

СОНОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ТЕРАФТАЛА В БАКТЕРИАЛЬНЫХ СРЕДАХ

© 2015 г. С.Е. Мазина, А.В. Гопин, А.Л. Николаев, П.И. Тальберг*

*Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1/3;*

**Городская поликлиника № 19 Департамента здравоохранения г. Москвы, 109451, Москва, ул. Верхние поля, 34/4*

E-mail: sonophytum@mail.ru

Поступила в редакцию 09.10.14 г.

На бактериальных модельных системах показано, что введение в среду растворимого соединения – натриевой соли октакарбокситфаллоцианина кобальта (терафтал) – приводит в ультразвуковом поле к уменьшению доли выживших бактерий. Высказано предположение, что терафтал в бактериальной среде образует твердую фазу, которая в ультразвуковом поле вызывает деструкцию примыкающих к нанокристаллам структур вследствие локализованных кавитационных процессов.

Ключевые слова: ультразвук, бактерии, соносенсибилизация.

В последние годы большое внимание уделяется исследованию проблемы локализации акустической энергии в биологических системах на искусственно созданных неоднородностях. Такой интерес объясняется реальной возможностью практического применения этого явления в различных областях медицины, в частности, в методе сонодинамической терапии онкологических заболеваний [1–4]. Проведенные на модельных объектах эксперименты свидетельствуют о том, что введение твердофазных модификаторов (соносенсибилизаторов) в полимерную гидрогелевую матрицу приводит в ультразвуковом поле к локальному повышению температуры [5]. Возможность селективного накопления соносенсибилизатора, при наличии физико-химических особенностей выбранного участка (локуса), обеспечивает избирательность несфокусированного ультразвукового воздействия преимущественно в месте локализации соносенсибилизатора. Это дает основание предположить, что введение твердофазных неоднородностей в биологическую систему существенно изменит ее отклик на ультразвуковое воздействие. При этом агрегаты соносенсибилизаторов являются своеобразными физико-химическими концентраторами акустической энергии. Вариацией режимов акустического воздействия и размеров частиц твердофазных соносенсибилизаторов можно вызвать либо обратимое изменение примыкающих к нанокристаллам структур, либо полную их деструкцию. Первый вариант дает возможность использо-

вать твердофазное модифицирование полимерных структур для конструирования лекарственных контейнеров с управляемым ультразвуком выходом лекарственного вещества [6], второй используется в сонодинамической терапии онкологических заболеваний [7].

В экспериментах с гелевыми системами показано, что интенсивность кавитационных шумов, возникающих в модифицированных гелях при ультразвуковом воздействии, превышает аналогичную для немодифицированного образца более чем в пять раз. Усиление деструкционных процессов в присутствии твердофазного модификатора – фталлоцианина железа – обнаружено по изменению молекулярно-массового распределения полимера, подвергнутого ультразвуковому воздействию [8]. Целью данной работы была оценка на бактериальных модельных системах изменения отклика на ультразвуковое воздействие, вызванное введением в эти системы октакарбокситфаллоцианина кобальта (терафтал) – соносенсибилизатора, используемого в доклинической и клинической практике ультразвуковой терапии онкозаболеваний. Бактерии, в определенном приближении, могут рассматриваться в качестве биологических моделей структурных элементов злокачественных опухолей. Поэтому результаты такого исследования могут быть использованы при выборе соносенсибилизаторов и оптимальных режимов в ультразвуковой терапии онкологических заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальная модель. В качестве объектов исследования были выбраны бактерии *Escherichia coli* (*Enterobacteriaceae*), которые являются постоянным компонентом кишечной микрофлоры, и бактерии *Enterococcus spp.*, также приспособленные к существованию в организме человека. Культуру *E. coli* выращивали на среде Mac Conkey, культуру *Enterococcus spp.* – на среде PCA (Standard Methods agar) в чашках Петри при 37°C. Эксперименты с ультразвуковым воздействием проводили на суспензии микроорганизмов. Для приготовления суспензии бактериальные клетки смывали с поверхности среды физиологическим раствором с pH 7,1. Концентрация бактерий в суспензии составляла 2000–4000 клеток на 1 мл рабочего раствора.

Модификатор. В качестве модификатора использовали терафтал. Терафтал (ГНЦ НИОПИК, Россия) является эффективным соносенсибилизатором в методе сонодинамической терапии онкологических заболеваний [9] и хорошо растворим в воде. Его кальциевые соли и кислые формы нерастворимы. В выбранных условиях он не проявляет токсичности в отношении бактерий *Escherichia coli* и *Enterococcus spp.*

Оценка воздействия ультразвука на суспензию бактерий. В суспензию бактерий добавляли терафтал в концентрации 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} М, время инкубации составляло 10 мин. После инкубации суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин. Ультразвуковую обработку проводили в термостатируемой ячейке при температуре 37°C. Объект располагали на расстоянии 1 см от излучателя (ближнее поле), частота 0,88 МГц, интенсивность воздействия варьировали в интервале 1–3 Вт/см².

Эффективность ультразвукового воздействия оценивали по числу клеток, выживших после этого воздействия, используя принцип Коха, – способность каждой бактериальной клетки образовывать колонию на гелевой среде. Сопоставляли количества колониеобразующих единиц бактерий у следующих образцов – контрольная суспензия (без обработки), суспензия после обработки ультразвуком, суспензия с добавлением терафтала и суспензия с добавлением терафтала, обработанная ультразвуком. Для этого из каждого образца отбирали стандартную пробу (1 мл), которую переносили на среду для культивирования микроорганизмов в чашку Петри. Чашки с бактериями термостатировали при 37°C в течение суток, после чего производили подсчет выросших колоний. Итоговый результат воздействия оценивали в процентном

соотношении количества колониеобразующих единиц бактерий контроль/опыт.

Оценка сорбции терафтала на бактериальных клетках. Была проведена оценка сорбционной способности бактерий *Escherichia coli* по отношению к терафталу. Для этого в 3 мл суспензии бактерий с концентрацией бактериальных клеток $16 \cdot 10^6$ в 0,9%-м водном растворе NaCl вносили 15 и 30 мкл раствора терафтала с концентрацией 10^{-3} М (концентрация терафтала составляла $5 \cdot 10^{-6}$ и 10^{-5} М соответственно). Аналогично готовили суспензию бактерий, не содержащую терафтал. Полученные суспензии помещали в термостат (температура 37°C) и инкубировали 10 мин. Затем суспензии центрифугировали и центрифугат фотометрировали (длина волны 680 нм) относительно образца, не содержащего терафтал (0,9%-го водного раствора NaCl).

Сканирующая электронная микроскопия. Изменение морфологии поверхности бактерий исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа. Для фиксации жидкую суспензию бактерий переносили на мембранные фильтры или вырезали участки геля с нанесенными на поверхность бактериями. Фиксацию проводили в жидком пропане в течение 30 с, затем переносили образцы в охлажденный до –78°C ацетон, температуру ацетона повышали до комнатной в течение 2 ч.

Материал высушивали в вакууме в установке сушки в критической точке (HSP-2, Hitachi, Япония), в атмосфере CO₂, напыляли золотом (толщина слоя составляла 20 нм) в ионно-напылительной установке ИВ-3 (EIKO). Далее его просматривали в электронном микроскопе S-405A (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Ультраструктуру бактериальных клеток оценивали методом трансмиссионной микроскопии. Суспензию клеток центрифугировали, добываясь осаждения клеток перед каждой сменой раствора.

Фиксацию клеток из контроля после обработки ультразвуком (частота 0,88 МГц, интенсивность 1 Вт/см², время воздействия 10 мин) и терафталом (10^{-5} М, время контакта с терафталом 10 мин) производили 2%-м раствором глутарового альдегида на 0,05 М фосфатном буфере, далее дофиксировали 1%-м раствором четырехоксида осмия. Начальное обезвоживание проводили в серии спиртов восходящей концентрации до абсолютного, с дополнительным контрастированием уранилацетатом в 70%-м спирте (сутки), и заливали в эпоксидные смолы.

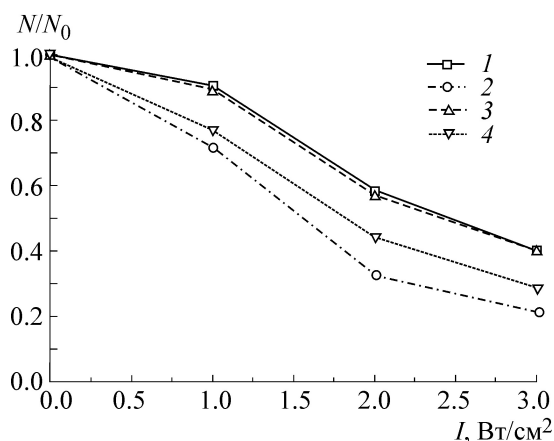


Рис. 1. Зависимости доли выживших клеток (N/N_0) *Enterococcus spp.* после облучения ультразвуком от интенсивности воздействия в водной среде: 1 – ультразвук, 2 – ультразвук совместно с терафталом (10^{-4} М), 3 – ультразвук совместно с терафталом (10^{-5} М), 4 – ультразвук совместно с терафталом (10^{-6} М).

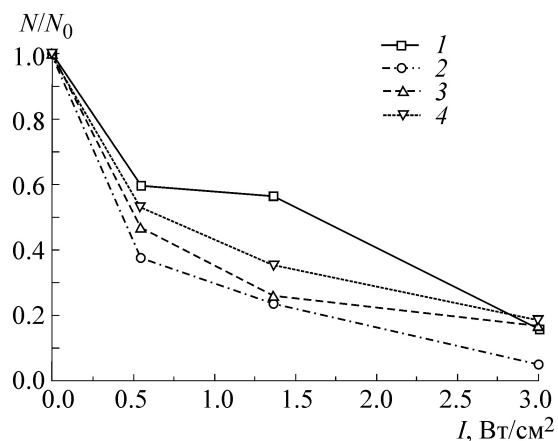


Рис. 2. Доля выживших бактериальных клеток *Escherichia coli* после совместного действия ультразвука и терафталла в водной среде: 1 – ультразвук, 2 – ультразвук совместно с терафталом (10^{-4} М), 3 – ультразвук совместно с терафталом (10^{-5} М), 4 – ультразвук совместно с терафталом (10^{-6} М).

Срезы контрастировали по Рейнолдсу и затем просматривали в электронном микроскопе TEM Jeol (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ультразвуковое воздействие оказывало влияние на жизнеспособность бактерий, причем число выживших бактерий уменьшалось по мере увеличения мощности ультразвука. Введение в суспензию терафталла снижало долю выживших бактерий, и это уменьшение имело достаточно четко выраженную концентрационную зависимость (рис. 1, 2). Заметный и воспроизводимый эффект влияния терафталла на уменьшение числа выживших клеток в ультразвуковом поле наблюдался при интенсивностях ультразвукового воздействия 1–5 Вт/см². При этом концентрация терафталла находилась в пределах 10^{-4} – 10^{-5} М. Воздействие меньшей акустической мощности практически не отражалось на жизнеспособности клеток, а при большей мощности влияние терафталла переставало быть заметным.

Из приведенных данных следует, что введение терафталла уменьшает долю выживших бактерий. При этом уменьшение имеет достаточно четко выраженную концентрационную зависимость.

Определение сорбционной способности бактерий показало, что терафталл в используемых концентрациях практически полностью переходит из раствора в клеточные системы. Определение концентрации терафталла проводили спектрофотометрически при длине волны 690 нм. Согласно полученным данным, можно предпо-

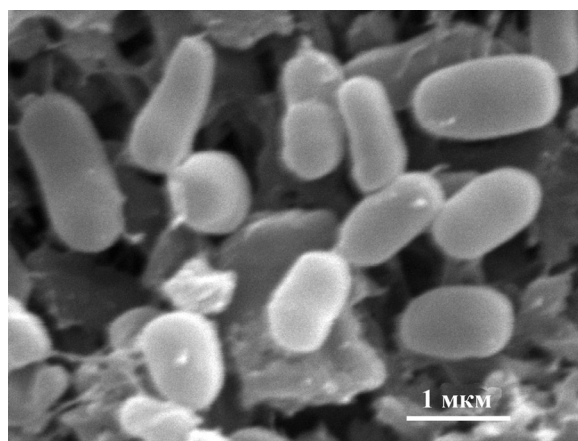


Рис. 3. Нативные клетки *Enterococcus spp.*

ложить, что терафталл образует твердую фазу кальциевой соли на поверхности бактериальных клеток, где локализованы ионы кальция.

Данные сравнительного электронно-микроскопического исследования морфологии клеток бактерий рода *Enterococcus* и *E. coli*, подвергшихся действию ультразвука, терафталла и их совместному действию, приведены на рис. 3–5. Из сопоставления представленных результатов следует, что при ультразвуковом воздействии часть бактерий подвергается деструкции, сопровождающейся, по-видимому, вытеканием цитоплазмы или небольшой деформацией клеток (рис. 4). Однако большая часть клеток сохраняет нормальную форму. При обработке терафталлом на поверхности клеток образуется кристаллический чехол. У бактерий, предвари-

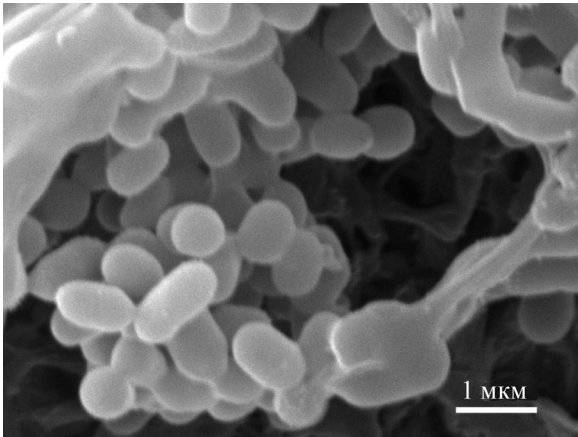


Рис. 4. Бактерии *Enterococcus spp.* после ультразвуковой обработки.

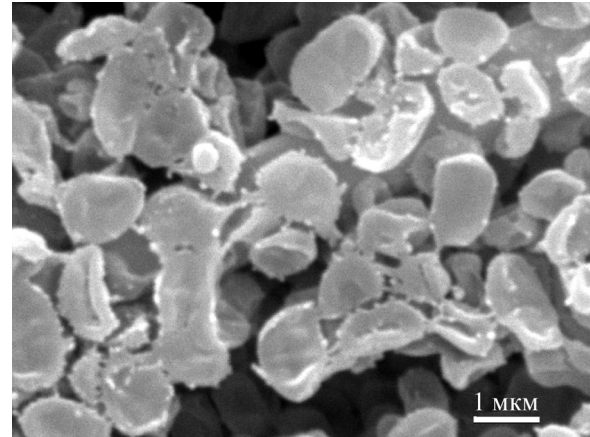


Рис. 5. *Enterococcus spp.* после совместного действия ультразвука и терафтал.

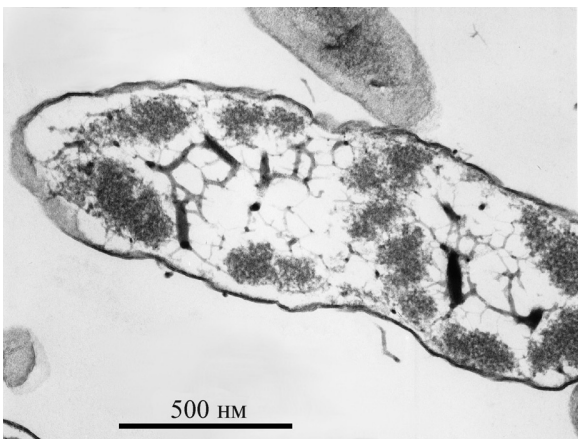


Рис. 6. Нативные бактерии *Escherichia coli*.

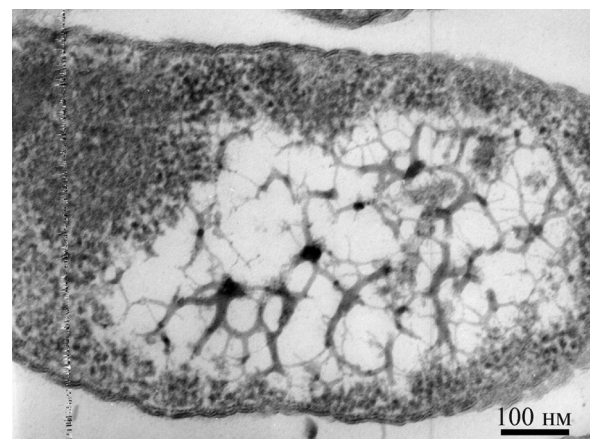


Рис. 7. Бактерия *Escherichia coli*, находившаяся в среде, содержащей терафтал.

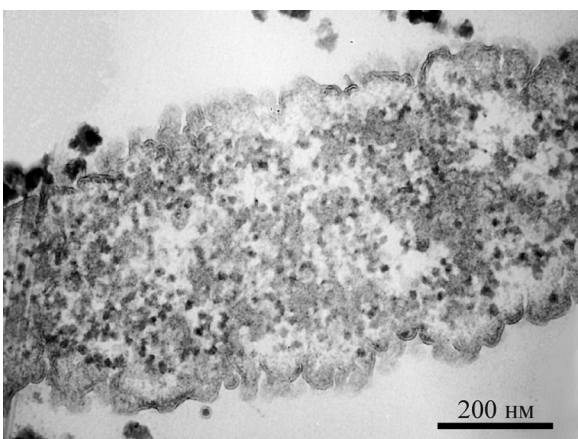


Рис. 8. Бактерия *Escherichia coli* после обработки ультразвуком в присутствии терафтал.

тельно обработанных терафталом, после обработки ультразвуком практически у всех обра-

ботанных клеток наблюдается изменение формы и разрушение мембран (рис. 5).

Сравнительный анализ электронно-микроскопических фотографий *Escherichia coli* позволил выявить следующие различия в морфологии исследованных образцов, которые представлены на рис. 6–8. Обработка клеток терафталом приводит к изменению контура клеток, появляется извилистость мембраны, повышается пористость мембраны, увеличивается количество электронно-плотного материала в клетках (рис. 7). При обработке ультразвуком и терафталом плазматическая мембрана приобретает большое число инвагинаций, на срезе заметны многочисленные широкие поры и разрывы в мембране. В мезосомах наблюдается гранулярный материал высокой электронной плотности, концевые участки мезосом сильно расширены, заняты электронно-плотными гранулами (рис. 8).

Можно предположить, что терафтал располагается в цитоплазме и мембранных структурах клетки, а также в концевых участках мезосом, способствует увеличению пористости плазмалеммы. Воздействие ультразвуком приводит к появлению разрывов плазматической мембраны бактериальной клетки.

На основании литературных данных [10] можно предположить, что при введении терафтала в биологическую систему происходит образование его нерастворимой кальциевой соли на мембранных структурах бактериальных клеток. Это приводит к интенсификации кавитационных процессов в районе твердофазных включений при наложении ультразвукового поля, результатом чего является разрушение и гибель клеток. Образование твердой фазы кальциевой соли терафтала может происходить и вне бактерий в результате взаимодействия терафтала с продуктами их метаболизма. И в том и в другом случае, в соответствии с экспериментальными данными, образуется нерастворимая форма кальциевой соли терафтала, в присутствии которой усиливаются деструкционные эффекты ультразвука.

Предположение об увеличении вклада ультразвуковых кавитационных процессов в уменьшение доли выживших бактерий в присутствии твердой фазы кальциевой соли терафтала было подтверждено экспериментами [10].

На основании проведенных экспериментов можно утверждать, что введение твердофазных модификаторов в биологические системы суще-

ственно усиливает ультразвуковые деструкционные процессы. Это усиление связано с локальным увеличением интенсивности кавитации, вызванное уменьшением кавитационной прочности среды в зоне локализации агрегатов соносенсибилизатора. Следует отметить, что введение твердофазных модификаторов может быть использовано как фактор направленного изменения ультразвуком свойств биологических объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Umemura, Y. Nagashiko, R. Nishikagi, and K. Umemura, *Japan J. Cancer Res.* **81** (9), 962 (1990).
2. Yo. Harada, K. Ogawa, Yu. Irie, et al., *J. Controlled Release.* **149**, 190 (2011).
3. Sh. Yamaguchi, H. Kobayashi, T. Narita, et al., *Ultrasonics Sonochemistry.* **18**, 1197 (2011).
4. L. Serpe, *Nanotechnol Rev.* **1**, 173 (2012).
5. А. Л. Николаев, А. В. Гопин, Д. С. Чичерин и др., *Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия* **49** (3), 203 (2008).
6. А. Л. Николаев, А. В. Гопин, В. Е. Божевольнов и др., *Акуст. журн.* **55** (4–5), 565 (2009).
7. А. Л. Николаев, В. Л. Зеленко, Д. С. Чичерин и др., *Рос. хим. журн.* **56** (5–6), 52 (2012).
8. Николаев А.Л., Гопин А.В., Трещалина Е.М. и др., *Рос. хим. журн.* **57** (2), 83 (2013).
9. Н. В. Андропова, Е. М. Трещалина, Д. В. Филоненко и др., *Рос. биотерапевт. журн.* **4** (3), 101 (2005).
10. А. Л. Николаев и П. М. Раевский, *Рос. хим. журн.* **5**, 105 (1998).

Sonosensitizing Action of Teraphtal in Bacterial Media

S.E. Mazina*, A.V. Gopin*, A.L. Nikolaev*, and P.I. Talberg**

**Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991, Russia*

***Moscow City Polyclinic № 19, Moscow Health Department, ul. Verkhnie Polya 34/4, Moscow, 109451 Russia*

Employing bacterial model systems it was shown that the introduction of the soluble compound – sodium salt of cobalt octacarboxyphthalocyanine (teraphtal) – into the medium led in an ultrasonic field to a decrease in the proportion of survived bacteria. It is suggested that in the bacterial environment teraphtal forms a solid phase, which in the ultrasonic field causes destruction of the structures adjacent to the nanocrystals due to localized cavitation processes.

Key words: ultrasound, bacteria, sonosensibilization