



Конкурс для школьников «Гениальные мысли» Автореферат проекта победителя конкурса

Название работы – Исследование эффективности фотодинамической терапии с использованием природных фотосенсибилизаторов и коллоидного раствора наночастиц золота.

Автор – Кукушкина Юлия Владимировна (10 класс, МБОУ "Гимназия № 64" города Липецка, ГОАОУ "Центр поддержки одаренных детей "Стратегия", г. Липецк).

Руководитель – Корнеева Анастасия Олеговна, к.т.н., доцент кафедры строительного материаловедения и дорожных технологий ФГБОУ ВО «ЛГТУ», ПДО Детского технопарка «Кванториум».

Основная идея работы, цели, задачи

Цель исследования: сравнение биологического эффекта комплексного раствора фотосенсибилизатора, спиртовой настойки чаги и раствора наночастиц золота, полученных методом лазерной абляции, а также изучение особенностей их фотодинамического эффекта на бактериальную микрофлору.

Задачи:

- 1) Приготовление коллоидного раствора наночастиц золота методом лазерной абляции.
- 2) Провести анализ полученных наночастиц с помощью сканирующей зондовой микроскопии.
- 3) Приготовить комплексный ФС.
- 4) Осуществить забор и посев бактериальной суспензии на питательные среды.
- 5) Выполнить облучение лазером подготовленных согласно таблице и заполненных соответствующими растворами чашек Петри с колониями бактерий.
- 6) Провести сравнительный анализ полученного бактерицидного эффекта.
- 7) Приготовить спиртовую настойку чаги, оценить возможность применения в качестве ФС.

В работе изучается процесс фотодинамической терапии, посвященный проблеме элиминации *H.pylori*. Данный метод не только снижает планку экономической доступности, но и является достаточно селективным, кроме того, ФДТ это одно из перспективных направлений в лечении онкологических заболеваний. В работе предлагается способ получения комплексного фотосенсибилизатора, составляющими которого являются наночастицы золота с размером от 70 до 120 нм и производное хлорина е₆.

Основные результаты

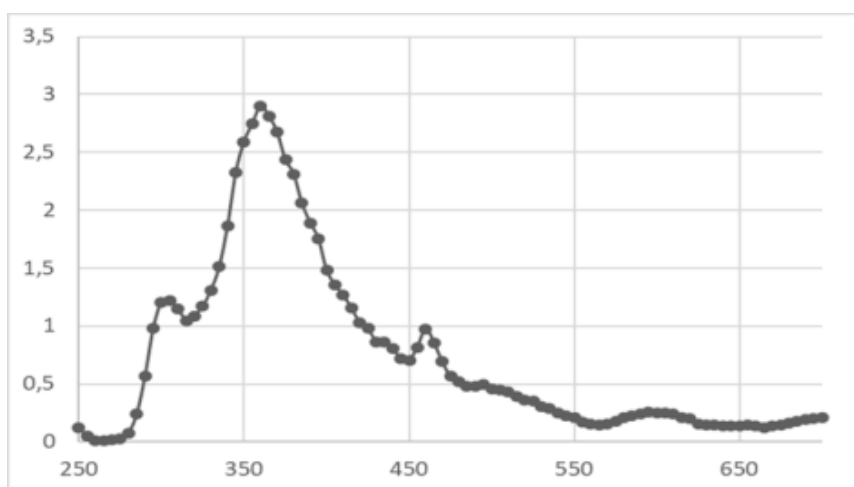
Методика получения коллоидного раствора наночастиц золота

1. Изготовить тонкую пластинку золота (не более 1 мм в ширину) небольшого размера (в моем случае площадь поверхности 1 см²).
2. Поместить ее в заполненную на 1/3 бидистиллированной водой чашку Петри.
3. Провести облучение лазером инфракрасного диапазона (длина волны 1064 нм) на мощности 20 Вт.
4. Облучение проводить 7.5 мин (до получения насыщенно окрашивания раствора в лиловый цвет).

В ходе облучения лазером с поверхности металла происходит высекание («испарение») наночастиц в виде аэрозоля с последующей конденсацией в водной среде. В исследовании использовалась золотая пластинка стандартной 585 пробы, что свидетельствует о содержании 58,5% золота, меди в сплаве 33,5%, а остальные 8% составляет серебро в совокупности с другими лигатурными металлами, что говорит о том, что в данном случае помимо наночастиц золота в аэрозоли возможно присутствие и других металлов.

Приготовление спиртовой настойки чаги

На основе графика спектра люминесценции спиртовой настойки чаги, предположено, что данный раствор можно использовать в качестве фотосенсибилизатора. Для приготовления спиртовой настойки чаги нами был использован 70% спирт и гриб – чага. Мы брали небольшое количество измельчённого гриба (~ 100г) и залили 200мл медицинского спирта. Настаивали 3 дня.

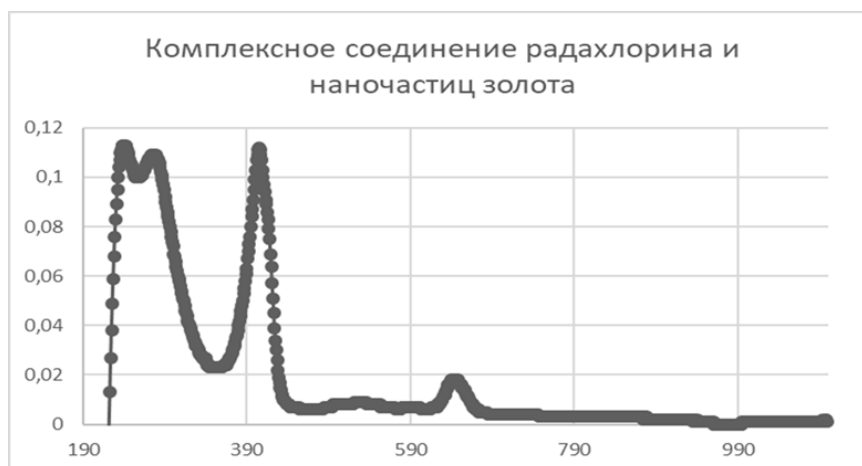


Спектр люминесценции спиртовой настойки чаги.

На графике показана зависимость оптической плотности от длины волны.

Приготовление комплексного фотосенсибилизатора

Полученный раствор наночастиц золота был слит вместе с фотосенсибилизатором в пропорции 2:1. Нами были сняты спектры поглощения полученного раствора, из графика отчётливо видно, что комплексный фотосенсибилизатор имеет пики возбуждения на 200, 230, 420, 650 нм.



Спектр поглощения комплексного ФС.

На графике показана зависимость оптической плотности от длины волны.

Забор и выращивание колоний бактерий *Helicobacter pylori*

Выполнен забор биологического материала путем эндоскопической щипцовой биопсии с последующей идентификацией наличия *H. pylori* с помощью тест-системы.

Для выращивания колонии бактерий *H. pylori*. была как наиболее специфичная выбрана кровяной Агар-Агар». Выращивание колоний бактерий производилось из взвеси с концентрацией клеток 1×10^3 кл/м³ при температуре близкой к температуре тела - 37°C и влажности 97-98% в микроаэрофильных условиях, т.к. *Helicobacter pylori* растет только при концентрации кислорода не более 5% в термостате в закрытой емкости. Время выращивания в нашем случае составило 5 дней (до визуализации специфичных этому роду колоний бактерий, представленных на фотографии в виде «мраморной крошки»).



Поверхность чашки Петри с колониями бактерии *Helicobacter pylori*

Всего в работе использовалась 24 чашки Петри.

Антибактериальная фотодинамическая терапия

Проведена серия опытов, представленных в таблице 1.

1 а/в/с	2- а/в/с	3- а/в/с	4- а/в/с	
+	+	+	+	Колонии <i>Helicobacter pylori</i>
+	-	+	-	Радахлорин
-	+	+	-	коллоидный раствор наночастиц золота

а	а	а	а	Лазер 662 нм, режим непрерывный, мощность 1 Ватт, доза облучения 100 Дж/ см ² , время облучения 5мин
в	в	в	в	Лазер 662Нм, режим непрерывный, мощность 1 Ватт, доза облучения 100 Дж/ см ² , время облучения 10мин
с	с	с	с	Лазер 662 нм, режим непрерывный, мощность 1 Ватт, доза облучения 150 Дж/ см ² , время облучения 5мин

Получены следующие результаты (оценено присутствие колоний *Helicobacter pylori* по трех бальной системе).

Наличие колоний <i>Helicobacter pylori</i>											
1			2			3			4		
а	в	с	а	в	с	а	в	с	а	в	с
+	-	-	+	+	+	-	-	-	+++	+++	+++

Выводы, заключение, перспективы

Проведено исследование по определению возможности применения комплексного ФС (Радахлорин + наночастицы золота) и спиртовой настойки чаги в ФДТ. Получены наночастицы золота методом лазерной абляции, с помощью сканирующего зондового микроскопа, установили, что средний размер от 70 до 120нм. Выполнен забор и выращивание колоний бактерий рода *H.pylori*. Приготовлен комплексный раствор ФС, а также доказано его бактерицидное воздействие. Установлена возможность использования спиртового раствора чаги в качестве ФС. Работа продолжается.

Список цитированных источников

1. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов / М.: Дрофа, 2006, 285 с.
2. Гейниц А.В., Сорокатый А.Е., Ягудаев Д.М., Трухманов Р.С. Фотодинамическая терапия. История создания метода и ее механизмы // Лазерная медицина, Т. 11, № 3, С. 42-46, 2007.
3. Красновский (мл) А.А. Фотодинамическое действие и синглетный кислород // Биофизика, Т. 49, № 2, С. 305-321, 2004.
4. М.А. Radzig and I.A. Khmel // Effect of silver nanoparticles on growth and biofilm formation of Gram-negative bacteria, mechanisms of action// II International Conference on Antimicrobial Research (ICAR2012), Lisbon, Portugal, 21-23 ноября 2012
5. Nadtochenko V., Alboushev A., Radzig M., Barbashov Yu., Kiwi J., Kostrov A., Kanaev A., Museur L., Khmel I. // Plasmonics and antibacterial effects // 7th European meeting on solar chemistry and photocatalysis: environmental applications, Porto, Portugal – 17-20 June 2012. p. 21-23.
6. М. А. Радциг, О. А. Кокшарова, В.А. Надточенко, И. А. Хмель// Изучение антибактериальных эффектов ионов золота. Биогенез наночастиц золота с помощью различных бактерий // XXIV Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 7-9 февраля 2012 г.
7. Странацко Е.Ф., Коробоев У.М., Толстых М.П. Фотодинамическая терапия при гнойных заболеваниях мягких тканей // Хирургия. – 2000. – № 9. – с. 67–70.
8. Странацко Е.Ф. Исторический очерк развития фотодинамической терапии // Лазерная медицина. – 2002. – Т. 6(1). – с. 4–8.
9. <http://www.findpatent.ru/patent/225/2253675.html>