

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ НАН АРМЕНИИ им. Г.Х. БУНЯТЯНА**

ГЮЛЬХАНДАНЯН АННА ГРИГОРЬЕВНА

**ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОРФИРИНОВ
И ИХ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ**

ДИ С С Е Р Т А Ц И Я

**на соискание учёной степени кандидата
биологических наук по специальности
03.00.04 – «БИОХИМИЯ»**

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

ЕРЕВАН-2016

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	11
1.1. Порфирины	12
1.1.1. Фотосенсибилизаторы.....	13
1.1.2. Фотосенсибилизаторы первого, второго и третьего поколений	14
1.1.3. Катионные порфирины	19
1.1.4. Порфирины как потенциальные сенсоры	21
1.2. Фотодинамическая терапия опухолей (ФДТ)	23
1.2.1. Краткая история ФДТ	23
1.2.2. Механизм фотодинамического эффекта	24
1.3 Фотообесцвечивание	33
1.4 Фотофизические свойства порфиринов	34
1.4.1. Квантовый выход генерации синглетного кислорода	35
1.4.2. Методы регистрации синглетного кислорода	37
1.5. Инактивация микроорганизмов фотодинамическим действием	38
1.6. Наночастицы	41
1.6.1. Твердые наночастицы	42
1.6.2. Мягкие наночастицы	44
1.6.3. Гидрогели и бионеразлагаемые наночастицы	46
1.6.4. Наночастицы серебра	49
1.6.5. Наночастицы цеолита	51
Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	53
Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	61
3.1. Фотофизические свойства катионных (металло)порфиринов	61

3.1.1. Фотообесцвечивание катионных (металло)порфиринов	62
3.1.2. Квантовый выход генерации синглетного кислорода (металло)порфиринов	65
3.2. Фотодинамическая инаktivация микроорганизмов катионными (металло)порфиринами <i>in vitro</i>	70
3.3. Фотодинамическое поражение раковых клеток катионными (металло)порфиринами <i>in vitro</i>	79
3.4. Образование комплексов катионных (металло)порфиринов с наночастицами.....	85
3.4.1. Наноконпозиты катионных (металло)порфиринов с наночастицами цеолита ...	85
3.4.2. Наноконпозиты катионных (металло)порфиринов с наночастицами серебра ...	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
ВЫВОДЫ.....	115
ЛИТЕРАТУРА	116

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФС	-	фотосенсибилизаторы
ФДТ	-	фотодинамическая терапия
ФДИ	-	фотодинамическая инаktivация
HpD	-	производное гематопорфирина
<i>m</i> -THPP	-	<i>meta</i> -tetra(hydroxyphenyl) porphyrin
TPPS4	-	5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)-21H,23H-porphyrin
<i>m</i> -THPC	-	5,10,15,20-tetrakis(<i>m</i> -hydroxyphenyl) chlorin
H ₂ TMe4PyP	-	5,10,15,20-тетракис(4-N-метилпиридил) порфирин
TMPP	-	5,10,15,20-тетракис (4-метоксифенил) порфирин
AlPcS4	-	тетрасульфонируемый алюминий фталоцианин
Фотосенс	-	алюминий фталоцианин (Al- phthalocyanine)
Pc4	-	silicon phthalocyanine 4
¹ O ₂	-	синглетный кислород (СК)
³ O ₂	-	триплетный кислород
АФК	-	активные формы кислорода
-R	-	периферические функциональные группы
Грам (+)	-	грамположительные микроорганизмы
Грам (-)	-	грамотрицательные микроорганизмы
ФДП	-	фотодинамическое повреждение
S ₀	-	основное состояние фотосенсибилизатора
S ₁	-	синглетное состояние фотосенсибилизатора
ARSA	-	антибиотик-устойчивый штамм <i>Staphylococcus aureus</i>
TEM	-	трансмиссионная электронная микроскопия
AFM	-	атомно-силовая микроскопия
PLGA	-	поли (молочная-ко-гликолевая кислота)
PVP	-	поливинилпирролидон
ПВС	-	поли (виниловый спирт)
AgNP	-	наночастицы серебра
γ _Δ	-	квантовый выход образования синглетного кислорода

KOE	-	колониобразующие единицы
PBS	-	фосфатный буфер
HeLa	-	клетки эпителия рака шейки матки
K-562	-	лимфобласты хронической миелоидной лейкемии
IC ₅₀	-	дозы, вызывающие 50%-ное ингибирование
IC ₁₀₀	-	дозы , вызывающие 100%-ное ингибирование
TOEt4PyP	-	мезо-тетра-[N-оксиэтил-4-пиридил] порфирин
TOEt3PyP	-	мезо-тетра-[N-оксиэтил-3-пиридил] порфирин
TBut3PyP	-	мезо-тетра-[N-бутил-3-пиридил] порфирин
TBut4PyP	-	мезо-тетра-[N-бутил-4-пиридил] порфирин
TAll4PyP	-	мезо-тетра-[N-аллил-4-пиридил] порфирин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Фотопроцессы, лежащие в основе жизнедеятельности организмов, опираются на взаимодействия молекул. Одной из важнейших молекул для клеточной жизнедеятельности являются порфирины, представляющие собой светочувствительные красители обладающие фотосенсибилизирующей активностью. Порфирины играют исключительную роль в природе, с их помощью осуществляются важнейшие биологические, биохимические, фотохимические и ферментативные процессы в живых организмах, такие как фотосинтез, перенос кислорода, транспорт электронов и др. К типичным представителям порфиринов относятся хлорофилл и гемин крови. Хлорофилл, как известно, осуществляет начальную стадию фотосинтеза. Порфирины входят в состав таких известных белков, как гемоглобин, миоглобин и многочисленной группы цитохромов, ферментов каталаза, пероксидаза и др.

Возможность модификации макроцикла молекулы порфирина путем введения в ее структуру различных периферических заместителей позволяет исследовать взаимосвязь между строением и свойствами этих веществ. Среди широкого спектра порфиринов мезо-замещенные синтетические катионные порфирины и металлопорфирины [(металло)порфирины] занимают особое место в связи с тем, что изменением структуры можно добиться их включения в структуру опасной для организма клетки и под действием света способствовать ее разрушению (микроорганизмы, раковые клетки, и др.). Поэтому интерес к изучению синтетических порфиринов, несмотря на долгие годы исследований не стихает, а только усиливается. В последние годы активно развиваются такие области применения порфиринов, как диагностика и лечение злокачественных новообразований, анемии, нейропсихических нарушений, кожных, глазных и многих других болезней [52]. Эффективность и специфичность действия порфиринов зависит от многих факторов, в первую очередь от структуры порфирина, pH среды, присутствия липопротеинов, молекул кислорода и др. [114]. В биоактивности порфиринов важную роль играет свет. Изучение их фотофизических свойств (фотообесцвечивание и генерация синглетного кислорода как основного фактора поражения живых структур) имеет первостепенное значение для оценки эффективности порфиринов.

Во всем мире специфической проблемой является увеличение числа патогенных микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, и разработка новых альтернативных антибактериальных технологий может иметь решающее значение в борьбе с ними [47, 73, 118]. В этой связи исследование фотофизических свойств новых катионных (металло)порфиринов, соответствия этих свойств медико-биологической активности порфиринов и их эффективному поражающему действию на опасные для организма клетки, представляет собой актуальную задачу современной медико-биологической науки.

Порфирины синтезируются, выделяются из природных источников, исследуются в десятках лабораториях и фирмах мира, ежегодно им посвящаются десятки симпозиумов и конференций, труды ученых по порфиринам печатаются в многочисленных специализированных научных журналах. Актуальность и важность изучения фотофизических и медико-биологических свойств будет продолжать оставаться на многие годы в связи с широкими возможностями практического применения порфиринов в медицине, микробиологии и сельском хозяйстве.

Целью диссертационной работы является исследование фотофизических свойств (фотообесцвечивания, квантового выхода генерации синглетного кислорода) новых синтетических катионных (металло)порфиринов и сравнительное изучение действия этих фотосенсибилизаторов (ФС) на инактивацию микроорганизмов и культуру раковых клеток, а также изучение комплексообразования этих соединений с наночастицами серебра и цеолита для применения в медицине и микробиологии.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- Исследовать фотофизические свойства новых катионных порфиринов и металлопорфиринов:
 1. Оценить фотообесцвечивание катионных (металло)порфиринов
 2. Определить квантовый выход генерации синглетного кислорода катионных (металло)порфиринов
- Изучить фотодинамическую инактивацию микроорганизмов катионными (металло)порфиринами *in vitro*
- Исследовать цитотоксическое и фототоксическое действие катионных (металло)порфиринов на монослойные и суспензионные линии раковых клеток

- Изучить комплексообразование катионных (металло)порфиринов с наночастицами:
 1. Исследовать образование нанокompозитов наночастицами цеолита с катионными (металло)порфиринами
 2. Исследовать образование нанокompозитов наночастицами серебра с катионными (металло)порфиринами

Научная новизна.

- Впервые определено, что новые катионные порфирины и особенно Zn-производные металлопорфиринов обладают значительно более высоким квантовым выходом генерации синглетного кислорода, чем известный порфирин TMe4PyP.
- Среди новых катионных (металло)порфиринов выявлены наиболее эффективные соединения, обладающие высокой способностью инактивации микроорганизмов и уничтожения раковых клеток *in vitro* без применения каких-либо дополнительных агентов усиления их действия.
- Впервые показано, что фотофизические свойства новых (металло)порфиринов находятся в полном соответствии с их биологической активностью: наиболее эффективно поражают микроорганизмы те Zn-производные порфиринов у которых наиболее высокие значения квантового выхода генерации синглетного кислорода.

В результате исследований получен ряд положений, вытекающих из выводов и определяющих **практическую ценность работы.**

- Новые катионные (металло)порфирины в виде растворов можно применять для распыления на территориях в борьбе против опасных или особо опасных микроорганизмов, а также в медицине в виде мазей и растворов против грибковых заболеваний и антибиотикоустойчивых микроорганизмов в стоматологии и дерматологии, для лечения инфекций и язв, обработки медицинских инструментов и т.д.
- Новые катионные (металло)порфирины можно рекомендовать для дальнейших экспериментов *in vivo* для применения в фотодинамической терапии опухолей.

Личный вклад автора. Авторский вклад состоит в выполнении экспериментальных исследований, в обработке полученных результатов, анализе и обобщении полученных данных, формулировке выводов, оформлении 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 научным сотрудником лаборатории молекулярной биологии НПЦ "Армбиотехнология" НАН РА М. Г. Паронян, с сотрудниками лаборатории фотоники молекул Института физики им. Б.И.Степанова НАН Беларуси (зав. лаб. проф. Б.М. Джагаров), с сотрудниками кафедры оптики и биофотоники физического факультета Саратовского государственного университета (зав. кафедрой проф. В. В. Тучин).

Связь работы с научными тематиками. Работа выполнена: в рамках 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.); в рамках гранта "Фотодинамическая и фототермическая инаktivация микроорганизмов нанокompозитами бимодального действия" (руководитель Анна Г. Гюльханданян) по "Программе поддержки исследований аспирантов в 2012 году" Государственного комитета по науке Министерства образования и науки Республики Армения (2013-2014 гг.); в рамках гранта Армения-Беларусь № 13РБ-055 "Новые нанокompозиты на основе наночастиц и порфиринов: изучение фотофизических и биоактивных свойств" (2014-2016 гг.).

Апробация работы. Результаты работы представлены: на совместном семинаре лаборатории фотоники молекул Института физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси и группы "Биоинженерии" Института биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА (2013 г.); на совместном семинаре лабораторий метаболизма адениловых соединений, медицинской биотехнологии и группы "Биоинженерии" Института биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА (2015 г.); на заседании Ученого совета Института биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА (2015 г.); на международном симпозиуме "Photonics West", BIOS 2012, 21-26 января 2012 г., Сан-Франциско, США; на конференции "SPIE Microtechnologies -2013", 24 - 26 апреля 2013 г., Гренобль, Франция; на международном симпозиуме "Photonics West", BIOS 2014, 25-30 января 2014 г., Сан-Франциско, США; на конференции "SPIE Photonics Europe 2014", 14-17 апреля 2014 г., Брюссель, Бельгия; на конференции "EMBO Conference Series: Chemical

Biology 2014”, 20-23 августа 2014 г., Гейдельберг, Германия; на конгрессе Федерации Европейских Биохимических Обществ “14th FEBS Young Scientists' Forum (YSF)”, 27-30 августа 2014 г., Париж, Франция; на конференции “SPIE Microtechnologies -2015”, 4 - 6 мая 2015 г., Барселона, Испания.

Место выполнения работы. Основная часть работы выполнена в Институте биохимии им. Г. Бунятяна НАН РА; спектральные и фотофизические исследования совместно проведены в Институте биохимии им. Г. Бунятяна НАН РА и Институте физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси; исследования по действию порфиринов и металлопорфиринов на микроорганизмы совместно проведены в Институте биохимии им. Г. Бунятяна НАН РА и в лаборатории молекулярной биологии НПЦ "Армбиотехнология" НАН РА; исследования по действию порфиринов и металлопорфиринов на культуры раковых клеток проведены на кафедре генетики ЕГУ.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы из 186 наименований. Работа оформлена на русском языке, общий объем работы 133 страницы, включая 46 рисунков и 8 таблиц.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, включая 8 научных статей.

Глава I.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

2015 год объявлен годом света и огромная армия ученых в лице физиков, биологов, химиков и др. специальностей всесторонне изучают процессы, связанные с этим важнейшим источником жизни. Одной из главных молекул для жизнедеятельности организмов являются порфирины, представляющие собой светочувствительные красители обладающие фотосенсибилизирующей активностью. Порфирины и родственные тетрапиррольные пигменты широко распространены в живой природе и необходимы для оптимального протекания основных биологических процессов. Порфирины играют исключительную роль, с их помощью осуществляются важнейшие биологические, биохимические, фотохимические и ферментативные процессы в живых организмах, такие как фотосинтез, перенос кислорода, транспорт электронов и др. К типичным представителям порфиринов относятся хлорофилл и гемин крови. Хлорофилл, как известно, осуществляет начальную стадию фотосинтеза. Порфирины входят в состав таких известных белков, как гемоглобин, миоглобин и многочисленной группы цитохромов, ферментов каталаза, пероксидаза и др.

Интерес к изучению как природных, так и синтетических порфиринов, несмотря на долгие годы исследований, не стихает, а только усиливается. В последние годы активно развиваются такие области применения порфиринов, как диагностика и лечение злокачественных новообразований, анемии, нейропсихических нарушений, кожных, глазных и многих других болезней [52]. Функции молекулярных порфириновых систем, используемых для исследования и селективного воздействия на организм, достаточно разнообразны, но все они основаны на взаимодействии с различными биомолекулами, в основном с транспортными белками и нуклеиновыми кислотами. Эффективность и специфичность взаимодействия зависит от многих факторов, в первую очередь от структур порфирина и биомолекул, pH среды, присутствия липопротеинов, молекул кислорода и др. [114]. Порфирины синтезируются, выделяются из природных источников и исследуются в десятках лабораториях и фирмах мира, ежегодно им посвящаются десятки симпозиумов и конференций, труды ученых по порфиринам печатаются в многочисленных специализированных научных журналах. Актуальность и важность изучения

фотофизических и медико-биологических свойств будет продолжать оставаться на многие годы в связи с уникальными возможностями практического применения порфиринов.

1.1. Порфирины

Порфирин и порфиринсодержащие соединения широко распространены в природе. К ним относится хлорофилл – зеленый пигмент растений, а также различные его аналоги, содержащиеся в различных классах водорослей – хлорофилл а, b, с₁ и с₂, d, гем – красящее вещество в составе гемоглобина крови и группы цитохромов, бактериохлорофилл – в пурпурных фотосинтезирующих бактериях [34], а также порфирины нефти и других минеральных пород. Порфирины и их гидрированные аналоги - хлорины и бактериохлорины - играют важную роль в природе [34, 9]. Они входят в состав многих известных белков и ферментов, таких как цитохромы, гемоглобин, миоглобин, каталазы, пероксидазы и др. Эти гемопротеиды 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.

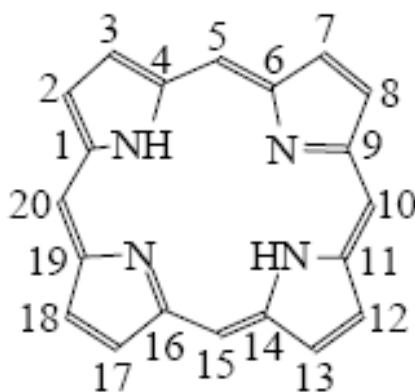


Рис. 1. Структурная формула порфирина по международной номенклатуре IUPAC [13].

Сопряженное макроциклическое кольцо из 4-х пиррольных остатков, соединенных между собой метиновыми мостиками, является основной частью структуры всех порфиринов [13]. У хлорина, известного представителя класса порфиринов, в положении 17 и 18 вместо двойной связи имеется дополнительно 2 атома водорода, у бактериохлоринов - 4 атома водорода в положениях 7, 8, 17 и 18 (Рис. 1).

1.1.1. Фотосенсибилизаторы

Фотосенсибилизаторы (ФС) являются классом светочувствительных соединений природного или синтетического происхождения и имеют свойство поглощения света присущее только им. Под действием света они содействуют генерации активных форм кислорода (в том числе синглетного кислорода), индуцирующие повреждение клеточных структур и гибель клеток [34, 40]. Восприимчивыми целями в клетке, реагирующими с синглетным кислородом, являются: ненасыщенные липиды, холестерол, α -аминокислоты (триптофан) и нуклеиновые кислоты (гуанин) [81]. Принимая во внимание все это, зная их совместимость с организмом человека, порфирины известны как идеальные фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии опухолей (ФДТ), которая широко применяется во всем мире для лечения практически всех видов онкологических заболеваний. Некоторые известные фотосенсибилизаторы, агенты ФДТ, представлены на рисунке 2.

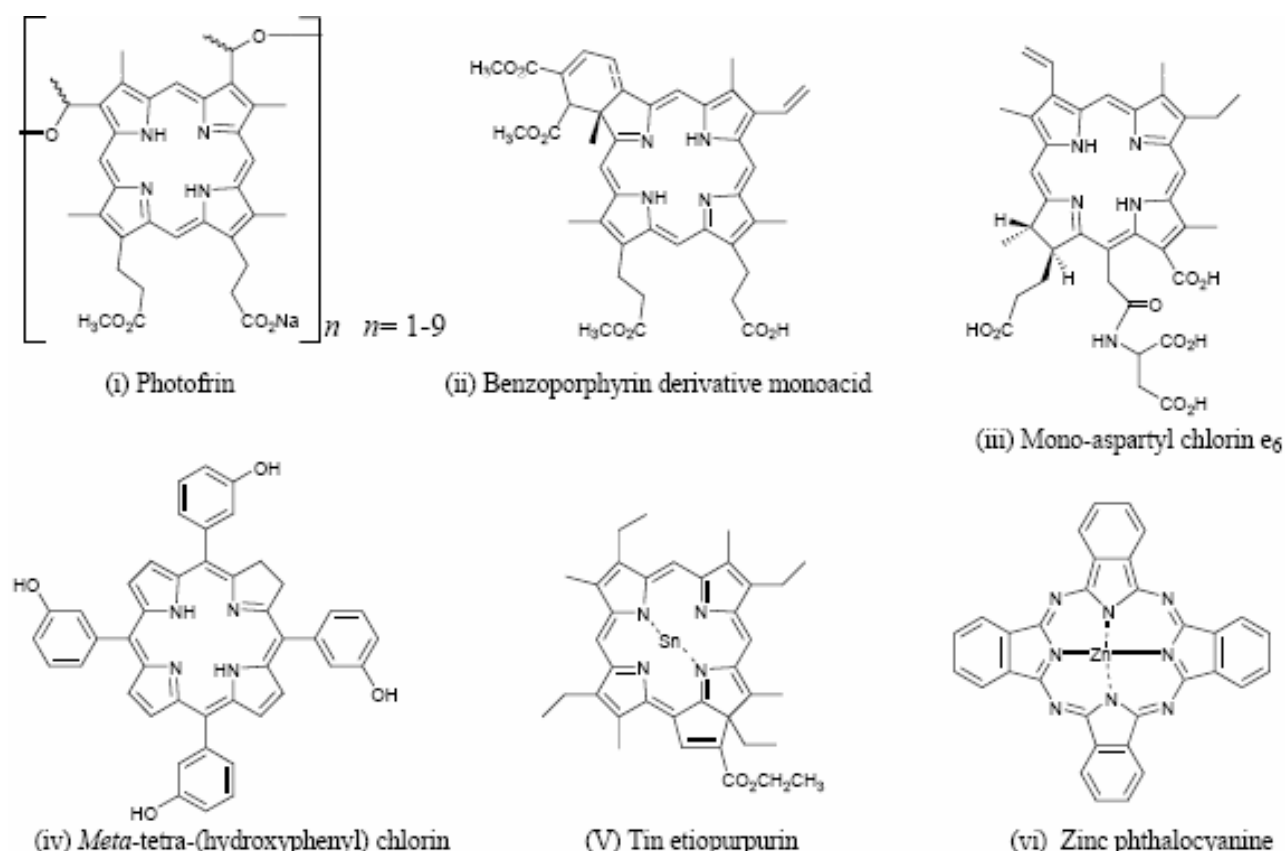


Рис. 2. Некоторые известные фотосенсибилизаторы, применяемые в ФДТ [81].

1.1.2. Фотосенсибилизаторы первого, второго и третьего поколений

А) Фотосенсибилизаторы первого поколения

В качестве фотосенсибилизаторов первого поколения для ФДТ было исследовано большое количество порфиринов. Наиболее перспективным среди них оказался гематопорфирин IX (рис. 3), на его основе Липсон с сотрудниками [115] в 1960 году получил так называемое "производное гематопорфирина" (HrD), которое Т. Догерти [50] применил при лечении своих первых пациентов с онкологическими заболеваниями.

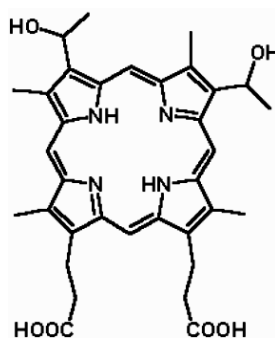


Рис. 3. Структурная формула гематопорфирина [115].

В медицинской практике наиболее широко используются препараты на основе гематопорфирина и сегодня. Это Фотофрин в США и Канаде, Фотосан в Германии, HrD в Китае и Фотогем в России. Многочисленными работами было показано, что образующийся по методике Липсона продукт состоит из мономерных порфиринов, димеров и высокомолекулярных олигомеров. Именно последние обладают наибольшей активностью при ФДТ. В олигомерах порфириновые макроциклы соединены тремя типами связи - сложноэфирной (А), простой эфирной (Б) и углерод-углеродной связью (В). Олигомеры при попадании в клетку подвергаются расщеплению по связи А и В, высвобождая мономерные порфирины. Этим объясняется повышение флуоресценции опухоли при ФДТ, несмотря на то, что первоначально накапливающиеся там олигомеры имеют слабую флуоресценцию. Таким образом, можно предполагать, что олигомеры могут выполнять роль переносчиков мономерных порфиринов в клетку.

Клиническая проверка препаратов на основе гематопорфирина в ряде стран в настоящее время уже закончена. Только в США курс лечения за период с 1978 по 1993 гг.

прошли более 5000 больных. На основе этих испытаний получено разрешение на использование препарата Фотофрин 2 при различных типах рака [10]. В России во второй половине 80-х годов под руководством проф. А.Ф. Миронова был разработан фотосенсибилизатор первого поколения Фотогем, который в период с 1992 по 1995 год прошел клиническую проверку и с 1996 года разрешен для медицинского применения [10].

Б) Фотосенсибилизаторы второго поколения

В настоящее время наряду с уже используемыми препаратами активно исследуются новые соединения, получившие название фотосенсибилизаторов второго поколения. Для идеального фотосенсибилизатора основные требования можно сформулировать следующим образом [10]: 1) слабое задерживание в нормальных тканях и высокая селективность к раковым клеткам; 2) легкий вывод из организма и низкая токсичность; 3) слабое накопление в коже; 4) устойчивость при хранении и введении в организм; 5) хорошая люминесценция для надежной диагностики опухоли; 6) высокий квантовый выход триплетного состояния с большой энергией (не меньше 94 кДж/моль); 7) интенсивный максимум поглощения в области 600 - 900 нм.

До настоящего времени однако такое идеально подходящее соединение не найдено. Многочисленные полученные соединения лишь приближаются к этому стандарту. Первые четыре требования очевидны и не требуют пояснений. Пункты 5 и 6 нельзя рассматривать в отрыве друг от друга. Флуоресценция сенсибилизатора, необходимая для диагностики опухоли, и генерация синглетного кислорода (терапия) взаимосвязаны между собой. Для эффективной генерации синглетного кислорода фотосенсибилизатор должен иметь высокий квантовый выход триплетного состояния, время жизни достаточно продолжительное (10^{-4} - 10^{-2} сек) и для возможности передачи энергии молекуле кислорода энергию триплетного состояния не ниже 94 кДж/моль [34, 9]. Квантовый выход синглетного кислорода является наиболее важным параметром при подборе сенсибилизатора. Интенсивный максимум в красной и ближней инфракрасной части спектра также имеет большое значение. Это условие связано с тем, что свет видимой части спектра плохо проникает через кожу и ткани, а также происходит его поглощение различными структурами клетки. Большие и глубоко расположенные опухоли не могут быть освещены, и эффективность ФДТ при этом

снижается. На рис. 4 представлено прохождение света различных длин волн через кожу и клетчатку с распределением энергии для разных длин волн [10].

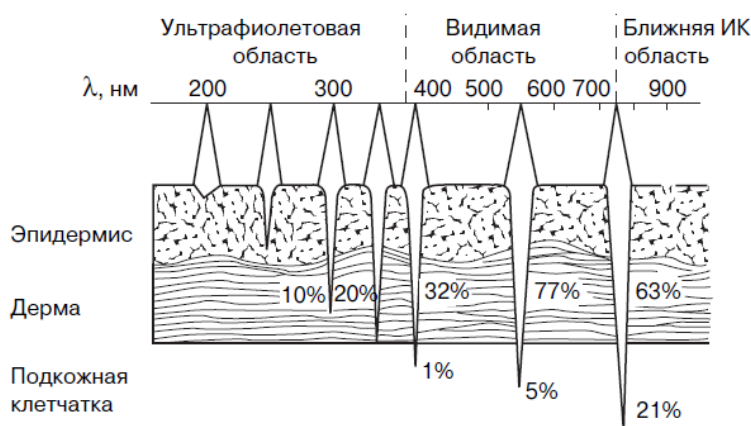


Рис.4. Светопроницаемость кожи для различных областей света [10].

При попадании света на кожу происходят три основных явления:

- 1) свет отражается поверхностью кожи;
- 2) после проникновения свет рассеивается кожей;
- 3) внутрикожными структурами свет поглощается.

Для диагностических целей отраженный свет использовать можно, однако клинического действия он не оказывает. Не имеет клинического значения также и рассеянный свет. Клинический эффект производит лишь свет, поглощенный определенными структурами кожи. Он преобразуется в различные типы энергии, такие как тепловые или акустические волны, а в случае с ФДТ свет активирует различные молекулы.

Чем больше длина волны, тем глубже проникающая способность света. Свет с длиной волны 630 нм проникает на глубину до 2-3 мм, а при длине волны 700 - 800 нм его проникающая способность достигает 4 см. Однако, как только свет поглощается фотосенсибилизатором или каким-либо другим хромофором, дальше он уже не проникнет. Так, зеленый свет с длиной волны 532 нм может проходить на глубину ткани до 1 мм, тогда как гораздо более длинные волны инфракрасной части спектра (10 600 нм) могут проникать в ткань лишь на глубину 20 - 30 мкм, поскольку они поглощаются водой [3]. Для ФДТ важно подобрать такой активирующий свет, который обладал бы и глубокой проникающей способностью, достаточной для достижения им ткани-мишени, и характеризовался бы

отсутствием других конкурирующих абсорбентов в окружающих тканях.

Второе поколение фотосенсибилизаторов включает в себя порфирины и родственные соединения (хлорины, фталоцианины, порфицены, и т.д.), многие из которых пока находятся на стадии клинических испытаний. Наиболее часто используемые в ФДТ фотосенсибилизаторы второго поколения из семейства порфиринов это *meta*-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin (*m*-THPP) и 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)-21H,23H-porphyrin (TPPS4) (Рис. 5).

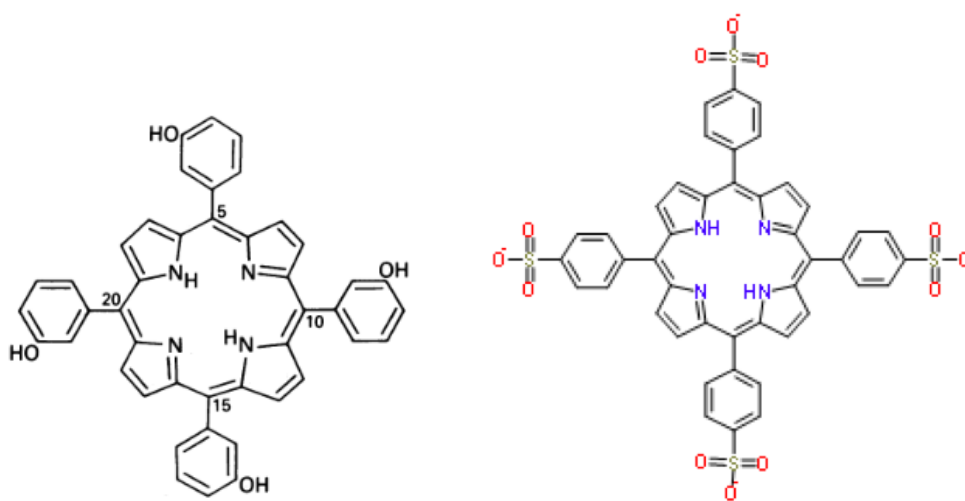


Рис. 5. Химические структуры порфиринов *meta*-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin (*m*-THPP) (слева) и 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)-21H,23H-porphyrin (TPPS4) (справа).

Однако, *m*-THPP вызывал фототоксичность кожи, и при облучении на 648 нм в фотонекрозе опухоли был от 25 до 30 раз более мощным, чем HpD [59]. Более низкую фотохимическую эффективность, чем *мезо*-замещенные порфирины, содержащие несколько сульфированных групп, показал TPPS4 [157].

Порфирины могут быть хелатированы различными металлами, из них диамагнитные повышают фототоксичность. Металлсодержащие порфирины с парамагнитными свойствами имеют очень малую продолжительность жизни триплетного состояния вследствие чего они фотоинактивны [91]. У центрально координированного иона металла присутствие аксиальных лигандов часто выгодно, поскольку они создают некоторую степень стерических препятствий на межмолекулярные агрегации, без ухудшения фотофизических свойств красителя [91].

Фталоцианины (Pc) в настоящее время признаны одним из лучших сенсibilизаторов второго поколения, используемых в ФДТ, имеют длинноволновой диапазон с большим коэффициентом экстинкции ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и, в целом, низкую темновую токсичность [22, 92, 93, 95]. Их максимумы поглощения находятся в области 670-700 нм, с очень высокими молекулярными коэффициентами экстинкции. Представитель соединения алюминий тетрасульфонируемый фталоцианин AlPcS_4 , известный коммерчески под названием Фотосенс, несмотря на чувствительность к нему кожи, имеет свойственный фталоцианинам максимум поглощения при 676 нм, хорошо применяется в российских клиниках против рака желудка, кожи, полости рта и рака молочной железы [172]. Другой фталоцианин применяемый в клиниках - это silicon phthalocyanine 4 (Pc4), был успешно испытан на различных формах рака кожи (предраковый - старческий кератоз, болезнь Боуэна) и на злокачественных формах рака кожи [106, 55, 145].

Центральные ионы металлов играют важную роль в фотофизических свойствах фталоцианинов, а также других порфиринов. В металлофталоцианинах центральный металл (M) имеет один или два аксиальных лиганда, или один или более заместителей в кольце, или оба. Когда диамагнитный ион находится в центре кольца (например, Zn, Al, Ga), то он, как правило, обладает высокой триплетной формой выхода ($\phi_T > 0.4$) с большой продолжительностью жизни ($\tau_T > 200 \text{ }\mu\text{s}$) и достаточным количеством энергии ($110 - 126 \text{ кДж / моль}^{-1}$) для генерирования $^1\text{O}_2$ (требуется $94,5 \text{ кДж / моль}^{-1}$) [54, 29]. Silicon phthalocyanine (силиконовый фталоцианин) допускает два соответствующих осевых лиганда, которые запрещают укладку кольца, что уменьшает клиническую эффективность [60, 89, 139]. Триплетное состояние продолжительности жизни аксиально замещенного силикон фталоцианина, как правило, варьируются от 100 до 200 μs и выход от 0,2 до 0,5 [89]. Некоторые синтетические силиконовые фталоцианины и нафталоцианины были использованы в различных лабораторных исследованиях на культурах клеток K562 и были получены отличные результаты [160].

В) Фотосенсибилизаторы третьего поколения

Фотосенсибилизаторы третьего поколения содержат доступные лекарства, их модифицировали с конъюгатами антител, биологическими конъюгатами, и т.д. [130, 131].

Эти термины все еще используются, хотя и не приняты единогласно и деление фотосенсибилизирующих лекарств на такое поколение очень запутанно. Наноструктуры все шире используются в качестве носителей для развития 3-го поколения ФС. В качестве наиболее важных систем доставки лекарственных средств, используемых в области противораковой ФДТ как носители для фотосенсибилизаторов, используются наночастицы благородных металлов (серебра и золота), железа (Fe_3O_4 , Fe_2O_3), липосомы и др. (более подробно они рассмотрены в разделе I.5.).

1.1.3. Катионные порфирины

Наиболее важным звеном в фотодинамической терапии опухолей и фотодинамической диагностике является подбор подходящего порфирина-фотосенсибилизатора. Среди широкого спектра порфиринов мезо-замещенные катионные порфирины занимают особое место в связи с тем, что изменением их структуры можно добиваться их включения в различные структуры клетки, например в митохондрии или липосомы, или связывания с различными макромолекулами (белками, ДНК и т.д.). Гидрофобность или гидрофильность фотосенсибилизатора, а также возможное внесение катионного или анионного заряда разной величины можно контролировать проводя изменения структуры периферических заместителей макроцикла порфирина.

В Армении синтез порфиринов, и в частности катионных порфиринов осуществляется уже более 35 лет в Ереванском Государственном медицинском университете на кафедре общей химии (к.х.н., доцент Р.К. Казарян). Синтезированы более 100 различных мезо-замещенных водорастворимых катионных порфиринов и металлопорфиринов с различными центральными атомами металла (Zn, Ag, Co, Fe, Mn, Cu, и др.) и различными периферическими функциональными группами R (бутил-, оксиэтил-, аллил- и метиллил) (Рис. 6) [8, 171].

Высокая эффективность и селективность катионных порфиринов с успехом была показана для разрушения опухолей *in vivo* [176, 129]. Синтезированные в Армении новые катионные порфирины и металлопорфирины также показали высокую эффективность как для ФДТ [170, 70, 171], так и для инактивации Грам (+) и Грам (-) микроорганизмов [68, 69, 72].

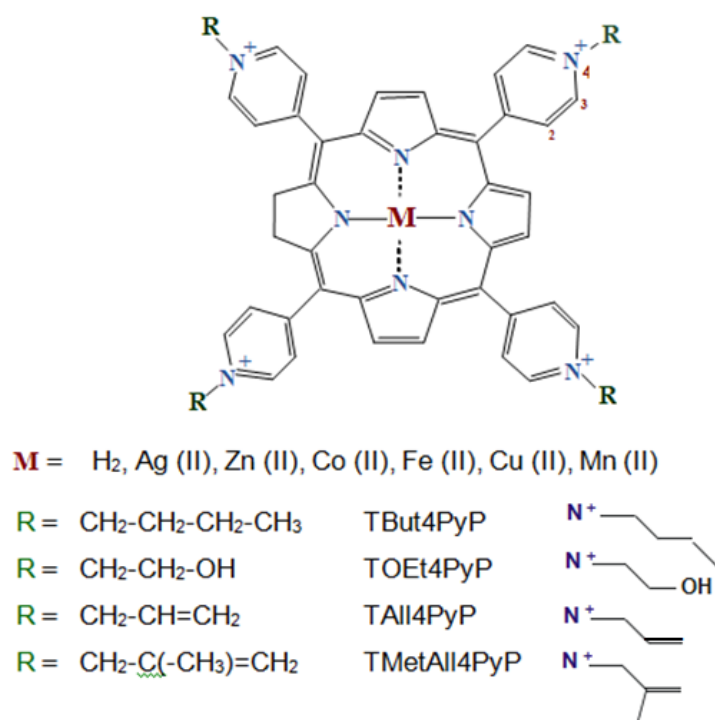


Рис. 6. Структура катионных порфиринов. М - центральные атомы металлов (Zn, Ag, Co, Fe, Mn, Cu, и др.), R – периферические группы [8, 171].

Ниже приводятся структурные формулы и молекулярные массы (вес) некоторых из синтезированных в Армении и наиболее употребляемых порфиринов и металлопорфиринов, сгруппированных в соответствии с периферическими функциональными группами (R) в 4-ой и 3-ей позициях:

I. meso-tetra [4-N-(2'-oxyethyl) pyridyl] porphyrin (TOEt4PyP)
(R= - CH₂ - CH₂ - OH)

Мол. масса (дальтон)

1. TOEt4PyP	940
2. Ag-TOEt4PyP	1152
3. Zn-TOEt4PyP	1003
4. Cu-TOEt4PyP	1002
5. Co-TOEt4PyP	997
6. TOEt4PyP-indigo carmine	2750
7. TOEt3PyP	940
8. Ag-TOEt3PyP	1152
9. Zn-TOEt3PyP	1003
10. Cu-TOEt3PyP.....	1002

II. meso-tetra [4-N-butyl pyridyl] porphyrin (TBut4PyP)
(R= - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₃)

11. TBut4PyP.....	1166
12. Ag-TBut4PyP	1200

13. Zn-TBut4PyP	1229
14. Mn-TBut4PyP	1219
15. TBut3PyP	1166
16. Zn-TBut3PyP	1229

III. meso-tetra [4-N-Allyl pyridyl] porphyrin (TAll4PyP) (R= - CH₂– CH = CH₂)

17. TAll4PyP	1102
18. Ag-TAll4PyP	1136
19. Zn-TAll4PyP	1165
20. Cu-TAll4PyP	1164
21. Co-TAll4PyP	1159
22. Fe-TAll4PyP	1191,5
23. TriAll4PyMVanP	1250
24. Ag-TriAll4PyMVanP	1302
25. TAll3PyP.....	1102

IV. meso-tetra [4-N-MethylAllyl pyridyl] porphyrin (TMetAll4PyP) (R= - CH₂– C = CH₂)



26. TMetAll4PyP.....	1158
27. Ag-TMetAll4PyP.....	1192
28. Cu-TMetAll4PyP.....	1220
29. Co-TMetAll4PyP	1215

1.1.4. Порфирины как потенциальные сенсоры

Первые матричные детектирующие системы были разработаны в конце прошлого века и предназначались для распознавания паров различных веществ оптическими методами [49]. Они представляли собой матрицу чувствительных химических элементов, создающую сложный, но уникальный отклик на каждое анализируемое вещество. В 2000 году было предложено использовать в качестве детектирующих элементов набор различных металлопорфиринов, изменяющих окраску при специфических взаимодействиях с координирующими соединениями [151]. Металлопорфирины обладают способностью присоединять непосредственно к иону металла дополнительные лиганды, что является их важнейшим функциональным свойством. Именно посредством такого взаимодействия обеспечивается связь хлорофилла и гема с белком, осуществляется обратимая оксигенация гемоглобина и миоглобина, катализируются и контролируются многие биохимические реакции.

Спектры поглощения порфиринов, а также их комплексов с металлами, содержащими пустые или заполненные d-оболочки, обусловлены дипольными ππ-переходами, связанными

с переходами электронов, локализованных преимущественно на порфирине [2]. Такие системы, как правило, имеют долгоживущие возбужденные синглетные и триплетные состояния. Многочисленными исследованиями показано, что спектральные и фотофизические свойства порфириновых соединений сильно подвержены влиянию полярности окружающей среды, внутри- и межмолекулярных процессов переноса заряда, энергии, чувствительны к наличию и природе экстралигандов, а также к искажениям плоскостности макроцикла, вызванного его взаимодействием с внешней матрицей. По совокупности свойств тетрапиррольные пигменты являются идеальными кандидатами для создания сенсорных устройств.

Реализовать эти богатые потенциальные возможности порфиринов для матричных детекторов, работающих в биологических жидкостях, стало возможным лишь относительно недавно в связи с разработкой и выпуском специализированных лазерных сканеров и наборов компонентов, позволяющих массово создавать детектирующие матрицы путем внедрения заряженных сенсорных молекул в гидрогелевую подложку. Такие матрицы, разработанные для задач многомерной биологии, получили название микрочипов малых молекул [51]. На таких микрочипах малых молекул, на основе катионных порфиринов в качестве сенсоров, имеющих заряд +4, был реализован анализ взаимодействия большого спектра порфиринов и металлопорфиринов с рядом белков крови [64].

Чаще всего исследуются катионные порфирины, которые в отличие от анионных не образуют агрегатов в растворах и остаются в мономерной форме во всем диапазоне концентраций, обычно используемых в экспериментах [101]. Это их свойство значительно облегчает обработку и интерпретацию экспериментальных данных. Кроме того, катионные порфирины можно использовать для изучения комплексообразования не только с белками, но и нуклеиновыми кислотами, имеющими отрицательно заряженный фосфатный остов.

В последнее время особое внимание уделяется синтезу модифицированных катионных порфиринов и металлопорфиринов с дополнительными липофильными концевыми группами, и изучению их потенциального использования как в ФДТ, так и фотодинамической инактивации микроорганизмов [69-71]. Установлено, что катионные порфирины связываются с белками, при этом константы комплексообразования существенно различаются для разных белков, так, цитохром С проявляет значительно более

высокое сродство к катионным порфиринам, чем гемоглобин и сывороточный альбумин. Метод молекулярного докинга был впервые применен к катионным порфиринам и осуществлена их стыковка с молекулами альбумина [64].

Таким образом, порфирины и, в частности, катионные порфирины, с успехом были применены для целей сенсорики.

1.2. Фотодинамическая терапия опухолей (ФДТ)

1.2.1. Краткая история ФДТ

Лечение солнечным светом, гелиотерапия, применялось в Древнем Египте, Греции и Индии. Экзогенные фотосенсибилизаторы использовали для усиления эффекта фототерапии еще в 1400 г. до н. э., что было описано в «Атхарва-веда» - священной книге индусов. В нем упоминается использование солнечного света в сочетании с обладавшими фотосенсибилизирующими свойствами растениями, содержащими псоралены, для лечения кожных заболеваний, таких как витилиго и псориаз [3]. В современной истории фотодинамический эффект заново был открыт в 1897г. студентом фармакологического факультета Мюнхенского университета Оскаром Раабом, когда он изучал эффект света и красителей на парамеции (*Paramecium*). Сообщение об этом сделал профессор этого университета Н.Тарпинер в 1900 г. [166], он же ввел термин "фотодинамическое действие" ("photodynamische wirkung"). Фотодинамическую терапию впервые провели в 1903 г. профессор Н. Тарпинер и доктор А. Jesionek в дерматологической клинике г. Мюнхена больному с базальноклеточным раком кожи лица [165]. Авторы в 1905 г. сообщили о лечении методом ФДТ с местным применением красителей с положительным эффектом шести больных раком кожи, причем у четырех больных с отмечено полное излечение с длительностью безрецидивного периода до одного года [98]. Первое сообщение о фототоксичности гематопорфирина (Рис. 3) сделал W.H. Hausmann в 1908 г. Он установил, что гематопорфирин - это активный фотосенсибилизатор для парамеций и эритроцитов [75]. Впервые испытал действие гематопорфирина на человеческий организм в сенсационном эксперименте на самом себе F. Meyer-Betz [125]. В 1912 г. он ввел себе внутривенно 0,2 г гематопорфирина и продемонстрировал солнечную фоточувствительность в виде отека и гиперпигментации, которые продолжались в течение 2 месяцев.

За исследование по применению света в лечении туберкулезной волчанки более 100

лет назад, в 1903 г., датскому физиотерапевту Нильс Финсену (Niels Finsen) была присуждена Нобелевская премия в области физиологии и медицины.

Для диагностических целей использование гематопорфирина, основанное на флюоресценции неопластических тканей, продемонстрировал А. Policard в 1924 г. [146]. Во время операции в тканях визуализировалась яркая красная флюоресценция при облучении ближним ультрафиолетовым светом. Было отмечено, что красную флюоресценцию гематопорфирина и его тенденцию концентрироваться в опухолях можно использовать, чтобы выявить невидимые глазом опухоли во время операции и определить их границы. Также можно обнаружить мелкие или незаметные лимфатические узлы с помощью такой техники.

Далее развитие ФДТ шло по длительному пути и лишь в конце семидесятых годов XX века после детальной экспериментальной разработки и клинических публикаций Т. Догерти и соавторов [50] развитие ФДТ приобрело взрывной характер с огромной массой ежегодных публикаций.

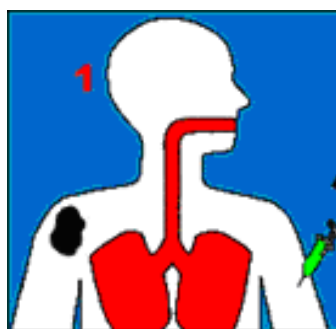
Таким образом, ФДТ хотя и известный, “древний” метод, но в то же время является современным, перспективным, стремительно развивающимся методом лечения онкологических заболеваний.

1.2.2. Механизм фотодинамического эффекта

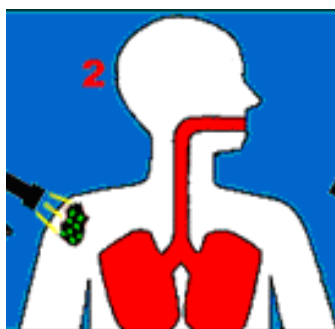
На изучение механизмов фотодинамического повреждения направлены многочисленные теоретические исследования. Однако до сих пор остается невыясненной природа накопления («захвата») фотосенсибилизатора в опухоли, степени избирательности накопления в опухоли по сравнению с нормальной тканью, значительной задержки фотосенсибилизатора в опухоли и т.д.

Фотодинамическая терапия является трехкомпонентным методом лечения. Из них два компонента - фотосенсибилизатор и свет являются экзогенными внешними факторами. Для фотодинамической реакции третьим обязательным компонентом является эндогенный фактор - кислород.

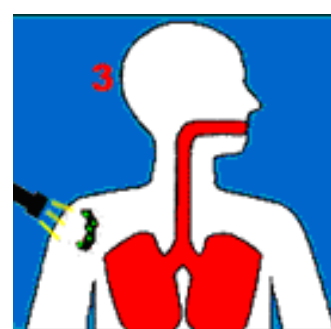
Фотодинамическая терапия проводится в два этапа. В организм сначала внутривенно вводится фотосенсибилизатор (порфирин), способный активироваться под действием света. Через некоторое время препарат накапливается в опухоли в гораздо большем количестве, чем в здоровой ткани. В настоящее время это объясняют особенностями опухолевых клеток и их кровоснабжения. У опухоли кровеносные сосуды обычно бывают капиллярного типа с несовершенной базальной мембраной и измененными клетками внутреннего слоя (эндотелия), вследствие этого молекулы фотосенсибилизатора довольно легко проникают из кровеносного русла в быстрорастущие клетки опухоли и накапливаются там. Соотношение концентрации фотосенсибилизатора в опухоли и окружающей нормальной ткани для современных препаратов составляет от 3:1 до 10:1 и более в зависимости от химических свойств препарата и природы опухоли [10]. На рис. 7 приведена схема действия ФДТ.



1. Фотосенсибилизатор вводится внутривенно, либо наносится наружно.



2. Фотосенсибилизатор аккумулируется в поврежденной ткани. Низкоинтенсивное лазерное излучение фокусируется на поврежденной области.



3. Возбужденный с помощью света фотосенсибилизатор приходит в активное состояние, стимулируя выделение токсических соединений кислорода, приводящих к гибели больных клеток.

Рис. 7. Схема действия ФДТ [53].

После накопления препарата (0,5 – 48 часов) производят облучение измененных тканей светом определенной длины волны в течение от нескольких до 30 минут. В качестве источника излучения обычно используется лазер. В участках опухоли, содержащих сенсibilизатор, развиваются фотохимические реакции, которые приводят к гибели раковых клеток. В последующее за облучением время (обычно через несколько минут, иногда до 2-4 недель) происходит разрушение злокачественной опухоли и через 6-8 недель происходит частичное или полное восстановление пораженных участков [10].

Для опухолевых клеток различают прямое фотодинамическое повреждение (ФДП) и не прямое, опосредованное. Узловыми вопросами научных исследований были и остаются вопросы селективного накопления порфиринов в опухолевой ткани и распределения в тканях животных, определение тканевых и клеточных мишеней ФДП, механизмы внутриклеточного распределения фотосенсibilизаторов. К настоящему времени сформировались вполне определенные представления о механизме ФДТ несмотря на то, что до последнего времени далеко не все удалось выяснить.

Механизм противоопухолевого действия ФДТ хорошо объясняют две основные теории [16]. **Первая теория** связывает повреждающее действие ФДТ внутриклеточными изменениями вследствие взаимодействия с активными формами кислорода, среди которых основным является синглетный кислород. Синглетный кислород довольно сильный окислитель биомолекул, который вызывает гибель клеток, если его в достаточном количестве и когда его концентрация достигает определенного уровня. Синглетный кислород токсичен и для опухолевых, и для нормальных клеток, однако свойство фотосенсibilизаторов концентрироваться значительно больше в злокачественных тканях позволяет нормальные ткани щадить от повреждающего действия ФДТ. В связи с этим вопросы о избирательности накопления и задержке фотосенсibilизатора в опухолевых клетках и тканях, а также биологическое обоснование такой селективности является одним из ключевых положений научных поисков по проблеме ФДТ. **Вторая теория** противоопухолевого действия ФДТ опирается на не прямой, опосредованный механизм фотодинамического повреждения опухоли при взаимодействии повреждающих факторов ФДТ и сосудистой системы опухоли.

Молекулярные механизмы прямого фотодинамического повреждения клеток

опухоли и тканей изучены довольно детально и многосторонне. При прямом фотодинамическом повреждении опухолевых клеток синглетным кислородом различают молекулярные механизмы с выделением двух типов реакций энергопереноса [30, 19, 179]. Поглотив квант света, на первом этапе молекула фотосенсибилизатора переходит в возбужденное триплетное состояние T_1 (первый уровень возбуждения) и вступает в фотохимические реакции (рис. 8).

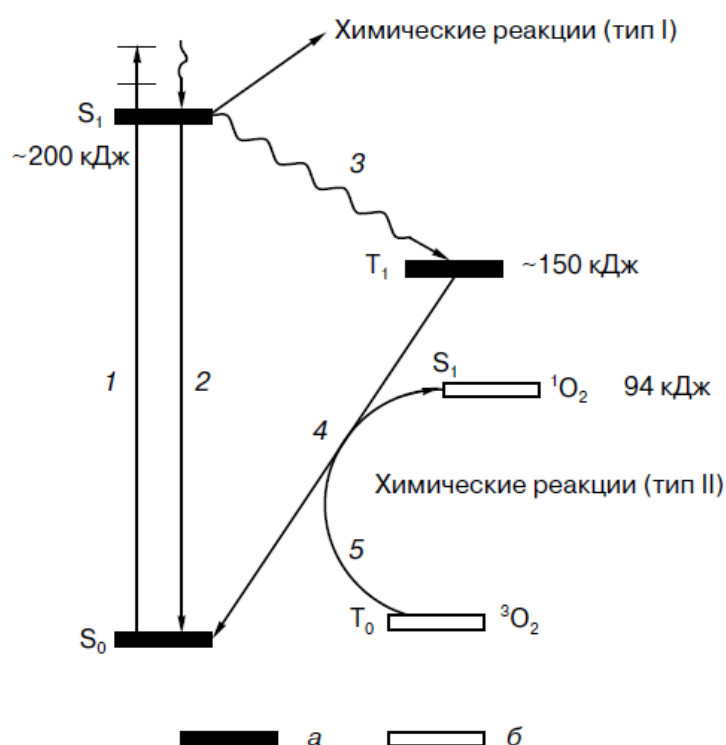
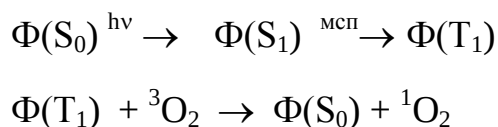


Рис. 8. Схема электронных переходов возбужденных фотосенсибилизаторов и образования синглетного кислорода [5]: 1- поглощение; 2 – флуоресценция; 3 – внутрисистемная конверсия; 4 – фосфоресценция; 5 – переход триплетного кислорода 3O_2 в синглетный кислород 1O_2 . Уровни энергии обозначены темными и светлыми полями: а – фотосенсибилизатора и б – кислорода.

В этом случае возможны два типа фотохимических реакций с образованием различных радикалов (рис. 8). В первом типе реакций (тип I) молекулы фотосенсибилизатора в триплетном состоянии взаимодействуют непосредственно с молекулами биологического

субстрата. Результат такого взаимодействия приводит к образованию радикалов биосубстрата и фотосенсибилизатора, которые вступают во взаимодействие с молекулярным кислородом. Это в свою очередь приводит к образованию свободных радикалов - очень агрессивных окислителей биологических структур. При реакциях второго типа (тип II) энергия молекулы возбужденного фотосенсибилизатора сразу передается молекуле кислорода. В результате образуется синглетный кислород $^1\text{O}_2$, который является цитотоксическим для живых клеток из-за свойства сильного окислителя биомолекул. В фотодинамических процессах *in vivo* реакции первого типа играют незначительную роль и основное значение имеют реакции второго типа [9, 15].

Как было отмечено выше, в основе метода ФДТ лежит использование фотосенсибилизаторов с определенными характеристиками, поглощающих свет и передающих энергию возбужденного состояния на растворенные в органах и клетках молекулы кислорода. Такое взаимодействие приводит к образованию синглетного кислорода, а также других активных форм кислорода (АФК) – супероксидного радикала, пероксида водорода и гидроксильного радикала, которые приводят к деструкции и гибели клетки. Этот процесс схематически можно представить следующим образом [34]:



где Φ – фотосенсибилизатор, S_0 , S_1 – его основное и первое возбужденное синглетные состояния, T_1 – первое возбужденное триплетное состояние, мсп – межсистемный переход (см. далее), ${}^3\text{O}_2$ – основное состояние триплетного кислорода, ${}^1\text{O}_2$ – первое возбужденное синглетное состояние кислорода (см. рисунок 8).

В основе фотохимического действия света при ФДТ лежат два механизма: реакции первого и второго типа [18]. Протеканию реакций того или иного типа предшествует процесс перехода ФС в триплетное состояние.

Молекула фотосенсибилизатора (**а**, Рис. 8) в результате облучения переходит из основного состояния S_0 в синглетное состояние S_1 , затем из-за потери части энергии переходит в долгоживущее триплетное состояние T_1 (межсистемный переход), длительность жизни в таком состоянии намного больше по сравнению с синглетным. Поэтому

фотосенсибилизированное окисление происходит с участием триплетного сенсibilизатора, обладающего высоким квантовым выходом. Образующийся триплетный фотосенсибилизатор участвует в реакциях первого и второго типов. Активная форма ФС в реакциях типа I взаимодействует с молекулой субстрата с выделением атома водорода или переносом электрона. Вследствие этого образуются радикалы, реагирующие в дальнейшем с кислородом или другими молекулами [116].

В отличие от реакций типа I, в реакциях типа II триплетный ФС взаимодействует непосредственно с кислородом (б, Рис. 8) и переводит его в возбужденное синглетное состояние ($^1\text{O}_2$). Эта реакция тушения триплетного ФС кислородом протекает быстро. Менее эффективно происходит перенос электрона от ФС к кислороду с образованием супероксид-анион радикала (O_2^-) [179], количество которого при фотохимических реакциях варьирует от 1 до 10% от общего количества генерируемых АФК. Именно $^1\text{O}_2$ играет важнейшую роль в ФДТ. В частности, синглетный кислород, взаимодействуя с электрофильным биоматериалом (белками, ненасыщенными жирными кислотами, нуклеиновыми кислотами и др.), вызывает фотоокисление последних, приводя к деструкции и гибели клетки. Исследования *in vitro* показали преобладание реакций типа II [19].

При объяснении избирательности повреждения опухоли вопрос о механизмах селективного накопления фотосенсибилизатора в опухолевой ткани и клетках исследователей интересовал прежде всего. До сих пор этот вопрос полностью не решен. Для объяснения этого факта большинство исследователей склоняется к особой способности опухолевых клеток захватывать и длительно удерживать порфирины. Экспериментальные данные ряда авторов [100, 104] свидетельствуют, что в крови больных производное гематопорфирина связывается с сывороточными белками, включая липопротейны, преимущественно низкой плотности, глобулины и альбумины. Наиболее продолжительное связывание производного гематопорфирина наблюдается с липопротеином (липосомами). Т.к. опухолевые клетки содержат большое количество липопротеиновых рецепторов [37], предполагается, что опухолевые клетки захватывают комплексы липопротеинов с производным гематопорфирина, это и обуславливает селективность их накопления.

Связанные с липосомами порфирины активнее захватываются и дольше удерживаются опухолевыми клетками, чем порфирины в водных растворах. В связи с этим отличаются и мишени фотодинамического воздействия: цитоплазматическая мембрана,

как более доступная, водорастворимыми порфиринами поражается в первую очередь, в то время как порфирины связанные с липосомами (жирорастворимые порфирины), вызывают более глубокие внутриклеточные поражения у митохондрий, лизосом и эндоплазматического ретикулума [25, 122]. Значительная селективность накопления фотосенсибилизатора в опухоли может определяться также более низкой рН опухоли, у которой по сравнению с нормальными тканями она ниже на единицу [117, 149]. При более низких рН фотосенсибилизаторы лучше растворяются в водных растворах и насыщение ими в опухолевой среде должно быть выше. Поскольку к понижению рН в опухоли ведет гипергликемия, то в этих условиях уровень накопления производного гематопорфирина опухолью выше и деструктивные изменения опухоли более выражены, что было показано в экспериментах на моделях опухолей крыс [168].

Однако оказалось, что теоретически хорошо обоснованные механизмы прямого повреждающего действия порфиринов и света на опухоли подтверждения у экспериментаторов не всегда находят. По крайней мере об отсутствии прямого действия и его ведущей роли в фотодинамическом повреждении опухолей при ФДТ свидетельствуют данные о незначительном содержании в опухолевых клетках некоторых порфиринов (в частности, гематопорфирина). Выявление концентрации гематопорфирина в опухолевых клетках, проведенное с использованием различных методов, показало его в очень незначительных количествах [44, 128]. Т. Christensen и соавторы отметили у гематопорфирина незначительные различия в накоплении между нормальными и опухолевыми клетками [44]. Тем не менее необходимо отметить, что эти работы относятся к самым первым порфиринам, гематопорфиру, и эти выводы аппроксимировать на другие, в частности на современные порфирины второго поколения, неправомерно. В настоящее время показано, что порфирины и металлопорфирины, используемые для метода фотодинамической диагностики, накапливаются в тканях и клетках с контрастностью 20 и более (в зависимости от типа опухоли и фотосенсибилизатора) [78, 79]. В этом случае метод флуоресцентной диагностики позволяет даже определять также размеры и геометрию опухоли. К примеу, для хлорина еб, фотосенсибилизатора второго поколения, было показано, что он избирательно накапливается в злокачественных новообразованиях кожи, пищевода, желудка, гортани, бронхов и других областях организма с большим

коэффициентом контрастности (до 10:1). К тому же он обладал быстрым выходом из организма, в то время как гематопорфирин в опухолевых тканях накапливался медленно и имел невысокую терапевтическую эффективность [16b].

Возникает вопрос, какие же факторы могут влиять на селективное накопление порфиринов в опухоли и большую, по сравнению с нормальными тканями, чувствительность опухолей к фотодинамическому повреждению, если при этом концентрация порфиринов в самих опухолевых клетках будет мала, чтобы вызвать необратимые фотодинамические повреждения опухоли? Электронномикроскопическое изучение микроциркуляторного русла опухоли показало, что эндотелиальные клетки капилляров являются самой ранней локализацией и самыми первыми микроскопическими объектами фотодинамических повреждений [57]. Вышеотмеченная селективность накопления фотосенсибилизаторов в опухоли, повидимому, связана со структурно-функциональными особенностями сосудистой сети опухоли. Хорошо известно, что у злокачественных опухолей сосудистая сеть представлена сосудами капиллярного типа с несовершенной базальной мембраной повышенной проницаемости и измененным эндотелием, где скорость кровотока значительно ниже, чем в нормальных капиллярах [57, 76]. Такие особенности сосудов опухоли приводят к более длительному контакту фотосенсибилизаторов с сосудами стромы, к большей возможности задержки их в стенках сосудов и проникновению в более глубокие по отношению к сосудам участки опухолевой ткани молекул фотосенсибилизаторов и их комплексов.

Также еще один важный аспект, на который все больше внимания оказывают исследователи, это **иммунологический отклик на ФДТ**. При фотодинамической терапии активизируется местная иммунная реакция организма на опухолевые ткани и клетки, подвергшиеся воздействию. Клетки иммунитета и поврежденные клетки высвобождают хемокины, цитокины, а также другие медиаторы воспаления, и вырабатываются вещества, привлекающие в зону повреждения лейкоциты. При этом развивается местная воспалительная реакция, которая также приводит к гибели измененных клеток.

Современные исследования иммунных механизмов ФДТ (роль Т-лимфоцитов, использование конъюгата моноклональных антител с фотосенсибилизаторами), роль повреждения хромосомного аппарата клетки и ДНК, роль окиси азота, медиаторов ряда

биологических реакций (простагландины, тромбоксан, гистамин, перекисное окисление липидов), метаболических процессов и фактора некроза опухоли в фотодинамическом повреждении, носят поисковый характер. Научные подходы к решению этих вопросов пока не оформились в той степени, которая необходима для клинического применения [16]. Тенденции развития позволяют надеяться, что часть этих вопросов будет решена в ближайшие годы. На это позволяет надеяться также широкий фронт научных исследований по проблеме ФДТ, проводимых во всех развитых странах мира.

Резюмируя можно отметить, что при фотодинамическом действии различают три пути гибели раковых клеток:

1. Прямая гибель клеток.
2. Гибель клеток за счет повреждения сосудов.
3. Иммунологический отклик на ФДТ.

Право на существование имеют все три пути, но в каждом конкретном случае их надо аккуратно исследовать и решать в каком направлении необходимо двигаться дальше для получения максимального терапевтического эффекта ФДТ.

В любом случае первоочередными задачами в ФДТ остается синтез новых фотосенсибилизаторов, селективно накапливающихся в опухолях, поглощающих свет в ближней инфракрасной области и обладающих быстрым выходом из организма.

Для лечения злокачественных новообразований успешное применение метода ФДТ стимулирует поиск новых ФС с улучшенными свойствами. Для ФДТ наиболее перспективны ФС с максимумом поглощения в красном и ближнем инфракрасном диапазоне (700-900 нм). Это так называемое «терапевтическое окно», где собственное поглощение биологической ткани минимально и где более глубокое проникновение излучения в ткань обеспечивает высокую эффективность терапии [35].

Препарат “Фотосенс” на основе сульфированного фталоцианина алюминия является одним из наиболее перспективных синтезированных фталоцианинов, допущенных для применения в клиниках России. Он имеет длинноволновый максимум поглощения при $\lambda_{\text{max}}=675$ нм с высоким коэффициентом молярной экстинкции (свыше 100000) и высокий квантовый выход флуоресценции, который позволяет добиваться фотоиндуцированных некрозов на глубине до 1,0 см [12]. Однако “Фотосенс” обладает недостаточно высокой

селективностью накопления в опухолевых клетках, он имеет длительный срок задержки в тканях, что может привести к фототоксичности кожи.

Для ФДТ перспективными ФС, поглощающими в ближнем инфракрасном диапазоне спектра, являются бактериохлорины (тетрагидропорфирины). В молекуле хлорина гидрирование еще одной двойной связи приводит к дальнейшему батохромному смещению длинноволновой полосы поглощения. Получаемый так называемый препарат “Тукад» (Tookad), палладиевое производное бактериохлорина с максимумом поглощения при 760 нм, в настоящее время разрешен для лечения простаты в Японии и др. странах [87].

Но при этом, даже хорошо зная основные механизмы фотодинамического действия, нельзя не учитывать тот факт, что ФДТ является точной и элегантной технологией, которая не может применяться в повседневной практике рутинно без подробного и скрупулезного анализа экспериментальных данных. Новые эффективные решения и подходы, например с применением молекулярных зондов с конъюгированными фотосенсибилизаторами или в качестве носителей фотосенсибилизаторов с наночастицами, позволяют в модельных экспериментах *in vitro* и *ex vivo* проводить целевое поражение раковых клеток и надеяться на существенное увеличение положительных клинических результатов в ФДТ.

1.3. Фотообесцвечивание

Явление фотообесцвечивания растворов фотосенсибилизаторов под действием света является без сомнения важнейшим фактором, который необходимо контролировать как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*. М. Криг с соавторами в 1984 г. определили, что главная роль в фотообесцвечивании порфиринов принадлежит синглетному кислороду, генерированному самими порфиринами [88].

Свойство фотообесцвечивания характерно как для фотосенсибилизаторов первого, так и второго поколений, хотя есть и довольно устойчивые к этому явлению фотосенсибилизаторы. Так, фотообесцвечивание наблюдали у перспективных, и в настоящее время допущенных для испытаний в клинике фотосенсибилизаторов второго поколения хлорина и бактериохлорина (5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) и 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (m-THPBC)) [35].

Фотообесцвечивание наблюдали также и *in vivo* при исследовании свойств нового, перспективного мезо-тетра[1-(4'-бромбутил)-3-пиридил]бактериохлорин тетрабромида (3-

РуВС) (рис. 9) в процессе облучения кожи мыши, которое проводили под контролем флуоресценции [12]. Было показано снижение интенсивности флуоресценции 3-РуВС в облученном участке до уровня фона (участок кожи без воздействия), при этом характер спектра оставался неизменным. По-видимому, это происходило как за счет прекращения кровотока в результате повреждения сосудов и/или образования тромбов, так и в зоне облучения интенсивного выгорания красителя, что не связано с деградацией красителя в процессе облучения. При завершении воздействия флуоресценция в облученном участке кожи увеличивалась, и это свидетельствовало о поступлении красителя из кровотока в облучаемый участок.

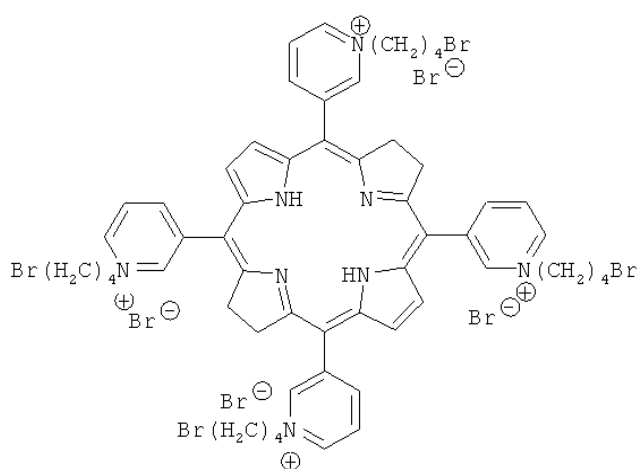


Рис. 9. Новый фотосенсибилизатор мезо-тетра[1-(4'-бромбутил)-3-пиридил]бактериохлорин тетрабромид (3-РуВС) [12].

Установление и исследование явления фотообесцвечивания фотосенсибилизаторов (порфиринов) является необходимым условием для успешного проведения ФДТ опухолей и фотоинактивации микроорганизмов.

1.4. Фотофизические свойства порфиринов

Поглощение света в живых организмах с участием эндогенных или экзогенных порфиринов в присутствии кислорода вызывает окисление, что ведет ко многим химическим и биологическим эффектам, из которых большинство имеют отрицательные последствия [33]. Однако эти последствия, которые губительны для обычных клеток, в случае с раковыми клетками являются положительными с точки зрения их разрушения. В процессе поглощения

света фотосенсибилизатор (порфирин) может претерпевать химические превращения или оставаться неизменным (см. 1.2.2.). При этом в биологических системах было обнаружено много различных короткоживущих реакционноспособных частиц и одна из них – молекула синглетного кислорода $^1\text{O}_2$ [19]. В клетках животных и микроорганизмов, по-видимому, отсутствуют какие-либо специфические средства защиты от синглетного кислорода, и это позволяет считать его основным поражающим агентом в фотодинамическом действии [34, 40, 179]. Изучению фотофизических явлений посвящено множество теоретических и экспериментальных работ, но наиболее важными представляются связанные с образованием синглетного кислорода.

1.4.1. Квантовый выход генерации синглетного кислорода

Как было отмечено в пункте 1.2.2. при ФДТ наиболее важным показателем эффективности фотосенсибилизатора является количество генерируемого синглетного кислорода (СК). В соответствии со схемой Яблонского электронных переходов возбужденных фотосенсибилизаторов и образования синглетного кислорода (рис. 8) этот показатель связан с интенсивностью флуоресценции ФС. Интенсивность люминесценции (флуоресценции) данного вещества определяется количеством поглощенного света и квантовым выходом флуоресценции [20]. Квантовый выход флуоресценции определяется, как отношение количества испускаемых и поглощаемых фотонов молекулой и может быть рассчитан по формуле

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

где N_{em} – количество испускаемых фотонов веществом (порфирином) в результате флуоресценции, а N_{abs} – общее количество поглощаемых фотонов. Квантовый выход флуорофора прямо пропорционален интенсивности его флуоресценции [20].

Люминесценция - общее название двух процессов: излучательные переходы $S_1 \rightarrow S_0$ соответствуют процессу флуоресценции вещества (порфирина), $T_1 \rightarrow S_0$ – фосфоресценции вещества (рис. 8).

Важной из проблем люминесцентных измерений синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, – регистрация слабой люминесценции $^1\text{O}_2$, испускаемой в ближней инфракрасной области спектра на $\lambda = 1270$ нм. Количество фотонов люминесценции в единицу времени прямо

пропорционально текущей концентрации синглетного кислорода. Регистрация люминесценции синглетного кислорода *in vitro* обычная стандартная процедура при исследовании растворов сенсibilизаторов. Эта задача усложняется *in vivo*, поскольку в процессе ФДТ синглетный кислород расходуется так быстро, что его локальная концентрация лежит в пикомолярном диапазоне, и его испускание слабее на несколько порядков [15].

В процессе облучения опухолей животных с накопленным фотосенсibilизатором было показано, что характерная люминесценция синглетного кислорода наблюдается на $\lambda = 1270$ нм [77, 134]. В последующих экспериментах было показано, что сигнал люминесценции $^1\text{O}_2$ (общее число фотоотсчетов в процессе сеанса ФДТ), измеренный в суспензии раковых клеток сенсibilизированной аминолевулиновой кислотой, хорошо коррелирует с клеточным выживанием: чем больше был сигнал люминесценции $^1\text{O}_2$, тем меньше была выживаемость клеток [135].

Дозу светового облучения в процессе ФДТ можно рассчитать на основании известных параметров источника света и времени облучения. С помощью современных приборов с зарядовой связью (ПЗС камер) можно достаточно просто зарегистрировать остаточную флуоресценцию, которой обладают большинство используемых препаратов порфиринов, которые способствуют образованию синглетного кислорода. На таком приборе Сташевским с соавторами было показано, что амплитуда сигнала люминесценции синглетного кислорода прямо пропорциональна концентрации кислорода в объеме, непосредственно примыкающем к облучаемому участку ткани или раствора [15]. В этой работе осуществлена регистрация люминесценции синглетного кислорода вместо непосредственного слежения за концентрацией молекулярного кислорода. А поскольку интенсивность люминесценции $^1\text{O}_2$ пропорциональна количеству образовавшихся молекул синглетного кислорода [138], то достаточно простым методом сравнения амплитуды сигнала люминесценции исследуемого образца со стандартом (для которого известен квантовый выход синглетного кислорода) можно определить квантовый выход синглетного кислорода исследуемого порфирина (см. Главу 2, раздел 2.3) и соответственно оценить эффективность данного соединения.

Отметим, что квантовый выход синглетного кислорода является одним из важных показателей порфиринов-фотосенсibilизаторов и этот показатель является критерием

эффективности соединения при ФДТ и он может быть использован в первую очередь для отбора наиболее эффективного порфирина при прочих других достоинствах.

1.4.2. Методы регистрации синглетного кислорода

Методов регистрации синглетного кислорода (СК) известно большое количество и их условно можно подразделить на физические, химические и биохимические [3, 184]. Но чувствительности многих из них, и в первую очередь распространенного и надежного физического метода обнаружения СК по измерению его фотосенсибилизированной люминесценции, оказывается не всегда достаточно для изучения невысокой фотосенсибилизирующей способности агрегированных молекул [184, 28]. Трудности вызывает изучение генерации СК в водной среде, которое необходимо для биологических и медицинских применений синглетного кислорода. Связано это с небольшим временем жизни СК в воде (2–3 мкс [110]).

В настоящее время существует множество химических методов регистрации СК, которые основаны на применении “химических ловушек”, т. е. соединений селективно взаимодействующих с СК. Химические методы регистрации имеют высокую чувствительность благодаря накоплению продуктов реакции “химической ловушки” с синглетным кислородом. Большая химическая активность СК к электронодонорным соединениям (фенолам, ароматическим и полициклическим соединениям, олефинам, диенам,) обуславливает разнообразие реакций, которые лежат в основе химических методов определения синглетного кислорода [5].

Об образовании синглетного кислорода обычно судят по расходованию соединения-“ловушки”, по потреблению кислорода в содержащих “ловушки” системах или по накоплению характерных продуктов окисления [5]. Соответствующий анализ часто проводят, опираясь на изменение характеристической полосы поглощения того или иного вещества. В то же время регистрация накопления продуктов окисления может осуществляться и другими физическими способами, например, методом ЭПР-спектроскопии [28]. Химические “ловушки” часто используют в сочетании с веществами, продлевающими или сокращающими время жизни СК для увеличения достоверности результатов. Чаще всего в качестве “тушителей” $^1\text{O}_2$ используют токоферолы, каротиноиды, амины, азид натрия и др.

С целью увеличения времени жизни $^1\text{O}_2$ используют замену растворителя его аналогом, где атомы водорода заменены атомами дейтерия [5].

Например, в методе, предложенном Kraljic I. и Mohsni S.Et. [109], в качестве “ловушки” синглетного кислорода используется аминокислота (гистидин). При реакции гистидина с синглетным кислородом, нарабатываемым в присутствии фотосенсибилизатора, образуется эндоперекись гистидина. Эндоперекись является очень реакционноспособным соединением и взаимодействует с индикатором п-нитрозодиметиланилином (ПНДА), убыль которого проявляется в просветлении желтого раствора. По такой схеме протекающих реакций, падение оптической плотности раствора на длине волны 440 нм прямо пропорционально увеличению концентрации СК, нарабатанного за время наблюдения.

Тем не менее, спектральный метод регистрации синглетного кислорода, предложенный в работе Сташевского и др. [15] отличается простотой и достаточной точностью. Именно он и был использован нами для определения генерации синглетного кислорода катионными порфиринами и металлопорфиринами, используемых в данной работе (Глава II, п. 2.3).

1.5. Инактивация микроорганизмов фотодинамическим действием

Известно, что микроорганизмы в процессе мутации приобретают устойчивость к антибиотикам и обычно применяемым лекарственным препаратам, что является большой проблемой для медицины. Решение проблемы лекарственной устойчивости микроорганизмов является одной из важнейших и развитие новых подходов в антиинфекционной терапии без антибиотиков является актуальным и важным направлением в медицине и биологии XXI века.

В настоящее время фотодинамическая инактивация (ФДИ) микроорганизмов посредством фотосенсибилизаторов является одним из наиболее перспективных направлений для уничтожения устойчивых к антибиотикам микроорганизмов [162, 177, 74], она известна также под названиями антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ) [118, 150] или антимикробная фотодинамическая химиотерапия (ФАХТ) [39]. Микроорганизмы, такие как бактерии, грибки, дрожжи и вирусы могут быть уничтожены светом после их обработки соответствующими фотосенсибилизаторами (порфиринами) [147, 132]. Антибактериальная и противовирусная активность ФС проявляет уникальные свойства: а) она независима от спектра чувствительности к лекарству (антибиотику) обработанного патогена;

б) обладает эффективным и необратимым летальным действием при освещении [120]; в) ФС действуют быстро (1-5 мин) [163]. Особенность применения порфиринов заключается в том, что они способны поглощать энергию в широком диапазоне длин волн в УФ и видимой части спектра (200-800 нм), что допускает применение не только лазеров, но и естественных солнечных лучей для фотодинамического эффекта и генерации необходимых активных форм кислорода. Поскольку активными агентами ФДИ являются активные формы кислорода, бактерии не могут вырабатывать устойчивость к этой терапии. Определено, что основным механизмом смертельного повреждения ФДИ бактерий является повреждение цитоплазматической мембраны, в то время как деструкция белков и ДНК играет только вспомогательную роль [73, 180].

Однако не все порфирины одинаково эффективны против микроорганизмов, особенно в отношении Gram (-) [80], часто их концентрация недостаточна для их полного уничтожения. В 1990-х годов было отмечено, что имеется фундаментальное различие в восприимчивости к ФДТ между грамположительными и грамотрицательными бактериями. Было установлено, что в основном нейтральные или анионные молекулы ФС эффективно связываются и фотодинамически инактивируют грам-положительные бактерии и клетки грибов, в то время как грам-отрицательные бактериальные клетки относительно устойчивы к этим соединениям [119]. Такая “избирательность” связана с различием в строении клеточной стенки микроорганизмов [127 b]. Отличие клеточной стенки Gram (-) от Gram (+) микроорганизмов состоит в том, что Gram (-) микроорганизмы имеют более сложную структуру стенки: они имеют наружную мембрану из липополисахаридов и фосфолипидов и две бислойные мембраны клеточной стенки связаны посредством липопротеинов и пептидогликанов, в то время как Gram (+) микроорганизмы имеют одну бислойную цитоплазматическую мембрану к которой снаружи примыкает пептидогликановый слой. Наибольшая эффективность против Грам (+) и Грам (-) микроорганизмов была достигнута катионными порфиринами и металлопорфиринами и была продемонстрирована в большом ряде исследований [74, 72, 69, 152, 113, 47, 99].

Новые катионные порфирины и металлопорфирины, которые были синтезированы в Армении (раздел 1.1.3) обладают рядом существенных отличий от других порфиринов. Впервые методом химического синтеза были получены соединения, в которых в пиридинном

кольце активные оксиэтил-, бутил- или аллил- периферические группы связывались в 3-м или 4-м положениях (рис. 6). Как показали эксперименты, при уничтожении микроорганизмов соединения с группами в 3-м положении фотодинамически были значительно более активнее, чем с группами в 4-м положении [68]. Во-вторых, что очень важно, по сравнению с известными фотосенсибилизаторами (например с 5,10,15,20-тетракис(4-N-метилпиридил)порфирин-ом /TMe4PyP/) синтезированные новые катионные (металло)порфирины обладали очень высоким квантовым выходом генерации синглетного кислорода (0,77 для TMe4PyP и до 0,97 для катионных металлопорфиринов соответственно) [67, 14], который как было отмечено выше (раздел 1.4.) играет решающую роль в фотодинамической терапии опухолей и ФДИ микроорганизмов.

Одним из наиболее опасных микроорганизмов является антибиотик-устойчивый штамм микроорганизма *Staphylococcus aureus* (ARSA) [105]. Для человека *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) является одним из четырех наиболее опасных и распространенных микроорганизмов. Среди более чем 20 известных видов *Staphylococcus*, золотистый стафилококк (*St. aureus*) является наиболее распространенным видом, способным вызвать у человека смертельно опасные инфекции. Антибиотик-устойчивый штамм *St. aureus* (ARSA), который был обнаружен в 1963 году, является серьезной проблемой для многих клиник [48, 38]. Известно, что *St. aureus* проявляет устойчивость к 11 классам антибиотиков [105]. Однако в случае фотодинамического подавления микроорганизмов механизм в корне отличается от подавления другими препаратами. Свойственное прилипание фотосенсибилизаторов к структурам клеточной стенки или внутренним структурам, считается достаточным для его активирования светом и уничтожения микробных клеток. Мишени-клетки не имеют возможности останавливать поглощение, развивать устойчивость, повышая метаболическую детоксикацию или увеличивая активный выброс препаратов [181].

Как было отмечено ранее, основным механизмом смертельного повреждения ФДИ бактерий является повреждение цитоплазматической мембраны, в то время как деструкция белков и ДНК играет только вспомогательную роль [73, 180]. В фотодинамическом подавлении стафилококков успешно были использованы некоторые широко известные

красители, такие как метиленовый синий [102], индоцианин зеленый [148, 173], а также различные соединения порфиринов [56, 167, 159].

Таким образом, фотодинамическая инаktivация микроорганизмов порфиринами и родственными соединениями является перспективным и мощным оружием уничтожения широкого класса Грам (+) и Грам (-) микроорганизмов, в том числе особо опасных.

1.6. Наночастицы

Наночастицы - это гигантские псевдомолекулы, имеющие сложное внутреннее строение, во многих случаях ядро и оболочку, часто - внешние функциональные группы и т.п. Их уникальные магнитные свойства возникают при размерах 2-30 нм. Ограничение по размерам связано с тем, что наночастицы, будучи, как всякие частицы, частью целого, при достижении некоторых размеров начинают резко отличаться от породившего их целого; оценки показывают, что существенные различия начинают возникать, как правило, при размерах частиц ниже ≈ 30 нм [82].

Обычно «наночастицами» называют частицы размерами от 1 до 100 нанометров. Так, например, оказалось, что наночастицы некоторых материалов имеют очень хорошие каталитические и адсорбционные свойства. Другие материалы показывают удивительные оптические свойства, например, сверхтонкие пленки органических материалов применяют для производства солнечных батарей. Удается добиться взаимодействия искусственных наночастиц с природными объектами наноразмеров — белками, нуклеиновыми кислотами и др. Тщательно очищенные наночастицы могут самовыстраиваться в определённые структуры. Такая структура содержит строго упорядоченные наночастицы и также зачастую проявляет необычные свойства.

Наночастицы имеют различные необычные свойства, которые могут улучшить доставку лекарств. В настоящее время наночастицы как переносчики препаратов активно применяются в качестве наноплатформ (наноконтейнеров) фотоактивных веществ. Такие наноконтейнеры активно используются для повышения накопления фотосенсибилизаторов в непосредственной близости или на клеточных стенках как для микроорганизмов, так и для ФДТ опухолей [143]. Эти наноплатформы в качестве несущего элемента имеют различные типы наночастиц: твердые наночастицы, мягкие наночастицы, гидрогели и

бионеразлагаемые наночастицы, наночастицы благородных металлов (золота или серебра), наночастицы цеолита или других неорганических сорбентов и т.д.

1.6.1. Твердые наночастицы

Твердые наночастицы подразделяются на неорганические и органические.

А). Твердые неорганические наночастицы.

Неорганические наночастицы - общий термин для нескольких наночастиц, в том числе, например, метал оксидной- и -неоксидной керамики, металлов, золота и магнитных наночастиц. Ниже приводятся примеры нескольких таких наночастиц.

Керамические наночастицы. Наночастицы с керамической основой имеют некоторые преимущества по сравнению с органическими носителями: размером, формой, пористостью и монодиспергируемостью наночастиц. Они растворимы в воде, очень стабильны и известны своей совместимостью в биологических системах, не подвергаясь воздействию микробов. Для обычной доставки лекарств, носитель-перевозчик должен освободить инкапсулированное лекарство на ткани-мишени. Работы, выполненные группой Прасада, являются одним из немногих примеров применения керамических наночастиц в ФДТ [156]. Гидрофобный фотосенсибилизирующий противоопухолевый препарат 2-devinyl-2- (1-hexyloxyethyl) pyropheophorbide через контролируемый гидролиз триэтоксивинилсилана в мицеллярной среде был захвачен силикон-основанными наночастицами с близкими размерами (диаметром около 30 нм).

Облучением подходящими длинами волн: 532 или 650 нм, силиконовые наночастицы с встроенным порфирином, эффективно поглощались опухолевыми клетками, что приводило к смерти клеток.

Силиконовые наночастицы (SiO_2) имеют следующие преимущества:

1. химически инертны, избегают взаимодействия с другими молекулами в организме;
2. доступны для их синтеза, что позволяет точно контролировать их размер частиц, форму, пористость и полидисперсность в процессе подготовки;
3. позволяют включать небольшие молекулы, инкапсулируя внутри собственной частицы или ковалентно присоединяя их к поверхности;

Доставка фотосенсибилизаторов, встроенных в пористые наночастицы силикона, имеет много преимуществ:

- практически любой тип фотосенсибилизатора может быть использован. Во-вторых, концентрация фотосенсибилизатора может быть модулирована по мере необходимости (увеличена или уменьшена);
- поверхность силикона дает возможность для дальнейшего функционирования;
- когда фотосенсибилизаторы включены ковалентными связями во впадины наночастиц силикона, можно избежать возможного освобождения соединений в среду, и, как следствие, потери эффективности или появления побочных эффектов.

Эти интересные свойства сделали силиконовые наночастицы наиболее изученными системами ФДТ на основе наночастиц.

Магнитные наночастицы. Магнитные наночастицы дают возможность с помощью приложенного магнитного поля быть направленными на достижение конкретной цели в организме человека и, в конечном итоге, остаться локализованными. Наночастицы с покрытием железа, адсорбированных на поверхности углерода, целесообразно используются в качестве магнитных носителей лекарственных препаратов, сопоставимы магнитно-резонансной томографией, биологическими метками и т. д. В качестве одного из наиболее важных материалов, наночастицы магнетита (магнитный железняк) (Fe_3O_4) привлекают большое внимание интересными магнитными свойствами и потенциальным применением в области биологии, фармацевтики и диагностики [94].

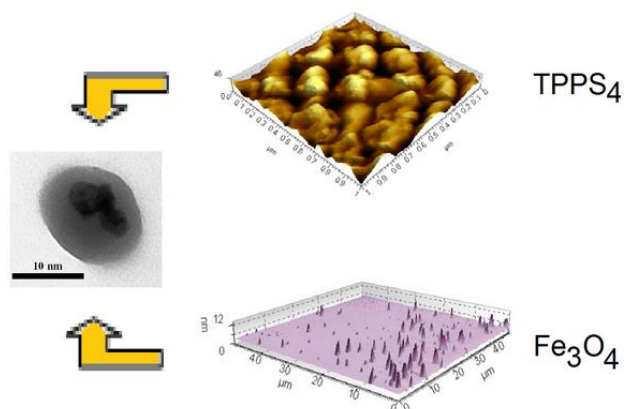


Рис. 10. Наночастицы Fe_3O_4 окруженные TPPS4 (слева), АФМ-микроскопия для TPPS4 (справа, сверху) и для Fe_3O_4 (справа, внизу) [94].

Магнетит Fe_3O_4 с наночастицами олеиновой кислоты был проанализирован при помощи ТЕМ (трансмиссионная электронная микроскопия), и была показана их сферическая форма с узким распределяющим размером. На рис. 10 представлена наночастица Fe_3O_4 , окруженная порфирином TPPS4, справа методом AFM (atomic-force microscopy - атомно-силовая микроскопия), показаны TPPS4 и Fe_3O_4 .

В качестве неорганических наноносителей также могут выступать частицы золота, серебра (представлено подробно в разделе 1.6.3), фуллерены, нанотрубки и другие.

Б). Органические наночастицы. Носители органической природы весьма разнообразны и включают целые классы органических полимеров, белков, липосом, дендримеров и даже вирусов. В настоящее время общая тенденция исследований в наномедицине это применение фотосенсибилизаторов для ФДТ с развитием светочувствительных наночастиц и модификацией фотосенсибилизаторов для улучшения эффекта фотодинамической терапии. ФС могут быть модифицированы их инкапсулированием в средства доставки, такие как липосомы [97], мицеллы [92] и полимерные наночастицы [174].

1.6.2. Мягкие наночастицы

1.6.2.1. Полимерные носители для доставки лекарств

Полимерные носители делятся на три группы:

А. Биоразлагаемые полимеры. В биологических условиях они разлагаются на нетоксичные продукты, которые выводятся из организма.

Б. Полимеры с сопряженными лекарствами (природные полимеры). Используемыми полимерами являются декстран, полиакриламиды и альбумины, у которых целевое лекарство контролируемо высвобождается при расщеплении комплекса лекарство-полимер в надлежащем месте.

В. Неразлагаемые полимеры. Они стабильны в биологических системах, и используются в качестве компонентов имплантируемых устройств для доставки лекарственных средств.

А. Биоразлагаемые полимеры

Биоразлагаемыми полимерами могут быть полимерные наночастицы, которые включают природные или синтетические биосовместимые полимеры такие как:

полисахариды, полимолочная кислота, полилактиды, полиакрилаты, полиалкильные цианоакрилаты, полиалкилвиниловые пирролидоны или акриловые полимеры. Одной из наиболее приемливых оказалась поли (молочная-ко-гликолевая кислота) (PLGA), которая показала несколько преимуществ по сравнению с другими биоразлагаемыми полимерами, которые обычно используются для доставки фотосенсибилизаторов [156] и стала самым популярным полимером для ФДТ. Количество 50:50 PLGA-наночастицы с порфирином m-THPP в качестве фотосенсибилизатора влияют не только на их фотодинамическую активность (большее количество - меньше активность), но также влияют на их взаимодействие с биологической средой (поглощение белками, клеточный захват или распределение в ткани) [36]. Другой важный полимер - поли (виниловый спирт) (PVA) - имеет определенное сродство к фотосенсибилизатору p-THPP, вызывает адсорбцию на поверхность наночастицы и приводит к высокой чистоте комплекса [26]. Многие из сенсibilизаторов второго поколения были инкапсулированы в полимерные наночастицы, например PLGA. Конкретным примером является бактериохлорофилл, инкапсулированный в PLGA, полученный по методу испарения растворителя. Были получены сферические частицы размером около 660 нм с эффективностью инкапсулирования 69% и высоким производством синглетного кислорода ($\phi = 0,26$) [153]. Другой синтетический фотосенсибилизатор, 5,10,15,20-тетракис (4-метоксифенил) порфирин (TMPP) был протестирован на модели хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона, показав более длительное время удерживания при инкапсулировании в наночастицы и улучшение сосудистых эффектов после облучения светом [140].

Б. Природные полимеры

Природными полимерами, представляющими особый интерес для доставки некоторых лекарственных средств, в том числе и фотосенсибилизаторов, являются полисахариды, которые включают хитозан, гиалуронан, декстран, целлюлозу, пуллулан, хондроитинсульфат и альгинат, и такие полимеры как казеин и желатин. Они нетоксичны, биосовместимы, биоразлагаемы и, в основном, гидрофильны. В качестве наночастиц — переносчиков лекарств чаще всего используются нижеследующие соединения.

Декстрансульфат представляет собой полисахарид, который состоит из линейных 1,6-связанных D-глюкопиранозных единиц с 2,3 сульфатными группами на глюкозильном

остатке, нетоксичен, водорастворим и биоразлагаем. Поскольку он носит отрицательный заряд, он используется для системы наночастиц доставки инсулина, основанный на комплексообразовании с противоположно заряженными полимерами [24].

Альгинатные/хитозановые наночастицы могут образовывать комплексы с катионными β -циклодекстрин полимерами. Некоторые полифенолы были захвачены в кальциево альгинатные шарики и была исследована их эффективность инкапсуляции и выхода в среду *in vitro* [161].

Альгинат линейный сополимер, состоящий из β -D-маннуроновой кислоты и α -L-гулууроновой кислоты, соединенных 1-4 гликозидной связью. Наиболее распространенным источником альгината является клеточная стенка бурых водорослей. Альгинат является биосовместимым, биоразлагаемым и нетоксичным полимером и имеет множество биомедицинских применений из-за реактивности его карбоксилатных боковых групп, его способности спонтанно гелеобразоваться при контакте с двухвалентными катионами, такими как кальций, и контролируемой доставки лекарств [23].

Хитозан (CS) представляет собой кополимер, состоящий из β (1 $\rightarrow$ 4)-linked 2-acetoamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose (Glc-NAc; A-unit)) и 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose (GlcN; D-unit) [142]. Основные группы аминов делают хитозан очень полезным в фармацевтической промышленности. Наночастицы CS доказали цитотоксические свойства на различных опухолевых клеточных линиях [133].

1.6.3. Гидрогели и бионеразлагаемые наночастицы

А. Гидрогели

Гидрогели – широко применяемый материал в биомедицине и фармацевтике, благодаря их уникальному свойству набухать и гидратированной структуре. Гели - макромолекулярные материалы промежуточные между твердыми и жидкими материалами. Эти гели составлены из комбинации локальных сшитых полимерных цепей. Структура этих гелей обладает свойством, связанным с набуханием путем включения растворителя. Если растворитель содержит воду в количестве более 20%, гель называется гидрогелем. Гидрогели эластичны по своей природе благодаря присутствию опорных конфигураций, которые находятся в гидрогеле даже после того, как были искривлены в течение определенного периода времени. Природные полимеры хитозан и альгинат наиболее изучены для

изготовления гидрогелевых наночастиц. Среди синтетических полимеров, которые использовались для того, чтобы высвободить включенные молекулы на основе наночастиц, наиболее часто использовали такие как poly (vinyl alcohol) PVA, poly (ethylene oxide) PEO, poly (ethylene imide) (PEI), polyvinylpyrrolidone (PVP), poly (N-isopropyl acrylamide).

Среди них, особенно важны гидрогели из поливинилового спирта благодаря их водорастворимости, нетоксичности, не канцерогенности и биологической разлагаемости. Гидрогели на основе поливинилового спирта (ПВС) характеризуются прозрачностью в трехмерной полимерной структуре и большим объемом поглощающей способности. Поливиниловый спирт имеет полу-кристаллический характер с приложениями для инкапсуляции и контролируемого высвобождения порфиринов, особенно для терапии раковых заболеваний. С порфирином 5,10,15,20-tetra-sulfonato-phenyl porphyrin (TPPS4) успешно проведена процедура его загрузки в гидрогель ПВС, эксперименты по сорбции, эффективности удерживания порфирина в гидрогеле и контролируемое высвобождение TPPS4 из гидрогеля [96]. ПВС становится более пористым и его поры становятся более большими после удерживания порфирина. Это наблюдается сильнее для TPPS4, чем для других порфиринов с меньшими размерами [141].

Б. Бионеразлагаемые наночастицы

По сравнению с биоразлагаемыми полимерными системами-носителями, бионеразлагаемые наночастицы имеют определенные преимущества: они очень устойчивы к колебаниям температуры и pH [32]; во время их приготовления можно управлять размером, формой, пористостью и моно-диспергируемостью частиц [178]; они не подвержены воздействию микробов [143]; крошечные поры в керамической частице, которые в диаметре 0,50 - 1,00 нм, слишком малы, чтобы позволить препарату выходить из матрицы, но достаточно велики, чтобы обеспечить эффективную диффузию кислорода в и из частицы [45]. Биоразлагаемые полимерные наночастицы деградируют с готовностью высвобождая фотосенсибилизаторы, в то время как оболочки в бионеразлагаемых частицах трудно распадаются. Тем не менее, поскольку эффективность ФДТ обусловлена производством $^1\text{O}_2$, нет необходимости, чтобы высвободить загруженные фотосенсибилизаторы, но важно, чтобы кислород мог диффундировать в и из наночастиц. Использование бионеразлагаемых наночастиц имеет некоторые преимущества по сравнению с их разлагаемыми аналогами.

Поскольку наночастица сохраняет свою целостность, фотосенсибилизатор имеет постоянную защиту от окружающей среды; кроме того, можно использовать наночастицы в качестве платформы, чтобы включать дополнительные функциональные возможности. Так, порфирин 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridino)porphyrin tetra(p-toluenesulfonate) был инкапсулирован в наночастицы на основе полиакриламида. Его фототоксичность в диапазоне инфракрасного излучения была продемонстрирована *in vitro* путем модуляции времени воздействия света [175].

Последние тенденции в использовании производных фуллеренов в медицине связаны с развитием наноплатформ, которые содержат препараты с различным составом, умеющие выполнять их селективную доставку к некоторым органам человека. Молекула фуллерена состоит из 60 атомов углерода, расположенных на сфере с диаметром приблизительно в один нанометр и напоминает футбольный мяч. Основные лекарственные мишени - это раковые клетки различных типов. Считается, что в этом аспекте фуллерены представляют большой интерес из-за их способности участвовать в образовании таких наноплатформ в нескольких ролях: как цитотоксический агент, а также наоборот, антиоксидантный (эти роли могут меняться в зависимости от накопления в разных органах и тканях); в качестве переносчика препаратов; в качестве фото- или радиосенсибилизатора (или защитника). Для использования в ФДТ были получены конъюгаты C60 с meso-aryl-porphyrin с длинными цепями заместителей, рис. 11 [41].

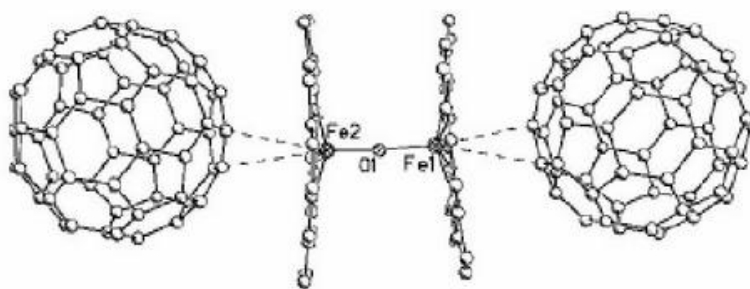


Рис. 11. Структура C60-(TPP-Fe)₂O [41]

Успех некоторых производных фуллеренов против ВИЧ, селективность к некоторым линиям раковых клеток, не повреждая здоровые ткани, говорит о многообещающей перспективе фуллеренов в области наномедицины.

1.6.4. Наночастицы серебра

Известно, что серебро - самый сильный естественный антибиотик из существующих на земле. Доказано, что серебро способно уничтожить более чем 700 видов бактерий, поэтому оно используется человеком для уничтожения различных микроорганизмов на протяжении тысячелетий. Коллоидное наносеребро - продукт, состоящий из микроскопических наночастиц серебра, взвешенных в деминерализованной и деионизированной воде. Типичные наночастицы серебра имеют размеры 20-25 нм. Они имеют чрезвычайно большую удельную площадь поверхности, что увеличивает область контакта серебра с бактериями или вирусами, значительно улучшая его бактерицидные действия. Таким образом, применение серебра в виде наночастиц позволяет в сотни раз снизить концентрацию серебра с сохранением всех бактерицидных свойств [83].

Действие серебра специфично не по инфекции (как у антибиотиков), а по клеточной структуре. Любая клетка без химически устойчивой стенки (такое клеточное строение имеют бактерии и другие организмы без клеточной стенки, например, внеклеточные вирусы) подвержена воздействию серебра. Поскольку клетки млекопитающих имеют мембрану совершенно другого типа (не содержащую пептидогликанов), серебро никаким образом не действует на них.

Однако до недавнего времени не было ясно, действие производят наночастицы серебра или ионы серебра. В течение почти десяти лет, исследователи обсуждали механизмы, с помощью которых Ag-наночастицы (AgNPs) оказывают токсичное действие на бактерии и другие организмы. Наиболее уклончивым был вопрос - оказывают ли AgNPs напрямую "частица-специфичные" эффекты. В работе, проведенной учеными из Университета Райса [183], было сделано заключение, что именно Ag^+ является молекулярным ядом (рис. 12). Исследователи исключили прямые частица-специфичные биологические эффекты, показывая отсутствие токсичности AgNPs при синтезе и тестируя в строго анаэробных условиях, исключаящих $\text{Ag} (0)$ окисление и Ag^+ выход. Было показано, что в полностью бескислородных условиях наночастицы не проявляли совершенно никакой токсичности по отношению к бактериям даже в концентрациях, достигающих 195 частей на миллион. Для сравнения: концентрации ионов серебра в 15 частей на миллиард достаточно, чтобы убить все присутствующие в растворе бактерии. Это означает, что токсичность наночастиц серебра

по меньшей мере в 7665 раз ниже токсичности его ионов. Или, говоря проще, она пренебрежима.

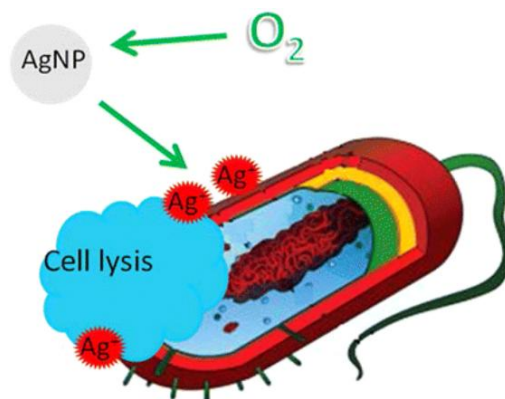


Рис. 12. Бактерия уничтожается ионами серебра, образовавшимися на поверхности наночастицы [183].

Как было отмечено в п. 1.5 в настоящее время фотодинамическая инактивация (ФДИ) микроорганизмов посредством фотосенсибилизаторов является одним из наиболее перспективных направлений для уничтожения антибиотик устойчивых микроорганизмов [95-97]. Одним из наиболее перспективных подходов усиления эффективности ФДИ микроорганизмов является применение наноконтейнеров из наночастиц благородных металлов (золота и серебра) [6]. Применение такой технологии в совокупности с конъюгацией в таких наноконтейнерах фотосенсибилизаторов (катионных порфиринов) может привести к значительному усилению эффективности ФДИ микроорганизмов вследствие бимодального действия таких нанокомпозиов [105]. Такой эффект происходит при освещении светом наночастиц: а) вследствие плазмонного резонанса и сильного нагрева наночастиц в местах их локализации и летального повреждения структур микроорганизмов, а также б) вследствие фотодинамического эффекта у порфиринов, приводящего к образованию губительного для микроорганизмов активных форм кислорода и в первую очередь синглетного кислорода.

Таким образом наночастицы серебра являются перспективным и эффективным подходом усиления фотодинамического действия как на микроорганизмы, а также вследствие их безопасности для клеток млекопитающих для фотодинамической терапии опухолей.

1.6.5. Наночастицы цеолита

Для усиления эффективности и целенаправленной доставки фотосенсибилизатора, наночастицы цеолитов среди других типов наночастиц занимают достойное место вследствие его инертности к клеткам млекопитающих и большой биологической активности [27, 154], противоопухолевого эффекта [147, 185], а также больших возможностей сорбции микроорганизмов [111] и комплексообразования с лигандами, в частности с порфиринами [53]. Цеолиты - это минералы вулканического происхождения, содержащие водные алюмосиликаты кальция, натрия, калия, бария и других микроэлементов, имеющие множество внутренних полостей и каналов (рис. 13).

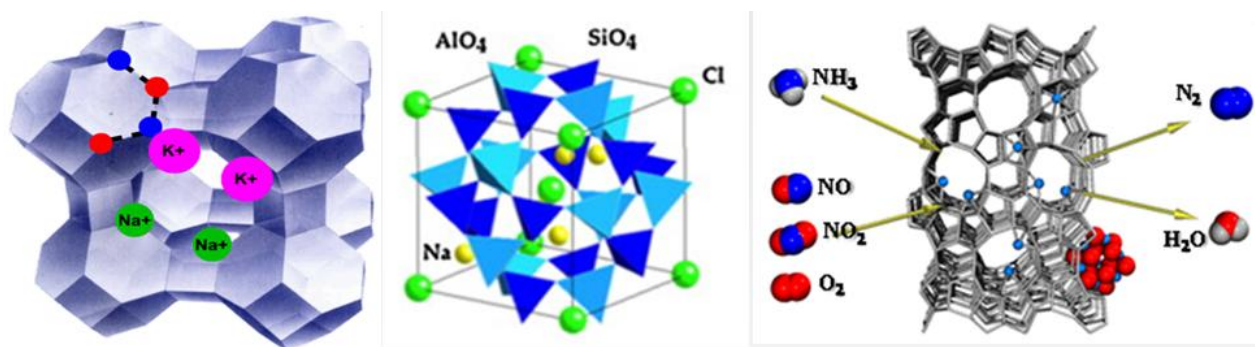


Рис. 13. Структура цеолита

Мировой объем добычи цеолитов составляет около 30 млн. тонн и ежегодно растет на 20-25%. Лидеры по применению минерала – Китай, Япония, США. В настоящее время самая активная добыча цеолитов ведётся в Китае. Китаю принадлежит около 65% мирового рынка этого минерала [7]. В Армении наиболее значительное месторождение цеолитов, 12 млн. тонн, это месторождение в Ноемберянском районе. Оно имеет минералы высокого качества и в них содержатся большое количество наиболее ценного из минералов цеолита - клиноптилолита (до 70-75 %) [14].

Значительное влияние на адсорбционные свойства цеолитов (адсорбционную емкость, ситовой эффект, селективность) оказывает химическая модификация [103, 58]. Интерес к этому явлению заключается в том, что с помощью химической модификации можно получить минералы с требуемыми параметрами для сорбции.

Антибактериальное действие цеолитов представлено в ряде исследований. Посредством иммобилизации серебряных наночастиц в цеолитные мембраны было показано, что такие структуры эффективно уничтожают *Escherichia coli* и обладают бактериостатическим действием против метициллин-устойчивого штамма *Staphylococcus aureus* [132]. Выход Ag^+ в раствор в первую очередь определяется ионной силой среды, и вследствие этого ионно-обменные процессы являются медиа-зависимыми. Недостатком этих препаратов являлось уменьшение антибактериального действия при их повторном применении. Большой цикл работ по включению различных порфиринов и металлопорфиринов в цеолиты был проведен с 1985 г. [43]. Начальные исследования комплексообразования порфиринов с цеолитами показали, что порфирины лучше связываются с внешней поверхностью цеолитов, чем инкапсулируются во внутренние поры [46]. Более поздние исследования показали, что катионные порфирины хорошо инкапсулируются во внутреннюю область цеолитов ионообменным механизмом, в то время как анионные порфирины не встраиваются, а нейтральные лишь в следовых количествах [186]. Аналогичные результаты были получены также нами: синтезированные в Армении катионные порфирины с зарядом +4 (Zn-TBut4PyP и Zn-TOEt4PyP) в значительных количествах связывались с полученными нами наночастицами цеолита (связывание порфиринов более 90%), тогда как анионный порфирин хлорин е6 связывался менее 30%, а анионный фотосенсибилизатор Al-фталоцианин практически не связывался [65]. Проведенные работы R. Ion и соавторов по включению фотосенсибилизаторов (порфиринов) в наночастицы цеолитов (клиноптилолитов) и достаточно высокая противораковая активность *in vitro* таких нанокомпозигов свидетельствует о большом потенциале таких нанокомпозигов [53].

Таким образом, в силу своей инертности по отношению к клеткам млекопитающих и высоких сорбционных и других важных характеристик, наночастицы цеолита могут представлять большой интерес как для ФДТ опухолей, так и для ФДИ микроорганизмов.

Завершая литературный обзор по фотофизическим и медико-биологическим свойствам порфиринов отметим резкое повышение интереса и соответственно публикаций в этом направлении, а также многообразие подходов и методов усиления фотодинамического действия порфиринов-фотосенсибилизаторов.

Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Порфирины и металлопорфирины

В работе были использованы новые катионные порфирины и металлопорфирины [(металло)порфирины], которые были синтезированы в Армении, на кафедре химии фармацевтического факультета Ереванского государственного медицинского университета (ЕГМИ) (более 100 соединений) [8, 171], имеющие ряд существенных отличий от других порфиринов. Наиболее важное отличие в том, что были разработаны методы синтеза, позволяющие получать соединения, в которых активные гидроксиэтил-, бутил- или аллил-периферические группы -R могут связываться в 3-м или 4-м положении пиридиньного кольца, а также что эти группы могут иметь разную степень гидрофобности (рис. 14). Эти соединения для использования в работе были предоставлены доцентом ЕГМИ, к.х.н. Р. К. Казаряном.

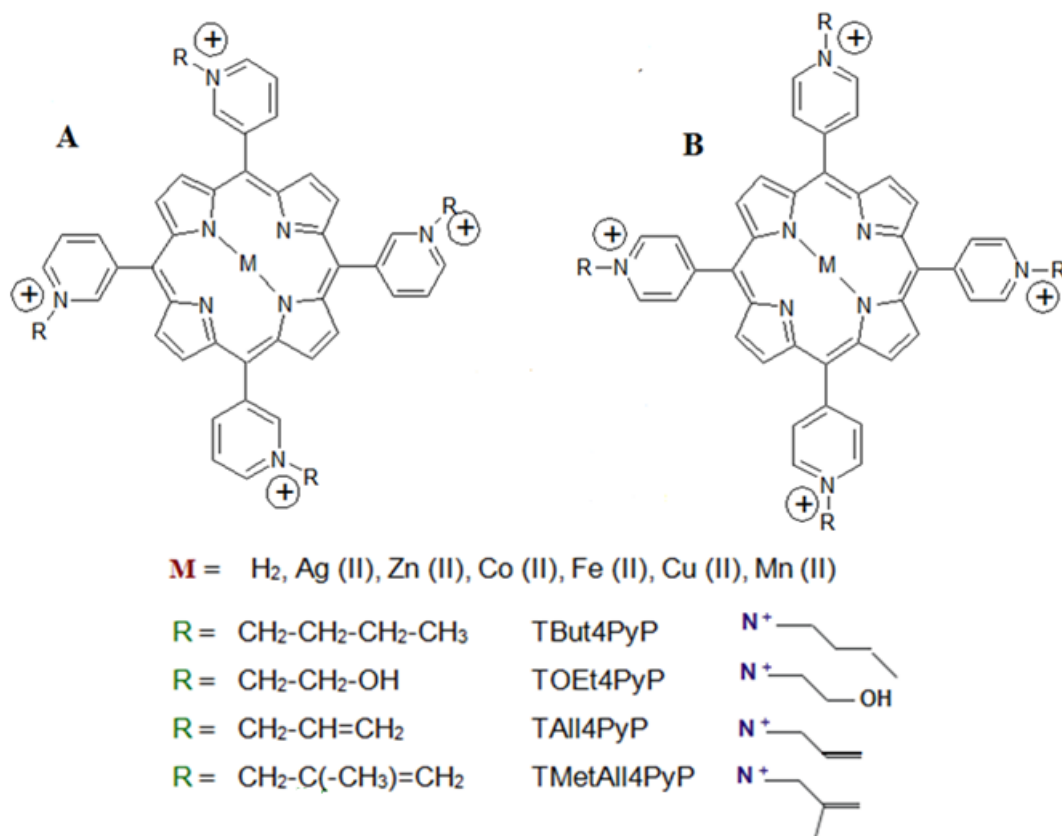


Рис. 14. Новые катионные порфирины и металлопорфирины с различными периферическими группами (-R) в 3-й (A) и в 4-й (B) позиции пиридиньного кольца. М - металл.

В работе также были использованы: известный катионный порфирин 5,10,15,20-тетракис[4-N-метилпиридил] порфирин (TM4PyP) (производство “Porphyrin systems” Co.,

Германия) [34], а также допущенные для применения в клиниках фотосенсибилизаторы: анионный порфирин хлорин е₆ (производство “Предприятие по производству диагностических и лекарственных препаратов”, Минск, Белоруссия) и анионный фотосенсибилизатор Al-фталочианин (препарат «Фотосенс», производство Научно-исследовательского института полупродуктов и красителей (НИОПИК), Москва, Россия).

Растворы исходных концентраций (10^{-3} М) (металло)порфиринов и других фотосенсибилизаторов готовили на дистиллированной воде и за час до эксперимента разбавляли до исследуемых концентраций. Все порфирин-содержащие растворы хранились при комнатной температуре или в холодильнике (не более 72 ч) в темноте во избежание фотохимических модификаций и фотообесцвечивания.

2.2. Спектральные исследования

Спектры поглощения порфиринов и наночастиц в ультрафиолетовой (UV) и видимой областях (VIS) регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV–VISIBLE Recording Spectrophotometer UV-2100 (Япония). Для исследований использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см с плотно закрывающимися крышками. В исследуемые растворы порфиринов добавление микроколичеств ($50 \div 200$ мкл) наночастиц серебра или цеолита проводили с использованием микрошприцов Hamilton Co. (США) или микропипеток с объемом 0,1 или 0,2 мл. Титрование производили через строго определенные промежутки времени и спектры регистрировали через 3 мин. после добавления наночастиц и сорбции порфиринов с образованием нанокомпозитов. В совместных исследованиях с лабораторией фотоники молекул Института физики НАН Беларуси в рамках гранта Беларусь-Армения (Проект 11РБ-016) и (Проект Ф11АРМ-017) спектры поглощения исследуемых веществ измерялись также на спектрофотометре МС 122 (Proscan, Беларусь).

Флуоресцентные спектры испускания растворов (металло)порфиринов и нанокомпозитов (наночастица-порфирин) регистрировали на спектрофлуориметре MPF-44 (Perkin Elmer, США) в диапазоне 400-850 нм (возбуждение при 420-440 нм) в 1 см кварцевой кювете. Комплексообразование порфиринов с наночастицами (серебра или цеолита) проводили титрацией раствора порфирина возрастающими концентрациями наночастиц и следили за изменениями спектров флуоресценции. Концентрации порфиринов изменяли от 2×10^{-7} до 2×10^{-6} с добавлением соответствующих концентраций наночастиц для образования

нанокмползтов (0 – 90 мин). Исследование процессов десорбции порфиринов с нанокмползтов проводили добавлением концентрированных растворов солей (5 М NaCl или 5 М CaCl₂) до конечной концентрации соли 0,3 М в растворе и следили за динамикой десорбции (0 – 60 мин) по спектрам испускания.

В совместных исследованиях с лабораторией фотоники молекул Института физики НАН Беларуси в рамках гранта Беларусь-Армения (Проект 11РБ-016) и (Проект Ф11АРМ-017) спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре, сконструированном в лаборатории фотоники молекул Института физики НАН Беларуси. Возбуждение порфиринов осуществлялось в спектральной области вблизи максимума полосы Sore. Спектры записывали в энергетическом режиме работы спектрофлуориметра, затем проводили их ручную коррекцию на спектральную чувствительность фотоэлектронного умножителя (ФЭУ). Использовался относительный метод определения квантовых выходов флуоресценции. Стандартом служил мезо-тетра-[N-метил-4-пиридил] порфирин тозилат (ТМе4РyР) в дистиллированной воде, для которого квантовый выход флуоресценции равен 0,044 [42]. В этой же работе показано, что растворённый в воде атмосферный кислород не влияет на флуоресцентные характеристики ТМе4РyР. Поэтому в работе удаление кислорода из исследуемых растворов не проводилось.

2.3. Определение квантового выхода синглетного кислорода

Интенсивность флуоресценции синглетного кислорода ¹O₂ пропорциональна количеству образовавшихся молекул [138]. Кинетические сигналы флуоресценции синглетного кислорода (¹O₂) в области 1270 нм регистрировали на спектрофлуориметре, сконструированном в лаборатории фотоники молекул Института физики НАН Беларуси. Образцы возбуждали лазерными импульсами с длительностью 10 нс и энергией не превышающей 1 мкДж, следующими с частотой 5 кГц на длине волны 532 нм (Nd:YAG-лазер DTL-314QT, Laser-export Co. Ltd, Россия). Для спектральной селекции флуоресценции использовался полосовой интерференционный фильтр с максимумом на 1272 нм и шириной на полувысоте 13 нм (“Аксикон”, Беларусь).

Сташевским А.С. с соавторами [15] на основе решения дифференциальных уравнений, описывающих процессы взаимодействия молекул фотосенсибилизатора и кислорода, были получены зависимости, из которых следовало, что: а) интенсивность флуоресценции I(t)

синглетного кислорода пропорциональна количеству образовавшихся молекул синглетного кислорода, б) квантовый выход образования синглетного кислорода γ_{Δ} зависит от концентрации синглетного кислорода $[^1\text{O}_2](t)$, числа квантов в возбуждающем лазерном импульсе ($[N_L]$) и оптической плотности D раствора фотосенсибилизатора. Из полученных результатов следует, что квантовый выход образования синглетного кислорода γ_{Δ} пропорционален количеству образовавшихся молекул синглетного кислорода $[^1\text{O}_2]$ и, определяя γ_{Δ} , мы фактически определяем эффективность фотосенсибилизатора (порфирина).

Наиболее распространенный метод определения величины квантового выхода синглетного кислорода - относительный, при котором сравниваются интенсивности инфракрасной флуоресценции ($\lambda = 1270$ нм) синглетного кислорода, образованного исследуемым сенсибилизатором и стандартом. В работе Сташевского с соавторами было показано, что интенсивность флуоресценции $I(t)$ синглетного кислорода линейно зависит от энергии лазерных импульсов (E_L), которыми возбуждался фотосенсибилизатор, и что для определения квантового выхода синглетного кислорода справедливо соотношение:

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

где a_1 – тангенсы углов в зависимости $I_0/(1 - 10^{-D}) = a_1 E_L$, D – оптическая плотность раствора фотосенсибилизатора [15]. В соотношении (1) индекс “st” относится к стандартному порфируну ТМ4РуР, для которого в воде $\gamma_{\Delta}^{\text{st}} = 0,77$ [61]. Вышеописанным методом совместно с коллегами из лаборатории фотоники молекул Института физики НАН Беларуси был определен квантовый выход синглетного кислорода ряда новых катионных (металло)порфиринов, что отражено в работе [15] и Главе III (п. 3.1.2.).

2.4. Определение фотообесцвечивания (металло)порфиринов.

Фотообесцвечивание растворов (металло)порфиринов определяли под воздействием двух источников света: 1) вольфрамовой лампы накаливания 50 Вт с мощностью излучения 30 мВт/см^2 ; и 2) солнечного света с мощностью облучения около 70 мВт/см^2 , как описано в работе [68]. Интенсивности поглощения растворов регистрировали спектрально при длине волны полосы Соре для каждого порфирина (420-440 нм). Число измерений оптической

плотности проводили в пяти независимых экспериментах с дальнейшим усреднением полученных величин.

2.5. Микроорганизмы

Грамм (+) микроорганизмы (метициллин-чувствительный штамм микроорганизма *Staphylococcus aureus* 209 P (MSSA) и MRSA - метициллин устойчивый *S. aureus*) были получены из коллекции микроорганизмов Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича (Москва, Россия). Грамм (+) микроорганизм (*S. aureus*) также был выделен и получен из раны пациентов (Институт эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А. Алексаняна, Ереван, Армения). Грамм (-) микроорганизм (*E. coli*, штамм K-12) был получен из коллекции "Институт биотехнологии" НАН Армении (Ереван, Армения). Микроорганизмы были выращены аэробно в L-бульоне Luria-Bertani (LB) [121] на орбитальной качалке при 32-37°C. После 18-20 часов на стационарной фазе роста микроорганизмов их собирали центрифугированием при 4000 оборотов в минуту в течение 10 мин, дважды промывали фосфатным буферным (PBS) pH 7,4 и суспендировали в том же буфере PBS до оптической плотности соответствующей 1×10^9 КОЕ/мл (КОЕ - колониеобразующие единицы). Оптическую плотность клеточных суспензий измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-VISIBLE Recording Spectrophotometer UV-2100 (Япония), при длине волны 670 нм.

Выживаемость микроорганизмов определяли методом последовательных разведений по Миллеру [9]. Суспензии микроорганизмов последовательно 10-ти кратно разбавляли фосфатным буфером (PBS) pH 7,4 и далее вносили по 10 мкл из каждого разбавления на питательную среду (мясо-пептонный агар /МПА/ или L-агар) в чашках Петри (по 5 повторов) и инкубировали при 37°C в аэробных условиях. Число колониеобразующих единиц (КОЕ) у штаммов микроорганизмов на чашках Петри подсчитывали после 24 ч инкубации. Выживание было подсчитано в процентах относительно к контрольному образцу без добавления фотосенсибилизатора. Контроль для каждой пробы предварительно был взят перед облучением. Выживание микроорганизмов также определяли в пробах после облучения, в отсутствии ФС, и в пробах после инкубации в темноте с фотосенсибилизатором.

2.6. Цитотоксичность (темновая токсичность) и фототоксичность металлопорфиринов

Токсическое действие (металло)порфиринов на Грам (+) и Грам (-) микроорганизмы определяли путем измерения степени ингибирования роста и уменьшения числа клеток, выживших после обработки порфиринами в темновых условиях (цитотоксичность) или при освещении светом (фототоксичность). 1 мл образца содержал 0,9 мл суспензии соответствующего микроорганизма в LB среде, к нему добавляли 0,1 мл раствора исследуемого порфирина, в результате чего конечная концентрация клеток составляла 10^8 - 10^9 клеток/мл. **В темновых условиях** 1 мл клеточной суспензии с фотосенсибилизатором в концентрации между 0,01 и 100 мкг/мл инкубировали при 32-37⁰ С в течение 22-24 ч. Выживаемость микроорганизмов определяли по модифицированной версии метода Miles и Misra [126]. Для этого суспензии последовательно 10-тикратно разбавляли буфером PBS. Затем капли суспензионных клеток по 10 мкл каждого разбавления помещали в чашки Петри с агаром и инкубировали при 32-37⁰ С в аэробных условиях. После 18-20 ч подсчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ). Процент выживаемости рассчитывали делением количества КОЕ клеток, инкубированных с фотосенсибилизатором, на количество КОЕ контроля. **Для определения фототоксичности (металло)порфиринов** (фотодинамическая инаktivация микроорганизмов) после добавления фотосенсибилизатора в суспензию клеток, пробы инкубировали в течении 10 мин в темноте, далее облучали светом 30 мин (30 мВт/см²) и инкубировали при 30-37⁰ С с перемешиванием в течение 22-24 ч. Выживаемость микроорганизмов определяли как и для темновых условий. Процент выживаемости проводили путем подсчета КОЕ клеток, инкубированных с фотосенсибилизатором после облучения, их делением на количество КОЕ клеток, инкубированных с фотосенсибилизатором перед облучением.

2.7. Культуры раковых клеток: цитотоксичность и фототоксичность (металло)порфиринов.

Исследования проводили на монослойной (HeLa - клетки эпителия рака шейки матки, Институт урологии и нефрологии, Великобритания) и суспензионной (K-562 – лимфобласты хронической миелоидной лейкемии) культурах раковых клеток человека. Обычная питательная среда для клеток: DMEM или RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 mM L-глутамина, 100 ME/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37⁰С.

2.7.1. Оценка темновой токсичности (металло)порфиринов. Темновую токсичность порфиринов оценивали тестом исключения витального красителя (трипановый синий; Sigma-Aldrich, Германия) [164]. По этой технике идентифицируются мертвые клетки с нарушениями целостности клеточной мембраны и оценивается количество живых клеток. Клетки высевали в 15-мл стеклянные флаконы с плотностью около $0,5-0,6 \times 10^6$ клеток/мл (1 мл суспензии клеток в каждом флаконе), инкубировали в течение 48 час, а затем порфирины, растворенные в дистиллированной воде, при различных концентрациях были добавлены в клеточные культуры. После дальнейшей инкубации в течение 48 часов определяли число жизнеспособных клеток. Клетки окрашивали 0,4% раствором трипановый синий в течение 5-15 мин и подсчитывали в гемоцитометре под световым микроскопом. Монослойные клетки (прикрепляющиеся клетки, клеточная линия HeLa) заранее были откреплены раствором трипсин-ЭДТА (Sigma-Aldrich, Германия). Жизнеспособность клеток выражали в процентах от отрицательного контроля (культура клеток без добавления порфиринов в темновых условиях). Дозы порфиринов, вызывающие 50% и 100% ингибирование жизнеспособности клеток (величины IC_{50} и IC_{100} соответственно) были определены для всех исследованных клеточных линий.

2.7.2. Оценка фотодинамической (световой) токсичности (металло)порфиринов. Клетки культуры K-562 высевали в 15 мл стеклянных флаконах (1 мл клеточной суспензии в флаконе), инкубировали в течение 48 час, далее добавляли различные концентрации (металло)порфиринов, растворенных в дистиллированной воде. После 30 мин преинкубации клеточные культуры облучали в течение 30 минут с использованием вольфрамовой лампы (30 мВт/см^2) со стеклянным фильтром (область пропускания света 600-900 нм). Далее клетки инкубировали в течение 48 ч и число жизнеспособных клеток определяли по методу исключения витального красителя как в п. 2.7.1. Отрицательным контролем были освещенные клеточные культуры без порфиринов. Жизнеспособность клеток выражали в процентах от контроля. Значения IC_{50} и IC_{100} определяли на основе анализа кривых выживаемости клеток в %.

2.8. Получение наночастиц цеолита. Для получения наночастиц использовали цеолитный минерал - клиноптилолит (Ноемберянский район, Республика Армения), содержание которого в минерале природного цеолита около 70-80 %. Наночастицы цеолита

(клиноптилолита) получали путем механического дробления цеолита на модифицированной дробилке типа дисмембратор (мельница типа дисмембратор марки ИЛА-3, Россия) и дальнейшей седиментацией в водном растворе [13, 158]. На определенной высоте водяного столба отбирали наночастицы размерами 80-130 нм. Размер наночастиц контролировали лазерным анализатором наночастиц типа IG-1000 (Shimadzu, Япония) либо методом электронной микроскопии. Для использования концентрацию наночастиц доводили дистиллированной водой до величины 0,66 мг/мл.

2.9. Наночастицы анизотропного серебра были приобретены у фирмы “БИОВАР” ООО (Армения) с концентрацией 10^{11} - 10^{12} наночастиц в 1 мл раствора (размер наночастиц от 80 до 120 нм). Раствор наночастиц анизотропного серебра имел зелено-синеватый цвет с двумя характерными широкими максимумами поглощения около 410 нм и 660 нм.

2.10. Статистический анализ. Для построения, сглаживания диаграмм и обработки статистических данных (средняя величина, стандартное отклонение) использовали программы Microsoft Excel и Origin 7.0 (OriginLab Corporation). Достоверность различий средних значений параметров оценивали по t -критерию Стьюдента. Различия между выборками считали достоверными при $P \leq 0,05$.

Глава III

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Условно результаты исследований представленной работы можно разделить на две части: изучение фотофизических свойств порфиринов и исследование медико-биологических аспектов действия порфиринов, которые можно представить как этапы следующих исследований:

3.1. Фотофизические свойства катионных (металло)порфиринов

3.1.1. Фотообесцвечивание катионных (металло)порфиринов

3.1.2. Квантовый выход генерации синглетного кислорода (металло)порфиринами

3.2. Фотодинамическая инактивация микроорганизмов катионными (металло)порфиринами *in vitro*

3.3. Фотодинамическое поражение раковых клеток катионными (металло)порфиринами *in vitro*

3.4. Образование комплексов катионных (металло)порфиринов с наночастицами

3.4.1. Нанокompозиты катионных (металло)порфиринов с наночастицами цеолита

3.4.2. Нанокompозиты катионных (металло)порфиринов с наночастицами серебра

Вышепредставленные этапы исследований были проведены для новых водорастворимых катионных (металло)порфиринов (Глава II) в сравнении с известными и применяемыми в настоящее время в медицинской практике анионным порфирином хлорин е6 (Республика Беларусь) и анионным фотосенсибилизатором Al-фталоцианин (препарат “Фотосенс”, Российская Федерация).

3.1. Фотофизические свойства катионных (металло)порфиринов

Как было отмечено в Главе I, п. I.3, исключение фотообесцвечивания фотосенсибилизаторов (порфиринов) является необходимым условием успешного проведения ФДТ опухолей и фотоинактивации микроорганизмов.

3.1.1. Фотообесцвечивание катионных (металло)порфиринов

Известно, что основным действующим агентом на онкологические клетки и микроорганизмы является синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), образующийся в растворе при действии света на порфирины (фотодинамическая реакция). Порфирины флуоресцируя передают энергию на триплетный кислород ($^3\text{O}_2$) с переходом последнего в синглетное состояние ($^1\text{O}_2$) [34, 9]. Именно синглетный кислород производит фотодеструктивное действие на клетки, бактерии, вирусы и др. биологические объекты [34, 81, 50]. При продолжающемся фотодеструктивном процессе может происходить фотообесцвечивание - уменьшение флуоресценции фотосенсибилизатора под действием света или лазерного излучения. Показано, что главная роль в фотообесцвечивании порфиринов принадлежит синглетному кислороду, фотогенерированному самими порфиринами [88].

Фотообесцвечивание является одним из наиболее важных процессов, который характеризует устойчивое, стабильное состояние фотосенсибилизатора (порфирина) при воздействии света. При исследовании явления фотообесцвечивания Rotomskis R. и др. показали, что при освещении гематопорфирина, мезо-тетрафенилпорфирин тетрасульффоната и производных гематопорфирина в водном растворе одновременно происходит два процесса: фотодеградация и образование устойчивых фотопродуктов, поглощающих в красной области спектра [155]. В случае гематопорфирина и его производных, эти фотопродукты имеют максимум поглощения около 640 нм (фотопродукт 640). Первый процесс, фотодеградация, определяется по обесцвечиванию (уменьшению интенсивности поглощения и флуоресценции порфирина). Фотодеградация слабо зависит от pH и становится доминирующей, когда формирование фотопродукта достигает насыщения. В большинстве случаев, фотодеградацию можно объяснить как открытие порфиринового кольца, что приводит к увеличению поглощения света в ультрафиолетовой области. На основании этих спектроскопических исследований, предполагается, что фотопродукт 640 представляет собой молекулы типа хлорина, которые формируются преимущественно из агрегатов порфиринов.

Исследования эффективности порфиринов на культуру клеток и микроорганизмы, обычно проводятся под действием света (лазер или вольфрамовая лампа) в течение довольно длительного времени (30 минут или более). В этой связи, было исследовано явление фотообесцвечивания, т.е. влияние света на ряд порфиринов и металлопорфиринов [68]. Эти

исследования были проведены для 2-х порфиринов (TOEt4PyP и TBut4PyP) и их цинк-содержащих порфиринов (Zn-TOEt4PyP and Zn-TBut4PyP), а также для известных фотосенсибилизаторов - Al-фталоцианина и хлорин е6 (Таблица 1 и Рис. 15).

Таблица 1.*

Фотообесцвечивание растворов порфиринов при облучении лампой накаливания (отмечены-р) и солнечным светом (отмечены-s). Приведенные в таблице значения соответствуют оптической плотности растворов с концентрацией 10^{-5} М

NN		0' min.	1'	5'	15'	30'	60'	%
1	TOEt4PyP-s	1,93	1,92	1,93	1,9	1,84	1,76	91
1	TOEt4PyP-p	1,98	2	2	2	2,01	2	101
2	Zn-TOEt4PyP-s	1,5	1,48	1,46	1,41	1,37	1,24	83
2	Zn-TOEt4PyP-p	1,56	1,56	1,58	1,58	1,57	1,55	99
3	TBut4PyP-s	1,46	1,42	1,4	1,32	1,24	1,15	79
3	TBut4PyP-p	1,44	1,43	1,42	1,41	1,4	1,37	95
4	Zn-TBut4PyP-s	1,55	1,55	1,53	1,49	1,43	1,35	87
4	Zn-TBut4PyP-p	1,77	1,77	1,77	1,76	1,75	1,73	98
5	Al-phthalocyan-s	1,33	1,35	1,36	1,39	1,41	1,45	109
5	Al-phthalocyan-p	1,42	1,42	1,42	1,42	1,43	1,47	104
6	Chlorin e6-s	1,65	1,57	1,41	1,15	0,95	0,84	51
6	Chlorin e6-p	1,67	1,61	1,54	1,42	1,3	1,15	69

*Приведены среднестатистические значения пяти независимых экспериментов (n =5).

Среднее квадратическое отклонение величин не превышает 5%. $P \leq 0,05$

Исследование динамики фотообесцвечивания растворов порфиринов проводили при двух режимах: 1) облучении лампой накаливания 50 Вт с диапазоном излучения 350 нм - 1100 нм (мощность излучения 30 мВт/см^2) и 2) воздействии солнечного света (мощность облучения около 70 мВт/см^2). В таблице справа представлены интенсивности поглощения после 60 мин облучения в % от исходного поглощения (0 минут). Интенсивности поглощения регистрировали спектрально на длине волны полосы Соре для каждого порфирина (420-440 нм). Каждое значение в таблице представляет собой среднее число измерений оптической плотности пяти экспериментов. Следует отметить, что для генерации активных форм кислорода фотосенсибилизаторами, в частности синглетного кислорода, необходимым и достаточным условием является облучение мощностью 30 мВт/см^2 (94 кДж, рис. 8), которое обеспечивает применяемая вольфрамовая лампа накаливания. Естественно, можно было ожидать, что при воздействии на растворы порфиринов более мощного

облучения солнцем, по сравнению с лампой накаливания, может произойти фотообесцвечивание. И действительно, в этом случае у растворов порфиринов происходит падение интенсивности поглощения (в таблице 1 приведено в последнем столбце в процентах). В таблице эти данные для каждого (металло)порфирина приводятся попарно с индексами s (действие солнца) и p (действие лампы). Так, для порфирина TOEt4PyP (для этого фотосенсибилизатора эта пара приводится первыми и обозначена цифрами 1 и снова 1) падение интенсивности поглощения наблюдается только при воздействии солнечного излучения (с 1,93 до 1,76), тогда как при действии светом лампы фотообесцвечивание не наблюдается (101 % - это суммарные ошибки эксперимента).

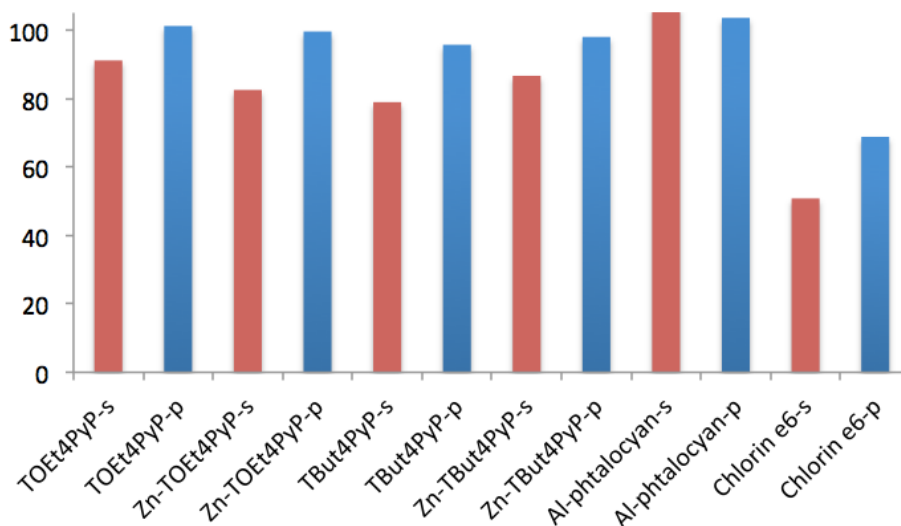


Рис. 15. Фотообесцвечивание (мталло)порфиринов, Al-фталоцианина и хлорина е6 при двух режимах освещения: действие на растворы препаратов 1) света вольфрамовой лампы (отмечено-p) и 2) солнечного света (отмечено-s). По оси ординат в % показана интенсивность поглощения через 60 мин экспозиции для двух режимов: красным цветом - при действии солнца, синим цветом - при действии лампы. Стандартное отклонение измерений не превышает 5%, приводится среднее число пяти экспериментов измерений оптической плотности. $n = 5$; $p < 0,05$.

Из результатов, представленных в таблице 1 следует, что для всех (металло)порфиринов, а также фотосенсибилизатора Al-фталоцианин при облучении вольфрамовой лампой с мощностью облучения 30 мВт/см^2 60 минут или более фотообесцвечивания практически не происходит (интенсивность поглощения света

растворами сохраняется на уровне 95-100%). Под действием же солнечного света (мощность облучения около 70 мВт/см²) растворы (металло)порфиринов частично фотообесцвечиваются (при облучении 60 мин интенсивность поглощения растворов падает на 9% - 21%). Поскольку дальнейшие эксперименты проводили при облучении растворов лампой мощностью 30 мВт/см² и менее 60 минут, то можно считать, что удовлетворялось условие исключения фотообесцвечивания (металло)порфиринов.

Как было отмечено выше, согласно работе [155] фотообесцвечивание можно объяснить открытием порфиринового кольца, что приводит к увеличению поглощения света в ультрафиолетовой области. В спектрах поглощения (металло)порфиринов это явление также наблюдалось и нами: после облучения в УФ-области спектров растворов порфиринов происходит значительное увеличение поглощения (в области 210-230 нм).

Для фотосенсибилизатора хлорина е6 при обоих режимах наблюдается значительное фотообесцвечивание и использование этого фотосенсибилизатора рекомендуется проводить со строгой защитой от света.

Таким образом, можно прийти к заключению, что катионные (металло)порфирины при облучении лампой накаливания (мощность облучения 30 мВт/см²) фотообесцвечиванию не подвергаются.

3.1.2. Квантовый выход генерации синглетного кислорода (металло)порфиринами

Исследования квантового выхода генерации синглетного кислорода были проведены с порфиринами и Zn-содержащими порфиринами, имеющими в 3-м или 4-м положениях пиридинного кольца активные оксиэтил-, бутил- или аллил- периферические группы R (Рис. 10). В частности были исследованы нижеследующие (металло)порфирины:

- мезо-тетра-[N-оксиэтил-3-пиридил] порфирин (TOEt3PyP);
- мезо-тетра-[N-бутил-3-пиридил] порфирин (TBut3PyP);
- мезо-тетра-[N-оксиэтил-4-пиридил] порфирин (TOEt4PyP); Zn-TOEt4PyP
- мезо-тетра-[N-бутил-4-пиридил] порфирин (TBut4PyP); Zn-TBut4PyP
- мезо-тетра-[N-аллил-4-пиридил] порфирин (TAl4PyP); Zn-TAl4PyP.

На рис. 16 представлены их спектры поглощения (слева) и флуоресценции (справа) при концентрациях 10^{-5} – 10^{-6} М.

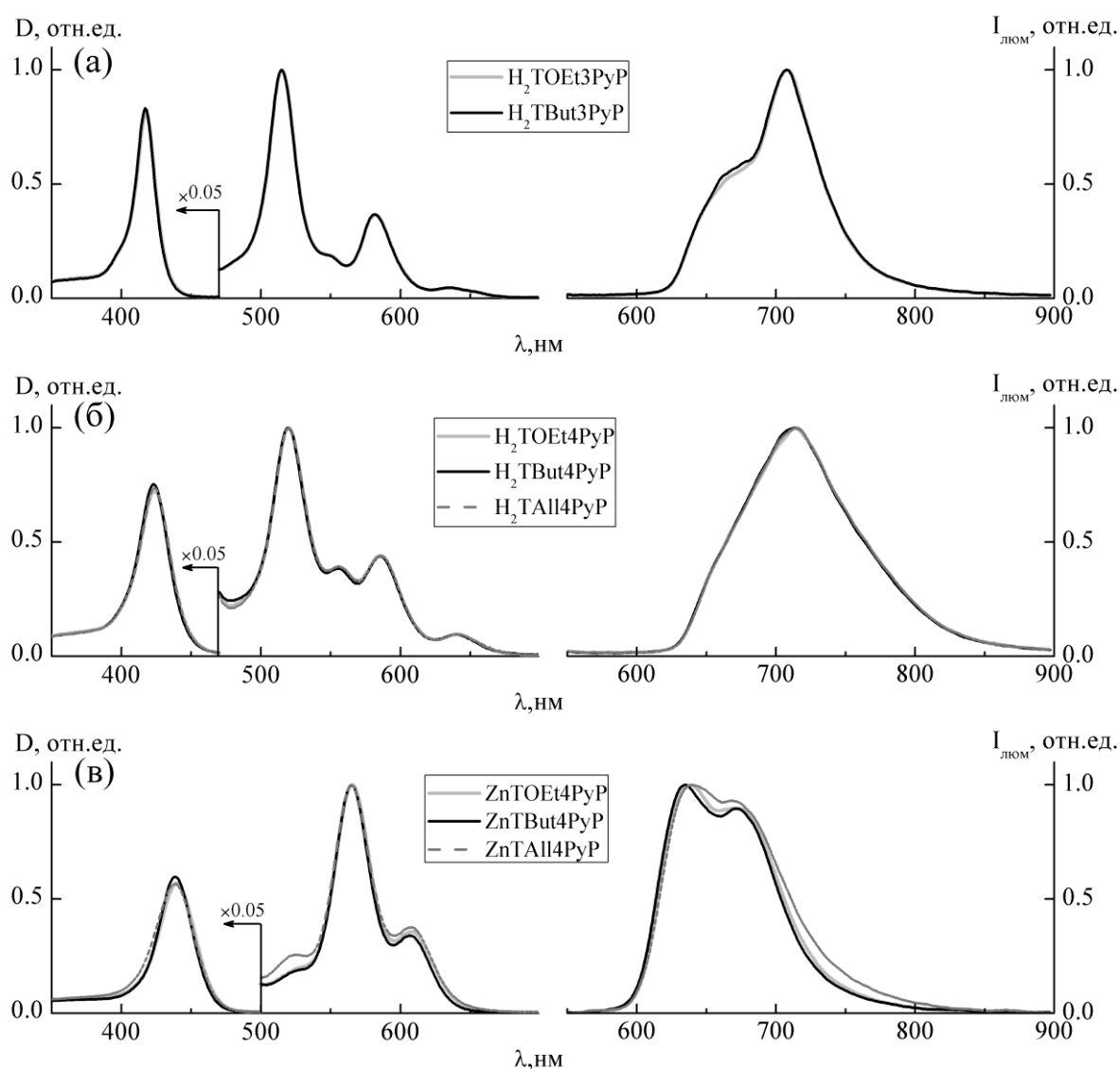


Рис. 16. Нормированные спектры поглощения (слева) и флуоресценции (справа) водных растворов исследованных свободных оснований [3-пиридил] и [4-пиридил] порфиринов (а) и (б), а также [4-пиридил] Zn-порфиринов (в). Спектры флуоресценции (а) и (б) детектировались при возбуждении на 418 нм, (в) – при возбуждении на 429 нм.

Анализ спектров поглощения и флуоресценции (рис. 16) позволяет разделить исследуемые соединения условно на три группы: свободные основания [3-пиридил]порфиринов, свободные основания [4-пиридил]порфиринов и Zn-комплексы [4-пиридил]порфиринов. В каждой группе химическая структура заместителя существенно не влияет на контуры и соотношения интенсивностей полос в спектрах поглощения (рис. 16). Из рисунка 16 и таблицы 2 можно отметить, что для свободных оснований переход от [3-

пиридил]- к [4-пиридил]порфиринам сопровождается сдвигом максимумов полос в спектрах поглощения в длинноволновую сторону на 5-23 нм.

Как было отмечено в Главе I, п. 1.4, при фотодинамических процессах (ФДТ опухолей, а также ФДИ микроорганизмов) наиболее важным показателем эффективности фотосенсибилизатора является количество генерируемого синглетного кислорода. В соответствии с схемой Яблонского электронных переходов возбужденных фотосенсибилизаторов и образования синглетного кислорода (рис. 8) этот показатель связан с интенсивностью флуоресценции ФС. Интенсивность флуоресценции данного вещества определяется количеством поглощенного света и квантовым выходом флуоресценции [20]. Это дает возможность применять фотосенсибилизаторы не только для ФДТ терапии опухолей, но и для диагностических целей в онкологии, что отражено в диаграмме энергетического состояния молекул порфиринов и их возможного применения [14, 10] (рис. 16).

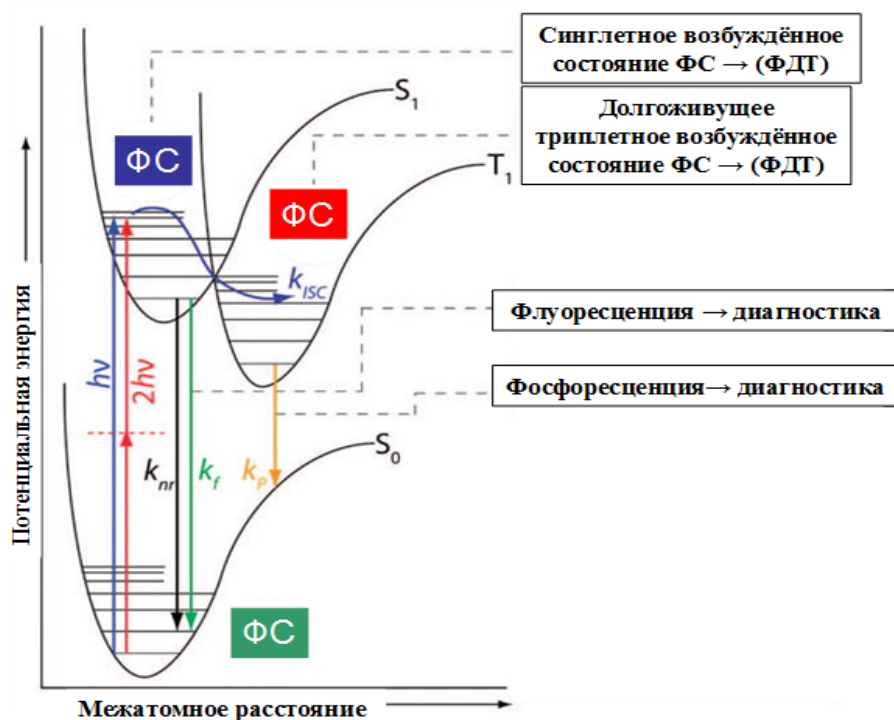


Рис. 16. Диаграмма порфириновых молекул (фотосенсибилизаторов) в возбуждённых состояниях S₁ и T₁ и их потенциальные применения [11].

Для порфиринов, как и для подавляющего числа фотосенсибилизаторов, образование синглетного кислорода является результатом взаимодействия молекул фотосенсибилизатора

в возбуждённом триплетном состоянии T_1 и кислорода. Для теоретического описания данного процесса необходимо составлять уравнения временных зависимостей концентраций как для фотосенсибилизатора в триплетном состоянии $[T_1]$, так и кислорода в синглетном состоянии $[^1O_2]$. Эти исследования нами были проведены совместно с Лабораторией фотоники молекул Института физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси в рамках грантов Армения-Беларусь № 11 РБ-016 и № Ф11 АРМ-017 и были отражены в соответствующих публикациях [68, 14, 10]. На основе решения дифференциальных уравнений, описывающих эти процессы, были получены зависимости, из которых следовало: а) интенсивность флуоресценции $I(t)$ синглетного кислорода пропорциональна количеству образовавшихся молекул синглетного кислорода, б) квантовый выход образования синглетного кислорода γ_Δ зависит от концентрации синглетного кислорода $[^1O_2](t)$, числа квантов в возбуждающем лазерном импульсе ($[N_L]$) и оптической плотности D раствора фотосенсибилизатора согласно уравнению [15]:

$$[^1O_2](t) = \gamma_\Delta [N_L] (1 - 10^{-D}) \tau_\Delta \{ \exp(-t/\tau_\Delta) - \exp(-t/\tau_T) \} / \{ \tau_\Delta - \tau_T \} \quad (2)$$

где $\tau_\Delta = 1/k_\Delta$ и $\tau_T = 1/k_T$ - определяемые константы. Из выражения (1) следует, что $\gamma_\Delta \sim [^1O_2]$, т.е., что квантовый выход образования синглетного кислорода γ_Δ пропорционален количеству образовавшихся молекул синглетного кислорода и, определяя γ_Δ , мы фактически определяем эффективность фотосенсибилизатора (порфирина).

В это выражение входит γ_Δ и наиболее распространённый метод определения величины γ_Δ - относительный, при котором сравниваются интенсивности флуоресценции синглетного кислорода в инфракрасной области спектра ($\lambda \sim 1270$ нм), образованного исследуемым фотосенсибилизатором и стандартом. Было также показано, что 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 $I_0/(1 - 10^{-D}) = a_1 E_L$, и где D - оптическая плотность раствора фотосенсибилизатора. Здесь индекс "st" относится к стандартному порфируну ТМс4РуР, для которого в воде $\gamma_\Delta^{st} = 0,77$ [61]. В соответствии с выражением (1) были определены квантовые выходы образования синглетного кислорода γ_Δ для ряда порфиринов и металлопорфиринов (Таблица 2).

Таблица 2.*

Квантовые выходы образования синглетного кислорода γ_{Δ} , а также положения (λ , нм) и интенсивности (A , отн. ед.) максимумов поглощения полосы Соре (металло)порфиринов в воде при 20⁰ С.

Соединение	γ_{Δ}	λ , нм	A , отн. ед.
TMe4PyP	0,77	424	1,42
TOEt3PyP	0,78	418	1,63
TBut3PyP	0,78	417	1,67
TOEt4PyP	0,77	424	1,45
TBut4PyP	0,79	423	1,51
TAll4PyP	0,75	424	1,47
ZnTOEt4PyP	0,85	440	1,14
ZnTBut4PyP	0,97	438	1,20
ZnTAll4PyP	0,86	438	1,13

*Приведены среднестатистические значения пяти независимых экспериментов ($n=5$). Среднее квадратическое отклонение величин не превышает 5%. $P \leq 0,05$

Из таблицы 2 видно, что по сравнению с известным фотосенсибилизатором 5,10,15,20-тетракис (4-N-метилпиридил) порфирином (TMe4PyP), синтезированные новые катионные (металло)порфирины имеют значительно более высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода (0,97). Отметим, что значения для Zn-производных порфиринов значительно выше, чем у свободных оснований, из-за увеличения эффективности интеркомбинационной (внутрисистемной) конверсии (ИКК), когда атом металла включается в порфириновый макроцикл [15].

Как будет показано далее (п. III.2), эти данные находятся в хорошем соответствии с их действием на микроорганизмы - была показана значительно более высокая эффективность поражения микроорганизмов Zn-производными порфиринов.

Из проведенных экспериментов по фотофизическим свойствам (металло)порфиринов можно сделать следующие заключения:

1. Новые катионные (металло)порфирины имеют высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода,

2. Zn-производные порфиринов обладают значительно более высоким квантовым выходом генерации синглетного кислорода (до 0,97) по сравнению со свободными основаниями порфиринов (0,75-0,78) и с известным порфирином TMe4PyP (0,77).

3.2. Фотодинамическая инактивации микроорганизмов катионными

(металло)порфиринами *in vitro*

Среди большого класса фотосенсибилизаторов катионные фотосенсибилизаторы (порфирины) являются наиболее эффективной формой соединений, широко применяемых в фотодинамической терапии опухолей и фотодинамической инактивации микроорганизмов [124, 74, 152, 113, 47, 169]. Для увеличения фотодинамической активности разных фотосенсибилизаторов использовались различные способы. Различные типы нейтральных и анионных порфиринов демонстрируют хорошую фототоксичную активность в отношении Грам (+) микроорганизмов, но не оказывают заметную цитотоксическую и фототоксичную активность против Грам (-) микроорганизмов, если только проницаемость внешней мембраны не изменяется при обработке этилендиамин тетра-уксусной кислотой или антибиотиком полимиксин, в основе которого нанопептид [31, 136]. В то же время, катионные (металло)порфирины эффективно инактивируют Грам (-) микроорганизмы без необходимости модификации естественной структуры клеточной оболочки [123, 127]. Было показано, что Грам (+), Грам (-) микроорганизмы и грибы без какой либо обработки можно успешно фотодинамически инактивировать катионными фотосенсибилизаторами: 5-фенил-10,15,20-трис (N-метил-4-пиридил) порфирином [124, 112] или толуидин синим [107]. В этой части исследований, была изучена эффективность 9 различных новых катионных порфиринов и металлопорфиринов с различными периферическими группами против клинически интересных штаммов Грам (+) (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*) и Грам (-) (*E.coli*, *Salmonella sp.*) бактерий [72]. Эти микроорганизмы вызывают также значительный интерес в связи с тем, что размножаясь в пище (мясо, овощи, фрукты и т.д.) выделяют токсины (например, Verotoxin), представляющие большую опасность для здоровья человека. Была поставлена цель определения наиболее эффективных новых катионных фотосенсибилизаторов, обладающих высокой фотоактивностью против Грам (-) микроорганизмов без привлечения дополнительных соединений, увеличивающих их эффективность.

Нами было изучено действие на микроорганизмы следующих новых 9 катионных порфиринов и металлопорфиринов:

- meso-tetra-[4-N-(2`-oxyethyl) pyridyl] porphyrin (TOE4PyP), Zn-TOE4PyP, Ag-TOE4PyP;
- meso-tetra-[4-N-(2`-butyl) pyridyl] porphyrin (TBut4PyP), Zn-TBut4PyP, Ag-TBut4PyP;
- meso-tetra-[4-N-(2`-allyl) pyridyl] porphyrin (TAll4PyP), Zn-TAll4PyP, Ag-TAll4PyP.

Ранее было получено, что новые катионные порфирины обладают достаточно высокой фотодинамической активностью к опухолевым клеткам *in vitro* и *in vivo* [70]. Дальнейшие исследования показали, что эти порфирины демонстрируют также хорошую активность в отношении микроорганизмов [72, 69, 68]. В связи с возможностями направленного синтеза порфиринов и металлопорфиринов с различными центральными атомами металлов и функциональными группами была поставлена задача выяснения этих факторов на фотодинамическую инактивацию микроорганизмов *in vitro*. Исследование поражающего действия этих соединений было проведено в двух режимах: темновом (определение собственной цитотоксичности соединения) и под воздействием света (фототоксичности).

3.2.1. Темновая токсичность (цитотоксичность) катионных (металло)порфиринов.

На первом этапе исследований кроме решения задачи выбора (из 9 синтезированных ФС) наиболее активных (металло)порфиринов в темновых условиях, также была поставлена задача определения минимально эффективных цитотоксических доз ФС на бактерии. Эти данные далее были использованы в экспериментах с фотодинамической активностью ФС. Для уменьшения достаточно большого числа предстоящих экспериментов на микроорганизмы в качестве типичного представителя Грам (-) бактерий была выбрана *E.coli* (штамм К-12). Эта бактерия является удобной моделью изучения эффективности катионных (металло)порфиринов в связи с ее значительной устойчивостью многим нейтральным и анионным фотосенсибилизаторам. В работе [137] Nitzan и др. показали, что производные гематопорфирина (HPD) и дейтеропорфирина были активны в отношении Грам (+) бактерий, но неактивны в отношении Грам (-) видов, таких как *E.coli* или *Pseudomonas aeruginosa*, даже при концентрациях 200 мг/мл.

На рис. 17 и 18 представлены типичные результаты тестов на темновую токсичность (цитотоксичность) различных (металло)порфиринов относительно микроорганизма *E.coli*.

Так, из рис. 17 очевидна разница в эффективности действия безметалльного TBut4PyP и Ag-содержащего порфирина Ag-TBut4PyP: металлопорфирин Ag-TBut4PyP в 10 раз более цитотоксичен по сравнению с безметалльным порфирином TBut4PyP. Видно, что кривая подавления выживаемости клеток для Ag-TBut4PyP по сравнению с TBut4PyP сдвинута в сторону меньших концентраций, что соответственно выражается также и в величинах 50% -ного (IC_{50}) и 100% -ного (IC_{100}) подавления роста клеток (смотри ниже таблицу 3).

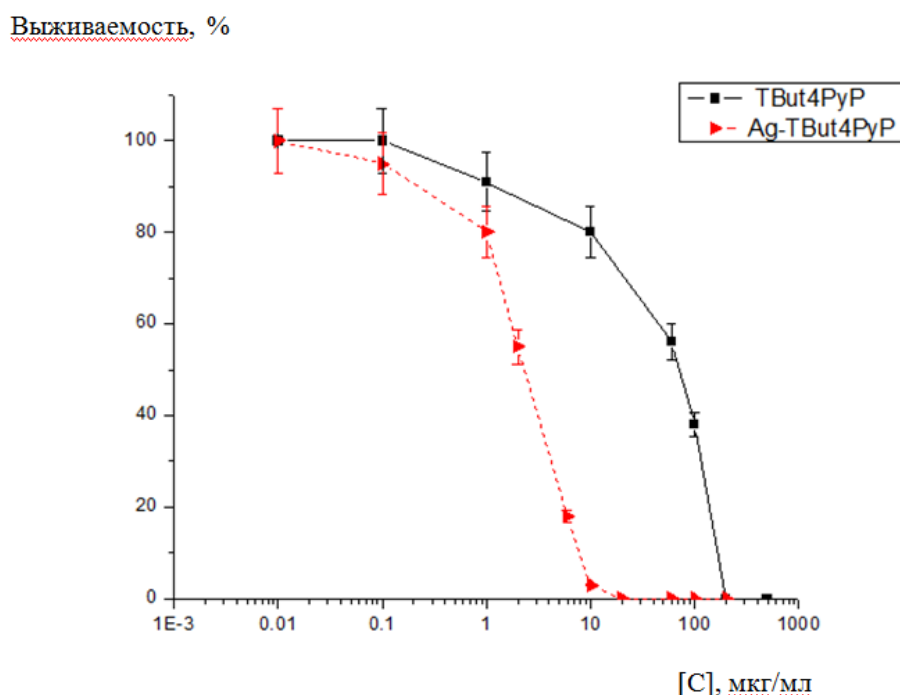


Рис. 17. Влияние концентраций двух различных (металло)порфиринов на выживание клеток *E.coli* в темновых условиях: TBut4PyP (—) и Ag-TBut4PyP (---). $p < 0,05$; $n = 5$.

На основании аналогичных исследований для каждого (металло)порфирина была определена концентрация, ниже которой данный препарат не токсичен (не ингибирует рост клеток, т.е. выживаемость клеток равна 100%). Так, например, из рис. 18 следует, что для металлопорфирина Zn-TBut4PyP такая концентрация равна 7 мкг/мл, а для Zn-TOE4PyP такая концентрация равна 10 мкг/мл. Именно при концентрациях ниже указанных можно проводить исследование фототоксичности препаратов, чтобы исключить вклад собственной цитотоксичности препарата. Так, например, для металлопорфирина Zn-TBut4PyP исследование фототоксичности (действие света) проводили при концентрациях ≤ 5 мкг/мл (рис. 19).

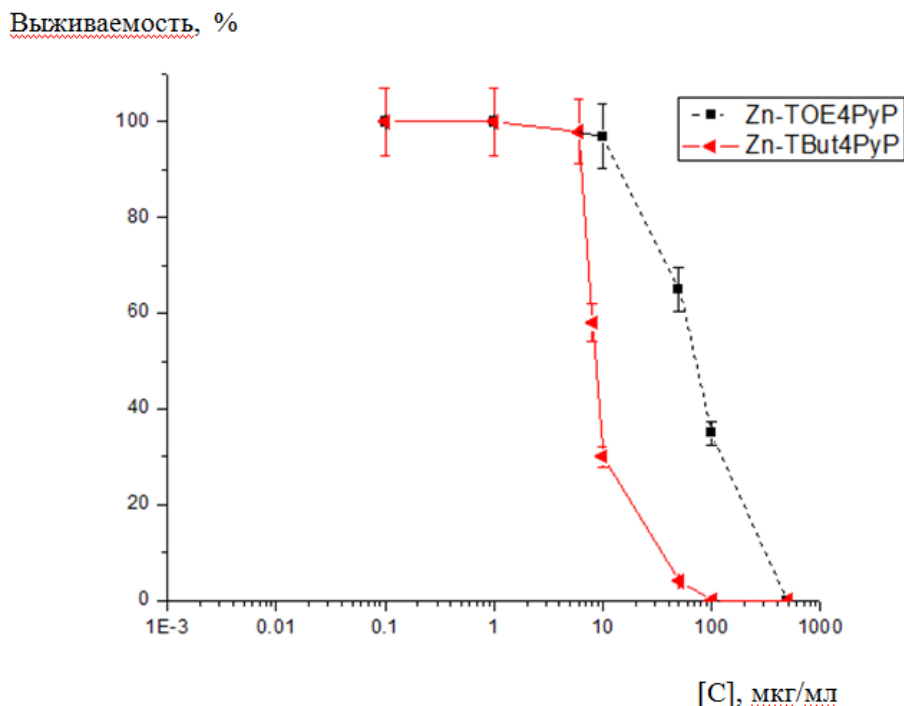


Рис. 18. Влияние концентраций двух Zn-металлопорфиринов с различными периферическими группами на выживание клеток *E.coli* в темновых условиях: Zn -TOE4PyP (---) и Zn-TBut4PyP (—). $p < 0,05$; $n = 5$.

Конечные результаты исследования цитотоксической эффективности 9 катионных порфиринов и металлопорфиринов на микроорганизм *E.coli* представлены в Таблице 3, где: IC_{50} - 50 %-ное ингибирование роста клеток и IC_{100} - 100 %-ное ингибирование роста клеток. Исследования темновой цитотоксической инактивации *E. coli* свидетельствуют о высокой степени активности металлопорфиринов, для которых IC_{50} и IC_{100} значительно ниже по сравнению с безметальными порфиринами (металлопорфирины более цитотоксичны). Значительно более высокая эффективность аллил- и бутил- производных порфиринов обусловлена, по-видимому, более глубоким встраиванием молекул порфиринов с аллил- и бутил- гидрофобными группами в мембрану бактерий по сравнению с оксиэтил группой (содержащей -ОН гидрофильный конец).

Ингибирующие концентрации катионных (металло)порфиринов
на микроорганизм *E.coli* в темновых условиях

(Металло)порфирины	Ингибирующие концентрации в темновых условиях (мкг/мл)	
	IC ₅₀	IC ₁₀₀
TOE4PyP	100	>10 000
TAll4PyP	10	100
TBut4PyP	70	200
Zn-TOE4PyP	70	500
Zn-TAll4PyP	7	80
Zn-TBut4PyP	8	100
Ag-TOE4PyP	4	100
Ag-TAll4PyP	1,5	10
Ag-TBut4PyP	3	20

*Приведены среднестатистические значения пяти независимых экспериментов (n =5).
Среднее квадратическое отклонение величин не превышает 5%. $P \leq 0,05$

3.2.2. Фототоксичность катионных (металло)порфиринов.

В связи с тем, что тяжелые металлы (кроме Zn) тушат флуоресценцию порфиринов, мы исследовали эффективность фототоксичности 3-х порфиринов не содержащих металлы и 3-х Zn-содержащих порфиринов. На рис. 19 представлены типичные кривые выживаемости *E. coli* в зависимости от концентрации порфирина или металлопорфирина при действии света. Из представленных кривых следует, что у исследованных (металло)порфиринов IC₅₀ для клеток *E. coli* лежит в интервале от 0,1 до 1,0 мкг/мл, а IC₁₀₀ - от 2,0 до 10,0 мкг/мл. Результаты исследований для 6-и исследованных порфиринов и Zn-металлопорфиринов суммированы в таблице 4.

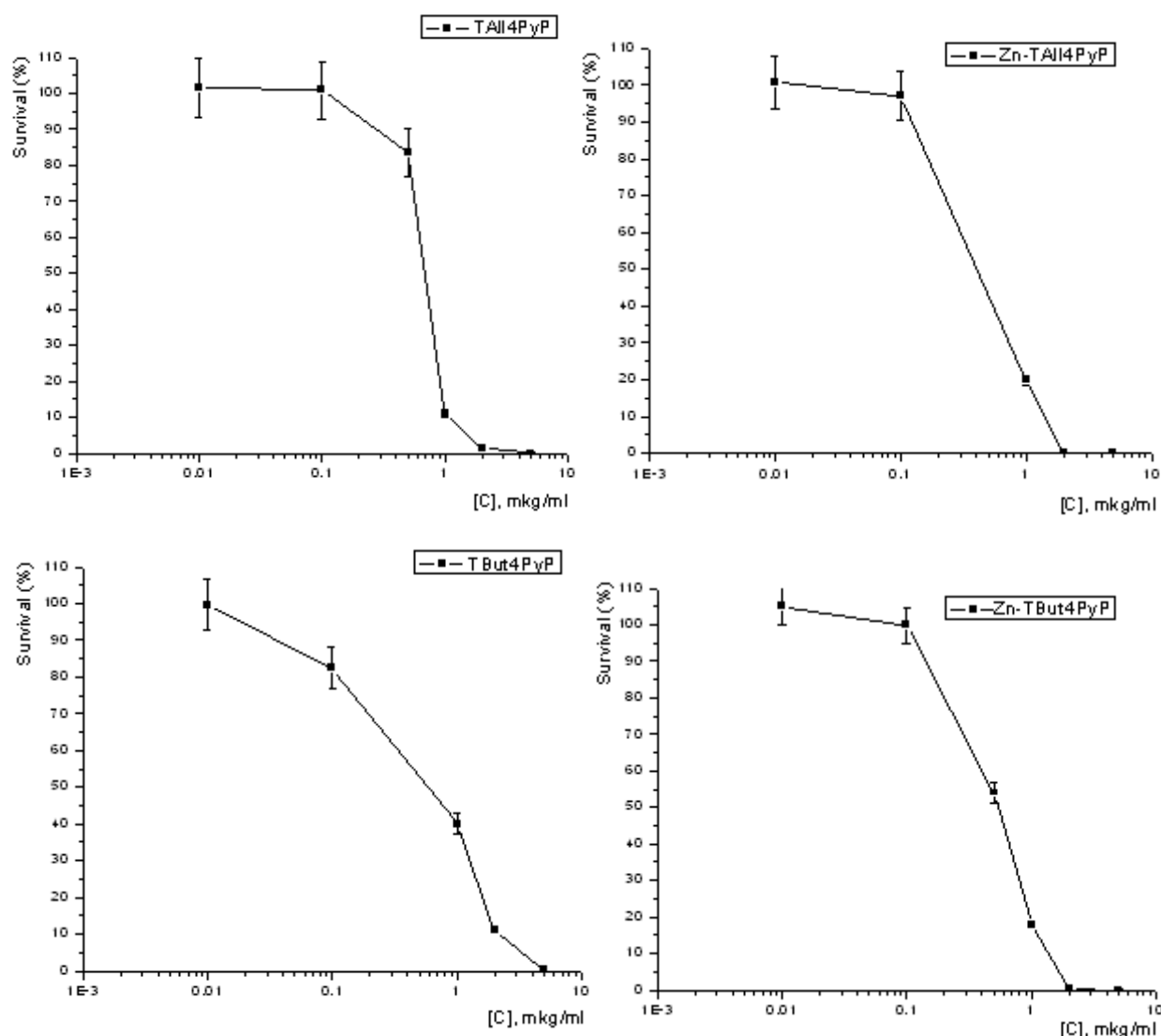


Рис. 19. Влияние концентраций различных (металло)порфиринов на выживание микроорганизма *E.coli* при фотодинамическом действии (при действии света) (по оси абсцисс в логарифмической шкале приведена концентрация порфирина в мкг/мл, по оси ординат приведена выживаемость клеток в процентах от контроля без порфиринов). $p < 0,05$; $n = 6$.

Результаты, приведенные в таблице 4, свидетельствуют, что Zn-содержащие порфирины полностью подавляют рост *E.coli* от 1.5 до 5 раз эффективнее по сравнению с безметалльными порфиринами. Из исследованных фотосенсибилизаторов наивысшей фотодинамической активностью обладает металлопорфирин Zn-TBut4PyP. Эти результаты полностью соответствуют также данным Таблицы 2, согласно которым Zn-содержащие порфирины обладают значительно более высоким квантовым выходом генерации синглетного кислорода по сравнению со свободными безметалльными порфиринами.

Таблица 4.*

Величины IC_{50} и IC_{100} для катионных (металло)порфиринов ингибирующие рост клеток *E.coli* при фотодинамическом действии

(Металло)порфирины	IC_{50} (мкг/мл)	IC_{100} (мкг/мл)
TOE4PyP	$0,7 \pm 0,05$	$10,1 \pm 0,7$
TBut4PyP	$0,6 \pm 0,04$	$5,4 \pm 0,4$
TAlI4PyP	$0,7 \pm 0,05$	$5,3 \pm 0,2$
Zn -TOE4PyP	$0,65 \pm 0,05$	$2,2 \pm 0,15$
Zn -TBut4PyP	$0,5 \pm 0,03$	$2,1 \pm 0,15$
Zn -TAlI4PyP	$0,45 \pm 0,03$	$2,2 \pm 0,15$

*Приведены среднестатистические значения пяти независимых экспериментов ($n = 5$). $p < 0,05$.

Было показано, что различные производные порфирина (гематопорфирин, дейтеропорфирин, протопорфирин) в присутствии света обладают сильной антибактериальной активностью (*St. aureus*, *St. pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Propionobacter acnes*, *Enterococcus birae*, и т.д.) [162]. Для изучения фотодинамической инактивации ряда Грам (+) и Грам (-) микроорганизмов нами был выбран наиболее активный фотосенсибилизатор Zn-TBut4PyP. Результаты исследований приведены в таблице 5.

Таблица 5.*

Величины IC_{50} и IC_{100} для Zn-TBut4PyP при фотодинамическом ингибировании Грам (+) и Грам (-) микроорганизмов

Микроорганизмы		IC_{50} , мкг/мл	IC_{100} , мкг/мл
Грамм (+)	<i>St. aureus</i>	$0,14 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,05$
	<i>St. epidermis</i>	$0,20 \pm 0,015$	$0,40 \pm 0,03$
Грамм (-)	<i>E. coli</i>	$0,50 \pm 0,03$	$2,1 \pm 0,15$
	<i>Salmonella sp.</i>	$0,55 \pm 0,04$	$2,0 \pm 0,15$

*Приведены среднестатистические значения пяти независимых экспериментов ($n = 5$). $p < 0,05$.

Известно, что Грамм (-) микроорганизмы имеют сложную структуру наружной стенки, а также два липидных бислоя, а Грамм (+) микроорганизмы имеют только один липидный бислой и другой относительно проницаемый слой [47]. Как и ожидалось, в соответствии с

литературными данными [123, 127], порог полной инактивации (IC_{100}) для Gram(+) микроорганизмов оказался в 3-5 раз ниже, чем для Грам (-) микроорганизмов.

Нами также была исследована эффективность 4-х порфиринов и металлопорфиринов на метициллин-чувствительный штамм микроорганизма *St. aureus* 209 P (MSSA) и метициллин-устойчивый штамм *St. aureus* (MRSA) при воздействии лазерного излучения (светодиод с максимумом спектра испускания $\lambda=405\pm15$ нм и плотностью мощности 70 мВт/см^2) (исследования проводились совместно с Саратовским государственным университетом им. Н. Г. Чернышевского, кафедра оптики и биофотоники) [68]. По сравнению с тремя из этих (металло)порфиринов (I. TOE4PyP, II. Zn-TOE4PyP, III. Zn-TBut4PyP) из вышеприведенного списка в начале п. III.2, четвертый металлопорфирин: IV. Zn-TBut3PyP отличается 3-м положением бутильной группы в пиридинском кольце, что представляло интерес в сравнении с металлопорфирином Zn-TBut4PyP, имеющим максимально высокий выход синглетного кислорода (0,97) (таблица 2, п. III.1.2.). Динамика изменения числа бактерий приведена на рис. 20-22. Выживаемость клеток микроорганизмов выраженная числом колониеобразующих единиц (КОЕ) при фотодинамическом воздействии оценивали по сравнению с контролем (без фотосенсибилизаторов).

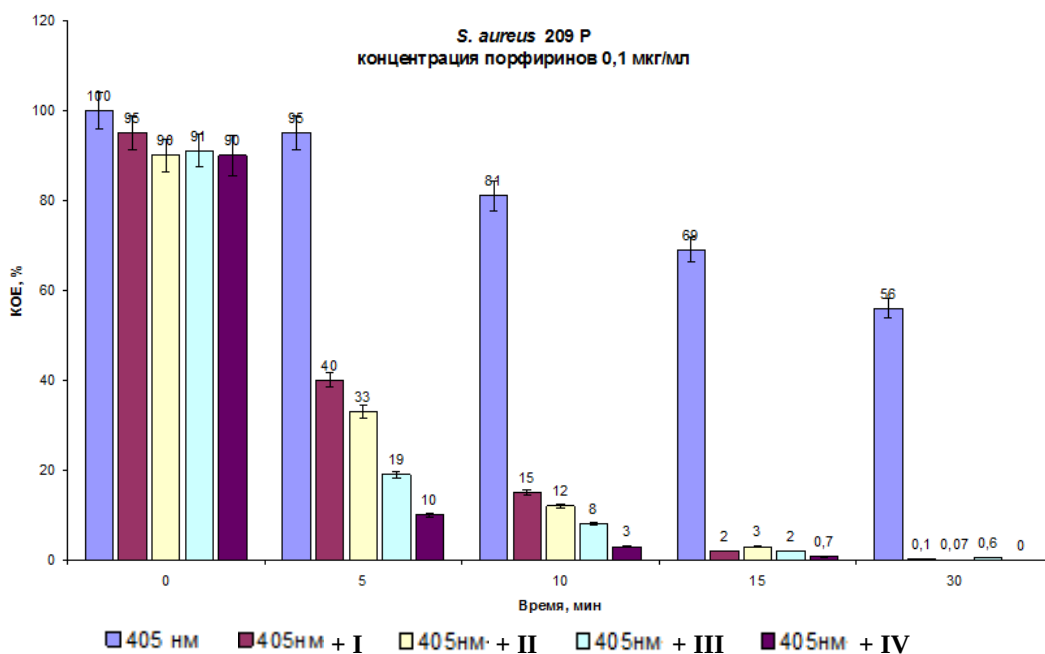


Рис. 20. Выживаемость *S. aureus* 209 P в присутствии порфириновых соединений I-IV в концентрации 0,1 мкг/мл, выраженная числом колоние-образующих единиц при действии синего излучения ($\lambda=405$ нм). $p < 0,05$; $n = 5$.

Изменяя время облучения микроорганизмов от 5 до 30 мин в экспериментах на *St. aureus* 209 P мы получили, что при концентрации 0,1 мкг/мл наибольшая эффективность наблюдается у металлопорфирина Zn-TBut3PyP. При облучении 10 и 15 мин его эффективность в 3-5 раз выше, чем порфирина TOEt4PyP, и облучение в 30 мин металлопорфирином Zn-TBut3PyP полностью уничтожает микроорганизмы (Рис. 20).

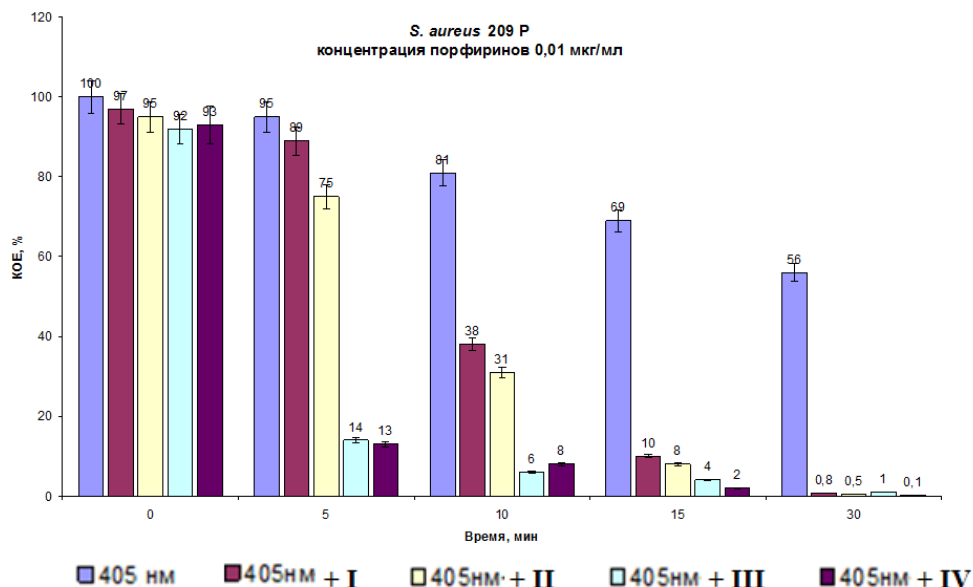


Рис. 21. Выживаемость *S. aureus* 209 P к порфириновым соединениям I-IV в концентрации 0,01 мкг/мл, выраженная числом колоние-образующих единиц при действии синего излучения ($\lambda=405$ нм). $p < 0,05$; $n = 5$.

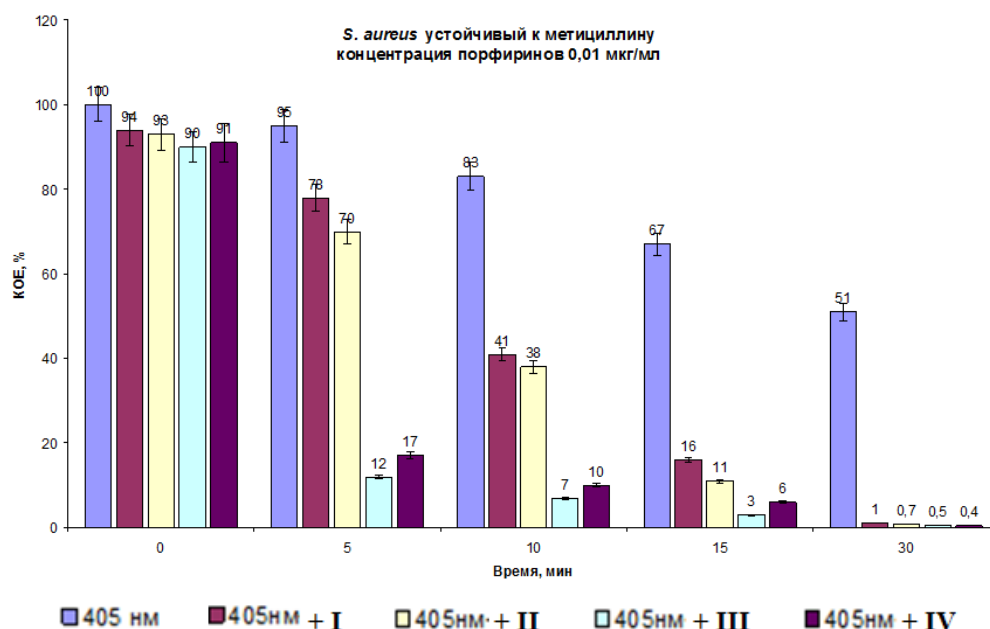


Рис. 22. Выживаемость метициллин-устойчивого штамма *S. aureus* в присутствии порфириновых соединений I-IV в концентрации 0,01 мкг/мл, выраженная числом колоние-образующих единиц при действии синего излучения ($\lambda=405$ нм). $p < 0,05$; $n = 5$.

При уменьшении концентрации порфиринов до 0,01 мкг/мл эффективности соединений практически сохраняются и наибольшая эффективность также наблюдается у металлопорфирина Zn-TBut3PyP (рис. 21). Аналогичные результаты для тех же порфиринов были получены и при поражении метициллин устойчивого штамма *S. aureus*. При концентрации 0,01 мкг/мл наибольшая эффективность также наблюдается у металлопорфирина Zn-TBut3PyP (рис. 22).

Переход от [3-пиридил] порфиринов к [4-пиридил] производным приводит к небольшому увеличению константы скорости тушения молекулы порфирина в возбужденных триплетных состояниях k_{TD} : от $\sim 1,4 \times 10^9$ до $\sim 1,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [15]. Этим можно объяснить несколько большую эффективность металлопорфирина Zn-TBut3PyP по сравнению с Zn-TBut4PyP для обоих штаммов *S. aureus*.

Таким образом, *in vitro* для 100%-ой (IC_{100}) инактивации Грам (+) микроорганизма *S. aureus* достаточно, чтобы концентрация Zn-порфиринов была 0,1 мкг/мл, что в 20 раз меньше, чем концентрация, которая требуется для 100%-ой инактивации Грам (-) микроорганизма *E.coli* (таблица 4).

Результаты свидетельствуют о высокой эффективности (100%-ной инактивации) Грам (+) и Грам (-) микроорганизмов катионными (металло)порфиринами без применения каких-либо дополнительных агентов усиления их действия (например, этилендиамин тетрауксусной кислоты или антибиотика полимиксин, в основе которого нанопептид), что говорит о перспективности их применения в медицине и микробиологии.

3.3. Фотодинамическое поражение раковых клеток катионными (металло)порфиринами *in vitro*

Фотодинамическая терапия опухолей (ФДТ) – одно из основных направлений применения фотосенсибилизаторов. Известно, что эффективность фотосенсибилизаторов варьирует в зависимости от их типа (гидрофобные или гидрофильные, несущие положительный или отрицательные заряды, нейтральные, безметалльные или с металлом и т.д.) [81, 63] и фенотипа поражаемых клеток [182].

Среди порфиринов, используемых в ФДТ, особое место занимают катионные порфирины, благодаря своей высокой селективности накопления в малигнизированных

клетках [81]. Как было отмечено выше, одним из больших преимуществ катионных порфиринов то, что в отличие от анионных они не образуют агрегатов в растворах и остаются в мономерной форме во всем диапазоне концентраций, обычно используемых в экспериментах [101]. На этом этапе исследований перед нами была поставлена задача определения сравнительной эффективности новых синтезированных (метаалло)порфиринов на культурах раковых клеток разного типа.

В исследовании эффективности поражения двух типов раковых клеток, монослойных (HeLa - клетки эпителия рака шейки матки) и суспензионных (K-562 - лимфобласты хронической миелоидной лейкемии), использовали пять нижеследующих соединений (в скобках указан заряд):

- 1) Zn-мезо-тетра [3-N-(2'-бутил)пиридил]порфирин, Zn-TBut3PyP, (+4);
- 2) мезо-три [3-N-(2'-бутил)пиридил]монофенил(-C₁₂)порфирин, TriBut3PyMPhP, (+3);
- 3) Zn-мезо-три[3-N-(2'-бутил) пиридил]монофенил(-C₁₂)порфирин, Zn-TriBut3PyMPhP, (+3);
- 4) Zn-мезо-три [4-N-(2'-бутил) пиридил] монофенил(-C₁₆)порфирин, Zn-TriBut4PyMVanP, (+3);
- 5) Zn-мезо-три [4-N-(2'-бутил) пиридил] монофенил(-CH₃)порфирин, Zn-TriBut4PyMVerP, (+3).

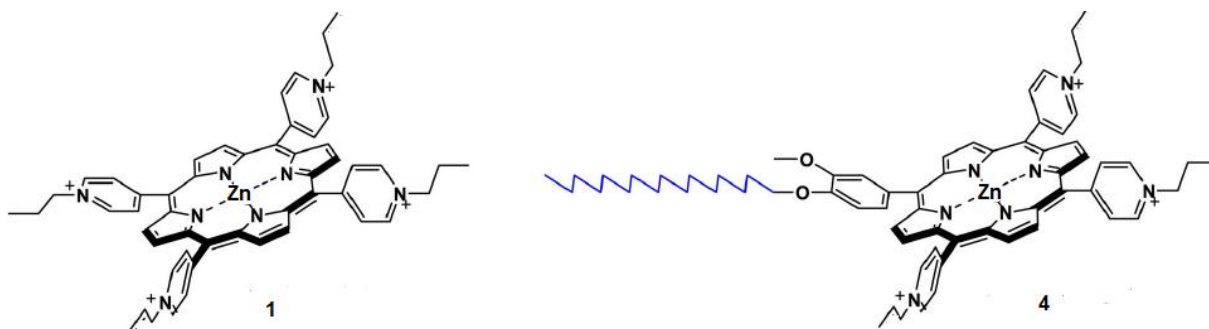


Рис. 23. Структура соединения 1 с зарядом +4 и соединения 4 с липофильной группой (C₁₆) и с зарядом + 3.

На рис. 23 приведены структуры 2-х металлопорфиринов из приведенных выше соединений, которые отличаются зарядом и наличием липофильной группы (-C₁₆). Аналогично приведенной структуре соединения 4, соединение 3 отличается наличием

липофильной группы с менее длинной цепью ($-C_{12}$), соединение 2 аналогично 3-му, но не содержит металл Zn, а соединение 5 вместо цепи имеет короткую группу $-CH_3$. Соединение 1 имеет заряд +4, остальные соединения имеют заряд +3.

Изучение эффективности этих соединений условно можно разделить на три группы задач:

А) провести сравнение эффективности порфиринов близкой структуры, но с разными зарядами (+4 и +3) – соединения 1 и 3;

Б) провести сравнение эффективности порфиринов одинаковой структуры, но с металлом и без металла (соединения 2 и 3);

В) провести сравнение эффективности 3 металлопорфиринов близкой структуры (соединения 5, 3 и 4), но с разной длиной углеводородного бокового радикала: а) соединение 5 с одним углеродом (группа $-CH_3$), б) соединение 3 с 12 углеродами (группа $-C_{12}H_{25}$) и в) соединение 4 с 16 углеродами (группа $-C_{16}H_{33}$).

Для отбора и идентификации наиболее эффективных (металло)порфиринов *in vitro* нами были проведены исследования по определению темновой токсичности и фототоксичности вышеуказанных соединений.

3.3.1. Цитотоксичность (металло)порфиринов относительно монослойной культуры раковых клеток HeLa

Определение цитотоксичности порфиринов (темновая токсичность) на монослойной культуре раковых клеток HeLa проводили в интервале концентраций от 0,025 до 200 мкг/мл (в зависимости от типа (металло)порфирина). В качестве примера изучения одного из (металло)порфиринов на рис. 24 приведены результаты исследования цитотоксичности металлопорфирина Zn-TBut3PyP в интервале концентраций 0,1 – 200 мкг/мл. Из кривой рис. 24 следует, что металлопорфирин Zn-TBut3PyP становится цитотоксичным при концентрациях >50 мкг/мл и полностью убивает клетки (0% выживаемости) при $[C]>200$ мкг/мл (ориентировочно при концентрации 400 мкг/мл).

На основе изучения цитотоксичности (металло)порфиринов на культуру раковых монослойных клеток HeLa можно сделать следующие заключения (см. также итоговую Таблицу 6) (здесь и далее величины IC_{50} и IC_{100} обозначают дозы порфиринов, вызывающие 50% и 100% ингибирование жизнеспособности клеток):

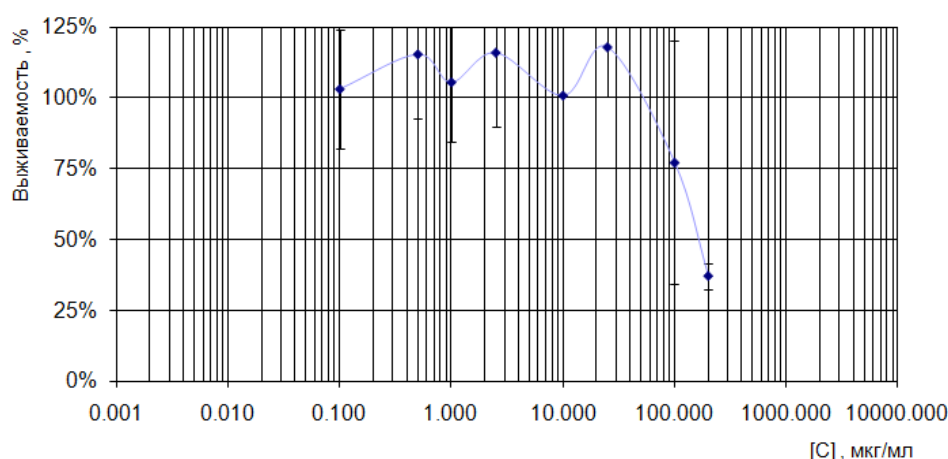


Рис. 24. Зависимость выживаемости культуры раковых клеток HeLa от действия металлопорфирина Zn-TBut3PyP. По оси абсцисс приведены концентрации порфирина [C] в логарифмической шкале, по оси ординат выживаемость клеток в % по сравнению с контролем (100% выживаемости при [C]=0). $p < 0,05$; $n = 6$.

1. Токсичность (металло)порфиринов TriBut3PyMPhP и Zn-TriBut3PyMPhP с зарядами +3, по сравнению с металлопорфирином Zn-TBut3PyP с зарядом +4, с уменьшением заряда увеличивается в 29 раз (по IC_{100});

Такое увеличение токсичности у TriBut3PyMPhP и Zn-TriBut3PyMPhP можно объяснить двумя обстоятельствами: 1) по-видимому, уменьшение заряда дает возможность порфиринам с меньшим положительным зарядом при отрицательной поверхности клетки легче встроиться внутрь мембраны клетки и 2) этому способствует также углеводородный “хвост” -C₁₂, который способствует встраиванию в липидный слой мембраны.

2. IC_{100} (металло)порфиринов одинаковой структуры, но с металлом (Zn-TriBut3PyMPhP) и без металла (TriBut3PyMPhP) не отличаются (см. итоговую Таблицу 6), но IC_{50} в 28 раз меньше у Zn-порфирина, что свидетельствует о его большей цитотоксичности.

Таким образом, исследования проведенные на монослойной культуре клеток HeLa показали, что из исследованных трех препаратов наиболее цитотоксичным является металлопорфирин Zn-TriBut3PyMPhP.

3.3.2. Цито- и фототоксичность (металло)порфиринов относительно суспензионной культуры раковых клеток К-562

Определение цитотоксичности и фототоксичности металлопорфиринов относительно суспензионной культуры раковых клеток К-562 проводили в интервале концентраций от 0,05 до 20 мкг/мл (в зависимости от типа металлопорфирина). В качестве примера изучения одного из (металло)порфиринов на рис. 25 и 26 приведены результаты исследования цитотоксичности и фототоксичности металлопорфирина Zn-TriBut3PyMPhP.

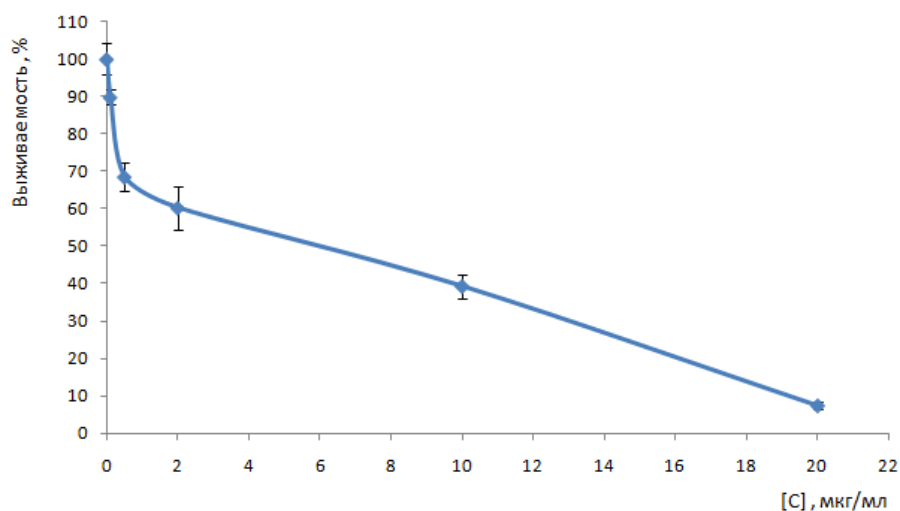


Рис. 25. Выживаемость культуры клеток линии К-562 при действии металлопорфирина Zn-TriBut3PyMPhP в темновых условиях. По оси абсцисс приведена концентрация порфирина в мкг/мл, по оси ординат выживаемость клеток в % по сравнению с контролем. $p < 0,05$; $n = 5$.

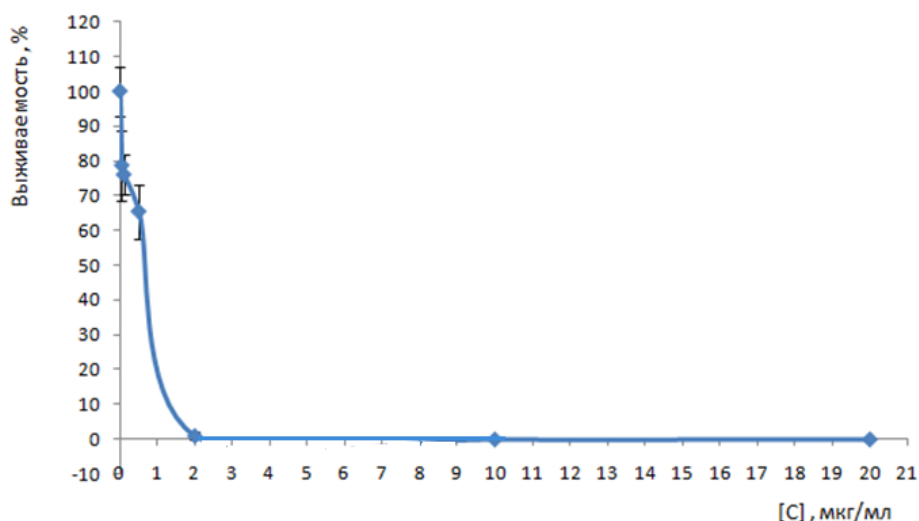


Рис. 26. Выживаемость культуры клеток линии К-562 при фотодинамическом действии металлопорфирина Zn-TriBut3PyMPhP. По оси абсцисс приведена концентрация порфирина, по оси ординат выживаемость клеток в % по сравнению с контролем. $p < 0,05$; $n = 5$.

Из сравнения кривых на рис. 25 и 26, а также данных таблицы 7 можно сделать заключение, что фототоксичность Zn-TriBut3PyMPhP эффективнее его цитотоксичности приблизительно в 11 раз (IC_{100} меньше).

Результаты проделанной работы по цитотоксическому и фототоксическому действию пяти исследованных (металло)порфиринов на культуру монослойных клеток HeLa и культуру суспензионных клеток К-562 представлены в итоговых Таблицах 6 и 7.

Таблица 6.*

Величины IC_{50} и IC_{100} (мкг/мл) 3-х новых (металло)порфиринов при их воздействии на монослойную культуру раковых клеток HeLa.

Zn-TBut3PyP		TriBut3PyMPhP (-C12)		Zn-TriBut3PyMPhP (-C12)	
Цитотоксичность		Цитотоксичность		Цитотоксичность	
IC_{50}	IC_{100}	IC_{50}	IC_{100}	IC_{50}	IC_{100}
160	400	7	14	0,25	14

*Приведены среднестатистические значения пяти независимых экспериментов ($n=5$).
Среднее квадратическое отклонение величин не превышает 5%. $P \leq 0,05$

Таблица 7.*

Величины IC_{50} и IC_{100} (мкг/мл) 3-х Zn-порфиринов при их цито- и фототоксическом воздействии на суспензионную культуру клеток К-562

Zn-TriBut3PyMPhP (-C12)				Zn-TriBut4PyMVanP (-C16)				Zn-TriBut4PyMVerP (-CH3)			
Цитотоксич.		Фототоксич.		Цитотоксич.		Фототоксич.		Цитотоксич.		Фототоксич.	
IC_{50}	IC_{100}	IC_{50}	IC_{100}	IC_{50}	IC_{100}	IC_{50}	IC_{100}	IC_{50}	IC_{100}	IC_{50}	IC_{100}
7	22	0,8	2	6,3	16	0,3	5	30	108	2,2	22

*Приведены среднестатистические значения пяти независимых экспериментов ($n=5$).
Среднее квадратическое отклонение величин не превышает 5%. $P \leq 0,05$

Из таблицы 7 следует, что по фотодинамическому действию на культуру суспензионных клеток К-562 наиболее эффективным препаратом из трех исследованных является Zn-TriBut3PyMPhP (наименьшее IC_{100}), эта величина несколько больше для Zn-TriBut3PyMVanP. Фотодинамическое действие этих препаратов намного (в 5-10 раз) сильнее, чем действие Zn-TriBut3PyMVerP. Можно сделать заключение, что наличие углеводородной цепи (в первом случае -C₁₂, а во втором -C₁₆) существенно увеличивает фотодинамическую

эффективность металлопорфирина. Этот эффект, по-видимому, можно объяснить встраиванием металлопорфиринов с углеводородной цепью в липидную внутреннюю часть мембраны клетки и при действии света генерация синглетного кислорода в результате ведет к более эффективному разрушению и по внутренней части, и по поверхности мембраны клеток, тогда как другие порфирины, возможно, действуют только по поверхности мембраны.

В соответствии с проделанной работой были сделаны следующие заключения:

1. Уменьшение заряда катионного (металло)порфирина с +4 до +3 и наличие углеводородной цепи ($-C_{12}$ или $-C_{16}$) существенно увеличивает цитотоксичность препарата (по воздействию на монослойную культуру HeLa в 29 раз). Из исследованных препаратов наиболее цитотоксическим препаратом является металлопорфирин Zn-TriBut3PyMPhP.
2. По фотодинамическому действию на культуру суспензионных клеток К-562 наиболее эффективным препаратом является Zn-TriBut3PyMPhP (наименьшее IC_{100}), ему незначительно уступает Zn-TriBut3PyMVanP, имеющие углеводородные цепи ($-C_{12}$ или $-C_{16}$). Оба этих препарата намного эффективнее по фотодинамическому действию по сравнению с металлопорфирином Zn-TriBut3PyMVerP.
3. Фотодинамическое действие исследованных металлопорфиринов в 5-10 раз эффективнее по сравнению с цитотоксическим действием этих же металлопорфиринов.

3.4. Образование комплексов катионных (металло)порфиринов с наночастицами

3.4.1. Наноконкомпозиты катионных (металло)порфиринов с наночастицами цеолита

Благодаря уникальным адсорбционным и ионообменным свойствам наночастицы цеолита широко применяются в качестве наноконтейнеров в биомедицине [111, 53]. Наноконкомпозиты (наноконтейнеры) на основе наночастиц цеолита и порфиринов имеют большие перспективы в различных областях онкологии и хирургии [53]. Исследования показали, что катионные порфирины хорошо инкапсулируются во внутреннюю область цеолитов ионообменным механизмом, в то время как анионные не встраиваются, а нейтральные порфирины лишь в следовых количествах [186]. Среди многих типов наночастиц-наноконтейнеров, используемых для усиления эффективности и целевой доставки фотосенсибилизаторов, наночастицы цеолитов занимают особое место вследствие

большой биологической активности, а также больших возможностей сорбции микроорганизмов [111] и лигандов-порфиринов [53]. Эти предпосылки были убедительным доводом в целесообразности подробного и внимательного исследования комплексов (металло)порфиринов с наночастицами цеолита. Изучение взаимодействия различных катионных (металло)порфиринов и наночастиц цеолита с образованием нанокомпозитов являлись одной из целей работы.

Нами были исследованы и показаны хорошие возможности комплексообразования ряда катионных (металло)порфиринов с наночастицами цеолита [65]. Для изучения механизма связывания наночастиц цеолита с порфиринами были отобраны 5 катионных (металло)порфиринов таким образом, чтобы они отличались гидрофобностью (содержали различные периферические группы), наличием гидроксильной группы (для изучения возможной водородной связи с поверхностью цеолита), разными центральными атомами металла (Zn and Ag), различными положениями боковой функциональной группы (3-я или 4-ая позиция в пиридинном кольце). Для исследований использовали следующие пять катионных (металло)порфиринов: I) мезо-тетра (4-N-оксиэтил пиридил) порфирин (TOEt4PyP), II) Zn-TOEt4PyP, III) мезо-тетра (3-N-оксиэтил пиридил) порфирин (TOEt3PyP), IV) Zn-мезо-тетра (4-N-бутил-пиридил) порфирин (Zn-TBut4PyP) и V) Ag-TBut4PyP, а также известные анионные фотосенсибилизаторы: порфирин хлорин e_6 и Al-фталоцианин.

Прежде всего была определена концентрация наночастиц цеолита (наноцеолита), которая образовывала комплексы с порфиринами и изменяла спектральные свойства (поглощение порфирина) в линейном интервале. В качестве примера исследования на рис. 27 представлены изменения спектра поглощения раствора металлопорфирина Zn-TBut4PyP при последовательном добавлении наночастиц цеолита. Прежде всего отметим, что в растворе образуется нанокомпозит (комплексы наночастиц цеолита с металлопорфирином). Такой вывод следует из известного критерия в спектрофотометрическом анализе, в котором утверждается, что при наличии двухкомпонентной системы в растворе образуются изобестические точки (общие точки пересечения спектральных кривых) [1]. Из рисунка видно образование двух изобестических точек при длинах волн $\lambda \approx 415$ нм и $\lambda \approx 460$ нм, что свидетельствует об образовании в растворе только двух типов веществ: свободного порфирина и связанного с наночастицами порфирина (нанокомпозита).

В раствор металлопорфирина объемом 2 мл и конечной концентрацией 10^{-5} М (цифра 1 на рис. 27) последовательно добавляли 0.2, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7 и 0.8 мл раствора наночастиц цеолита (исходная концентрация 0.66 мг/мл) (на рис. 27 обозначены цифрами 2-7 соответственно).

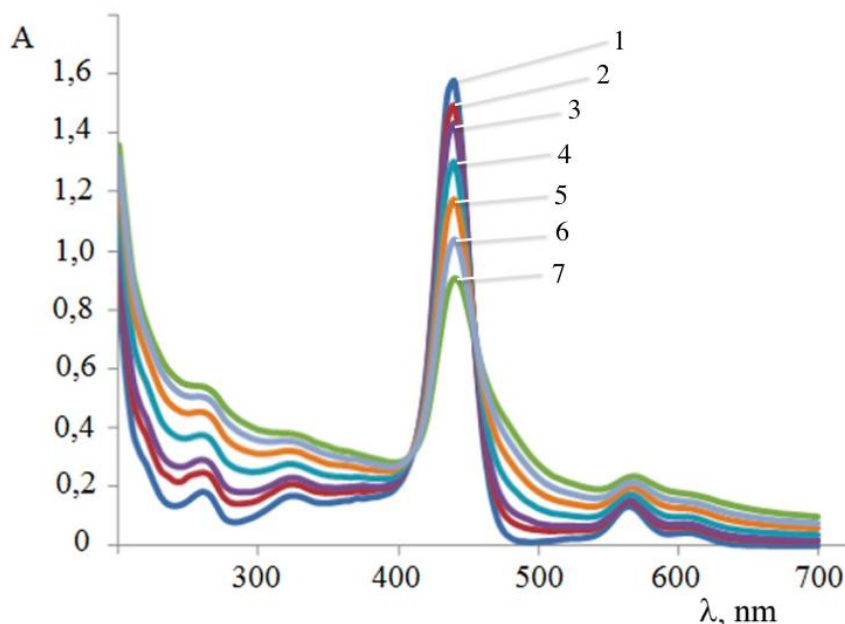


Рис. 27. Спектры поглощения Zn-TBut4PyP после добавления различных концентраций наночастиц цеолита. Концентрация металлопорфирина 10^{-5} М (раствор без наночастиц обозначен цифрой 1). К раствору порфирина последовательно добавляли 0.2, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7 и 0.8 мл раствора наночастиц цеолита (исходная концентрация 0.66 мг/мл) (обозначены цифрами 2 - 7 соответственно).

Связывание (металло)порфиринов наблюдали по изменению поглощения на пике полосы Sore (420-440 нм) при добавлении наночастиц. Процент связывания определяли по соотношению:

$$\% \text{ сорбции} = 100 - A \times 100 / A_0 \quad (3)$$

где A - величина поглощения на пике полосы Sore после добавления наночастиц цеолита и A_0 - величина поглощения чистого раствора порфирина (без наночастиц). Достаточная точность этого соотношения определялась тем, что форма спектров при добавлении наноцеолита не изменялась (см. Рис. 27).

Так, при последовательном повышении концентрации наночастиц цеолита (от 0,2 мл = 0,06 мг/мл до 0,6 мл = 0,15 мг/мл) в раствор металлопорфирина Zn-TBut4PyP наблюдалась прямая пропорциональность уменьшения поглощения на пике полосы Soret, в то время как при добавлении наночастиц 0,7 мл = 0,17 мг/мл и 0,8 мл = 0,19 мг/мл линейность не соблюдается, по-видимому, происходит насыщение адсорбционной способности цеолита (Рис. 28).

Таким образом в раствор порфирина добавление наночастиц цеолита можно проводить до их конечной концентрации 0,15 мг/мл (добавление 0,6 мл исходного раствора цеолита с концентрацией 0,66 мг/мл на 2 мл металлопорфирина). Исходя из полученного результата для всех других катионных (металло)порфиринов к 2 мл раствора (металло)порфирина добавляли 0.6 мл цеолита так, чтобы конечная концентрация (металло)порфирина в растворе получалась 10^{-5} М. Далее по соотношению (3) рассчитывали сорбцию после центрифугирования этого раствора (15 тыс. оборотов/мин, 15 мин.) и определения остаточного порфирина (поглощение на полосе Soret 420-440 нм) (для примера см. рис. 30).

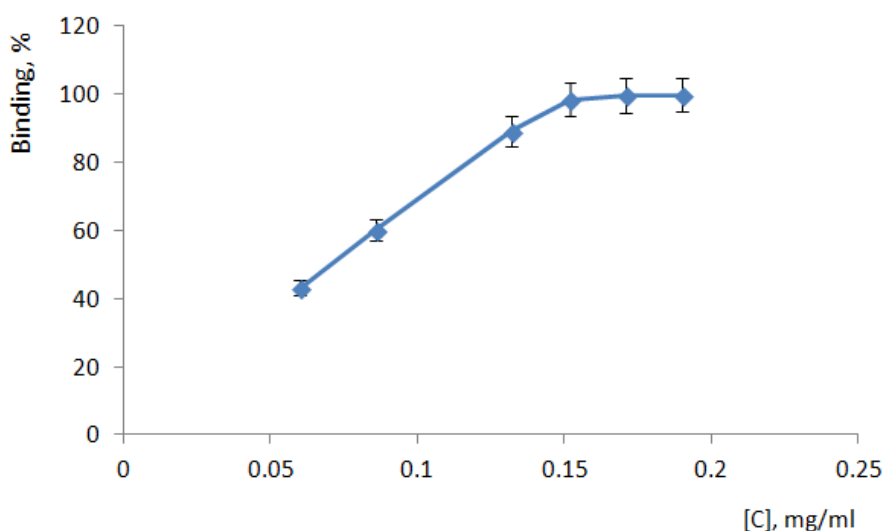


Рис. 28. Связывание металлопорфирина Zn-TBut4PyP (ось ординат) при различных концентрациях (мг/мл) в растворе наночастиц цеолита (ось абсцисс). $p < 0,05$; $n = 5$.

Такие кривые были получены для всех исследовавшихся металлопорфиринов. Результаты сорбции с наночастицами цеолита вышеуказанных I-V различных катионных (металло)порфиринов, а также анионных фотосенсибилизаторов порфирина хлорин е6 и Al-фталоцианина представлены в таблице 8.

Таблица 8.*

Сорбция (металло)порфиринов цеолитом (0,15 мг/мл)

Порфи- рины	TOEt 4PyP	TOEt 3PyP	Zn- TOEt4PyP	Zn- TBut4PyP	Ag- TBut4PyP	Хло- рин e ₆	Al-фтало- циани
сорб- ция, %	97,1 ±3.6	98,5 ±3.9	98,3 ±3.9	98,7 ±4.0	98,0 ±3.4	24,4 ±1.1	0

*Приведены среднестатистические значения пяти независимых экспериментов (n =5), p < 0,05.

Анализ динамики изменения в спектрах поглощения (металло)порфиринов при добавлении наночастиц цеолита позволяет сказать, что: 1) образуются наноконпозиты и процент адсорбции (металло)порфиринов наночастицами цеолита для всех исследованных соединений более 95% (таблица 8), 2) преобладающим механизмом связывания является электростатическое связывание катионных (металло)порфиринов с отрицательно заряженной поверхностью или внутренними полостями наночастиц цеолита. При этом ионы металлов, наличие в структуре порфиринов гидроксильной группы и других периферических групп значительно не влияют на величину связывания.

Комплексообразование порфиринов с наночастицами цеолита при разных температурных режимах

Поскольку связывание порфиринов как лигандов к наночастицам цеолита на начальном этапе взаимодействий определяется броуновским движением порфиринов, то из термодинамических соображений следовало ожидать, что взаимодействие порфиринов с наночастицами может зависеть от температуры. На этом этапе работ методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии было изучено комплексообразование порфиринов с наночастицами цеолита при разных температурах (18⁰С и 37⁰С) [66].

Изучение комплексообразования порфиринов с наночастицами цеолита при этих двух температурных режимах проводили для двух металлопорфиринов: I) Zn-мезо-тетра (4-N-оксиэтил пиридил) порфирин (Zn-TOEt4PyP) и II) Zn-мезо-тетра (3-N-бутил-пиридил) порфирин (Zn-TBut3PyP).

Все эксперименты проводили так, чтобы при добавлении различных концентраций наночастиц цеолита в раствор порфирина конечная концентрация (металло)порфирина в растворе оставалась одинаковой (10^{-5} М).

Для проведения экспериментов при разных температурных режимах заранее был определен тот интервал добавляемых наночастиц цеолита, когда зависимость связывания от концентрации добавляемых наночастиц находится в линейной части кривой комплексообразования. Как было определено выше, в раствор (металло)порфирина добавление наночастиц цеолита можно проводить до концентрации 0.15 мг/мл (добавление 0.6 мл исходного раствора наночастиц цеолита с концентрацией 0.66 мг/мл в 2 мл раствора порфирина).

Комплексообразование Zn-TOEt4PyP с наноцеолитом при 18° С

На рис. 29 представлены оптические спектры поглощения в динамике при связывании металлопорфирина Zn-TOEt4PyP с наноцеолитом. Как видно из рисунка связывание металлопорфирина Zn-TOEt4PyP с наночастицами цеолита происходит очень быстро, менее одной минуты (кривая 2). Происходит интенсивное падение пика Sore (кривые 1 и 2) и появление на спектре “плеча” в районе 480 нм (кривые 2 и 3). В исходном растворе металлопорфирина (кривая 1) и супернатане (кривая 4) это “плечо” отсутствует. Падение интенсивности поглощения света (гипохромное изменение), которое наблюдается у порфирина Zn-TOEt4PyP, можно объяснить появлением в растворе комплекса [наночастица - Zn-TOEt4PyP], где металлопорфирин находится в более упорядоченной форме по сравнению со своим свободным состоянием. Из рисунка видно, что происходит сдвиг пика полосы Sore с 439,5 нм в длинноволновую область до 442,0 нм (батохромный эффект), что также свидетельствует о взаимодействии металлопорфирина с наноцеолитом и образовании нанокompозита.

На рис. 30 представлены спектры поглощения нанокompозита [Zn-TOEt4PyP+наноцеолит], полученного при температуре 18°С (на рисунке отмечено зеленым цветом и цифрой 3) и супернатанта – после центрифугирования не связавшегося металлопорфирина Zn-TOEt4PyP (на рисунке отмечено синим цветом и цифрой 2), а также исходного раствора металлопорфирина Zn-TOEt4PyP (на рисунке отмечено красным цветом и цифрой 1). Проведенные расчеты на основе спектров поглощения показали, что при

подготовке нанокompозита при температуре 18⁰С доля несвязавшегося металлопорфирина оказалась 26,5% и соответственно 73,5% металлопорфирина Zn-TOEt4PyP связалось с наночастицами цеолита.

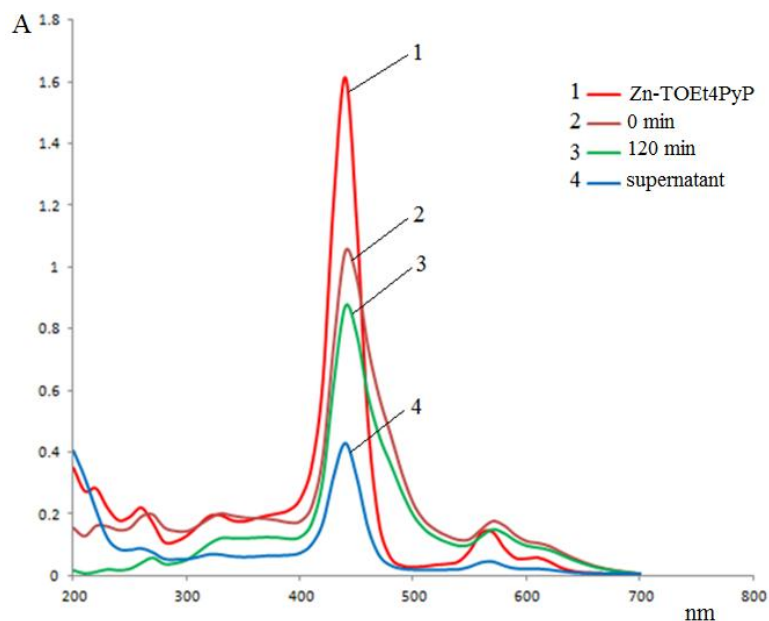


Рис. 29. Изменение спектров поглощения в процессе связывания металлопорфирина Zn-TOEt4PyP (концентрация 10⁻⁵М) с наноцеолитом (концентрация 0,15 мг/мл) при температуре 18⁰С.

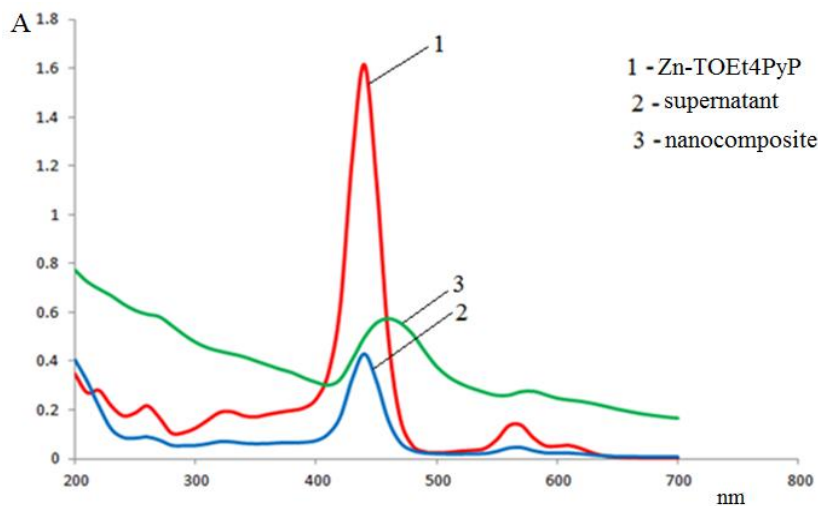


Рис. 30. Спектры поглощения металлопорфирина Zn-TOEt4PyP (1), супернатанта – не связавшегося металлопорфирина Zn-TOEt4PyP (2) и нанокompозита [Zn-TOEt4PyP+наноцеолит] (3).

Спектры флуоресценции для трех концентраций металлопорфирина Zn-TOEt4PyP представлены на рисунке 31. Возбуждение металлопорфирина проводили при длине волны 440 нм, максимумы спектров испускания соответствуют длине волны 635 нм.

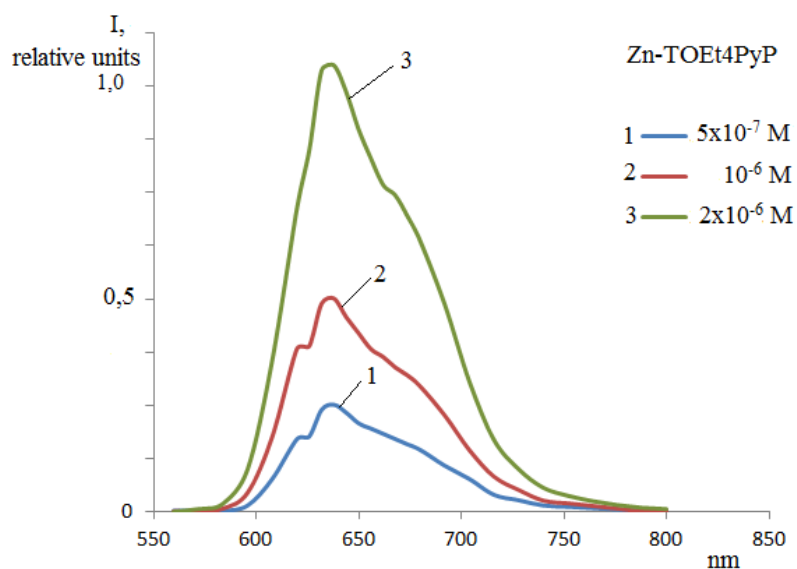


Рис. 31. Спектры флуоресценции металлопорфирина Zn-TOEt4PyP. На оси ординат – интенсивность флуоресценции в относительных единицах, на оси абсцисс – длина волны, в нм. Возбуждение при $\lambda=440$ нм.

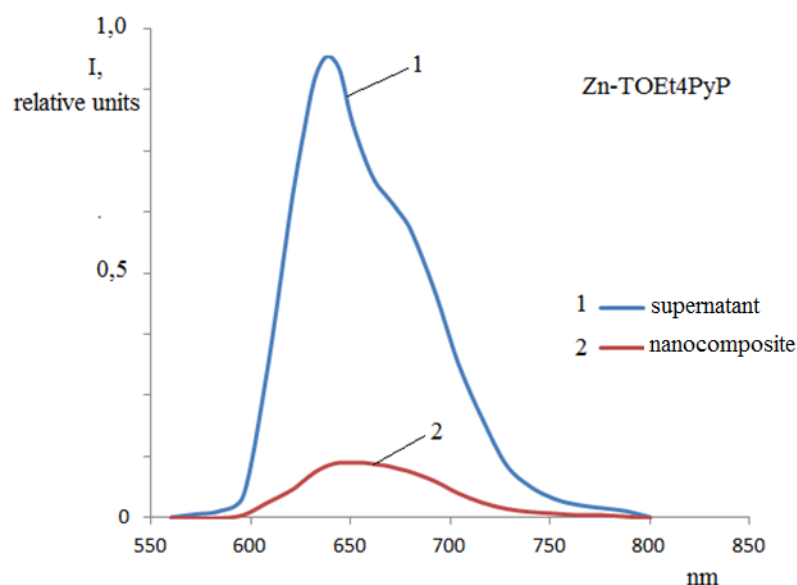


Рис. 32. Спектры флуоресценции супернатанта и нанокompозита [Zn-TOEt4PyP + наноцеолит]. На оси ординат – интенсивность флуоресценции в относительных единицах, на оси абсцисс – длина волны, в нм. Возбуждение при $\lambda=440$ нм.

На рисунке 32 представлены спектры флуоресценции супернатанта и нанокompозита [Zn-TOEt4PyP+наноцеолит].

Из расчетов спектров флуоресценции следует, что у нанокompозита флуоресцирует около 2% порфирина, а остальные 98% металлопорфирина, связанного с наноцеолитом, не флуоресцирует. Возможно это связано с тушением флуоресценции металлопорфирина остовом наноцеолита.

Комплексообразование Zn-TOEt4PyP с наноцеолитом при 37° C

Эксперименты проводили аналогично как и для 18°С за исключением того, что раствор нанокompозита в течение эксперимента термостатировали при 37° С. Как и в случае с температурой 18°С, при температуре 37°С связывание металлопорфирина Zn-TOEt4PyP с наноцеолитом происходит очень быстро (менее одной минуты), здесь также происходит сдвиг пика полосы Soret с 439,5 нм в длинноволновую область до 442,0 нм (батохромный эффект), что свидетельствует о взаимодействии металлопорфирина с наноцеолитом и образовании нанокompозита.

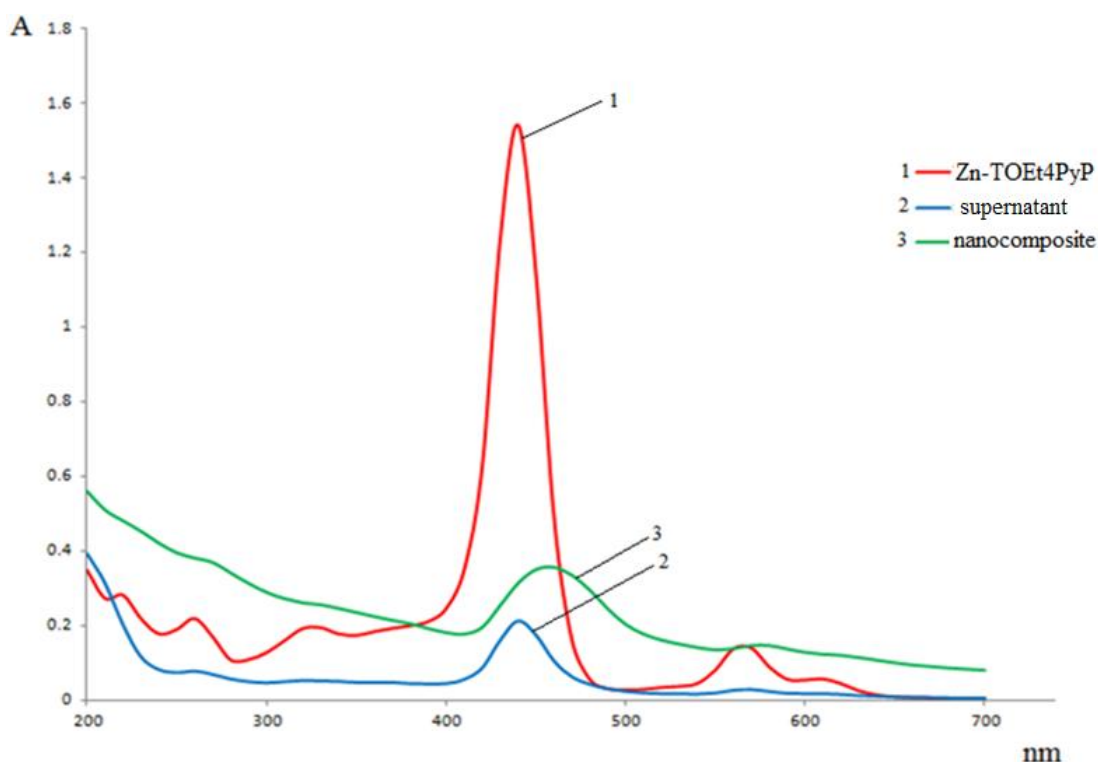


Рис. 33. Спектры поглощения металлопорфирина Zn-TOEt4PyP (1), супернатанта (2) и нанокompозита (3), полученные при температуре 37 ° С.

На рис. 33 представлены спектры поглощения нанокompозита при температуре 37° С (на рисунке отмечено зеленым цветом и цифрой 3) и супернатанта – несвязавшегося раствора металлопорфирина Zn-TOEt4PyP (на рисунке отмечено синим цветом и цифрой 2), а также исходного металлопорфирина Zn-TOEt4PyP (на рисунке отмечено красным цветом и цифрой 1).

Проведенные расчеты на основе спектров поглощения показали, что при температуре 37° С доля несвязанного металлопорфирина оказалась 4,6% и соответственно 95,4% металлопорфирина Zn-TOEt4PyP связалось с наночастицами цеолита.

Из расчетов, получаемых анализом сравнения спектров флуоресценции следует, что при 37°С у нанокompозита флуоресцирует всего около 2,8% порфирина, а остальные 97% металлопорфирина, связанного с наноцеолитом, не флуоресцирует. Из этого следует, что, по-видимому, происходит тушение связанного металлопорфирина наноцеолитом. Это предположение было подтверждено расчетами по квантовому выходу синглетного кислорода для нанокompозита, проведенного в Институте физики НАН Беларуси (Минск).

Расчеты квантовых выходов фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода (γ_{Δ}) показали, что для нанокompозита с порфирином TOEt4PyP γ_{Δ} не превышает 0,04 и для нанокompозита с металлопорфирином ZnTOEt4PyP - 0,01. Такое низкое значение квантового выхода может быть связано как с образованием в порах наноцеолита агрегатов порфиринов, обладающих очень слабой способностью генерации синглетного кислорода, так и с тушением синглетного кислорода остовом цеолита.

Сравнение двух температурных режимов связывания металлопорфирина Zn-TOEt4PyP с наноцеолитом указывает на явную температурную зависимость такого процесса, что следовало ожидать из простых, хорошо известных соображений о зависимости броуновского движения от температуры. Связывание Zn-TOEt4PyP с наноцеолитом при 18°С происходит на $73,5 \pm 2,9$ %, тогда как при 37°С связывается $95,4 \pm 3,8$ % молекул металлопорфирина.

Комплексообразование металлопорфирина Zn-TBut3PyP с наноцеолитом

Изучение комплексообразования металлопорфирина Zn-TBut3PyP с наноцеолитом представляло интерес в связи с тем, что, во-первых, в отличие от Zn-TOEt4PyP эта молекула не содержит -ОН групп, а также, что его бутильная группа ($R = -CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_3$)

находится в 3-м положении пиридинового кольца. Как было показано выше поскольку связывание более эффективно происходит при температуре 37° С, исследование комплексообразования металлопорфирина Zn-TBut3PyP с наноцеолитом нами было проведено только при температуре 37° С.

Отметим, что как и для Zn-TOEt4PyP, металлопорфирин Zn-TBut3PyP при связывании с наноцеолитом также характеризуется сдвигом пика максимума полосы Core с 429,0 нм до 431,0 нм (батохромный эффект), что свидетельствует о взаимодействии металлопорфирина с наноцеолитом и образовании нанокompозита. И в этом случае также образование нанокompозита происходит очень быстро (менее 1 минуты) с интенсивным падением максимума полосы Core. После 120-й минуты изменений в поглощении спектра не происходило и мы останавливали эксперимент и определяли количество связанного металлопорфирина Zn-TBut3PyP с наноцеолитом.

На рис. 34 представлены спектры поглощения полученного нанокompозита при температуре 37° С (Zn-TBut3PyP+наноцеолит) (на рисунке отмечено зеленым цветом и цифрой 3) и супернатанта - несвязавшегося раствора металлопорфирина Zn-TBut3PyP (на рисунке отмечено синим цветом и цифрой 2), а также исходного металлопорфирина Zn-TBut3PyP (на рисунке отмечено красным цветом и цифрой 1).

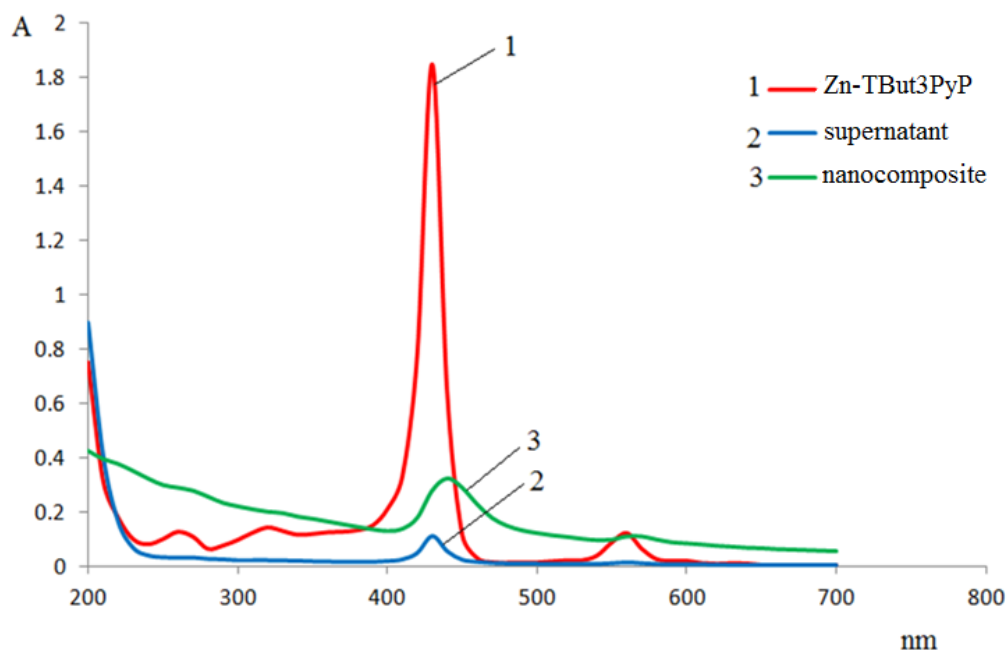


Рис. 34. Спектры поглощения металлопорфирина Zn-TBut3PyP (1), супернатанта (2) и нанокompозита (3), полученного при температуре 37° С.

На основе полученных спектров поглощения (исходного спектра металлопорфирина Zn-TBut3PyP и супернатанта) нами было определено, что несвязанного металлопорфирина оказалось 5,9 % и соответственно 94,1% металлопорфирина Zn-TBut3PyP связалось с наноцеолитом, образовав наноккомпозит [Zn-TBut3PyP+наноцеолит].

На рисунке 35 представлены спектры флуоресценции металлопорфирина Zn-TBut3PyP для трех концентраций (от 5×10^{-7} до 2×10^{-6} М). Возбуждение металлопорфирина проводили при длине волны 430 нм, максимумы спектров испускания соответствуют длинам волн 613 нм и 660 нм.

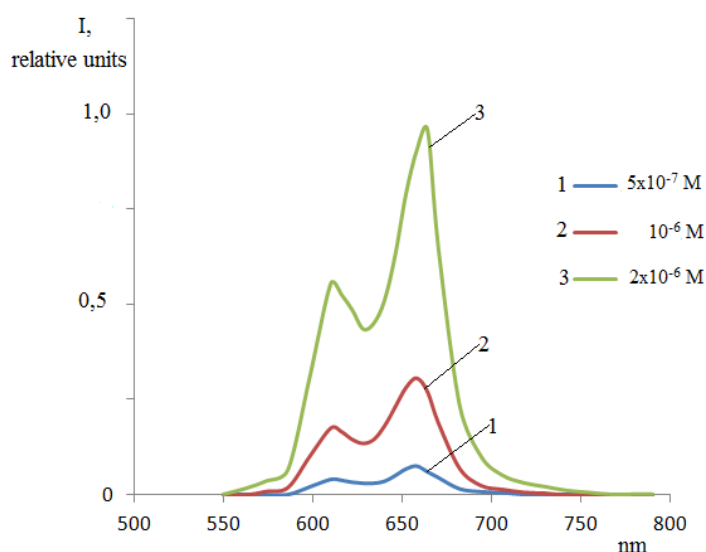


Рис. 35. Спектры флуоресценции металлопорфирина Zn-TBut3PyP. На оси ординат – интенсивность флуоресценции в относительных единицах, на оси абсцисс - длина волны, в нм. Возбуждение при $\lambda=430$ нм.

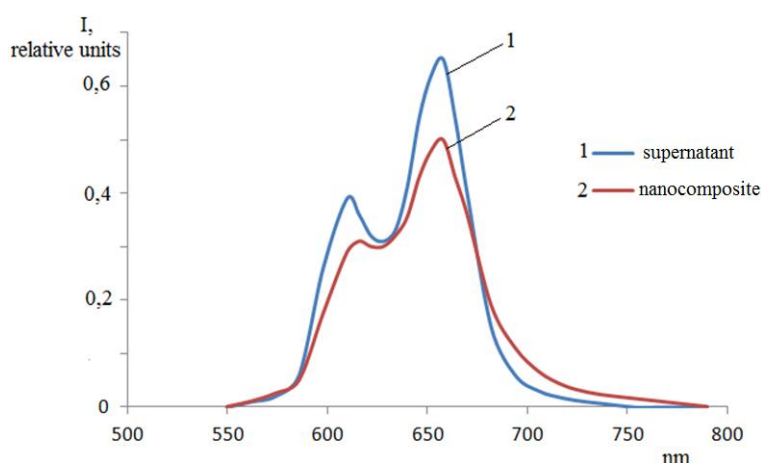


Рис. 36. Спектры флуоресценции супернатанта и наноккомпозита (Zn-TBut3PyP+наноцеолит). На оси ординат – интенсивность флуоресценции в относительных единицах, на оси абсцисс - длина волны, в нм. Возбуждение при $\lambda=430$ нм.

На рисунке 36 представлены спектры флуоресценции супернатанта и нанокompозита [Zn-TBut3PyP+наноцеолит]. Из расчетов спектров флуоресценции следует, что у нанокompозита флуоресцирует около 6,6 % порфирина, а остальные 93,4 % металлопорфирина, связанного с наноцеолитом, не флуоресцирует или гасятся остовом наноцеолита.

Итак, на основе проведенных экспериментов для двух металлопорфиринов следует, что имеется очевидная температурная зависимость комплексообразования катионных металлопорфиринов с наночастицами цеолита и для корректного определения процента связывания необходимо строгое термостатирование условий эксперимента.

Десорбцию (металло)порфиринов TOEt4PyP, Zn-TOEt4PyP, Zn-TBut3PyP с наночастиц цеолита исследовали по спектрам поглощения на полосе Core 420-440 нм: а) при добавлении одновалентных (NaCl) и двухвалентных солей (CaCl_2 и MgCl_2), а также б) действии света на растворы нанокompозитов. Исследования показали, что для всех порфиринов образовывался устойчивый нанокompозит и при добавлении в раствор солей, и при действии света десорбции (металло)порфиринов не происходит.

Таким образом, при комплексообразовании (металло)порфирина с наноцеолитом образуются прочные электростатические (возможно также гидрофобные) связи катионных (металло)порфиринов с отрицательно заряженной поверхностью наночастиц цеолита. У нанокompозитов из наночастиц цеолита и (металло)порфиринов флуоресцирует всего 3-6% (металло)порфирина, а остальные 94-97% связанного (металло)порфирина не флуоресцирует. Изучение квантовых выходов образования синглетного кислорода (γ_Δ) показало, что такие нанокompозиты генерируют синглетный кислород с очень низким квантовым выходом (0,01 - 0,04), что может быть связано как с образованием в порах наноцеолита агрегатов (металло)порфиринов, обладающих очень слабой способностью генерации синглетного кислорода, так и с тушением синглетного кислорода остовом цеолита. Такие нанокompозиты не могут быть использованы для целей фотодинамической терапии.

3.4.2. Наноконкомпозиты катионных (металло)порфиринов с наночастицами серебра

Как было отмечено в главе I одним из наиболее перспективных подходов усиления эффективности ФДТ рака и ФДИ микроорганизмов является применение наноконтейнеров из наночастиц благородных металлов (золота и серебра). Сорбция такими наноконтейнерами фотосенсибилизаторов может привести к значительному усилению эффективности ФДИ микроорганизмов (и в частности против *St. aureus*) вследствие бимодального действия наноконкомпозитов [105]. Такой эффект происходит при освещении светом наночастиц: а) вследствие плазмонного резонанса и из-за сильного нагрева наночастиц в местах их локализации и летального повреждения структур микроорганизмов, а также б) вследствие фотодинамического эффекта у порфиринов, приводящего к образованию губительного для микроорганизмов активных форм кислорода и, в первую очередь, синглетного кислорода. Применение наноконтейнеров позволит сконцентрировать в их структурах значительные количества порфиринов и усилить эффективность поражающего действия активных форм кислорода.

Исследования комплексообразования порфиринов и металлопорфиринов проводили с двумя видами наночастиц серебра: 1) со сферическими и 2) анизотропными наночастицами серебра.

Комплексообразование (металло)порфиринов со сферическими наночастицами серебра

Нами было исследовано взаимодействие катионных (металло)порфиринов со сферическими наночастицами серебра (рис. 37). Показано, что такие наночастицы образуют наноконкомпозиты с содержанием (металло)порфиринов до 60 % [67].

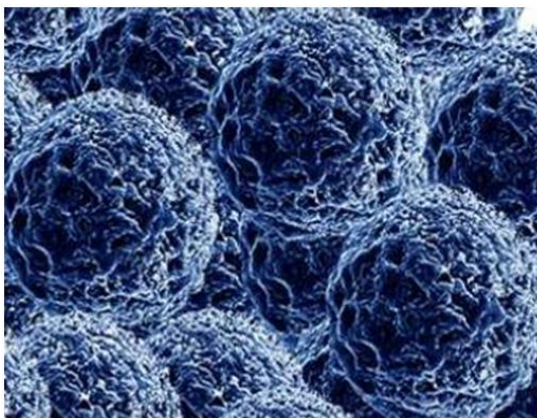


Рис. 37. Сферические наночастицы коллоидного серебра [84].

Предоставленные фирмой “БИОВАР” ООО сферические наночастицы серебра имели размер наночастиц около 20 нм и характерный серо-голубой цвет. Взаимодействие с порфиринами исследовали методом спектрофотометрии в диапазоне длин волн 200-700 нм. Спектр сферических наночастиц серебра в видимой области спектра характеризуется одним пиком поглощения (417 нм), совпадающим с поглощением порфиринов в области Core (рис. 38).

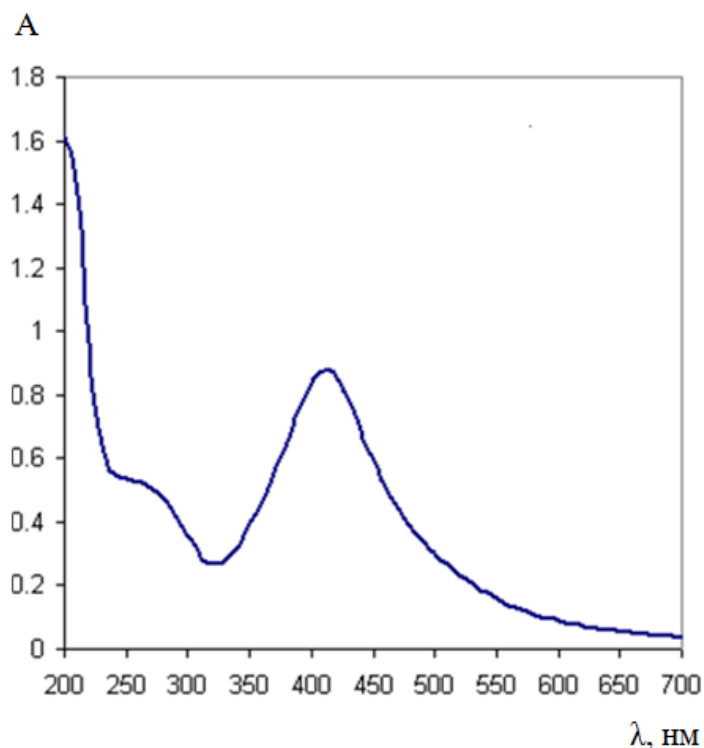


Рис. 38. Спектр поглощения сферических наночастиц серебра диаметром 20 нм.

Исследование динамики сорбции порфиринов на наночастицах серебра проводили на примере двух катионных (металло)порфиринов: а) мезо-тетра (4-N-бутил пиридил) порфирин (TBut4PyP), б) Ag-мезо-тетра (4-N-бутил пиридил) порфирин (Ag-TBut4PyP), а также анионного фотосенсибилизатора Al-фталоцианина (препарат “Фотосенс”). Эти два (металло)порфирина были выбраны по двум критериям: во-первых, в экспериментах по действию на культуры раковых клеток и на различные микроорганизмы *in vitro* они показали высокую активность по сравнению с другими ранее исследованными (металло)порфиринами [71, 72], во-вторых, порфирин Ag-TBut4PyP был выбран для исключения эффекта металлирования (эффект встраивания ионной формы Ag в структуру порфиринового ядра).

На рисунках 39 и 40 представлена динамика изменения спектра поглощения растворов порфирина TBut4PyP (рис. 39) и фотосенсибилизатора Al-фталоцианин (рис. 40) после добавлении наночастиц серебра. После добавления наночастиц в раствор порфирина происходит резкое падение интенсивности спектра поглощения порфирина TBut4PyP и некоторый сдвиг пика поглощения в область более длинных волн (рис. 39).

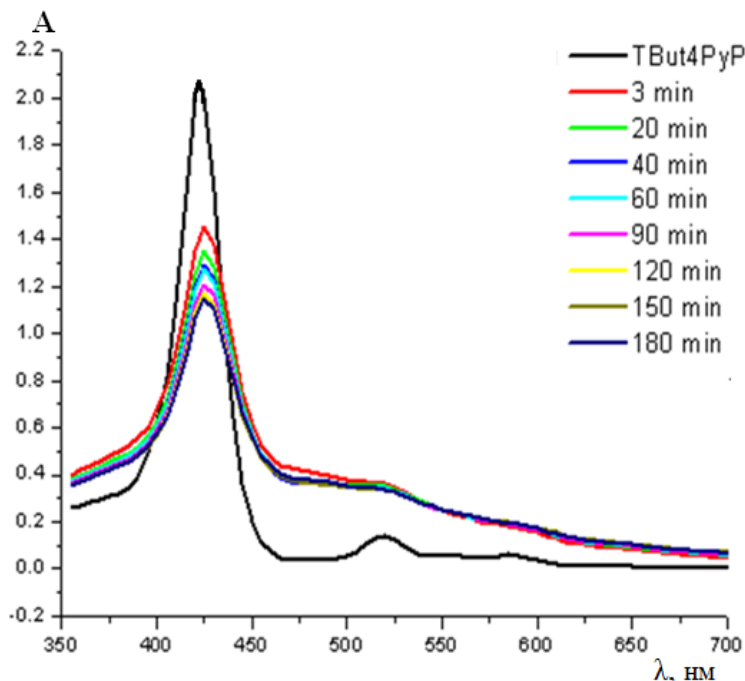


Рис. 39. Динамика изменения спектра поглощения раствора порфирина TBut4PyP после добавлении сферических наночастиц серебра.

Наблюдаемое гипохромное изменение (падение интенсивности поглощения света) у порфирина TBut4PyP (рис. 39) можно объяснить появлением в растворе комплексов [наночастица – порфирин], где порфирин находится в более упорядоченной форме по сравнению со своим свободным состоянием. Анализ динамики изменения спектров поглощения для (металло)порфиринов TBut4PyP и Ag-TBut4PyP при добавлении наночастиц серебра приводит к заключению, что связывание порфиринов происходит очень быстро – меньше 3-х минут. Так, для порфирина Ag-TBut4PyP при добавлении наночастиц интенсивность поглощения резко падала до $A=1,211$ (после 3 минут) и продолжала падать в течение 3-х часов до $A=1,028$ (при этом в течение последних 30 мин интенсивность практически не менялась). Стабильное состояние интенсивности поглощения (около $A=1,00$)

спектров порфиринов наблюдали через 12 и 24 часов, что свидетельствовало о том, что десорбции порфиринов не происходит.

Иная картина наблюдается для фотосенсибилизатора Al-фталочианин при добавлении тех же наночастиц (рис. 40). Здесь также происходит быстрая сорбция фотосенсибилизатора Al-фталочианин на наночастицы серебра (3 мин). После добавления наночастиц интенсивность исходной кривой падает незначительно. Однако в следующие 30 мин интенсивность кривой поглощения практически совпадает с исходной, что, по-видимому, можно интерпретировать десорбцией Al-фталочианина с наночастиц. В дальнейшем этот процесс десорбции продолжается (кривые получали для времен 60, 90, 120 мин) и происходит полная десорбция Al-фталочианина с наночастиц серебра.

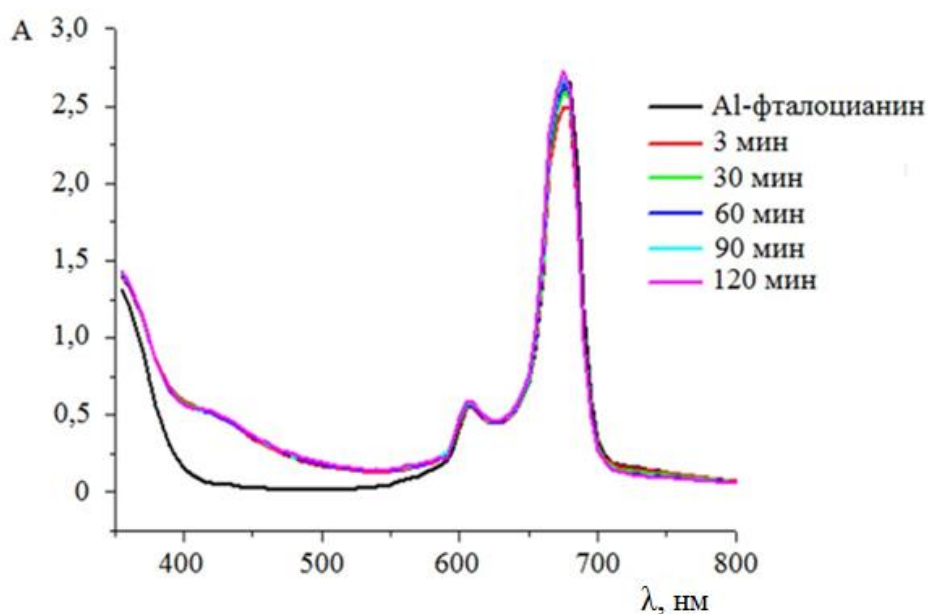


Рис. 40. Динамика изменения спектра поглощения раствора фотосенсибилизатора Al-фталочианин после добавлении сферических наночастиц серебра.

На основе экспериментов были проведены расчеты сорбции (металло)порфиринов TBut4PyP и Ag-TBut4PyP на наночастицах сферического серебра. Было определено, что:

1. для порфирина TBut4PyP процент сорбции на наночастицах составляет $60,7 \pm 3\%$;
2. для металлопорфирина Ag-TBut4PyP процент сорбции на наночастицах составляет $55,6 \pm 2,7\%$.

Таким образом, проведенные исследования сорбции двух типов (металло)порфиринов на наночастицах сферического серебра свидетельствует о хороших возможностях взаимодействия и переноса катионных (металло)порфиринов такими наночастицами, что является перспективным для их применения в фотодинамической терапии опухолей и инактивации микроорганизмов.

Комплексообразование (металло)порфиринов с анизотропными наночастицами серебра

Нами также было исследовано взаимодействие катионных (металло)порфиринов с анизотропными наночастицами серебра – смеси наночастиц треугольной, кубической, шестигранной, овальной и др. форм (рис. 41).

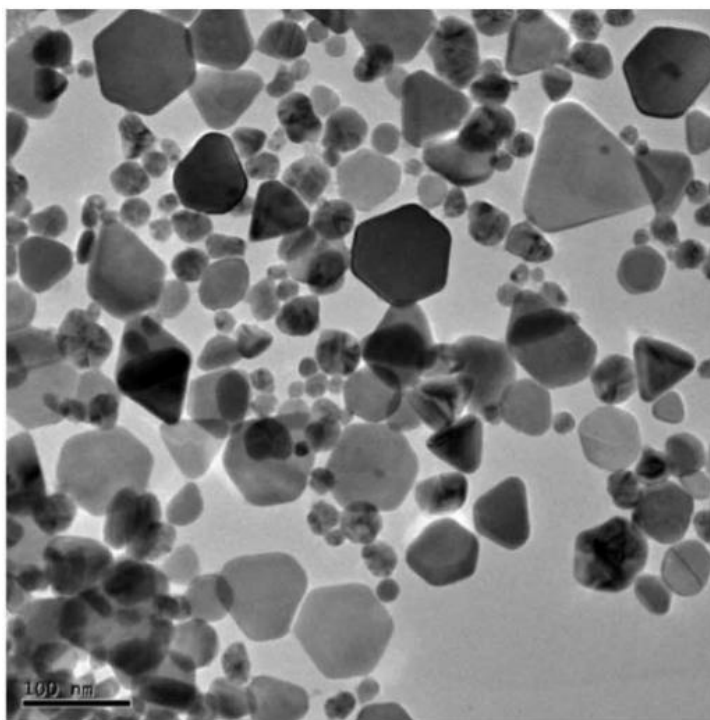


Рис. 41. Анизотропные наночастицы серебра [85]

Предоставленные фирмой “БИОВАР” ООО анизотропные наночастицы серебра имели характерный зеленовато-синий цвет с размером наночастиц 80-130 нм. Взаимодействие порфиринов с анизотропными наночастицами серебра исследовали методом спектрофотометрии в диапазоне длин волн 200-800 нм. В отличие от спектра сферических наночастиц серебра (рис. 38) спектр анизотропных наночастиц серебра в видимой области

характеризуется двумя пиками поглощения в области Соре (410 нм) и более широким пиком при длине волны 667 нм (рис. 42).

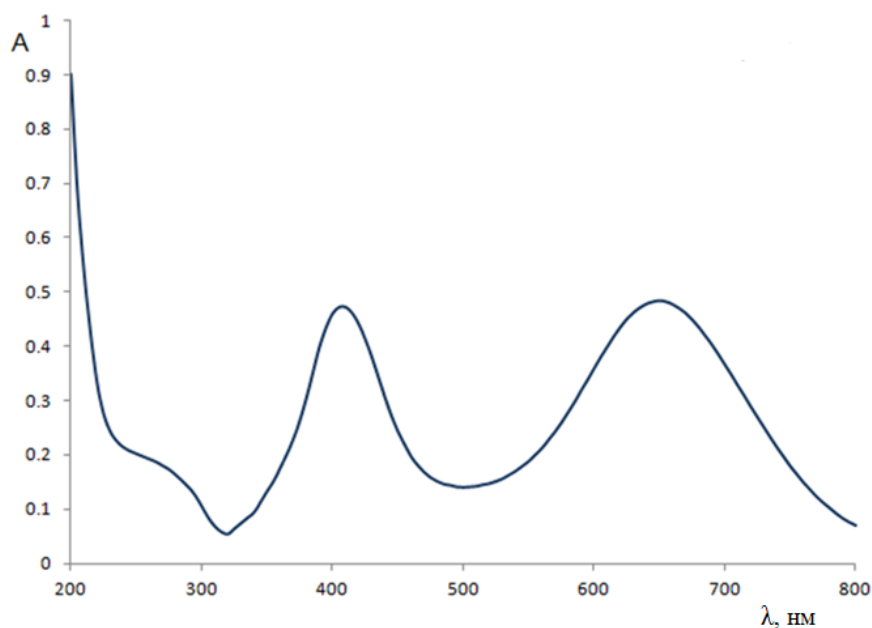


Рис. 42. Спектр поглощения анизотропных наночастиц серебра

Исследование динамики сорбции порфиринов на анизотропных наночастицах серебра проводили на примере четырех катионных (металло)порфиринов: 1) Zn-мезо-тетра (4-N-бутил пиридил) порфирин (Zn-TBut4PyP), 2) Zn-мезо-тетра (3-N-бутил пиридил) порфирин (Zn-TBut3PyP), 3) мезо-тетра (4-N-оксиэтил пиридил) порфирин (TOEt4PyP) и 4) Zn-мезо-тетра (4-N-оксиэтил пиридил) порфирин (Zn-TOEt4PyP).

Пример исследования динамики взаимодействия наночастиц анизотропного серебра с порфиринами (Zn-TOEt4PyP) и образование нанокомпозита (порфирин + наночастицы анизотропного серебра) представлен на рис. 43. Из спектра видно, что после добавления наночастиц происходит изменение формы спектра, резкое падение пика Соре и его смещение на 2-3 нм в длинноволновую сторону (батохромный эффект), что свидетельствует об образовании нанокомпозита в растворе. Происходит суммирование пиков наночастиц анизотропного серебра и металлопорфирина (на спектрах обозначено цифрой 2). После связывания металлопорфирина с наночастицами серебра в течение 90 мин (когда изменения спектра уже не происходит) и осаждения нанокомпозита центрифугированием (15 мин, 12 тыс/об. мин) регистрировали спектр супернатанта (на спектре обозначен цифрой 3). Из сравнения спектров 1 и 3 проводили расчеты ориентировочного связывания порфиринов с

наночастицами анизотропного серебра. Аналогичные спектры также были получены для остальных (металло)порфиринов. Расчеты показали, что наночастицы анизотропного серебра связывают 70-90 % ($p < 0,05$; $n = 5$) растворенного (металло)порфирина (10^{-6} M).

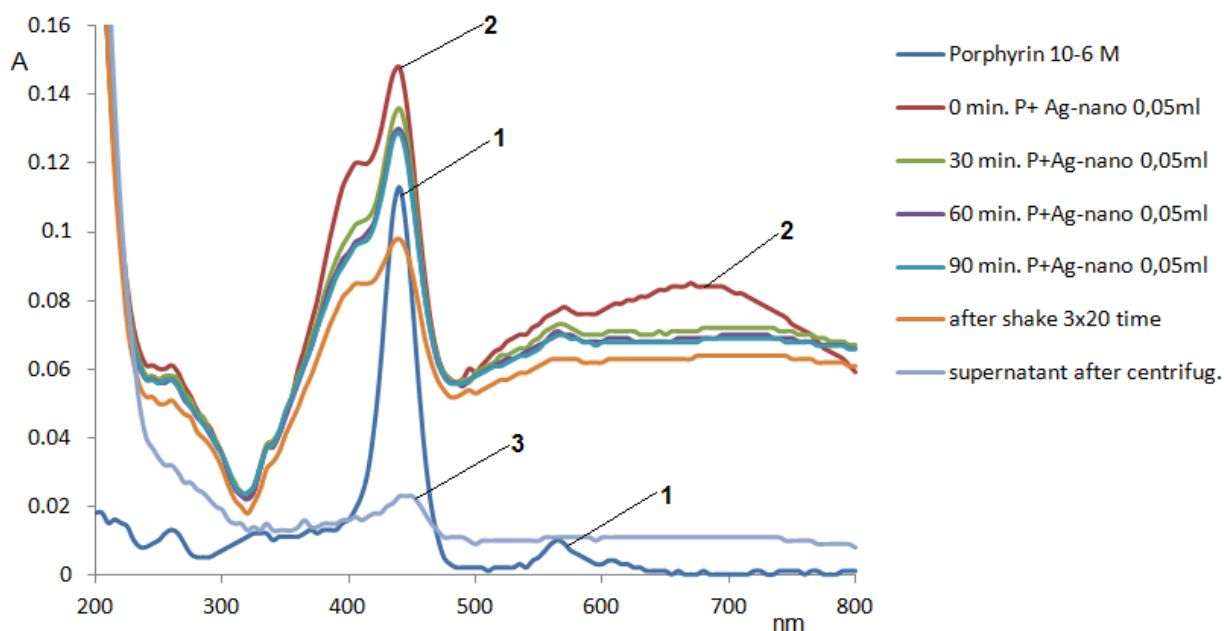


Рис. 43. Динамика спектра поглощения металлопорфирина Zn-TOEt4PyP (10^{-6} M) при добавлении наночастиц анизотропного серебра: исходный спектр металлопорфирина без наночастиц (1), после добавления наночастиц и образования нанокompозита – (2), супернатант после центрифугирования (3).

После доставки нанокompозита к поражающим целям (онкологическим клеткам или микроорганизмам) важное значение имеет десорбция порфиринов: при этом может происходить выделение большого количества фотосенсибилизатора на мишенях или в непосредственной близости от них и при фотодинамическом действии будет происходить образование большого количества синглетного кислорода, что значительно усиливает поражающее действие порфиринов.

Десорбцию (металло)порфиринов с наночастиц анизотропного серебра исследовали по спектрам поглощения полосы Core 420-440 nm: а) при добавлении одновалентных (NaCl) и двухвалентных солей (CaCl_2 и MgCl_2), а также б) при действии света на раствор нанокompозита. Изучение десорбции порфиринов с нанокompозита с цеолитом показало, что для всех (металло)порфиринов образовывался устойчивый нанокompозит и при добавлении в

раствор солей и при действии света десорбции (металло)порфиринов не происходит (п. III.4.1). Иная картина десорбции фотосенсибилизаторов наблюдается для нанокомпозитов с наночастицами анизотропного серебра.

Пример результата исследований при добавлении одновалентной соли NaCl для металлопорфирина Zn-TOEt4PyP представлен на рис. 44.

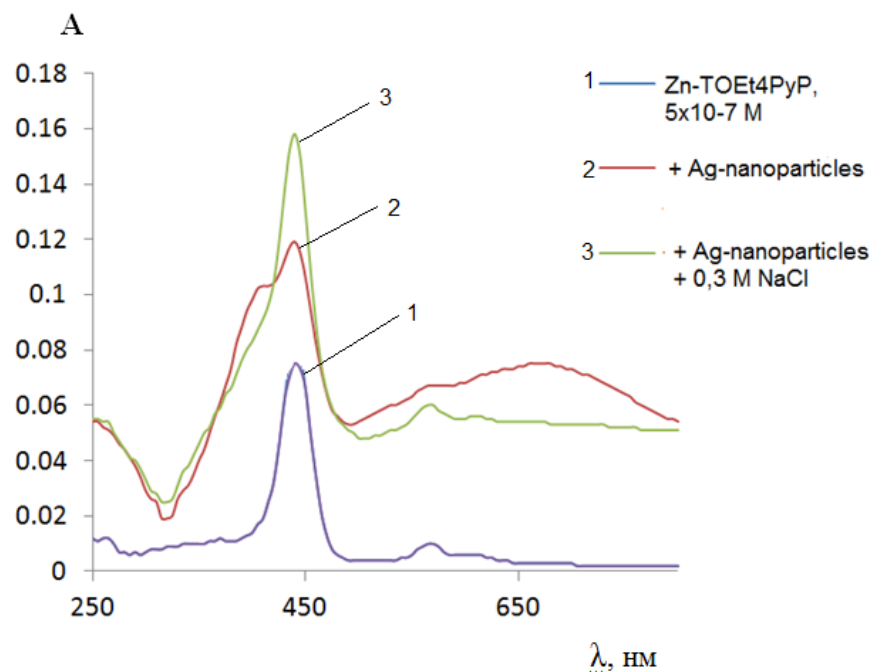


Рис. 44. Спектры поглощения металлопорфирина Zn-TOEt4PyP (1), нанокомпозита анизотропного серебра с Zn-TOEt4PyP (2) и после десорбции металлопорфирина Zn-TOEt4PyP (3) при действии соли NaCl.

Как видно из представленных оптических спектров поглощения, после сорбции порфирина Zn-TOEt4PyP и образования через 30 мин нанокомпозита (спектр 2), при добавлении в раствор одновалентной соли NaCl до конечной концентрации 0,3 М (спектр 3) происходит явная десорбция порфирина с нанокомпозита (сравнив спектр 2 и спектр 3 можно заметить существенное увеличение пика Core на 439 нм). Представленные результаты свидетельствуют, что для порфирина Zn-TOEt4PyP наиболее эффективную (а также легко реализуемую для микроорганизмов и клеток) десорбцию можно проводить раствором NaCl (0,3 М NaCl в растворе практически полностью десорбирует порфирин с наночастиц) (Рис. 44). Раствор CaCl₂ также десорбирует порфирин Zn-TOEt4PyP с наночастиц серебра, однако в растворе появляется муть, что свидетельствует о частичном

разложении или образовании крупных конгломератов нанокompозита в растворе. Раствор MgCl_2 также десорбирует порфирин Zn-TOEt4PyP с наночастиц серебра, однако в растворе уже при добавлении соли MgCl_2 до конечной концентрации 0,1 М начинается образование видимых глазом хлопьев нанокompозита, которые по размерам увеличиваются при дальнейшем добавлении соли MgCl_2 до 0,5 М, и начинают осаждаться, т.е. эти двухвалентные соли (CaCl_2 и MgCl_2) не годятся для десорбции порфина с нанокompозита.

Спектральные исследования десорбции (металло)порфиринов с наночастиц анизотропного серебра действием света на раствор нанокompозитов показали, что облучение светом (лампа видимого света, мощность 50 Вт, 30 мВт/см²) продолжительностью 1, 5, 15, 30 и 60 мин никакого эффекта не производит, т.е. десорбции не происходит.

Результаты спектрального исследования образования комплексов (металло)порфиринов наночастицами анизотропного серебра, их десорбции в присутствии солей металлов были подтверждены для всех 4-х (металло)порфиринов методом флуоресцентной спектроскопии. Этот метод имеет то преимущество перед спектроскопией оптического поглощения, что при возбуждении молекулы порфина при 420-440 нм (полоса Soret) флуоресцентный спектр испускания регистрируется в области 500-800 нм, где наночастицы серебра не флуоресцируют, т.е. исследуем “чистые” спектры (металло)порфиринов и наложения спектров как в случае абсорбционной спектроскопии нет.

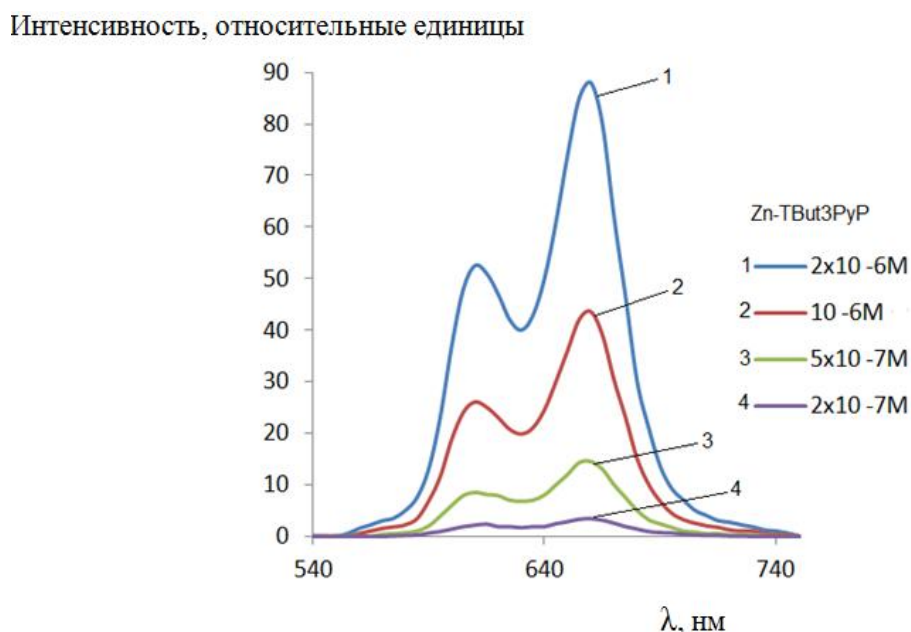


Рис. 45. Спектры флуоресценции металлопорфина Zn-TBut3PyP . $\lambda_{\text{возб}} = 430 \text{ нм}$.

Типичный эксперимент представлен на рисунке 45, где приведены спектры флуоресценции металлопорфирина Zn-TBut3PyP для четырех концентраций (от 2×10^{-7} до 2×10^{-6} М). Флуоресценцию металлопорфирина регистрировали при длинах волн 613 нм и 660 нм, при $\lambda_{\text{возб}} = 430$ нм.

Десорбцию (металло)порфиринов TOEt4PyP, Zn-TOEt4PyP, Zn-TBut3PyP и Zn-TBut4PyP с наночастиц анизотропного серебра исследовали по спектрам флуоресценции с возбуждением на полосе Core (420-440 нм) и испусканием от 540 до 750 нм при добавлении в раствор одновалентных (NaCl) и двухвалентных солей (CaCl_2 и MgCl_2). Типичный эксперимент по изучению десорбции представлен на рисунке 46, где приведены спектры флуоресценции металлопорфирина Zn-TBut3PyP (кривая 1), нанокompозита при добавлении наночастиц серебра к раствору порфирина (кривая 2) и десорбции металлопорфирина с нанокompозита при добавлении в раствор NaCl до конечной концентрации 0,3 М (кривая 3).

Интенсивность, относительные единицы

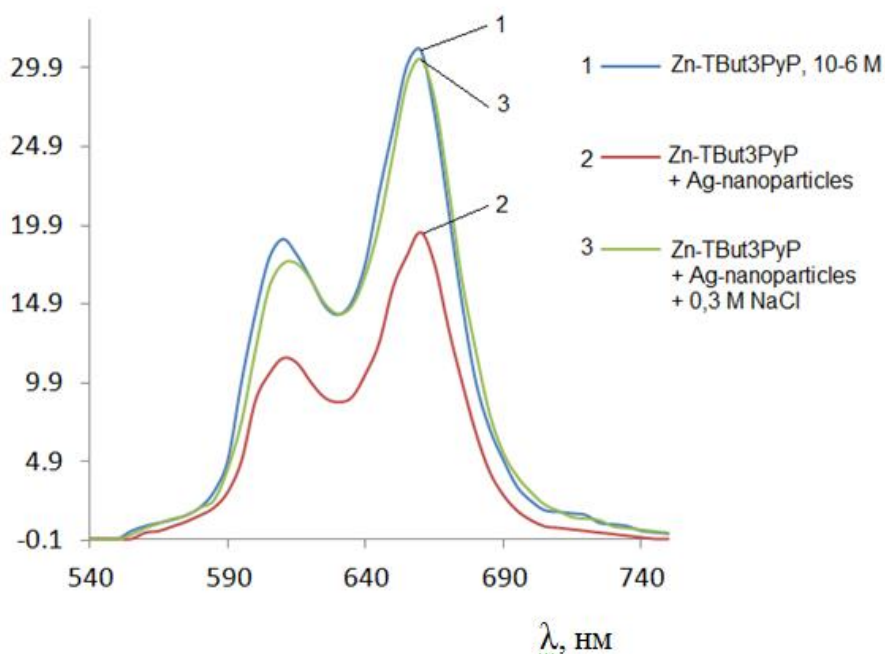


Рис. 46. Спектры флуоресценции: металлопорфирина Zn-TBut3PyP (1), нанокompозита при добавлении наночастиц серебра к раствору порфирина (2) и десорбция металлопорфирина с нанокompозита при добавлении в раствор NaCl до конечной концентрации 0,3 М (3), ($\lambda_{\text{возб}} = 430$ нм)

Как видно из представленных спектров флуоресценции рисунка 46, после сорбции порфирина Zn-TBut3PyP и образования через 60 мин нанокompозита (спектр 2), при добавлении в раствор одновалентной соли NaCl до конечной концентрации 0,3 М (спектр 3) происходит полная десорбция металлопорфирина с нанокompозита (сравнив спектр 1 и спектр 3 можно заметить практически их полное совпадение). Представленные результаты свидетельствуют, что для металлопорфирина Zn-TBut3PyP наиболее эффективную (а также легко реализуемую для микроорганизмов и клеток) полную десорбцию можно проводить раствором NaCl (до конечной концентрации в растворе 0,3 М NaCl). Аналогичные результаты были получены также и для остальных трех (металло)порфиринов: TOEt4PyP, Zn-TOEt4PyP и Zn-TBut4PyP. Как и в случае оптических спектров поглощения при изучении флуоресцентных спектров отметим, что двухвалентные соли (CaCl_2 и MgCl_2) образуют в растворе муть, что свидетельствует о частичном разложении или образовании крупных конгломератов нанокompозита в растворе. Эти соли не годятся для десорбции (металло)порфиринов с нанокompозита.

Таким образом, добавление в раствор определенных количеств одновалентной соли (NaCl) приводит к полной десорбции (металло)порфиринов с наночастиц анизотропного серебра, что может приводить к увеличению локальной концентрации фотосенсибилизаторов в непосредственной близости от клеточной стенки или внутри бактерий. Двухвалентные соли (CaCl_2 и MgCl_2) образуют в растворе муть и не годятся для десорбции (металло)порфиринов с наночастиц анизотропного серебра. Учитывая, что при облучении светом нанокompозитов с анизотропным серебром происходит не только фотодинамическое разрушение клеток, но и плазмонный резонанс с высоким нагревом наночастиц, такие нанокompозиты могут быть высокоэффективными агентами для целей фотодинамической терапии и борьбы против широкого спектра микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Порфирины играют исключительную роль в природе, с их помощью осуществляются важнейшие биологические, биохимические, фотохимические и ферментативные процессы в живых организмах. Среди широкого спектра порфиринов мезо-замещенные синтетические катионные (металло)порфирины занимают особое место в связи с тем, что изменением их структуры можно добиться их включения в различные структуры клетки и действием света способствовать эффективному разрушению микроорганизмов и раковых клеток.

В биоактивности порфиринов важную роль играет свет. Изучение их фотофизических свойств: фотообесцвечивание и генерация синглетного кислорода как основного фактора поражения живых структур, имеет первостепенное значение для оценки эффективности порфиринов. Во всем мире специфической проблемой является увеличение числа патогенных микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, и разработка новых альтернативных антибактериальных технологий может иметь решающее значение в борьбе с ними. В этой связи исследование фотофизических свойств новых катионных (металло)порфиринов, соответствия этих свойств их медико-биологической активности и эффективному поражающему действию на опасные для организма клетки, представляет собой актуальную задачу современной медико-биологической науки.

В соответствии с поставленными целями были определены задачи: исследовать фотофизические свойства новых катионных (металло)порфиринов (оценить фотообесцвечивание и квантовый выход генерации синглетного кислорода); изучить их медико-биологическую активность (фотодинамическую инактивацию микроорганизмов *in vitro*; цитотоксическое и фототоксическое действие на монослойные и суспензионные линии раковых клеток); изучить образование комплексов с наночастицами цеолита и серебра и оценить целесообразность прикладного использования этих комплексов.

Действие света на исследуемые фотосенсибилизаторы от двух типов источников облучения (вольфрамовая лампа накаливания и солнце) показало, что катионные (металло)порфирины, а также анионный фотосенсибилизатор Al-фталоцианин при облучении лампой накаливания (мощность облучения 30 мВт/см²) фотообесцвечиванию не подвергаются. Под действием солнца у всех фотосенсибилизаторов происходит незначительное обесцвечивание (уменьшение интенсивности поглощения полосы Core на 9-

17%). Для фотосенсибилизатора хлорина еб наблюдается существенное фотообесцвечивание и использование этого фотосенсибилизатора рекомендуется проводить со строгой защитой от света.

При фотодинамических процессах (ФДТ опухолей, а также ФДИ микроорганизмов) наиболее важным показателем эффективности фотосенсибилизатора является количество генерируемого синглетного кислорода. Квантовый выход образования синглетного кислорода (γ_{Δ}) пропорционален количеству образовавшихся молекул синглетного кислорода и определяя γ_{Δ} мы фактически определяем эффективность фотосенсибилизатора (порфирина). Исследования квантового выхода генерации синглетного кислорода были проведены с катионными порфиринами и Zn-содержащими порфиринами, имеющими в 3-м или 4-м положениях пиридинового кольца активные оксиэтил-, бутил- или аллил-периферические группы. Из проведенных экспериментов по фотофизическим и спектральным свойствам (металло)порфиринов были сделаны следующие заключения: а) новые катионные порфирины имеют высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода, б) Zn-содержащие порфирины обладают значительно более высоким квантовым выходом генерации синглетного кислорода (до 0,97) по сравнению со свободными основаниями порфиринов (0,75-0,78) и с известным порфирином TMe4PyP (0,77).

В связи с возможностями направленного синтеза (металло)порфиринов с изменением различных центральных атомов металлов и функциональных периферических групп была поставлена задача выяснения этих факторов на фотодинамическую инактивацию микроорганизмов и раковых клеток *in vitro*. Полученные данные и заключения по изучению фотофизических свойств явились основанием отбора наиболее эффективных новых катионных (металло)порфиринов для дальнейших экспериментов. Среди более чем 100 новых соединений нами было изучено действие на микроорганизмы 9 нижеследующих катионных порфиринов и металлопорфиринов:

- meso-tetra-[4-N-(2'-oxyethyl) pyridyl] porphyrin (TOE4PyP), Zn-TOE4PyP, Ag-TOE4PyP;
- meso-tetra-[4-N-(2'-butyl) pyridyl] porphyrin (TBut4PyP), Zn-TBut4PyP, Zn-TBut3PyP, Ag-TBut4PyP;
- meso-tetra-[4-N-(2'-allyl) pyridyl] porphyrin (TAl4PyP), Zn-TAl4PyP, Ag-TAl4PyP.

Было показано, что для 100%-ой инактивации Грам (+) микроорганизма *S. aureus* достаточно, чтобы концентрация Zn-порфиринов была 0,1 мкг/мл, что в 20 раз меньше, чем концентрация, которая требуется для 100%-ой инактивации Грам (-) микроорганизма *E.coli*. Результаты свидетельствуют о высокой эффективности инактивации Грам (+) и Грам (-) микроорганизмов катионными (металло)порфиринами без применения каких-либо дополнительных агентов усиления их действия (например, этилендиамин тетра-уксусной кислоты или антибиотика полимиксин, в основе которого нанопептид). Фотофизические свойства порфиринов и металлопорфиринов находятся в соответствии с их биологической активностью: наиболее эффективно поражают микроорганизмы те Zn-производные порфиринов (Zn-TBut3PyP и Zn-TBut4PyP), у которых наиболее высокие значения квантового выхода генерации синглетного кислорода.

Поставленные задачи определения сравнительной эффективности новых синтезированных (металло)порфиринов были решены также относительно монослойных (HeLa - клетки эпителия рака шейки матки) и суспензионных (K-562 – лимфобласты хронической миелоидной лейкемии) культур раковых клеток. Исследования по эффективности проводили с нижеследующими пятью соединениями, различающимися как зарядом молекулы, так и длиной боковой углеводородной цепи (в скобках указаны заряды и длины цепей):

- Zn-мезо-тетра [3-N-(2'-бутил) пиридил] порфирин, Zn-TBut3PyP, (+4);
- мезо-три[3-N-(2'-бутил)пиридил]монофенил(-C₁₂) порфирин, TriBut3PyMPhP, (+3);
- Zn-мезо-три [3-N-(2'-бутил) пиридил] монофенил(-C₁₂) порфирин, Zn-TriBut3PyMPhP, (+3);
- Zn-мезо-три [4-N-(2'-бутил) пиридил] монофенил(-C₁₆) порфирин, Zn-TriBut4PyMVanP, (+3);
- Zn-мезо-три [4-N-(2'-бутил) пиридил] монофенил(-CH₃) порфирин, Zn-TriBut4PyMVerP, (+3).

Для скрининга и идентификации наиболее эффективных (металло)порфиринов *in vitro* нами были проведены исследования по определению цитотоксичности (темновой токсичности) и фототоксичности (световой токсичности) вышеуказанных соединений. В соответствии с проделанной работой были сделаны следующие заключения:

- Наличие углеводородной цепи ($-C_{12}$ или $-C_{16}$) существенно увеличивает цитотоксичность препарата (по воздействию на монослойную культуру HeLa в 29 раз). Из исследованных препаратов наиболее цитотоксическим препаратом является металлопорфирин Zn-TriBut3PyMPhP.
- По фотодинамическому действию на культуру суспензионных клеток К-562 наиболее эффективным препаратом является Zn-TriBut3PyMPhP, ему незначительно уступает Zn-TriBut3PyMVanP, имеющие углеводородные цепи ($-C_{12}$ или $-C_{16}$ соответственно). Оба эти препараты намного эффективнее по фотодинамическому действию по сравнению с металлопорфирином Zn-TriBut3PyMVerP (с группой $-CH_3$), что можно объяснить возможным встраиванием углеводородных цепей этих металлопорфиринов во внутренние части мембраны и при действии света более эффективному разрушению как внутренней части, так и поверхности мембраны клеток.
- Фотодинамическое действие исследованных металлопорфиринов в 5-10 раз эффективнее по сравнению с цитотоксическим действием этих же порфиринов не содержащих металл.

В настоящее время наночастицы как переносчики лекарственных препаратов активно применяются в качестве наноплатформ (наноконтейнеров). Такие наноконтейнеры активно используются для повышения накопления фотосенсибилизаторов в непосредственной близости или на клеточных стенках как для микроорганизмов, так и для ФДТ опухолей. Среди многих типов наночастиц-наноконтейнеров, используемых для усиления эффективности и целевой доставки фотосенсибилизаторов, наночастицы цеолитов занимают особое место вследствие большой биологической активности, а также уникальных возможностей сорбции микроорганизмов и лигандов-порфиринов. Эти предпосылки использования цеолитов послужили основанием внимательного исследования комплексообразования (металло)порфиринов с наночастицами цеолита. Для изучения механизма связывания наночастиц цеолита с фотосенсибилизаторами были отобраны 5 типов катионных (металло)порфиринов таким образом, чтобы они отличались гидрофобностью (различными периферическими группами), наличием гидроксильной группы (для изучения возможной водородной связи с поверхностью цеолита), разными центральными атомами металла (Zn and Ag), различными положениями боковой

функциональной группы (3-я или 4-ая позиция в пиридинном кольце). Основные заключения на основании экспериментов следующие:

- При добавлении к раствору (металло)порфиринов наночастиц цеолита образуются наноконпозиты для которых процент адсорбции всех изученных (металло)порфиринов более 95%; преобладающим механизмом связывания является электростатическое связывание катионных (металло)порфиринов на отрицательно заряженной поверхности или внутренних полостях наночастиц цеолита. Анионные фотосенсибилизаторы Al-фталоцианин и порфирин хлорин еб не связывается или связывается очень слабо соответственно.
- В наноконпозитах наночастиц цеолита и (металло)порфиринов флуоресцирует всего 3-6% (металло)порфирина, а остальные 94-97% связанного (металло)порфирина не флуоресцирует. Изучение квантовых выходов образования синглетного кислорода показало, что такие наноконпозиты генерируют синглетный кислород с очень низким квантовым выходом (0,01 – 0,04), что может быть связано как с образованием в порах наноцеолита агрегатов порфиринов, обладающих очень слабой способностью генерации синглетного кислорода, так и с тушением синглетного кислорода остовом цеолита. Десорбции (металло)порфиринов с наночастиц цеолита одно- и двухвалентными солями не происходит. Следовательно, такие наноконпозиты не могут быть использованы для целей фотодинамической терапии.

Одним из наиболее перспективных подходов усиления эффективности ФДТ рака и ФДИ микроорганизмов является применение наноконтейнеров из наночастиц благородных металлов (золота и серебра). Исследования комплексообразования (металло)порфиринов были проведены с двумя видами наночастиц серебра: со сферическими и с анизотропными наночастицами серебра. Наиболее целесообразным является использование наноконпозитов с наночастицами анизотропного серебра вследствие больших сорбционных возможностей:

- В водном растворе (металло)порфирины с наночастицами анизотропного серебра образуют наноконпозиты, у которых процент адсорбции (металло)порфиринов находится в интервале 70-90 %.

- Добавление в раствор одновалентной соли (NaCl) в конечной концентрации 0,3 М приводит к полной десорбции (металло)порфиринов с наночастиц анизотропного серебра и возможному увеличению локальной концентрации фотосенсибилизаторов в непосредственной близости от клеточной стенки или внутри бактерий.

Таким образом, исследованные новые катионные (металло)порфирины являются соединениями с высокой биологической активностью и могут быть эффективно применены в борьбе против различных микроорганизмов и в фотодинамической терапии опухолей.

ВЫВОДЫ

1. Катионные порфирины и металлопорфирины, а также анионный фотосенсибилизатор Al-фталоцианин при облучении лампой накаливания фотообесцвечиванию не подвергаются.
2. Новые катионные порфирины и особенно Zn-производные порфиринов обладают значительно более высоким квантовым выходом генерации синглетного кислорода (γ_{Δ} до 0,97), чем известный порфирин TMe4PyP ($\gamma_{\Delta} = 0,77$).
3. Новые катионные (металло)порфирины обладают высокой эффективностью инактивации Грам (+) и Грам (-) микроорганизмов. Фотофизические свойства (металло)порфиринов находятся в полном соответствии с их биологической активностью: наиболее эффективно поражают микроорганизмы Zn-производные порфиринов с наиболее высоким квантовым выходом генерации синглетного кислорода.
4. Zn-производные порфиринов с углеводородной цепью ($-C_{12}$ или $-C_{16}$) поражают культуру суспензионных раковых клеток K-562 со значительно большей фотодинамической эффективностью (5-10 раз), чем Zn-порфирин без углеводородной цепи.
5. В водном растворе (металло)порфирины с наночастицами цеолита и анизотропного серебра образуют нанокомпозиты, у которых процент адсорбции порфиринов более 95% и 70-90 % соответственно. Нанокомпозиты из наночастиц цеолита и (металло)порфиринов генерируют синглетный кислород с очень низким квантовым выходом (0,01-0,04) и для целей фотодинамической терапии опухолей не могут быть использованы.
6. Добавление в раствор одновалентной соли (NaCl) приводит к полной десорбции (металло)порфиринов с наночастиц анизотропного серебра. Эти нанокомпозиты могут рассматриваться как высокоэффективные агенты фотодинамической терапии опухолей и в борьбе против широкого спектра микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бернштейн И.Я., Каминский Ю.Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии // Ленинград, Химия. - 1975. - 230 с.
2. Джагаров Б.М., Гуринович Г.П. Механизмы релаксационных процессов в молекулах хлорофилла и родственных соединений // Возбужденные молекулы. Кинетика превращений (Под. ред. А.А. Красновского). Ленинград, Наука. – 1982. - С. 59-74.
3. Джеликсон Б.Д. Основы фотодинамической терапии (ФДТ). http://kvantola.com/fdt_antiage_skintreatment/base-info/
4. Красновский А.А., мл. Синглетный молекулярный кислород и первичные механизмы фотодинамического действия оптического излучения // Итоги науки и техники. Современные проблемы лазерной физики. - 1990. - М.: ВИНТИ. - Т. 3. - С. 63–135.
5. Крисько Т. К., Кисляков И. М. Фотохимический метод регистрации синглетного кислорода в водной среде для изучения фотосенсибилизирующей способности твердофазных композиций // Оптический журнал. – 2009. – Т. 76(6). – С. 16-23.
6. Куликова М.В., Кочубей В.И. Благородные металлы – наноконтейнеры порфиринов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14 (4). – С. 206-209.
7. Лобода Б., Тареев А. Цеолиты - новое применение старого минерала // "Наука и жизнь". – 2010. – Номер 9. – Стр. 98-105.
8. Мадакян В.Н., Казарян Р.К., Хачатрян М.А., Степанян А.С., Куртикан 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.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике // – М.: Мир, 1976. – Раздел I. – С. 25–27.
10. Миронов А.Ф. Фотодинамическая терапия рака – новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 8. – С. 32–40.
11. Отчет о научно-исследовательской работе по теме № Ф11АРМ-017 “Молекулярные зонды на основе новых водорастворимых порфиринов – исследование фотофизических

- свойств и специфических взаимодействий с белками и нуклеиновыми кислотами методами оптической спектроскопии и молекулярного докинга” (руководитель Б.М. Джагаров) // Институт физики НАН Беларуси, Минск. – 2013. – С. 57.
12. Патент РФ 2220722, A61K 31/409. – 2004.
<http://www.findpatent.ru/catalog/1/21/194/1592/12784/>
13. Порфирины: структура, свойства, синтез. Под ред. Н.С. Ениколопьяна // Москва, Наука. – 1985. – С. 333.
14. Саргсян А. О., Хачатрян Ш. В., Геворкян Р. Г. Фазовые превращения природных цеолитов Армении при гидротермальной модификации // Ученые записки Ереванского государственного университета. – 2009. – Т. 1. – Стр. 3-8.
15. Сташевский А.С., Галиевский В.А., Кнюкшто В.Н., Казарян Р.К., Гюльханданян А.Г., Гюльханданян Г.В., Джагаров Б.М. Водорастворимые катионные пиридинные порфирины: флуоресцентные характеристики и фотосенсибилизированное образование синглетного кислорода // Журнал прикладной спектроскопии. – 2013. – Т. 80(6). – С. 823–833.
16. Странацко Е.Ф. Механизмы действия фотодинамической терапии.
<http://lasermedicine.narod.ru/pdt/mechanism/mechanisms.html>
в. Странацко Е. Ф., Рябов М. В. Новая лазерная технология в медицине – фотодинамическая терапия // - 2004. http://www.cybermed.ru/publications/5-letnij_opyt_fdt_s_proizvodnymi_hlorina_e6/
17. Фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии. Патент РФ на изобретение №: 2479585. Классификация по МПК: A61K C07D. Дата публикации: 20 Апреля, 2013. Начало действия патента: 17 Февраля, 2012. Internet_80. 80_ <http://bankpatentov.ru/node/560611>.
18. Фридович И. Радикалы кислорода, пероксида водорода и токсичность кислорода // Свободные радикалы в биологии. – Москва: Мир. – 1979. – Т. 2. – С. 272-314.
19. Фут Х. Фотосенсибилизированное окисление и синглетный кислород. Биологические действия // Свободные радикалы в биологии. – Москва: Мир. – 1979. – Т. 2. – С. 96-151.
20. Черницкий Е.А., Слобожанина Е.И. Спектральный люминесцентный анализ // – Минск, Наука и техника. – 1989. – 141с.

21. Шилов И.П. - руководитель проекта: Ранняя люминесцентная диагностика эндоскопически доступных форм рака для групп риска населения на основе создания и использования нетоксичных фотосенсибилизаторов злокачественных опухолей и высокочувствительного стробоскопического онкофлуориметра // Проект МНТЦ No.3065, Краткий отчет, М., - 2010.
22. Agirtas S., Ion R.M., Bekaroglu O. Spectral study of the supramolecular assemblies porphyrins-phthalocyanines for PDT // Mat.Sci. Eng.C:Biomimetic Materials Sensors Systems. – 2000. – Vol. 7. – P. 105-110.
23. Arora S., Gupta S., Narang R.K., Budhiraja R.D. Amoxicillin loaded chitosan-alginate polyelectrolyte complex nanoparticles as mucopenetrating delivery system for H. Pylori // ScientiaPharmaceutica. – 2011. – Vol. 79(3). – P. 673–694.
24. Balasubramanian J., Narayanan N., Mohan V., Ranjit Mohan A., MandavaSree B. Nanotechnology based Oral Delivery of Insulin – A Retrospective // Int. J. of Pharmacy and Analytical Research. – 2013. – Vol. 2(4). – P. 144-150.
25. Barel A., Jori G., Perin A., Romandini P., Pagnan A., Biffanti S. Role of high-, low- and very low-density lipoproteins in the transport and tumor-delivery of hematoporphyrin in vivo // Cancer Lett. - 1986. – Vol. 32. – P. 145-150
26. Bechet D., Couleaud P., Frochot C., Viriot V.L., Guillemin F., Barberi-Heyob M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents // Trends in Biotechnology. – 2008. – Vol. 26(11). – P. 612-621.
27. Bedioui F. Zeolite – encapsulated and clay – intercalated metal porphyrin phthalocyanine and Schiffbase complexes as models for biomimetic oxidation catalysts: an overview // Coord. Chem. Rev. – 1995. – Vol. 144. – P. 39 – 68.
28. Beeby A., Eastoe J., Heenan R. K. Solubilisation of C60 in Aqueous Micellar Solution // J. of the Chem. Soc., Chem. Commun. - 1994. – Vol. 10. - P. 173–175.
29. Bello K.A., Bello I.A. Some observations on the visible absorption spectra and stability properties of the silicon phthalocyanine system // Dyes and Pigments. – 1997. – Vol. 35. – P. 261-266.

30. Berns M.W., Dahlman A., Johnson F.M., Burns R., Sperling D., Guiltinan M., Siemens A., Walter R., Wright W., Hammer-Wilson M., Wile A. // *Cancer Res.* – 1982. Vol. 42(6). – P. 2325-2329.
31. Bertoloni G., Rossi F., Valduga G., Jori G., and van Lier J. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli* // *FEMS Microbiology Letters.* – 1990. – Vol. 71. – P. 149-156.
32. Bhuvaneswari R., Gan Y., Soo K., Olivo M., Alejandro Diaz-Moscoso T. Soft versus hard nanoparticles in cancer PDT // *Int. J. Med. Biomed. Res.* – 2012. – Vol. 1(1). – P. 2312-2321.
33. Blum H.F. Photodynamic action and diseases caused by light // Hafner. New York. – 1964.
34. Bonnett R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy // *Chem. Soc. Rev.* – 1995. – Vol. 24(1). – P. 19–33.
35. Bonnett R., Martínez G. Photobleaching of compounds of the 5,10,15,20-Tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin Series (m-THPP, m-THPC, and m-THPBC) // *Org Lett.* – 2002. – Vol. 4(12). – P. 2013-2016.
36. Bovis M.J, Woodhams J.H., Rojnik M., Kocbek P., Kos J., Bown S.G., Loizidou M. M-THPC delivery via pegylatedplga nanoparticles for in vivo photodynamic therapy (PDT) // *British Journal of Surgery.* – 2013. – P. 43 - 44.
37. Brown M.S., Kovanen P.T., Goldstein J.L. Evolution of the LDL receptor concept-from cultured cells to intact animals // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1980. – Vol. 348. – P. 48-68.
38. Carnicer-Pont D., Bailey K. A., Mason B. W., Walker A. M., Evans M. R., and Salmon R. L. Risk factor for hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a case-control study // *Epidemiol. Infect.* – 2006. – Vol. 134. – P. 1167–1173.
39. 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.
40. 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.
41. Chen W. Nanoparticle Based Photodynamic Therapy for Cancer Treatment. American Scientific Publishers. – 2007.

42. Chirvony V.S., Galievsky V.A., Kruk N.N., Dzhagarov B.M., Turpin P.-Y. J. Photophysics of the cationic 5,10,15,20-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin bound to DNA, [poly (dA-dT)]₂ and [poly (dG-dC)]₂: interaction with molecular oxygen studied by porphyrin triplet-triplet absorption and singlet oxygen luminescence // *Photochem. Photobiol. B: Biology*. – 1997. – Vol. 40. – P. 154–162.
43. Chou J-H., Kozal M. E., Halwa H. S., Rakow N. A., and Suslick K. S. In: *The Porphyrin Handbook*, Volume 6 (Kadish K. M., Smith K. M., Guillard R., Editors), Academic Press, San Diego. – 2000. – P. 87-94.
44. Christensen T., Sandquist T., Feren K., Waksvik H, Moan J. Retention and photodynamic effects of haematoporphyrin derivative in cells after prolonged cultivation in the presence of porphyrin // *Br. J. Cancer*. – 1983. – Vol. 48. – P. 35-43.
45. Couleaud P., Morosini V., Frochot C., Richeter S., Raehm L., Durand J.O. Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications // *Nanoscale*. – 2010. – Vol. 2. – P. 1083-1095.
46. De Vismes B., Bedioui F., Devynck J., Bied-Charreton C.J. Zeolite-porphyrin modified electrodes // *J. Electroanal. Chem*. – 1985. – Vol. 187. – P. 197–202.
47. Demidova T.N., Hamblin R.M. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49(6). – P. 2329-2335.
48. Deurenberg R. H., Vink C., Kalenic S., Friedrich A. W., and Bruggeman C. A. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Clin. Microbiol. Infec.* – 2007. – Vol. 13. – P. 222–235.
49. Dickinson T. A. White J., Kauer J.S., Walt D.R. A chemical-detecting system based on a cross-reactive optical sensor array // *Nature*. – 1996. – Vol. 382. – P. 697-700.
50. Dougherty T.J., Kaufman J.E., Goldfarb A. Weishaupt K.R., Boyle D., Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors // *Cancer Res*. – 1978. – Vol. 38(8). – P. 2628–2635.
51. Dupuy L. Gauthier C., Durand G., Musnier A., Heitzler D., Herledan A., Sakanyan V., Crépieux P., Reiter E. A highly sensitive near-infrared fluorescent detection method to analyze signalling pathways by reverse-phase protein array // *Proteomics*. – 2009. – Vol. 9. – P. 5446-5454.

52. Ethirajan M. Chen Y., Joshi P., Pandey R.K. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy // *Chem. Soc. Rev.* – 2011. – Vol. 40. – P. 340-362.
53. Faraon V., Ion R.M. Ship-in-bottle porphyrin – zeolite nanomaterials // *Optoelectron. Adv. Mat.* – 2010. – Vol. 4(8). – P. 1135–1140.
54. Farren C., FitzGerald S., Bryce M.R., Bee A., Batsanov A. Synthesis, structure and optical characterisation of silicon phthalocyanine bis-esters // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions.* – 2002. – Vol. 2. – P. 59-65.
55. Fernandez J.M., Bilgin M.D., Grossweiner L.I. Singlet oxygen generation by photodynamic agents // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* – 1997. – Vol. 37. – P. 131–140.
56. Ferro S., Ricchelli F., Monti D., Mancini G., and Jori G. Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into a polycationic liposome // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 39. – P. 1026–1034.
57. Fingar V.H., Haydon P.S., Wieman T. The effects of thrombocytopenia on vessel stasis and macromolecular leakage after photodynamic therapy using photofrin // *J. Photochem. Photobiol.* – 1996. – Vol. 63. – P. 72-79.
58. Foldesová M., Hudec P., Dillinger P. Properties of zeolites // *Petroleum & Coal.* – 2007. – Vol. 49(2). – P. 60–63.
59. Frąckowiak D., Planner A., Ion R.M., Wiktorowicz K. Incorporation of dye in resting and stimulated leukocytes: in: *Near-Infrared Dyes for High Technology Applications* // NATO ASI SERIES, Ed. by S. Daehne, U. Resch-Genger, O. S. Wolfbeis., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London 3/52. – 1998. – P. 87-114.
60. Frackowiak D., Planner A., Waszkowiak A., Boguta A., Manikowski H., Ion R.M., Wiktorowicz K. // Yield of ISC of Pc's evaluated on the basis of a time-resolved photothermal method // *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.* – 2001. – Vol. 41. – P. 101-108.
61. 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.
62. Gasparyan V. K. Silver sol immunoagglutination assay for determination of human IgG // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2010. – Vol. 80. – P. 180-183.

63. Gomer C.G. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy // Photochem. Photobiol. – 1991. – Vol. 54. – P. 1093-1107.
64. Gyulkhandanyan A., Gyulkhandanyan L., Ghazaryan R., Fleury F., Angelini M., Gyulkhandanyan G. & Sakanyan V. Assessment of new cationic porphyrin binding to plasma proteins by planar microarray and spectroscopic methods // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 2013. – Vol. 31(4).- P. 363-375.
65. Gyulkhandanyan A.G. Zeolite nanoparticles – nanocontainers of porphyrins // Biolog. Journ. of Armenia. – 2015. – Vol. 67(2). – P. 90-92.
66. Gyulkhandanyan A.G., Zakoyan A.A., Sargsyan H.H., Ghazaryan R.K., Sheyranyan M.A., Gyulkhandanyan G.V. Complexation of porphyrins with nanoparticles of zeolite // Proc. of SPIE. – 2015. - Vol. 9519. –P. 95190H-1 - 95190H-7.
67. Gyulkhandanyan Anna G., Ghazaryan R. K., Gasparyan V. K., Sargsyan H. O., Madoyan R. A., Gyulkhandanyan Aram G., Paronyan M. H., Stasheuski A. S., Knyukshto V. N., Dzhagarov B. M., Gyulkhandanyan G. V. Complexation of porphyrins with silver and zeolite nanoparticles // Proceedings of SPIE. – 2013. – Vol. 8766. – P. 87660H-1 - 87660H-8.
68. Gyulkhandanyan G. V., R. K. Ghazaryan, M. H. Paronyan, A. G. Gyulkhandanyan, M. A. Sheyranyan, B. M. Dzhagarov, E. S. Tuchina, M. A. Korchenova, V. V. Tuchin. Photophysical properties and photodynamic efficiency of cationic porphyrins // Proc. of SPIE. – 2014. - Vol. 8942. –P. 894212-1 - 894212-9.
69. Gyulkhandanyan G. V., R. K. Ghazaryan, M. H. Paronyan, G. I. Ulikhanyan, A. G. Gyulkhandanyan and L. A. Sahakyan. Antimicrobial activity of new porphyrins of synthetic and natural origin // Proc. of SPIE. – 2012. – Vol. 8211. – P. 821107-1 - 821107-9.
70. 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.
71. Gyulkhandanyan G.V., Ghambaryan S.S., Amelyan G.V., Ghazaryan R.K., Haroutiunian S.G., Gyulkhandanyan A.G., Gasparyan G.H. Anticancer activity of the new photosensitizers: dose and cell dependence // Proc. of SPIE. - 2005. – Vol. 5689. – P. 276-281,
72. Gyulkhandanyan G.V., Paronyan M.H., Hovsepyan A.S., Ghazaryan R.K., Tovmasyan A.G., Gyulkhandanyan Aram G., Gyulkhandanyan Anna G., Amelyan G.V. Photodynamic

- inactivation of Gram (-) and Gram (+) microorganisms by cationic porphyrins and metalloporphyrins // Proc. of SPIE. – 2009. – Vol. 7380. – P. 73803I-1 - 73803I-7.
73. Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? // Photochem. Photobiol. Sci. – 2004. – Vol. 3. – P. 436–450.
 74. Hamblin M.R., O'Donnell D.A., Mufthy N., Rajagopalan K., Michaud N., Sherwood M.E., Hasan. T. Polycationic photosensitizer conjugates: effect chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria // J. Antimicrob. Chemotherapy. -2002. – Vol. 49. – P. 941-951.
 75. Hausmann W.H. Die sensibilisierende Wirkung des Hamatoporphyrins // Biochem Z. - 1910. - Vol. 30. - P. 276-316.
 76. Henderson B.W., Dougherty T.J. How does photodynamic therapy work? // Photochem. Photobiol. – 1992. – Vol. 55(1). – P. 145-157.
 77. 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.
 78. Horiuchi H., Hosaka M., Mashio H., Terata M., Ishida S., Kyushin S., Okutsu T., Takeuchi T., Hiratsuka H. Silylation improves the photodynamic activity of tetraphenylporphyrin derivatives *in vitro* and *in vivo* // Chemistry. – 2014. – Vol. 20(20). – P. 6054-6060.
 79. Hovanesyan V.A., Lalayan A.A., Aidinyan L.E., Gyulkhandanyan G.V. Quenching mechanisms of autofluorescence of tissues sensitized by tumor-seeking dyes // 8th Intern. Confer. “Laser Optics INCONO'95”, Technical Digest, 1995, St.Petersburg, Russia. – 1995. – Vol. 1. – P. 278-279.
 80. Huang L., Dai T., Hamblin M. R. Antimicrobial Photodynamic Inactivation and Photodynamic Therapy for Infections // Methods Mol Biol. – 2010. – Vol. 635. – P. 155–173.
 81. Hudson R. and Boyle R.W. Strategies for selective delivery of photodynamic sensitizers to biological targets // J. Porphyrins Phthalocyanines. - 2004. – Vol. 8, -P. 954-975.
 82. Internet_124. <http://nsportal.ru/vu/fiziko-matematicheskii-fakultet/nanotekhnologii-i-nanomaterialy/lektsiya-3-nanochastitsy>
 83. Internet_149. <http://www.medicinform.net/biochemistry/nanoserebro1.htm>

84. Internet_189.

http://www.o8ode.ru/article/oleg2/silver/kolloidnoe_nanocerebro_produkt_nanotehnologii.htm

85. Internet_190. <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2015/234741/fig1/>

86. Internet_53. <http://www.niopik.ru/science/oncology/diagnostics/>

87. Internet_78. <http://bankpatentov.ru/node/560611>

88. Internet_79. <http://earthpapers.net/tsitotoksicheskie-i-immunomoduliruyuschie-effekty-produktov-fotoliza-psoralena-i-porfirinov>

89. Ion R.M. Nanomedicine between laboratory and clinical applications, in: Nanostructuring and Nanocharacterization, in Series in Micro and Nanoengineering (eds. M.Zaharescu, M.Ciurea, D.Dascalu), Ed. Academiei, Bucharest, Romania. – 2010. – P. 241–256.

90. Ion R.M. Nanosystems Based On Micelle Metallo-Porphyrins // The Scientific Bulletin of VALAHIA University – Materials and Mechanics. – 2013. – Vol. 8(11). – P. 33-38.

91. Ion R.M. Photodynamic therapy (PDT): A photochemical concept with medical applications // Revue Roumaine De Chimie. – 2007. – Vol. 52(12). – P. 1093-1102.

92. Ion R.M. Synthesis, photophysical properties and photocatalytic activity of tungsten porphyrin (TPPWC14) // J. Porphyrins Phthalocyanines. – 2013. – Vol. 17. – P. 460-472.

93. Ion R.M. The Use of Phthalocyanines and Related Complexes in Photodynamic Therapy. In: Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security. T. Nyokong, V. Ahsen (Eds.). Springer – 2012. – P. 315-349.

94. Ion R.M., Brezoi D.V. A study on the photodynamic therapy of photosensitizer-coated magnetic nanoparticles // Journal of Optoelectronics and Advanced Materials. – 2007. – Vol. 9(4). – P. 936-939.

95. Ion R.M., Kocak M., Bekaroglu O. Catalytic decomposition of hydrogen peroxide with crowned ether phthalocyanines // Progr.Catal. – 1998. – Vol. 2. – P. 34-45.

96. Ion R.M., Patachia S.C.F. TPPS4 Controlled Release from PVA Hydrogels in Photodynamic Therapy of Cancer // in: International Conference on Advancements of Medicine and Health Care through Technology, S. Vlad and R.V. Ciupa (eds.), IFMBE Proceedings 44, Springer International Publishing Switzerland. – 2014. – P. 307-310.

97. Ion R.M., Stirbet A. Photodynamic action of light radiation on E. coli with porphyrin sensitizers // St. Cerc. Biotechnol. – 1997. – Vol. 29-30. – P. 106-121.

98. Jesionek A., Tappiner H. // *Deutsch. Arch. Klin. Med.* – 1905. – Vol. 82. – P. 223-228.
99. Jori G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives // *J. Environm. Pathol., Toxicology, and Oncol.* – 2006. – Vol. 25(1-2). – P. 505-519.
100. Jori G., Tomio L., Reddi E. Rossi E, Corti L, Zorat PL, Calzavara F. Preferential delivery of liposome-incorporated porphyrins to neoplastic cells in tumour-bearing rats // *Br. J. Cancer.* – 1983. – Vol. 48. – P. 307-309.
101. Kano K. Self-aggregation of cationic porphyrin in water // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1987. – Vol. 60. – P. 1281-1287.
102. Kashef N., Esmaeeli D. G., Siroosy M., Taghi Khani A., Hesami Zokai F., and Fateh M. Photodynamic inactivation of drug-resistant bacteria isolated from diabetic foot ulcers. // *Iranian J. Microbiol.* - 2011. – Vol. 3. – P. 36–41.
103. Keheyan Y., Khachatryan Sh., Christidis G., Moraetis D., Gevorkyan R., Sargsyan H., Yeritsyan H., Nikogosyan S., Hovhannisyan A., Sahakyan A., Kekelidze N., Akhalbedashvili L. Sorption behavior of tritiated water on Armenian natural zeolites // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.* – 2005. – Vol. 264(3). – P. 671–677.
104. Kessel D. Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization // *Cancer Lett.* – 1986. – Vol. 33. – P. 183-188.
105. Khlebtsov B. N., Tuchina E. S., Khanadeev V. A., Panfilova E. V., Petrov P. O., Tuchin V. V., and Khlebtsov N. G. Enhanced photoinactivation of *Staphylococcus aureus* with nanocomposites containing plasmonic particles and hematoporphyrin // *Journal of Biophotonics.* – 2013. – Vol. 6(4). – P. 338–351.
106. Kinsella T.J., Baron E.D., Colussi V.C., Cooper K.D., Hoppel C.L., Ingalls S.T., Kenney M.E., Li X., Oleinick N.L., Stevens S.R. Preliminary clinical and pharmacologic investigation of photodynamic therapy with the silicon phthalocyanine photosensitizer Pc 4 for primary or metastatic cutaneous cancers // *Front. Oncol.* – 2011. – Vol. 1. – P. 1–6.
107. Komerik N., Wilson M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization // *J. Appl. Microbiol.* – 2002. – Vol. 92. – P. 618-623.
108. Kraljic I., Mohsni S. Et. A New Method for the Detection of Singlet Oxygen in Aqueous Solutions // *Photochemistry and Photobiology.* – 1978. – Vol. 28. – P. 577–581.

109. Kraljic I., Mohsni S.Et., Arvis M. A General Method for the Identification of Primary Reactions in Sensitized Photooxidations // *Photochemistry and Photobiology*. – 1978. – Vol. 27. – P. 531–537.
110. Krasnovsky A.A., Jr. Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies // *Membrane Cellular Biology*. – 1998. – Vol. 12, № 5. – P. 665–690.
111. 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 Biointerfaces*. – 2008. – Vol. 64(1). – P. 88-97.
112. Lambrechts S.A.G., Aalders M.C.G., Langeveld-Klerks D.H., Khayali Y., Lagerberg J.W.M. Effect of monovalent and divalent cations on the photoinactivation of bacteria with meso-substituted cationic porphyrins // *J. Photochem. Photobiol.* – 1996. – Vol. 35. – P. 149-157.
113. Lambrechts S.A.G., Aalders M.C.G., Verbraak F.D., Lagerberg J.W.M., Dankert J.B., Schuitmaker J.J. Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 2005. – Vol. 79. – P. 51-57.
114. Lang K., Mosinger J., Wagnerova D.M. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy // *Coord. Chem. Rev.* – 2004. Vol. 248. – P. 321-350.
115. Lipson R.L., Baldes E.J. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative // *Arch. Dermatol.* – 1960. – Vol. 82. – P. 508–516.
116. Livingston R. // In: *Autoxidation and Antioxidants*, New York. – 1961. – Vol. 1. – P. 249.
117. Ma L.W., Moan J., Peng Q. Effects of light exposure on the uptake of photofrin II in tumors and normal tissues // *Int. J. Cancer*. – 1992. – Vol. 52. – P. 120-123.
118. Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? // *Lasers Med. Sci.* – 2007. – Vol. 22(2). – P. 83–91.
119. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions // *J Photochem Photobiol B*. – 1992. – Vol. 14. – P. 262–266
120. Malik Z., Ladan H., Nitzan Y., Smetana Z. Antimicrobial and antiviral activity of porphyrin photosensitization // - 2001. Invited Paper. <http://www.lumacare.com/paper14.htm>
121. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. – 545 p.

122. Mazier J.C., Morliere P., Santus R. The role of the low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of lipophilic photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours // J. Photochem. Photobiol. - 1991. – Vol. 8. – P. 351-360.
123. Merchat M., Bertoloni G., Giacomoni P., Villanueva A., and Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. – 1996. – Vol. 32. – P. 153-157.
124. 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: Biol. – 1996. – Vol. 35. – P. 149-157.
125. Meyer-Betz F. Untersuchung über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hamatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs // Dtsch. Arch. Klin. Med. - 1913. - Vol. 112. - P. 476-503.
126. Miles A.A., Misra S.S. The estimation of bactericidal power of the blood // J. Hygiene. – 1938. – Vol. 38. – P. 732-749.
127. Minnock A., Vernon D.I., Schofield J., Griffiths J., Parish J.H., and Brown S.B. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. – 1996. – Vol. 32. – P. 159-164.
- b. 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.
128. Moan J., Boye E. Photodynamic effects of haematoporphyrin derivative on synchronized and asynchronous cells of different origin // Photochem. Photobiophys. -1981. – Vol. 2. – P. 301-308.
129. Morgan J. and Oseroff A.R. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy // Drug Deliv. Rev. – 2001. – Vol. 49. – P. 71-86.
130. Moser J.G. 2nd and 3rd generation photosensitizers // Amsterdam: Harwood Academic Publishers. - 1998.
131. Muehlmann L.A., Ma B.C., Longo J.P.F., Almeida Santos M.F.M., Azevedo R.B. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride)

- nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy // International Journal of Nanomedicine. – 2014. – Vol. 9(1). – P. 1199-1213.
132. Nagy A., Harrison A., Sabbani S., Munson Jr R. S., Dutta P. K., and Waldman W. Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action // Int. J. Nanomedicine. – 2011. – Vol. 6. – P. 1833–1852.
 133. Nenu I., Popescu T., Aldea M.D., Craciun L., Olteanu D., Tatomir C., Bolfa P., Ion R.M., Muresan A., Filip A. Metformin associated with photodynamic therapy - A novel oncological direction // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. - 2014. – Vol. 138. – P. 80-91.
 134. 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.
 135. 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.
 136. Nitzan Y., Gutterman M., Malik Z., & Ehrenberg B. Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins // Photochem. Photobiol. - 1992. – Vol. 55. – P. 89-97.
 137. Nitzan Y., Malik Z., and Eherenberg B. Photosensitization of microbial cells // In *Photobiology: the Science and its Applications*, (Riklis E., Ed.). – 1991. Plenum Press, New York. – P. 815-820.
 138. 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.
 139. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 1997. – Vol. 39. – P. 1-18.
 140. Paszko E., Ehrhardt C., Senge M.O., Kelleher D.P., Reynolds J.V. Nanodrug Applications In Photodynamic Therapy // Photodiagn. Photodyn. Ther. – 2011. – Vol. 8. – P. 14–29.
 141. Patachia S.C.F., Varga S., Ion R.M. Porphyrin encapsulation in nanostructured hydrogels // J. Optoelect. Adv. Mat. – 2007. – Vol. 9(6). – P. 1816-1820.

142. Payne G.F., Raghavan S.R. Chitosan: a soft interconnect for hierarchical assembly of nano-scale components // *Soft Matter*. – 2007. – Vol. 3. – P. 521–527.
143. 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.
144. 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. – P. 712 – 720.
145. Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F., Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects // *Lasers Med. Sci.* – 2009. – Vol. 24. – P. 259–268.
146. Policard A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood // *CR Soc. Biol.* – 1924. – Vol. 91. – P. 1423-1424.
147. 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.
148. Popov D. E., Ovchinnikov I. S., Tuchin V. V., Shapoval O. G., Shub G. M., and Altshuler G. B. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* // *Proc. SPIE.* – 2003. – Vol. 5008. – P. 442–445.
149. Pottier R., Kennedy J.C. The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 1990. – Vol. 8. – P. 1-16.
150. 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.
151. Rakow N.A. and Suslick K.S. A colorimetric sensor array for odour visualization // *Nature*. – 2000. – Vol. 406. – P. 710-713.
152. Reddi E., Ceccon M., Valduga G., Jori G., Bommer J.C., Elisei F., Latterini L., Mazzucato U. Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins // *Photochem. Photobiol.* – 2002. – Vol. 75(5). – P. 462-470.

153. Ricci-Júnior E., Marchetti J.M. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use // *Int J. Pharm.* – 2006. – Vol. 310(1-2). – P. 187-195.
154. Rodriguez-Fuentes G., Barrios M. A., Iraizoz A., Perdomo I. & Cedre B. Entrex-anti-diarrheic drug based on purified natural clinoptilolite // *Zeolites.* – 1997. – Vol. 19. – P. 441 – 448.
155. Rotomskis R., Bagdonas S., Streckyte G. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1996. – Vol.33(1). – P. 61-67.
156. Roy I., Ohulchanskyy T.Y., Pudavar H.E., Bergey E.J., Oseroff A.R., Morgan J., Dougherty T.J., Prasad P.N. Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. - Vol. 125(26). – P. 7860-7865.
157. Santoro S., Bandieramonte O., Melloni G., Marchesini E., Zunino R., Lepera F., de Palo P. Photodynamic therapy by topical meso-tetraphenylporphinesulfonatetetrasodium salt administration in superficial basal cell carcinoma // *Cancer Res.* -1990. - Vol. 50. – P. 4501–4503.
158. 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.
159. Schastak S., Ziganshyna S., Gitter B., Wiedemann P., and 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. – P. 11674(1–8).
160. Sorescu A.A., Nuta A., Raditoiu V., Ion R.M. Photophysical and photochemical properties of some silicon benzporphyrazine derivatives. In: *Proceedings in Advanced Research in Scientific Areas*, EDIS - Publishing Institution of the University of Zilina, Slovakia. – 2013. – P. 294-299.
161. Stoica R., Pop S.F., Ion R.M. Evaluation of natural polyphenols entrapped in calcium alginate beads prepared by the ionotropic gelation method // *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials.* – 2013. – Vol. 15(7- 8). – P. 893 – 898.

162. Stojiljkovic I., Evavold B.D., Kumar V. Antimicrobial properties of porphyrins. *Exp. Opin. Invest. Drugs* – 2001. – Vol. 10(2). – P. 309-320.
163. Strakhovskaya M.G., Zukhovitski V.G., Mironov A.F., Stranadko E.F., Rubin A.B. Fungicide activity of the endogenic and exogenic porphyrin photosensitizers // *The First Conference of Mycologists of Russia, Russia, Moscow, Abstracts.* – 2002. - Part 8. – P. 243-244.
164. Strober W. In: *Current Protocols in Immunology* // Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach W.M. and Strober W (Eds.) John Wiley and Sons Press, New York . – 1997. – P. A.3B.1-A.3B.2.
165. Tappeiner H., Jesionek H. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen // *Munch. Med. Wschr.* - 1903. - Vol. 50. - P. 2042-2044.
166. Tappiner H. // *Munch. Med. Wochenschr.* – 1900. - Vol. 47. – P. 5-17.
167. Tavares A., Carvalho C. M. B., Faustino M. A., Neves M. G. P. M. S., Tomé J. P. C., Tomé A. C., Cavaleiro J. A. C., Cunha A., Gomes N. C. M., Alves E., and Almeida A. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment // *Mar. Drugs.* – 2010. – Vol. 8. – P. 91–105.
168. Thomas J.P., Girotti A.W. Glucose administration augments in vivo uptake and phototoxicity of the tumor-localizing fraction of hematoporphyrin derivative // *Photochem. Photobiol.* – 1989. – Vol. 49. – P. 241-247.
169. Tome J.P.C., Neves M.J.P.M.S., Tome A.C., Cavaleiro J.A.S., Soncin M., Magaraggia M., Ferro S., Jori G. Synthesis and antibacterial activity of new poly-s-lysine-porphyrins conjugates // *J. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 47. – P. 6649-6652.
170. Tovmasyan A., Ghazaryan R., Sahakyan L., Gasparyan G., Babayan N., Gyulkhandanyan G. New water-soluble cationic metalloporphyrins as potential anticancer agents // *J. of Biomolecular Structure and Dynamics.* – 2007. – Vol. 24(6). – P. 682-683.
171. Tovmasyan A.G., Ghazaryan R.K., Sahakyan L., Gasparyan G., Babayan N., Gyulkhandanyan G. Synthesis and anticancer activity of new water-soluble cationic metalloporphyrins // *European Conferences on Biomedical Optics 2007, 17-21, June, 2007. Munich, Germany. Technical Abstract Summaries.* – 2007. – P. 71-72.
172. Triesscheijn M., Baas P., Schellens J.H.M., Stewart F.A. Photodynamic therapy in oncology // *The Oncologist.* – 2006. – Vol. 11. – P. 1034-1044.

173. Tuchina E. S. and Tuchin V. V. Low-intensity LED (625 and 405 nm) and laser (805 nm) killing of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* // Proc. SPIE, - 2009. – Vol. 7165. – P. 71650I-716517.
174. Vargas A., Delie F. Potential Use Of Biodegradable Nanoparticles For The Photodynamic Therapy Of Eye Diseases // Arch. Soc. Esp. Oftalmol. – 2009. – Vol. 84. – P. 169-176.
175. Vargas A., Eid M., Fanchaouy M., Gurny R., Delie F. In vivo photodynamic activity of photosensitizer - loaded nanoparticles: Formulation properties, administration parameters and biological issues involved in PDT outcome // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2008. – Vol. 69. – P. 43 - 53.
176. Villaneuva A., Caggiari L., Jori G. and Milanese C. Morphological aspects of an experimental tumour photosensitized with a meso-substituted cationic porphyrin // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. – 1994. – Vol. 23. – P. 49-56.
177. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy // J. Antimicrob. Chemotherapy. – 1998. – Vol. 42. – P. 13-28.
178. Wainwright M. Photodynamic Therapy: The development of new photosensitisers // Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents). – 2008. – Vol. 8. – P. 280-291.
179. Weishaupt K.R., Gomer C.K., Dougherty T.J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor // Cancer Res. – 1976. – Vol. 36. – P. 2326-2329.
180. Wilson B. C. In: Handbook of Photonics for Biomedical Science (Tuchin, V.V., ed.). CRC Press, Taylor & Francis Group, London. – 2010. – P. 649–686.
181. Winckler K.D. Special section: focus on anti-microbial photodynamic therapy (PDT) // J. Photochem. Photobiol. B. – 2007. – Vol. 86(1). – P. 43–44.
182. Wyld L. Reed M.W.R., and Brown N.J. Photodynamic therapy-induced apoptosis in dose and cell type dependent // 7th Biennial Congress of International Photodynamic Association. Final Programme and Abstracts. 7-9 July. 1998. - Nantes, France. – 1998. - RC178. - P. 96.
183. Xiu Z., Zhang Q., Puppala H.L., Colvin V.L., and Alvarez P.J. J. Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles // Nano Lett. – 2012. – Vol. 12 (8). – P. 4271–4275.

184. Yamakoshi Y., Umezawa N., Ryu A., Arakane K., Miyata N., Goda Y., Masumizu T., Nagano T. Active Oxygen Species Generated from Photoexcited Fullerene (C₆₀) as Potential Medicines: O•– versus ¹O₂ // J. of the Amer. Chem. Soc. - 2003. – Vol. 125. - P. 12803–12809.
185. Zarkovic N., Zarkovic K., Kralj M., Borovic S., Sabolovic S., Poljak-Blazi M., Cipak A. & Pavelic K. Anticancer and antioxidative effects of micronized zeolite clinoptilolite // Anticancer Res. – 2003. – Vol. 23(2B). – P. 1589 – 1595.
186. 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.