



УДК 577.344.3

## ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА МИКРООРГАНИЗМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНЕГО (405 нм) ИЗЛУЧЕНИЯ И НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА (III)

Е. С. Тучина<sup>1</sup>, П. О. Петров<sup>1</sup>, В. И. Кочубей<sup>2</sup>, В. В. Тучин<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Саратовский государственный университет

<sup>2</sup>Институт проблем прецизионной механики и управления РАН, Саратов

<sup>3</sup>Университет Оулу, Финляндия

E-mail: klianuy@rambler.ru

Изучено влияние светодиодного синего (405 нм) излучения в сочетании с наночастицами оксида железа III на бактерии *Staphylococcus aureus* 209 P, *S. simulans* и *Dermabacter hominis*. Показано, что синий (405 нм) свет в сочетании с наночастицами Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> обладал угнетающим действием в отношении *Dermabacter hominis*: снижение численности отмечено на 94% после 30 мин воздействия.

**Ключевые слова:** синее (405 нм) излучение, микроорганизмы, наночастицы, оксид железа III.

### Photodynamic Action on Microorganisms Using Blue (405 nm) Light and Iron Oxide III Nanoparticles

E. S. Tuchina, P. O. Petrov, V. I. Kochubey, V. V. Tuchin

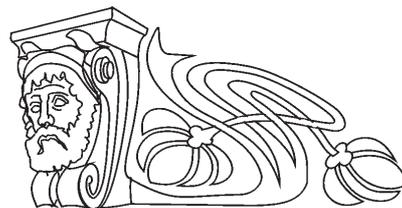
The effect of blue (405 nm) LED radiation in combination with iron oxide III nanoparticles on *Staphylococcus aureus* 209 P, *S. simulans* and *Dermabacter hominis* was investigated. It was shown that the blue (405 nm) light in combination with Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles strongly depressed *Dermabacter hominis*: decrease in bacterial population quantity on 94% after 30 min of exposure was observed.

**Key words:** blue light, nanoparticles, iron oxide.

#### Введение

В последнее десятилетие происходит активное развитие нанотехнологий, что связано с междисциплинарным характером исследований, интеграцией различных областей знаний. Использование наноструктурных материалов в медицине и здравоохранении является перспективным и востребованным направлением [1, 2].

Часто бактериальные инфекции возникают при повреждениях (ожоги, раны) или системных поражениях (аллергические дерматиты) кожи и слизистых оболочек [3]. Значительную эффективность при лечении подобных заболеваний демонстрирует фотодинамическая терапия с использованием излучения УФ или синей областей спектра в сочетании с соответствующими фотосенсибилизаторами (порфирины, аминолевулиновая кислота) [4, 5]. Существенно расширить возможности антимикробной фотодинамической терапии при борьбе с причинами подобных заболеваний может появление новых фотосенсибилизаторов с боль-



шим выходом синглетного кислорода или более эффективным образованием активных радикалов. Основой для фотосенсибилизаторов нового поколения могут стать такие наночастицы, как TiO<sub>2</sub>, Ag, Au, ZnO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SiO<sub>2</sub> [6–11].

В связи с вышеизложенным представляет интерес изучить чувствительность бактерий, ассоциированных с заболеваниями кожи и слизистых оболочек организма человека, к совместному действию синего (405 нм) излучения и наночастиц оксида железа III.

#### Материалы и методы

Объектами для исследования послужили следующие микроорганизмы: типовой штамм *Staphylococcus aureus* 209 P (ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Москва), клинические штаммы *S. simulans* и *Dermabacter hominis*, выделенные из синусовых пазух больных гайморитом. Микроорганизмы выращивали при температуре 37 °С на универсальной плотной питательной среде (ГРМ-агар, Оболенск, Россия).

В качестве источника излучения использовали светодиод с длиной волны 405 нм (синее излучение – СИ) и плотностью мощности 31.5 мВт/см<sup>2</sup>.

Синтез наночастиц Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> проводился следующим образом: к 20 мл водного раствора хлорида железа III (FeCl<sub>3</sub>) (концентрация 250 мг/мл) постепенно добавляли 6 мл водного 40%-ного раствора аммиака. Проводили перемешивание в ультразвуковой ванне в течение 10 мин до приобретения раствором характерного коричневого цвета, что свидетельствовало об образовании гидроксида железа III: FeCl<sub>3</sub>+3H<sub>2</sub>O+3NH<sub>3</sub>=Fe(OH)<sub>3</sub>+3NH<sub>4</sub>Cl.

Гидроксид железа III центрифугировали и высушивали в течение 24 ч. Затем при обжиге при 450 °С происходило разложение гидроксида железа III с образованием оксид железа III: 2Fe(OH)<sub>3</sub>=Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+3H<sub>2</sub>O.

Полученные наночастицы Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> имели средний размер 8 нм, в экспериментах использовали суспензию наночастиц Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в концентрации 0.001%.



Спектры оптической плотности водных растворов наночастиц измеряли с помощью спектрофотометра Lambda 950 (ParkinElmer Ink., USA) (рис. 1).

Для измерения температуры растворов использовали цифровой мультиметр (MY62, Mastech, China) с погрешностью измерения  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ .

При постановке опытов использовали суточную культуру исследуемого штамма. Бактериаль-

ную взвесь готовили в стерильном физиологическом растворе, из разведения микроорганизмов  $10^5$  мк/мл 0.1 мл взвеси вносили в 0.9 мл раствора наночастиц, инкубировали в течение 15 мин времени без доступа света. Из конечного разведения, а также из раствора наночастиц взвесь в объеме 0.1 мл вносили в ячейки иммунологического полистирольного планшета. Источник излучения располагали над ячейками планшета.

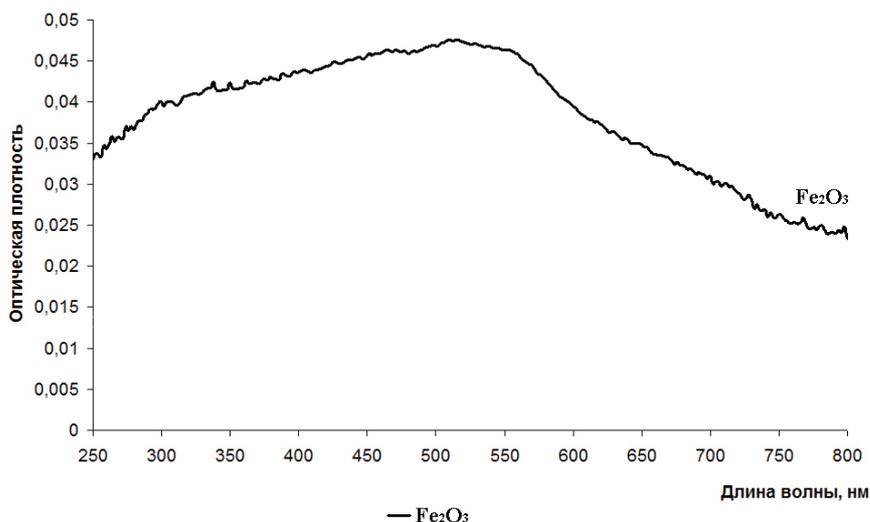


Рис. 1. Спектр оптической плотности водного раствора наночастиц  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  в концентрации 0.001%

Облучали бактериальные взвеси в течение 5, 10, 15 и 30 мин. 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  $37^\circ\text{C}$ . Контролем служили взвеси бактерий, не обработанные наночастицами и не подвергнутые облучению; контрольные значения принимали за 100%.

Каждый эксперимент проводили в 10-кратной повторности. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel 2010.

### Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы исследовали действие синего (405 нм) излучения на микроорганизмы. Установлено, что СИ оказывало незначительное подавляющее действие на рост *S. aureus* 209 P, вызывая снижение числа КОЕ в среднем на 30% (рис. 2, а). Облучение синим светом *S. simulans* приводило к уменьшению численности на 11–42% при увеличении экспозиции от 10 до 30 мин (рис. 2, б).

Показано, что действие СИ на *D. hominis* носило дозозависимый угнетающий характер: сокращение числа КОЕ происходило 2–37% (рис. 2, в). Отмечено изменение температуры облученных взвесей на  $1^\circ\text{C}$  по сравнению с контролем (таблица).

### Изменение температуры взвеси, содержащей *S. aureus* 209 P, при воздействии инфракрасного лазерного излучения

Время, мин	Т $^\circ\text{C}$	
	Синее излучение	Синее излучение + $\text{Fe}_2\text{O}_3$
0	22	22
5	22.5	23.5
10	23	24
15	23	25
30	23	26
$\Delta T^\circ\text{C}$	1	4
$\Delta T_{\text{p-ра}} - \Delta T_{\text{СИ}}, ^\circ\text{C}$	0	3

В ходе дальнейшей работы изучали действие синего (405 нм) излучения на микроорганизмы, обработанные наночастицами оксида железа III. Совместное действие СИ и наночастиц приводило к угнетению роста *S. aureus* 209 P на 2–82%

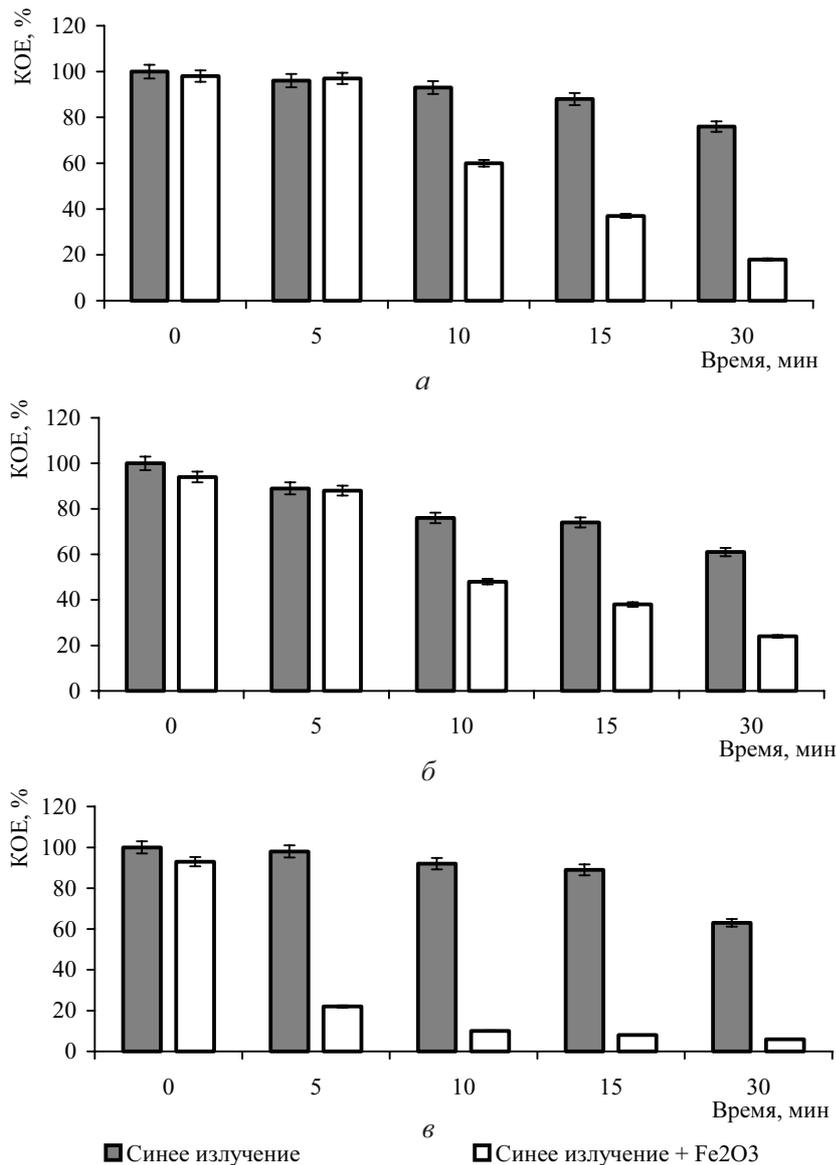


Рис. 2. Изменение численности микроорганизмов при воздействии излучения и наночастиц: а – *S. aureus* 209 P; б – *S. simulans*; в – *Dermabacter hominis*

при варьировании времени облучения от 5 до 30 мин (см. рис. 2, а). Существенное снижение КОЕ *S. simulans* зафиксировано после 10 мин облучения и составляло 52%, облучение в течение 15 мин вызывало снижение численности на 63%, в течение 30 мин – на 76% (см. рис. 2, б). Наиболее выраженный подавляющий эффект совместного действия СИ и наночастиц Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> отмечен для *D. hominis*: после 5 мин облучения снижение КОЕ достигало 78%, после 30 мин – 94% (см. рис. 2, в). Показано, что температура взвесей, содержащих наночастицы Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, повышалась в среднем на 4 °С (см. таблицу).

Многими авторами показано, что синее (400–420 нм) излучение обладает угнетающим действием на ряд патогенных и условно-пато-

генных микроорганизмов: *Haemophilus parainfluenzae*, *Propionibacterium acnes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* [4, 5, 12–14]. Нами установлено, что доза 35 Дж/см<sup>2</sup> синего (405 нм) излучения эффективнее подавляет рост *P. acnes*, чем метициллин-чувствительного или метициллин-устойчивого штаммов *Staphylococcus epidermidis* [15].

Известно, что чувствительность бактерий к излучению синей области спектра зависит от присутствия в их клетках эндогенных фотосенсибилизаторов – порфиринов, а также от содержания ферментов антиоксидантной защиты [4, 5, 16, 17]. Так, клетки *P. acnes* и *P. gingivalis* характеризуются повышенным содержанием порфиринов и их производных и отсутствием



системы нейтрализации активных форм кислорода; поскольку данные микроорганизмы – строгие анаэробы, даже молекулярный кислород для них является токсичным [4, 5, 12, 13]. В клетках стафилококков также содержатся порфирины, но выживание бактерий обеспечивается за счет работы сложного комплекса пигментов (каротиноиды, стафилоксантины) и белков (каталаза, супероксиддисмутаза), которые обеспечивают тушение синглетного кислорода и других активных радикалов, образующихся при фотодинамическом воздействии [16, 17]. Наличием подобных защитных механизмов можно объяснить незначительный (15–25%) подавляющий эффект, который оказывало действие синего (405 нм) излучения на исследованные нами микроорганизмы. Колонии *S. aureus* 209 P и *Dermbacter hominis* имеют желтовато-коричневую окраску, что косвенно подтверждает наличие каротиноидов в их клетках и обеспечивает устойчивость к синему излучению. Колонии *S. simulans* имеют белый цвет, содержание каротиноидов снижено, вследствие чего данные бактерии были более чувствительны к облучению синим светом.

В ходе данного исследования было установлено, что использование наночастиц Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в сочетании со светодиодным синим (405 нм) излучением вызывает снижение численности бактерий ассоциированных с гнойно-септическими заболеваниями кожи и слизистых.

Активный интерес к наноматериалам обусловлен тем, что при переходе в наноразмерное состояние происходит изменение ряда фундаментальных свойств вещества. Одним из главных факторов, определяющих физические характеристики наноразмерных объектов, выступает развитая поверхность, что определяет преобладание поверхностных явлений [1, 2, 6–11, 18].

Механизм фототоксического действия наноразмерных оксидов металлов, в том числе Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, заключается в следующем. Активация оксида металла под действием УФ или видимого света приводит к образованию электронно-дырочных пар (e<sup>-</sup>h<sup>+</sup>). Это вызывает разрушение молекул воды, всегда присутствующей в окружающей клетку среде, до OH<sup>-</sup> and H<sup>+</sup>. Молекулы растворенного кислорода превращаются в супероксиданион радикалы (\*O<sup>-2</sup>). При взаимодействии \*O<sup>-2</sup> с H<sup>+</sup> формируются HO<sup>2•</sup> радикалы, а затем пероксиданионы HO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Они способны вступить в реакцию с H<sup>+</sup> с образованием молекул перекиси водорода H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, токсичной для бактериальной клетки. Особенностью Fe<sup>3+</sup> в данном случае является способность взаимодействовать с OH<sup>-</sup> и формирование крайне токсичного гидроксидного радикала HO<sup>•</sup> [1, 8, 9].

Для успешной фотоактивации определяющую роль играет совпадение максимума испускания источника излучения и максимума поглощения фотосенсибилизатора (фотокатализатора) [4]. Как видно из рис. 1, оксид железа III эффективно поглощает свет с длиной волны 405 нм. Соответственно идет активная генерация свободных радикалов, что приводит к гибели большого числа бактериальных клеток.

Известно, что особенности взаимодействия наночастиц оксидов металлов с живыми клетками определяются их размерами. Рядом автором показано, что наночастицы Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с размерами 10–15 нм обладают большей фотоактивностью, чем частицы с размером более 25 нм [19, 20]. В наших исследованиях размер наночастиц Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, равный 8 нм, мог обеспечить лучший контакт с бактериальными клетками, что также определило различия в изменении численности микроорганизмов.

Наночастицы оксидов металлов могут обеспечивать не только фотокаталитический, но и фототермический эффект. Локальный нагрев частиц вблизи мембран бактериальных клеток может вызвать их повреждение, а при множественном действии – и киллинг [21, 22]. Показано, что нагрев взвесей, содержащих наночастицы Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, составлял 4 °С. Следовательно, можно предположить, что подобные процессы или отсутствовали, или влияние их на клетки микроорганизмов было незначительным.

#### Благодарности

Авторы выражают признательность зав. лабораторией биофизики, канд. физ.-мат. наук Л.Е. Долотову за разработку светодиодного облучателя и помощь при проведении экспериментов.

Работа выполнена в рамках гранта 224014 PHOTONICS4LIFE, FP7-ICT-2007-2; проектов 1.4.09, 2.1.1/4989 и 2.2.1.1/2950 Министерства образования и науки РФ, госконтрактов 02.740.11.0484, 02.740.11.0770, и 02.740.11.0879; FiDiPro, TEKES Program, Finland (40111/11).

#### Список литературы

1. Schaefer H.-E. Nanoscience. Berlin: Springer, 2010. 790 p.
2. Баллюзек Ф. В., Куркаев А. С., Сентле Л. Нанотехнологии в медицине. СПб., 2010. 103 с.
3. Microbiology of wounds / eds. S. Parcival, K. Cuttling. N.Y. : CRC Press, 386 p.
4. Hamblin M. R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? // J. Photochem. Photobiol. 2004. № 3. P. 436–450.
5. Kotoku Y., Kato J., Akashi G., Hirai Y., Ishihira K. Bactericidal effect of a 405-nm diode laser on *Porphyromonas gingivalis* // Laser Phys. Lett. 2009. Vol. 6, № 5. P. 388–392.



6. Premanathan M., Karthikeyan K., Jeyasubramanian K., Manivannan G. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation // *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 2011. Vol. 7, № 2. P. 184–192.
7. Morones J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Ramirez T. J., Yacaman M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles // *Nanotechnology.* 2005. Vol. 16. P. 2346–2353.
8. Sunada K., Watanabe T., Hashimoto K. Studies on photokilling of bacteria on TiO<sub>2</sub> thin film // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2003. Vol. 156. P. 227–233.
9. Kiwi J., Nadochenko V. Evidence for the mechanism of photocatalytic degradation of the bacterial wall membrane at the TiO<sub>2</sub> interface by ATR-FTIR and laser kinetic spectroscopy // *Langmuir.* 2005. Vol. 21. P. 4631–4641.
10. Chirita M., Grozescu I. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – nanoparticles, physical properties and their photochemical and photoelectrochemical applications // *Chem. Bull. «POLITEHNICA».* 2009. Vol. 54(68), № 1. P. 1–8.
11. Huang W. -C., Tsai P. -J., Chen Y. -C. Functional Gold Nanoclusters as Antimicrobial Agents for Antibiotic-resistant Bacteria // *Nanomedicine.* 2007. Vol. 2. P. 777–787.
12. Van der Meulen F.W., Ibrahim K., Sterenborg H.J.C.M., Alphen L.V., Maikoe A., Dankert J. Photodynamic destruction of *Haemophilus parainfluenzae* by endogenously produced porphyrins // *J. Photochem. Photobiol. B.* 1997. Vol. 40. P.204–208.
13. Ashkenazi H., Malik Z., Harth Y., Nitzan Y. Eradication of *Propionibacterium acnes* by its endogenic porphyrins after illumination with high intensity blue light // *Immunol. Med. Microbiol.* 2003. Vol. 35. P. 17–24.
14. Enwemeka C. S., Williams D., Hollosi S., Yens D., Enwemeka S. K. Visible 405-nm SLD light photo-destroys  
meticcillin-resistance *Staphylococcus aureus in vitro* // *Lasers Surg. Med.* 2008. Vol. 40. P. 734–737.
15. Tuchina E. S., Tuchin V. V. Low-intensity LED (625 and 405 nm) and laser (805 nm) killing of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* // *Proceedings of SPIE.* 2009. Vol. 7165. P. 716501–716507.
16. Sailer R., Strauss W. S. L., Konig K., Ruck A., Steiner R. Correlation between porphyrin biosynthesis and photo-dynamic inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* after incubation with 5-aminolevulinic acid. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 1997. Vol. 36. P. 236–242.
17. Clauditz A., Resch A., Wieland K. P., Peschel A., Götz F. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress // *Infection and immunity.* 2006. Vol. 74, № 8. P. 4950–4953.
18. Schrand A. M., Rahman M. F., Hussain S. M. Schlager J. J., Smith D. A., Syed A. F. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment // *Nanomed. Nanobiotech.* 2010. Vol. 2. P. 544–568.
19. Dehner C., Barton L., Maurice P. A., Dubois J. L. Size-dependent bioavailability of hematine ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles to common aerobic bacteria // *Environ. Sci / Technol.* 2011. Vol. 45. P. 977–983.
20. Jiang J., Oberdrster G., Elder A., Gelein R., Mercer P., Biswas P. Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase? // *Nanotoxicology.* 2008. Vol. 2. P. 33–42.
21. Zharov V. P., Kim J. -W., Curiel D. T., Everts M. Self-assembling nanoclusters in living systems: application for integrated photothermal nanodiagnostics and nanotherapy // *J. Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 2005. Vol. 1. P. 326–345.
22. Larson T. A., Bankson J., Aaron J., Sokolov K. Hybrid plasmonic magnetic nanoparticles as molecular specific agents for MRI / optical imaging and photothermal therapy of cancer cells // *Nanotechnology.* 2007. Vol. 18.

УДК 612-057.875

## ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКТИВНОСТЬ НА ЭКЗАМЕНАЦИОННЫЙ СТРЕСС СТУДЕНТОВ-СПОРТСМЕНОВ ПЕДАГОГИЧЕСКОГО ВУЗА

С. С. Павленкович<sup>1</sup>, Л. К. Токаева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Саратовский государственный университет

E-mail: svpravlin@yandex.ru

<sup>2</sup>Саратовский государственный медицинский университет

E-mail: normalf@yandex.ru

Изучены психоэмоциональный статус и функциональное состояние студентов-спортсменов при экзаменационном стрессе. Установлено, что основой психоэмоционального напряжения спортсменов является личностная тревожность. Выявлена четкая зависимость между уровнем личностной тревожности студентов-спортсменов и характером их реактивности на экзаменационный стресс.

**Ключевые слова:** студенты, адаптация, сердечно-сосудистая система, экзаменационный стресс, личностная и реактивная тревожность.



### Psychophysiological Reactivity to Examination Stress Student-Athletes Pedagogical University

S. S. Pavlenkovich, L. K. Tokaeva

Studied the psycho-emotional status and functional status of student-athletes in a situation of examination stress. It was established that the basis of psycho-emotional stress athletes is trait anxiety. A clear relationship between the level of personal anxiety of students-