

Индукцированное ИК лазерным излучением фототоксическое воздействие конъюгатов плазмонно-резонансных наночастиц с красителем индоцианиновым зеленым на бактерии *Staphylococcus aureus*

Е.С.Тучина, В.В.Тучин, Б.Н.Хлебцов, Н.Г.Хлебцов

*Исследовано влияние ИК лазерного излучения ($\lambda = 805\text{--}808\text{ нм}$) на бактерии штамма *Staphylococcus aureus* 209 P, инкубированные в растворах индоцианинового зеленого, а также коллоидных золотых наноболочек, наноклеток и их конъюгатов с индоцианиновым зеленым. Установлено, что клетки *S. aureus* 209 P в равной степени подвержены действию ИК лазерного излучения ($\lambda = 805\text{ нм}$) после предварительной сенсibilизации индоцианиновым зеленым наночастицами золота отдельно и конъюгатами наночастиц с индоцианиновым зеленым. Отмечено усиление фотодинамического и фототермического эффектов на 5% после 30 мин облучения лазером (808 нм) бактерий, обработанных конъюгатами индоцианинового зеленого и наноклеток.*

Ключевые слова: ИК лазеры, наночастицы, индоцианиновый зеленый, бактерии золотистого стафилококка.

1. Введение

Исследования в области применения ИК лазерного излучения при лечении различных острых и хронических инфекционных заболеваний, а также при гнойно-септических и гнойно-воспалительных осложнениях известны достаточно давно [1, 2]. Терапевтический эффект ИК низкоинтенсивного лазерного излучения обычно связывают с усилением активности важнейших ферментов, с биосинтезом белков, ДНК, РНК, с пролиферацией клеток, регенерацией тканей, усилением микроциркуляции крови и лимфы, а также с активизацией работы иммунной системы.

Существенно большего терапевтического эффекта удается добиться при совместном использовании лазерного излучения и различных фотодинамических и фототермических красителей. В этом случае, помимо указанных выше биофизических механизмов светового воздействия, дополнительными факторами, обеспечивающими желаемый эффект, являются фотодинамическое, фототермическое и фототоксическое действия самого красителя при поглощении излучения. Следует отметить, что основными требованиями, предъявляемыми к молекулярным агентам, являются высокий выход синглетного кислоро-

да (или монооксида азота), высокий молярный коэффициент экстинкции, а также низкая темновая токсичность. Если рассматривать параметры облучения, то для фотодинамической и фототермической терапии лазерное излучение в области 750–850 нм также весьма перспективно благодаря существенной глубине проникновения света в биотканю.

Красителем, позволяющим получить как фотодинамический, так и фототермический эффекты на этих длинах волн, является индоцианиновый зеленый. Данный краситель активно используется во многих областях медицины (онкология, офтальмология, кардиология, хирургия, дерматология, косметология), поскольку обладает низкой токсичностью, легко и быстро выводится из организма [3, 4].

Стремительный прогресс в области нанотехнологий предоставил исследователям широкий арсенал новых материалов с уникальными оптическими и физико-химическими свойствами для применений в биологии и медицине. В частности, в последние годы получены положительные результаты использования наночастиц золота, серебра, оксидов кремния или титана как в защите от излучений, так и в биосенсорике, иммуноанализе, геномике, лечении онкологических и инфекционных заболеваний [5–9].

С точки зрения биологических и медицинских приложений особый интерес представляют наночастицы золота с плазмонным резонансом (ПР). Для большинства применений в биофизике и биомедицине [9] резонансные оптические свойства наноструктур должны попадать в окно прозрачности биотканей [10]. Спектральная настройка ПР наночастиц и соотношения между их эффективностями поглощения и рассеяния осуществляется путем изменения размера, формы, металла и структуры частиц [11–14]. Развитие технологий синтеза наночастиц за последние 10–15 лет [15, 16] предоставило широкий выбор объектов исследований, начиная от хорошо известных теперь золотых наностержней [17–24] и наноболочек [25–28] и заканчивая экзотическими структурами напо-

Е.С.Тучина. Национальный исследовательский Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; e-mail: kliany@rambler.ru

В.В.Тучин. Национальный исследовательский Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; Институт проблем точной механики и управления РАН, Россия, 410028 Саратов, ул. Рабочая, 24

Б.Н.Хлебцов. Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, лаборатория нанобиотехнологий, Россия, 410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13

Н.Г.Хлебцов. Национальный исследовательский Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, лаборатория нанобиотехнологий, Россия, 410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13

Поступила в редакцию 25 февраля 2011 г.

добие «наноклеток» [29]. В настоящей работе основное внимание уделено двум типам наночастиц – золотым наноболочкам и наноклеткам, состоящим из диэлектрического ядра и металлической оболочки толщиной несколько нанометров (для наноклеток ядро представляет собой дисперсионную среду). Выбор данных объектов обусловлен возможностью настройки ПР этих частиц в область прозрачности биотканей, а также их перспективностью и востребованностью в практической и экспериментальной биологии и медицине, где такие частицы используются в качестве нанобиотехнологической платформы.

В последние годы появился ряд работ, продемонстрировавших усиление биологической активности различных красителей при совместном применении их с ПР-наночастицами. Как правило, используются металлические наночастицы, к поверхности которых с помощью физической адсорбции или ковалентной пришивки прикреплены фотодинамические красители или антибиотики. Такие наноструктуры называют конъюгатами, а процедуру прикрепления биомолекулы к поверхности наночастицы часто называют функционализацией [30].

С практической точки зрения каждый из типов функционализации наночастиц имеет свои преимущества и недостатки: ковалентная пришивка обеспечивает прочную химическую связь красителя с поверхностью частицы и исключает десорбцию; электростатическое прикрепление, в свою очередь, не требует модификации молекул красителя и существенно проще с химической точки зрения.

Механизм усиления фотодинамического или фототоксического действия молекулярных красителей при конъюгации с ПР-наночастицами является на сегодняшний день дискуссионным. Можно предположить три возможных варианта: 1) усиление взаимодействия молекулы со световой волной за счет усиления поля вблизи поверхности частицы (по аналогии с гигантским комбинационным рассеянием вблизи шероховатой поверхности металла); 2) совместное фотодинамическое действие красителя и фототермическое действие частицы; 3) повышение локальной концентрации красителя при адсорбции конъюгата на поверхности клетки-мишени.

В пользу первого варианта говорят исследования группы Рассела, в которых авторам удалось добиться повышения квантового выхода синглетного кислорода или монооксида азота при фотодинамической терапии [31, 32]. В частности в работе [31] продемонстрировано удвоение квантового выхода синглетного кислорода с помощью фотосенсибилизатора фталоцианина при конъюгации его с золотыми наночастицами. Кроме того, конъюгация позволила увеличить стабильность агента при переводе его из органической фазы (толуол) в водную.

Эффективность использования совместных фотодинамических и фототоксических свойств конъюгатов была продемонстрирована на примере конъюгатов золотых наностержней с метиленовым синим [7] и индоцианиновым зеленым [33].

Наконец, в пользу концентрационных эффектов говорят работы по увеличению активности антибиотиков в смеси с наночастицами золота [34, 35].

Целью настоящего исследования являлась оценка влияния ИК лазерного излучения (805–808 нм) на клетки *Staphylococcus aureus* 209 P, инкубированные в растворах индоцианинового зеленого, коллоидных золотых наноболочек, наноклеток и их конъюгатов с индоцианиновым зеленым.

2. Материалы и методы

В качестве модельных были выбраны бактерии штамма *Staphylococcus aureus* 209 P (ГИСК им. Л.А.Тарасевича, Москва). Стафилококки выращивали при температуре 37°C на универсальной плотной питательной среде (ГРМ-агар, Оболенск). Источниками излучения служили диодные лазеры с максимумом на длине волны $\lambda = 805$ нм и плотностью мощности излучения 46 мВт/см² (Acculaser, Photothera Inc., США), а также с $\lambda = 808$ нм и плотностью мощности излучения 60 мВт/см² (LAS, Санкт-Петербург). Все эксперименты проводились в непрерывном режиме генерации.

Температура растворов измерялась цифровым мультиметром (МУ62, Mastech, Китай) с погрешностью измерения ± 0.5 °C. Фотосенсибилизатором служил водный раствор индоцианинового зеленого (ИЗ, Sigma-Aldich Co., США) с максимумом спектра поглощения на $\lambda = 775$ нм в концентрации 2.5 мкг/мл.

Золотые наноболочки (Au–S) получали по методике [36], основанной на направленном восстановлении золота на поверхности силикатных частиц, полученных по методу Стёбера [37]. Были получены суспензии наночастиц, состоящих из силикатного ядра диаметром 120 ± 15 нм и золотой оболочки толщиной 20 ± 7 нм. Концентрация наночастиц составляла $\sim 10^9$ мл⁻¹. Наночастицы с данными геометрическими параметрами имели ПР в ИК области (максимум экстинкции 850 нм). Оптическая плотность суспензии на данной длине волны составляла ~ 2 .

Протокол синтеза наноклеток золота (Au–C) состоял из двух основных этапов [38]: на первом этапе получали наночастицы серебра преимущественно кубической формы путем индуцированного сульфидом серебра полиольного синтеза, на втором этапе серебряные нанокубики использовали в качестве шаблона для преобразования в золотые наноклетки методом гальванического замещения серебра на золото. Полученные полые частицы имели средний размер 53 ± 5 нм, толщину стенки 7 ± 2 нм, размер по диагонали 78 нм и форму, которую в литературе принято называть «нанокейдж». Концентрация частиц составляла $\sim 10^{10}$ мл⁻¹, при этом ПР был локализован около 750 нм, а оптическая плотность суспензии на данной длине волны составляла ~ 2 .

Для получения конъюгата наночастиц с флуоресцентным красителем индоцианиновым зеленым использовали методику [39], схематически представленную на рис.1. Золотые наноболочки предварительно покрывали слоем оксида кремния контролируемой нанометровой толщины. Затем к суспензии покрытых слоем SiO₂ частиц добавляли 3-аминопропилтриметоксисилан для поверхностной функционализации частиц аминными группами. Образовавшиеся амин-функционализованные частицы осаждались на дно реакционной колбы. Осадок растворяли в водном растворе индоцианинового зеленого. В результате индоцианиновый зеленый адсорбировался на поверхности частиц за счет электростатического взаимодействия с положительно заряженными аминными группами. Полученный конъюгат центрифугировали и перерастворяли в воде или буфере. Расстояние между флуорофором и золотой поверхностью определялось в данном случае толщиной слоя SiO₂ и составляло 10–15 нм. Концентрация адсорбированного индоцианинового зеленого была оценена нами по разности оптической плотности конъюгата до и после процедуры адсорбции и составляла для двух видов частиц около 2.5 мкг/мл.

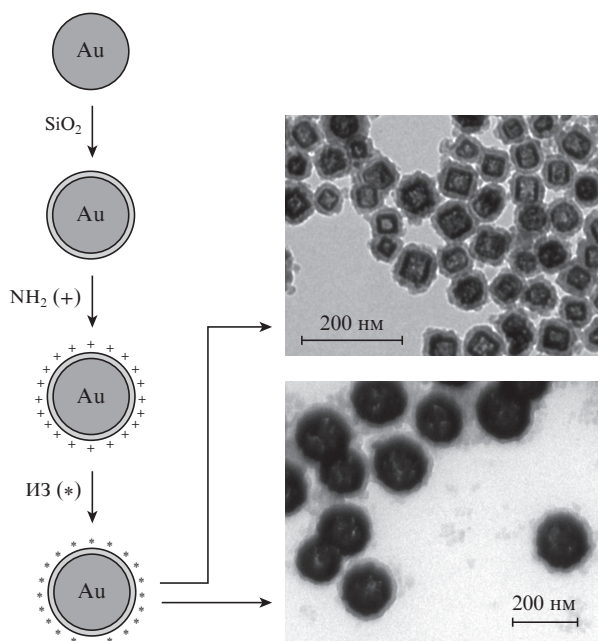


Рис.1. Схема синтеза конъюгата ПР-наночастиц (наноклейки – сверху, оболочка – снизу) с индоцианиновым зеленым (ИЗ).

На рис.2 представлены спектры экстинкции (коэффициента экстинкции) золотых наночастиц и наноклеток. Штриховыми кривыми показаны спектры наночастиц, покрытых оксидом кремния, сплошными – конъюгаты с индоцианиновым зеленым. Видно, что в случае использования наночастиц конъюгация приводит к появлению дополнительных пиков экстинкции в области около 800 нм, которые соответствуют молекулярному поглощению адсорбированного красителя. Для наноклеток, име-

ющих четко выраженный пик ПР около 750 нм, адсорбция красителя приводит к смещению максимума суммарной экстинкции в длинноволновую область.

Помимо конъюгатов наночастиц с индоцианиновым зеленым, мы исследовали фототермическую активность суспензий наночастиц в тех же концентрациях, но без красителя. Для увеличения коллоидной стабильности в буфере наночастицы конъюгировали с молекулами полиэтиленгликоля (ПЭГ), как описано в [40].

Геометрические, оптические и физико-химические параметры исследуемых образцов представлены в табл.1.

Для создания асептических условий в ходе эксперимента применяли стерильный одноразовый полистирольный 96-луночный планшет; источник излучения помещали над ячейками планшета. Использовалась культура *S. aureus* 209 P, предварительно выращенная в течение 24 ч при температуре 37 °С на плотной питательной среде. Бактериальную взвесь готовили в стерильном физиологическом растворе методом последовательных десятикратных разведений; конечная концентрация составляла 10^3 микробных клеток (м.к.) в 1 мл. Затем 0.1 мл взвеси из разведения 10^4 м.к./мл вносили в 0.9 мл раствора фотосенсибилизатора, наночастиц или конъюгатов и инкубировали в течение 15 мин без доступа света. Для оценки взаимодействия наночастиц с клетками *S. aureus* 209 P использовали электронный микроскоп Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) (рис.3).

Бактериальную взвесь из разведения 10^3 м.к./мл, а также из растворов фотосенсибилизатора и наночастиц вносили в ячейки планшета в объеме 0.1 мл. Облучение взвеси продолжалось 5, 10, 15 или 30 мин.

По истечении времени воздействия лазер выключали, в ячейки планшета помещали датчик мультиметра и измеряли температуру исследуемых растворов. Затем взве-

Табл.1. Геометрические, оптические и физико-химические параметры образцов.

Название образца	Концентрация ИЗ (мкг/мл)	Концентрация частиц (мл^{-1})	Длина волны максимальной экстинкции (нм)	Оптическая плотность (см^{-1})	Модификация поверхности
Водный раствор ИЗ	2.5	—	775	0.35	—
Конъюгат наночастиц с ИЗ	2.5	10^9	850	2	ИЗ
Конъюгат наноклеток с ИЗ	2.5	10^{10}	775	2	ИЗ
Суспензия наночастиц	—	10^9	850	2	ПЭГ
Суспензия наноклеток	—	10^{10}	750	2	ПЭГ

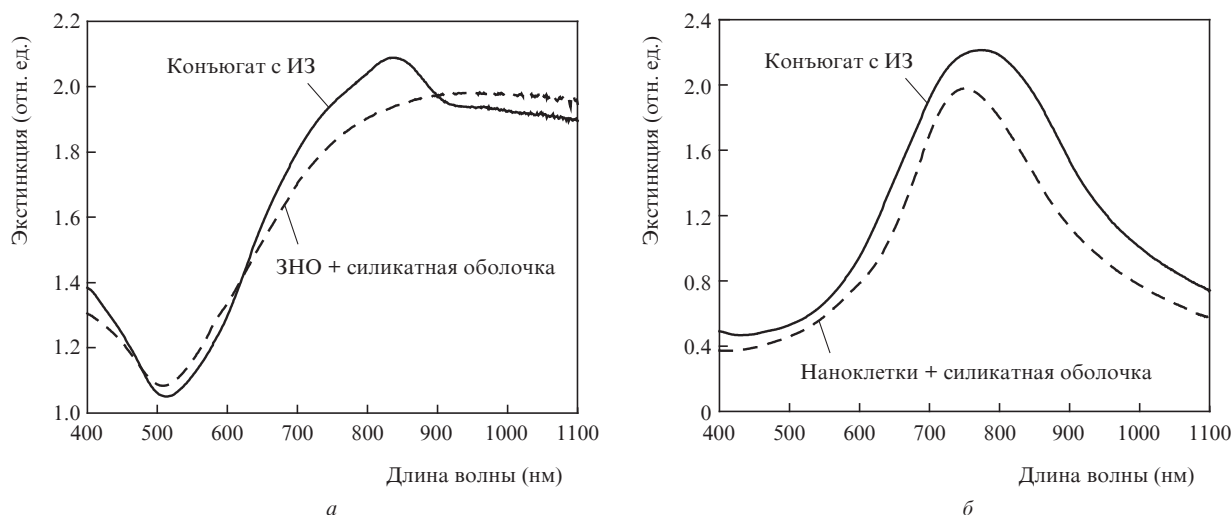


Рис.2. Спектры экстинкции золотых наночастиц (ЗНО) (а) и наноклеток (б) до конъюгации с индоцианиновым зеленым (штриховые кривые) и после конъюгации (сплошные кривые).

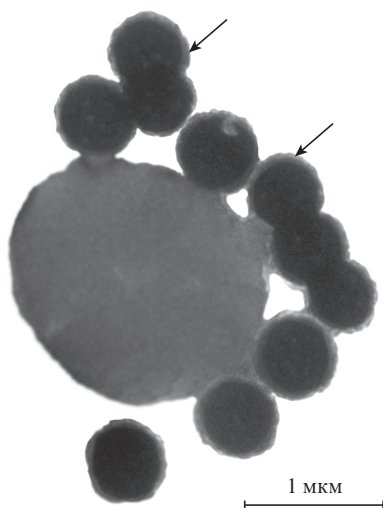


Рис.3. Клетка *S. aureus* 209 P, окруженная золотыми наносферами; стрелками обозначен внешний кремниевый слой, содержащий индоцианиновый зеленый (электронная микрофотография, увеличение 600 000[×]).

си бактерий из данных ячеек переносили на чашки Петри с плотной питательной средой и равномерно распределяли по поверхности стерильным шпателем. Через 24 ч после инкубации при 37 °С подсчитывали число колониеобразующих единиц (КОЕ). Для контроля служили взвеси бактерий, не обработанные сенсibilизатором и не подвергнутые облучению. Каждый эксперимент повторяли десятикратно.

3. Результаты

Установлено, что лазерное излучение с длиной волны 805 нм и интенсивностью 46 мВт/см² незначительно подавляет рост клеток *S. aureus* 209 P. Число КОЕ уменьшилось на 5%–21% по сравнению с контрольными данными (рис.4). При увеличении времени облучения от 0 до 30 мин температура физиологического раствора, содержащего бактерии, возросла всего на 1 °С (табл.2). Аналогичные результаты были получены при воздействии на бактериальные клетки лазерного излучения с длиной волны 808 нм и интенсивностью 60 мВт/см²: число КОЕ сократилось на 5%–24% (рис.5), температура облученного раствора повысилась также примерно на 1 °С (табл.2).

Известно, что индоцианиновый зеленый обладает достаточно сильным фототоксическим действием, что можно объяснить его фотодинамическим эффектом [4, 41–43]

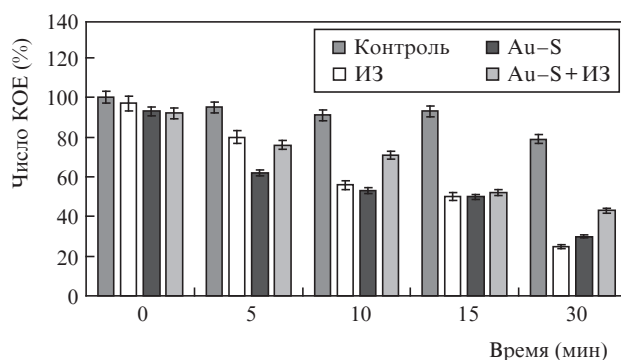


Рис.4. Влияние ИК лазерного излучения (805 нм) на бактерии, обработанные индоцианиновым зеленым (ИЗ), золотыми наноболочками (Au-S) и конъюгатами золотых наноболочек с индоцианиновым зеленым (Au-S+ИЗ).

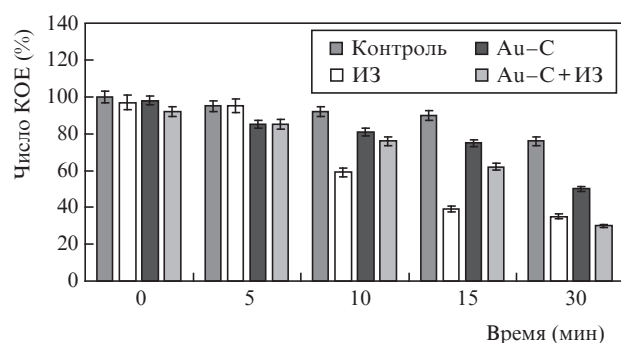


Рис.5. Влияние ИК лазерного излучения (808 нм) на бактерии, обработанные индоцианиновым зеленым (ИЗ), золотыми наноклетками (Au-C) и конъюгатами золотых наноклеток с индоцианиновым зеленым (Au-C+ИЗ).

или образованием цитотоксических конечных продуктов под действием света [44]. При использовании излучения лазера (805 нм, 46 мВт/см²) численность *S. aureus* 209 P в зависимости от длительности воздействия сократилась на 20%–75% (рис.4). Температура раствора, содержащего клетки микроорганизмов и индоцианинового зеленого, повысилась на 1.5 °С (табл.2). Облучение бактериальной взвеси излучением лазера (808 нм, 60 мВт/см²) приводило к сокращению числа КОЕ на 5%–65% (рис.5), температура раствора при этом возрастала не более чем на 1 °С (табл.2).

Установлено, что использование только наночастиц золота (независимо от формы) приводит примерно к такому же подавлению роста бактерий *S. aureus* 209 P, как и применение только красителя ИЗ. Обработка бактери-

Табл.2. Изменение температуры взвеси, содержащей бактерии *S. aureus* 209 P, при воздействии ИК лазерного излучения.

Время (мин)	Температура (°С)					
	λ = 805 нм			λ = 808 нм		
	ИК	ИК + Au-S	ИК + ИЗ + Au-S	ИК	ИК + Au-C	ИК + ИЗ + Au-C
0	22	22	22	22	22	22
5	23	24	23.5	23	23.5	25
10	23	25	24	23	24.5	25.5
15	23	25	25.5	23	25	26
30	23	26	27	23	28	26
	(1), [0]	(4), [3]	(5), [4]	(1), [0]	(6), [5]	(4), [3]

Примечание: ИК + Au-S – ИК излучение и золотые наноболочки, ИК + ИЗ + Au-S – ИК излучение и конъюгаты золотых наноболочек с индоцианиновым зеленым, ИК + Au-C – ИК излучение и золотые наноклетки, ИК + ИЗ + Au-C – ИК излучение и конъюгаты золотых наноклеток с индоцианиновым зеленым. В круглых скобках – увеличение температуры раствора при нагревании в течение 30 мин, в квадратных скобках – изменение температуры раствора без учета вклада ИК излучения.

альных клеток золотыми наноболочками в сочетании с лазерным излучением (805 нм, 46 мВт/см²) вызывала снижение численности *S. aureus* 209 P на 38% после 5 мин воздействия, на 47% после 10 мин, на 50% после 15 мин и на 70% после 30 мин (рис.4). За все время облучения температура раствора, содержащего бактериальные клетки и золотые наноболочки, возросла на 3°C (табл.2). При воздействии излучения (808 нм, 60 мВт/см²) на бактерии *S. aureus* 209 P, проинкубированные с золотыми наноклетками, отмечено сокращение числа КОЕ на 15%–50% по сравнению с контрольными данными (рис.5). При этом температура раствора, содержащего *S. aureus* 209 P и золотые наноклетки, увеличилась на 5°C (табл.2).

В ходе экспериментов было установлено, что применение в качестве фотосенсибилизаторов конъюгатов наночастиц с индоцианиновым зеленым не приводит к существенным синергетическим эффектам в подавлении исследуемых бактерий. Отмечено уменьшение числа КОЕ на 24%–57% по сравнению с контрольным (рис.4) при использовании лазерного излучения (805 нм, 46 мВт/см²) и конъюгатов индоцианинового зеленого с золотыми наноболочками. Температура такого раствора возрастала на 4°C при увеличении времени облучения от 0 до 30 мин (табл.2). Инкубация бактерий *S. aureus* 209 P с конъюгатами индоцианинового зеленого и наноклеток при облучении лазером (808 нм, 60 мВт/см²) приводила к снижению числа КОЕ на 15%–70% (рис.5). При этом температура облученного раствора повышалась на 3°C (табл.2).

4. Обсуждение

В ряде работ было показано, что комплексное использование наночастиц золота, фотодинамических красителей и лазерного излучения красного (600–660 нм) [5, 8] или инфракрасного (700–900 нм) [6, 7, 33] диапазонов весьма эффективно при антибактериальном воздействии на такие бактерии, как *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. По сравнению с обычными методами терапии, фотодинамические и фототермические технологии имеют существенные преимущества при лечении гнойно-воспалительных заболеваний, вызванных именно антибиотико-резистентными штаммами бактерий, поскольку у них не формируется устойчивость к используемым методам воздействия. Применение источников ближнего ИК излучения позволяет достаточно глубоко и неинвазивно воздействовать на очаг поражения. Следует отметить, что в указанных выше работах и в [45] использовались сравнительно высокие концентрации красителей (25–250 мкг/мл) в сочетании с ИК лазерным излучением (810 нм, 48 мВт/см², 30 мин). При этом наблюдалось подавление роста *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* на 90%–99%. В наших экспериментах концентрация красителя была на 1–2 порядка меньше (2.5 мкг/мл). Это связано с максимальной сорбционной емкостью коллоидов наночастиц золота. Простейшие оценки молярной концентрации красителя и концентрации частиц позволили оценить количество молекул красителя (~2000), адсорбированных на одну частицу, что соответствует молекулярному монослою. Даже при столь низкой массовой концентрации индоцианинового зеленого мы наблюдали выраженное угнетающее воздействие (на 75%) излучения на бактерии *S. aureus* 209 P.

В зависимости от используемого фотосенсибилизатора общие суммарные изменения температуры при облу-

чении находились в диапазоне 1–6°C. Таким образом, влияние нагрева среды на угнетение роста микроорганизмов при использовании указанных выше плотностей мощности лазерного излучения можно исключить. Тем не менее инкубация с наночастицами золота обоих классов (наноболочки и наноклетки) и последующее облучение ИК лазером приводило к гибели 50%–70% клеток *S. aureus* 209 P, при этом в отсутствие облучения наночастицы угнетающего действия не оказывали. Возможными механизмами воздействия в данном случае являются аккумуляция и миграция энергии при поглощении наночастицами золота света с длиной волны, близкой к длине волны плазмонного резонанса, что может вызывать фототермическое повреждение биомембран. То есть в данном случае речь идет о локальном разогреве адсорбированной на поверхности бактериальной клетки частицы до температуры, достаточной для повреждения клеточной стенки.

В ходе настоящей работы было показано, что исследуемый штамм *S. aureus* 209 P более подвержен действию ИК лазерного излучения в случае участия золотых наноболочек, чем участия золотых наноклеток. Наноболочки имеют более крупные размеры (130 нм) и, следовательно, существенно большее сечение поглощения, чем небольшие (50 нм) наноклетки полой структуры. Этот факт также свидетельствует о возможности локального нагрева наночастиц.

Известно, что комплексы индоцианинового зеленого с белками в присутствии коллоидов золота обладают большей фотостабильностью [46]. В связи с этим использование комплексов индоцианинового зеленого с наночастицами золота для фототерапии инфекционных заболеваний представляется весьма обоснованным. Тем не менее в наших экспериментах была показана недостаточная эффективность применения подобных комплексов. В случае использования конъюгатов золотых наноболочек с адсорбированным индоцианиновым зеленым снижение числа КОЕ *S. aureus* 209 P не превышало 43%. Возможно, что применение конъюгатов затрудняет формирование молекулами красителя синглетного кислорода и активных радикалов. Увеличение выживаемости в данном случае по сравнению с показателями КОЕ при использовании только индоцианинового зеленого или только золотых наносфер предположительно связано с небольшим (от 22 до 28°C) повышением температуры раствора. Оптимальной температурой для роста и развития бактерий *S. aureus* 209 P являются 37°C. Часть популяции бактерий погибает в результате совместного действия наночастиц и лазерного излучения. Выжившие клетки с приближением экспериментальных условий к физиологическим продолжают размножаться, что в целом проявляется в более медленном уменьшении их численности.

Другим препятствием на пути повышения эффективности фотодинамического подавления патогенных микроорганизмов является недостаточная степень неспецифического связывания конъюгатов с клетками в процессе инкубации. В недавней работе [47] показано, что эффективность специфического мечения клеток почки эмбриона свиньи, несущей онковирус, была в 17 раз выше, чем неспецифическая адсорбция.

5. Заключение

Установлено, что клетки *S. aureus* 209 P в равной степени подвержены воздействию ИК лазерного излучения

(805 нм, 46 мВт/см²) после предварительной сенсibilизации с помощью индоцианинового зеленого, наночастиц золота отдельно и конъюгатов наночастиц с индоцианиновым зеленым. Незначительное (на 5%) взаимное усиление фотодинамического и фототермического эффектов отмечено при облучении в течение 30 мин лазером (808 нм, 60 мВт/см²) бактерий, инкубированных с конъюгатами индоцианинового зеленого и наноклеток.

Сформулируем основные направления активации угнетающего действия ИК лазерного излучения на бактерии *S. aureus* 209 P, сенсibilизированные комплексами фотодинамического красителя и наночастиц золота. В-первых, повышения эффективности следует ожидать при увеличении плотности мощности излучения, которая в наших экспериментах была сравнительно низкой (46–60 мВт/см²). Величина плотности мощности должна быть ограничена лишь уровнем физиологической температуры, т.е. нагревом бактериальной взвеси от комнатной температуры до 37–40 °C (примерно на 20 °C) в ходе облучения. Важно, что при этом дополнительным эффектом будет фототермическое повреждение клеточной стенки микроорганизмов, индуцированное наночастицами. Во-вторых, использование наносекундных импульсных режимов нагрева позволяет существенно увеличить локальный нагрев наночастиц, не сильно нагревая всю взвесь, т.к. за время импульса (10–20 нс) не успевает произойти теплоперенос между частицей и окружающей средой. И наконец, переход к специфическому мечению взвеси конъюгатами наночастиц с красителями (с использованием, например, фаговых антител) позволит существенно увеличить степень адсорбции наночастиц на клеточную стенку и локальную концентрацию красителя.

Работа была частично поддержана Федеральным агентством по образованию РФ (грант №2.2.1.1/2950), PHOTONICS4LIFE-FP7-ICT-2007-2 (грант №224014), Госконтрактами №02.740.11.0484, 02.740.11.0879, а также фондом Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (грант №МК 1057.2011.2).

- Karu T. *J. Photochem. Photobiol.*, **49**, 1 (1999).
- Tuchin V.V. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis* (Bellingham, WA: SPIE Press, 2007).
- Abels C., Fickweiler S., Weiderer P., Baumler W. *Arch. Dermatol. Res.*, **292**, 404 (2000).
- Fickweiler S., Rolf-Markus Szeimies R.-M., Baumler W., Steinbach P., Karrer S., Goetz A.E., Abels C., Hofstaidter F., Landthaler M. *J. Photochem. Photobiol. B.*, **38**, 178 (1997).
- Gil-Tomas J., Tubby S., Parkin I.P., Narband N., Dekker L., Nair S.P., Wilson M., Street C. *J. Mater. Chem.*, **17**, 3739 (2007).
- Norman S.R., Stone J.W., Gole A., Murphy C.J., Sabo-Attwood T.L. *Nano Lett.*, **8** (1), 302 (2008).
- Kuo W., Chang C.N., Chang Y.T., Yeh C.S. *Chem. Commun.*, **32**, 4853 (2009).
- Perni S., Piccirillo C., Kafizas A., Uppal M., Pratten J., Wilson M., Parkin I.P. *J. Cluster Sci.*, **21** (3), 427 (2010).
- Liao H., Nehl C.L., Hafner J.H. *Nanomedicine*, **1**, 201 (2006).
- Khlebtsov N.G., Maksimova I.L., Tuchin V.V., Wang L., in *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics* (Bellingham, Washington: SPIE, 2002, ch. 1, p. 31).
- Khlebtsov N.G., Melnikov A.G., Bogatyrev V.A., Dykman L.A. *NATO Science Series, II. Mathematics, Physics, and Chemistry* (Dordrecht: Kluwer, 2004, vol. 161, p. 265).
- Lee K.-S., El-Sayed M.A. *J. Phys. Chem. B*, **109**, 20331 (2005).
- Jain P.K., Lee K.S., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. *J. Phys. Chem. B*, **110**, 7238 (2006).
- Noguez C.J. *J. Phys. Chem. C*, **111**, 3806 (2007).
- Daniel M.-Ch., Astruc D. *Chem. Rev.*, **104**, 293 (2004).
- Xia Y., Halas N.J. *MRS Bulletin*, **30**, 338 (2005).
- Chang S.-S., Shih C.-W., Chen C.-D., Lai W.-C., Wang C.R.Ch. *Langmuir*, **15**, 701 (1999).
- Link S., El-Sayed M.A. *J. Phys. Chem. B*, **103**, 8410 (1999).
- Jana N.R., Gearheart L., Murphy C.J. *Adv. Mater.*, **13**, 1389 (2001).
- Nikoobakht B., El-Sayed M.A. *Chem. Mater.*, **15**, 1957 (2003).
- Pérez-Juste J., Pastoriza-Santos I., Liz-Marzán L.M., Mulvaney P. *Coord. Chem. Rev.*, **249**, 1870 (2005).
- Murphy C.J., Sau T.K., Gole A.M., Orendorff C.J., Gao J., Gou L., Hunyadi S.E., Li T. *Phys. Chem. B*, **109**, 13857 (2005).
- Liz-Marzán L.M. *Langmuir*, **22**, 22 (2006).
- Алексеева А.В., Богатырев В.А., Хлебцов Б.Н., Мельников А.Г., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. *Коллоидный журн.*, **68** (6), 661 (2006).
- Oldenburg S., Averitt R.D., Westcott S., Halas N.J. *Chem. Phys. Lett.*, **288**, 243 (1998).
- Sun Y., Xia Y. *Analyst*, **128**, 686 (2003).
- West J.L., Halas N.J. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **6**, 285 (2006).
- Hirsch L.R., Gobin A.M., Lowery A.R., Tam F., Drezek R., Halas N.J., West J.L. *Annals. Biomed. Eng.*, **34**, 15 (2006).
- Chen J., Saeki F., Wiley B. J., Cang H., Gobb M.J., Li Zh.-Y., Au L., Zhang H., Kimmey M.B., Li X., Xia Y. *Nano Lett.*, **5**, 473 (2005).
- Glomm W.R. *J. Disp. Sci. Tech.*, **26**, 389 (2005).
- Hone D.C., Walker P.I., Evans-Gowing R., FitzGerald S., Beeby A., Chambrier I., Cook M.J., Russell D.A. *Langmuir*, **18**, 2985 (2002).
- Mocellin S., Bronte V., Nitti D. *Med. Res. Rev.*, **27**, 317 (2007).
- Kuo W.-S., Chang Ch.-N., Chang Yi.-T., Yang M.-H., Chien Yi.-H., Chen Sh.-J., Yeh Ch.-Sh. *Angew. Chem.*, **49**, 2711 (2010).
- Huang W.-C., Tsai P.-J., Chen Y.-C. *Nanomedicine*, **2**, 777 (2007).
- Williams D.N., Ehrman S.H., Holoman T.R.P. *J. Nanobiotechnol.*, **4**, 3 (2006).
- Khlebtsov B.N., Dykman L.A., Bogatyrev V.A., Zharov V.P., Khlebtsov N.G. *Nanoscale Research Lett.*, **2**, 6 (2007).
- Stöber W., Fink A., Bohn J. *J. Colloid Interface Sci.*, **26**, 62 (1968).
- Skrabalak S.E., Au L., Li X., Xia Y. *Nat. Protoc.*, **2**, 2182 (2007).
- Tam F., Goodrich G.P., Johnson B.R., Halas N.J. *Nano Lett.*, **7**, 496 (2007).
- Niidome T., Yamagata M., Okamoto Y., Akiyama Y., Takahashi H., Kawano T., Katayama Y., Niidome Y. *J. Control Release*, **114**, 343 (2006).
- Baumler W., Abels C., Karrer S., Weiss T., Messmann H., Landthaler M., Szeimies R.M. *Br. J. Cancer*, **80**, 360 (1999).
- Urbanska K., Romanowska-Dixon B., Matuszak Z., Oszajca J., Nowak-Sliwinska P., Stoch G. *Acta Biochimica Polon.*, **49** (2), 387 (2000).
- Xu R.X., Huang J., Xu J.S., Sun D., Hinkle G.H., Martin E.W., Pivoski S.P. *J. Biomed. Opt.*, **14** (3), 034020 (2009).
- Engel E., Schraml R., Maisch T., Kobuch K., König B., Szeimies R.-M., Hillenkamp J., Bäuml W., Vasold R. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49** (5), 1777 (2008).
- Omar G.S., Wilson M., Nair S.P. *BMC Microbiology*, **8**, 111 (2008).
- Geddes C.D., Cao H., Lakowicz J.R. *Spectrochimica Acta A*, **59**, 2611 (2003).
- Khanadeev V.A., Khlebtsov B.N., Staroverov S.A., Vidyasheva I.V., Skaptsov A.A., Ileneva E.S., Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Khlebtsov N.G. *J. Biophotonics*, DOI: 10.1002/jbio.200900093 (2010).