

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՊԱՐՈՆՅԱՆ ՄԱՐԻՆԱ ՀԱՄԼԵՏԻ

ՊՈՐՖԻՐԻՆՆԵՐԻ ՆՈՐ ԱԾԱՆՅՅԱԼՆԵՐԻ ՀԱԿԱՄԱՆՐԷԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ  
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Գ.00.14 - «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

Երևան – 2015

---

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

ПАРОНЯН МАРИНА ГАМЛЕТОВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ  
ПРОИЗВОДНЫХ ПОРФИРИНОВ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук  
по специальности 03.00.14 – «Биотехнология»

Ереван – 2015

Ատենախոսության թեման հաստատվել է «Կենսատեխնոլոգիա ԳՀԻ» ՓԲԸ –ում (ներկայում ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ):

Գիտական ղեկավար՝ կ.գ.թ. Գ.Վ. Գյուլխանդանյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կ.գ.դ., պրոֆեսոր Ս.Մ. Բադալյան  
կ.գ.թ. Լ.Ս. Մարկոսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության  
ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2015 թ. դեկտեմբերի 16-ին, ժամը 15<sup>00</sup>, ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցեն՝ 0056, ՀՀ, Երևան, Գյուրջյան փող. 14, հեռ/ֆաքս՝ (37410) 654180:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2015 թ. նոյեմբերի 16-ին:

Մասնագիտական խորհրդի  
գիտական քարտուղար, կ.գ.թ.՝ Գ.Ե. Ավետիսովա

---

Тема диссертации утверждена в ЗАО «НИИ Биотехнологии» (ныне НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА)

Научный руководитель: к.б.н. Г.В. Гюльханданян

Официальные оппоненты: д.б.н., профессор С.М. Бадалян  
к.б.н. Л.С. Маркосян

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии НАН РА

Защита диссертации состоится 16 декабря 2015 г. в 15<sup>00</sup> часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/факс (37410) 654180.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 16 ноября 2015 г.

Ученый секретарь специализированного совета, к.б.н.

Г.Е. Аветисова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** Возрастающее во всем мире число патогенных микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, пробудил большой интерес к разработкам альтернативных антибактериальных стратегий [Demidova, Hamblin, 2004; Hamblin, Hasan, 2004; Maisch, 2007]. 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 [Boucher, Corey, 2008]. 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) [Wainwright, 1998; Grinholm et al., 2007; Hajim et al., 2010; Maisch et al., 2011; Kashef et al., 2012]. 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 [Bachmann et al., 1995; Wainwright, 2004; Demidova, Hamblin, 2005; Akilov et al., 2006; Ferro et al., 2006; Fuchs et al., 2007; Gonzales et al., 2010; Schastak et al., 2010].

Повреждающее действие фотодинамического процесса обусловлено свободно-радикальными реакциями, поэтому развитие микробной устойчивости к ФДИ практически невозможно [Pedigo et al., 2009; Giuliani et al., 2010; Tavares et al., 2010]. Кроме того, в отличие от антибиотиков, действие ФС носит локальный характер, что позволяет избежать поражения нормальной микрофлоры вне зоны облучения [Странадко и др., 2000; Romanov et al., 2001; Segalla et al., 2002; Hamblin, Hasan, 2004; Wilson, 2004]. 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 [Koo et al., 2007; Perni et al., 2011]. 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 [Khlebtsov et al., 2013].

Бесконтрольное применение ядохимикатов с избирательным механизмом действия привело к опасному загрязнению почв фитопатогенными грибами, устойчивыми к фунгицидам [Mikanova, Simon, 2009; Соколов и др., 2010]. 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 производных синтетических порфиринов и природных 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-ТОЕ4PyP, Zn-TBut3PyP и Ag-ТОЕ4PyP) 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, мази) в дерматологии, стоматологии и др. отраслях медицины для лечения локальных инфекций.
- Показана возможность применения новых синтетических 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 НАН РА Гюльханданяна 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

В этой главе рассматривается проблема антимикробной резистентности и разработок альтернативных антибактериальных стратегий, одним из которых является ФДИ микроорганизмов. Представлены история возникновения ФДИ, его механизм действия, преимущества над антибиотикотерапией и области применения, известные в медицинской практике ФС и их недостатки. Описаны способы усиления антимикробной активности ФДИ с применением нанокompозитов. Рассматривается также проблема корневой гнили пшеницы для сельского хозяйства.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Бактериальные штаммы.** В работе были использованы бактериальные штаммы *E. coli* K-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 P и MRSA (из коллекции Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевич).

**Среды.** В качестве полноценных сред для культивирования бактерий использовали мясо-пептонный бульон (МПБ), среду Luria-Bertani (LB), 1,6% мясо-пептонный агар (МПА), желточно-солевой агар (ЖСА) [Миллер, 1976; Maniatis et al., 1982].

**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 [Ghazaryan et al., 2004; Казарян и др., 2008].

Перечень использованных 11 катионных производных синтетических порфиринов: мезо-тетра[4-N-(2'-оксиэтил)пиридил]порфирин (ТОЕ4PyP) и его металлокомплексы Zn-ТОЕ4PyP, Ag-ТОЕ4PyP; мезо-тетра[3-N-(2'-бутил)пиридил]порфирин (TBut3PyP) и его металлокомплекс Zn-TBut3PyP; мезо-тетра[4-N-(2'-бутил)пиридил]порфирин (TBut4PyP) и его металлокомплексы Ag-TBut4PyP, Zn-TBut4PyP; мезо-тетра[4-N-(2'-аллил)пиридил]порфирин (TAlI4PyP) и его металлокомплексы Zn-TAlI4PyP, Ag-TAlI4PyP, Co-TAlI4PyP; Со-мезо-тетра[4-N-(2'-метилаллил)пиридил]порфирин (Со-MetTAlI4PyP), а также 6 природных порфиринов: феофитин(a+b), Ag-феофитин(a+b), Zn-феофитин(a+b); феофитин(a), Ag-феофитин(a), Zn-феофитин(a).

Для сравнения в работе использовались допущенные для применения в клиниках ФС: анионный порфирин хлорин *e*<sub>6</sub>, нейтральный ФС Al-фталоцианин и 5,10,15,20-тетракис[4-N-метилпиридил]порфирин (H<sub>2</sub>TM4PyP) [Bonnert, 1995].

Маточные концентрации порфиринов и других ФС (10<sup>-3</sup> М) готовились за час до эксперимента. Все растворы порфиринов хранились в темноте при комнатной температуре в течение не более 24 ч.

**Оптическую плотность (ОП)** клеточных суспензий бактерий измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-VISIBLE Recording Spectrophotometer UV-2100 (Япония).

**Фотодинамические и темновые исследования.** Пробы для исследования содержали 0,1 мл раствора ФС соответствующей концентрации и 0,9 мл суспензии

бактерий в ФБ (конечная концентрация клеток составляла  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл). Пробы инкубировали в течение 24 ч при  $37^\circ\text{C}$  в термостате (темновое исследование).

Для фотодинамических исследований непосредственно после добавления ФС пробы инкубировали в темноте в течение 10 мин, облучали вольфрамовой лампой 50 Вт с диапазоном облучения 350-1100 нм и плотностью мощности излучения  $30 \text{ мВт/см}^2$ , или с использованием светодиода (LED) с пиковой эмиссией 405 нм и плотностью мощности излучения  $70 \text{ мВт/см}^2$  в течение 5-120 мин.

**Выживаемость бактерий** определяли по методу последовательных разведений [Миллер, 1976].

**Исследование фотофизических свойств порфиринов.** Спектры флуоресценции образцов регистрировали на серийном спектрофлуориметре MPF 44 («Перкин-Элмер», США).

Квантовые выходы синглетного кислорода ( $\gamma_\Delta$ ) определяли относительным методом [Сташевский и др., 2013]. В качестве стандарта использовали  $\text{H}_2\text{TМ4PyP}$  [Frederiksen et al., 2005].

**Получение наночастиц серебра.** В качестве исходного препарата для получения наночастиц серебра использовали  $\text{AgNO}_3$ , полиэтиленгликоль, этиленгликоль и поливинилпирролидон. Коллоидное серебро получали по методике, описанной в работе Silvert с соавторами [Silvert et al., 1997].

**Получение наночастиц цеолита.** Наночастицы природного цеолитного минерала – клиноптилолита (Ноемберянский район, Армения) нанометрических размеров получали методом механического дробления цеолита и дальнейшей седиментацией в водном растворе [Sargsyan et al., 2004].

**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 Центра по сельскому хозяйству и защите растений (г. Эчмиадзин, Армавирская область, Армения). Объектом исследования выбрана озимая пшеница «Безостая-1». Для опытных образцов использовалась зараженная возбудителями корневой гнили почва, отобранная из экспериментальных полей «Центра сельского хозяйства и защиты растений», а в качестве контроля – незараженная почва.

Для исследования эффективности металлопорфиринов в борьбе с корневой гнилью озимой пшеницы, ее семена предварительно обрабатывались различными концентрациями металлопорфиринов (от 0,5 г/л до 3 г/л) в течение 0-60 мин.

В полевых условиях после полного созревания пшеницы измеряли следующие показатели урожая: длина колоса, число колосьев в  $1 \text{ м}^2$  поля, вес зерен в одном колосе, вес 1000 зерен и урожай с  $1 \text{ м}^2$  поля (урожай с 1 га).

**Определение белка.** Концентрацию белка в зернах пшеницы определяли методами Whitaker и Granum, Grows и Davis [Whitaker, Granum, 1980; Peterson, 1983].

**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 (значения  $p < 0,05$  рассматривались как значимые различия).

**Использованные программы.** Для построения и обработки спектров использовали программу Microsoft Office Excel. Построение спектров по численным значениям с интервалом 2 нм каждой точки спектра проводили с использованием программы обработки спектров “Spectra Manager for Spectra Analysis, Version 1.53.00, JASCO Corporation, 2000 (“Spectra Manager”) [http://www.jasco.co.uk/spectra\_manager.asp]. 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 бактерии новыми производными порфиринов

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

На первом этапе работы был проведен предварительный отбор из 6 природных и 11 производных синтетических порфиринов по признаку наиболее высокой антибактериальной активности по отношению к грамотрицательной бактерии *E. coli* K-12 в темновых условиях *in vitro*. Исследования без облучения светом необходимы для определения предельных концентраций токсичности изучаемых соединений.

Штамм *E. coli* K-12 является удобной моделью для изучения эффективности действия новых производных порфиринов, так как проявляет значительную устойчивость ко многим известным ФС.

Проведенные исследования производных синтетических порфиринов показали, 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 (табл. 1). МБК – минимальная концентрация, вызывающая 100% гибель клеток бактерий. Наиболее низкие значения МБК выявлены у серебряных комплексов синтетических порфиринов. Очевидно, это обусловлено природой центрального атома металла.

Таблица 1

**Выживаемость (%) клеток *E. coli* K-12 после действия производными 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
ТОЕ4PvP	98,2 ± 4,8	97,4 ± 9,3	75,1 ± 7,4	39,3 ± 5,9
Zn-ТОЕ4PvP	98,5 ± 3,1	75,1 ± 4,1	57,4 ± 5,5	12,1 ± 4,3
Ag-ТОЕ4PvP	97,3 ± 2,7	71,0 ± 3,3	55,2 ± 4,7	0
TAlI4PvP	98,4 ± 4,3	79,2 ± 2,7	46,0 ± 8,3	2,1 ± 0,8
Co-TMetAlI4PvP	92,2 ± 3,8	61,4 ± 3,1	36,3 ± 6,4	1,7 ± 0,6
Co-TAlI4PvP	97,4 ± 7,5	59,3 ± 4,6	32,1 ± 9,1	1,5 ± 0,4
Zn-TAlI4PvP	91,0 ± 2,2	21,4 ± 7,2	9,3 ± 5,1	0
Ag-TAlI4PvP	38,1 ± 7,1	0	0	0
TBut4PvP	95,4 ± 9,2	76,4 ± 5,9	39,4 ± 7,3	0
Zn-TBut4PvP	58,2 ± 5,3	23,3 ± 8,1	9,0 ± 2,7	0
Ag-TBut4PvP	43,3 ± 6,4	0	0	0

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

Сравнение антибактериальной активности 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-TAl14PyP приводит к понижению МБК (в 5 раз) по сравнению с оксиэтил-группой Ag-TOE4PyP, которая содержит ОН гидрофильный конец. Степень гидрофобности периферических функциональных групп производных порфиринов способствует более сильной ассоциации с наружной мембраной клеток кишечной палочки и увеличению проникновения исследуемых порфиринов.

Исследования природных порфиринов в темновых условиях показали, что МБК серебряных комплексов до 1,5 раза ниже, чем у цинковых комплексов и металл не содержащих аналогов (табл. 2). МБК производных синтетических порфиринов в таких же условиях ниже до 70 раз по сравнению с природными порфиринами.

**Таблица 2**

**Выживаемость (%) клеток *E. coli* K-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(a+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	<b>0,3±0,04</b>
феофитин(a)	97,1±7,2	95,3±6,7	82,7±6,5	62,0±8,1	45,6±5,9	24,8±7,9	<b>0,2±0,03</b>
Zn-феофитин(a+b)	94,5±6,4	75,2±5,5	70,1±7,7	48,3±5,5	31,3±4,2	<b>0,1 ± 0,02</b>	<b>0</b>
Zn-феофитин(a)	95,8±5,2	81,4±7,3	74,2±3,5	56,1±6,4	33,0±7,5	<b>0,2 ± 0,03</b>	<b>0</b>
Ag-феофитин(a+b)	72,3±7,8	46,3±8,1	34,5±9,1	13,7±7,5	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Ag-феофитин(a)	76,3 ± 6,2	59,5 ± 7,0	37,2 ± 6,1	15,1 ± 4,5	<b>0,1 ± 0,05</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

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

### 3.1.2. Исследование фотофизических свойств производных синтетических порфиринов

Одним из наиболее важных показателей эффективности ФС является квантовый выход синглетного кислорода. В связи с этим были исследованы фотофизические свойства производных синтетических порфиринов. Исследования показали, что у металлопорфиринов, содержащих в качестве центрального атома Co или Ag, не было обнаружено флуоресценции. Для остальных металл не содержащих производных порфиринов и их цинковых комплексов характерно наличие заметной флуоресценции.

### 3.1.3. Определение квантовых выходов синглетного кислорода производных синтетических порфиринов

Исследование производных синтетических порфиринов показало, что все они обладают достаточно высокими значениями квантовых выходов синглетного кислорода ( $\gamma_{\Delta}$ ) (табл. 3). Значения  $\gamma_{\Delta}$  цинковых комплексов выше, чем у их металл не содержащих аналогов. Это объясняется увеличением эффективности интеркомбинационной конверсии при включении атома металла в макроцикл порфирина.

**Таблица 3**

**Квантовые выходы синглетного кислорода производных синтетических порфиринов**

Соединение	H <sub>2</sub> TM4PyP	H <sub>2</sub> TOE3PyP	H <sub>2</sub> TBut3PyP	H <sub>2</sub> TOE4PyP	H <sub>2</sub> TBut4PyP	H <sub>2</sub> TAl14PyP	ZnTOE4PyP	ZnTBut4PyP	ZnTAl14PyP
$\gamma_{\Delta}$	<b>0,77</b>	<b>0,78</b>	<b>0,78</b>	<b>0,77</b>	<b>0,79</b>	<b>0,75</b>	<b>0,85</b>	<b>0,97</b>	<b>0,86</b>

Примечание:  $p < 0,01$ ;  $n = 5$ .

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

Результаты исследования фотоинактивации клеток *E. coli* K-12 катионными производными синтетических порфиринов в зависимости от их концентрации (0,1-10 мкг/мл) приведены в табл. 4. Как видно из представленных данных, МБК исследованных производных синтетических порфиринов варьирует 2-10 мкг/мл. Наиболее эффективными являются металлопорфирины Zn-TAll4PyP и Zn-TBut4PyP, которые при концентрации 2 мкг/мл и облучении в течение 30 мин приводят к 100% гибели клеток *E. coli* K-12.

Таблица 4

#### Выживаемость (%) клеток *E. coli* K-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	<b>0,2 ± 0,1</b>
Tall4PyP	82,4 ± 6,5	38,1 ± 7,2	9,4 ± 5,5	<b>0,3 ± 0,05</b>	<b>0</b>
TBut4PyP	82,1 ± 5,9	35,2 ± 5,6	7,1 ± 4,7	<b>0,2 ± 0,18</b>	<b>0</b>
Zn-ТОЕ4PyP	79,8 ± 7,2	32,4 ± 6,8	3,2 ± 2,6	<b>0</b>	<b>0</b>
Zn-Tall4PyP	45,7 ± 5,9	13,2 ± 7,9	<b>0,1 ± 0,01</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Zn-TBut4PyP	41,3 ± 6,4	10,3 ± 4,5	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Примечания: начальный титр клеток –  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл; облучение в течение 30 мин мощностью излучения 30 мВт/см<sup>2</sup>; контроль – без добавления ФС; p<0,05; n=5.

Данные, представленные в табл. 5, 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-TAll4PyP, 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<sub>6</sub> и нейтральный Al-фталочианин.

Таблица 5

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

ФС	МБК, мкг/мл
хлорин e <sub>6</sub>	>10 000
Al-фталочианин	>10 000
ТОЕ4PyP	10,3 ± 0,25
TBut4PyP	5,1 ± 0,40
TAll4PyP	5,3 ± 0,20
Zn-ТОЕ4PyP	5,0 ± 0,25
Zn-TBut4PyP	2,0 ± 0,15
Zn-TAll4PyP	2,1 ± 0,26

Примечания: начальный титр клеток –  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл; облучение в течение 30 мин мощностью излучения 30 мВт/см<sup>2</sup>; контроль – без добавления ФС; p<0,05; n=5.

Нами установлено, что высокая антибактериальная активность исследуемых катионных производных синтетических порфиринов зависит от четырех факторов: присутствия в порфириновом макроцикле положительного заряда (+4), центрального

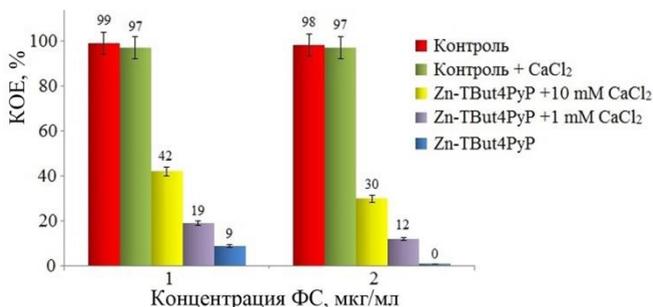
атома металла ( $Zn^{2+}$ ) и гидрофобных периферических функциональных групп, а также высоких значений квантовых выходов синглетного кислорода.

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 способствует электростатическому связыванию катионных ФС с наружной мембраной бактерии, вызывая начальное ограниченное повреждение и проникновение в клетку, а 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

Исследование влияния ионов  $Ca^{2+}$  на фотодинамическую активность Zn-TBut4PyP при инаktivации клеток *E. coli* K-12 показало, что добавление  $CaCl_2$  вызывает уменьшение фотодинамического эффекта (рис. 1). 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, 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 фотоинаktivация бактерий, особенно грамотрицательных, в первую очередь определяется эффективностью связывания молекул ФС с клетками-мишенями.



**Рис. 1.** Влияние  $CaCl_2$  на выживаемость клеток *E. coli* K-12. Начальный титр клеток –  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл. Облучение в течение 30 мин мощностью излучения 30 мВт/см<sup>2</sup>. Контроль – без добавления Zn-TBut4PyP.  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ .

Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что движущей силой фотоинаktivации является наличие положительно заряженных групп в молекуле ФС, которые вступают в электростатическое взаимодействие с отрицательными группами на поверхности клеточной стенки [Glukhov et al., 2005]. В результате этого на начальных стадиях фотопроцесса увеличивается проницаемость наружной мембраны и ускоряется приток молекул ФС внутрь клетки [Malik et al., 1992]. Окончательное связывание ФС с клетками регулируется гидрофобностью функциональных групп, которая способствует сильной ассоциации с цитоплазматической мембраной [Wainwright, 1998].

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

Изучение ФДИ с Zn-TBut4PyP по отношению к различным грамположительным (*S. aureus*, *S. epidermidis*) и грамотрицательным (*E. coli* K-12, *S. typhimurium* Г-38) бактериям показало, что этот порфирин эффективно фотоинактивирует вышеуказанные микроорганизмы при очень низких концентрациях (0,7-2,0 мкг/мл) (рис. 2). Порог инактивации для грамположительных бактерий оказался в 2-3 раза ниже, чем для грамотрицательных бактерий.

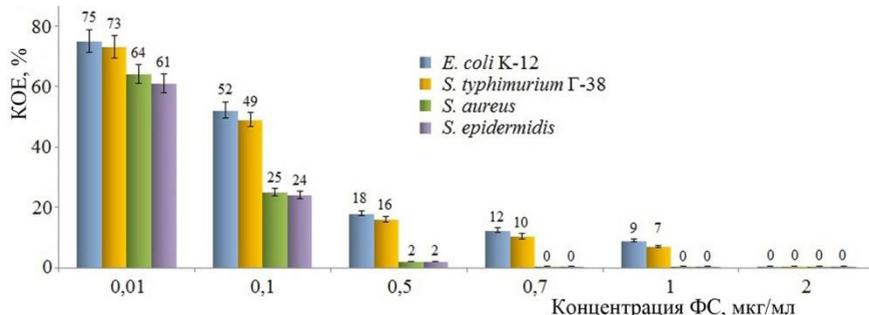


Рис. 2. Выживаемость клеток грамотрицательных и грамположительных бактерий после фотоинактивации с Zn-TBut4PyP. Начальный титр клеток –  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл. Облучение в течение 30 мин мощностью излучения 30 мВт/см<sup>2</sup>. Контроль – суспензия клеток без добавления Zn-TBut4PyP.  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ .

Таким образом, Zn-TBut4PyP является перспективным ФС для применения в борьбе против изученных как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий.

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

Полученные данные относительно сравнительной фотоинактивации штаммов MRSA и метициллин чувствительной *S. aureus* показали, что Zn-TBut4PyP одинаково эффективен по отношению к обоим штаммам (рис. 3). ФДИ с Zn-TBut4PyP при концентрации 0,7 мкг/мл приводит к 100% гибели клеток.

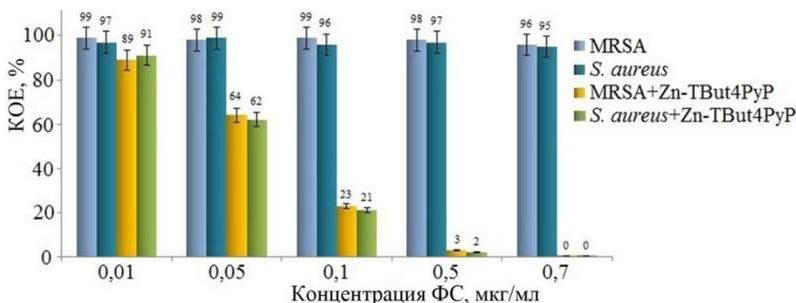


Рис. 3. Выживаемость клеток *S. aureus* и MRSA после фотоинактивации с Zn-TBut4PyP. Начальный титр клеток –  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл. Облучение в течение 30 мин мощностью излучения 30 мВт/см<sup>2</sup>. Контроль – суспензия клеток без добавления Zn-TBut4PyP.  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ .

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

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. Как видно из представленных данных в табл. 6, удлинение времени светового воздействия от 30 до 60 мин приводит к сокращению выживших клеток *E. coli* K-12 еще на 9-21%.

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.

Таблица 6

#### Выживаемость (%) клеток *E. coli* K-12 после фотинактивации синтетическими катионными производными 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
ТАИ14PyP	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-ТАИ14PyP	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

Примечания: начальный титр клеток –  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл; концентрация порфиринов 1 мкг/мл; облучение мощностью излучения 30 мВт/см<sup>2</sup>; контроль – без добавления ФС;  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ .

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

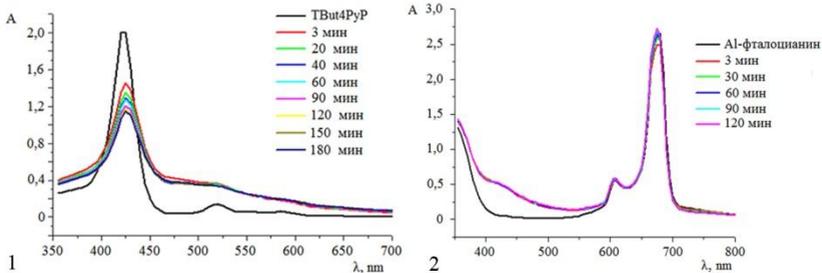
В условиях *in vivo* эффективность ФДИ микроорганизмов снижается по сравнению с условиями *in vitro* под влиянием таких факторов, как агрегация и связывание ФС с белками плазмы крови. Такие системы доставки как наночастицы позволяют снизить вероятность агрегации и увеличить локальную концентрацию ФС в непосредственной близости от клеточной стенки бактерий [Gil-Tomas et al., 2007; Koo et al., 2007; Kuo et al., 2009; Perni et al., 2009; Tuchina et al., 2011].

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

#### 3.2.1. Комплексообразование порфиринов с наночастицами серебра

Динамику сорбции на наночастицах серебра диаметром 20 нм изучали на примере катионного TBut4PyP и нейтрального ФС Al-фталоцианина (рис. 4). После добавления наночастиц в раствор TBut4PyP происходит резкое падение интенсивности спектра поглощения и некоторый сдвиг пика поглощения в область более длинных волн, что можно объяснить появлением в растворе нанокомпозита серебро-TBut4PyP. Стабильное состояние интенсивности поглощения (около  $A=1,10$ ) спектра порфирина наблюдалось через 12 и 24 ч, что свидетельствует об отсутствии десорбции порфирина. Процент сорбции TBut4PyP на наночастицах коллоидного серебра составляет  $60,7 \pm 3,6\%$ .

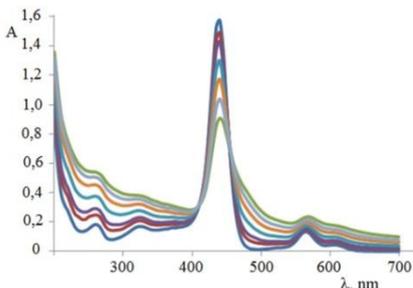
Сорбция Al-фталоцианина на наночастицах коллоидного серебра незначительна.



**Рис. 4.** Спектры поглощения растворов **TBut4PyP (1)** и **Al-фталоцианина (2)** после добавления наночастиц серебра. Исходная концентрация **TBut4PyP** и **Al-фталоцианина**  $10^{-5}$ М.  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ .

### 3.2.2. Комплексообразование порфиринов с наночастицами цеолита

Наличие двух изобестических точек при длине волны  $\approx 415$  нм и  $\approx 460$  нм при последовательном добавлении наночастиц цеолита в раствор **Zn-TBut4PyP** свидетельствует об образовании в растворе наноконкомпозита цеолит-**Zn-TBut4PyP** (рис. 5). Процент сорбции на наночастицах для **TBut4PyP** составляет 98,3%. Стабильное состояние интенсивности поглощения спектров металлопорфирина наблюдалось через 12 и 24 ч, что свидетельствует о том, что десорбции порфирина не происходит.



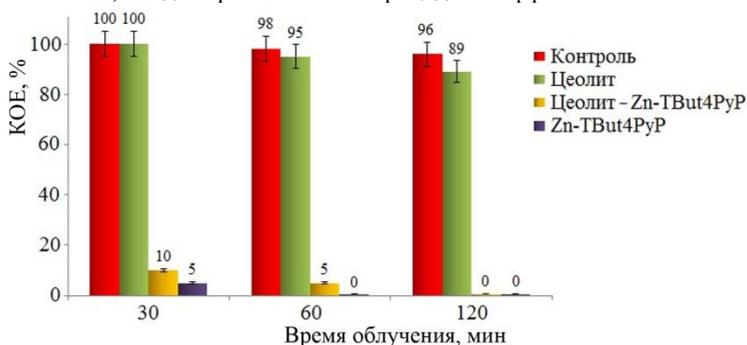
**Рис. 5.** Спектр поглощения раствора порфирина **Zn-TBut4PyP** после добавления различных концентраций наночастиц цеолита. Концентрация порфирина  $10^{-5}$ М (темно-синим цветом представлен раствор порфирина без наночастиц). К раствору порфирина добавляли 0,1-0,6 мл раствора цеолита с интервалом 0,1 мл с исходной концентрацией наночастиц цеолита 0,66 мг/мл.  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ .

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

Фотодинамическая активность наноконкомпозита (цеолит-**Zn-TBut4PyP**) нами была исследована по отношению к *S. aureus*. Фотодинамическую активность наноконкомпозита сравнивали с фотодинамической активностью наноцеолита и свободного порфирина **Zn-TBut4PyP** (рис. 6). Облучение образцов проводили в течение 30, 60 и 120 мин.

Исследования фототоксичности наноконкомпозита цеолит-**Zn-TBut4PyP** при инактивации *S. aureus* показали, что он по сравнению со свободным **Zn-TBut4PyP** обладает пролонгированным действием, что может быть связано с медленным высвобождением порфирина из наноконкомпозита, или при длительном облучении

генерация синглетного кислорода порфирином Zn-TBut4PyP вполне достаточна для 100% гибели клеток, т.е. для проявления бактерицидного эффекта.



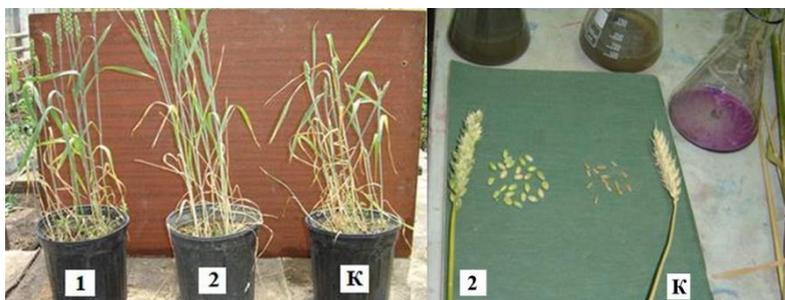
**Рис. 6. Выживаемость клеток *S. aureus* после ФДИ цеолитом, цеолит-Zn-TBut4PyP нанокомпозитом и Zn-TBut4PyP.** Начальный титр клеток –  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл. Облучение мощностью излучения 30 мВт/см<sup>2</sup>. Концентрация цеолита – 0,66 мг/мл, нанокомпозита цеолит-Zn-TBut4PyP – 0,23 мг/мл, Zn-TBut4PyP – 10 мкг/мл. Контроль – суспензия клеток без добавления Zn-TBut4PyP, цеолита или нанокомпозита цеолит-Zn-TBut4PyP.  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ .

### 3.3. Изучение действия производных синтетических порфиринов против грибковых заболеваний растений

Фитопатогенные грибы, вызывающие корневые гнили у сельскохозяйственных растений, приводят к значительным потерям урожая. В связи с этим производные синтетических порфиринов были апробированы в качестве поражающих агентов, поскольку они обладают высокой антимикробной активностью.

#### 3.3.1. Исследование эффективности синтетических металлопорфиринов в теплице

Результаты предварительного замачивания растворами синтетических металлопорфиринов семян озимой пшеницы «Безостая-1», выращенной в тепличных условиях в вазах с землей, зараженной возбудителями корневой гнили, представлены на рис. 7.



**Рис. 7. Изучение эффективности действия синтетических металлопорфиринов на рост, размер колоса и число зерен озимой пшеницы «Безостая-1», выращенной в теплице.** Растения, выращенные в вазах с землей, зараженной возбудителями корневой гнили: 1 – семена, обработанные металлопорфирином Ag-TOE4PyP; 2 – семена, обработанные металлопорфирином Zn-TOE4PyP; К – контрольный вазон, где семена не обработаны металлопорфирином.

После обработки растворами синтетических металлопорфиринов наблюдается значительное опережение как в росте, так и размере колоса и зерен растений по сравнению с контролем (семена, не обработанные порфирином). Эксперименты показали, что наилучшие показатели «прорастания» и «высоты растений» наблюдаются при предварительном замачивании семян металлопорфирином Zn-ТОЕ4РyP в течение 30 мин при концентрациях 0,75-1 г/л. Увеличение концентрации металлопорфирина (1,5-3 г/л) подавляло рост растений.

### 3.3.2. Исследование эффективности синтетических металлопорфиринов в полевых условиях

У образцов озимой пшеницы «Безостая-1», выращенных на «зараженном» поле из предварительно обработанных синтетическими металлопорфиринами Zn-ТОЕ4РyP и Zn-TBut3PуP семян, наблюдается значительное усиление корневой системы, увеличение длины стебля, размера колоса и зерен (образцы 3 и 4, соответственно) по сравнению с необработанными образцами пшеницы со «здоровых» или «зараженных» полей (1 и 2 соответственно) (рис. 8).

В результате исследования действия синтетических металлопорфиринов на грибы, вызывающие корневую гниль у пшеницы, выявлено, что при предварительном замачивании семян раствором металлопорфиринов Zn-ТОЕ4РyP, Ag-ТОЕ4РyP, Zn-TBut3PуP с концентрацией 1 мг/мл в течение 30 мин приводит к повышению урожайности пшеницы на 18-20% и увеличению синтеза белка в зернах на 15-17%.



**Рис. 8.** Действие синтетических металлопорфиринов Zn-ТОЕ4РyP и Zn-TBut3PуP 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-ТОЕ4РyP; 4 – образцы растений с «зараженных» полей (семена, обработанные порфирином Zn-TBut3PуP).

## ВЫВОДЫ

1. Производные синтетических порфиринов обладают более высокой 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 работ, опубликованных по теме диссертации

1. Gyulkhanyan G.V., Ghazaryan R.K., Hovsepian A.S., **Paronyan M.H.**, Ghambaryan S.S., Tovmasyan A.G., Gyulkhanyan A.G. Antimicrobial activity of water-soluble cationic porphyrins // European Conferences on Biomedical Optics, Munich, Germany, Technical Abstract Summaries, 17-21 June, 2007, p. 71.
2. Gyulkhanyan A.G., **Paronyan M.H.**, Hovsepian A.S., Ghazaryan R.K., Tovmasyan A.G., Gyulkhanyan G.V. Study of porphyrins activity against Gram (-) microorganisms // International Conference: "State-of the-Art of Biotechnology in Armenia & ISTC Contribution", Tsakhkadzor, Armenia, Book of Abstracts, September 28 - October 02, 2008, p. 159.
3. Gyulkhanyan G.V., **Paronyan M.H.**, Hovsepian A.S., Ghazaryan R.K., Tovmasyan A.G., Gyulkhanyan Ar.G., Gyulkhanyan An.G., Amelyan G.V. Photodynamic inactivation of Gram (-) and Gram (+) microorganisms by cationic porphyrins and metalloporphyrins // PDT: Back to the Future, edited by D.H. Kessel, Proc. of SPIE, 2009, Vol. 7380, p. 73803I-1–73803I-7.
4. Gyulkhanyan G.V., **Paronyan M.H.**, Hovsepian A.S., Ghazaryan R.K., Tovmasyan A.G., Gyulkhanyan Ar.G., Gyulkhanyan An.G., Amelyan G.V. Photodynamic inactivation of gram (-) microorganisms using of new cationic porphyrins // International Photodynamic Association World Congress, Seattle, WA United States, Proc. of SPIE, 11-15 June, 2009, Vol. 7380, Paper 7380–124.
5. Ուլիխանյան Դ.Բ., **Պարոնյան Մ.Հ.**, Գյուլխանյան Գ.Վ., Ղազարյան Ռ.Շ., Սահակյան Լ.Ա. Միկրոօրգանիզմների ապաստիվացումը նոր կատիոնային պորֆիրիններով // «Բժշկություն, գիտություն և կրթություն» գիտատեղեկատվական հանդես, ԵՊԲՀ, 2011, № 10, էջ 42–46.

6. Ուլիխանյան Ղ., Սահակյան Լ., Ղազարյան Ռ., **Պարոնյան Մ.**, Գյուլխանդանյան Գ. Բնական և սինթետիկ ծագման նոր պորֆիրինների կողմից մանրէների ֆոտոդինամիկ և մթնային ապաակտիվացումը // Հայաստանի 3-րդ միջազգային բժշկական համագումար «Միասին՝ հանուն առողջության», Երևան, Հունիսի 7-9, 2011, էջ 369–370.
7. Ulikhanyan Gh.I., Gyulkhandanyan G.V., **Paronyan M.H.**, Ghazaryan R.K., Sahakyan L.A. Antimicrobial activity of new cationic porphyrins of synthetic and natural origin // 2<sup>nd</sup> International Conference on Organic Chemistry: “Advances in Heterocyclic Chemistry”, Tbilisi, Georgia. Book of abstracts, September 25-27, 2011, p. 199–200.
8. Gyulkhandanyan G.V., Ghazaryan R.K., **Paronyan M.H.**, Ulikhanyan Gh.I., Gyulkhandanyan A.G., Sahakyan L.A. Antimicrobial activity of new porphyrins of synthetic and natural origin // Mechanisms for Low-Light Therapy VII. Proc. of SPIE, 2012, Vol. 8211, p. 821107-1–821107-9.
9. **Paronyan M.H.**, Hovsepyan A.S., Ghazaryan R.K., Gyulkhandanyan A.G., Gyulkhandanyan G.V. Antibacterial activity of cationic porphyrins *in vitro* and *in vivo*. Scientific seminar: “Modern state of biotechnological developments and ways of commercialization”, Yerevan, Armenia. Book of abstracts, 11-12 September, 2012, p. 85.
10. Gyulkhandanyan A.G., Ghazaryan R.K., Gasparyan V.K., Sargsyan H.O., Madoyan R.A., Gyulkhandanyan A.G., **Paronyan M.H.**, Stasheuski A.S., Knyukshto V.N., Dzhagarov B.M., Gyulkhandanyan G.V. Complexation of porphyrins with silver and zeolite nanoparticles // Nanotechnology VI, edited by R. Adelung, Proc. of SPIE, 2013, Vol. 8766, p. 87660H-1–87660H-8.
11. 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 // Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics XI. Proc. of SPIE, 2014, Vol. 8942, p. 894212-1–894212-9.
12. Gyulkhandanyan A.G., Tuchina E.S., Ghazaryan R.K., **Paronyan M.H.**, Zakoyan A.A., Tuchin V.V., Gyulkhandanyan G.V. New cationic metalloporphyrins for inactivation of antibiotic resistant microorganisms // EMBO Conference Series: Chemical Biology 2014, EMBL Advanced Training Centre, Heidelberg, Germany, Book of abstracts, 20-23 August, 2014, p. 155.
13. Gyulkhandanyan A.G., Tuchina E.S., Ghazaryan R.K., **Paronyan M.H.**, Dzhagarov B.M., Gyulkhandanyan G.V., Tuchin V.V. Photophysical properties of porphyrins as a selection criterion of porphyrins for study of their effectiveness against microorganisms // FEBS Journal, 2014, Vol. 281, (Suppl. 1), p. 665.
14. Gyulkhandanyan A.G., Tuchina E.S., Ghazaryan R.K., **Paronyan M.H.**, Dzhagarov B.M., Gyulkhandanyan G.V., Tuchin V.V. Quantum yield of singlet oxygen generation by porphyrins and their efficacy against microorganisms // International Scientific Workshop “Trends in Microbiology and Microbial Biotechnology”, Yerevan, Armenia, 5-8 October, 2014, p. 56.
15. **Paronyan M.H.**, Gyulkhandanyan G.V., Ghazaryan R.K. Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* // International Scientific Workshop “Trends in Microbiology and Microbial Biotechnology”, Yerevan, Armenia, 5-8 October, 2014, p. 80.
16. **Paronyan M.H.** Photoinactivation of gram-positive and gram-negative microorganisms by cationic porphyrins // Biolog. Journal of Armenia, 2014, Vol. 3(66), p. 54-57.
17. **Paronyan M.H.** Photodynamic inactivation of antibiotic-resistant pathogens // Biolog. Journal of Armenia, 2015, Vol. 3(67), p. 107-109.



## Պարոնյան Մարինա Հավելտի

ՊՈՐՖԻՐԻՆՆԵՐԻ ՆՈՐ ԱՍՏԱՆՅՑԱԼՆԵՐԻ ՀԱԿԱՄԱՆՐԷԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

### ԱՍՓՈՓԱԳԻՐ

*Հանգուցային բառեր՝ ֆոտոսենսիբիլիզատորներ, պորֆիրինի ածանցյալներ, ֆոտոդինամիկ ինակտիվացում, հակաբակտերիալ ակտիվություն, սինզլետային թթվածին, նանոմասնիկներ, նանոկոմպոզիտներ, ֆիտոպայթոզեն սնկեր:*

Ատենախոսական աշխատանքը նվիրված է բնական և սինթետիկ պորֆիրինների նոր ածանցյալների համեմատական ուսումնասիրությանը Գրամ դրական և Գրամ բացասական բակտերիաների և գյուղատնտեսական մշակաբույսերի մոտ արմատի փտում առաջացնող սնկերի վրա, ինչպես նաև արծաթի ու ցեռլիտի նանոմասնիկների հետ այդ պորֆիրինների կոմպլեքսի առաջացմանը և միկրոօրգանիզմների վրա դրանց ազդեցության ուսումնասիրությանը:

Մթնային պայմաններում *E. coli* K-12 շտամի վրա ունեցած ազդեցության հիման վրա 6 բնական և 11 սինթեզված պորֆիրինների ածանցյալներից ընտրվել են առավել բարձր հակաբակտերիալ ակտիվություն ցուցաբերածները: Հետազոտվել է տարբեր ֆունկցիոնալ խմբերի և կենտրոնական մետաղի ատոմի դերը պորֆիրինների ածանցյալների հակաբակտերիալ ակտիվության վրա: Յույց է տրվել, որ մթնային պայմաններում կենտրոնական մետաղի ատոմի՝ հատկապես արծաթի առկայությունը բնական և սինթետիկ պորֆիրինների ածանցյալների մոլեկուլում բարձրացնում է դրանց հակաբակտերիալ ակտիվությունը:

*E. coli* K-12 վրա սինթետիկ պորֆիրինների ածանցյալների արդյունավետությունը բնական պորֆիրինների համեմատ 70 անգամ բարձր է: Տարբեր ֆունկցիոնալ խմբերով սինթետիկ պորֆիրինների արծաթե կոմպլեքսների ազդեցության ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ բուլթիլ- և ալլիլ- հիդրոֆոր խմբերի առկայությունը OH-հիդրոքսիլ ծայր ունեցող օքսիէթիլ-խմբի համեմատությամբ 5 անգամ բարձրացնում է պորֆիրինների հակաբակտերիալ ակտիվության արդյունավետությունը:

Հետազոտվող պորֆիրինների ածանցյալների մոտ ուսումնասիրվել են ֆլուորեսցենտային հատկությունները, որի հիման վրա որոշվել է սինզլետային թթվածնի քվանտային ելքը և ընտրվել են հեռանկարային տարբերակները: Բացահայտել է, որ Co կամ Ag կենտրոնական ատոմ պարունակող մետաղապորֆիրինները չունեն սեփական ֆլուորեսցենցիա՝ հետևաբար չեն կարող դրսևորել ֆոտոդինամիկ ակտիվություն: Ընտրված 6 սինթետիկ պորֆիրինների ածանցյալները՝ հատկապես Zn-մետաղապորֆիրինները օժտված են սինզլետային թթվածնի բարձր քվանտային ելքով և դրան համապատասխան բարձր ֆոտոդինամիկ ակտիվությամբ Գրամ բացասական և Գրամ դրական բակտերիաների նկատմամբ: Գրամ դրական բակտերիաների ինակտիվացման շեմը 2-3 անգամ ցածր է Գրամ բացասական բակտերիաների համեմատությամբ: Յույց է տրվել, որ Zn-մետաղապորֆիրինները մետաղ չպարունակող անալոզների

համեմատությամբ ցուցաբերում են 2-2,5 անգամ բարձր արդյունավետություն: Հետազոտվող կատիոնային սինթետիկ պորֆիրինները ցուցաբերում են մոտ 1000 անգամ բարձր ֆոտոդինամիկ ակտիվություն, քան անիոնային քլորին  $e_6$ -ը և չեզոք Al-ֆտալոցիանինը:

Zn-TBut4PyP մետաղապորֆիրինի ֆոտոդինամիկ ակտիվության վրա  $Ca^{2+}$  իոնների ազդեցության հետազոտման արդյունքում բացահայտել է, որ բակտերիաների ֆոտոդինակտիվացումը (հատկապես *G*-րամ բացասական), կախված է բջիջ-թիրախի հետ ֆոտոսենսիբիլիզատորների ամրացման արդյունավետությունից: Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ ֆոտոդինամիկ ինակտիվացման ժամանակ պորֆիրինների ածանցյալների մոլեկուլում մետաղի և հիդրոֆոր խմբի առկայությունը նպաստում է բակտերիայի բջջապատի հետ ուժեղ ասոցիացիային և հետագա կլանմանը, իսկ գեներացված սինգլետային թթվածինը՝ բջիջների ոչնչացմանը:

*S. aureus*-ի մետիցիլինի նկատմամբ զգայուն և մետիցիլինի նկատմամբ կայուն շտամների համեմատական ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ երկուսն էլ, անկախ հակաբիոտիկի նկատմամբ ունեցած զգայնությունից, միանման արդյունավետությամբ են ֆոտոդինակտիվացիայի ենթարկվում կատիոնային սինթետիկ պորֆիրինների ածանցյալներով: Zn-TBut4PyP-ի 0,7 մկգ/մլ կոնցենտրացիայով 30 րոպե ճառագայթման պայմաններում ֆոտոդինակտիվացումը բերում է այդ շտամների բջիջների 100% ոչնչացմանը:

Ցույց է տրվել, որ երկարեցնելով ճառագայթման տևողությունը 30-ից մինչև 60 րոպե ֆոտոդինամիկ ինակտիվացման արդյունավետությունը ավելանում է ևս 9-21%:

Արդյունավետ նանոկոմպոզիտների ստեղծման նպատակով ուսումնասիրվել է սինթետիկ պորֆիրինների ածանցյալների սորբցիան արծաթի և ցեոլիտի նանոմասնիկների վրա: Ցույց է տրվել, որ արծաթի նանոմասնիկների վրա TBut4PyP սորբցիան կազմում է 61%, իսկ Zn-TBut4PyP-ի սորբցիան ցեոլիտի նանոմասնիկների վրա՝ 98%: Ցույց է տրվել, որ ցեոլիտ-Zn-TBut4PyP նանոկոմպոզիտը ազատ պորֆիրինի համեմատ օժտված է երկարատև ազդեցությամբ:

Ցորենի մոտ արմատի փտում առաջացնող սնկերի վրա մետաղապորֆիրինների ազդեցության ուսումնասիրության արդյունքում պարզվել է, որ Zn-TOE4PyP, Zn-TBut3PyP և Ag-TOE4PyP մետաղապորֆիրինների 1 մկգ/մլ լուծույթում 30 րոպե տևողությամբ սերմերի նախապես թրջումը բերում է բերքատվության 18-20% բարձրացմանը:

Այսպիսով, կատարված աշխատանքի արդյունքում ցույց է տրվել, որ նոր սինթետիկ կատիոնային պորֆիրինները հանդիսանում են կենսաբանական բարձր ակտիվությամբ օժտված միացություններ և հաջողությամբ կարող են կիրառվել բժշկության մեջ՝ ախտածին բակտերիաների դեմ պայքարում, ինչպես նաև գյուղատնտեսության մեջ՝ մշակաբույսերի սնկային հիվանդությունների դեմ պայքարում:

## INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PORPHYRIN NEW DERIVATIVES

### Summary

**Key words:** photosensitizers, porphyrin derivatives, photodynamic inactivation, antimicrobial activity, singlet oxygen, nanoparticles, nanocomposites, plant pathogenic fungi.

The thesis is devoted to a comparative study of the effect of new natural and synthetic porphyrin derivatives on Gram-positive and Gram-negative bacteria and plant pathogenic fungi that cause root rot in agricultural plants, as well as the study of the complexation of porphyrins with silver and zeolite nanoparticles and their effects on microorganisms.

From 6 natural and 11 synthetic porphyrin derivatives were selected the porphyrins with the highest antibacterial activity against Gram-negative bacterium *E. coli* K-12 under the dark conditions (*in vitro*). The effect of various peripheral functional groups and the central metal atom on the antibacterial activity of porphyrin derivatives was studied. It is shown that the presence of the central metal atom, particularly of Ag in the molecule of synthetic and natural porphyrin derivatives enhances their antibacterial activity. Synthetic porphyrins compared to natural ones show 70 times higher efficiency towards *E. coli* K-12.

Comparison of the efficacy of action of silver complexes of synthetic porphyrins with various peripheral functional groups shows that the presence of butyl- and allyl-hydrophobic groups leads to 5 times higher antibacterial activity than the oxyethyl-group, which contains a hydrophilic OH end.

The fluorescent properties of porphyrin derivatives were studied, the quantum yields of singlet oxygen identified, and based thereon promising options were chosen. Metalloporphyrins containing Co or Ag as a central metal atom do not have their own fluorescence, therefore they can not reveal photodynamic activity. The selected 6 synthetic porphyrin derivatives, especially zinc complexes, have high quantum yields of singlet oxygen and, accordingly, high photodynamic activity towards Gram-negative and Gram-positive bacteria. The threshold for inactivation of Gram-positive bacteria is 2-3 times lower than for Gram-negative bacteria. It is shown that zinc complexes compared to their metal free analogs exhibit 2-2.5 times higher efficiency. The investigated cationic synthetic porphyrins exhibit a 1000-fold greater photodynamic activity than the anionic chlorine<sub>6</sub> and neutral Al-phthalocyanine.

As a result of study of the effect of Ca<sup>2+</sup> ions on photodynamic activity of Zn-TBut4PyP it was revealed that photoinactivation of bacteria (particularly Gram-negative), is determined by the efficiency of binding molecules of PS to target-cells. These data lead to the conclusion that the presence of the metal atom and hydrophobic groups in the porphyrin derivatives molecule contributes to a strong association with the cell wall of the bacteria

causing a limited initial damage and penetration into the cell, and then the generated singlet oxygen kills cells.

Comparative study of methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-sensitive *S. aureus* strains showed that both strains with the same efficiency are photoinactivated by synthetic cationic porphyrin derivatives, regardless of the spectrum of sensitivity to antibiotics. Photoinactivation with Zn-TBut4PyP at a concentration of 0.7 µg/ml for 30 min results in a 100% destruction of the cells of these strains.

It is shown that the duration of light exposure from 30 to 60 min reduces the number of survived cells of *E. coli* K-12 for another 9-21%.

To create efficient nanocomposites, the sorption of porphyrin derivatives on silver or zeolites nanoparticles was studied. It is shown that the sorption percentage for the cationic porphyrin TBut4PyP on silver nanoparticles is 61%, and the sorption percentage for Zn-TBut4PyP on zeolite nanoparticles is 98%. It is shown that the nanocomposite Zeolite-Zn-TBut4PyP compared with free Zn-TBut4PyP has a prolonged effect.

As a result of study of the effect of porphyrins on fungi that cause root rot of wheat, it is revealed that preliminary soaking of seeds by Zn-TOE4PyP, Ag-TOE4PyP, Zn-TBut3PyP metalloporphyrins solution at 1 mg/ml for 30 min leads to an increase in wheat yield by 18-20% and an increase in protein synthesis in the grains by 14.5-17.3%.

Thus, as a result of the performed work it is shown that novel synthetic cationic porphyrins are compounds of high biological activity and can be effectively applied against pathogenic bacteria in medicine and fungal diseases in agriculture.