

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» ГНКО

ПАРОНЯН МАРИНА ГАМЛЕТОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ
НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОРФИРИНОВ**

ДИ С С Е Р Т А Ц И Я

**на соискание учёной степени кандидата
биологических наук по специальности
03.00.14 – «БИОТЕХНОЛОГИЯ»**

**Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Г.В. Гюльханданян**

ЕРЕВАН-2015

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Проблема антимикробной резистентности	11
1.2. Фотодинамическая терапия и фотодинамическая инактивация микроорганизмов	12
1.2.1. История фотодинамической терапии	13
1.2.2. Фотодинамическая инактивация микроорганизмов	15
1.2.3. Механизм фотодинамической терапии	17
1.2.4. Флуоресценция и квантовый выход синглетного кислорода	21
1.2.5. Причина низкой чувствительности грамотрицательных бактерий к ФДИ и способы их преодоления.....	25
1.2.6. Поиск эффективных ФС для ФДИ микроорганизмов.....	28
1.2.7. Применение нанокompозитов (наночастица-порфирин) для ФДИ микроорганизмов	35
1.3. Корневые гнили пшеницы	37
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	48
3.1. Фотодинамическая инактивация грамотрицательных и грамположительных бактерий новыми производными порфиринов.....	48
3.1.1. Исследование темновой токсичности новых производных порфиринов в условиях <i>in vitro</i>	49
3.1.2. Исследование фотофизических свойств производных синтетических порфиринов.....	54
3.1.3. Определение квантовых выходов синглетного кислорода производных синтетических порфиринов.....	55
3.1.4. Исследование фотодинамической активности катионных производных синтетических порфиринов по отношению к <i>E. coli</i> K-12.....	56

3.1.5. Исследование влияния ионов Ca^{2+} на фотодинамическую активность Zn-TBut4PyP при инактивации клеток <i>E. coli</i> K-12.....	58
3.1.6. Исследование фотодинамической активности Zn-TBut4PyP по отношению к различным грамотрицательным и грамположительным бактериям	60
3.1.7. Исследование фотодинамической активности Zn-TBut4PyP по отношению к полирезистентным патогенам.....	61
3.1.8. Исследования по воздействию продолжительности времени облучения на выживаемость клеток <i>E. coli</i> K-12.....	63
3.2. Получение нанокompозитов из наночастиц серебра/цеолитов и катионных производных порфиринов.....	64
3.2.1. Комплексообразование порфиринов с наночастицами серебра	65
3.2.2. Комплексообразование порфиринов с наночастицами цеолита.....	68
3.3. Изучение действия производных синтетических порфиринов против грибковых заболеваний растений.....	71
3.3.1. Исследование эффективности синтетических металлопорфиринов в теплице.....	72
3.3.2. Исследование эффективности синтетических металлопорфиринов в полевых условиях.....	74
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	79
ВЫВОДЫ	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	89

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК	–	активная форма кислорода
ДОН	–	дезоксиниваленол
ИК	–	инфракрасный диапазон спектра
ИКК	–	интеркомбинационная конверсия
кДа	–	килоДальтон
КОЕ	–	колониеобразующие единицы
МБК	–	минимальная бактерицидная концентрация
Мол. масса	–	молекулярная масса
МПА	–	мясо-пептонный агар
МПБ	–	мясо-пептонный бульон
НМ	–	наружная мембрана
ОП	–	оптическая плотность
ФДИ	–	фотодинамическая инактивация
ФДТ	–	фотодинамическая терапия
ФБ	–	фосфатный буфер
ФС	–	фотосенсибилизатор
ЦМ	–	цитоплазматическая мембрана
EDTA	–	ethylene diamine tetraacetic acid
H ₂ TM4PyP	–	5,10,15,20-тетракис[4-N-метилпиридил]порфирин
IUPAC	–	International Union of Pure and Applied Chemistry
LB	–	Luria-Bertani (питательная среда)
¹ O ₂	–	синглетный кислород
O ₂ ^{•-}	–	супероксидный анион-радикал
OH [•]	–	гидроксильный радикал
MRSA	–	methicillin-resistant <i>S. aureus</i>
SDS	–	sodium dodecyl sulfate
TA114PyP	–	мезо-тетра[4-N-(2'-аллил)пиридил]порфирин
TBut3PyP	–	мезо-тетра[3-N-(2'-бутил)пиридил]порфирин

- TBut4PyP – мезо-тетра[4-N-(2'-бутил)пиридил]порфирин
- TMetAlI(4)PyP – мезо-тетра[4-N-(2'-метилаллил)пиридил]порфирин
- TOE4PyP – мезо-тетра[4-N-(2'-оксиэтил)пиридил]порфирин
- γ_{Δ} – квантовый выход синглетного кислорода

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Возрастающее во всем мире число патогенных микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, пробудил большой интерес к разработкам альтернативных антибактериальных стратегий [61, 91, 129]. Количество пациентов, ежегодно умирающих от инфекций, вызванных такими полирезистентными бактериями, как метициллин-резистентный штамм *Staphylococcus aureus* (MRSA), эквивалентно общему числу смертей от СПИДа, туберкулеза и вирусного гепатита [50]. В связи с этим поиск новых эффективных антимикробных препаратов, не вызывающих устойчивость у микроорганизмов, является актуальным для медицины XXI века.

Одним из наиболее перспективных и инновационных подходов для уничтожения патогенов является фотодинамическая инактивация (ФДИ) микроорганизмов посредством фотосенсибилизаторов (ФС) [83, 89, 112, 133, 208]. ФС – в основном порфирины, являются красителями природного или синтетического происхождения, которые под действием света способствуют генерации активных форм кислорода, приводящих к повреждению и гибели микроорганизмов. ФДИ обладает широким спектром действия по отношению к различным бактериям, грибам, вирусам и простейшим паразитам [35, 39, 62, 71, 74, 81, 184, 209].

Повреждающее действие фотодинамического процесса обусловлено свободнорадикальными реакциями, поэтому развитие микробной устойчивости к ФДИ практически невозможно [79, 166, 198]. Кроме того, в отличие от антибиотиков, действие ФС носит локальный характер, что позволяет избежать поражения нормальной микрофлоры вне зоны облучения [28, 91, 182, 185, 217]. Одним из наиболее значимых показателей эффективности широко применяемых ФС является их способность генерировать образование синглетного кислорода – главного поражающего агента. В связи с этим возникает необходимость исследовать фотофизические свойства порфиринов и провести отбор подходящих ФС по критерию их способности генерировать синглетный кислород.

Доставка ФС непосредственно до микроорганизмов и их накопление в/на клетках являются одними из центральных задач ФДИ. В последнее время с целью повышения эффективности и увеличения аккумуляции фотосенсибилизаторов в микроорганизмах активно используются наноконтейнеры [116, 169]. Одним из подходов усиления эффективности ФДИ микроорганизмов является сорбция ФС (катионных порфиринов)

на наночастицах, как из благородных металлов (золото и серебро), так и из природных минералов [114].

Бесконтрольное применение ядохимикатов с избирательным механизмом действия привело к опасному загрязнению почв фитопатогенными грибами, устойчивыми к фунгицидам [25, 139]. Несмотря на огромное количество работ, посвященных изучению действия порфиринов на патогенные микроорганизмы человека и животных, до сих пор отсутствуют литературные данные относительно их эффективности в борьбе с фитопатогенными микроорганизмами.

Целью диссертационной работы является сравнительное изучение действия новых природных и производных синтетических порфиринов на грамотрицательные и грамположительные бактерии и фитопатогенные грибы, а также изучение комплексообразования этих порфиринов с наночастицами серебра и цеолита и их действия на микроорганизмы.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- исследование темновой токсичности (антибактериальная активность в условиях темноты) новых природных и производных синтетических порфиринов по отношению к грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* K-12 в *in vitro* условиях;
- исследование фотофизических свойств и определение квантовых выходов синглетного кислорода производных порфиринов;
- изучение фототоксичности (антибактериальная активность в условиях облучения светом) новых производных порфиринов по отношению к грамотрицательным и грамположительным бактериям, в том числе и к антибиотикоустойчивым штаммам в *in vitro* условиях;
- исследование комплексообразования новых производных синтетических порфиринов с наночастицами серебра и цеолита;
- изучение воздействия новых производных синтетических порфиринов на фитопатогенные грибы, вызывающие корневую гниль у сельскохозяйственных растений.

Научная новизна.

- Выявлены новые синтетические катионные порфирины (пиридил-производные), которые обладают высокой степенью фототоксичности по отношению как к грамположительным, так и грамотрицательным бактериям, в том числе антибиотикоустойчивым штаммам. Исследуемые катионные синтетические порфирины проявляют в 1000 раз более высокую фотодинамическую активность по сравнению с применяемыми в клиниках ФС – анионным хлорин e_6 и нейтральным Al-фталоцианином.
- Впервые показано, что предварительное замачивание семян озимой пшеницы растворами 1г/л металлопорфиринов (Zn-TOE4PyP, Zn-TBut3PyP и Ag-TOE4PyP) повышает устойчивость растений против фитопатогенных грибов, вызывающих корневые гнили. Применение этих соединений приводит к увеличению урожайности пшеницы на 18-20%.

Практическая ценность.

- Новые синтетические катионные порфирины и металлопорфирины можно применять в борьбе против антибиотикоустойчивых микроорганизмов в виде лекарственных форм (растворы и мази) в дерматологии, стоматологии и др. отраслях медицины для лечения локальных инфекций.
- Показана возможность применения новых катионных металлопорфиринов в сельском хозяйстве в борьбе против корневой гнили растений, что приводит к увеличению урожайности как в тепличных, так и полевых условиях.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Новые катионные производные синтетических порфиринов и металлопорфиринов являются высокоактивными соединениями с ярко выраженной бактерицидной активностью.
- Новые катионные производные синтетических порфиринов и металлопорфиринов обладают бактерицидной активностью как в темновых условиях, так и при облучении светом.

- Цинковые комплексы новых производных синтетических порфиринов, особенно Zn-TBut3PyP и Zn-TBut4PyP, проявляют высокую эффективность по отношению к полирезистентному штамму MRSA в *in vitro* условиях.
- Новые нанокompозиты из наночастиц серебра и цеолита имеют высокий процент сорбции катионных синтетических металлопорфиринов.
- Новые синтетические металлопорфирины показывают эффективное действие на корневую гниль сельскохозяйственных растений.

Связь работы с научными тематиками. Работа выполнена в рамках гранта CRDF «Изучение и организация производства противогрибковых препаратов для применения в сельском хозяйстве против корневой гнили растений» (STEP BPG 2010 Grant № ARC1-9053-YE-11, 2010-2012 гг.); Армяно-Белорусского гранта 11РБ-016 «Молекулярные зонды на основе новых водорастворимых порфиринов – исследование фотофизических свойств и специфических взаимодействий с белками и нуклеиновыми кислотами методами оптической спектроскопии и молекулярного докинга» (2011-2013 гг.).

Личный вклад соискателя. Собственный вклад соискателя включает экспериментальную реализацию сформулированных задач, поиск и анализ научной литературы по теме, разработку методологии по изучению антимикробного действия препаратов, обобщение результатов исследований, оформление научных статей и диссертационной работы. Постановка основных задач, разработка методологии спектральных и фотофизических исследований, обсуждение результатов исследований проводились под руководством к.б.н., с.н.с., зав. группой «Биоинженерии» Института биохимии им. Г.Х. Буниатяна НАН РА Гюльхандяна Г.В. Отдельные разделы исследования обсуждались и проводились при техническом содействии совместно с к.б.н., в.н.с. лаборатории молекулярной биологии Овсепян А.С. и к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии Амбарцумяном А.А. (НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА).

Апробация работы. Результаты работы представлены на заседании ученого совета НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА; на Европейской конференции по биомедицинской оптике, 17-21 июня 2007, Мюнхен, Германия; на международной конференции «Современное состояние биотехнологии в Армении и роль МНТЦ в ее развитии», 28 сентября - 02 октября 2008, Цахкадзор, РА; на Всемирном конгрессе Международной

Фотодинамической Ассоциации, 11-15 июня 2009, Сиэтл, США; на 2-й Международной конференции по органической химии «Достижения в химии гетероциклических соединений», 25-27 сентября 2011, Тбилиси, Грузия; на научном семинаре «Современное состояние биотехнологических разработок и пути коммерциализации», 11-12 сентября 2012, Ереван, Армения; на 14-м форуме молодых ученых FEBS, 27-30 августа 2014, Париж, Франция; на Европейской конференции «Химическая Биология 2014», 20-23 августа 2014, Гейдельберг, Германия; на Международном научном семинаре «Тенденции в микробиологии и микробной биотехнологии», 5-8 октября 2014, Ереван, Армения.

Место выполнения работы. Основная часть работы выполнена в НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА, спектральные и фотофизические исследования проведены в Институте биохимии им. Г.Х. Буниатяна НАН РА и Институте физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси. Исследования по эффективности порфиринов против корневой гнили озимой пшеницы проводились в Национальном аграрном университете Армении и на полях Центра по сельскому хозяйству и защите растений (г. Эчмиадзин, Армавирская область, Армения).

Объем и структура работы. Диссертация состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы, результатов исследований и их обсуждения, а также из заключения, выводов, списка литературы, включающего 225 источников. Работа оформлена на русском языке, изложена на 110 страницах, иллюстрирована 27 рисунками и 8 таблицами.

Публикации. Основные результаты диссертации изложены в 17 научных работах, включая 7 научных статей, опубликованных как в республиканских, так и международных научных изданиях.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Проблема антимикробной резистентности

Всемирной Организацией Здравоохранения, странами Европейского Союза и Северной Америки в качестве глобальной проблемы признано предотвращение формирования и распространения устойчивости к антимикробным препаратам среди патогенных микроорганизмов [214]. В США распространение антимикробной резистентности рассматривается как одна из угроз национальной безопасности, ввиду их потенциала в биологической войне, а также в дестабилизации в экономических и социальных сферах [110]. Rammelkamp и Махон еще в 1942 г. предвидели, что широкое использование антибиотиков приведёт к снижению их терапевтической эффективности [175]. Многочисленные наблюдения за прошедшие десятилетия привлекли внимание к этому явлению, которое стало большой проблемой для медицинских учреждений [127, 145].

Основным механизмом, обеспечивающим устойчивость практически всех клинически важных грамположительных и грамотрицательных бактерий является наличие в этих штаммах одной или нескольких различных β -лактамаз [51]. В 1959 г. в медицинскую практику первым был внедрен β -лактамаза – метициллин, который имел устойчивость к гидролизу, осуществляемому стафилококковыми β -лактамазами. Однако вскоре (1960 г.) появились сообщения о выделении устойчивых к этому антибиотику штаммов стафилококков [41].

Для современной медицины рост устойчивости к антибиотикам среди возбудителей внутрибольничных инфекций – одна из наиболее серьезных проблем. Антибиотики получают от 25 до 30% всех госпитализированных больных, и, по крайней мере, половине из них неверно подобрана схема лечения или препарат [30, 34].

В медицинских учреждениях широкое распространение получили грамположительные бактерии, такие как *S. aureus* и *Enterobacter sp.* (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella sp.* и др.), и, как показано в некоторых работах, частота устойчивости к важным антибиотикам, таким как метициллин и ванкомицин, у этих штаммов растет [65, 144].

В настоящее время в больницах и отделениях интенсивной терапии США штамм MRSA составляет более 60% изолированных *S. aureus* [157]. Ежегодно от инфекций,

вызванных штаммами MRSA, умирают 19.000 госпитализированных американских пациентов, что эквивалентно общему числу смертей от СПИДа, туберкулеза и вирусного гепатита [50].

В течение многих лет гликопептиды (ванкомицин, тейкопланин и др.) были основными эффективными антибиотиками при инфекциях, вызываемых устойчивыми к метициллину стафилококками. Но в 1996 г. в Японии были выделены штаммы *S. aureus* с пониженной чувствительностью к ванкомицину (VISA) [96]. В последующие годы подобные штаммы были выделены и в других географических регионах.

Таким образом, в настоящее время очевидна опасность пассивного отношения к возникновению и распространению штаммов, устойчивых к антибиотикам. В борьбе с этим явлением важно не столько быстрее внедрение в практику новых антимикробных препаратов, сколько разработка мер, направленных на снижение устойчивости к антибиотикам, а также поиск альтернативных подходов к инаktivации болезнетворных микроорганизмов [30].

1.2. Фотодинамическая терапия и фотодинамическая инаktivация микроорганизмов

Возрастающее во всем мире число штаммов, устойчивых к антимикробным препаратам, пробудил большой интерес к исследованиям разработок альтернативных антибактериальных стратегий [61, 91, 129]. Одним из наиболее перспективных и инновационных подходов в этом отношении является фотодинамическая терапия (ФДТ), к изучению которой в последние годы наблюдается повышенный интерес исследователей [26, 105, 106, 184].

ФДТ – трехкомпонентный метод лечения. Два компонента – фотосенсибилизатор (ФС) и свет, являются нетоксичными, экзогенными факторами. Третьим обязательным компонентом фотодинамической реакции является эндогенный фактор – кислород. Суть метода состоит в том, что многие биологические объекты (раковые клетки, воспаленные ткани, микробы и вирусы) могут накапливать определенные красители – ФС, обладающие повышенной чувствительностью к возбуждающему действию света соответствующей длины волны. Под действием энергии светового излучения в клетках микробов или тканей, захвативших краситель, развивается фотохимическая реакция с выделением синглетного

кислорода и свободных радикалов. Эти высокоактивные биологические окислители являются токсичными для большинства биологических объектов и приводят к разрушению раковых или микробных клеток [22, 56, 108, 125, 129, 174, 219]. Противоопухолевая активность ФДТ обусловлена комбинацией прямого фотоповреждения самих клеток опухоли, разрушения сосудистой системы опухоли и активации иммунного ответа. Антимикробное применение ФДТ основано на фотосенсибилизированном повреждении стенки микробной клетки с последующей ее гибелью.

1.2.1. История фотодинамической терапии

Фотодинамическая терапия как метод лечения известна давно. За последнее время методика претерпела значительные изменения в связи с открытием новых фотосенсибилизирующих красителей и способов их применения. Использование экзогенных ФС для получения терапевтического эффекта было описано около 1500 лет назад, когда псорален, полученный из растений *Psoralea corylifolia* в Индии и *Ammi majus* в Египте, применяли для лечения витилиго [192]. Экстракты наносили на поверхность кожи или принимали внутрь, после чего больные подвергались действию солнечного света. Лечение приводило к постепенному восстановлению пигментации, в то время как без света не было отмечено лечебного воздействия экстрактов. В настоящее время во всем мире псорален успешно применяется при лечении витилиго, псориаза, красного плоского лишая и нейродермита [29, 36, 48].

Фотосенсибилизация и фотохимические реакции при использовании псораленов протекали без участия кислорода. Кислородзависимая фотодинамическая реакция была открыта Raab и Tarpeiner в 1900 г. [173, 204]. Во время их экспериментов по изучению токсических свойств акридина (краситель) на *Paramecium caudatum* (инфузория-туфелька) началась гроза. Под воздействием акридина и световых вспышек молнии инфузория-туфелька погибла, что натолкнуло исследователей на мысль об изучении свойств акридина в разных световых условиях. Они обнаружили, что воздействие света при самых незначительных концентрациях акридина приводило к повышению токсического эффекта на *P. caudatum* [173]. Tarpeiner и Jodbauer показали зависимость этих реакций от кислорода и ввели термин «фотодинамическое воздействие» («photodynamische wirkung») [206].

Эти работы, а также многочисленные, выполненные позже, исследования показали, что в основе фотодинамического действия фотосенсибилизированными красителями лежит окисление компонентов клеток кислородом. При этом краситель практически не расходуется, его главная роль состоит в том, что он делает реакции окисления чувствительными к освещению [192]. Основываясь на новых знаниях по фотодинамике, Tarpeiner и Jensionek разработали технологию ФДТ с использованием эозина в качестве ФС для лечения таких кожных заболеваний, как псориаз, волчанка, кондилома и рак [205].

Современная эпоха применения ФДТ в онкологии началась в 60-х гг. XX столетия с публикации Lipson, в которой было показано, что злокачественные опухоли визуализируются после внутривенной инъекции смеси производных гематопорфирина (HpD) за счет характерного флуоресцентного излучения избирательно накопленных порфиринов [123]. В 1976 г. HpD был впервые успешно применен в США для лечения рака мочевого пузыря. В результате ФДТ, проведенной через 48 ч после внутривенного введения производного гематопорфирина, исследователи наблюдали селективный некроз рецидивирующей папиллярной опухоли мочевого пузыря, при этом нормальная слизистая не была повреждена [113].

В 1980 г. впервые применили лазерное излучение длиной волны 630 нм [66]. Лазерный свет, который обладает монохроматичностью, позволяет использовать оптимальную длину волны для данного ФС, что многократно увеличивает интенсивность фотохимической реакции. Кроме того появилась возможность индукции световых потоков высокой мощности, транспортировки излучения по волоконно-оптическим системам к различным органам и тканям организма, а также прицельного воздействия на пораженные, содержащие ФС, клетки.

С тех пор началось интенсивное внедрение метода ФДТ в различные сферы клинической практики. Лечение онкопатологии стало одним из первых направлений, включивших в свой арсенал фотодинамическое воздействие. ФДТ используется для уничтожения небольших поверхностных опухолей, либо полостных опухолей, которые можно облучать при помощи световодов. Помимо этого, ФДТ применяется также для стерилизации операционного поля после хирургического удаления массивных опухолей [64, 67, 126, 177].

Особое значение ФДТ приобрела при удалении опухолей, расположенных в труднодоступных для хирургического вмешательства областях (поджелудочная железа, большой дуоденальный сосочек, общий желчный проток, внутривенные протоки), а также местах, где операция приводит к грубым косметическим и функциональным дефектам (на губе, в полости рта, на глазном яблоке, на веке, на ушной раковине) [13, 67].

За последние десятилетия показания к применению ФДТ существенно расширились. Причиной тому послужило экспериментальное обоснование возможности использования энергии фотохимических реакций для воздействия на патогенную микрофлору инфекционного очага [59, 91, 210]. Некоторыми исследователями отмечено, что воспаленным тканям, как и опухолевым, также свойственна способность задерживать красители, и поэтому ткани, инфицированные патогенными бактериями и вирусами, могут быть объектом для фотодинамического воздействия [28, 91, 134, 141].

В настоящее время метод ФДТ широко применяется при лечении неопухолевой патологии (трофические язвы, гнойные раны, заболевания кожи, атеросклероз, артрит, инфекционно-воспалительные и эрозивно-язвенные процессы в различных органах и тканях), в гинекологии, урологии, физиопульмонологии, оториноларингологии, офтальмологии, стоматологии и других областях [28, 31, 48, 59, 64, 124, 188].

1.2.2. Фотодинамическая инактивация микроорганизмов

Явление фотодинамической инактивации микроорганизмов открыто более ста лет назад. Однако активное развитие исследования по фотосенсибилизации микроорганизмов получили лишь в 1980-1990 гг. Работы в этой области приобрели выраженную практическую направленность, что обусловлено ростом устойчивости патогенных микроорганизмов к традиционной химиотерапии и необходимостью разработки альтернативных способов их инактивации.

В настоящее время интенсивно развивается новая медицинская технология – антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ) [129, 174], также известная как фотодинамическая инактивация (ФДИ) [58, 62, 161, 179], фотоактивируемая дезинфекция (ФАД) [43, 54] или антимикробная фотодинамическая химиотерапия (ФАХТ) [55].

Многочисленные исследователи показали, что широкое разнообразие патогенных бактерий и грибов чувствительны к ФДИ [91, 107]. Так, Malik с соавторами в классическом обзоре представили данные о бактерицидной активности ФДИ на штаммы *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *Mycoplasma hominis* и грибы [134]. Тот факт, что летальная фотосенсибилизация не является видоспецифичной, имеет определенное преимущество: в смешанной инфекции можно уничтожить все имеющиеся микроорганизмы.

Эффективность ФДИ не зависит от спектра чувствительности патогенных микроорганизмов к антибиотикам [83, 89, 131]. С клинической точки зрения способность фотодинамической терапии с лёгкостью уничтожать полирезистентные штаммы MRSA и *P. aeruginosa* очень важна, так как развитие резистентности к этой терапии представляется маловероятной, в отличие от антибиотиков и других антибактериальных агентов [83, 89].

Одно из основных преимуществ ФДИ над антибиотикотерапией заключается во множественном характере окислительной деструкции структур клеточной стенки микроорганизмов, что затрудняет выработку устойчивости к последующим циклам фотодинамических воздействий и можно проводить повторные курсы при значительной бактериальной обсемененности [79, 108, 166, 198].

Структуры клеточной стенки являются основной мишенью препаратов ФДИ, в то время как повреждение ДНК играет только вспомогательную роль, и по этой причине не обязательно, чтобы препараты проникли в клетку [91, 216]. Специфическая адгезия (прилипание) ФС к этим структурам, как правило, считается достаточным для свето-активированного уничтожения микробных клеток. Таким образом, клетки-мишени не имеют возможности развивать устойчивость, останавливая поглощение, повышая метаболическую детоксикацию или увеличивая активный выброс (эффлюкс) препаратов [218]. Некоторые исследователи провели многоэтапные исследования для изучения способности патогенных штаммов развивать устойчивость к ФДИ и показали неизменную восприимчивость к двадцати пяти последовательным сеансам ФДТ [79, 166].

Дополнительным преимуществом этого метода является низкое цитотоксическое действие на клетки-хозяева наряду с высокой эффективностью по отношению к патогенам [59, 84, 92], а также отсутствие каких-либо прямых или замедленных повреждений генетического материала [222]. При этом фотодинамическое повреждение имеет локальный

характер, а бактерицидный эффект лимитируется зоной облучения, это позволяет избежать при местной ФДИ побочного эффекта, наблюдаемого при применении антибиотиков и антисептиков. Это происходит потому, что ни одному из компонентов ФДИ – ни ФС, ни световому облучению, по отдельности не свойственны бактерицидное действие или другие повреждающие эффекты. Фотодинамическая реакция возникает только при одновременном действии этих двух факторов в присутствии кислорода [28, 185].

ФДИ микроорганизмов может быть использована не только в терапевтических целях, но и для фотообеззараживания медицинских инструментов, компонентов крови, сред, сточных вод от патогенных микроорганизмов, в том числе вирусной этиологии [39, 54, 64]. В настоящее время установлена возможность фотоинактивации безоболочечных вирусов, включая ВИЧ, с применением такого простого катионного ФС как метиленовый синий [39].

Ограничения ФДИ связаны со свойствами ФС, в том числе от количества энергии, необходимой для активации ФС [128], низкой глубины проникновения лазерного света из-за его активирующей длины волны [40, 128], заряда и чистоты молекул [38, 40, 53, 122, 128], специфичности ФС к бактериям [58] и кинетики поглощения соединений микроорганизмами [68].

1.2.3. Механизм фотодинамической терапии

Эффективное применение красителей в медицинских целях не возможно без глубокого понимания механизмов фотосенсибилизации биологических объектов различного происхождения. В этой области исследований существуют две основные группы проблем. Первая связана с изучением природы действующих ФС, механизмов их взаимодействия с клетками и субклеточными структурами. Вторая – с исследованием фотоиндуцированных повреждений клеточных мишеней, приводящих к развитию сенсибилизированных поражений.

В соответствии со схемой Яблонского (рис. 1, 2) молекула ФС обычно находится в стабильном синглетном электронном состоянии (S_0). Это состояние соответствует самой низкой внутренней энергии. После поглощения фотона света определенной длины волны молекула переходит в возбужденное состояние, также синглетное (S_1), с очень коротким временем жизни. Подобные молекулы практически не наносят фотодинамических

повреждений ввиду их слишком короткого срока существования, исчисляемого наносекундами (10^{-9} - 10^{-6} с), и недостаточного для воздействия на окружающие структуры. Далее может произойти возврат молекулы в основное состояние ($S_1 \rightarrow S_0$) безизлучательным путем, отдавая избыток электронной и колебательной энергии окружающей среде (внутренняя конверсия (ВК)), с эмиссией фотона ($(S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{фл}})$ флуоресценция) или преобразованием энергии в тепло (тепловая диссипация вследствие безизлучательного перехода $S_1 \rightarrow S_0$) [186]. Последний вариант приводит к выработке тепловой энергии и может служить действенным механизмом нанесения повреждений клеткам. Но молекула может также перейти в триплетное состояние ($S_1 \rightarrow T_1$), если в результате потери части энергии поменяется спин одного из электронов (так называемая интеркомбинационная конверсия (ИКК)) [10, 14, 126]. Триплетное состояние молекулы обладает более низкой энергией, чем возбужденное синглетное, но с более продолжительным временем жизни (уже микро- и миллисекунды). По разным оценкам это время жизни колеблется от 10^{-3} -1 с [150] до 10^{-4} -10 с [10]. Поэтому, как правило, фотосенсибилизированное окисление происходит с участием триплетного сенсibilизатора. На этом этапе молекула может перейти из триплетного состояния в основное состояние ($(T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{фос}})$ фосфоресценция) [150, 186] или вступить в реакции с окружающими структурами. Вероятность перехода молекулы ФС в возбужденное триплетное состояние при поглощении одного фотона называется квантовым выходом реакции. Чем выше квантовый выход, тем более активно проходят фотодинамические процессы разрушения клеток. Далее реакции ФС с молекулами, образующими биологическую ткань, могут пойти по одному из двух путей (реакции I и II типа) [146, 162, 197]. ФС в триплетном состоянии может первоначально реагировать непосредственно с биомолекулами, входящими в состав мембран (ненасыщенные жирные кислоты, боковые цепи α -аминокислот, таких как, цистеин, триптофан, тирозин, метионин и гистидин) (реакции I типа) [193], или при достаточном времени жизни (10^{-4} - 10^{-2} с) и энергии (превышающей 94,5 кДж/моль) триплетного состояния (T_1), может вступить во взаимодействие с присутствующим в ткани кислородом (тоже триплетной молекуле) с образованием высокоактивного синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) (реакции II типа) (рис. 1, 2) [143, 162]. Синглетный кислород обладает значительно большей подвижностью по сравнению с T_1 и более активно окисляет клеточные компоненты. Обе реакции (тип I и тип

II) могут происходить одновременно. Исследования *in vitro* показали, что реакций II типа преобладают [67]. Соотношение этих реакций зависит от типа используемого ФС, концентрации субстрата и кислорода [48, 56].

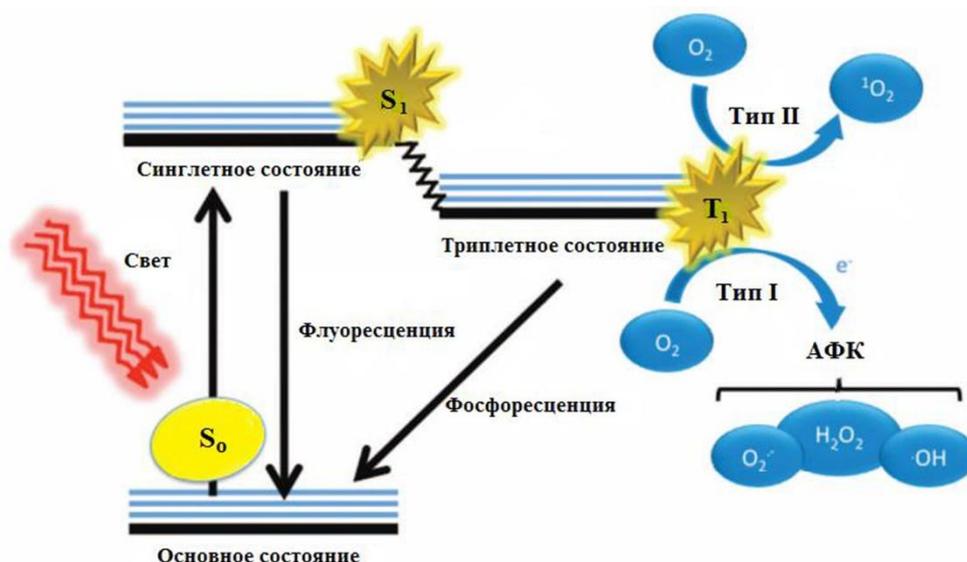


Рис. 1. Энергетическая схема механизма ФДТ [193].

S₀ – основное (невозбужденное состояние); S₁ и T₁ – возбужденные синглетные и триплетные состояния, соответственно.

В реакциях I типа происходит перенос электрона (окисление) или иона водорода (восстановление) от биологического субстрата к молекуле ФС, генерируя производство свободных радикалов, способных немедленно реагировать с присутствующим в биологической системе молекулярным кислородом. Это приводит к образованию супероксидного анион-радикала (O₂^{•-}), который впоследствии преобразуется в высоко реакционноспособный гидроксильный радикал (OH[•]), инициируя каскад производства цитотоксичных элементов, приводящих к повреждению и смерти клетки [56, 69, 162, 216].

В реакциях II типа основным «действующим лицом» является кислород [56, 133, 216]. Молекула кислорода в основном находится в триплетном состоянии (имеет два неспаренных электрона и является парамагнитным). При взаимодействии с возбужденным ФС она переходит в синглетное состояние [14, 46, 109]. При этом молекула ФС снова переходит в основное невозбужденное состояние и может далее участвовать в фотохимической реакции. Таким образом, синглетный кислород отличается от других активных форм кислорода тем,

что для его получения требуется лишь поглощение энергии (не менее 94,5 кДж/моль) без химической модификации молекул кислорода (рис. 2).

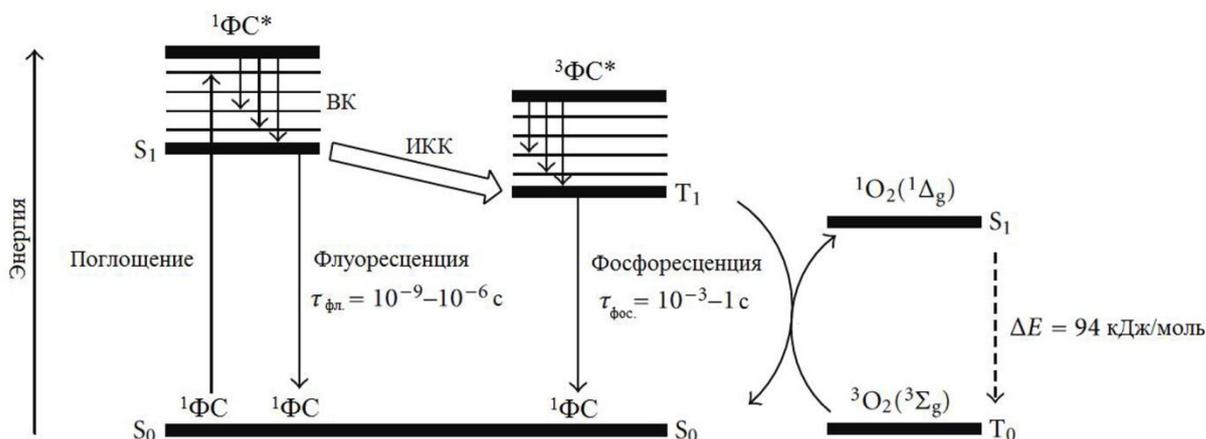


Рис. 2. Схема Яблонского энергетических уровней молекул с сопряженными связями.

S_0 – основное (невозбужденное состояние); S_1 и T_1 – возбужденные синглетные и триплетные состояния, соответственно; жирные горизонтальные линии – электронные уровни энергии, тонкие – колебательные уровни; стрелки – поглощательные и излучательные переходы, ВК– внутренняя конверсия (переходы электрона без обращения спина); ИКК – интеркомбинационная конверсия (переходы электрона с обращением спина) [109].

Оба процесса приводят к образованию высокотоксичных активных форм кислорода (АФК), таких как 1O_2 , свободные радикалы – $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} и пероксид водорода (H_2O_2), способные необратимо изменять жизненно важные компоненты клеток в результате окислительных повреждений [69, 108]. Стоит отметить, что активные формы кислорода, образующиеся при ФДТ, как результат их высокой реакционности, имеют очень короткий период полураспада (в диапазоне микросекунд) и могут диффундировать только на короткие расстояния [129, 133]. Кроме того, АФК может повредить молекулы в нескольких различных местах. Биомолекулы повреждаются не специфически, и эта особенность затрудняет появление поколений мутантных ФДИ-устойчивых штаммов. Классические антибиотики, в отличие от ФДИ, обычно нацелены на конкретные молекулярные пути обмена, что способствует развитию устойчивых штаммов [79].

Синглетный кислород – индикатор механизма фотодинамических реакций [115]. Люминесценция при длине волны 1270 нм является единственным прямым методом («золотым стандартом») определения синглетного кислорода в растворах [10, 130]. Как было указано выше, основное различие между фотореакциями типа I и II состоит в разном вкладе

синглетного кислорода в эти фотопроцессы. Действительно, в фотореакциях типа I его роль незначительна. Реакции типа II, наоборот, определяются преимущественно активностью $^1\text{O}_2$. Он очень реактивен и имеет сильную окислительную энергию. Синглетный кислород, мгновенно взаимодействуя с окружающими биологическими субстратами, запускает каскад свободнорадикальных реакций, разрушающих мембранные структуры клетки и уничтожающих ее [190]. Деградация биомолекул в конечном итоге приводит к смерти микробной или опухолевой клетки, поэтому мембраны считаются наиболее вероятными первичными мишенями, поражение которых ведёт к повреждению и гибели клеток [176, 194]. Радиус цитотоксического действия синглетного кислорода не превышает 20 нм, а продолжительность его жизни в биологических системах составляет менее 0,04 мс [162]. Таким образом, молекулярные повреждения ограничиваются участками, где перед фотоактивацией был локализован ФС [162, 167]. Эта особенность частично объясняет специфичность фотодинамических реакций для ФДТ рака или ФДИ микробов.

Поскольку цитотоксический продукт – $^1\text{O}_2$ может мигрировать менее 20 нм после его образования [162], участки фотоповреждения будут отражать локализацию ФС в момент облучения, то многие исследователи решили изучать субклеточные участки ФДИ-индуцированных изменений, а не искать участки связывания ФС. Возбужденные молекулы кислорода, а также ФС возвращаются в исходное состояние и способны вступать в химические реакции. Весь цикл может быть запущен заново после поступления нового кванта световой энергии. После нескольких циклов ФС может фотодеградировать – «выгорать», т. е. теряет способность участвовать в фотодинамической реакции. Этот эффект называется фотообесцвечиванием [48].

1.2.4. Флуоресценция и квантовый выход синглетного кислорода

Известно, что среди активных форм кислорода синглетный кислород является главной токсичной молекулой при ФДИ [212]. Количество генерируемого синглетного кислорода при ФДТ является важным показателем эффективности ФС. Квантовый выход синглетного кислорода ФС связан с интенсивностью его флуоресценции.

Интенсивность люминесценции (флуоресценции) данного вещества определяется его квантовым выходом и количеством поглощенного света [33]. Квантовый выход

флуоресценции показывает с какой эффективностью проходит данный процесс. Он определяется как отношение количества испускаемых и поглощаемых фотонов молекулой ФС. Квантовый выход флуоресценции может быть рассчитан по формуле:

$$\Phi = \frac{N_{em}}{N_{abs}},$$

где N_{em} – количество испускаемых в результате флуоресценции фотонов, N_{abs} – общее количество поглощаемых фотонов.

Чем больше квантовый выход флуорофора, тем интенсивнее его флуоресценция.

Прогресс техники дал толчок развитию нового отдельного направления в изучении люминесценции синглетного кислорода – дозиметрии. ФДТ-дозиметрия – комплексный подход, требующий учета всех процессов, происходящих во время ФДТ (рис. 3).

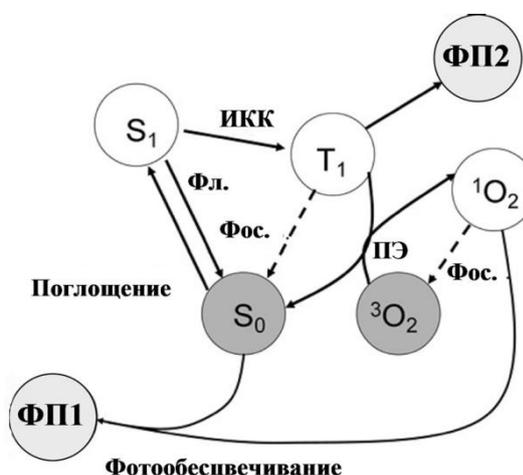


Рис. 3. Фотопроцессы при ФДТ.

S_0 , S_1 – сенсбилизатор в синглетном состоянии; T_1 – сенсбилизатор в триплетном состоянии; Фл. – флуоресценция; Фос. – фосфоресценция; ИКК – интеркомбинационная конверсия; ПЭ – перенос энергии; ФП1, ФП2 – фотоиндуцированные продукты [20].

Излучательные переходы $S_1 \rightarrow S_0$ соответствуют процессу флуоресценции вещества (порфирина), $T_1 \rightarrow S_0$ – фосфоресценции вещества. Оба эти процесса объединяются общим названием – люминесценция [33].

При условии, что биологическая восприимчивость коррелирует с количеством синглетного кислорода, очевидны три возможных подхода к проблеме дозиметрии [215]:

- а) люминесцентная дозиметрия синглетного кислорода, при которой ведется наблюдение за 1O_2 ;

- b) полная дозиметрия, когда контролируют (в идеале постоянно) три основных компонента: свет, ФС и кислород. Зная пути и эффективности превращений (рис. 3), можно рассчитать количество образующегося синглетного кислорода;
- c) опосредованная дозиметрия, при которой измеряются продукты реакций с участием синглетного кислорода.

Рассмотрим подробнее люминесцентную дозиметрию $^1\text{O}_2$. Как упоминалось выше, синглетный кислород является главной цитотоксичной молекулой при ФДТ [212], поэтому неудивительно, что его прямое измерение в *in vivo* условиях представляет существенный интерес. Основа люминесцентной дозиметрии – регистрация слабой люминесценции $^1\text{O}_2$, испускаемой в ближней инфракрасной области спектра света при 1270 нм. Количество фотонов люминесценции в единицу времени прямо пропорционально текущей концентрации синглетного кислорода и относительной вероятности этого пути дезактивации. Регистрация люминесценции синглетного кислорода – стандартная процедура при исследовании растворов сенсibilизаторов. В *in vivo* условиях задача усложняется, поскольку синглетный кислород в процессе ФДТ расходуется так быстро, что его локальная концентрация лежит в пикомолярном диапазоне и уровень люминесценции слабее на несколько порядков.

Первые работы по регистрации синглетного кислорода продемонстрировали, что характерная люминесценция синглетного кислорода наблюдается при 1270 нм в процессе облучения опухолевых клеток животных с накопленным ФС [97, 151]. В дальнейшем Niedre с соавторами показали, что общий сигнал люминесценции $^1\text{O}_2$ (т.е. общее число фотоотсчетов в процессе сеанса ФДТ), сенсibilизированной аминолевулиновой кислотой и измеренной в суспензии раковых клеток, хорошо коррелирует с клеточным выживанием – чем больше был сигнал люминесценции $^1\text{O}_2$, тем меньше была выживаемость клеток [152].

На основании известных параметров источника света и времени процедуры можно рассчитать дозу светового облучения в процессе ФДТ. Большинство используемых на практике препаратов способствуют образованию синглетного кислорода и при этом обладают остаточной флуоресценцией, которую можно достаточно просто зарегистрировать с помощью современных ПЗС (прибор с зарядовой связью) камер. В работе Сташевского с соавторами было показано, что амплитуда сигнала люминесценции синглетного кислорода прямо пропорциональна концентрации кислорода в объеме, непосредственно примыкающем

к облучаемому участку ткани или раствора [27]. Таким образом, можно осуществить промежуточный вариант ФДТ-дозиметрии, заменив в полной дозиметрии непосредственное слежение за концентрацией молекулярного кислорода на регистрацию люминесценции синглетного кислорода.

Приведенные рассуждения и выводы одинаково приемлемы как для фотодинамической терапии опухолей, так и для фотодинамической инактивации микроорганизмов.

Отметим, что в источниках света видимого диапазона максимальную глубину проникновения в биологические ткани обеспечивает красная часть спектра (625-740 нм), поскольку коротковолновое излучение (380-400 нм) поглощается гемоглобином и другими биоструктурами, а длинноволновое (760-780 нм) – поглощается водой, содержащейся в организме.

Как видно из рис. 3 ФС поглощает квант света и переходит в S_1 состояние, затем посредством интеркомбинационной конверсии заселяется в метастабильное T_1 состояние. Для порфиринов, как и для подавляющего числа ФС, фотосенсибилизированное образование синглетного кислорода является результатом взаимодействия молекул ФС в возбужденном триплетном состоянии и кислорода также в триплетном состоянии.

Интенсивность люминесценции 1O_2 пропорциональна количеству образовавшихся молекул синглетного кислорода [156]. Наиболее распространенный метод определения величины квантового выхода синглетного кислорода (γ_Δ) – относительный, при котором сравниваются интенсивности инфракрасной люминесценции ($\lambda = 1270$ нм) синглетного кислорода, образованного исследуемым ФС и стандартом.

В работе Сташевского с соавторами было показано, что амплитуды (I_0) сигналов люминесценции синглетного кислорода зависят линейно от энергии лазерных импульсов (E_L), которым возбуждался ФС. Для определения квантового выхода синглетного кислорода справедливо соотношение:

$$\gamma_\Delta = \gamma_\Delta^{st} a_1/a_1^{st} \quad (1),$$

где a_1 – тангенсы углов в зависимости $I_0/(1-10^{-D}) = a_1 E_L$, D – оптическая плотность раствора ФС [27]. В соотношении (1) индекс “st” относится к стандарту – известному порфирину $H_2TM4PyP$, для которого в воде $\gamma_\Delta^{st} = 0,77$ [72].

Таким образом, квантовый выход синглетного кислорода в растворах является важным показателем и может быть использован как критерий для отбора наиболее эффективных ФС.

1.2.5. Причина низкой чувствительности грамотрицательных бактерий к ФДИ и способы их преодоления

Большой группой исследователей установлено, что грамположительные бактерии высокочувствительны к фотосенсибилизирующему действию целого ряда красителей, в то время как грамотрицательные бактерии оказались резистентными к фотодинамическому воздействию большинства этих сенсibilизаторов [28, 83, 91, 127, 134, 135]. Однако значительное число трудноизлечимых микробных инфекций ассоциировано именно с грамотрицательными бактериями (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp.* и др.), что долгое время сдерживало практическое внедрение ФДИ микроорганизмов.

В фундаментальном аспекте одной из основных задач при изучении механизмов фотосенсибилизации бактерий является установление причин низкой чувствительности объектов, относящихся к грамотрицательным бактериям [135, 137, 141]. Условием эффективной прямой фотодинамической инактивации является тесная ассоциация ФС с биологической мишенью, что следует из малого (10-50 нм) диффузионного радиуса действия синглетного кислорода в биологической среде [162, 163]. Связывание ФС с микробными клетками-мишенями имеет определяющее значение при фотоинактивации, опосредованной экзогенными красителями. Изучение структурно-функциональных связей ФС с бактериальными клетками показало, что анионные или нейтральные их молекулы активно связываются с грамположительными бактериями и при воздействии света инактивируют их, тогда как те же молекулы ФС не инактивируют грамотрицательные бактерии при облучении светом [129, 134, 135, 153]. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что фотоинактивация бактерий, особенно грамотрицательных, в первую очередь определяется эффективностью связывания молекул ФС с клетками-мишенями. Таковую «присущую от природы» относительную резистентность грамотрицательных бактерий к ФДИ принято объяснять особенностью строения их клеточной стенки [142].

Цитоплазматическая мембрана (ЦМ) бактерий отделена от внешней среды клеточной стенкой толщиной 10-80 нм в зависимости от видовой принадлежности (рис. 4).

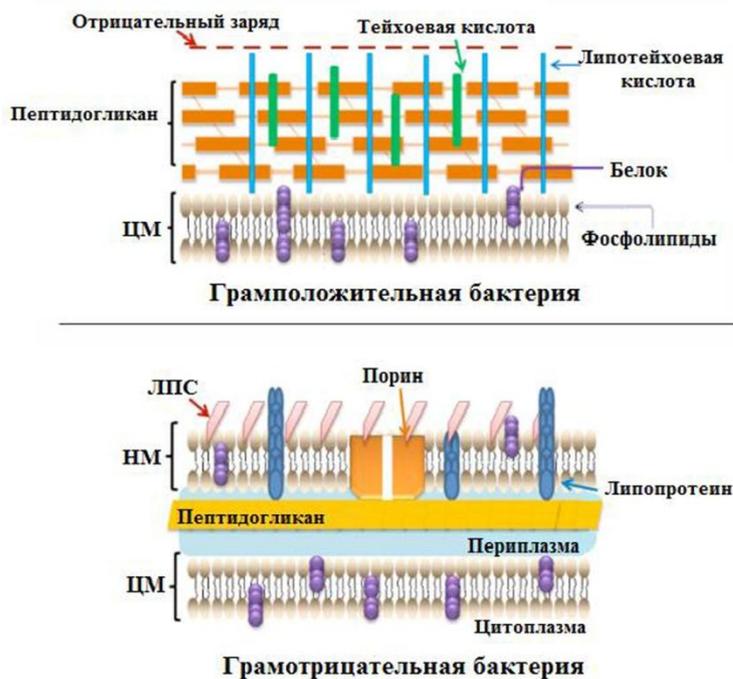


Рис. 4. Схематическое изображение структуры клеточной стенки и цитоплазматической мембраны у грамположительных и грамотрицательных бактерий [186].

У грамположительных бактерий пористый слой пептидогликана тесно прилегает к ЦМ. У грамотрицательных бактерий слой пептидогликана окружен бислойнными структурами НМ и ЦМ.

Клеточная стенка грамотрицательных тоньше (10-15 нм), чем у грамположительных (20-80 нм), но более сложная по своему строению. Отличительным компонентом клеточной стенки грамотрицательных служит наружная мембрана (НМ). В отличие от плазматической мембраны, которая имеет бислойную структуру, сформированную фосфолипидами, НМ имеет асимметричное молекулярное строение. На внутренней поверхности НМ содержит фосфолипиды, а на внешней – липополисахариды. Между НМ и ЦМ, окружающей протопласт, находится тонкий слой муреина или пептидогликана (2-3 нм). Он представляет собой мешкообразную структуру. Слой пептидогликана неплотно прилегает к ЦМ, между ними находится периплазматическое пространство. Для описания содержимого периплазмы предложен термин «периплазматический гель». Этот обводненный материал содержит разнообразные белки. Слои клеточной стенки у грамотрицательных бактерий связаны посредством липопротеинов [15, 94, 135]. В отличие от плазматической мембраны наружная мембрана не служит обычным барьером диффузии. Присутствующие в НМ белки-порины образуют в ней каналы для переноса гидрофильных малых молекул (мол. массой < 600 Да)

[63]. В НМ содержатся также белки, осуществляющие экспорт пептидов, а также белки, выполняющие функции рецепторов бактериофагов или специфических каналов поглощения веществ [15].

У грамположительных бактерий, по сравнению с грамотрицательными, клеточная стенка более толстая, но имеет более простую структуру. Она представляет собой относительно пористый гомогенный многослойный (до 100 слоев) пептидогликан, который тесно прилегает к цитоплазматической мембране. Пептидогликановый слой пронизывают тейхоевые кислоты, которые ковалентно связаны с пептидогликаном, и липотейхоевые кислоты, которые закреплены в гидрофобной области ЦМ. Грамположительные бактерии не имеют наружной мембраны [15, 73, 94, 135]. Клеточная стенка грамположительных бактерий проницаема для различных макромолекул с мол. массой до 60 кДа [73].

Грибковая клеточная стенка состоит из толстого слоя β -глюкана и хитина. По уровню проницаемости она занимает промежуточное место между проницаемостью клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий (рис. 5).

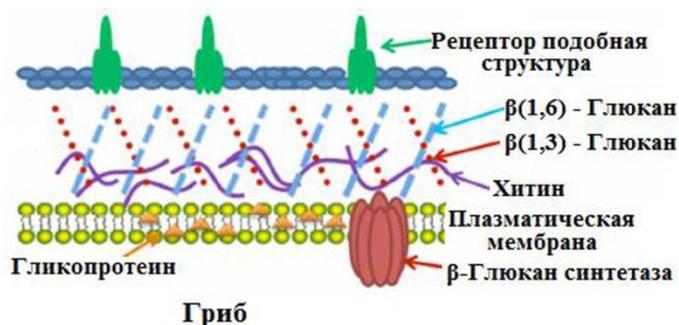


Рис. 5. Схематическое изображение структуры грибковой клеточной стенки.

Липидный бислой плазматической мембраны окружен менее пористым слоем β -глюкана и хитина [186].

Компоненты клеточных стенок (липополисахариды наружной мембраны грамотрицательных и липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий) несут отрицательный заряд [82, 149]. Это препятствует связыванию с микробными клетками липофильных или гидрофильных анионных красителей, что суживает круг ФС с потенциальной антимикробной активностью.

Научные исследования по преодолению резистентности грамотрицательных бактерий можно сгруппировать в несколько направлений. Одним из первых было использование,

помимо ФС, дополнительных химических веществ или биологических агентов, изменяющих проницаемость наружной мембраны бактерий для ФС, т.е. превращающих резистентные к ФДИ микроорганизмы в фотосенсибилизированные.

С этой целью применяли этилендиамин тетрауксусную кислоту (EDTA) [132, 138, 153], катионный полипептид полимиксин В [135, 153, 201], конъюгаты ФС с полимерами [90], наночастицами [78, 86], или антителами [44, 85], которые обеспечивали более высокое сродство ФС к микробным клеткам.

Вторым направлением научных поисков по преодолению резистентности к летальной фотосенсибилизации грамотрицательных бактерий стала разработка и апробация новых ФС с положительным зарядом. Подход, который принят несколькими группами – это использование молекул ФС с одним или более внутренними положительными зарядами обычно предоставленными четырьмя атомами азота [38, 40, 53, 122, 128].

Наиболее вероятным механизмом, обеспечивающим связывание катионных ФС с микробными клетками, является электростатическое взаимодействие (связывание) положительно заряженных заместителей в молекулах ФС с отрицательно заряженными центрами связывания на клеточных стенках (липополисахариды наружной мембраны грамотрицательных бактерий, липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий, фосфоманнаны и полифосфаты дрожжей) [76].

Обнаружено, что катионные ФС связываются и проникают сквозь клеточную стенку грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов [138]. Также было выявлено, что скорость поглощения катионных ФС бактериальными клетками намного выше, чем эукариотическими клетками хозяина [95, 186]. Если облучение осуществляется через короткие промежутки времени после применения ФС (в минутах), то повреждение ткани хозяина от ФДИ будут сведены к минимуму [59, 92].

1.2.6. Поиск эффективных ФС для ФДИ микроорганизмов

Одной из актуальных задач оптимального проведения фотодинамической инактивации микроорганизмов является поиск ФС, способного обеспечить эффективное практическое использование этого метода. Для ФДТ использовались различные типы природных и синтетических ФС, включая порфирины, фталоцианины, хлорины и бактериохлорины.

Порфирины и их гидрированные аналоги (хлорины и бактериохлорины) играют важную роль в природе. Они входят в состав таких известных белков, как гемоглобин, миоглобин, а также ферментов (каталаза, пероксидаза) и многочисленной группы цитохромов. Эти гемопротейды участвуют в транспорте кислорода и обеспечении животных организмов энергией. Фотосинтез и родственные ему процессы выполняются второй обширной группой порфиринов – хлорофиллами и бактериохлорофиллами. Первая группа порфиринов выступает в форме железных комплексов, а хлорины и бактериохлорины содержат магний.

В основе всех порфириновых соединений лежит сопряженное макроциклическое кольцо (рис. 6), состоящее из четырех пиррольных остатков, соединенных между собой метиновыми группами [4]. Хлорины имеют два добавочных атома водорода (вместо двойной связи) в положениях 17 и 18, а бактериохлорины – 4 атома водорода в положениях 7, 8, 17 и 18.

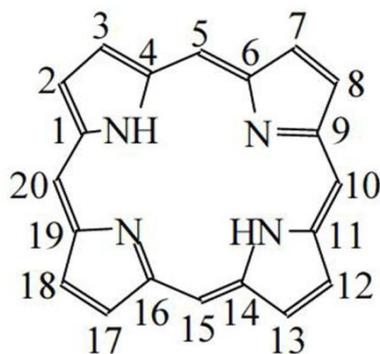


Рис. 6. Структурная формула порфирина.

Нумерация порфиринов по номенклатуре IUPAC.

В медицинской практике наиболее широко используются препараты на основе гематопорфирина. К ФС первого поколения относятся Фотофрин (США и Канада), Фотосан (Германия), НрD (Китай) и Фотогем (Россия) [9, 10]. Для ФДТ с препаратами на основе производных гематопорфирина применяют лазерное излучение с длиной волны 628–632 нм, при котором глубина фотоиндуцированных некрозов не превышает 1 см. Дозы световой энергии зависят от размеров и локализации опухолевого поражения, поэтому существенно варьируют, составляя 50-500 Дж/см². Наряду с высокой терапевтической активностью эти

фармакокинетические), фотофизические и химико-технологические критерии [46]. В настоящее время они выглядят следующим образом:

- низкая темновая и высокая световая токсичность в терапевтических дозах [47, 52, 67, 186];
- высокая селективность накопления в тканях злокачественных новообразований, инфицированных тканях, микробах и вирусах, а также быстрое выведение ФС из кожи, эпителиальной ткани и организма [47, 52, 67];
- сильное поглощение в красном и ближнем инфракрасном спектральном диапазоне (600-1500 нм), где биологические ткани имеют наибольшее пропускание [56, 67, 126, 162];
- подходящие фотофизические характеристики: высокий квантовый выход синглетного кислорода ($\gamma_{\Delta} \geq 0,5$), относительно продолжительное время жизни триплетного состояния (t_{tr} , в пределах микросекунд), высокая энергия триплетного состояния (≥ 94 кДж/мол) [48, 109, 121, 159, 186];
- доступность получения или синтеза, однородный химический состав;
- хорошая растворимость в воде или разрешенных для внутривенного введения жидкостях и кровезаменителях;
- стабильность при световом воздействии и хранении.

У порфирина и его аналогов имеются следующие преимущества: 1) многие из них являются эффективными продуцентами синглетного кислорода [27]; 2) они обычно не действуют в отсутствие света; 3) у них более или менее сильное поглощение в красной области оптического спектра (наиболее эффективно порфирины поглощают свет с длинами волн 400-420 нм, что соответствует так называемой полосе Soret, но существуют и Q-полосы, менее эффективно поглощающие излучение с длинами волн 500-700 нм); 4) они относительно стабильны. Однако последнее качество может стать недостатком при медленной элиминации ФС из организма.

Для эффективной генерации синглетного кислорода ФС должен иметь высокий квантовый выход триплетного состояния, достаточно продолжительное время жизни (10^{-4} - 10^{-2} с) и энергию (не ниже 94 кДж/моль) для возможности передачи этой энергии молекуле кислорода. Квантовый выход синглетного кислорода является основным параметром при

подборе ФС. Большое значение имеет также наличие интенсивного максимума поглощения в дальней красной и ближней инфракрасной области спектра (750-1500 нм), где биологические ткани относительно прозрачны, для более полного воздействия на обширные и глубокие инфекции.

На распределение и накопление ФС в тканях, и, следовательно, на его фотоповреждающее действие влияет множество факторов: способ введения ФС, время, прошедшее с момента введения, и, самое главное, химические свойства вещества, его структура, масса и заряд молекулы, гидрофильность или липофильность (склонность растворяться в жирах, липидах). Гидрофильные препараты можно использовать для приготовления водных растворов для внутривенного введения. Они связываются с альбуминами, а также другими белками сыворотки крови и накапливаются преимущественно в межклеточном пространстве. Если ФС плохо растворяется в воде, требуется приготовление липосомальных форм препарата. Липофильные сенсibilизаторы лучше проникают в клетку, накапливаясь в мембранах клетки, ядра и лизосом, в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме. Поэтому и механизм повреждающего действия этих ФС несколько разный. Липофильные препараты атакуют клетку изнутри, а растворимые в воде ФС способствуют гибели быстрорастущих клеток косвенно, повреждая кровеносные сосуды и прекращая снабжение опухоли кислородом и другими питательными веществами.

При синтезе препарата можно до некоторой степени управлять свойствами гидрофильности-липофильности, зарядом молекулы ФС в растворе, положением максимума поглощения и другими параметрами, получая производные с различными заместителями.

В отличие от противоопухолевой ФДТ, основанной преимущественно на использовании тетрапиррольных ФС (порфирины, хлорины, фталоцианины), в ФДИ микроорганизмов до недавнего времени основной упор делался на сравнительно низкомолекулярные красители – фенотиазины и акридины [203, 207].

Несмотря на то, что фенотиазины (метиленовый синий, толуидиновый синий) обладают широким спектром антимикробного действия, их применение в целях ФДИ микроорганизмов имеет ряд недостатков. В первую очередь, это недостаточная активность в отношении бактерий, грибов и необходимость их применения в высоких концентрациях (до 200 мкМ на моделях *in vivo*), которые токсичны для животных [225]. Одно из основных

преимуществ ФДИ микроорганизмов над антибиотикотерапией заключается во множественном характере окислительной деструкции микробных клеток-мишеней, что затрудняет выработку устойчивости к последующим циклам фотодинамических воздействий [106]. Но, в отношении фенотиазинов, это преимущество может быть поставлено под сомнение, поскольку мутантные бактерии с повышенным уровнем экспрессии транспортных белков множественной лекарственной устойчивости проявляют более высокую устойчивость к фотосенсибилизации с фенотиазинами по сравнению с дикими штаммами [199]. Применение акридинов может сдерживаться наличием у этой группы красителей мутагенных свойств [75].

В этой связи несомненный интерес представляет изучение антимикробной активности других типов ФС, в том числе на основе тетрапиррольных структур – порфиринов. Тетрапиррольные красители являются известными сенсibilизаторами живых организмов при действии видимого света. Эти соединения широко используются в фотодинамической терапии рака, а в последние годы находят применение при лечении микробных поражений. Фототоксичность порфиринов основана на способности содействовать генерации активных форм кислорода (главным образом синглетного кислорода), которые, реагируя с биологически важными макромолекулами, вызывают их фотоокисление и нарушение функциональных свойств.

Катионные тетрапиррольные ФС, содержащие четыре функциональные группы, были синтезированы на основе таких структур как порфирины [1-3, 122, 128] и фталоцианины [119].

Катионные ФС инактивируют микроорганизмы всех классов: грамположительные и грамотрицательные бактерий [38, 40, 91, 135, 137, 141], а также бактериальные споры [62], грибы [74, 81], вирусы [39, 209], паразиты [35, 71].

Значительные усилия были направлены на оптимизацию таких свойств этих соединений, как избирательность к микробным клеткам по сравнению с клетками хозяина [61, 95], максимальное поглощение в дальней красной и ближней инфракрасной области спектра [104] и уменьшение фотобликинга [120].

Было показано, что наибольшей активностью обладают водорастворимые катионные красители [141]. Исследования показали, что более эффективными являются те ФС, которые

несут больше положительного заряда [104]. Катионные порфирины, имеющие три и четыре заряда, воздействовали эффективнее при ФДИ грамположительных и грамотрицательных бактерий, чем монокатионные ФС [38, 138].

Исходя из перспективности и эффективности этого ряда порфиринов в Ереванском государственном медицинском университете, на кафедре органической химии фармацевтического факультета синтезированы новые катионные порфирины и металлопорфирины с различными периферическими функциональными группами (рис. 8). Эти порфирины показали высокую эффективность как при ФДТ опухолей [87, 200], так и при ФДИ грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов [1-3].

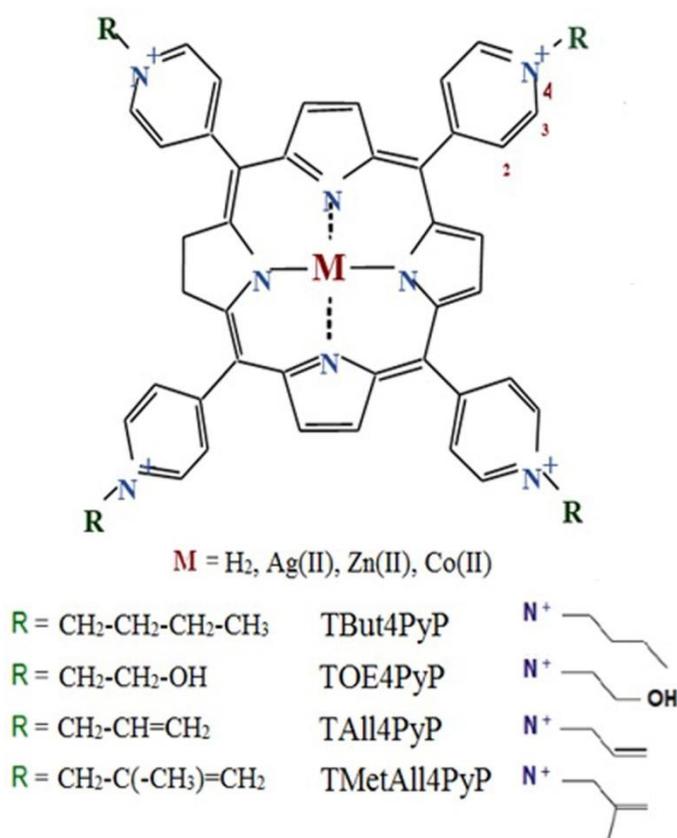


Рис. 8. Схематическое изображение синтетических катионных порфиринов.

M – центральный атом металла металлопорфирина, R – периферические функциональные группы.

Там же из листьев крапивы (*Urtica dioica*) были выделены производные хлорофилла – природные порфирины феофитин(а) и феофитин(б) и получены их сребренные (II) и цинковые (II) комплексы (рис. 9) [1, 12].

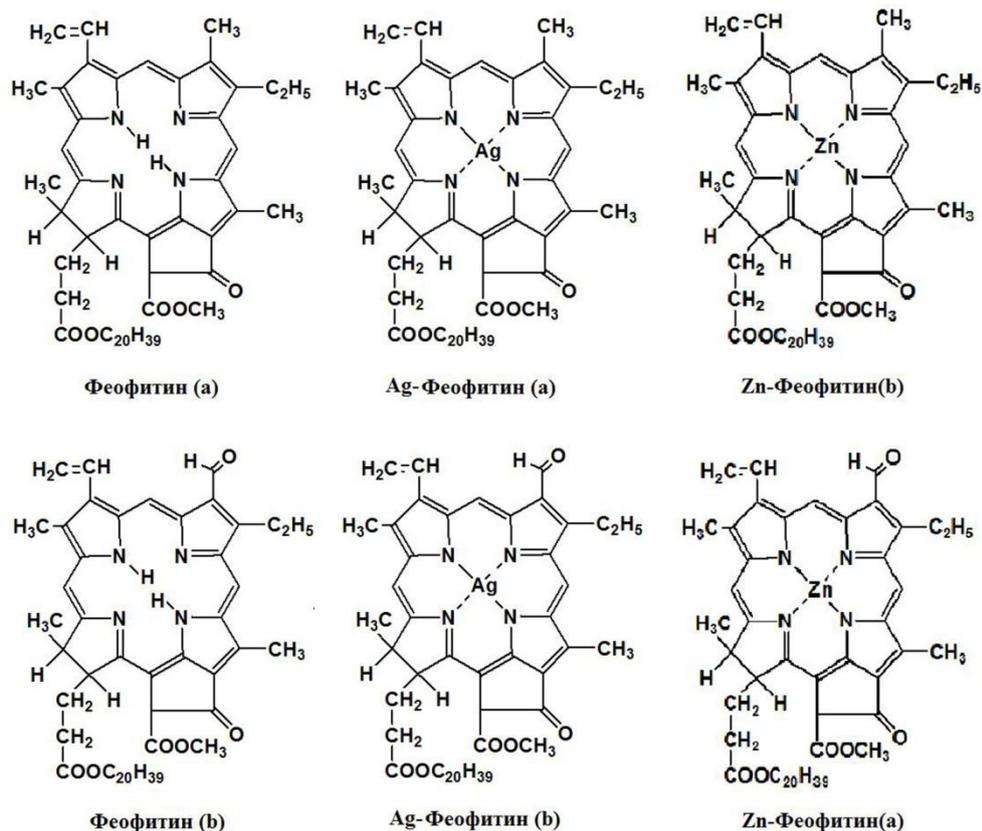


Рис. 9. Природные катионные порфирины феофитин(а и б) и их серебряные (II) и цинковые (II) комплексы [12].

Таким образом, вышеприведенные работы убедительно свидетельствуют о том, что катионные порфирины являются перспективным и высокоэффективным классом соединений с широким спектром применения в ФДИ микроорганизмов.

1.2.7. Применение нанокмползитов (наночастица-порфирин) для ФДИ микроорганизмов

Для усиления ФДИ микроорганизмов рассматривается два основных механизма: увеличение локальной концентрации ФС в непосредственной близости от клеточной стенки бактерий с помощью наночастиц [116] и увеличение захвата наночастиц бактериями с помощью заряда или биоспецифических взаимодействий [169]. Для пассивной доставки ФС наночастицы благородных металлов (золото и серебро) занимают особое место среди других типов наночастиц вследствие резонансного поглощения и рассеяния света в видимом (380-740 нм) и ИК (700-3000 нм) диапазонах спектра. Такие нанокмползиты, состоящие из

плазмонных резонансных наночастиц и молекул ФС, имеют некоторые преимущества по сравнению с другими типами наноконтейнеров. Резонансное поглощение света наночастицами приводит к сильному нагреву частиц, которые могут привести к фототермической инактивации бактерий в процессе ФДИ [224], кроме того металлические поверхности наночастиц могут привести к увеличению фотодинамической активности молекул ФС, сопряженных с металлическими наночастицами [98].

Применение наночастиц золота и серебра в качестве платформы для создания композитов с ФС в антимикробной инактивации весьма многообещающее. В настоящее время число публикаций на эту тему довольно ограничено, в отличие от большого количества статей по ФДТ раковых клеток. Фотодинамическая эффективность конъюгатов толуидинового синего с наночастицами золота показана в работе Gil-Tomas с соавторами [78]. Perni с соавторами использовали наночастицы золота для повышения фотодинамической активности метиленового синего в полимерной матрице против MRSA и *E. coli* [168]. Бимодальное (фототермическое и фотодинамическое) подавление метициллинрезистентного штамма *S. aureus* толуидиновым синим, конъюгированного с золотыми наностержнями, впервые было показано в работе Куо с соавторами [118]. Tuchina с соавторами весьма убедительно показали синергическое действие на MRSA с использованием индоцианина зеленого/золотых и серебряных наносфер при облучении ИК спектром света [202].

Конструирование нанокомпозитов из наночастиц золота и серебра позволяет концентрировать в таких структурах значительные количества порфиринов [114]. При этом комплексобразование катионных порфиринов с такими наночастицами значительно усиливает возможности бимодального поражения микроорганизмов вследствие усиления связывания положительно заряженных порфиринов с отрицательно заряженной мембраной микроорганизмов, а также вследствие высокого квантового выхода синглетного кислорода этими катионными порфиринами.

Как было отмечено выше, одним из основных механизмов усиления ФДИ микроорганизмов является увеличение локальной концентрации ФС в непосредственной близости от клеточной стенки бактерий с помощью наночастиц [116]. Среди многих типов наночастиц, используемых для усиления эффективности ФС и его целевой доставки,

наночастицы цеолитов занимают особое место вследствие их большой биологической активности [42, 181], а также уникальных возможностей сорбции микроорганизмов [117] и лигандов-порфиринов [70].

Результаты антибактериального действия цеолитов представлены в ряде исследований. Методом иммобилизации наночастиц серебра в цеолитные мембраны было показано, что такие структуры достаточно эффективно уничтожают *E. coli* и обладают бактериостатическим действием по отношению к MRSA [147]. С 1985 г. был проведен большой цикл работ по включению различных порфиринов и металлопорфиринов в цеолиты [57]. Первые попытки комбинирования порфиринов с цеолитами показали, что порфирины лучше связываются с внешней поверхностью цеолитов, чем инкапсулируются во внутренние поры [60]. Дальнейшие исследования показали, что катионные порфирины хорошо инкапсулируются во внутреннюю область цеолитов ионообменным механизмом, тогда как анионные порфирины не встраиваются, а нейтральные порфирины инкапсулируются лишь в следовых количествах [223].

Таким образом, наноконкомпозиты из наночастиц благородных металлов и цеолитов с конъюгированными порфиринами обладают высокой биологической активностью по отношению к микроорганизмам и являются одним из наиболее перспективным решением проблемы целевой атаки.

1.3. Корневые гнили пшеницы

В течение многих тысяч лет эволюции сельскохозяйственные растения приобрели не только полезные свойства, но и ряд заболеваний, которые обусловлены паразитическими грибами, бактериями, вирусами, нематодами, насекомыми-вредителями и условиями окружающей среды [100].

Распространение таких опасных болезней сельскохозяйственных культур, как корневые гнили, мучнистая роса, ржавчина, фузариоз, пятнистости различной этиологии, фитофтороз, бактериозы, часто носит эпифитотийный характер и приводит к чрезвычайно высоким потерям урожая, а заселение почвы патоконкомплексами токсинообразующих грибов сопровождается порчей продукции [8].

Пшеница – ведущая продовольственная культура, поражается многочисленными болезнями, вызываемые микроскопическими грибами. Среди них наиболее вредоносными являются снежные плесени, корневые гнили, твёрдая головня, пыльная и карликовая головня, виды ржавчины, мучнистая роса, септориозно-пиренофорозные пятнистости, фузариоз колоса и зерна. Среди них корневые гнили занимают особое место ввиду значительных потерь урожая и широкой распространенности в Европе, Азии, США и Канаде [99, 103].

Корневые гнили вызываются несколькими видами фитопатогенных грибов, обитающих в почве, на семенах и растительных остатках. При этом разные виды могут иметь сходные симптомы проявления. Наиболее часто встречаются фузариозная, гельминтоспориозная (обыкновенная), офиоболезная и церкоспореллезная корневые гнили [11, 32].

Возбудителями фузариозной корневой гнили являются грибы рода *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* и др.) [49]. Этим возбудителем поражаются в основном озимая и яровая пшеница, озимая рожь, яровой ячмень и овес. В течение вегетации заражение осуществляется конидиями, распространяющимися воздушно-капельным путем. Сохраняется грибок в виде мицелия, хламидоспор, склероциев на растительных остатках, в почве, на поверхности и внутри семян [11, 32].

Гельминтоспориозная (обыкновенная) корневая гниль, возбудителем которого является *Bipolaris sorokiniana* (син. *Helminthosporium sativum*). Чаще всего поражается ячмень, реже – яровая пшеница и овес. Возбудитель сохраняется в почве на инфицированных растительных остатках, на поверхности и внутри семян. В течение вегетационного сезона инфекция распространяется при помощи конидий воздушно-капельным путем [11, 32].

Офиоболезная корневая гниль (возбудитель – *Ophiobolus graminis*, син. *Gaeumannomyces graminis*) чаще поражает пшеницу, но встречается на ячмене, ржи и овсе. В течение вегетации заражение осуществляется аскоспорами, которые разносятся потоками воздуха и каплями дождя. Сохраняется грибок на инфицированных растительных остатках в виде грибницы и плодовых тел, хламидоспор, а также в виде мицелия в почве на большой глубине [11, 32].

Церкоспореллезная прикорневая гниль (возбудитель – *Pseudocercospora herpotrichoides*) поражает всходы и взрослые растения озимой пшеницы, ржи, ячменя, редко

– яровые культуры. Возбудитель сохраняется на инфицированных растительных остатках в почве. В течение вегетации распространяется конидиями, переносимыми воздушными потоками и каплями дождя [11, 32].

Как правило, на одном поле можно обнаружить несколько видов корневых гнилей. Соотношение болезней, составляющих комплекс, определяется природно-климатическими особенностями региона, уровнем его интенсификации и специализации [11, 32].

За последнее десятилетие возросло количество поражений посевов зерновых культур грибом рода *Fusarium*, вследствие чего зерно заражается дезоксиниваленолом (ДОН). ДОН по действию на человека и теплокровных животных относят к наиболее опасным микотоксинам [140]. Несмотря на то, что ДОН не самый токсичный среди микотоксинов, он наиболее часто встречается в зерне во всем мире и может накапливаться в высоких концентрациях. Высокая термическая стабильность ДОН, обусловленная наличием эпоксидной группы, делает детоксикацию загрязненного зерна практически невозможной [211]. Хроническая интоксикация микотоксинами людей и сельскохозяйственных животных может негативно воздействовать на желудочно-кишечный тракт, угнетать иммунную систему, повреждать гены, способствовать росту возникновения онкологических заболеваний [171, 196].

Контроль развития корневых гнилей пшеницы является сложной проблемой. Борьба с этой болезнью ведется как с помощью регулирования подачи удобрений, так и с помощью химикатов-фунгицидов.

Ведущий вклад в мировой экологический кризис по загрязненности почв и сельскохозяйственных продуктов питания вносит также массовое применение пестицидов и минеральных удобрений [25, 139]. Применение химических фунгицидов имеет ряд особенностей. Снижение норм расхода химических фунгицидов приводит к уменьшению эффективности и возникновению устойчивых популяций фитопатогенов, а увеличение норм расхода – к ухудшению экологической обстановки и опасности загрязнения продукции зернопроизводства остаточным количеством фунгицидов. Вместе с тем, в условиях сложной фитосанитарной ситуации на посевах сельскохозяйственных культур, значительной пораженности посевного и посадочного материала и инфицированности пахотных земель

фитопатогенными микроорганизмами полный отказ от использования средств защиты растений и агрохимикатов невозможен [21, 23, 45].

Обработанные фунгицидами семена озимых культур лучше переносят зиму, так как препарат повышает их устойчивость к неблагоприятным факторам. Молодые растения уходят под снег крепкими, потому что снимается не только семенная инфекция, но и почвенная [101].

Большой экономический ущерб заставляет исследователей непрерывно проводить поиск новых эффективных и экологически безопасных препаратов против этих заболеваний.

В связи с этим поиск новых технологий, способов и средств обработки культур, эффективных противогрибковых препаратов является важной и актуальной задачей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Бактериальные штаммы. В работе были использованы бактериальные штаммы *E. coli* К-12 (из коллекции НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА), *Salmonella typhimurium* Г-38, *Staphylococcus epidermidis* и *S. aureus* (из коллекции НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А. Алексаняна, МЗ РА), *S. aureus* 209 Р и MRSA (из коллекции Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевич).

Питательные среды. Для выращивания штаммов *E. coli* К-12, *S. typhimurium* Г-38, *S. aureus*, *S. epidermidis* и MRSA в качестве полноценной жидкой среды использовали среду Luria-Bertani (LB) следующего состава: триптон (“Difco”, США) – 10 г, дрожжевой экстракт (Difco) – 5 г, хлористый натрий – 10 г, вода дистиллированная – 1 л, рН среды 7,2-7,5. Твердую среду L-агар готовили добавлением 16 г агара (“Difco”) на 1 л указанной среды LB [136].

Для выращивания бактериальных штаммов *E. coli* К-12, *S. typhimurium* Г-38 в качестве полноценных сред использовали мясо-пептонный бульон (МПБ) следующего состава: пептон – 10 г, NaCl – 5 г, мясная вода – 1 л, а также мясо-пептонный агар (МПА), который получали добавлением 16-18 г/л агара (“Difco”) в состав МПБ.

Для выращивания штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis* и MRSA в качестве полноценной твердой питательной среды использовали желточно-солевой агар (ЖСА) следующего состава: 2% МПА, содержащий 75 мг/мл NaCl и 15 мл раствора одного яичного желтка в 100 мл физиологического раствора.

Природные порфирины и производные синтетических порфиринов. В работе были использованы водорастворимые природные порфирины и производные синтетических порфиринов, полученные на кафедре химии фармацевтического факультета Ереванского государственного медицинского университета и любезно предоставленные для использования в работе к.х.н., доцентом Р.К. Казаряном [12, 16, 77].

Структура соединений была исследована и подтверждена методами ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), инфракрасной и абсорбционной спектроскопии (см. гл. 1.2.6, рис. 8) [16, 77].

В работе были использованы следующие катионные синтетические порфирины и металлопорфирины с различными центральными атомами металла (Zn^{2+} , Ag^{2+} и Co^{2+}) и различными периферическими функциональными группами:

1. Периферическая группа – оксиэтил ($R = CH_2-CH_2-OH$):

- мезо-тетра[4-N-(2'-оксиэтил)пиридил]порфирин (ТОЕ4PyP), Zn-ТОЕ4PyP, Ag-ТОЕ4PyP.

2. Периферическая группа – бутил ($R = CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$):

- мезо-тетра[3-N-(2'-бутил)пиридил]порфирин (TBut3PyP), Zn-TBut3PyP;
- мезо-тетра[4-N-(2'-бутил)пиридил]порфирин (TBut4PyP), Ag-TBut4PyP, Zn-TBut4PyP.

3. Периферическая группа – аллил ($R = CH_2-CH=CH_2$):

- мезо-тетра[4-N-(2'-аллил)пиридил]порфирин (TAlI4PyP), Zn-TAlI4PyP, Ag-TAlI4PyP, Co-TAlI4PyP.

4. Периферическая группа – метилаллил ($R = CH_2-CH=CH_2$):

- Со-мезо-тетра[4-N-(2'-метилаллил)пиридил]порфирин (Co-MetTAlI4PyP).

Использованные в работе природные порфирины и их серебряные (II) и цинковые (II) комплексы (см. гл. 1.2.6, рис. 9) [12]:

1. феофитин(a+b), Ag-феофитин(a+b), Zn-феофитин(a+b);
2. феофитин(a), Ag-феофитин(a), Zn-феофитин(a).

Для сравнения в работе использовались допущенные для применения в клиниках ФС: анионный порфирин хлорин e_6 («Предприятие по производству диагностических и лекарственных препаратов», Минск, Беларусь), нейтральный ФС Al-фталоцианин (известен также как препарат «Фотосенс», производство Научно-исследовательского института полупродуктов и красителей (НИОПИК), Москва, Россия) и 5,10,15,20-тетракис[4-N-метилпиридил]порфирин ($H_2TM4PyP$) (“Porphyrin systems” Co., Германия) [46].

Маточные концентрации порфиринов и других ФС (10^{-3} М) готовились за час до эксперимента. Все порфирин-содержащие растворы хранились при комнатной температуре (не более 24 ч) в темноте во избежание фотохимических модификаций и фотообесцвечивания порфиринов.

Приготовление клеточных суспензий микроорганизмов. Ночную культуру, выращенную в питательной среде LB при $37^\circ C$ на качалке в течение 18 ч, осаждали

центрифугированием при 4000 об/мин 10 мин. Осадок дважды промывали фосфатным буфером (ФБ) следующего состава: 0,2 М K_2HPO_4 ; 0,2 М NaH_2PO_4 ; pH 7,4. Далее осадок ресуспензировали в ФБ до оптической плотности соответствующей 1×10^9 КОЕ/мл.

Оптическую плотность (ОП) клеточных суспензий измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-VISIBLE Recording Spectrophotometer UV-2100 (Япония) при длине волны 670 нм.

Фотодинамические и темновые исследования. Пробы для исследования содержали 0,1 мл раствора ФС соответствующей концентрации и 0,9 мл суспензии микроорганизмов в ФБ (титр клеток составлял 1×10^9 КОЕ/мл). Пробы инкубировали в течение 24 ч при 37°C в термостате (темновое исследование) в соответствии с оптимальной температурой роста указанных штаммов.

Для фотодинамических исследований (фотодинамическая инаktivация микроорганизмов) непосредственно после добавления ФС пробы инкубировали в течение 10 мин, далее облучали вольфрамовой лампой 50 Вт с диапазоном облучения 350-1100 нм и плотностью мощности излучения 30 мВт/см^2 , или с использованием светодиода (LED) с пиковой эмиссией 405 нм и плотностью мощности излучения 70 мВт/см^2 в течение 5-30 мин.

Выживаемость бактерий определяли по методу последовательных разведений [17]. Для этого суспензии были серийно 10 раз разбавлены ФБ-ом. Затем капли по 10 мкл из каждого разбавления были нанесены на питательную среду (МПА или L-агар) в чашках Петри (по 5 повторов) и инкубированы при 37°C в аэробных условиях. После 24 ч инкубации у штаммов было подсчитано число колониеобразующих единиц (КОЕ). Выживание клеток определяли как процент относительно контрольного образца без добавления ФС, предварительно взятое перед облучением из каждой пробы. Также определяли выживание в пробах после облучения, в отсутствие ФС, и в пробах после инкубации в темноте с ФС.

Исследование фотофизических свойств порфиринов проводили в дистиллированной воде при комнатной температуре в 10 мм кварцевых кюветках. Были проведены исследования водорастворимых катионных порфиринов и металлопорфиринов с различными центральными атомами металла (Zn^{2+} , Ag^{2+} и Co^{2+}) и различными периферическими функциональными группами (оксиэтил-, бутил-, аллил-, метилаллил-).

Спектры флуоресценции образцов регистрировали на серийном спектрофлуориметре Perkin-Elmer MPF 44 (США). Флуоресцентные спектры порфиринов и металлопорфиринов также были исследованы на лазерном флуорометре, созданном в лаборатории фотоники молекул Института физики НАН Беларуси. В стандартной конфигурации возбуждение образцов осуществляли лазером на длине волны 53 нм.

Квантовые выходы синглетного кислорода (γ_{Δ}) определяли относительным методом [27]. В качестве стандарта использовали 5,10,15,20-тетракис[4-N-метилпиридил] порфирин ($H_2TM4PyP$), для которого $\gamma_{\Delta} = 77\%$ [72]. Квантовые выходы синглетного кислорода $H_2TM4PyP$ были исследованы в Tris-буфере, а порфиринов – в дистиллированной воде.

Для определения квантового выхода синглетного кислорода (γ_{Δ}) водорастворимых катионных порфиринов использовали соотношение $\gamma_{\Delta} = \gamma_{\Delta}^{st} a_1/a_1^{st}$ (см. гл. 1.2.4).

Получение наночастиц серебра. В качестве исходного препарата для получения наночастиц серебра использовали нитрат серебра ($AgNO_3$, марка ч.д.а., 99,94%, «Реахим»), а также полиэтиленгликоль (PEG 800, “LOBA FEINCHEMIE”, Австрия), этиленгликоль (Ethylene Glycol № E-9129, “Sigma-Aldrich”, США) и поливинилпирролидон, предоставленный Институтом переливания крови МЗ России (PVP, х.ч.).

Коллоидное серебро получали по методике, описанной в работе Silvert с соавторами [189]. Типовую процедуру получения проводили следующим образом: 1 г поливинилпирролидона (PVP) растворяли в $7,5\text{ см}^3$ этиленгликоля при комнатной температуре, затем в этот раствор добавляли 40 мг $AgNO_3$. Суспензию размешивали при комнатной температуре так, чтобы нитрат серебра полностью растворился. Далее систему нагревали до $120^{\circ}C$ со скоростью $1^{\circ}C$ в минуту и реакцию при этой температуре продолжали 22-24 ч. Образец быстро остужали в водяной бане до комнатной температуры и разводили водой в мерном стакане до 25 см^3 . В результате получали монодисперсный коллоидный раствор, имеющий дисперсию серебра с размером наночастиц 20-21 нм. О присутствии наночастиц серебра в растворе свидетельствовал широкий пик абсорбции, максимум которого находится на длине волны около 410 нм. Нами был получен пик абсорбции на длине волны $\lambda_{max} = 412,5\text{ нм}$.

Получение наночастиц цеолита. Наночастицы природного цеолитного минерала – клиноптилолита (Ноемберянский район, РА) нанометрических размеров получали методом

механического дробления цеолита и дальнейшей седиментацией в водном растворе [183]. На определенной высоте водяного столба отбирали наночастицы размерами 80-130 нм. Механическое дробление цеолита осуществляли на модифицированной дробилке типа дисмембратор (мельница типа дисмембратор марки ИЛА-3, Россия). Размер наночастиц контролировали лазерным анализатором наночастиц типа IG-1000 (“Shimadzu”, Япония), диапазон измерений 0,5-200 нм, либо методом электронной микроскопии.

Спектральные исследования проводились на спектрофотометре “Shimadzu UV-VISIBLE Recording Spectrophotometer UV-2100” (Япония).

Исследование эффективности действия производных синтетических порфиринов в борьбе с корневой гнилью озимой пшеницы проводились в теплице Национального аграрного университета Армении и в полевых условиях Научного центра земледелия и защиты растений (г. Эчмиадзин, Армавирская область, РА). Объектом исследования была выбрана озимая пшеница «Безостая-1». Для опытных образцов использовалась зараженная возбудителями корневой гнили почва, отобранная из экспериментальных полей «Научного центра земледелия и защиты растений», а в качестве контроля – незараженная почва.

Исследования эффективности действия порфиринов в борьбе с корневой гнилью озимой пшеницы в тепличных условиях проводились следующим образом:

1. семена пшеницы предварительно обрабатывались различными концентрациями (0,5; 0,75; 1; 1,5 и 3 г/л) металлопорфиринов Zn-ТОЕ4РyP и Ag-ТОЕ4РyP в течение 0 мин, 15 мин, 30 мин, 60 мин и 24 ч;
2. обработанные таким способом по 20 семян были посажены в вазоны. После прорастания в каждом вазоне оставлены по 10 проростков;
3. эксперименты проводились в пяти повторах (5 вазонов, по 6 кг почвы в каждом) при температуре $23 \pm 5^{\circ}\text{C}$;
4. в качестве косвенных показателей негативного влияния корневой гнили на разных стадиях роста анализировалась всхожесть семян и измерялась высота растений.

При исследовании эффективности действия порфиринов в борьбе с корневой гнилью озимой пшеницы в полевых условиях предварительно обработанные в тех же условиях семена были посеяны и на заключительном этапе «полного созревания» пшеницы (после 270 дней посева) измеряли следующие показатели урожая:

1. длину колоса;
2. число колосьев в 1 м² поля;
3. вес зерен в одном колосе;
4. вес 1000 зерен;
5. урожай с 1 м² поля (урожай с 1 га).

Определение белка. Экстракцию белка проводили кипячением 20 мг растертых в ступке зерен пшеницы в 1 мл экстракционного раствора (1 М NaOH, 0,5% SDS) в кипящей водяной бане в течение 10 мин. Далее раствор центрифугировали при 10000 об/мин 15 мин и в супернатанте определяли концентрацию белка.

Концентрацию белка в зернах пшеницы определяли методом Grows и Davis [172] по разнице поглощений в ультрафиолетовой области спектра по следующей формуле:

$$C = 0,167 \times [(A_{224} - A_{236}) - (A_{224\text{контр}} - A_{236\text{контр}})] \times N$$

где C – концентрация белка в зернах пшеницы (мг/мл), A – оптическая плотность белкового раствора при соответствующих длинах волн, A_{контр} – оптическая плотность экстракционного раствора при соответствующих длинах волн, N – число разведений.

Концентрацию белка также определяли методом Whitaker и Granum [213] по разнице поглощений в ультрафиолетовой области спектра по следующей формуле:

$$C = A_{235} - A_{280} / 2,51$$

где C – концентрация белка в мг/мл, A – оптическая плотность белкового раствора при длинах волн 235 и 280 нм. Эта формула исключает влияние присутствия нуклеиновых кислот в растворе, поскольку нуклеиновые кислоты имеют одинаковое поглощение при длинах волн 235 и 280 нм.

Статистический анализ. Статистические параметры (средняя величина, стандартное отклонение), используемые в экспериментах, вычислены при помощи программы Excel. Статистически значимые различия определены с использованием компьютерной программы Prism 3.03 (GraphPad Software, Inc., CA) и рассмотрены при помощи дисперсионного анализа (ANOVA); множественное сравнение было проделано с использованием теста Tukey (значение $p < 0,05$ рассматривалось как значимая разница).

Использованные программы. Для построения и обработки спектров использовали программу Microsoft Office Excel. Построение спектров по численным значениям с

интервалом 2 нм каждой точки проводили с использованием программы обработки спектров “Spectra Manager for Spectra Analysis, Version 1.53.00, JASCO Corporation, 2000 (“Spectra Manager”) [102]. Учет несимметричности спектров и отклонения от базовой (нулевой) линии был проведен также с применением этой программы (коррекция величины интенсивности поглощения A или величины интенсивности флуоресценции I).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Фотодинамическая инактивация грамотрицательных и грамположительных бактерий новыми производными порфиринов

Растущая устойчивость патогенных микроорганизмов к широкому спектру антибиотиков является одной из проблем современной медицины и этим обусловлена необходимость разработки альтернативных способов их инактивации (см. гл. 1).

В настоящее время фотодинамическая инактивация микроорганизмов посредством фотосенсибилизаторов (в основном порфиринов) является одним из наиболее перспективных направлений для уничтожения микроорганизмов и, в частности, полирезистентных бактерий [90, 106, 184]. Уничтожение микроорганизмов порфиринами и металлопорфиринами, как в темновом режиме (токсическая активность), так и световом режиме (фототоксическая или фотодинамическая активность) является одним из многообещающих направлений.

В экспериментальных условиях было обнаружено, что грамотрицательные бактерии, в отличие от грамположительных бактерий, проявляют устойчивость к ФДТ [91, 134, 135, 153, 154]. Впоследствии было обнаружено, что фосфолипиды, комплексы липопротеинов и полисахаридов, присутствующие в наружной мембране таких грамотрицательных бактерий, как *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *Haemophilus influenza*, ингибируют связывание молекул анионных ФС [153].

Был разработан ряд альтернативных стратегий для преодоления этого барьера. Это – использование нейтральных (дейтеропорфирин, прохлорпиридил) или положительно заряженных (тетракаationные порфирины, катионные фталоцианины, катионные фенотиазины) фотосенсибилизаторов [155, 160].

Катионные порфирины, в отличие от анионных, не образуют в растворе агрегаты и остаются в мономерной форме во всех используемых концентрациях, что значительно облегчает обработку и интерпретацию экспериментальных данных [111].

На кафедре органической химии фармацевтического факультета Ереванского государственного медицинского университета было синтезировано более 100 новых катионных порфиринов, которые отличались строением периферических функциональных групп (оксиэтил-, бутил-, аллил-, метилаллил-) и центральным атомом металла (кобальт, цинк, серебро и др.) (см. гл. 1.2.6, рис. 8) [16, 77, 200].

Ранее было показано, что эти синтезированные катионные порфирины обладают достаточно высокой фотодинамической активностью по отношению к опухолевым клеткам в *in vitro* и *in vivo* условиях [87]. Дальнейшие исследования показали, что эти порфирины демонстрируют также высокую активность по отношению к бактериям и грибам [1-3].

В связи с возможностями направленного синтеза порфиринов, содержащих различные функциональные группы и центральные атомы металлов, была поставлена задача выявления влияния этих факторов на ФДИ ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Доступность сырья и относительно несложное получение ФС – порфиринов природного происхождения, стимулировало их выделение, очистку и изучение противомикробных свойств. Из крапивы были получены природные катионные порфирины – производные хлорофилла: феофитин(а+b), феофитин(а), а также их серебряные и цинковые комплексы (см. гл. 1.2.6, рис. 9) [1, 12].

3.1.1. Исследование темновой токсичности новых производных порфиринов в условиях *in vitro*

Исследования темновой токсичности обусловлены определением влияния различных периферических функциональных групп и центральных атомов металла в молекуле порфиринов на их антибактериальную активность в темновых условиях (без облучения видимым светом). Как было отмечено в гл. 1.2.6, одним из основных требований к ФС является его нулевая или крайне низкая темновая и высокая световая токсичность в терапевтических дозах [47, 52, 67]. Поэтому определение концентрации порфиринов, не являющейся токсичной для микроорганизмов в темновых условиях, является необходимой для фотодинамических исследований.

В связи с этим на первом этапе исследований проводили предварительный отбор из 6 природных и 11 производных синтетических порфиринов по признаку наиболее высокой антибактериальной активности в темновых условиях *in vitro*. У исследуемых производных порфиринов определяли не токсичные концентрации (концентрация, вызывающая 0% гибель клеток микроорганизмов) и минимальные бактерицидные концентрации (МБК – концентрация, вызывающая 100% гибель клеток микроорганизмов).

Предварительный отбор этих порфиринов проводили на *E. coli* К-12 в условиях *in vitro*. Этот микроорганизм является удобной моделью для изучения эффективности влияния порфиринов в связи с проявлением значительной устойчивости кишечной палочки ко многим нейтральным и анионным ФС [129, 135, 153].

Результаты экспериментов по определению влияния бактерицидной активности исследуемых производных порфиринов и их металлокомплексов по отношению к *E. coli* К-12 в темновых условиях представлены в табл. 1.

Таблица 1

Выживаемость (%) клеток *E. coli* К-12 после действия производных синтетических порфиринов в темновых условиях

Порфирины	Концентрации порфиринов, мкг/мл			
	10	20	50	100
Контроль	100 ± 2,3	98,1 ± 5,0	98,4 ± 3,9	97,3 ± 6,7
ТОЕ4PyP	98,2 ± 4,8	97,4 ± 9,3	75,1 ± 7,4	39,3 ± 5,9
Zn-ТОЕ4PyP	98,5 ± 3,1	75,1 ± 4,1	57,4 ± 5,5	12,1 ± 4,3
Ag-ТОЕ4PyP	97,3 ± 2,7	71,0 ± 3,3	55,2 ± 4,7	0
TAll4PyP	98,4 ± 4,3	79,2 ± 2,7	46,0 ± 8,3	2,1 ± 0,8
Co-TMetAll4PyP	92,2 ± 3,8	61,4 ± 3,1	36,3 ± 6,4	1,7 ± 0,6
Co-TAll4PyP	97,4 ± 7,5	59,3 ± 4,6	32,1 ± 9,1	1,5 ± 0,4
Zn-TAll4PyP	91,0 ± 2,2	21,4 ± 7,2	9,3 ± 5,1	0
Ag-TAll4PyP	38,1 ± 7,1	0	0	0
TBut4PyP	95,4 ± 9,2	76,4 ± 5,9	39,4 ± 7,3	0
Zn-TBut4PyP	58,2 ± 5,3	23,3 ± 8,1	9,0 ± 2,7	0
Ag-TBut4PyP	43,3 ± 6,4	0	0	0

Примечания: начальный титр клеток – 1×10^9 КОЕ/мл; контроль – без добавления порфиринов; $p < 0,05$; $n=5$.

Из представленных в таблице данных видно, что наличие металла (Co^{2+} , Zn^{2+} , Ag^{2+}) в координационной плоскости приводит к понижению минимальной бактерицидной концентрации (МБК) исследуемых соединений по сравнению с металл не содержащими аналогами. Наиболее низкие значения МБК выявлены у серебряных комплексов синтетических порфиринов. Очевидно, это обусловлено природой центрального атома металла.

Сравнение антибактериальной активности (темновой токсичности) серебряных комплексов исследуемых производных синтетических порфиринов с различными периферическими функциональными группами показало, что наличие бутил- и аллил-

гидрофобных групп в молекуле порфиринов Ag-TBut4PyP и Ag-TAll4PyP приводит к понижению МБК (в 5 раз) по сравнению с оксиэтил-группой Ag-TOE4PyP, которая содержит ОН гидрофильный конец (рис. 10).

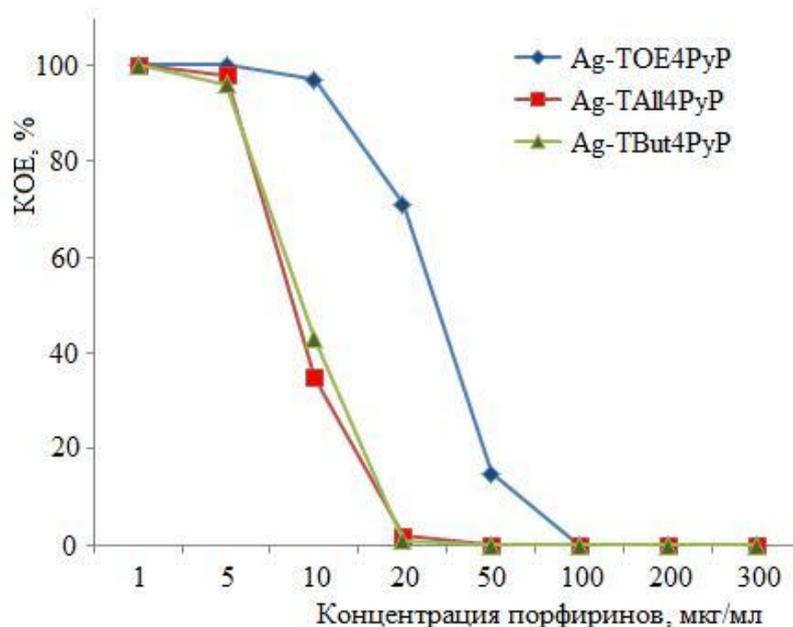


Рис. 10. Выживаемость клеток *E. coli* K-12 в темновых условиях после действия синтетических Ag-металлопорфиринов.

Начальный титр клеток – 1×10^9 КОЕ/мл. Концентрация порфиринов варьирует 1-300 мкг/мл. Контроль – суспензия клеток без добавления порфирина. $p < 0,05$; $n = 5$.

Сравнение антибактериальной активности (темновой токсичности) цинковых комплексов также показало эффективность действия производных синтетических порфиринов с бутил- или аллил- функциональными группами (рис. 11). Это еще раз показывает, что присутствие этих гидрофобных групп в молекуле порфирина приводит к понижению МБК по сравнению с оксиэтил-группой, которая содержит ОН гидрофильный конец.

Очевидно, что связывание порфиринов с клетками регулируется степенью гидрофобности периферических функциональных групп, которая способствует сильной ассоциации с наружной мембраной клеток *E. coli* и увеличению проникновения исследуемых порфиринов.

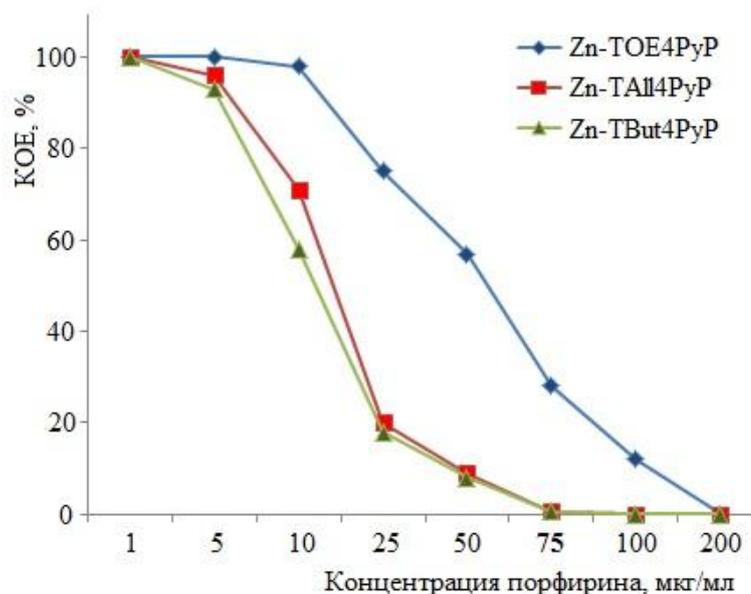


Рис. 11. Выживаемость клеток *E. coli* К-12 в темновых условиях после действия синтетических Zn-металлопорфиринов.

Начальный титр клеток – 1×10^9 КОЕ/мл. Концентрация порфиринов варьирует 1-200 мкг/мл. Контроль – суспензия клеток без добавления порфирина. $p < 0,05$; $n=5$.

Результаты исследований антибактериальной активности природных порфиринов феофитин(а+b), феофитин(а), а также их серебряных и цинковых комплексов в темновых условиях представлены в табл. 2.

Таблица 2

Выживаемость (%) клеток *E. coli* К-12 после действия природных порфиринов в темновых условиях

Порфирины	Концентрации порфиринов, мкг/мл						
	100	200	400	600	800	1000	1200
Контроль	99,2 ± 3,4	98,4 ± 4,1	98,5 ± 5,9	97,4 ± 7,2	97,0 ± 2,9	96,3 ± 3,2	95,7 ± 4,9
феофитин(а+b)	97,4 ± 6,3	92,5 ± 7,0	81,3 ± 4,8	57,4 ± 9,7	41,3 ± 7,4	20,1 ± 9,4	0,3 ± 0,04
феофитин(а)	97,1 ± 7,2	95,3 ± 6,7	82,7 ± 6,5	62,0 ± 8,1	45,6 ± 5,9	24,8 ± 7,9	0,2 ± 0,03
Zn-феофитин(а+b)	94,5 ± 6,4	75,2 ± 5,5	70,1 ± 7,7	48,3 ± 5,5	31,3 ± 4,2	0,1 ± 0,02	0
Zn-феофитин(а)	95,8 ± 5,2	81,4 ± 7,3	74,2 ± 3,5	56,1 ± 6,4	33,0 ± 7,5	0,2 ± 0,03	0
Ag-феофитин(а+b)	72,3 ± 7,8	46,3 ± 8,1	34,5 ± 9,1	13,7 ± 7,5	0	0	0
Ag-феофитин(а)	76,3 ± 6,2	59,5 ± 7,0	37,2 ± 6,1	15,1 ± 4,5	0,1 ± 0,05	0	0

Примечание: начальный титр клеток – 1×10^9 КОЕ/мл; контроль – без добавления порфиринов; $p < 0,05$; $n=5$.

Результаты исследований бактерицидной активности 6 природных и 11 катионных производных синтетических порфиринов по отношению к *E. coli* К-12 в темновых условиях представлены в табл. 3.

Таблица 3

Бактерицидная активность в темновых условиях природных и производных синтетических порфиринов по отношению к *E. coli* К-12

Порфирины	Не токсичная концентрация, мкг/мл	МБК, мкг/мл
ТОЕ4PyP	20 ± 2,6	320 ± 10,5
TAll4PyP	10 ± 1,1	105 ± 4,3
TBut4PyP	7 ± 0,7	100 ± 3,1
Zn-ТОЕ4PyP	10 ± 1,4	200 ± 5,7
Zn-TAll4PyP	7 ± 0,5	75 ± 2,4
Zn-TBut4PyP	5 ± 0,2	75 ± 2,0
Co-TAll4PyP	10 ± 1,5	105 ± 3,8
Co-MetTAll4PyP	8 ± 1,0	105 ± 4,1
Ag-ТОЕ4PyP	10 ± 1,3	100 ± 3,2
Ag-TAll4PyP	5 ± 0,3	20 ± 1,6
Ag-TBut4PyP	5 ± 0,2	18 ± 2,0
феофитин(a+b)	100 ± 10,2	1200 ± 20,5
феофитин(a)	100 ± 10,5	1200 ± 21,5
Zn-феофитин(a+b)	90 ± 5,1	1000 ± 15,3
Zn-феофитин(a)	90 ± 5,4	1000 ± 15,7
Ag-феофитин(a+b)	50 ± 2,2	800 ± 9,6
Ag-феофитин(a)	55 ± 2,5	820 ± 11,3

Примечание: начальный титр клеток – 1×10^9 КОЕ/мл; контроль – без добавления порфиринов; $p < 0,05$; $n=5$.

Данные свидетельствуют о высокой степени темновой активности металлопорфиринов, для которых МБК и не токсичные концентрации значительно меньше по сравнению с металлами не содержащими аналогами. Серебряные комплексы производных синтетических порфиринов с бутил- и аллил- гидрофобными периферическими группами (Ag-TBut4PyP и

Ag-TAlI4PyP, соответственно) проявляют в 4-16 раз более высокую темновую токсичность, чем остальные производные синтетических порфиринов. По действию на *E. coli* K-12 производные синтетических порфиринов в темновых условиях проявляют до 70 раз более высокую темновую токсичность, чем природные катионные порфирины.

Таким образом, сравнительное изучение антибактериальных свойств природных и производных синтетических порфиринов по отношению к *E. coli* K-12 в темновых условиях свидетельствуют о высокой степени активности синтетических металлопорфиринов.

Полученные результаты были использованы для дальнейших экспериментов с целью выявления фотодинамической активности (фототоксичности) исследуемых катионных порфиринов.

3.1.2. Исследование фотофизических свойств производных синтетических порфиринов

Как было отмечено в гл. 1.2.6, одним из наиболее важных показателей эффективности ФС является его способность содействовать генерации синглетного кислорода. В связи с этим актуальной задачей является исследование фотофизических свойств порфиринов для отбора перспективных ФС с высокими значениями квантового выхода синглетного кислорода.

Для исследований фотофизических свойств порфиринов (флуоресценции и квантовых выходов синглетного кислорода (γ_{Δ})) использовали относительный метод. В качестве стандарта использовали известный фотосенсибилизатор 5,10,15,20-тетракис[4-N-метилпиридил]порфирин (H_2TM_4PyP), для которого $\gamma_{\Delta} = 77\%$ [72].

Были исследованы спектры поглощения и флуоресценции 11 производных синтетических порфиринов. Для всех металлопорфиринов, содержащих в качестве центрального атома Co или Ag, не было обнаружено ни собственной флуоресценции, ни примесной флуоресценции свободного порфирина-основания (порфирина, не содержащего металл). Однако для остальных соединений: производных синтетических порфиринов не содержащих металл и их цинковых комплексов характерно наличие заметной флуоресценции. Все исследованные соединения оказались фотостабильными при освещении в течение 1 ч и более [88]. Это является существенным, поскольку они применялись для ФДИ микроорганизмов при освещении в течение 30 мин и более.

3.1.3. Определение квантовых выходов синглетного кислорода производных синтетических порфиринов

Из набора всех отобранных производных синтетических порфиринов и металлопорфиринов максимально близкими спектрально-абсорбционными характеристиками к известному фотосенсибилизатору $H_2TM4PyP$ обладал $TBut4PyP$. Квантовый выход синглетного кислорода у $H_2TM4PyP$ определяли в Tris-буфере, а у исследуемых производных синтетических порфиринов – в дистиллированной воде: для $H_2TM4PyP$ $\gamma_{\Delta} = 77\%$, для $TBut4PyP$ $\gamma_{\Delta} = 78-79\%$.

Для определения квантового выхода синглетного кислорода водорастворимых производных синтетических порфиринов использовали соотношение (1), приведенное в гл. 1.2.4.

В табл. 4 приведены квантовые выходы синглетного кислорода исследованных производных синтетических порфиринов в дистиллированной воде при комнатной температуре. Из анализа данных, приведенных в таблице, видно, что все исследуемые производные синтетических порфиринов обладают достаточно высокими значениями квантовых выходов синглетного кислорода. Можно видеть, что значения γ_{Δ} цинковых комплексов выше, чем у их металл не содержащих аналогов. Это объясняется увеличением эффективности ИКК при включении атома металла в макроцикл порфирина [88].

Таблица 4

Квантовые выходы синглетного кислорода производных синтетических порфиринов

Соединение	$H_2TM4PyP$	$H_2TOE3PyP$	$H_2TBut3PyP$	$H_2TOE4PyP$	$H_2TBut4PyP$	$H_2TAlI4PyP$	$ZnTOE4PyP$	$ZnTBut4PyP$	$ZnTAlI4PyP$
γ_{Δ}	0,77	0,78	0,78	0,77	0,79	0,75	0,85	0,97	0,86

Примечание: $p < 0,05$; $n = 5$.

На основании исследований фотофизических и спектральных свойств производных синтетических порфиринов можно сделать следующие заключения:

1. исследованные производные синтетических порфиринов не содержащие металл и их цинковые комплексы проявляют выраженную фотосенсибилизирующую активность;

2. природа водного раствора не оказывает влияние на высокую эффективность генерации синглетного кислорода у исследованных катионных синтетических порфиринов;
3. цинковые комплексы производных синтетических порфиринов являются перспективными соединениями для фотодинамического действия, так как обеспечивают высокий квантовый выход синглетного кислорода, а наиболее перспективным среди них – Zn-TBut4PyP.

3.1.4. Исследование фотодинамической активности катионных производных синтетических порфиринов по отношению к *E. coli* K-12

В связи с существованием явления тушения флуоресценции тяжелыми металлами (в том числе Co и Ag) исследования фототоксичности проводили с металл не содержащими аналогами и цинковыми комплексами производных синтетических порфиринов. Как было отмечено ранее (см. в гл. 3.1), исследования световой активности (фототоксичности) порфиринов необходимо проводить при не токсичных концентрациях. В связи с этим исследование фототоксичности производных синтетических порфиринов проводилось при концентрациях не превышающих 5-10 мкг/мл.

Исследование фототоксичности производных синтетических порфиринов на грамотрицательной бактерии *E. coli* K-12 проводили со следующими синтетическими порфиринами: TOE4PyP, TBut4PyP, TAlI4PyP и их цинковыми комплексами. Облучение осуществляли при мощности излучения 30 мВт/см² в течение 5-30 мин.

В табл. 5 представлены данные фотоинактивации клеток *E. coli* K-12 в зависимости от концентрации катионных производных синтетических порфиринов (0,01-10 мкг/мл) при облучении в течение 30 мин (мощность излучения 30 мВт/см²). Как видно из представленных данных, МБК исследованных производных синтетических порфиринов варьирует 2-10 мкг/мл. Как было выявлено, наиболее эффективными оказались металлопорфирины Zn-TAlI4PyP и Zn-TBut4PyP, которые при концентрации 2 мкг/мл приводят к 100% гибели клеток *E. coli* K-12.

Таблица 5

Выживаемость (%) клеток *E. coli* К-12 после фотоинактивации синтетическими катионными производными порфиринов

ФС	Концентрации ФС, мкг/мл				
	0,1	1	2	5	10
Контроль	100 ± 3,4	99,3 ± 4,1	98,5 ± 5,9	98,4 ± 7,2	98,2 ± 2,9
ТОЕ4PyP	95,8 ± 7,2	48,3 ± 6,7	37,3 ± 7,8	15,4 ± 8,7	0,2 ± 0,1
Tall4PyP	82,4 ± 6,5	38,1 ± 7,2	9,4 ± 5,5	0,3 ± 0,05	0
TBut4PyP	82,1 ± 5,9	35,2 ± 5,6	7,1 ± 4,7	0,2 ± 0,18	0
Zn-ТОЕ4PyP	79,8 ± 7,2	32,4 ± 6,8	3,2 ± 2,6	0	0
Zn-Tall4PyP	45,7 ± 5,9	13,2 ± 7,9	0,1 ± 0,01	0	0
Zn-TBut4PyP	41,3 ± 6,4	10,3 ± 4,5	0	0	0

Примечание: начальный титр клеток – 1×10^9 КОЕ/мл; облучение в течение 30 мин мощностью излучения 30 мВт/см²; контроль – без добавления ФС; $p < 0,05$; $n = 5$.

Результаты исследований фотодинамической активности 6 катионных производных синтетических порфиринов и известных ФС (анионного хлорин *e*₆ и нейтрального Al-фталоцианин) по отношению к клеткам *E. coli* К-12 представлены в табл. 6.

Таблица 6

Фотодинамическая активность фотосенсибилизаторов по отношению к *E. coli* К-12

ФС	МБК, мкг/мл
хлорин <i>e</i> ₆	>10 000
Al-фталоцианин	>10 000
ТОЕ4PyP	10,3 ± 0,25
TBut4PyP	5,2 ± 0,40
TAll4PyP	5,3 ± 0,20
Zn-ТОЕ4PyP	5,1 ± 0,25
Zn-TBut4PyP	2,0 ± 0,15
Zn-TAll4PyP	2,1 ± 0,25

Примечание: начальный титр клеток – 1×10^9 КОЕ/мл; облучение в течение 30 мин мощностью излучения 30 мВт/см²; контроль – без добавления ФС; $p < 0,05$; $n = 5$.

Данные свидетельствуют о высокой степени активности катионных синтетических металлопорфиринов для которых МБК в 2-2,5 раза меньше по сравнению с металл не содержащими аналогами. Более высокая фототоксичность Zn-TBut4PyP и Zn-TAlI4PyP, по-видимому, обусловлена природой центрального атома металла, наличием гидрофобных функциональных групп и высокими значениями квантовых выходов синглетного кислорода. Исследуемые катионные производные синтетических порфиринов проявляют в 1000 раз более высокую фотодинамическую активность, чем, использованные в качестве контролей, анионный хлорин e_6 и нейтральный Al-фталоцианин.

Нами установлено, что высокая антибактериальная активность исследуемых катионных производных синтетических порфиринов зависит от четырех факторов: присутствия в порфириновом макроцикле положительного заряда (+4), центрального атома металла (Zn^{2+}) и гидрофобных периферических функциональных групп, а также высоких значений квантовых выходов синглетного кислорода.

Эти результаты свидетельствуют, что катионные ФС могут найти более широкое применение в фотоинаktivации бактериальных клеток, чем обычно используемые в ФДИ анионные или нейтральные ФС.

Исходя из полученных нами данных можно предположить, что механизм фотоинаktivации грамотрицательных бактерий происходит следующим образом: положительный заряд катионных ФС, в отличие от нейтрально и отрицательно заряженных ФС, способствует электростатическому связыванию с наружной мембраной бактерии, вызывая начальное ограниченное повреждение и проникновение в клетку. По этому нейтрально и отрицательно заряженные ФС обладают незначительной фототоксичностью по отношению к грамотрицательным бактериям даже при условии, когда они являются эффективными генераторами синглетного кислорода.

3.1.5. Исследование влияния ионов Ca^{2+} на фотодинамическую активность Zn-TBut4PyP при инаktivации клеток *E. coli* K-12

Известно, что негативно заряженные молекулы липополисахаридов имеют сильное сродство к ионам кальция (Ca^{2+}), связывание с которыми требуется для термодинамической устойчивости наружной мембраны [93]. В связи с этим нами было исследовано влияние

ионов Ca^{2+} на фотодинамическую активность катионного Zn-TBut4PyP при инактивации клеток *E. coli* K-12 (рис. 12).

Как видно из диаграммы на рис. 12 добавление CaCl_2 вызывает уменьшение фотодинамического эффекта, т.е. защиту бактерий от фотоинактивации. С одной стороны это может быть связано с прямым конкурентным взаимодействием поликатионных ФС и бивалентных катионов (Ca^{2+}) с центрами связывания на поверхности бактериальной клетки (например, отрицательно заряженными группами липополисахаридов), а с другой – с повышенной проницаемостью клеточной стенки для Zn-TBut4PyP в отсутствие стабилизирующих катионов Ca^{2+} . Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что фотоинактивация бактерий, особенно грамотрицательных, в первую очередь определяется эффективностью связывания молекул ФС с клетками-мишенями.

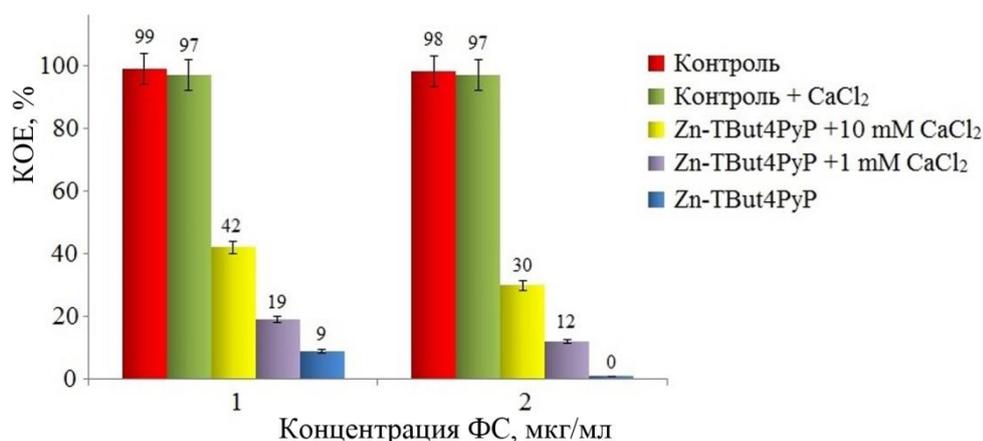


Рис. 12. Влияние CaCl_2 на выживаемость клеток *E. coli* K-12.

Начальный титр клеток – 1×10^9 КОЕ/мл. Облучение в течение 30 мин мощностью излучения 30 мВт/см^2 . Контроль – суспензия клеток без добавления Zn-TBut4PyP. $p < 0,05$; $n = 5$.

Аналогичные результаты были получены и Страховской с соавторами при использовании в исследованиях различных красителей: фенотиозинов, порфиринов, хлоринов и фталоцианинов. Присутствие в среде солей магния или кальция вызывало уменьшение фотодинамического подавления биолюминесценции, т.е. защиту бактерий от инактивации поликатионными фталоцианинами [195].

Таким образом, полученные нами данные подтверждают гипотезу о том, что движущей силой фотоинактивации является наличие положительно заряженных групп в молекуле ФС, которые вступают в электростатическое взаимодействие с отрицательными группами на

поверхности клеточной стенки [80, 138]. В результате этого в начальных стадиях фотопроцесса увеличивается проницаемость наружной мембраны и ускоряется приток молекул ФС внутрь клетки [135]. Окончательное связывание ФС с клетками регулируется гидрофобностью функциональных групп, которая способствует сильной ассоциации с цитоплазматической мембраной [208].

3.1.6. Исследование фотодинамической активности Zn-TBut4PyP по отношению к различным грамотрицательным и грамположительным бактериям

Следующим этапом наших исследований было изучение фотодинамической активности Zn-TBut4PyP по отношению к различным грамотрицательным (*E. coli* K-12, *S. typhimurium* Г-38) и грамположительным (*S. aureus*, *S. epidermidis*) бактериям. Результаты исследований представлены на рис. 13.

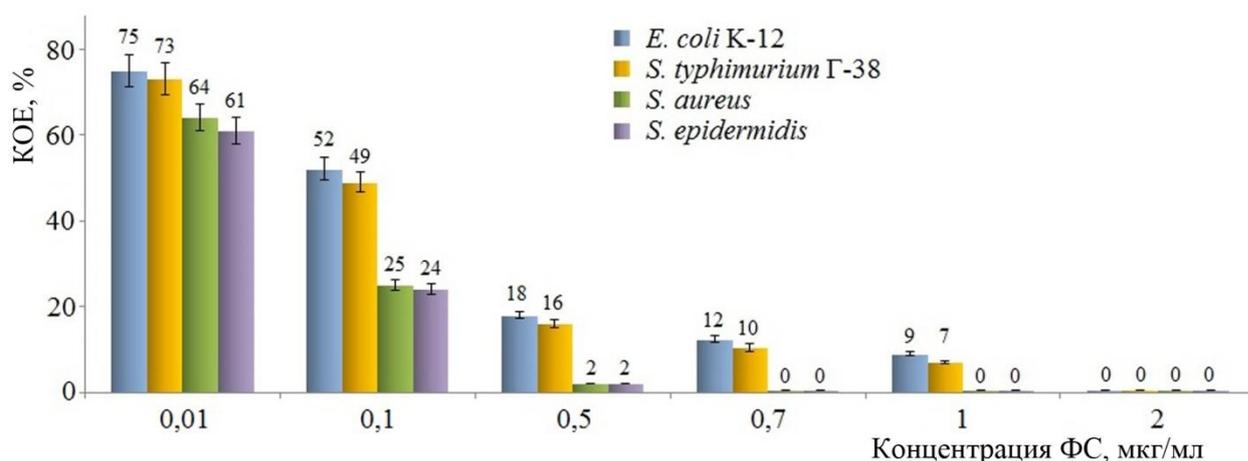


Рис. 13. Выживаемость клеток грамотрицательных и грамположительных бактерий после фотоинактивации с Zn-TBut4PyP.

Начальный титр клеток – 1×10^9 КОЕ/мл. Облучение в течение 30 мин мощностью излучения 30 мВт/см². Контроль – суспензия клеток без добавления Zn-TBut4PyP. $p < 0,05$; $n = 5$.

Как видно из диаграммы Zn-TBut4PyP эффективно фотоинактивирует как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии при очень низких концентрациях (0,7-2,0 мкг/мл). В соответствии с литературными данными, порог инактивации для грамположительных бактерий оказался в 2-3 раз ниже, чем для грамотрицательных бактерий [108, 137, 141, 174].

Таким образом, Zn-TBut4PyP является перспективным ФС для применения в борьбе с исследованными грамположительными и грамотрицательными бактериями.

3.1.7. Исследование фотодинамической активности Zn-TBut4PyP по отношению к полирезистентным патогенам

В настоящее время метициллин устойчивые штаммы *S. aureus* (MRSA) составляют более 60% от изолированных в больницах и отделениях интенсивной терапии США стафилококков [157]. От инфекций, вызванных штаммами MRSA, ежегодно умирают 19.000 госпитализированных американских пациентов, что эквивалентно общему числу смертей от СПИДа, туберкулеза и вирусного гепатита вместе взятых [50]. Аналогичная ситуация наблюдается в странах Европы и Азии. Эти важные факты послужили поводом для исследований фотодинамической активности порфиринов по отношению к такому опасному патогенному штамму как MRSA.

Эксперименты проводились с использованием светодиода (LED) с пиковой эмиссией 405 нм и плотностью мощности 70 мВт/см^2 со следующими производными синтетических порфиринов: TOE4PyP, Zn-TOE4PyP, Zn-TBut4PyP и Zn-TBut3PyP.

Исследования на штамме MRSA показали, что более эффективными металлопорфинами являются Zn-TBut3PyP и Zn-TBut4PyP. При концентрации производных синтетических порфиринов 0,1 мкг/мл и продолжительности облучения в течение 5 и 10 мин их эффективность в 3-5 раз выше, чем у TOE4PyP. При продолжительности облучения в течение 30 мин все производные синтетических порфиринов почти полностью уничтожают клетки MRSA (рис. 14).

Сравнительное исследование фотоинактивации метициллин-чувствительного штамма *S. aureus* 209 P также показало, что наиболее высокая эффективность наблюдается у металлопорфиринов Zn-TBut4PyP и Zn-TBut3PyP (рис. 15). При концентрации 0,1 мкг/мл и продолжительности облучения в течение 30 мин все производные синтетических порфиринов почти полностью уничтожают клетки *S. aureus* 209 P.

Сравнение литературных данных ФДИ с катионными фенотиазинами свидетельствует о значительно высокой фотодинамической эффективности исследуемых катионных производных синтетических порфиринов, и, в частности, Zn-TBut3PyP и Zn-TBut4PyP [89, 112, 148].

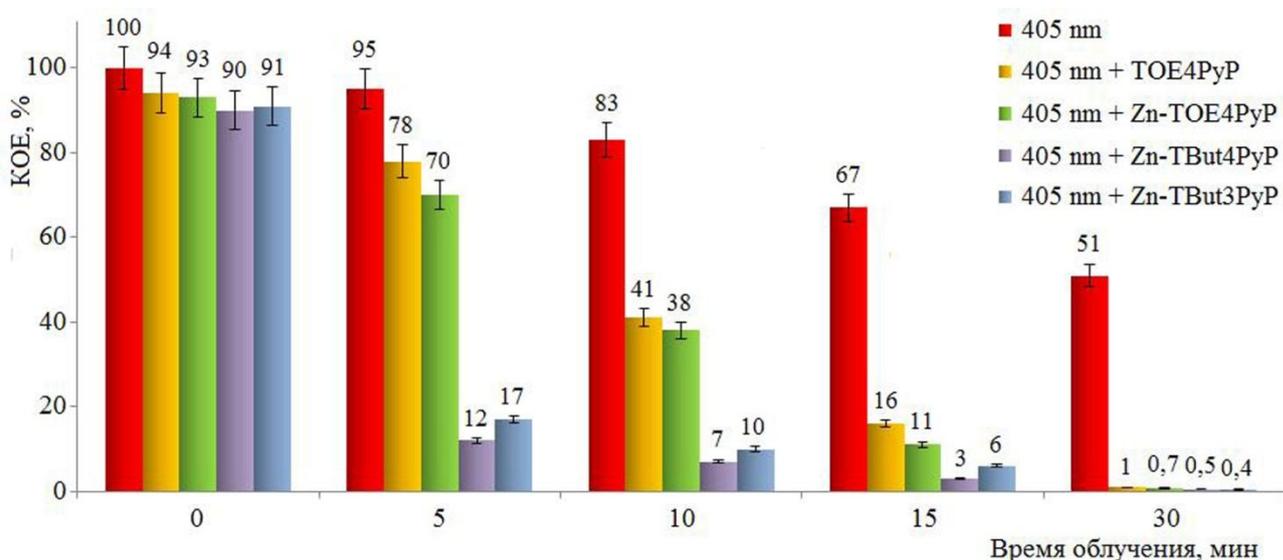


Рис. 14. Выживаемость клеток MRSA после фотоинактивации катионными производными синтетических порфиринов.

Концентрация производных синтетических порфиринов 0,1 мкг/мл. Облучение светодиоидом с максимумом спектра испускания $\lambda = 405 \pm 15$ нм и плотностью мощности 70 мВт/см². Режим излучения непрерывный. Контроль – суспензия клеток без добавления ФС. $p < 0,05$; $n = 5$.

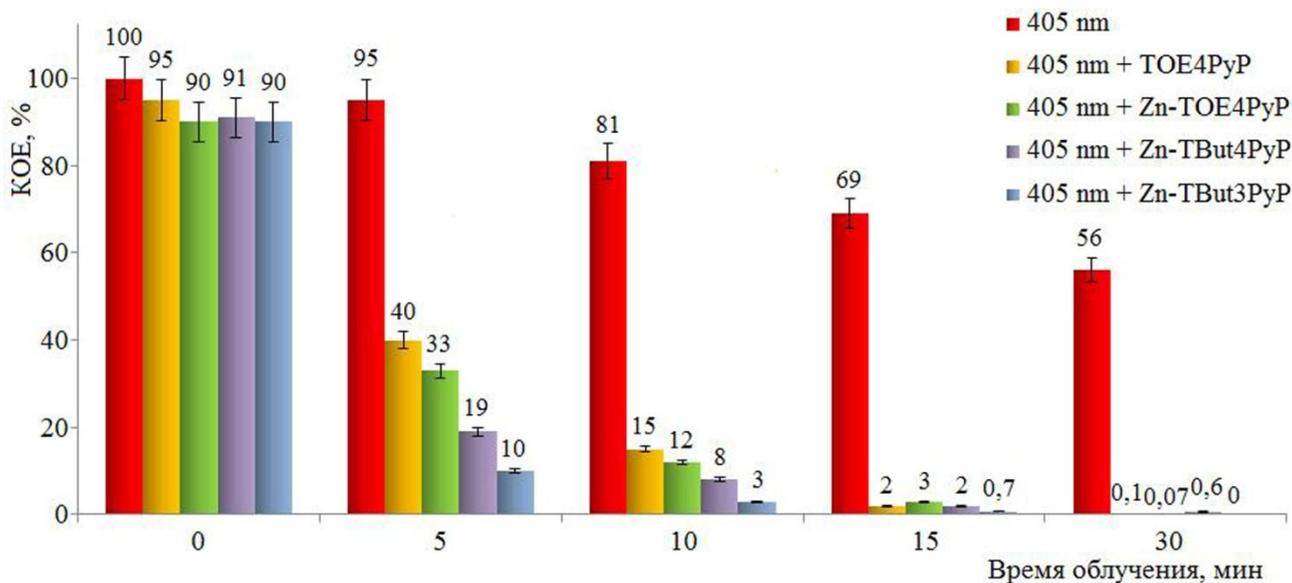


Рис. 15. Выживаемость клеток *S. aureus* 209 P после фотоинактивации катионными производными синтетических порфиринов.

Концентрация производных синтетических порфиринов 0,1 мкг/мл. Облучение светодиоидом с максимумом спектра испускания $\lambda = 405 \pm 15$ нм и плотностью мощности 70 мВт/см². Режим излучения непрерывный. Контроль – суспензия клеток без добавления ФС. $p < 0,05$; $n = 5$.

В работе Nakonechny с соавторами ФДИ с использованием катионного метиленового синего при концентрации 50 мкг/мл приводило к сокращению числа КОЕ метициллин-чувствительных штаммов *S. aureus* (MSSA) всего на 1,7-2,6 log₁₀ и метициллин-устойчивых штаммов *S. aureus* (MRSA) на 3,2-3,6 log₁₀ [148].

Таким образом, приведенные результаты свидетельствуют о высокой эффективности и 100% инактивации изученных грамотрицательных и грамположительных бактерий, независимо от спектра чувствительности патогенов к антибиотикам, синтетическими катионными порфиринами, особенно Zn-металлопорфиринами.

3.1.8. Исследования по воздействию продолжительности времени облучения на выживаемость клеток *E. coli* K-12

Для определения эффективности действия света в ФДТ важно знать его световые характеристики (терапевтические параметры), а именно дозу облучения (Дж/см²) и плотность мощности (мВт/см²).

Уменьшение абсорбирующего эффекта может быть частично компенсировано удлинением времени светового воздействия или увеличением плотности мощности.

Для исследования влияния продолжительности времени облучения на эффективность ФДИ были проведены эксперименты с разным временем облучения при определенных концентрациях исследуемых ФС на *E. coli* K-12. В табл. 7 приведены данные выживаемости клеток *E. coli* K-12 при концентрации производных синтетических порфиринов и металлопорфиринов 1 мкг/мл. Время облучения видимым светом варьировало 10-60 мин.

Данные свидетельствуют, что при удлинении времени светового воздействия процент выживших клеток *E. coli* K-12 сокращается еще на 9-21%. Удлинение времени светового воздействия приводит к повышению эффективности всех исследуемых порфиринов и металлорорфиринов. После 50 мин процент выживших клеток *E. coli* K-12 при фотоинактивации с ТОЕ4РyР, в отличие от других исследуемых ФС, остается неизменным. Это объясняется тем, что после нескольких циклов ФС может фотодеградировать, т. е. терять способность участвовать в фотодинамической реакции. Этот эффект называется фотообесцвечиванием (photobleaching) [48].

Выживаемость (%) клеток *E. coli* К-12 после фотоинактивации катионными производными синтетических порфиринов в зависимости от времени облучения

ФС	Время облучения, мин					
	10	20	30	40	50	60
Контроль	100 ± 5,7	99,4 ± 6,2	99,0 ± 5,1	98,3 ± 4,6	98,4 ± 6,1	98,1 ± 3,1
ТОЕ4PyP	96,1 ± 4,2	74,3 ± 3,1	48,4 ± 4,0	37,1 ± 7,0	35,2 ± 3,2	35,0 ± 4,0
TAll4PyP	90,3 ± 3,5	57,1 ± 4,2	37,1 ± 6,2	23,0 ± 2,2	17,1 ± 2,0	16,3 ± 3,2
TBut4PyP	87,4 ± 5,3	56,3 ± 6,2	35,2 ± 3,4	22,1 ± 4,1	18,4 ± 3,4	14,1 ± 2,4
Zn-ТОЕ4PyP	86,3 ± 4,1	57,2 ± 5,7	21,3 ± 7,2	12,4 ± 5,4	5,2 ± 0,15	3,0 ± 0,13
Zn-TAll4PyP	67,1 ± 3,3	46,3 ± 5,1	11,4 ± 3,3	4,2 ± 2,1	0	0
Zn-TBut4PyP	65,0 ± 4,2	44,2 ± 4,4	9,3 ± 3,1	3,1 ± 1,2	0	0

Примечание: начальный титр клеток – 1×10^9 КОЕ/мл; концентрация порфиринов 1 мкг/мл; облучение мощностью излучения 30 мВт/см²; контроль – без добавления ФС; $p < 0,05$; $n = 5$.

Основываясь на полученные нами результаты можно установить, что удлинение времени светового воздействия приводит к повышению фотодинамической активности исследуемых производных синтетических порфиринов, что позволит добиться уничтожения микроорганизмов при более низких концентрациях.

3.2. Получение нанокомпозитов из наночастиц серебра/цеолитов и катионных производных порфиринов

Одной из центральных задач ФДИ микроорганизмов является изучение и усовершенствование механизмов доставки и селективного накопления порфиринов в воспаленной ткани. В *in vivo* условиях на эффективность ФДИ микроорганизмов влияют такие факторы как агрегация и связывание ФС с белками плазмы крови.

Такие системы доставки, как наночастицы, позволяют снизить вероятность агрегации и увеличить локальную концентрацию ФС в непосредственной близости от клеточной стенки бактерий (см. гл. 1.2.7).

Конструирование нанокомпозитов, состоящих из неорганической наноплатформы, например из наночастиц серебра или цеолита, и органической активной молекулы – порфирина, является одним из перспективных направлений для увеличения эффективности действия ФС, и, в частности, доставки до микроорганизмов больших количеств порфиринов. Для порфиринов наноплатформой могут служить пористые наноструктуры различного происхождения (пористый силикон, наночастицы золота или серебра, полимерные материалы, природные минералы – цеолиты и др.). Исследование процессов сорбции порфиринов на наночастицах серебра или цеолитов является первым важным этапом решения задачи создания таких эффективных нанокомпозитов.

Высокоспецифичная наноплатформа имеет высокие сорбционные характеристики и, активно связываясь с микроорганизмами, может доставить большие количества поражающих агентов – порфиринов. Процесс конструирования нанокомпозитов разделяется на две части: создание неорганического инертного наноматериала (коллоидное серебро или цеолит) с активной сорбционной поверхностью и связывание ФС (порфиринов) с неорганическим наноматериалом.

3.2.1. Комплексообразование порфиринов с наночастицами серебра

Наночастицы коллоидного серебра за счет пористости имеют чрезвычайно большую удельную поверхность, что на несколько порядков увеличивает их сорбционные возможности. Размеры типичных наночастиц серебра составляет 10-100 нм. Коллоидное серебро с пористой поверхностью является удобной платформой для количественного связывания молекул порфирина, тем самым обеспечивая одновременную доставку большого количества ФС к микроорганизмам.

Исследования взаимодействия производных синтетических порфиринов с наночастицами серебра диаметром 20 нм проводились методом спектрофотометрии в видимой области спектра, в диапазоне длин волн 350-700 нм. Динамику сорбции на наночастицах серебра изучали на примере отобранного нами катионного TBut4PyP и нейтрального ФС Al-фталоцианина.

Спектр поглощения TBut4PyP представлен на рис. 16. Этот спектр характеризуется интенсивной полосой поглощения в области полосы Soret (около 400 нм). При добавлении

сорбентов (в нашем случае наночастиц) изменения на пике этой полосы (420-435 нм) характеризуют связывание (или сорбцию/десорбцию) порфиринов на сорбентах.

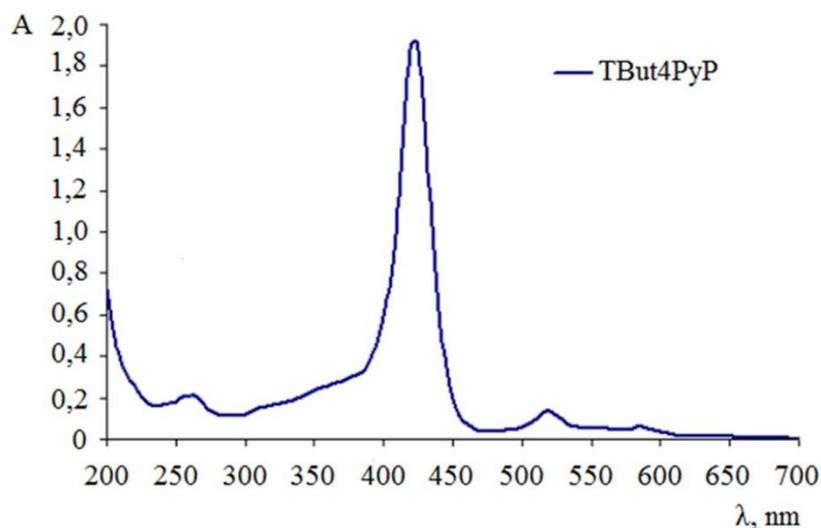


Рис. 16. Спектр поглощения раствора порфирина TBuT4PyP.

Динамика изменения спектра поглощения раствора TBuT4PyP при добавлении наночастиц коллоидного серебра диаметром 20 нм представлена на рис. 17.

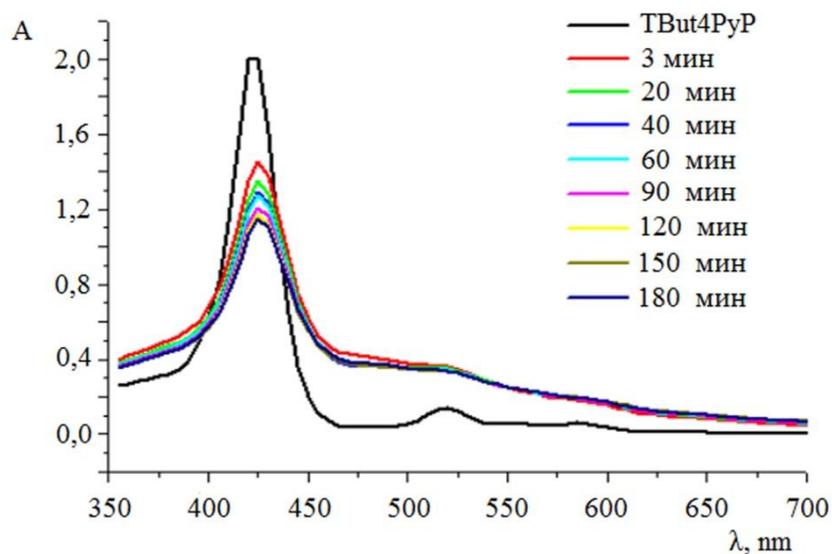


Рис. 17. Спектр поглощения раствора порфирина TBuT4PyP после добавления наночастиц серебра.

Исходная концентрация порфирина 10^{-5} М.

После добавления наночастиц в раствор катионного TBuT4PyP происходит резкое падение интенсивности спектра поглощения и некоторый сдвиг пика поглощения в область

более длинных волн. Падение интенсивности поглощения света (гипохромное изменение), которое наблюдается у TBut4PyP, можно объяснить появлением в растворе комплекса наночастица-TBut4PyP, где производный порфирина находится в более упорядоченной форме по сравнению со своим свободным состоянием. Изучение динамики изменения спектров поглощения раствора TBut4PyP при добавлении наночастиц серебра показало, что связывание производного порфирина происходит очень быстро – в течение 3 мин. Из рис. 17 следует, что при добавлении наночастиц интенсивность поглощения раствора TBut4PyP от $A = 2,05$ резко падает до $A = 1,45$ (после 3 мин) и продолжает падать в течение 3 ч до $A = 1,12$ (при этом в течение последних 30 мин интенсивность практически не меняется). Стабильное состояние интенсивности поглощения (около $A = 1,10$) спектра порфирина наблюдалось через 12 и 24 ч, что свидетельствует об отсутствии десорбции порфирина.

Для сравнения была исследована также динамика сорбции наночастиц серебра с нейтральным ФС – Al-фталоцианином. Спектр поглощения Al-фталоцианина представлен на рис. 18.

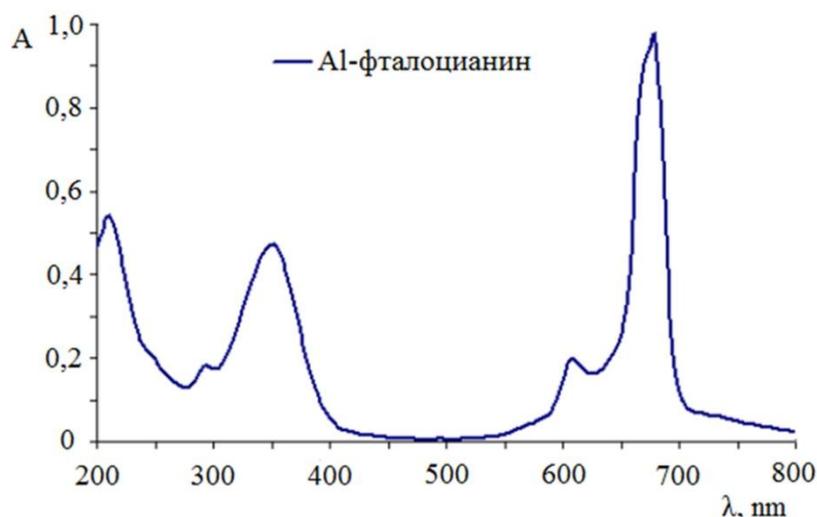


Рис. 18. Спектр поглощения раствора Al-фталоцианина.

За сорбцией на наночастицах коллоидного серебра в случае Al-фталоцианина следили по изменениям наиболее интенсивного пика на длине волны 680 нм. В случае Al-фталоцианина при добавлении наночастиц коллоидного серебра наблюдалась совершенно другая картина (рис. 19).

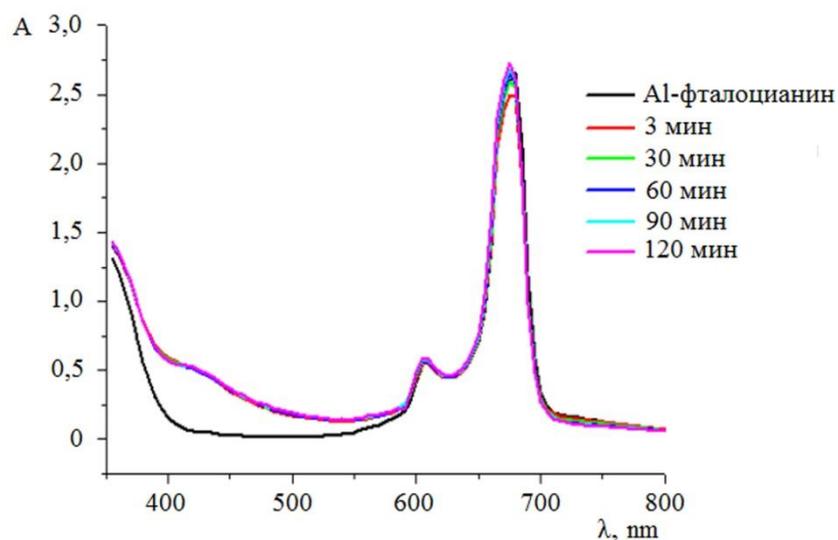


Рис. 19. Спектр поглощения раствора Al-фталочианина после добавления наночастиц серебра.

Исходная концентрация Al-фталочианина 10^{-5} М.

Сорбция Al-фталочианина на наночастицах коллоидного серебра в этом случае также происходит быстро (в течение 3 мин). При добавлении наночастиц серебра интенсивность исходной кривой падала незначительно (на рисунке спектр красного цвета), что свидетельствует о незначительном связывании Al-фталочианина с наночастицами.

Результаты экспериментов показали, что процент сорбции TBut4PyP на наночастицах коллоидного серебра диаметром 20 нм составляет $60,7 \pm 3,6\%$.

Таким образом, проведенные исследования открывают перспективы дальнейших экспериментов с целью увеличения сорбции порфиринов на наночастицах серебра и изучения эффективности таких нанокомпозитов для применения в ФДИ микроорганизмов.

3.2.2. Комплексообразование порфиринов с наночастицами цеолита

Создание комплексов на основе катионных порфиринов и наночастиц цеолита – один из многообещающих и перспективных путей уничтожения антибиотикоустойчивых микроорганизмов.

Другая неорганическая наноплатформа – цеолит был выбран в связи с его особыми свойствами. Наиболее известная биологическая активность природных цеолитов связана с его действием в качестве антидиарейного лекарства [181]. Известны результаты, связанные с

противоопухолевым действием цеолитов и их потенциальной роли в качестве адъювантов в противораковой терапии [170, 221].

Цеолиты обладают уникальным свойством сорбции микроорганизмов [117]. Было также показано, что катионные порфирины хорошо инкапсулируются во внутреннюю область немодифицированных цеолитов ионообменным механизмом, тогда как анионные порфирины не встраиваются, а нейтральные инкапсулируются лишь в следовых количествах [223]. Эти данные говорят в пользу того, что цеолиты могут являться хорошей наноплатформой для катионных порфиринов. Нами было исследовано комплексообразование наночастиц цеолита с Zn-TBut4PyP и для сравнения с двумя известными ФС (хлорин e_6 и Al-фталоцианин).

На рис. 20 представлены изменения спектра поглощения раствора Zn-TBut4PyP при последовательном добавлении наночастиц цеолита. В спектрофотометрическом анализе одним из основных критериев наличия двухкомпонентной системы в растворе является образование изобестической точки (общей точки пересечения спектральных кривых) [5].

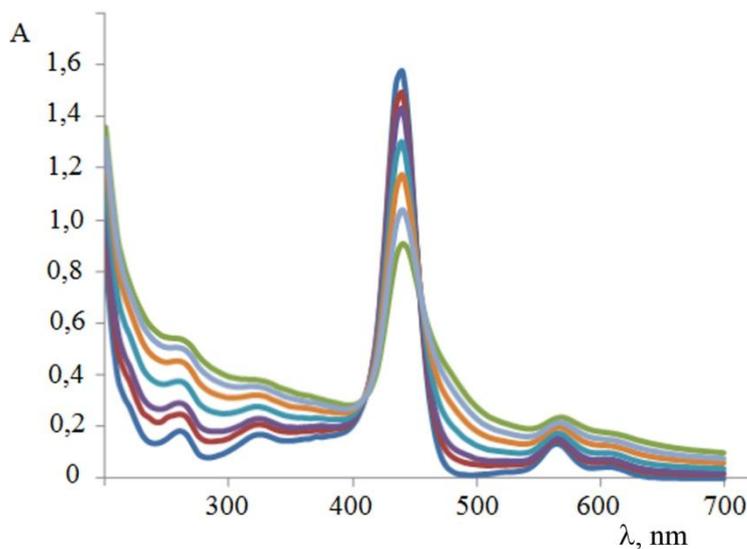


Рис. 20. Спектр поглощения раствора Zn-TBut4PyP после добавления различных концентраций наночастиц цеолита.

Концентрация порфирина 10^{-5} М (темно-синим цветом представлен раствор порфирина без наночастиц). К раствору порфирина добавляли 0,1-0,6 мл раствора цеолита с шагом варьирования 0,1 мл с исходной концентрацией наночастиц цеолита 0,66 мг/мл. $p < 0,05$; $n = 5$.

Видно, что при длинах волн $\lambda \approx 415$ нм и $\lambda \approx 460$ нм образуются две изобестические точки, что свидетельствует об образовании в растворе только двух типов веществ: свободного порфирина и порфирина связанного с наночастицами. Результаты экспериментов

показали, что процент сорбции Zn-TBut4PyP на наночастицах цеолита составляет $98,3 \pm 5,4\%$. Стабильное состояние интенсивности поглощения спектров металлопорфирина наблюдалось через 12 и 24 ч, что свидетельствует о том, что десорбции порфирина не происходит.

Таким образом, наночастицы цеолита подтвердили свои уникально высокие сорбционные свойства, что может привести к значительному увеличению локальной концентрации порфиринов на микроорганизмах.

Фотодинамическая активность нанокompозита (цеолит-Zn-TBut4PyP) нами была исследована по отношению к *S. aureus*. Фотодинамическую активность нанокompозита сравнивали с фотодинамической активностью цеолита и свободного порфирина Zn-TBut4PyP (рис. 21). Облучение образцов проводили в течение 30, 60 и 120 мин.

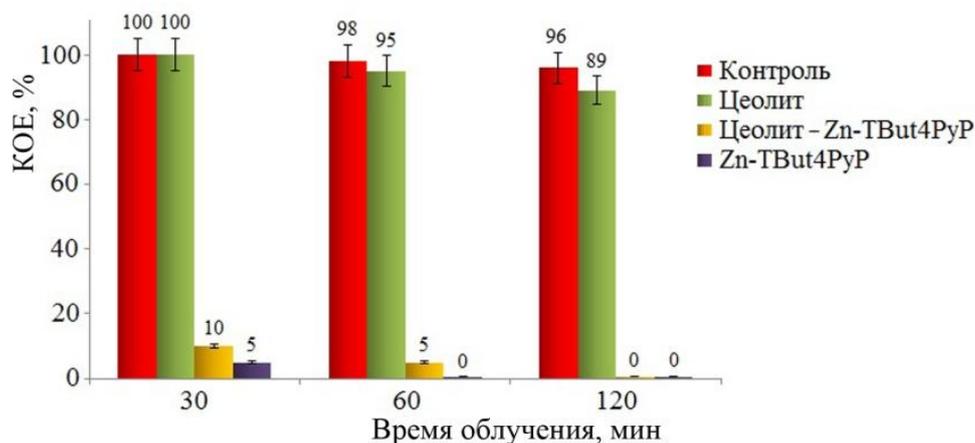


Рис. 21. Выживаемость клеток *S. aureus* после ФДИ цеолитом, цеолит-Zn-TBut4PyP нанокompозитом и Zn-TBut4PyP.

Начальный титр клеток – 1×10^9 КОЕ/мл. Облучение мощностью излучения 30 мВт/см². Концентрация цеолита – 0,66 мг/мл, нанокompозита цеолит-Zn-TBut4PyP – 0,23 мг/мл, Zn-TBut4PyP – 10 мкг/мл. Контроль – без добавления Zn-TBut4PyP, цеолита или нанокompозита цеолит-Zn-TBut4PyP. $p < 0,05$; $n=5$.

Как видно из диаграммы наночастица цеолита не фототоксична. Нанокompозит цеолит-Zn-TBut4PyP по сравнению со свободным Zn-TBut4PyP обладает пролонгированным действием, что может быть связано с медленным высвобождением порфирина из нанокompозита, или при длительном облучении генерация синглетного кислорода

порфирином Zn-TBut4PyP, связанным на поверхности наночастиц, вполне достаточно для 100% гибели клеток *S. aureus*, т.е. для проявления бактерицидного эффекта.

3.3. Изучение действия производных синтетических порфиринов против грибковых заболеваний растений

Как было отмечено в гл. 1.3 борьба с фитопатогенными грибами, вызывающими корневые гнили у сельскохозяйственных растений, имеет очень важное значение. Они приводят к значительным потерям урожая. В связи с этим производные синтетических порфиринов были апробированы в качестве поражающих агентов, поскольку они обладают высокой антимикробной активностью по отношению к грамотрицательным и грамположительным бактериям. Следовательно, можно ожидать аналогичного действия и по отношению к фитопатогенным грибам.

Для некоторых сельскохозяйственных растений наиболее опасными и распространенными заболеваниями являются корневые гнили, вызываемые фитопатогенными грибами *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium pseudograminearum*, *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sac., *F. graminearum* Schwabe, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) и др (см. гл. 1.3).

Пшеница является основной злаковой культурой Армении, поэтому нами была определена эффективность действия синтетических металлопорфиринов по отношению к возбудителям корневой гнили этого растения. На рис. 22 представлена корневая система здоровой пшеницы (А) и растения, зараженного корневой гнилью (Б).



Рис. 22. Корневая и прикорневая части озимой пшеницы.

А – здоровое растение, Б – растение, зараженное корневой гнилью.

Как видно на рисунке, фитопатогенные грибы поражают не только корневую, но и прикорневую часть растения.

Исследования проводились в двух направлениях:

1. исследование эффективности действия катионных металлопорфиринов на фитопатогены, вызывающие корневую гниль у пшеницы в тепличных условиях;
2. исследование эффективности действия катионных металлопорфиринов на фитопатогены, вызывающие корневую гниль у пшеницы в полевых условиях.

3.3.1. Исследование эффективности синтетических металлопорфиринов в теплице

Ранее было установлено, что на опытных полях Научного центра земледелия и защиты растений (г. Эчмиадзин, Армавирская область, РА) выявлено несколько типов фитопатогенных грибов, вызывающие корневую гниль.

Для определения действия на эти фитопатогенные грибы в тепличных условиях были выбраны два эффективных металлопорфирина – Zn-ТОЕ4РyP и Ag-ТОЕ4РyP.

Для проведения экспериментов в теплицах (Национальный аграрный университет Армении) был выбран один из самых распространенных видов озимой пшеницы – «Безостая-1». Исследования эффективности действия выбранных металлопорфиринов на возбудителей, вызывающих корневую гниль у озимой пшеницы, проводились в условиях, описанных в гл. 2.

На рис. 23-24 представлены результаты действия металлопорфиринов на рост озимой пшеницы, выращенной в теплице в вазонах с землей, зараженной возбудителями корневой гнили.

На рис. 23 представлено влияние предварительного замачивания семян озимой пшеницы металлопорфиринами Zn-ТОЕ4РyP и Ag-ТОЕ4РyP. Наблюдается значительное опережение роста, размера колоса растений по сравнению с контролем.

На рис. 24 видна значительная разница, как в размере колоса, так и в величине зерен озимой пшеницы. Эксперименты показали, что наилучшие показатели «прорастания» и «высоты растений» наблюдаются, когда проводится предварительное замачивание семян

металлопорфирином Zn-ТОЕ4РyР в течение 30 мин при концентрациях 0,75-1 г/л. Концентрации металлопорфирина 1,5 г/л и 3 г/л подавляли рост растений.

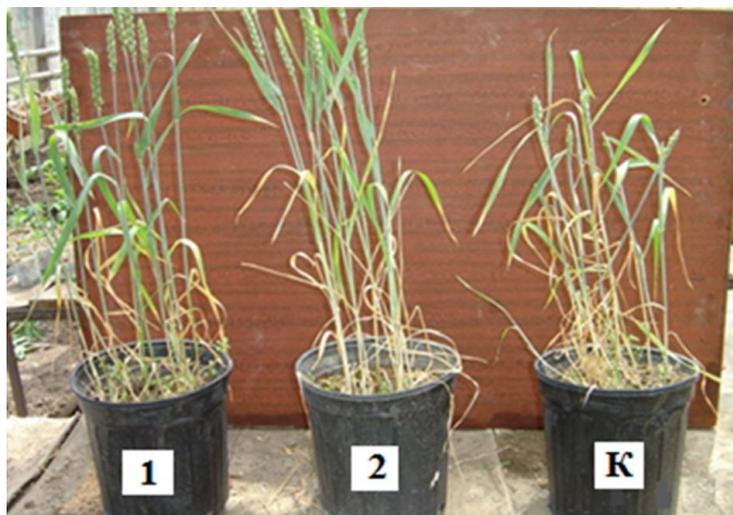


Рис. 23. Изучение эффективности действия металлопорфиринов на рост озимой пшеницы «Безостая-1», выращенной в теплице.

Растения, выращенные в вазонах с землей, зараженной возбудителями корневой гнили:

- 1 – семена, обработанные металлопорфирином Ag-ТОЕ4РyР;
- 2 – семена, обработанные металлопорфирином Zn-ТОЕ4РyР;
- К – контрольный вазон, где семена не обработаны порфирином.

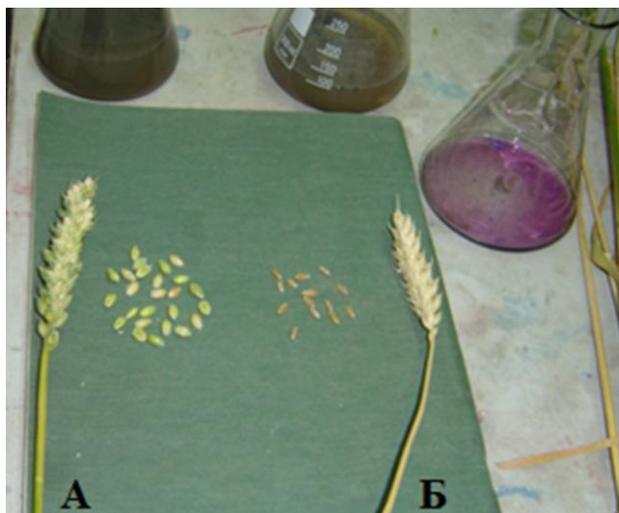


Рис. 24. Изучение эффективности действия металлопорфирина Zn-ТОЕ4РyР на размер колоса и зерен озимой пшеницы «Безостая-1».

Растения, выращенные в теплице в вазонах с землей, зараженной возбудителями корневой гнили;

- А – колос и зерна растений, семена которых предварительно обработаны Zn-ТОЕ4РyР;
- Б – колос и зерна растений, семена которых не обработаны Zn-ТОЕ4РyР.

Было исследовано действие раствора Zn-ТОЕ4РyР (1 г/л) на разные стадии роста пшеницы: а) стадия 3-х листьев, б) стадия кущения, в) стадия выхода в трубку. Дополнительный полив растений раствором Zn-ТОЕ4РyР не вызывало какого-либо значительного увеличения темпов роста (увеличение на 1-6%) на всех трех исследованных стадиях (а, б, в) роста. Наилучшие результаты были получены без дополнительного полива почвы, где высота растений увеличилась на $13,9 \pm 0,7\%$.

3.3.2. Исследование эффективности синтетических металлопорфиринов в полевых условиях

Испытания действия металлопорфиринов на возбудители, вызывающих корневую гниль у пшеницы, нами были проведены также на полях Научного центра земледелия и защиты растений (г. Эчмиадзин, Армавирская область, РА).

Семена озимой пшеницы «Безостая-1» были предварительно обработаны металлопорфиринами Zn-ТОЕ4РyР и Zn-ТВut3РyР и затем посеяны. После «полного созревания» пшеницы (на 270 день после посева) измеряли некоторые показатели урожая, чтобы выявить эффективность действия порфиринов. Эти измерения можно считать косвенными показателями действия металлопорфиринов на возбудители, вызывающих корневую гниль, но для сельскохозяйственного продукта они являются реальными конечными показателями урожайности. Такими параметрами урожая являются: длина колоса, число колосьев в 1 м^2 поля, вес зерен в одном колосе, вес 1000 зерен (абсолютный вес), урожай с 1 м^2 поля (урожай с 1 га).

На рис. 25-26 представлены результаты, отображающие эффективность двух металлопорфиринов Zn-ТОЕ4РyР и Zn-ТВut3РyР в полевых условиях. На рис. 25 видно, что у образцов озимой пшеницы «Безостая-1», семена которой были предварительно обработаны растворами металлопорфиринов Zn-ТОЕ4РyР и Zn-ТВut3РyР, выращенных на «зараженном» поле, наблюдается значительное усиление корневой системы и роста стеблей (образцы 3 и 4, соответственно) по сравнению с необработанными образцами пшеницы со «здоровых» и «зараженных» полей (1 и 2 соответственно).

На рис. 26 видно, что размеры колосьев и зерен озимой пшеницы «Безостая-1», семена которой предварительно были обработаны металлопорфиринами Zn-ТОЕ4РyР и Zn-TBut3РyР (образцы 3 и 4, соответственно), значительно больше, чем размеры колосьев и зерен необработанной пшеницы, собранных со «здоровых» и «зараженных» полей (образцы 1 и 2, соответственно).

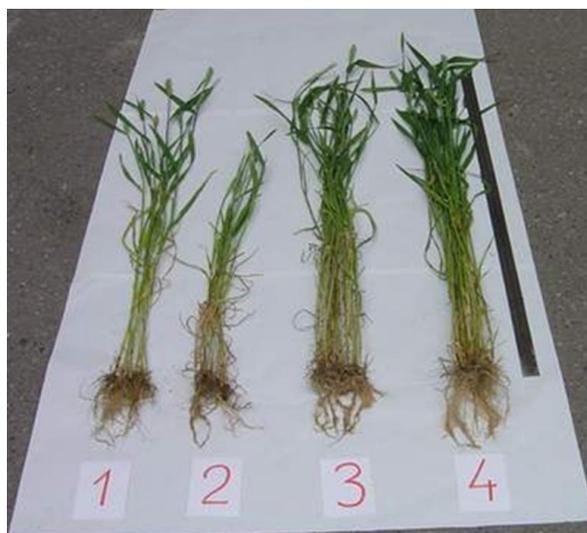


Рис. 25. Действие синтетических металлопорфиринов Zn-ТОЕ4РyР и Zn-TBut3РyР на рост озимой пшеницы «Безостая-1».

- 1 – образцы растений со «здорового» поля (семена, не обработанные порфирином);
- 2 – образцы растений с «зараженного» поля (семена, не обработанные порфирином);
- 3 – образцы растений с «зараженных» полей (семена, обработанные порфирином Zn-ТОЕ4РyР);
- 4 – образцы растений с «зараженных» полей (семена, обработанные порфирином Zn-TBut3РyР).



Рис. 26. Действие синтетических металлопорфиринов Zn-ТОЕ4РyР и Zn-TBut3РyР на размер колосьев и зерен озимой пшеницы «Безостая-1».

- 1 – образец колоса со «здорового» поля (семена, не обработанные порфирином);
- 2 – образец колоса с «зараженного» поля (семена, не обработанные порфирином);
- 3 – образец колоса с «зараженного» поля (семена, обработанные порфирином Zn-ТОЕ4РyР);
- 4 – образец колоса с «зараженного» поля (семена, обработанные порфирином Zn-TBut3РyР).

Результаты испытаний суммированы в табл. 8. Приведенные данные показывают значительный рост всех показателей урожая на тех полях, где семена были предварительно обработаны растворами металлопорфиринов. Урожай, полученный из необработанных семян со «здорового» поля (столбец № 1), на 14,2% больше, чем урожай, полученный из необработанных семян с «зараженного» поля (столбец № 2). Это объясняется заражением пшеницы возбудителями, вызывающими корневую гниль.

Таблица 8

Показатели урожая при действии синтетических металлопорфиринов Zn-TOEt4PyP и Zn-TBut3PyP на корневую гниль пшеницы ($p < 0,05$; $n=5$)

Показатели урожая	№ 1, не зараженная земля, семена не обработаны	№ 2, зараженная земля, семена не обработаны	№ 3, зараженная земля, семена обработаны порфирином Zn-TBut3PyP	№ 4, зараженная земля, семена обработаны порфирином Zn-TOEt4PyP
Длина 1 колоса (мм, среднее от 25 колосьев)	6,8 ± 0,8	6,4 ± 0,9	6,8 ± 0,9	7,2 ± 0,8
Число колосьев на 1 м ²	595 ± 21	507 ± 18	550 ± 15	585 ± 16
Вес 1000 зерен (г)	41,1 ± 1,9	39,4 ± 1,8	48,5 ± 2,3	47,0 ± 2,2
Вес зерен в 1 колосе (г, среднее от 25 колосьев)	0,73 ± 0,05	0,75 ± 0,03	0,83 ± 0,05	0,77 ± 0,04
Урожай с 1 м ² (г)	434,3 ± 21	380,2 ± 19	456,5 ± 22	450,4 ± 22
Урожай с 1 га (центнер)	43,4 ± 2,1	38,0 ± 1,9	45,6 ± 2,2	45,0 ± 2,2
Прирост урожая в % по отношению к № 2	14,2 ± 0,7	-	20,0 ± 0,9	18,4 ± 0,8
Содержание белка (%) в 100 г зернах	12,3 ± 0,4	10,5 ± 0,5	14,4 ± 0,3	14,0 ± 0,2

Применение металлопорфиринов приводит к увеличению урожая на 20,0% и 18,4% (Zn-TBut3PyP и Zn-TOE4PyP, соответственно) по сравнению с урожаем, выращенным из необработанных семян на «зараженном» поле (столбец № 2).

В результате апробирования эффективности действия металлопорфирина Zn-TOE4PyP в полевых условиях в трех областях Армении: Араратская область (деревня Ерасхаван), Армавирская область (деревня Аршалуйс), Котайкская область (г. Цахкадзор) были получены аналогичные результаты.

Изучение действия порфиринов Zn-TBut3PyP, Zn-TOE4PyP, TOE4PyP и Ag-TOE4PyP на фитопатогенные грибы, вызывающие корневую гниль у озимой пшеницы «Безостая-1», привело к следующему заключению:

1. наилучшие результаты были достигнуты при предварительной обработке семян пшеницы в течение 30 мин при концентрации растворов металлопорфиринов 1 мг/мл;
2. обработка растений на разных фазах роста существенно не влияет на урожай и другие показатели;
3. при предварительной обработке семян происходит заметное влияние на рост и утолщение стебля, размер колоса и числа зерен в нем;
4. при предварительной обработке семян растворами Zn-TOE4PyP и Ag-TOE4PyP происходит существенное увеличение синтеза белка в зернах на 14,5% и 17,3%, соответственно;
5. при предварительной обработке семян растворами Zn-TBut3PyP и Zn-TOE4PyP (столбцы 3 и 4, соответственно) достигнуто повышение урожая на 18-20% по сравнению с контролем (столбец № 2).

Таким образом:

- металлопорфирины, возможно, действуют не по механизму уничтожения фитопатогенных грибов, вызывающих корневую гниль, а, по всей вероятности, по механизму их подавления и повышения устойчивости растений к возбудителям корневой гнили, путем включения порфиринов в цикл синтеза хлорофилла и белков (увеличение синтеза белка в зернах на 15-17%);

- независимо от механизма действия металлопорфиринов, наблюдаются положительные результаты: в высоте растений, диаметре стебля, росте корневой системы, величине колосьев и зерен пшеницы;
- все исследованные металлопорфирины являются хорошими стимуляторами роста и повышают урожайность пшеницы на 18-20%.

Суммируя полученные результаты можно отметить их убедительность в пользу высокой биологической активности и эффективности новых катионных металлопорфиринов в борьбе против возбудителей корневой гнили сельскохозяйственных растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее время большое значение придается разработке новых способов борьбы с патогенными микроорганизмами, что обусловлено увеличением количества штаммов, устойчивых к действию традиционных антимикробных препаратов [61, 91, 129].

Одним из наиболее перспективных и инновационных подходов для уничтожения патогенов является фотодинамическая инактивация (ФДИ) микроорганизмов [83, 89, 106, 112, 133, 184].

Основное преимущество ФДИ микроорганизмов над антибиотикотерапией заключается во множественном характере окислительной деструкции клеточной стенки микроорганизмов, что затрудняет выработку устойчивости к последующим циклам фотодинамических воздействий и можно проводить повторные курсы при значительной бактериальной обсемененности [79, 108, 198].

Для практического внедрения ФДИ микроорганизмов существует проблема, которая заключается в устойчивости грамотрицательных бактерий к фотодинамическому воздействию большинства известных ФС [28, 83, 91, 127, 134, 135]. Резистентность грамотрицательных бактерий к ФДИ объясняется особенностью строения их клеточной стенки [142], отличительным компонентом которой является наружная мембрана (НМ), служащая барьером проницаемости (см. рис. 4).

Механизм трансмембранного транспорта ФС заключается в облегченном переносе молекул красителя, важным первичным этапом которого является связывание красителя с клеткой [135, 142, 180]. Отрицательный заряд внешней поверхности жизнеспособных бактериальных клеток определяет активное связывание с ними и, соответственно, выраженную антибактериальную активность катионных красителей [38, 40, 53, 122, 128, 141].

Настоящая работа посвящена скринингу наиболее эффективных ФС из числа новых природных и производных синтетических порфиринов.

По мере накопления экспериментального и клинического материала были сформулированы основные требования к ФС, включающие биологические (токсические и фармакокинетические), фотофизические и химико-технологические критерии [46]. Известно, что наиболее важными требованиями к ФС являются: низкая темновая и высокая световая

токсичность в терапевтических дозах [47, 52, 67, 186]; высокий квантовый выход синглетного кислорода ($\gamma_{\Delta} \geq 0,5$) [48, 109, 121, 159, 186].

В связи с этим на первом этапе нашей работы проводились исследования антибактериальной активности природных и производных синтетических порфиринов на грамотрицательной бактерии *E. coli* K-12 в темновых условиях (*in vitro*). Этот микроорганизм является удобной моделью для изучения эффективности влияния порфиринов, так как проявляет значительную устойчивость ко многим известным ФС [129, 135, 153].

У исследуемых природных и производных синтетических порфиринов были определены не токсичные концентрации (100% выживаемость клеток), необходимые для фотодинамических исследований.

Целью экспериментов было также определение влияния различных периферических функциональных групп и центральных атомов металла в молекулах производных синтетических порфиринов на их антибактериальную активность в темновых условиях.

Из литературных данных известно, что в темновых условиях серебряный комплекс производного порфирина (AgTMPyP) проявляет всего лишь бактериостатическую активность в отношении тест-культур *S. aureus* и *E. coli* [7].

В отличие от этой работы, проведенные нами исследования в темновых условиях показали, что наличие металла (Zn^{2+} , Ag^{2+} , Co^{2+}) в координационной плоскости производных синтетических порфиринов повышает антибактериальную активность исследуемых соединений по сравнению с металл не содержащими аналогами (см. табл. 1). Наиболее высокую темновую активность проявляют серебряные комплексы порфиринов. Очевидно, это обусловлено природой центрального атома металла и его координационной насыщенностью (см. табл. 3).

Сравнение бактерицидной активности серебряных комплексов исследуемых производных синтетических порфиринов с различными периферическими функциональными группами приводит к заключению, что наличие бутил- и аллил- гидрофобных групп Ag-TBut4PyP и Ag-TAl14PyP приводит к понижению МБК (в 5 раз) по сравнению с оксиэтил- группой Ag-TOE4PyP , которая содержит ОН гидрофильный конец (см. рис. 10). Очевидно, что степень гидрофобности периферических функциональных групп порфиринов

способствует более сильной ассоциации с наружной мембраной клеток кишечной палочки и увеличению поглощения исследуемых порфиринов.

В пользу этого факта говорят также данные других авторов. Так в исследованиях Minnock с соавторами показано, что инкубация с катионным фталоцианином в темновых условиях приводит к повышению проницаемости наружной мембраны *E. coli* и увеличению поглощения гидрофобных соединений [142].

Исходя из полученных нами данных, можно заключить, что серебряные комплексы исследуемых производных синтетических порфиринов с гидрофобными периферическими функциональными группами (Ag-TBut4PyP и Ag-TAll4PyP) являются очень эффективными биологическими агентами против грамотрицательной бактерии *E. coli* K-12 в темновых условиях.

Что касается природных порфиринов, то проведенные нами исследования в темновых условиях показали, что серебряные комплексы проявляют до 1,5 раза более высокую темновую активность, чем цинковые комплексы и металл не содержащие аналоги. Сравнение антибактериальной активности Ag-феофитин(a+b) и Ag-феофитин(a) приводит к заключению, что препарат Ag-феофитин(a+b) имеет более высокую активность, чем Ag-феофитин(a) (см. табл. 2).

Полученные нами данные согласуются с результатами исследований Казаряна с соавторами. Ими показано, что Ag-феофитин(a+b) проявляет 3,2 раза более высокую антибактериальную активность против микробной суспензии *S. aureus* 906, чем Ag-феофитин(a) [12].

По действию на микроорганизмы синтетические катионные порфирины в темновых условиях до 70 раз более эффективны, чем природные порфирины. Результаты исследований антибактериальной активности 11 производных синтетических порфиринов по отношению к *E. coli* K-12 в темновых условиях свидетельствуют о высокой степени активности синтетических металлопорфиринов, особенно серебряных комплексов синтетических порфиринов, для которых МБК в 4-16 раз меньше по сравнению с остальными синтетическими порфиринами (см. табл. 3).

Одним из наиболее важных показателей эффективности ФС является его способность содействовать генерации синглетного кислорода. В связи с этим актуальной задачей является

исследование фотофизических свойств порфиринов и отбор подходящих порфиринов по критерию высокого квантового выхода синглетного кислорода.

Изучение спектров поглощения и флуоресценции исследуемых катионных синтетических порфиринов показало, что у кобальтовых и серебряных комплексов порфиринов отсутствует флуоресценция. У цинковых комплексов и металл не содержащих производных синтетических порфиринов отмечено наличие заметной флуоресценции. Они оказались фотостабильными при освещении в течение более 1 ч [88].

В связи с явлением тушения флуоресценции тяжелыми металлами (Co и Ag) исследования эффективности фототоксичности порфиринов проводили с металл не содержащими производными синтетических порфиринов и их цинковыми комплексами.

Все отобранные порфирины обладают достаточно высокими значениями квантовых выходов синглетного кислорода по отношению к стандарту – $H_2TM4PyP$ ($\gamma_{\Delta} = 77\%$), наиболее высокий квантовый выход синглетного кислорода выявлен у Zn-металлопорфиринов (Zn-TOE4PyP – 0,85%; Zn-TAlI4PyP – 0,86%; Zn-TBut4PyP – 0,97%) (см. табл. 4).

Далее проводились исследования фотодинамической инактивации грамотрицательных и грамположительных бактерий выбранными катионными синтетическими порфиринами.

Результаты исследований фотоинактивации клеток *E. coli* K-12 свидетельствуют о высокой степени активности цинковых комплексов синтетических порфиринов, проявляющих в 2-2,5 раза более высокую эффективность, чем их металл не содержащие аналоги (см. табл. б). Сравнительно высокой фототоксичностью обладают металлопорфирины Zn-TBut4PyP и Zn-TAlI4PyP, которые при концентрации 2 мкг/мл и облучении в течение 30 мин (30 мВт/см^2) приводят к 100% ($9 \log_{10}$) гибели клеток *E. coli* K-12 (см. табл. 5).

Наши результаты согласуются с исследованиями Pavanì с соавторами, которые показали, что цинк содержащие порфирины сильнее связываются с мембранами, чем их металл не содержащие аналоги [165].

Исследуемые катионные синтетические порфирины проявляют в 1000 раз более высокую фотодинамическую активность, чем анионный хлорин e_6 и нейтральный Al-фталоцианин (см. табл. б).

Эти результаты свидетельствуют, что катионные ФС могут иметь более широкое применение в фотоинаktivации бактериальных клеток, чем обычно используемые в фотодинамической терапии анионные или нейтральные ФС.

Исходя из полученных нами данных можно предположить, что механизм фотоинаktivации грамотрицательных бактерий происходит следующим образом: положительный заряд катионных ФС, в отличие от нейтрально и отрицательно заряженных ФС, способствует электростатическому связыванию с наружной мембраной бактерии, вызывая начальное ограниченное повреждение и проникновение в клетку. По этому нейтрально и отрицательно заряженные ФС обладают незначительной фототоксичностью по отношению к грамотрицательным бактериям даже при условии, когда они являются эффективными генераторами синглетного кислорода. Это предположение коррелирует с заключениями нескольких групп исследователей, проводивших аналогичные работы [80, 132, 138, 141].

В результате наших исследований выявлено, что добавление CaCl_2 в суспензию клеток *E. coli* K-12 при ФДИ с Zn-TBut4PyP вызывает уменьшение фотодинамического эффекта, т.е. присутствие катионов Ca^{2+} защищает бактерии от фотоинаktivации (см. рис. 12). С одной стороны, это может быть связано с прямым конкурентным взаимодействием поликатионных ФС и бивалентных катионов (Ca^{2+}) с центрами связывания на поверхности бактериальной клетки (например, отрицательно заряженными группами липополисахаридов), а с другой – с понижением проницаемости наружной мембраны для красителя Zn-TBut4PyP в присутствии стабилизирующих катионов Ca^{2+} . Полученные данные также позволяют сделать вывод о том, что фотоинаktivация бактерий (особенно грамотрицательных бактерий), в первую очередь, определяется эффективностью связывания молекул ФС с клетками-мишенями.

В работах других авторов при использовании анионного ФС (мероцианин 540) добавление NaCl позволяет повысить бактерицидный потенциал при инаktivации стафилококков [6, 187]. Они полагают, что ионы Na^+ покрывают отрицательный заряд на клеточной стенке бактерий и тем самым облегчают электростатическое взаимодействие анионных ФС с бактериями. Эти данные также приводят к аналогичному выводу о зависимости фотоинаktivации бактерий от эффективности связывания молекул ФС с клетками-мишенями.

Основываясь на полученных нами результатах можно установить, что исследуемые катионные синтетические металлопорфирины Zn-TAll4PyP и Zn-TBut4PyP являются высокоэффективными ФС по отношению к грамотрицательным бактериям. Высокая антибактериальная эффективность исследуемых катионных синтетических металлопорфиринов зависит от четырех факторов: присутствия в порфириновом макроцикле положительного заряда (+4), металла (Zn^{2+}) и гидрофобных периферических функциональных групп, а также высоких значений квантовых выходов генерируемого синглетного кислорода.

Аналогичные заключения были сделаны и другими исследователями: свойства эффективного ФС зависят от числа, положения и природы замещенных функциональных групп и типа центрального атома металла [220]; тетракатионные производные порфирина являются высокоэффективными ФС по отношению к грамотрицательным бактериям [38, 108]; эффективность этих порфиринов может отличаться в зависимости от природы замещенных функциональных групп – например, гидрофобные (липофильные) группы повышают аффинность (сродство) порфиринов к мембранам клеток и проникновение ФС в клетки микроорганизмов, что приводит к повышению эффективности ФДИ [38, 68]; внесение атома цинка в порфириновое кольцо приводит к повышению эффективности ФДИ, что обусловлено с более сильным связыванием цинк металлокомплексов порфирина с фосфолипидами и повышением проникновения ФС в клетки [37, 164, 165, 191].

Исследование фотодинамической активности Zn-TBut4PyP по отношению к различным грамположительным (*S. aureus*, *S. epidermidis*) и грамотрицательным (*E. coli* К-12, *S. typhimurium* Г-38) бактериям показало, что порог инактивации грамположительных бактерий в 2-3 раза ниже, чем для грамотрицательных бактерий (см. рис. 13), что соответствует с данными, полученными другими авторами [108, 137, 141, 174].

Полученные данные относительно сравнительной фотоинактивации метициллин резистентного (MRSA) и метициллин чувствительного штаммов *S. aureus* показали, что Zn-TBut4PyP одинаково эффективен по отношению к обоим штаммам (рис. 27). ФДИ с Zn-TBut4PyP при концентрации 0,7 мкг/мл и мощностью излучения 30 мВт/см² в течение 30 мин приводила к 100% ($9 \log_{10}$) гибели клеток.

В работе Najim с соавторами восемь изолированных от пациентов штаммов MRSA были полностью уничтожены (100 %) после 15 мин воздействия гелий-неоновым лазером (632,8 нм) в присутствии 50 мкг/мл катионного толуидинового синего в *in vitro* условиях [89].

В исследованиях Kashef с соавторами ФДИ с толуидиновым синим (50 мкг/мл) и дозой облучения 46,8 Дж/см² приводила к сокращению числа КОЕ MRSA на 3,1 log₁₀ и *S. aureus* ATCC 25923 на 4,2 log₁₀. ФДИ с использованием катионного метиленового синего (50 мкг/мл) и дозой облучения 163,8 Дж/см² приводила к сокращению числа КОЕ MRSA и *S. aureus* ATCC 25923 на 2,2 log₁₀ и 3,1 log₁₀, соответственно [112].

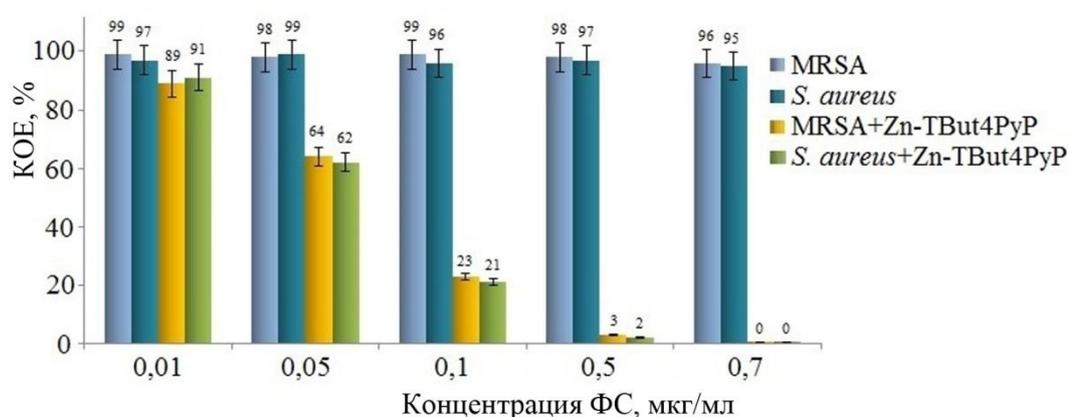


Рис. 27. Выживаемость клеток *S. aureus* и MRSA после фотоинактивации с Zn-TBut4PyP.

Начальный титр клеток – 1×10^9 КОЕ/мл. Облучение в течение 30 мин мощностью излучения 30 мВт/см². Контроль – суспензия клеток без добавления Zn-TBut4PyP. $p < 0,05$; $n = 5$.

В отличие от данных этих авторов, полученные нами результаты свидетельствуют об очень высокой фотодинамической эффективности (более чем в 50 раз) исследуемых катионных синтетических порфиринов, в частности Zn-TBut4PyP.

В результате наших исследований выявлено, что удлинение времени светового воздействия от 30 до 60 мин приводит к сокращению числа выживших клеток *E. coli* K-12 еще на 9-21% (см. табл. 7).

Основываясь на полученные нами результаты можно установить, что удлинение времени светового воздействия приводит к повышению фотодинамической активности исследуемых производных синтетических порфиринов, которое позволит добиться уничтожения микроорганизмов при более низких концентрациях.

В *in vivo* условиях эффективность ФДИ микроорганизмов снижается по сравнению с *in vitro* условиями под влиянием таких факторов, как агрегация и связывание ФС с белками плазмы крови. Такие системы доставки как наночастицы позволяют снизить вероятность агрегации и увеличить локальную концентрацию ФС в непосредственной близости от клеточной стенки бактерий [78, 98, 116, 118, 168, 202].

Исследование процессов сорбции порфиринов на наночастицах серебра или цеолитов является первым важным этапом решения задачи создания эффективных нанокомпозитов.

Проведенные нами работы в этом направлении показали, что процент сорбции для катионного TBut4PyP на наночастицах серебра диаметром 20 нм составляет 61%, а процент сорбции для катионного Zn-TBut4PyP на наночастицах цеолита – 98%. Отметим, что в отличие от катионных порфиринов, нейтральный Al-фталоцианин практически не связывался с наночастицами (см. рис. 17, 19, 20).

Полученные нами данные подтверждаются исследованиями Zhan с соавторами. Ими было показано, что катионные порфирины хорошо инкапсулируются во внутреннюю область цеолитов ионообменным механизмом, тогда как анионные порфирины не встраиваются, а нейтральные – лишь в следовых количествах [223].

Исследование фототоксичности нанокомпозита цеолит-Zn-TBut4PyP при инактивации *S. aureus* показали, что он по сравнению со свободным Zn-TBut4PyP обладает пролонгированным действием. Это может быть связано или с медленным высвобождением порфирина из нанокомпозита, или при длительном освещении генерация синглетного кислорода порфирином Zn-TBut4PyP, связанным на поверхности наночастиц, вполне достаточна для 100% уничтожения микроорганизмов.

В отличие от полученных нами результатов исследования Nagy с соавторами показали, что иммобилизованные наночастицы серебра в цеолитных наночастицах обладают всего лишь бактериостатическим действием по отношению к MRSA [147].

Достигнутые в настоящей работе результаты по созданию эффективных нанокомпозитов указывают на перспективность проведения дальнейших исследований с целью их применения в ФДИ микроорганизмов в *in vivo* условиях.

Катионные порфирины были апробированы в качестве поражающих агентов по отношению к фитопатогенным грибам, вызывающих у пшеницы корневые гнили, которые

приводят к значительным потерям урожая. Работы были проведены в тепличных и полевых условиях.

Предварительное замачивание семян озимой пшеницы металлопорфинами (Zn-TOE4PyP, Ag-TOE4PyP, Zn-TBut3PyP) при концентрации 1 мг/мл в течение 30 мин приводило к значительному усилению роста корневой системы, стеблей и увеличению размера колоса озимой пшеницы по сравнению с контролем. Выявлено, что все исследованные металлопорфирины являются хорошими стимуляторами роста и повышают урожайность пшеницы на 18-20% (см. рис. 23-26, табл. 8).

Что касается механизма действия металлопорфиринов то вероятно, что они подавляют рост грибов и повышают устойчивость растений по отношению к корневой гнили, путем включения порфиринов в цикл синтеза хлорофилла и белков (увеличение синтеза белка в зернах на 15-17%).

Отметим, что в литературе отсутствуют данные относительно применения порфиринов не только для защиты пшеницы от корневой гнили, но и их использования в сельском хозяйстве.

Таким образом, результаты проведенных работ свидетельствуют о высокой эффективности действия синтетических катионных порфиринов, особенно их цинковых комплексов с гидрофобными периферическими функциональными группами, по отношению к исследованным грамотрицательным и грамположительным бактериям, а также к такому опасному виновнику внутрибольничных и общественных инфекций, как полирезистентный штамм MRSA.

Очевидно, что новые синтетические катионные порфирины являются соединениями с высокой биологической активностью и могут быть эффективно применены в борьбе с патогенными микроорганизмами в медицине и грибковыми заболеваниями в сельском хозяйстве.

ВЫВОДЫ

1. Производные синтетических порфиринов обладают более высокой темновой токсичностью по сравнению с природными порфиринами. Серебряные комплексы этих синтетических порфиринов проявляют более высокую активность, чем металл не содержащие аналоги и цинковые комплексы.
2. Установлено, что производные синтетических порфиринов обладают высоким квантовым выходом синглетного кислорода и являются перспективными соединениями в борьбе с патогенными микроорганизмами фотодинамическими подходами. В этом отношении наиболее перспективными являются цинковые комплексы производных синтетических порфиринов.
3. Производные синтетических порфиринов обладают высокой степенью фототоксичности по отношению как к грамотрицательным, так и грамположительным бактериям, в том числе и полирезистентного штамма MRSA. Цинковые комплексы производных синтетических порфиринов обладают более высокой фототоксичностью по сравнению с металл не содержащими аналогами порфиринов. Эффективность действия этих металлопорфиринов на бактериях согласуется с уровнем генерации синглетного кислорода.
4. Показано, что производные синтетических порфиринов образуют устойчивые комплексы с наночастицами серебра и цеолита. По сравнению с наночастицами серебра наночастицы цеолита проявляют более высокую степень сорбции порфиринов, соответственно 61% и 98%.
5. Показано, что обработка семян озимой пшеницы растворами синтетических металлопорфиринов стимулирует рост, повышает урожайность на 18-20% и противодействует заражению пшеницы фитопатогенными грибами, вызывающими корневые гнили.
6. Новые катионные производные синтетических порфиринов являются соединениями с высокой биологической активностью и могут быть эффективно применены в борьбе против патогенных микроорганизмов в медицине и грибковых заболеваний в сельском хозяйстве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ղազարյան Ռ., Սահակյան Լ., Թովմասյան Ա., Գյուլխանդանյան Գ. Մանրէասպան և սնկասպան ակտիվություն ունեցող ֆեոֆիտինի (a+b) արծաթե կոմպլեքս // Արտոնագիր № 1920 A2: Հայաստանի Հանրապետություն: – Հայտի № AM20060132. – Գյուտի առաջնությունը. – 28.07.2006.
2. Ղազարյան Ռ., Սահակյան Լ., Թովմասյան Ա., Գյուլխանդանյան Գ. Միաժամանակ ֆունգիցիդային և մանրէասպան ակտիվություն ունեցող մեզո-քառա-(4-N-օքսիէթիլպիրիդիլ) պորֆիրինի արծաթե կոմպլեքս // Արտոնագիր № 1715 A2: Հայաստանի Հանրապետություն: – Հայտի № P20050153. – Գյուտի առաջնությունը. – 12.08.2005.
3. Ղազարյան Ռ., Սահակյան Լ., Թովմասյան Ա., Գյուլխանդանյան Գ., Երիցյան Ս. Միաժամանակ ֆունգիցիդային և աճը խթանող ակտիվություն ունեցող մեզո-, քառապիրիդիլպորֆիրինների ածանցյալների մետաղակոմպլեքսներ // Արտոնագիր № 1716 A2: Հայաստանի Հանրապետություն: – Հայտի № P20050151. – Գյուտի առաջնությունը. – 12.08.2005.
4. Аскаров К.А., Березин Б.Д., Евстигнеева Р.П. Порфирины: структура, свойства, синтез / Под ред. Н.С. Ениколопяна. – М.: Наука, 1985. – 333 с.
5. Бернштейн И.Я., Каминский Ю.Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии. – Ленинград: Химия, 1975. – 230 с.
6. Бехало В.А., Сысолятина Е.В., Зайцева Л.Г., Киреева И.В., Шмиголь Т.А., Потапенко А.Я., Нагурская Е.В. Двойственная роль фотосенсибилизатора мероцианина 540 как бактерицидного агента и регулятора иммунных реакций // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – № 2. – с. 3–10.
7. Вашурин А.С., Пуховская С.Г., Гарасько Е.В., Воронина А.А., Голубчиков О.А. Образование и бактериостатические свойства комплексов AgII и CuII с тетратозилатом мезо-тетраakis(N-метил-4-пиридил)-порфирина // Макрогетероциклы. – 2014. – Т. 7(3). – с. 272–275.

8. Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М., Новожилов К.В. Фузариоз зерновых культур // Защита и карантин растений. – 2011. – № 5. – с.70–120.
9. Гейниц А.В., Сорокатый А.Е., Ягудаев Д.М., Трухманов Р.С. Фотодинамическая терапия. История создания метода и ее механизмы // Лазерная медицина. – 2007. – Т. 11(3). – с. 42–46.
10. Генина Э.А. Методы биофотоники: Фототерапия. – Саратов: Новый ветер, 2012. – 119 с.
11. Дорофеева Л.Л., Шкаликов В.А. Полевая академия «Болезни зерновых культур» – М: Печатный город, 2007. – 97с.
12. Казарян Р.К., Саакян Л.А, Товмасян А.Г., Мовсисян Л.Д., Амбарцумян А.Ж. Новые противомикробные агенты на основе природных и синтетических металлопорфиринов // Новый Армянский Медицинский Журнал. – 2008. –Т. 2(4). – с. 40–48.
13. Катькова Е.А. Ультразвуковой мониторинг течения увеальной меланомы // Вестн. офтальмол. – 2006. – № 4. – с. 3–6.
14. Красновский А.А. мл. Фотодинамическое действие и синглетный кислород // Биофизика. – 2004. – Т. 49(2). – с. 305–321.
15. Ленгелер Й., Древе Г., Шлегель Г. Современная микробиология. Прокариоты. – М.: Мир, 2005. – Т. 1. – 656 с.
16. Мадакян В.Н., Казарян Р.К., Хачатрян М.А., Степанян А.С., Куртикян Т.С., Ордян М.Б. Новые производные мезо-тетра(4-пиридил)порфина и некоторые их превращения // Химия гетероциклических соединений. – 1986. – Т. 2. – с. 212–216.
17. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: Мир, 1976. – Раздел I. – с. 25–27.
18. Миронов А.Ф. Фотодинамическая терапия рака – новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 8. – с. 32–40.
19. Миронов А.Ф. Разработка сенсibilизаторов второго поколения на основе производных хлорофилла // Рос. хим. журнал. – 1998. – Т. XLII(5). – с. 23.
20. Молекулярные зонды на основе новых водорастворимых порфиринов – исследование фотофизических свойств и специфических взаимодействий с белками и нуклеиновыми

- кислотами методами оптической спектроскопии и молекулярного докинга: Отчет о НИР (заключ.) / Институт физики НАН Беларуси; Руководитель Б.М. Джагаров; Договор с БРФФИ № Ф11АРМ-017 от 01. 07. 2011 г. – Минск, 2013. – 57 с.
21. Павлюшин В.А. Научное обеспечение защиты растений и продовольственная безопасность России // Защита и карантин растений. – 2010. – № 2. – с. 11–15.
 22. Салмин Р.М., Стенько А.А., Жук И.Г., Брагов М.Ю. Основные направления фотодинамической терапии в медицине // Новости хирургии. – 2008. – № 3. – с. 155–162.
 23. Санин С.С. Фитосанитарные проблемы семеноводства зерновых культур // Защита и карантин растений. – 2010. – № 5. – с. 22–24.
 24. Соколов В.В., Странадко Е.Ф., Жаркова Н.Н. Якубовская Р.И., Филоненко Е.В., Астраханкина Т.А. Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей основных локализаций с препаратами фотогем и фотосенс (результаты трехлетних наблюдений) // Вопр. онкологии. – 1995. – Т. 41(1). – с. 134–138.
 25. Соколов М.С., Дородных Ю.Л., Марченко А.И. Здоровая почва как необходимое условие жизни человека // Почвоведение. – 2010. – № 7. – с. 858–866.
 26. Сорокатый А.Е., Ягудаев Д.М., Маркова М.В. Фотодинамическая терапия в урологии // Лазерная медицина. – 2006. – Т. 10(3). – с. 58–61.
 27. Сташевский А.С., Галиевский В.А., Кнюкшто В.Н., Казарян Р.К., Гюльханданян А.Г., Гюльханданян Г.В., Джагаров Б.М. Водорастворимые катионные порфирины: флуоресцентные характеристики и фотосенсибилизированное образование синглетного кислорода // Журнал прикладной спектроскопии. – 2013. – Т. 80(6). – с. 823–833.
 28. Странадко Е.Ф., Коробоев У.М., Толстых М.П. Фотодинамическая терапия при гнойных заболеваниях мягких тканей // Хирургия. – 2000. – № 9. – с. 67–70.
 29. Странадко Е.Ф. Исторический очерк развития фотодинамической терапии // Лазерная медицина. – 2002. – Т. 6(1). – с. 4–8.
 30. Страчунский Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. – Смоленск: МАКМАХ, 2007. – 464 с.
 31. Толстых П.И., Дербенев В.А., Кулешов И.Ю., Азимшоев А.М., Тамразова О.Б., Романова А.С., Караханов Т.И., Соловьева А.Б. Лазерная фотодинамическая терапия

- гнойных ран с фотосенсибилизатором хлоринового ряда // Хирургия (Ж. им. Н.И. Пирогова). – 2010. – Т. 12. – с. 17–22.
32. Ульяненко Л.Н., Филипас А.С., Дорофеева Л.Л., Орлов В.Н. Комплексная система защиты посевов зерновых культур от болезней, вредителей и сорных растений. Технологии Байер КропСайенс. – М.: Печатный Город, 2008. – 64 с.
 33. Черницкий Е.А., Слобожанина Е.И. Спектральный люминесцентный анализ. – Мн.: Наука и техника, 1989. – 141с.
 34. Эйдельштейн М.В. Выявление β -лактамаз расширенного спектра у грамотрицательных бактерий с помощью фенотипических методов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – № 2. – с. 185–189.
 35. Akilov O.E., Kosaka S., O’Riordan K., Song X., Sherwood M., Flotte T.J., Foley J.W., Hasan T. The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against *Leishmania* parasites // Chem. Biol. – 2006. – Vol. 13(8). – p. 839–847.
 36. Allison R.R., Mota H.C., Sibata C.H. Clinical PD/PDT in North America: an historical review // Photodiagn. Photodyn. Ther. – 2004. – Vol. 1(4). – p. 263–277.
 37. Al-Mutairi D.A., Craik J.D., Batinic-Haberle I., Benov L.T. Photosensitizing action of isomeric zinc N-methylpyridylporphyrins in human carcinoma cells // Free Radical Res. – 2006. – Vol. 40(5). – p. 477–483.
 38. Alves E., Costa L., Carvalho C.M., Tomé J.P., Faustino M.A., Neves M.G., Tomé A.C., Cavaleiro J.A., Cunha A., Almeida A. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins // BMC Microbiol. – 2009. – Vol. 9(70). – p. 1–13.
 39. Bachmann B., Knüver-Hopf J., Lambrecht B., Mohr H. Target structures for HIV-1 inactivation by methylene blue and light // J. Med. Virol. – 1995. – Vol. 47(2). – p. 172–178.
 40. Banfi S., Caruso E., Buccafurni L., Battini V., Zazzaron S., Barbieri P., Orlandi V. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an *in vitro* study on Gram negative and Gram positive bacteria // J. Photochem. Photobiol. B. – 2006. – Vol. 85(1). – p. 28–38.
 41. Barber M. Methicillin-resistant staphylococci // J. Clin. Pathol. – 1961. – Vol. 14. – p. 385–393.

42. Bedioui F. Zeolite-encapsulated and clay-intercalated metal porphyrin, phthalocyanine and Schiff-base complexes as models for biomimetic oxidation catalysts: an overview // *Coord. Chem. Rev.* – 1995. – Vol. 144. – p. 39–68.
43. Bergmans L., Moisiadis P., Huybrechts B., Van Meerbeek B., Quirynen M., Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens *ex vivo* // *Int. Endod. J.* – 2008. – Vol. 41(3). – p. 227–239.
44. Bhatti M., MacRobert A., Henderson B., Shepherd P., Cridland J., Wilson M. Antibody-targeted lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2000. – Vol. 44(10). – p. 2615–2618.
45. Bigler F. The role of IOBC research and implementation of biological and integrated crop protection // *J. fur Kulturpflanzen.* – 2010. – Vol. 62(3). – p. 107–111.
46. Bonnett R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy // *Chem. Soc. Rev.* – 1995. – Vol. 24(1). – p. 19–33.
47. Bonnett R., Djelal B.D., Nguyen A. Physical and chemical studies related to the development of m-THPC (FOSCAN) for the photodynamic therapy (PDT) of tumours // *J. Porphyrins Phtalocyanines.* – 2001. – Vol. 5(8). – p. 652–661.
48. Bonnett R., Martinez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy // *Tetrahedron.* – 2001. – Vol. 57(47). – p. 9513–9547.
49. Booth C. *Fusarium: laboratory guide to the identification of the major species.* Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, – 1977. – 58 p.
50. Boucher H.W., Corey G.R. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Clin. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 46(5). – p. S344–S349.
51. Bush K. The evolution of beta-lactamases // *Ciba. Found. Symp.* – 1997. – Vol. 207. – p. 152–163.
52. Calzavara-Pinton P.G., Venturini M., Sala R. Photodynamic therapy: update 2006 - Part 1: Photochemistry and photobiology // *J. Eur. Acad. Dermatol.* – 2007. – Vol. 21(3). – p. 293–302.
53. Caminos D.A., Spesia M.B., Durantini E.N. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and

- 4-(trifluoromethyl)phenyl groups // Photochem. Photobiol. Sci. – 2006. – Vol. 5(1). – p. 56–65.
54. Carvalho C.M.B., Tomé J.P.C., Faustino M.A.F., Neves M.G.P.M.S., Tomé A.C., Cavaleiro J.A.S., Costa L., Alves E., Oliveira A., Cunha Â., Almeida A. Antimicrobial photodynamic activity of porphyrin derivatives: Potential application on medical and water disinfection // J. Porphyrins Phthalocyanines. – 2009. – Vol. 13. – p. 574–577.
55. Cassidy C.M., Tunney M.M., McCarron P.A., Donnelly R.F. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice // J. Photochem. Photobiol. B. – 2009. – Vol. 95(2). – p. 71–80.
56. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization // Photodiagn. Photodyn. Ther. – 2004. – Vol. 1(4). – p. 279–293.
57. Chou J.H., Kozal M.E., Halwa H.S., Rakow N.A., Suslick K.S. In: The Porphyrin Handbook. Ed. by Kadish K.M., Smith K.M., Guillard R., Academic Press, San Diego, 2000. – Vol. 6. – p. 87–94.
58. Costa L., Alves E., Carvalho C.M., Tomé J.P., Faustino M.A., Neves M.G., Tomé A.C., Cavaleiro J.A., Cunha A., Almeida A. Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: a study of charge effect // Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – Vol. 7(4). – p. 415–422.
59. Dai T., Huang Y.Y., Hamblin M.R. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art // Photodiagn. Photodyn. Ther. – 2009. – Vol. 6(3–4). – p. 170–188.
60. De Vismes B., Bedioui F., Devynck J., Bied-Charreton C.J. Zeolite-porphyrin modified electrodes // J. Electroanal. Chem. – 1985. – Vol. 187. – p. 197–202.
61. Demidova T.N., Hamblin M.R. Photodynamic therapy targeted to pathogens // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. – 2004. – Vol. 17(3). – p. 245–254.
62. Demidova T.N., Hamblin M.R. Photodynamic inactivation of *Bacillus spores*, mediated by phenothiazinium dyes // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71(11). – p. 6918–6925.
63. Denyer S.P., Maillard J.Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gramnegative bacteria // J. Appl. Microbiol. – 2002. – Vol. 92. – p. 35S–45S.

64. Detty M.R., Gibson S.L., Wagner S.J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy // *J. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 47(16). – p. 3897–3915.
65. Diekema D.J., BootsMiller B.J., Vaughn T.E., Woolson R.F., Yankey J.W., Ernst E., Flach S., Ward M., Franciscus C., Pfaller M., Doebbeling B. Antimicrobial resistance trends and outbreak frequency in United States hospitals // *Clin. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 38(1). – p. 78–85.
66. Dougherty T.J., Thoma R.E., Boyle D., Weishaupt K.R. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors: Role of the laser. In: *Laser in Photomedicine and Photobiology*. Ed. by Pratesi R., Sacchi C.A., New York, NY, USA, Springer, 1980. – p. 67–75.
67. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J., Peng Q. Photodynamic therapy // *J. Nat. Cancer Inst.* – 1998. – Vol. 90(12). – p. 889–905.
68. Engelmann F.M., Mayer I., Gabrielli D.S., Toma H.E., Kowaltowski A.J., Araki K., Baptista M.S. Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2007. – Vol. 39(2). – p. 175–185.
69. Ergaieg K., Chevanne M., Cillard J., Seux R. Involvement of both type I and type II mechanisms in Gram-positive and Gram-negative bacteria photosensitization by a meso-substituted cationic porphyrin // *Sol. Energy.* – 2008. – Vol. 82. – p. 1107–1117.
70. Faraon V., Ion R.M. Ship-in-bottle porphyrin – zeolite nanomaterials // *Optoelectron. Adv. Mat.* – 2010. – Vol. 4(8). – p. 1135–1140.
71. Ferro S., Coppellotti O., Roncucci G., Ben Amor T., Jori G. Photosensitized inactivation of *Acanthamoeba palestinensis* in the cystic stage // *J. Appl. Microbiol.* – 2006. – Vol. 101(1). – p. 206–212.
72. Frederiksen P.K., McIlroy S.P., Nielsen C.B., Nikolajsen L., Skovsen E., Jørgensen M., Mikkelsen K.V., Ogilby P.R. Two-Photon Photosensitized Production of Singlet Oxygen in Water // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – Vol. 127 (1). – p. 255–269.
73. Friedrich C.L., Moyles D., Beveridge T.J., Hancock R.E. Antibacterial action of structurally diverse peptides on gram-positive bacteria // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2000. – Vol. 44(8). – p. 2086–2092.

74. Fuchs B.B., Tegos G.P., Hamblin M.R., Mylonakis E. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – Vol. 51(8). – p. 2929–2936.
75. Gasc A.M., Sicard A.M. Genetic studies of acridine-induced mutants in *Streptococcus pneumoniae* // *Genetics.* – 1978. – Vol. 90(1). – p. 1–18.
76. George S., Hamblin M.R., Kishen A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2009. – Vol. 8(6). – p. 788–795.
77. Ghazaryan R.K., Sahakyan L.A., Tovmasyan A.G., Vardanyan S.G., Gazaryan A., Aloyan L., Gyulkhandanyan G.V., Hovhannesian V.E. Synthesis of new water-soluble cationic porphyrins and their catalytic and biological activity // *ISTC 7th International Seminar, Scientific Advances in Chemistry: Heterocycles, Catalysis and Polymers as Driving Forces, Russia, Yekaterinburg. Book of abstracts.* – 2004. – p. 40.
78. Gil-Tomas J., Tubby S., Parkin I.P., Narband N., Dekker L., Nair S. P. Lethal photosensitisation of *Staphylococcus aureus* using a toluidine blue O-tiopronin-gold nanoparticle conjugate // *J. Mater. Chem.* – 2007. – Vol. 17. – p. 3739–3746.
79. Giuliani F., Martinelli M., Cocchi A., Arbia D., Fantetti L., Roncucci G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn (II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54(2). – p. 637–642.
80. Glukhov E., Stark M., Burrows L.L., Deber C.M. Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280(40). – p. 33960–33967.
81. Gonzales F.P., da Silva S.H., Roberts D.W., Braga G.U. Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue // *Photochem. Photobiol.* – 2010. – Vol. 86(3). – p. 653–661.
82. Grimmecke H.D., Knirel Y.A., Kiesel B., Voges M., Rietschel E.T. Structure of the *Acetobacter methanolicus* MB-129 capsular polysaccharide, and of oligosaccharides resulting from degradation by bacteriophage Acm7 // *Carbohydrate Res.* – 1994. – Vol. 259(1). – p. 45–58.

83. Grinholc M., Szramka B., Olender K., Graczyk A. Bactericidal effect of photodynamic therapy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain with the use of various porphyrin photosensitizers // *Acta Biochim. Pol.* – 2007. Vol. 54(3). – p. 665–670.
84. Grinholc M., Kawiak A., Kurlenda J., Graczyk A., Bielawski K.P. Photodynamic effect of protoporphyrin diarginate (PPArg2) on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and human dermal fibroblasts // *Acta. Biochim. Pol.* – 2008. – Vol. 55(1). – p. 85–90.
85. Gross S., Brandis A., Chen L., Rosenbach-Belkin V., Roehrs S., Scherz A., Salomon Y. Protein-A-mediated targeting of bacteriochlorophyll-IgG to *Staphylococcus aureus*: a model for enhanced site-specific photocytotoxicity // *Photochem. Photobiol.* – 1997. – Vol. 66(6). – p. 872–878.
86. Guo Y., Rogelj S., Zhang P. Rose Bengal-decorated silica nanoparticles as photosensitizers for inactivation of gram-positive bacteria // *Nanotechnology.* – 2010. – Vol. 21(6). – p. 065102.
87. Gyulkhandanyan G., Ghambaryan S., Amelyan G., Ghazaryan R., Arsenyan F., Gyulkhandanyan A. Investigation of photodynamic activity of water-soluble porphyrins in vitro and in vivo // *Proc. of SPIE.* – 2006. - Vol. 6139. – p. 613911-1–613911-7.
88. Gyulkhandanyan G.V., Ghazaryan R.K., Paronyan M.H., Gyulkhandanyan A.G., Sheyranyan M.A., Dzhagarov B.M., Tuchina E.S., Korchenova M.A., Tuchin V.V. Photophysical properties and photodynamic efficiency of cationic porphyrins // *Proc. of SPIE.* – 2014. – Vol. 8942. – p. 894212-1–894212-9.
89. Hajim K.I., Salih D.S., Rassam Y.Z. Laser light combined with a photosensitizer may eliminate methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* // *Lasers Med. Sci.* – 2010. – Vol. 25(5). – p. 743–748.
90. Hamblin M.R., O'Donnell D.A., Murthy N., Rajagopalan K., Michaud N., Sherwood M.E., Hasan T. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2002. – Vol. 49(6). – p. 941–951.
91. Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2004. – Vol. 3(5). – p. 436–450.

92. Hamblin M.R., Dai T. Can surgical site infections be treated by photodynamic therapy? // Photodiagnosis Photodyn. Ther. – 2010. – Vol. 7(2). – p. 134–136.
93. Hancock R.E. Alterations in outer membrane permeability // Annu. Rev. Microbiol. – 1984. – Vol. 38. – p. 237–264.
94. Hancock R.E. The bacterial outer membrane as a drug barrier // Trends Microbiol. – 1997. – Vol. 5(1). – p. 37–42.
95. Harris F., Chatfield L.K., Phoenix D.A. Phenothiazinium based photosensitisers – Photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications // Curr. Drug. Targets. – 2005. – Vol. 6(5). – p. 615–627.
96. Hiramatsu K., Aritaka N., Hanaki H., Kawasaki S., Hosoda Y., Hori S. Fukuchi Y., Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin // Lancet. – 1997. – Vol. 350(9092). – p. 1670–1673.
97. Hirano T., Kohno E., Nishiwaki M. Detection of near infrared emission from singlet oxygen in PDT with an experimental tumor bearing mouse // J. Japan. Soc. Laser Surg. Med. – 2002. – Vol. 22. – p. 99–108.
98. Hone D.C., Walker P.I., Evans-Gowing R., FitzGerald S., Beeby A., Chambrier I., Cook M.J., Russell D.A. Generation of cytotoxic singlet oxygen via phthalocyanine-stabilized gold nanoparticles: A potential delivery vehicle for photodynamic therapy // Langmuir. – 2002. – Vol. 18(8). – p. 2985–2987.
99. <http://agroflora.ru/kornevye-gnili-ozimoy-pshenicy/>
100. <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/wheatpests.html>
101. <http://www.avgust.com/newspaper/topics/detail.php?ID=1408>
102. http://www.jasco.co.uk/spectra_manager.asp
103. <http://www.smallgrains.org/Techfile/common.htm>
104. Huang L., Huang Y.Y., Mroz P., Tegos G.P., Zhiyentayev T., Sharma S.K., Lu Z., Balasubramanian T., Kraymer M., Ruzie C., Yang E., Kee H.L., Kirmaier C., Diers J.R., Bocian D.F., Holten D., Lindsey J.S., Hamblin M.R. Stable synthetic cationic bacteriochlorins as selective antimicrobial photosensitizers // Antimicrob. Agents Chemother. – 2010. – Vol. 54(9). – p. 3834–3841.

105. Isola V., Pece A., Pierro L. Photodynamic therapy with verteporfin of choroidal malignancy from breast cancer // *Am. J. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 142(5). – p. 885–887.
106. Jori G., Brown S.B. Photosensitized inactivation of microorganisms // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2004. – Vol. 3(5). – p. 403–405.
107. Jori G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives // *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* – 2006. – Vol. 25(1–2). – p. 505–519.
108. Jori G., Fabris C., Soncin M., Ferro S., Coppelotti O., Dei D., Fantetti L., Chiti G., Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications // *Lasers Surg. Med.* – 2006. – Vol. 38(5). – p. 468–481.
109. Josefsen L.B., Boyle R.W. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers // *Met. Based Drugs.* – 2008. – Vol. 2008. Article ID 276109.
110. Kaldec R.P., Zelicoff A.P., Vrtis A.M. Biological weapons control. Prospects and implications for the future // *J. Amer. Med. Assoc.* – 1997. – Vol. 278(5). – p. 351–356.
111. Kano K., Nakajima T., Takei M., Hashimoto S. Self-Aggregation of Cationic Porphyrin in Water // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1987. – Vol. 60(4). – p. 1281–1287.
112. Kashef N., Ravaei Sharif Abadi G., Djavid G.E. Phototoxicity of phenohtiazinium dyes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Escherichia coli* // *Photodiagnosis. Photodyn. Ther.* – 2012. – Vol. 9(1). – p. 11–15.
113. Kelly J.F., Snell M.E. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder // *J. Urol.* – 1976. – Vol. 115(2). – p. 150–151.
114. Khlebtsov B.N., Tuchina E.S., Khanadeev V.A., Panfilova E.V., Petrov P.O., Tuchin V.V., Khlebtsov N.G. Enhanced photoinactivation of *Staphylococcus aureus* with nanocomposites containing plasmonic particles and hematoporphyrin // *J. Biophotonics.* – 2013. – Vol. 6(4). – p. 338–351.
115. Kilger R., Maier M., Szeimies R.M., Bäumlner W. Bidirectional energy transfer between the triplet T₁ state of Photofrin and singlet oxygen in deuterium oxide // *Chem. Phys. Letters.* – 2001. – Vol. 343. – p. 543–548.
116. Koo Y.E., Fan W., Hah H., Xu H., Orringer D., Ross B., Rehemtulla A., Philbert M.A., Kopelman R. Photonic explorers based on multifunctional nanoplatfoms for biosensing and photodynamic therapy // *Appl. Opt.* – 2007. – Vol. 46(10). – p. 1924–1930.

117. Kubota M., Nakabayashi T., Matsumoto Y., Shiomi T., Yamada Y., Ino K., Yamanokuchi H., Matsui M., Tsunoda T., Mizukami F., Sakaguchi K. Selective adsorption of bacterial cells onto zeolites // *Colloids Surf., B.* – 2008. – Vol. 64(1). – p. 88–97.
118. Kuo W.S., Chang C.N., Chang Y.T., Yeh C.S. Antimicrobial gold nanorods with dual-modality photodynamic inactivation and hyperthermia // *Chem. Commun.* – 2009. – Vol. 28(32). – p. 4853–4855.
119. Kussovski V., Mantareva V., Angelov I., Orozova P., Wöhrle D., Schnurpreil G., Borisova E., Avramov L. Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2009. – Vol. 294(2). – p. 133–140.
120. Kuznetsova N., Makarov D., Yuzhakova O., Strizhakov A., Roumbal Y., Ulanova L., Krasnovsky A., Kaliya O. Photophysical properties and photodynamic activity of octacationic oxotitanium(IV) phthalocyanines // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2009. – Vol. 8(12). – p. 1724–1733.
121. Lang K., Mosinger J., Wagnerov D.M. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy // *Coordin. Chem. Rev.* – 2004. – Vol. 248(3–4). – p. 321–350.
122. Lazzeri D., Rovera M., Pascual L., Durantini E.N. Photodynamic studies and photoinactivation of *Escherichia coli* using meso-substituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution // *Photochem. Photobiol.* – 2004. – Vol. 80(2). – p. 286–293.
123. Lipson R.L., Baldes E.J. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative // *Arch. Dermatol.* – 1960. – Vol. 82. – p. 508–516.
124. Liu P.F., Zhu W.H., Huang C.M. Vaccines and photodynamic therapies for oral microbial-related diseases // *Curr. Drug. Metab.* – 2009. – Vol. 10(1). – p. 90–94.
125. Luksiene Z., Zukauskas A. Prospects of photosensitization in control of pathogenic and harmful microorganisms // *J. Appl. Microbiol.* – 2009. – Vol. 107(5). – p. 1415–1424.
126. MacDonald I.J., Dougherty T.J. Basic principles of photodynamic therapy // *J. Porphyrin. Phthalocyanines* – 2001. – Vol. 5(2). – p. 105–129.

127. MacKenzie F.M., Bruce J., Van Looveren M., Cornaglia G., Gould I.M., Goossens H., ARPAC Steering Group. Antimicrobial susceptibility testing in European hospitals: report from the ARPAC study // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2006. – Vol. 12(12). – p. 1185–1192.
128. Maisch T., Bosl C., Szeimies R.M., Lehn N., Abels C. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49(4). – p. 1542–1552.
129. Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? // *Lasers Med. Sci.* – 2007. – Vol. 22(2). – p. 83–91.
130. Maisch T., Baier J., Franz B., Maier M., Landthaler M., Szeimies R.M., Bäuml W. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104(17). – p. 7223–7228.
131. Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment // *Med. Chem.* – 2009. – Vol. 9(8). – p. 974–983.
132. Maisch T., Wagner J., Papastamou V., Nerl H.J., Hiller K.A., Szeimies R.M., Schmalz G. Combination of 10 % EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry *in vitro* // *J. Appl. Microbiol.* – 2009. – Vol. 107(5). – p. 1569–1578.
133. Maisch T., Hackbarth S., Regensburger J., Felgenträger A., Bäuml W., Landthaler M., Röder B. Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) – a new approach to treat superficial infections in the 21st century // *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* – 2011. – Vol. 9(5). – p. 360–366.
134. Malik Z., Hanania J., Nitran Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins – an alternative approach to antimicrobial drugs // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1990. – Vol. 5(3–4). – p. 281–293.
135. Malik Z., Ladan H., Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1992. – Vol. 14(3). – p. 262–266.
136. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. – 545 p.

137. Merchat M., Bertolini G., Giacomini P., Villanueva A., Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1996. – Vol. 32(3). – p. 153–157.
138. Merchat M., Spikes J.D., Bertoloni G., Jori G. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1996. – Vol. 35(3). – p. 149–157.
139. Mikanova O., Simon T. The influence of fertilization and crop rotation on soil microbial characteristics in the long-term field experiment // *Plant, Soil and Environ.* – 2009. – Vol. 55(55). – p. 11–16.
140. Miller J.D., Apsimon J.W., Blackwell B.A., Greenhalgh R., Taylor A. Deoxynivalenol: A 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance / *Fusarium: P.E. Nelson Memorial Symposium*. Ed. by B.A. Summerell, J.F. Leslie, D. Backhouse, W.L. Bryden, L.W. Burgess, St. Paul, Minnesota: APS Press, 2001. – p. 310–320.
141. Minnock A., Vernon D.I., Schofield J., Griffiths J., Parish J.H., Brown S.T. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria // *Photochem. Photobiol. B.* – 1996. – Vol. 32(3). – p. 159–164.
142. Minnock A., Vernon D.I., Schofield J., Griffiths J., Parish J.H., Brown S.B. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2000. – Vol. 44. – p. 522–527.
143. Moan J., Juzenas P. Singlet oxygen in photosensitization // *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* – 2006. – Vol. 25(1–2). – p. 29–50.
144. Moellering R.C.Jr., Graybill J.R., McGowan J.E. Jr., Corey L. Antimicrobial resistance prevention initiative – an update: proceedings of an expert panel on resistance // *Am. J. Infect. Control.* – 2007. – Vol. 35(9). – p. S1–S23.
145. Moet G.J., Jones R.N., Biedenbach D.J., Stilwell M.G., Fritsche T.R. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2004) // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 57(1). – p. 7–13.

146. Mroz P., Huang Y.Y., Szokalska A., Zhiyentayev T., Janjua S., Nifli A.P., Sherwood M.E., Ruzie' C., Borbas K.E., Fan D., Krayner M., Balasubramanian T., Yang E., Kee H.L., Kirmaier C., Diers J.R., Bocian D.F., Holten D., Lindsey J.S., Hamblin M.R. Stable synthetic bacteriochlorins overcome the resistance of melanoma to photodynamic therapy // *J. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* – 2010. – Vol. 24. – p. 3160–3170.
147. Nagy A., Harrison A., Sabbani S., Munson R.S. Jr., Dutta P.K., Waldman W.J. Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action // *Int. J. Nanomedicine.* – 2011. – Vol. 6. – p. 1833–1852.
148. Nakonechny F., Nisnevitch M., Nitzan Y., Firer M.A. New techniques in antimicrobial photodynamic therapy: scope of application and overcoming drug resistance in nosocomial infections. In: *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Ed. By A. Méndez-Vilas. Badajoz, Spain: Formatex Research Center Publisher, 2011. – Vol. 1. – p. 684–691.
149. Navarre W.W., Schneewind O. Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1999. – Vol. 63(1). – p. 174–229.
150. Nazzal S., Chen C.P., Tsai T. Nanotechnology in Antimicrobial Photodynamic Inactivation // *Journal of Food and Drug Analysis.* – 2011. – Vol. 19(4). – p. 383–395.
151. Niedre M., Patterson M.S., Wilson B.C. Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo // *Photochem. Photobiol.* – 2002. – Vol. 75(4). – p. 382–391.
152. Niedre M.J., Secord A.J., Patterson M.S., Wilson B.C. In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63(22). – p. 7986–7994.
153. Nitzan Y., Gutterman M., Malik Z., Ehrenberg B. Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins // *Photochem. Photobiol.* – 1992. – Vol. 55(1). – p. 89–96.
154. Nitzan Y., Dror R., Ladan H., Malik Z., Kimel S., Gottfried V. Structure-activity relationship of porphines for photoinactivation of bacteria // *Photochem. Photobiol.* – 1995. – Vol. 62(2). – p. 342–347.

155. Nitzan Y., Pechatnikov I. Approaches to kill gram-negative bacteria by photosensitized process. In: Photodynamic inactivation of microbial pathogens: medical and environmental applications. Ed. by M.R. Hamblin, Royal Society of Chemistry, 2011, – p. 47–67.
156. Nonell S., Braslavsky S.E. Time-resolved singlet oxygen detection. In: Methods in Enzymology. Ed. by L. Packer, H. Sies, San Diego: Academic Press, 2000, – Vol. 319. – p. 37–49.
157. Noskin G.A., Rubin R.J., Schentag J.J., Kluytmans J., Hedlom E.C., Smulders M., Lapetina E., Gemmen E. The burden of *Staphylococcus aureus* infections on hospitals in the United States: an analysis of the 2000 and 2001 Nationwide In patient Sample Database // Arch. Intern. Med. – 2005. – Vol. 165(15). – p. 1756–1761.
158. Nseyo U.O., Shumaker B., Klein E.A., Sutherland K. Photodynamic therapy using porfimer sodium as an alternative to cystectomy in patients with refractory transitional cell carcinoma in situ of the bladder. Bladder Photofrin Study Group // J. Urol. – 1998. – Vol. 160 (1). – p. 39–44.
159. Nyman E.S., Hynninen P.H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy // J. Photochem. Photobiol. B. – 2004. – Vol. 73(1–2). – p. 1–28.
160. O’Riordan K., Akilov O.E., Hasan T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections // Photodiagnosis Photodyn. Ther. – 2005. – Vol. 2(4). – p. 247–262.
161. O’Riordan K., Sharlin D.S., Gross J., Chang S., Errabelli D., Akilov O.E., Kosaka S., Nau G.J., Hasan T. Photoinactivation of Mycobacteria in vitro and in a new murine model of localized Mycobacterium bovis BCG-induced granulomatous infection // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – Vol. 50(5). – p. 1828–1834.
162. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours // J. Photochem. Photobiol. B. – 1997. – Vol. 39(1). – p. 1–18.
163. Oleinick N.L., Evans H.H. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms // Radiat. Res. – 1998. – Vol. 150(5 Suppl.). – p. S146–S156.
164. Pashkovskaya A.A., Sokolenko E. A, Sokolov V. S., Kotova E. A., Antonenko Y. N., Photodynamic activity and binding of sulfonated metallophthalocyanines to phospholipid membranes: Contribution of metal-phosphate coordination // Biochim. Biophys. Acta. – 2007.– Vol. 1768. – p. 2459–2465.

165. Pavani C., Uchoa A.F., Oliveira C.S., Iamamoto Y., Baptista M.S. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2009. – Vol. 8(2). – p. 233–240.
166. Pedigo L.A., Gibbs A.J., Scott R.J., Street C.N. Absence of bacterial resistance following repeat exposure to photodynamic therapy // *Proc. SPIE.* – 2009. – Vol. 7380. – p. 73803H–73803H7.
167. Peng Q., Moan J., Nesland J.M. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy // *Ultrastruct. Pathol.* – 1996. – Vol. 20(2). – p. 109–129.
168. Perni S., Piccirillo C., Pratten J., Prokopovich P., Chrzanowski W., Parkin I.P., Wilson M. The antimicrobial properties of light-activated polymers containing methylene blue and gold nanoparticles // *Biomaterials.* – 2009. – Vol. 30(1). – p. 89–93.
169. Perni S., Prokopovich P., Pratten J., Parkin I.P., Wilson M. Nanoparticles: their potential use in antibacterial photodynamic therapy // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2011. – Vol. 10(5). – p. 712–720.
170. Poljak-Blazi M., Katic M., Kralj M., Zarkovic N., Marotti T., Bosnjak B., Sverko V., Balog T., Pavelic K. In vitro and in vivo effect of natural clinoptilolite on malignant tumors // *Stud. Surf. Sci. Catal.* – 2001. – Vol. 135. – p. 5309–5316.
171. Pestka J.J. Toxicological mechanisms and potential health effects of deoxynivalenol and nivalenol // *World Mycotoxin J.* – 2010. – Vol. 3. – p. 323–347.
172. Peterson G.L. Determination of total protein // *Meth. Enzymol.* – 1983. – Vol. 91. – P. 95–119.
173. Raab O. Über die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorieria (On the effects of fluorescent substances on infusoria) // *Z. Biol. (Muenich).* – 1900. – Vol. 39. – p. 524–546.
174. Ragàs X., Sánchez-García D., Ruiz-González R., Dai T., Agut M., Hamblin M.R., Nonell S. Cationic porphycenes as potential photosensitizers for antimicrobial photodynamic therapy // *J. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 53(21). – p. 7796–7803.
175. Rammelkamp C.H., Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1942. – Vol. 51(3). – p. 386–389.
176. Ravanat J.L., Di Mascio P., Martinez G.R., Medeiros M.H., Cadet J. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275(51). – p. 40601–40604.

177. Reiners J.J.Jr., Agostinis P., Berg K., Oleinick N.L., Kessel D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy // *Autophagy*. – 2010. – Vol. 6(1). – p. 7–18.
178. Reshetnickov A.V., Ponomarev G.V., Ivanov A.V., Abakumova O.Yu., Tsvetkova T.A., Karmenyan A.V., Rebeko A.G., Baum R.Ph. Novel drug form of chlorin e6 // In *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy IX*. Ed. by T.J. Dougherty. – 2000. – Vol. 3909. – p. 124–129.
179. Reszka K.J., Denning G.M., Britigan B.E. Photosensitized oxidation and inactivation of pyocyanin, a virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa* // *Photochem. Photobiol.* – 2006. – Vol. 82(2). – p. 466–473.
180. Riess F.G., Elflein M., Benk M., Schiffler B., Benz R., Garton N., Sutcliffe I. The cell wall of the pathogenic bacterium *Rhodococcus equi* contains two channel-forming proteins with different properties // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185(9). – p. 2952–2960.
181. Rodriguez-Fuentes G., Barrios M.A., Iraizoz A., Perdomo I., Cedre B. Enterex: Anti-diarrheic drug based on purified natural clinoptilolite // *Zeolites*. – 1997. – Vol. 19. – p. 441–448.
182. Romanov V.P., Lebedev L.R., Tereshchenko T.A., Nazarikova N.I., Masycheva V.I. Photoinactivation of microorganisms in the presence of photosensitizers // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 2001. – Vol. 5. – p. 24–26.
183. Sargsyan H.H., Gevorgyan R.G., Aleksanyan G.M. International conference “Zeolites and zeolite similar structural materials”, Como, Italy, September 13-16, Book of abstracts. – 2004. – p. 115.
184. Schastak S., Ziganshyna S., Gitter B., Wiedemann P., Claudepierre T. Efficient photodynamic therapy against Gram-positive and Gram-negative bacteria using THPTS, a cationic photosensitizer excited by infrared wavelength // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5(7). – p. e11674.
185. Segalla A., Borsarelli C.D., Braslavsky S.E., Spikes J.D., Roncucci G., Dei D., Chiti G., Jori G., Reddi E. Photophysical, photochemical and antibacterial photosensitizing properties of a novel octacationic Zn(II)-phthalocyanine // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2002. – Vol. 1(9). – p. 641–648.
186. Sharma S.K., Dai T., Kharkwal G.B., Huang Y.Y., Huang L., De Arce V.J., Tegos G.P., Hamblin M.R. Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models // *Curr. Pharm. Des.* – 2011. – Vol. 17(13). – p. 1303–1319.

187. Shmigol T.A., Bekhalo V.A., Sysolyatina Cle., Nagurskaya E.V., Ermolaeva S.A., Potapenko A.Y. Effect of Sodium Chloride on Aggregation of Merocyanine 540 and Photosensitized Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* // Acta Naturae. – 2011. – Vol. 3(4). – p. 107–113.
188. Silva J.N., Filipe P., Morlière P., Mazière J.C., Freitas J.P., Gomes M.M., Santus R. Photodynamic therapy: Dermatology and ophthalmology as main fields of current applications in clinic // Biomed. Mater. Eng. – 2008. – Vol. 18(4–5). – p. 319–327.
189. Silvert P.Y., Herrera-Urbina R., Tekaiia-Elhsissen K. Preparation of colloidal silver dispersions by the polyol process. Part 2. Mechanism of particle formation // J. Mater. Chem. – 1997. – Vol. 7(2). – p. 293–299.
190. Specht K.G., Rodgers M.A. Depolarization of mouse myeloma cell membranes during photodynamic action // Photochem. Photobiol. – 1990. – Vol. 51(3). – p. 319–324.
191. Spesia M.B., Milanesio M.E., Durantini E.N. Synthesis, properties and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel cationic fullerene C60 derivatives // Eur. J. Med. Chem. – 2008. – Vol. 43(4). – p. 853–861.
192. Spikes J.D. Historical review. Photodynamic action: from paramecium to phototherapy // Photochem. Photobiol. – 1997. – Vol. 65S. – p. 142S–147S.
193. St Denis T.G., Dai T., Izikson L., Astrakas C., Anderson R.R., Hamblin M.R., Tegos G.P. All you need is light: antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease // Virulence. – 2011. – Vol. 2(6). – p. 509–520.
194. Stark G. Functional consequences of oxidative membrane damage // J. Membr. Biol. – 2005. – Vol. 205(1). – p. 1–16.
195. Strakhovskaya M.G., Antonenko Y.N., Pashkovskaya A.A., Kotova E.A., Kireev V., Zhukhovitsky V.G., Kuznetsova N.A., Yuzhakova O.A., Negrimovsky V.M., Rubin A.B. Electrostatic binding of substituted metal phthalocyanines to enterobacterial cells: its role in photodynamic inactivation // Biochemistry (Mosc). – 2009. – Vol. 74(12). – p. 1305–1314.
196. Sundstol E.G., Pettersson H., Lundh T. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites // Food Chem. Toxicol. – 2004. – Vol. 42. – p. 619–624.

197. Tanielian C., Mechin R., Seghrouchni R., Schweitzer C. Mechanistic and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen // *Photochem. Photobiol.* – 2000. – Vol. 71(1). – p. 12–19.
198. Tavares A., Carvalho C.M., Faustino M.A., Neves M.G., Tomé J.P., Tomé A.C., Cavaleiro J.A., Cunha A., Gomes N.C., Alves E., Almeida A. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment // *Mar. Drugs.* – 2010. – Vol. 8(1). – p. 91–105.
199. Tegos G.P., Hamblin M.R. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2006. – Vol. 50(1). – p. 196–203.
200. Tovmasyan A., Ghazaryan R., Sahakyan L., Gasparyan G., Babayan N., Gyulkhandanyan G. New Water-Soluble Cationic Metalloporphyrins as Potential Anticancer Agents // *J. Biomol. Struc. Dyn.* – 2007. – Vol. 24(6). – p. 682–683.
201. Tsubery H., Ofek I., Cohen S., Fridkin M. The functional association of polymyxin B with bacterial lipopolysaccharide is stereospecific: studies on polymyxin B nonapeptide // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39(39). – p. 11837–11844.
202. Tuchina E.S., Tuchin V.V., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. Phototoxic effect of conjugates of plasmon-resonance nanoparticles with indocyanine green dye on *Staphylococcus aureus* induced by IR laser radiation // *Quantum Electron.* – 2011. – Vol. 41(4). – p. 354–359.
203. Usacheva M.N., Teichert M.C., Biel M.A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms // *Lasers Surg. Med.* – 2001. – Vol. 29(2). – p. 165–173.
204. Von Tappeiner H. Uber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab // *Muench. Med. Wochenschr.* – 1900. – Vol. 47. – p. 5–7.
205. Von Tappeiner H., Jensionek H. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen // *Munch. Med. Wschr.* – 1903. – Vol. 50. – p. 2042–2044.
206. Von Tappeiner H., Jodlbauer A. Uber die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffen auf Protozoen und Enzyme // *Dtsch. Arch. Klin. Med.* – 1904. – Vol. 80. – p. 427–437.

207. Wainwright M., Phoenix D.A., Marland J., Wareing D.R., Bolton F.J. *In-vitro* photobactericidal activity of aminoacridines // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1997. – Vol. 40(4). – p. 587–589.
208. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1998. – Vol. 42(1). – p. 13–28.
209. Wainwright M. Photoinactivation of viruses // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2004. – Vol. 3(5). – p. 406–411.
210. Wainwright M. Photoantimicrobials – so what’s stopping us? // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2009. – Vol. 6(3–4). – p. 167–169.
211. Wakulinski W. Phytotoxicity of the secondary metabolites of fungi causing wheat head fusariosis (head blight) // *Acta Physiol. Plant.* – 1989. – Vol. 11(4). – p. 301–306.
212. Weishaupt K.R., Gomer C.J., Dougherty T.J. Identification of singlet oxygen as cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor // *Cancer Res.* – 1976. – Vol. 36. – p. 2326–2329.
213. Whitaker J.R., Granum P.E. An absolute method for protein determination based on differences in absorbance at 235 and 280 nm // *Anal. Biochem.* – 1980. – Vol. 109 (1). – p. 156–159.
214. WHO(World Health Organization) Global Strategy for the Containment of Antimicrobial Resistance. Geneva: WHO; 2001. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2.
215. Wilson B.C., Patterson M.S., Lilge L. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a New paradigm // *Lasers Med. Sci.* – 1997. – Vol. 12(3). – p. 182–199.
216. Wilson B.C. Photodynamic therapy/diagnostics: Principles, practice and advances. In: *Handbook of Photonics for Medical Science*. Ed. by V.V. Tuchin, London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. – p. 649–686.
217. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2004. – Vol. 3(5). – p. 412–418.
218. Winckler K.D. Special section: focus on anti-microbial photodynamic therapy (PDT) // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2007. – Vol. 86(1). – p. 43–44.

219. Yano S., Hirohara S., Obata M., Hagiya Y., Ogura S., Ikeda A., Kataoka H., Tanaka M., Joh T. Current states and future views in photodynamic therapy // J. Photochem. Photobiol. C. – 2011. – Vol. 12(1). – p. 46–67.
220. Yuksel F., Durmus M., Ahsen V. Photophysical, photochemical and liquid-crystalline properties of novel gallium(III) phthalocyanines // Dyes Pigm. – 2011. – Vol. 90. – p. 191–200.
221. Zarkovic N., Zarkovic K., Kralj M., Borovic S., Sabolovic S., Blazi M.P., Cipak A., Pavelic K. Anticancer and antioxidative effects of micronized zeolite clinoptilolite // Anticancer Res. – 2003. – Vol. 23(2B). – p. 1589–1595.
222. Zeina B., Greenman J., Corry D., Purcell W.M. Antimicrobial photodynamic therapy: assessment of genotoxic effects on keratinocytes *in vitro* // Br. J. Dermatol. – 2003. – Vol. 148(2). – p. 229–232.
223. Zhan B.Z., Li X.Y. A Novel “build-bottle-around-ship” Method to Encapsulate Metalloporphyrins in Zeolite-Y. An Efficient Biomimetic Catalyst // Chem. Comm. – 1998. – № 3. – p. 349–350.
224. Zharov V.P., Mercer K.E., Galitovskaya E.N., Smeltzer M.S. Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles // Biophys. J. – 2006. – Vol. 90(2). – p. 619–627.
225. Zolfaghari P.S., Packer S., Singer M., Nair S.P., Bennett J., Street C., Wilson M. In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent // BMC Microbiol. – 2009. – Vol. 9. – p. 27.