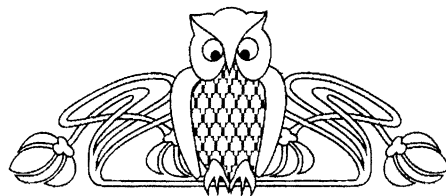




УДК 535+57 (023)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ TiO_2 ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ СВЕТОДИОДНОГО СИНЕГО (405 нм) ИЗЛУЧЕНИЯ НА МИКРООРГАНИЗМЫ



Е.С. Тучина, Н.М. Абаева, В.В. Тучин

Саратовский государственный университет

E-mail: kliany@rambler.ru

E-mail: tuchin@sgu.ru

Исследованы закономерности индуцированного синим излучением изменения численности популяции *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* в присутствии наночастиц. Подавляющий эффект действия синего излучения на бактерии *S. aureus* не носил дозозависимого характера.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, микроорганизмы, диоксид титана.

Using TiO_2 Nanoparticles for the Photodynamic Action of Led Blue (405 nm) Radiation on Microorganisms

E.S. Tuchina, N.M. Abaeva, V.V. Tuchin

The regularities of radiation-induced changes in the population quantity of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* in the presence of blue LED light and nanoparticles were studied. The effect of the blue radiation on the bacteria *S. aureus* was not dose-dependent.

Key words: phototherapy, microorganisms, titanium dioxide.

В настоящее время фотодинамическое воздействие используется для лечения раковых заболеваний, при антимикробной терапии, все более распространено при проведении различных физиотерапевтических и косметических процедур [1–5]. Данный метод основан на сочетанном действии лазерных или светодиодных источников излучения и красителей-фотосенсибилизаторов [3–5].

Известно более 400 веществ, обладающих свойствами фотосенсибилизаторов, среди которых производные хлоринов, бензопорфиринов, нафтало- и фталоцианинов [1–6]. Альтернативой или дополнением к существующим фотосенсибилизаторам могут стать наночастицы различной природы и структуры [7–9].

Нанокатализаторы принципиально отличаются от фотосенсибилизаторов механизмом генерации активных форм кислорода. Молекула кислорода на поверхности на-

ночастицы изначально находится в триплетном состоянии. Аналогичная молекула фотосенсибилизатора содержит связанный, каталитически неактивный синглетный кислород. Только под влиянием фотовоздействия его молекула переходит в триплетное состояние и становится готовой к участию в активизации кислорода среды [9].

Широко известно, что наночастицы серебра обладают выраженным бактерицидным эффектом. Антимикробную активность демонстрируют наночастицы меди, цинка, железа, оксидов металлов [8, 9]. Существенные преимущества перед серебряными наночастицами имеют наночастицы диоксида титана. Титан не относится к группе тяжелых металлов, не является ксенобиотиком, эффективно генерирует синглетный кислород [9].

Целью работы являлось изучение действия синего (405 нм) излучения в сочетании с наночастицами диоксида титана на различные микроорганизмы.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись микроорганизмы: *Staphylococcus aureus* 209 P, *Escherichia coli* 113-13, *Candida albicans* 184 (ГИСК им. Л.А. Тарасевича, г. Москва). Микроорганизмы выращивали при температуре 37°C на ГРМ-агаре.

В качестве источника синего излучения использовали светодиод с максимумом спектра испускания $\lambda = 405 \pm 20$ нм и плотностью мощности 31.5 мВт/см². Во всех экспериментах режим излучения был непрерывный. Время облучения варьировали от 5 до 30 мин.



В качестве фотокатализатора использовали наночастицы диоксида титана (TiO_2) в концентрации 0.02%.

Для проведения экспериментов использовали схему, разработанную ранее [10]. Для создания асептических условий иммунологический полистирольный 96-луночный планшет помещали в стеклянный или пластиковый корпус. Источник света располагали над ячейками планшета. При постановке опытов использовали суточную культуру исследуемого штамма. Бактериальную взвесь готовили в стерильном физиологическом растворе; конечная концентрация составляла 5 тыс. микробных клеток на 1 мл. Из разведения микроорганизмов 10000 мк/мл 0.1 мл взвеси вносили в 0.9 мл раствора фотокатализатора, инкубировали в течение 10 мин необходимого времени без доступа света. Из конечного разведения, а также из раствора фотокатализатора бактериальную взвесь в объеме 0.2 мл вносили в ячейки планшета. Воздействие проводили на бактериальные клетки во взвеси, находящейся в соответствующих ячейках, последовательно увеличивая дозу излучения. После воздействия взвеси бактерий переносили на чашки Петри с плотной питательной средой и равномерно распределяли по поверхности стерильным шпателем. Учет результатов проводили путем подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ) через 24–72 ч после инкубации при 37°C. Контролем служили взвеси бактерий, не обработанные наночастицами и не подвергнутые облучению. Каждый экспе-

римент проводили в десятикратной повторности.

Результаты

Установлено, что микроорганизмы *S. aureus* чувствительны к действию синего излучения. Последовательное увеличение времени облучения от 5 до 30 мин приводило к сокращению числа колоний на 30–77%. На следующем этапе изучали действие синего излучения на клетки *S. aureus*, обработанные диоксидом титана. Показано, что при использовании фотокатализатора чувствительность данных микроорганизмов к действию синего излучения возрастает. Отмечено уменьшение числа колоний на 60–80% после воздействия в течение 5–30 мин. Необходимо отметить, что эффект синего излучения не носил зависимость от дозы характера. Число КОЕ после 10–15 мин облучения было выше, чем после 5 мин. После 30 мин воздействия снова наблюдалось снижение численности. Данная динамика сохранялась и после обработки клеток *S. aureus* фотокатализатором (рис. 1).

Для дальнейших исследований в качестве модельного объекта использовали грамотрицательные микроорганизмы *E. coli*. Было установлено, что данный микроорганизм устойчив к действию синего излучения. Уменьшение числа колоний происходило на 7–10% и недостоверно отличалось от контроля. Применение диоксида титана для обработки клеток *E. coli* также не обеспечивало бактерицидного действия излучения (рис. 2).

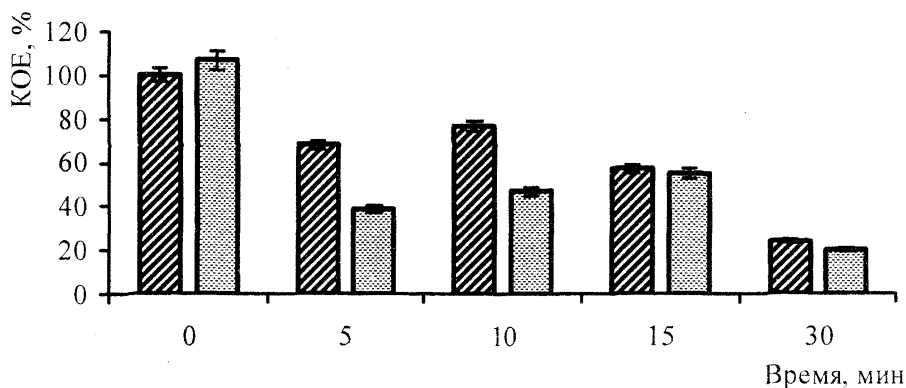


Рис. 1. Действие синего (405 нм) светодиодного излучения на микроорганизмы *S. aureus*:

▨ – синее излучение; ▩ – синее излучение + TiO_2

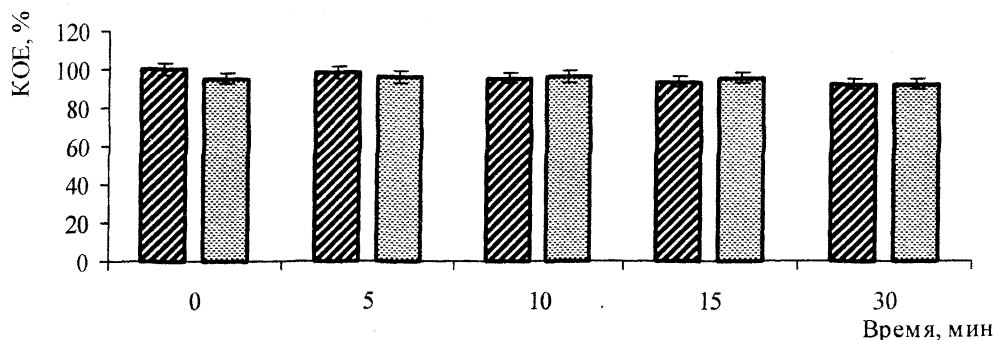


Рис. 2. Действие синего (405 нм) светодиодного излучения на микроорганизмы *E. coli*:
 ▨ – синее излучение; ▩ – синее излучение + TiO₂

На следующем этапе работы изучали чувствительность дрожжей *C. albicans* к фотодинамическому воздействию. Облучение клеток данного вида микроорганизмов синим светом обеспечивало незначительный угнетающий эффект. Сокращение числа КОЕ от-

мечено на 10–15 % при варьировании времени облучения от 5 до 30 мин. После обработки клеток *C. albicans* диоксидом титана и облучении синим светом произошло уменьшение числа колоний на 10–20% (рис. 3).

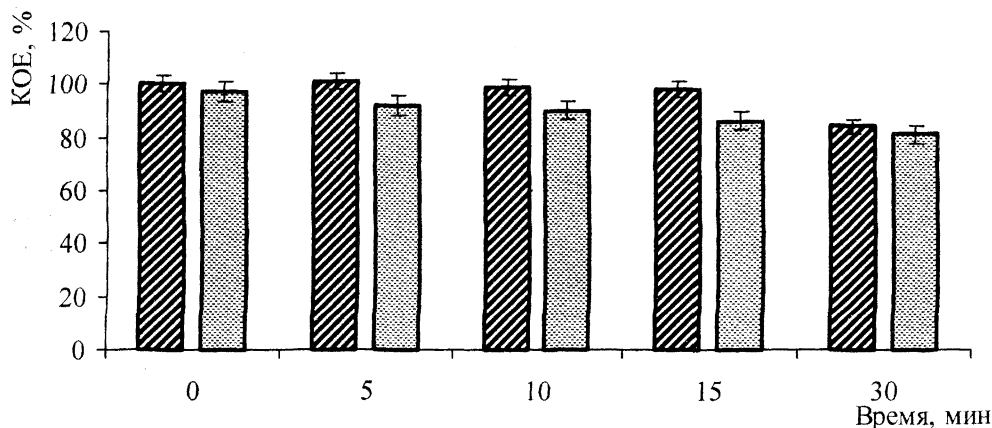


Рис. 3. Действие синего (405 нм) светодиодного излучения на микроорганизмы *C. Albicans*:
 ▨ – синее излучение; ▩ – синее излучение + TiO₂

Обсуждение

В последние десятилетия лазерная и световая терапия, в том числе и с использованием синего (400–420 нм) излучения, активно развивается и находит широкое применение при лечении заболеваний, вызванных различными микроорганизмами.

В ходе исследований установлено, что *S. aureus* был наиболее чувствителен к фотодинамическому воздействию. Клеточная стенка грамположительного типа, характерная для данного вида, обуславливает адгезию моле-

кул фотокатализатора на своей поверхности, а пористая структура пептидогликана не может препятствовать проникновению активных форм кислорода внутрь клетки [5, 6]. Также известно, что в клетках *S. aureus* содержатся разнообразные порфирины. Сложноорганизованные молекулы порфиринов имеют максимум поглощения в пределах от 400 до 420 нм и выступают в качестве эндогенных фотосенсибилизаторов, т.е. в их присутствии под действием излучения усиливается выход синглетного кислорода [11, 12].



Наличие подобных молекул-мишеней в бактериальной клетке повышает ее чувствительность к действию синего излучения. Тем не менее полного подавления роста *S. aureus* отмечено не было. Вероятно, это связано с наличием особых механизмов устойчивости, направленных на устранение, «тушение» молекул синглетного кислорода. В частности, эту функцию в клетках микроорганизмов выполняют такие ферментные комплексы, как каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза [13].

Показано, что бактерии *E. coli* были устойчивы к синему излучению, а также к его действию в сочетании с фотокатализатором. Клетки *E. coli* имеют клеточную стенку грамотрицательного типа: на поверхности содержится липополисахарид, образующий труднопроницаемую внешнюю мембрану [5]. Ввиду подобного строения взаимодействие наночастиц с поверхностью клетки затруднено. Время существования активных форм кислорода, образующихся в окружающей среде, недостаточно для того, чтобы проникнуть внутрь клетки и вызвать ее гибель.

Синее излучение не оказывало угнетающего воздействия на дрожжи *C. albicans*. Фотодинамический эффект при использовании наночастиц также был недостаточен для угнетения клеток данного микроорганизма. Дрожжи *Candida* являются эукариотическими организмами: их ядерный аппарат заключен в собственную оболочку [5, 13]. Количество образующихся активных форм кислорода при действии излучения с данными параметрами недостаточно, чтобы вызвать существенные изменения в структуре клеточной мембраны, органелл или генетического аппарата.

Таким образом, было установлено, что реакция микроорганизмов на действие синего излучения в сочетании с наночастицами зависит от строения их клеток и физиологических особенностей.

Выражаем признательность Л.Е. Долотову за разработку светодиодного облучателя и помощь при проведении экспериментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2009–2010 гг.)» (госконтракты №2.1.1/4989, №2.2.1.1/2950), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России (2009–2013 гг.)» (госконтракт №02.740.11.0484).

Библиографический список

1. Dougherty T.J. Photodynamic therapy // Medical radiology innovations in radiation oncology. 1988. №1. P.175–188.
2. Бриль Г.Е. Молекулярные аспекты биологического действия низкоинтенсивного лазерного излучения // Актуальные проблемы патологии. Саратов, 2001. С.124–136.
3. Васильев Н.Е., Озиренко А.П. Антимикробная фотодинамическая терапия // Лазерная медицина. 2002. Т.6, №1. С.32–38.
4. Дуванский В.А. Фотодинамическая терапия в комплексном лечении больных с острыми гнойными заболеваниями мягких тканей // Лазерная медицина. 2003. Т.7, № 4. С.41–45.
5. Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? // J. Photochem. Photobiol. 2004. №3. P.436–450.
6. Demidova T.N., Hamblin M.R. Photodynamic therapy targeted to pathogens // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2004. №17. P.245–254.
7. Feng Q. L., Wu J., Chen G. Q. et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* // J. Biomed. Mater. Res. 2000. №52. P.662–668.
8. Sunada K., Watanabe T., Hashimoto K. Studies on photokilling of bacteria on TiO_2 thin film // J. Photochem. Photobiol. 2003. №156. P.227–233.
9. Баллюзек Ф.В., Куркаев А.С., Сентле Л. Нанотехнологии в медицине. СПб., 2008. 103 с.
10. Тучина Е.С., Тучин В.В., Альтшулер Г.Б., Ярославский И.В. Фотодинамическое воздействие красного (625 нм) излучения на бактерии вида *Propionibacterium acnes*, обработанные фотосенсибилизатором // Естественные и технические науки. 2008. №2(34). С.90–93.
11. Lambrecht S.A., Demidova T.N., Aalders M.C. et al. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice // J. Photochem. Photobiol. 2005. №4. P.503–509.
12. Дерябин Д.Г. Стафилококки: экология и патогенность. Екатеринбург, 2000. 238 с.
13. Ермилова Е.В. Молекулярные аспекты адаптации прокариот. СПб., 2007. 299 с.