

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ  
ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԳՅՈՒԼԽԱՆԴԱՆՅԱՆ ԱՆՆԱ ԳՐԻԳՈՐԻ

ՊՈՐՖԻՐԻՆՆԵՐԻ ՖՈՏՈՖԻԶԻԿԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ  
ԵՎ ԴՐԱՆՑ ԲԺՇԿԱԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ

Գ.00.04 - «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 2016

---

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ГЮЛЬХАНДАНЯН АННА ГРИГОРЬЕВНА

ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОРФИРИНОВ  
И ИХ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности  
03.00.04 – «Биохимия»

ЕРЕВАН - 2016

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան  
Կենսաքիմիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդի նիստում

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. թեկնածու Գ.Վ. Գյուլխանդանյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր Ս.Ս. Մարդանյան  
կենս. գիտ. թեկնածու Ն. Խ. Ալշուջյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Պաշտպանությունը կայանալու է 2016 թ. ապրիլի 29-ին, ժամը 15<sup>00</sup>-ին ՀՀ ԳԱԱ  
Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, Փորձարարական  
կենսաբանություն 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 0014, ք.Երևան,  
Հասրաթյան փ. 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային  
կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և [www.molbiol.sci.am](http://www.molbiol.sci.am) կայքում:  
Սեղմագիրը առաքվել է 2016 թ. մարտի 29-ին

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական  
քարտուղար, կենս. գիտ. թեկնածու՝

Գ. Մ. Մկրտչյան

---

Тема диссертации утверждена на заседании Ученого совета Института биохимии  
им. Г.Х. Бунятына Национальной Академии Наук РА

Научный руководитель: кандидат биол. наук Гюльханданян Г.В.

Официальные оппоненты: доктор биол. наук Мардanian С.С.  
кандидат биол. наук Алчуджян Н. Х.

Ведущая организация: Ереванский государственный университет

Защита состоится 29-го апреля 2016 г. в 15 часов на заседании Специализированного  
совета 042 по Экспериментальной биологии, в Институте молекулярной биологии  
НАН РА (РА, 0014, Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной  
биологии НАН РА и на сайте [www.molbiol.sci.am](http://www.molbiol.sci.am).

Автореферат разослан 29-го марта 2016 г.

Ученый секретарь Специализированного совета 042,  
кандидат биол. наук

Մկրտչյան Գ. Մ.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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. 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.). В последние годы активно развиваются такие области применения порфиринов, как диагностика и лечение злокачественных новообразований, анемии, нейропсихических нарушений, кожных, глазных и многих других болезней [Ethirajan et al., 2011].

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 [Demidova, Hamblin, 2005; Hamblin, Hasan, 2004; Maisch, 2007]. 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 медко-биологической науки.

**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 нанокомпозитов наночастиц цеолита с катионными (металло)порфиринами
  2. Исследовать образование нанокомпозитов наночастиц серебра с катионными (металло)порфиринами.

### **Научная новизна.**

- Впервые определено, что новые катионные порфирины и особенно Zn-производные порфиринов 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.

**Связь работы с научными тематиками.** Работа выполнена: в рамках грантов Армения-Беларусь № 11РБ-016 (2011-2013 гг.) и № 13РБ-055 (2014-2015 гг.); в рамках гранта по "Программе поддержки исследований аспирантов в 2012 г." ГКН МОН РА (2013-2014 гг.).

**Апробация работы.** Результаты работы представлены: на заседании Ученого совета Института биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА (2015 г.); на международных симпозиумах "Photonics West", США (2012, 2014); на конференциях "SPIE Microtechnologies" (2013, Франция; 2015, Испания,); на конференциях: "SPIE Photonics Europe 2014", Бельгия; "EMBO Conference Series: Chemical Biology 2014", Германия; на конгрессе FEBS "14th FEBS Young Scientists' Forum (YSF)", 2014 г., Париж, Франция.

**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.

## СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Во введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, отмечена научная новизна, практическая ценность исследований, связь с научными тематиками и апробация работы.

**В главе I** диссертационной работы изложен литературный обзор по фотосенсибилизаторам, катионным порфиринам, их применению в фотодинамической терапии опухолей (ФДТ) и фотодинамической инактивации микроорганизмов (ФДИ), по фотофизическим свойствам порфиринов, квантовому выходу генерации синглетного кислорода порфиринами и методов его регистрации. Рассмотрены аспекты применения наночастиц в качестве наноконтейнеров порфиринов и возможности их применения в ФДТ и ФДИ.

**В главе II** диссертационной работы приводится описание использованных в работе материалов и методов.

**В главе III** диссертационной работы отображены результаты исследований и их обсуждение.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**2.1. Порфирины и металлопорфирины.** В работе были использованы новые катионные порфирины и металлопорфирины, синтезированные на кафедре химии фармацевтического факультета Ереванского государственного медицинского университета, с гидроксизетил-, бутил- или аллил- периферическими группами -R в 3-м или 4-м положении пиридинольного кольца и центральными атомами металлов [Мадакян и др., 1986; Tovmasyan et al., 2007] (рис. 1).

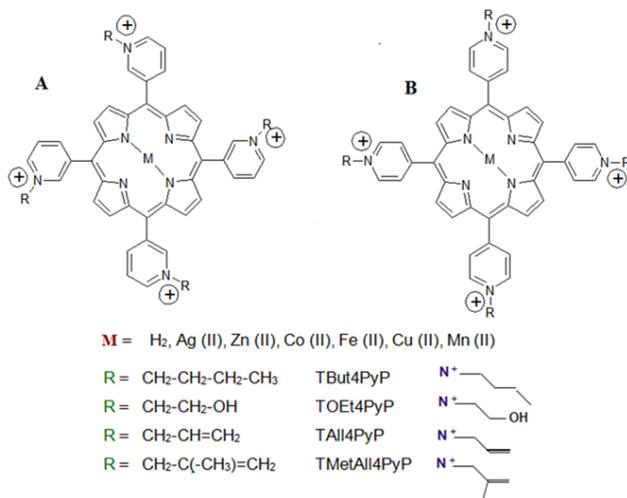


Рис. 1. Новые катионные порфирины и металлопорфирины

В работе также были использованы: известный катионный порфирин 5,10,15,20-тетраakis[4-N-метилпиридил]порфирин (ТМе4ПуР) (производство “Porphyrin systems” Co., Германия), а также анионный порфирин хлорин е<sub>6</sub> (Беларусь) и анионный фотосенсибилизатор Al-фталоцианин (Россия).

## 2.2. Спектральные исследования.

**Спектры поглощения** (металло)порфиринов и наночастиц в ультрафиолетовой и видимой областях регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-VISIBLE Recording Spectrophotometer UV-2100 (Япония).

**Флуоресцентные спектры испускания** растворов (металло)порфиринов и нанокмозитов регистрировали на спектрофлуориметре MPF-44 (Perkin Elmer, США) в диапазоне 400-850 нм (возбуждение при 420-440 нм).

**2.3. Определение квантового выхода синглетного кислорода.** Квантовый выход образования синглетного кислорода определяли в соответствии с методикой работы Сташевского А. С. с соавторами [Сташевский и др., 2013].

**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<sup>2</sup>; и 2) солнечного света с мощностью облучения около 70 мВт/см<sup>2</sup>, как описано в работе [Gyulkhandanyan G. V., et al., 2014].

**2.5. Микроорганизмы.** Грамм (+) микроорганизмы *Staphylococcus aureus* (209 P) и метициллин устойчивый *S. aureus* (MRSA) были получены из коллекции микроорганизмов Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича. Грамм (-) микроорганизм *E. coli*, (штамм K-12) был получен из коллекции "Институт биотехнологии" НАН Армении (Ереван, Армения).

**2.6. Цитотоксичность (темновая токсичность) и фототоксичность (металло)порфиринов.** Токсическое действие (металло)порфиринов на Грамм (+) и Грамм (-) микроорганизмы определяли путем измерения степени ингибирования роста и уменьшения числа клеток, выживших после обработки порфиринами в темновых условиях (цитотоксичность) или при освещении светом (фототоксичность). Концентрация клеток составляла 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> клеток/мл. **В темновых условиях** 1 мл клеточной суспензии с выбранным фотосенсибилизатором с концентрацией между 0,01 и 100 мкг/мл инкубировали при 32-37°C в течение 22-24 ч. Выживаемость микроорганизмов определяли по модифицированной версии метода Miles и Misra [Miles A.A., Misra S.S., 1938]. **Для определения фототоксичности (металло)порфиринов** (фотодинамическая инактивация микроорганизмов) после добавления фотосенсибилизатора в суспензию клеток, пробы инкубировали в течение 10 мин в темноте, далее облучали светом 30 мин (30 мВт/см<sup>2</sup>) и хранили при 30-37°C с перемешиванием в течение 22-24 ч. Выживание микроорганизмов определяли как и для темновых условий.

**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 (К-562 – лимфобласты хронической миелоидной лейкемии) культурах раковых клеток человека.

**2.7.1. Оценка темновой цитотоксичности (металло)порфиринов.** Темновую токсичность (металло)порфиринов оценивали тестом исключения витального красителя (трипан синий; Sigma-Aldrich, Германия) [Strober, 1997].

**2.7.2. Оценка фотодинамической (световой) токсичности (металло)порфиринов.** Клетки культуры К-562 высевали в 15 мл стеклянных флаконах (1 мл клеточной суспензии в флаконе), инкубировали в течение 48 час и добавляли различные концентрации (металло)порфиринов, растворенных в дистиллированной воде. После 30 мин прединкубации клеточные культуры облучали в течение 30 минут вольфрамовой лампой (30 мВт/см<sup>2</sup>), инкубировали в темноте в течение 48 час и число жизнеспособных клеток определяли тестом исключения трипанового синего.

**2.8. Наночастицы цеолита** (клиноптилолита) были получены в соответствии с работой [Sargsyan et al., 2004].

**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) использовались 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  $P \leq 0,05$ .

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

#### 3.1. Фотофизические свойства катионных (металло)порфиринов

Необходимым условием успешного проведения ФДТ опухолей и фотоинактивации микроорганизмов является исключение фотообесцвечивания фотосенсибилизатора.

##### 3.1.1. Фотообесцвечивание катионных (металло)порфиринов

Из результатов, представленных в таблице 1 следует, что для всех (металло)порфиринов, а также фотосенсибилизатора Al-фталочианин при облучении вольфрамовой лампой с мощностью облучения 30 мВт/см<sup>2</sup> 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/см<sup>2</sup>) растворы (металло)порфиринов частично фотообесцвечиваются. Поскольку дальнейшие эксперименты проводились при облучении растворов светом мощностью 30 мВт/см<sup>2</sup> и менее 60 минут, то можно считать, что фотообесцвечивания (металло)порфиринов не происходит.

Таблица 1\*.

Фотообесцвечивание растворов (металло)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-phtalocyan-s	1,33	1,35	1,36	1,39	1,41	1,45	109
5	Al-phtalocyan-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%.  $P \leq 0,05$

### 3.1.2. Квантовый выход генерации синглетного кислорода (металло)порфиринами

На основе решения дифференциальных уравнений, описывающих процессы взаимодействия молекул фотосенсибилизатора и кислорода, 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  $\gamma_{\Delta}$  зависит от концентрации синглетного кислорода  $[^1O_2](t)$ , числа квантов в возбуждающем лазерном импульсе ( $[N_L]$ ) и оптической плотности  $D$  раствора фотосенсибилизатора [Сташевский и др., 2013] согласно уравнению:

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

где  $\tau_{\Delta} = 1/k_{\Delta}$  и  $\tau_T = 1/k_{T1}$  - определяемые константы. Из выражения (1) следует, что  $\gamma_{\Delta} \sim [^1O_2]$ , т.е., что квантовый выход образования синглетного кислорода  $\gamma_{\Delta}$  пропорционален количеству образовавшихся молекул синглетного кислорода и, определяя  $\gamma_{\Delta}$ , мы фактически определяем эффективность фотосенсибилизатора (порфирина). Было также показано, что для определения квантового выхода синглетного кислорода справедливо соотношение:

$$\gamma_{\Delta} = \gamma_{\Delta}^{st} a_1 / a_1^{st} \quad (2),$$

где  $a_1$  - тангенсы углов в зависимости  $I_0/(1 - 10^{-D}) = a_1 E_L$ ,  $D$  - оптическая плотность раствора фотосенсибилизатора. Здесь индекс "st" относится к стандартному порфируну TMe4PyP, для которого  $\gamma_{\Delta}^{st} = 0,77$  в воде [Frederiksen et al., 2005].

Таблица 2\*.

Квантовые выходы образования синглетного кислорода  $\gamma_{\Delta}$ , а также положения ( $\lambda$ , нм) максимумов поглощения полосы Soret (металло)порфиринов в воде при 20<sup>0</sup> С.

Порфирины	TMe4PyP	TOE3PyP	TBut3PyP	TOE4PyP	TBut4PyP	TAlI4PyP	ZnTOE4PyP	ZnTBut4PyP	ZnTAlI4PyP
$\gamma_{\Delta}$	0,77	0,78	0,78	0,77	0,79	0,75	0,85	0,97	0,86
$\lambda$ , нм	424	418	417	424	423	424	440	438	438

\*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 TMe4PyP, синтезированные новые катионные (металло)порфирины имеют значительно более высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода (для катионных металлопорфиринов достигает 0,97).

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

На штаммах Gram (+) (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*) и Gram (-) (*E.coli*, *Salmonella sp.*) бактерий была изучена эффективность 9-ти различных новых катионных порфиринов и металлопорфиринов [Gyulkhandanyan G.V. et al., 2009]: TOE4PyP, Zn-TOE4PyP, Ag-TOE4PyP; TBut4PyP, Zn-TBut4PyP, Ag-TBut4PyP; TAlI4PyP, Zn-TAlI4PyP, Ag-TAlI4PyP. Исследование поражающего действия этих соединений было проведено в двух режимах: темновом (определение собственной цитотоксичности соединения) и под воздействием света (определение фототоксичности).

**3.2.1. Темновая токсичность (цитотоксичность) катионных (металло)порфиринов.** Грам (-) микроорганизм *E.coli* (штамм K-12) является удобной моделью изучения эффективности катионных порфиринов, поскольку обладает значительной сопротивляемостью по отношению ко многим нейтральным и анионным фотосенсибилизаторам [Nitzan et al., 1991]. На рис.2 представлены типичные результаты тестов на темновую цитотоксичность различных (металло)порфиринов с использованием *E.coli*.

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. 2 (справа) 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.

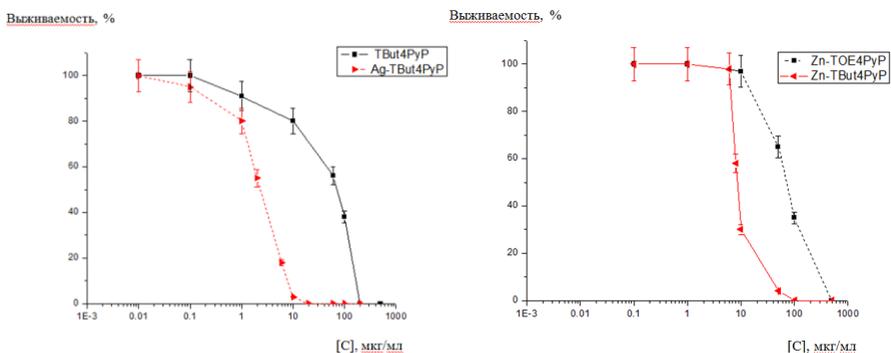


Рис. 2. Влияние концентраций порфиринов и металлопорфиринов на выживание клеток *E.coli* в темновых условиях.  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ .

**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 металл и 3-х Zn-содержащих порфиринов. Результаты исследований, приведенные в таблице 3, свидетельствуют, что Zn-содержащие порфирины полностью инактивируют ( $IC_{100}$ ) клетки *E.coli*: они от 1,5 до 5 раз эффективнее, чем металл не содержащие порфирины.

Таблица 3\*.

Концентрации катионных (металло)порфиринов ингибирующие рост клеток *E.coli* на 50% ( $IC_{50}$ ) или полностью ( $IC_{100}$ ) при фотодинамическом действии

(металло)порфирины	$IC_{50}$ , мкг/мл	$IC_{100}$ , мкг/мл
ТОЕ4PyP	$0,7 \pm 0,05$	$10,1 \pm 0,7$
TBuT4PyP	$0,6 \pm 0,04$	$5,4 \pm 0,4$
TAlI4PyP	$0,7 \pm 0,05$	$5,3 \pm 0,3$
Zn -ТОЕ4PyP	$0,65 \pm 0,05$	$2,2 \pm 0,15$
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 ( $n = 5$ ).  $p < 0,05$ .

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.

Для изучения фотодинамической инактивации ряда Грам (+) и Грам (-) микроорганизмов нами был выбран наиболее активный фотосенсибилизатор Zn-TBut4PyP. Результаты исследований приведены в таблице 4. Как и ожидалось в соответствии с литературными данными [Merchat et al., 1996; Minnock et al., 1996], порог полной инактивации (IC<sub>100</sub>) для Грам (+) микроорганизмов оказался в 3-5 раз ниже, чем для Грам (-) микроорганизмов.

Таблица 4\*.

Величины IC<sub>50</sub> и IC<sub>100</sub> для Zn-TBut4PyP при фотодинамическом ингибировании Грам (+) и Грам (-) микроорганизмов

Микроорганизмы	IC <sub>50</sub> , мкг/мл	IC <sub>100</sub> , мкг/мл
<i>St. aureus</i>	0,14 ± 0,01	0,75 ± 0,05
<i>St. epidermis</i>	0,20 ± 0,015	0,40 ± 0,03
<i>E. coli</i>	0,50 ± 0,03	2,1 ± 0,15
<i>Salmonella sp.</i>	0,55 ± 0,04	2,0 ± 0,15

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

Приведенные в Таблицах 3 и 4 результаты свидетельствуют о достаточно низких значениях IC<sub>100</sub> (100%-ная инактивация Грам (+) и Грам (-) микроорганизмов) и высокой эффективности катионных (металло)порфиринов без применения каких-либо дополнительных агентов усиления их действия (например, этилендиамин тетрауксусной кислотой или антибиотиком 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*

В исследовании эффективности поражения двух типов раковых клеток, монослойных (HeLa) и суспензионных (K-562), 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(-C<sub>12</sub>)порфирин, TriBut3PyMPhP, (+3); 3) Zn-мезо-три[3-N-(2'-бутил) пиридил]монофенил(-C<sub>12</sub>)порфирин, Zn-TriBut3PyMPhP, (+3); 4) Zn-мезо-три [4-N-(2'-бутил) пиридил] монофенил(-C<sub>16</sub>)порфирин, Zn-TriBut4PyMVanP, (+3); 5) Zn-мезо-три [4-N-(2'-бутил) пиридил] монофенил(-CH<sub>3</sub>)порфирин, Zn-TriBut4PyMVerP, (+3).

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

Концентрационная зависимость воздействия соединений 1, 2 и 3 на выживаемость монослойной культуры раковых клеток HeLa в темновых условиях была исследована в интервале концентраций 0,1-200мкг/мл. Результаты опытов представлены в Таблице 5.

Таблица 5\*.

Величины IC<sub>50</sub> и IC<sub>100</sub> (мкг/мл) 3-х порфиринов при их воздействии на монослойную культуру раковых клеток HeLa в темновых условиях.

Zn-TBut3PyP		TriBut3PyMPhP (-C12)		Zn-TriBut3PyMPhP (-C12)	
IC <sub>50</sub>	IC <sub>100</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>100</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>100</sub>
160	400	7	14	0,25	14

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

Приведенные в таблице 5 данные показывают что:

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<sub>100</sub>);
2. IC<sub>100</sub> порфиринов одинаковой структуры, но с металлом (Zn-TriBut3PyMPhP) и без металла (TriBut3PyMPhP) не отличаются, но IC<sub>50</sub> 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 K-562

Были исследованы также темновая токсичность и фототоксичность металлопорфиринов относительно суспензионной культуры раковых клеток K-562 (рис. 3).

Результаты исследований с соединениями 3, 4 и 5 представлены в таблице 6. Из сравнения кривых на рис. 3 и данных таблицы 6 можно сделать заключение, что фототоксичность Zn-TriBut3PyMPhP эффективнее его цитотоксичности приблизительно в 11 раз (IC<sub>100</sub> меньше). Из таблицы 6 также следует, что по фотодинамическому действию на культуру суспензионных клеток K-562 наиболее эффективным препаратом из трех исследованных является Zn-TriBut3PyMPhP (наименьшее IC<sub>100</sub>), эта величина несколько больше для Zn-TriBut3PyMVanP.

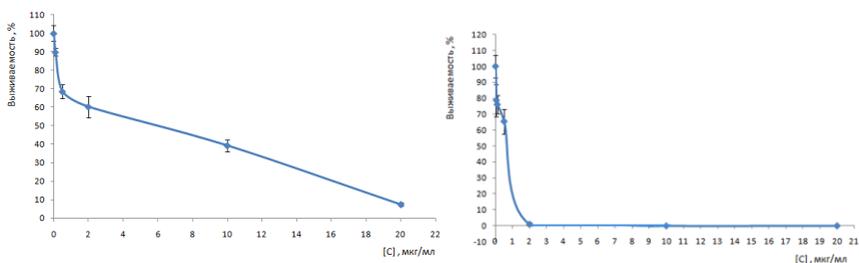


Рис. 3. Зависимость выживаемости культуры клеток линии К-562 от концентрации порфирина Zn-TriBut3PyMPhP в темновых условиях (слева) и при фотодинамическом действии (справа).

Таблица 6\*.

Величины IC<sub>50</sub> и IC<sub>100</sub> (мкг/мл) 3-х Zn-порфиринов при их цито- и фото-токсическом воздействии на суспензионную культуру клеток К-562

Zn-TriBut3PyMPhP; (-C12)				Zn-TriBut4PyMVan; (-C16)				Zn-TriBut4PyMVerP; (-CH3)			
Цитотоксичность		Фототоксичность		Цитотоксичность		Фототоксичность		Цитотоксичность		Фототоксичность	
IC <sub>50</sub>	IC <sub>100</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>100</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>100</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>100</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>100</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>100</sub>
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%.  $P \leq 0,05$

Фотодинамическое действие этих препаратов намного (в 5-10 раз) сильнее, чем действие Zn-TriBut3PyMVerP. Можно сделать заключение, что наличие углеводородной цепи (в первом случае -C<sub>12</sub>, а во втором -C<sub>16</sub>) существенно увеличивает фотодинамическую эффективность металлопорфирина.

### 3.4. Образование комплексов катионных (металло)порфиринов с наночастицами

#### 3.4.1. Нанокмозиты катионных (металло)порфиринов с наночастицами цеолита

Для изучения механизма связывания наночастиц цеолита с порфиринами были отобраны 5 катионных (металло)порфиринов: 1) ТОEt4PyP, 2) ТОEt3PyP, 3) Zn-ТОEt4PyP, 4) Zn-TBut4PyP и 5) Ag-TBut4PyP, а также известные анионные фотосенсибилизаторы: порфирин хлорин еб и Al-фталоцианин.

Анализ динамики изменения в спектрах поглощения (металло)порфиринов при добавлении наночастиц цеолита позволяет сказать, что: 1) процент адсорбции порфиринов наночастицами цеолита для всех исследованных соединений более 95% (таблица 7), 2) преобладающим механизмом связывания является электростатическое взаимодействие 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.

Таблица 7.\*

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

Порфи- рины	TOEt 4PyP	TOEt 3PyP	Zn-TOEt 4PyP	Zn-TBut 4PyP	Ag-TBut 4PyP	Хлорин $\epsilon_6$	Al-фтало- цианин
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 ( $n = 5$ ),  $p < 0,05$ .

Однако, флуоресцентные исследования показали, что у нанокompозитов из наночастиц цеолита и (металло)порфиринов флуоресцирует всего 3-6% порфирина, а остальные 94-97% связанного порфирина не флуоресцирует. Изучение квантовых выходов образования синглетного кислорода ( $\gamma_{\Delta}$ ) 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. Нанокompозиты катионных (металло)порфиринов с наночастицами серебра

Исследование динамики сорбции порфиринов на анизотропных наночастицах серебра проводили на примере четырех катионных (металло)порфиринов: 1) Zn-TBut4PyP, 2) Zn-TBut3PyP, 3) TOEt4PyP и 4) Zn-TOEt4PyP. После связывания (металло)порфирина с наночастицами серебра в течение 90 мин (когда изменения спектра уже не происходит) и центрифугирования, регистрировали спектр супернатанта. Расчеты показали, что наночастицы анизотропного серебра связывают 70-90% ( $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ) растворенного (металло)порфирина.

Для всех 4-х (металло)порфиринов десорбцию с наночастиц анизотропного серебра исследовали по изменению спектров поглощения полосы Core (420-440нм): а) добавлением одновалентных (NaCl) и двухвалентных (CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub>) солей, а также б) действием света на раствор нанокompозита. На примере металлопорфирина Zn-TOEt4PyP из оптических спектров поглощения было определено, что после сорбции

порфирина Zn-TOEt4PyP и образования через 30 мин нанокompозита, при добавлении в раствор одновалентной соли NaCl до конечной концентрации 0,3 М происходит десорбция порфирина с нанокompозита (существенно увеличивается интенсивность пика Core при 439 нм). При действии света десорбции порфиринов с наночастиц серебра 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 порфирина при 420-440 нм (полоса Core) флуоресцентный спектр испускания регистрируются в области 500-800 нм, где наночастицы серебра не флуоресцируют.

Интенсивность, относительные единицы

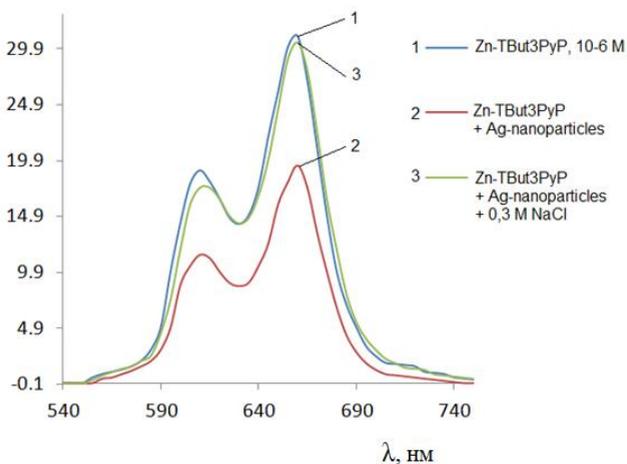


Рис. 4. Спектры флуоресценции раствора Zn-TBut3PyP до (кривая 1), и после (кривая 2) добавления наночастиц серебра с образованием нанокompозита. Добавление к нанокompозиту NaCl до 0,3 М приводит к десорбции металлопорфирина (кривая 3). Флуоресценцию регистрировали при возбуждении светом с длиной волны 430 нм.

На рисунке 4 в качестве примера приведены спектры флуоресценции Zn-TBut3PyP до (кривая 1), и после добавления наночастиц серебра (кривая 2), после чего был добавлен NaCl до конечной концентрации 0,3 М в растворе (кривая 3). Уменьшение интенсивности флуоресценции (кривая 2) свидетельствует об адсорбции металлопорфирина на серебре с образованием нанокompозита. Практически полное совпадение спектров флуоресценции 1 и 3 свидетельствует о полной десорбции металлопорфирина в присутствии NaCl.

Итак, добавление в раствор одновалентной соли (NaCl) приводит к полной десорбции исследованных 4-х (металло)порфиринов с наночастиц анизотропного серебра.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование фотофизических свойств новых катионных (металло)порфиринов, соответствия этих свойств медико-биологической активности и поражающему действию на микроорганизмы и раковые клетки является актуальной проблемой в связи с необходимостью разработки новых, альтернативных антибактериальных и противораковых технологий.

В соответствии с поставленными целями были определены задачи: исследовать фотофизические свойства новых катионных (металло)порфиринов (оценить фотообесцвечивание и 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 цеолита и серебра.

Действие света на исследуемые фотосенсибилизаторы показало, что катионные (металло)порфирины при облучении лампой накаливания фотообесцвечиванию не подвергаются, а действие солнца их обесцвечивает на 9-21%.

Исследование фотофизических свойств катионных (металло)порфиринов показало, что а) они имеют высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода; б) Zn-производные порфиринов обладают значительно более высоким квантовым выходом генерации синглетного кислорода (до 0,97) чем свободные основания порфиринов (0,75-0,78) и известный порфирин TMe4PyP (0,77).

Фотофизические свойства (металло)порфиринов находятся в соответствии с их биологической активностью *in vitro*: наиболее эффективно поражают Грам (+) и Грам (-) микроорганизмы те Zn-производные порфиринов, которые генерируют синглетный кислород с наиболее высокими значениями квантового выхода.

На культурах раковых клеток получено, что: а) наличие углеводородной цепи (-C<sub>12</sub> или -C<sub>16</sub>) в периферической части (металло)порфиринов существенно увеличивает цитотоксичность препарата; б) Zn-производные порфиринов с углеводородной цепью (-C<sub>12</sub> или -C<sub>16</sub>) поражают культуру суспензионных раковых клеток K-562 со значительно большей фотодинамической эффективностью (5-10 раз), чем Zn-порфирин без углеводородной цепи.

В растворах порфирин-наноцеолит формируются наноконкомпозиты, на которых процент адсорбции (металло)порфиринов более 95%; однако у таких наноконкомпозитов флуоресцирует всего 3-6% порфирина. Такие наноконкомпозиты генерируют синглетный кислород с очень низкой эффективностью (0,01-0,04) и для целей фотодинамической терапии не могут быть эффективны.

Исследование наноконкомпозитов из наночастиц анизотропного серебра и (металло)порфиринов показало, что: а) в водном растворе процент адсорбции (металло)порфиринов находится в интервале 70-90 %; б) добавление NaCl (конечная концентрация 0,3 М) приводит к полной десорбции (металло)порфиринов. Это указывает на перспективность таких комплексов для фотодинамической терапии опухолей.

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-фталочианин 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 ( $\gamma_{\Delta}$  до 0,97), чем известный порфирин TMe4Pyr ( $\gamma_{\Delta} = 0,77$ ).
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<sub>12</sub> или -C<sub>16</sub>) 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 наноконпозиты, у которых процент адсорбции порфиринов более 95% и 70-90 % соответственно. Наноконпозиты 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 наноконпозиты могут рассматриваться как высокоэффективные агенты фотодинамической терапии опухолей и в борьбе против широкого спектра микроорганизмов.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. **A.G. Gyulkhandanyan**, M.H. Paronyan, A.S. Hovsepyan, R.K. Ghazaryan, A.G. Tovmasyan, G.V. Gyulkhandanyan. Study of porphyrins activity against Gram (-) microorganisms. // Book of Abstracts of the International Conference: "State of the Art of Biotechnology in Armenia & ISTC Contribution", Tsaghkadzor, Armenia, 28 Sept. – 02 Oct. 2008, p. 159-160.
2. Grigor V. Gyulkhandanyan, Marina Paronyan, Anichka Hovsepyan, Robert Ghazaryan, Artak Tovmasyan, Aram Gyulkhandanyan, **Anna Gyulkhandanyan**, Gayane Amelyan. Photodynamic inactivation of gram (-) microorganisms using of new cationic porphyrins. // Proc. of SPIE. International Photodynamic Association World Congress. Seattle, USA. 11-15 June, 2009, Vol. 7380, p.7380-124.
3. G.V. Gyulkhandanyan, M.H. Paronyan, A.S. Hovsepyan, R.K. Ghazaryan, A.G. Tovmasyan, Aram G. Gyulkhandanyan, **A.G. Gyulkhandanyan**, G.V. Amelyan. Photodynamic inactivation of Gram (-) and Gram (+) microorganisms by cationic porphyrins and metalloporphyrins. // Proc. of SPIE. 2009; Vol. 7380, p.73803I-1 - 73803I-7.

4. В.Н. Кнюкшто, А.С. Шашевский, Б.М. Джагаров, **А.Г. Гюльханданян**, Р.К. Казарян, Г.В. Гюльханданян. Молекулярные зонды на основе новых водорастворимых порфиринов: люминесцентные свойства и способность к фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода. // Сборник тезисов IX Международная научная конференция “Лазерная физика и оптические технологии”. Гродно, Беларусь. 30 мая-2 июня 2012, с. 68.
5. **А. Г. Гюльханданян**, М. Г. Паронян, Ж.Б. Барсесян, Л.А. Саакян, Г.В. Гюльханданян. Фотодинамическая инактивация микроорганизмов новыми порфиринами синтетического и естественного происхождения. // Материалы III Международной Конференции Армянского Химического Общества “Успехи в области органической и фармацевтической химии”, Ереван, Армения. 3-4 октября 2012, с. 95.
6. **A.G. Gyulkhandanyan**, R.K. Ghazaryan, V.N. Knyukshto, A.S. Stasheuski, B.M. Dzhagarov, G.V. Gyulkhandanyan. Action of fatty acids on the binding capacity of porphyrins to blood proteins: I. Spectral investigations. // Biol. Journal of Armenia. 2012; 64(4), p.80-84.
7. **Anna G. Gyulkhandanyan**, Robert K. Ghazaryan, Vardan K. Gasparyan, Hakob O. Sargsyan, Roza A. Madoyan, Aram G. Gyulkhandanyan, Marina H. Paronyan, Alexandr S. Stasheuski, Valery N. Knyukshto, Boris M. Dzhagarov, Grigor V. Gyulkhandanyan. Complexation of porphyrins with silver and zeolite nanoparticles. // Proc. of SPIE, 2013; Vol. 8766, pp. 87660H-1 - 87660H-8.
8. А.С. Шашевский, В.А. Галиевский, В.Н. Кнюкшто, Р.К. Казарян, **А.Г. Гюльханданян**, Г.В. Гюльханданян, Б.М. Джагаров. Водорастворимые пиридинные порфирины с амфидильными N-заместителями: флуоресцентные характеристики и фотосенсибилизированное образование синглетного кислорода. // Ж. прикладной спектроскопии. 2013; 80(6), с.823-833.
9. **A. G. Gyulkhandanyan**, G. V. Gyulkhandanyan. Cytotoxic and photodynamic activity of new cationic porphyrins. // The FEBS Journal. 2013; 280 (Suppl. 1), p.323.
10. G. V. Gyulkhandanyan, 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, pp. 894212-1 – 894212-9.
11. **Anna G. Gyulkhandanyan**, Elena S. Tuchina, Robert K. Ghazaryan, Marina H. Paronyan, Grigor V. Gyulkhandanyan, Valery V. Tuchin. Photophysical properties and antimicrobial activity of new metalloporphyrins. // Technical Summaries of the SPIE Photonics Europe, Brussels, Belgium, 14-17 April 2014, p. 144.
12. **A. G. Gyulkhandanyan**, E. S. Tuchina, R. K. Ghazaryan, M. H. Paronyan, B. M. Dzhagarov, G. V. Gyulkhandanyan, V. V. Tuchin. Photophysical properties of porphyrins as a selection criterion of porphyrins for study of their effectiveness against microorganisms. // The FEBS Journal, 2014; 281(Suppl. 1), p. 665.
13. **A. G. Gyulkhandanyan**, E. S. Tuchina, R. K. Ghazaryan, M. H. Paronyan, B. M. Dzhagarov, G. V. Gyulkhandanyan, V. V. Tuchin. Quantum yield of singlet oxygen generation by porphyrins and their efficacy against microorganisms. // Book of Abstracts of the International scientific workshop on “Trends in Microbiology and Microbial Biotechnology”, Yerevan, Armenia, 5-8 October 2014, p. 56.
14. **Anna G. Gyulkhandanyan**, Anna A. Zakoyan, Hakob H. Sargsyan, Robert K. Ghazaryan, Marina A. Sheyranyan, Grigor V. Gyulkhandanyan. Complexation of

porphyrins with nanoparticles of zeolite. // Proc. of SPIE, 2015; Vol. 9519, p. 95190H-1 - 95190H-7.

15. **A.G. Gyulkhandanyan.** Zeolite nanoparticles – nanocontainers of porphyrins. // Biol. Journal of Armenia. 2015; 67(2), p.90-92.
16. М.В. Пархоц, С.В. Лепешкевич, А.С. Сташевский, Б.М. Джагаров, А.О. Саргсян, Р.К. Казарян, **А.Г. Гюльханданян**, Г.В. Гюльханданян. Фотосенсибилизированное образование синглетного кислорода наноконпозиатами “наноцеолит - порфирин” в водных растворах. // V Конгресс физиков Беларуси. Сборник научных трудов, Минск, Беларусь, 27-30 октября 2015, с.176-177.
17. **A.G. Gyulkhandanyan.** Adsorption of cationic porphyrins by nanoparticles of zeolite and silver. // Biol. Journal of Armenia. 2015; 67(4), p.68-70.

## ԳՅՈՒԼԻԱՆԴԱՆՅԱՆ ԱՆՆԱ ԳՐԻԳՈՐԻ

### Պորֆիրինների ֆոտոֆիզիկական հատկությունները և դրանց բժշկականսաբանական ակտիվությունը

#### ԱՄՓՈՓՈՒՄ

Պորֆիրինների ֆոտոֆիզիկական հատկությունների ուսումնասիրությունը (ֆոտոզուսազրկումը և սինգլետ թթվածնի արտադրումը՝ որպես կենդանի կառույցների ախտահարման հիմնական գործոն) ունի առաջնային նշանակություն դրանց արդյունավետության գնահատման համար: Ամբողջ աշխարհում յուրահատուկ խնդիր է հանդիսանում հակաբիոտիկների դեմ կայուն ախտածին միկրոօրգանիզմների թվի ավելացումը, և նոր այլընտրանքային հակաբակտերիալ տեխնոլոգիաների մշակումը կարող է ունենալ դրանց դեմ պայքարի համար որոշիչ նշանակություն: Նոր կատիոնային (մետաղա)պորֆիրինների ֆոտոֆիզիկական հատկությունների ուսումնասիրությունը, այդ հատկությունների համապատասխանեցումը բժշկականսաբանական ակտիվությանը և միկրոօրգանիզմների ու քաղցկեղի բջիջների վրա ախտահարող ազդեցության ուսումնասիրությունը հանդիսանում է արդիական խնդիր՝ նոր, այլընտրանքային հակաբակտերիալ և հակաքաղցկեղային տեխնոլոգիաների մշակման անհրաժեշտության հետ կապված:

Դրված նպատակներին համապատասխան, որոշվել են հետևյալ խնդիրները. հետազոտել նոր կատիոնային (մետաղա)պորֆիրինների ֆոտոֆիզիկական հատկությունները (գնահատել կատիոնային (մետաղա)պորֆիրինների ֆոտոզուսազրկումը և սինգլետ թթվածնի արտադրման քվանտային ելքը); ուսումնասիրել միկրոօրգանիզմների ֆոտոդինամիկ ապաակտիվացումը կատիոնային (մետաղա)պորֆիրիններով *in vitro*; հետազոտել կատիոնային (մետաղա)պորֆիրինների ցիտոտոքսիկ և ֆոտոտոքսիկ ազդեցությունը

քաղձկեղի բջիջների միաշերտ և սուսպենզիոն կուլտուրաների վրա; ուսումնասիրել ցեոլիտի և արծաթի նանոմասնիկների հետ կատիոնային (մետաղա)պորֆիրինների կոմպլեքսառաջացումը:

Հետազոտվող ֆոտոսենսիբիլիզատորների վրա լույսի ազդեցությունը ցույց տվեց, որ կատիոնային (մետաղա)պորֆիրինները շիկացման լամպով ճառագայթման դեպքում չեն ենթարկվում ֆոտոզուսացրկման, իսկ արևի լույսի ազդեցությունը դրանց ենթարկում է 9-21% ֆոտոզուսացրկման:

Ֆոտոդինամիկ գործընթացների ժամանակ (ուռուցքների ֆոտոդինամիկ թերապիա, ինչպես նաև միկրոորգանիզմների ֆոտոդինամիկ ապակտիվացում) ֆոտոսենսիբիլիզատորի արդյունավետության առավել կարևոր չափանիշ է հանդիսանում արտադրվող սինզլետ թթվածնի քանակը: Սինզլետ թթվածնի արտադրման քվանտային ելքը ( $\gamma_{\Delta}$ ) համեմատական է սինզլետ թթվածնի ձևավորված մոլեկուլների քանակին, և որոշելով  $\gamma_{\Delta}$ , մենք փաստորեն որոշում ենք ֆոտոսենսիբիլիզատորի (պորֆիրինի) արդյունավետությունը: Կատիոնային պորֆիրինների ֆոտոֆիզիկական հատկությունների ուսումնասիրությունը ցույց տվեց, որ. ա) դրանք սինզլետ թթվածին են արտադրում բարձր քվանտային ելքով; բ) Zn-պորֆիրինները օժտված են սինզլետ թթվածնի արտադրման զգալիորեն ավելի բարձր քվանտային ելքով (մինչև 0,97), քան ազատ հիմքերով պորֆիրինները (0,75-0,78) և հայտնի TMe4PyP պորֆիրինը (0,77):

Արդյունքները վկայում են կատիոնային (մետաղա)պորֆիրիններով Գրամ(+) և Գրամ(-) միկրոորգանիզմների ապակտիվացման բարձր արդյունավետության մասին՝ առանց դրանց ազդեցության ուժեղացման համար որևէ լրացուցիչ ազենտների կիրառման (օրինակ էթիլենդիամին տետրաքաջախաթթու կամ պոլիմիքսին հակաբիոտիկ, որի հիմքում նանոպեպտիդն է): (Մետաղա)պորֆիրինների ֆոտոֆիզիկական հատկությունները համապատասխանության մեջ են դրանց կենսաբանական ակտիվության հետ *in vitro*. Գրամ (+) և Գրամ (-) միկրոորգանիզմները առավել արդյունավետորեն ախտահարվում են այն Zn-պորֆիրիններով, որոնք արտադրում են սինզլետ թթվածինը առավել բարձր քվանտային ելքով:

Քաղցկեղի բջիջների կուլտուրաների վրա ստացվել է, որ. ա) (մետաղա)պորֆիրինների ծայրամասային հատվածում ածխաջրածնային շղթայի առկայությունը (-C12 կամ -C16) էականորեն մեծացնում է պատրաստուկի ցիտոտոքսիկությունը; բ) ածխաջրածնային շղթայով (-C12 կամ -C16) պորֆիրինների Zn-ածանցյալները ախտահարում են քաղցկեղի K-562 սուսպենզիոն բջիջների կուլտուրան զգալիորեն ավելիմեծ ֆոտոդինամիկ էֆեկտիվությամբ (5-10 անգամ), քան առանց ածխաջրածնային շղթայի Zn-պորֆիրինները:

Պորֆիրին-նանոցեոլիտ լուծույթներում ձևավորվում են նանոկոմպոզիտներ պորֆիրինների 95%-ից ավել ադսորբցիայով: Ցեոլիտի հետ նանոմասնիկներում ֆլուորեսցենցիա են ցուցաբերում պորֆիրինների միայն 3-6%: Այդ

նանոկոմպոզիտները արտադրում են սինգլետ թթվածին շատ ցածր արդյունավետությամբ և ֆոտոդինամիկ թերապիայի համար չեն կարող լինել արդյունավետ:

Անիզոտրոպ արծաթի նանոմասնիկների հետ կազմված նանոկոմպոզիտների ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ. (մետաղա)պորֆիրինների ադսորբցիայի տոկոսը գտնվում է 70-90 % միջակայքում; NaCl-ի ավելացումը հեշտությամբ բերում է դրանց ամբողջական դեսորբցիայի, ինչը ցուցանշում է, որ անիզոտրոպ արծաթի նանոմասնիկների և (մետաղա)պորֆիրինների կոմպլեքսները ֆոտոդինամիկ թերապիայի համար կարող են լինել արդյունավետ:

Այսպիսով, ուսումնասիրված (մետաղա)պորֆիրինները օժտված են բարձր կենսաբանական ակտիվությամբ և կարող են արդյունավետորեն կիրառվել տարբեր միկրոօրգանիզմների դեմ պայքարում և ուռուցքների ֆոտոդինամիկ թերապիայում:

**ANNA G. GYULKHANDANYAN**

**Photophysical properties of porphyrins and their  
medical-biological activity**

**SUMMARY**

The study of photophysical properties of porphyrins (photobleaching and generation of singlet oxygen as the main factor for destruction of living structures) has a primary importance to assess of their effectiveness. In the world the specific problem is the increase of the number of pathogenic microorganisms resistant to antibiotics and the development of new antibacterial alternative technologies can be crucial for fighting against them. Investigation of photophysical properties of new cationic (metallo)porphyrins, study of matching these properties to their medical and biological activity and research of their damaging effect on microorganisms and cancer cells is actual problem due to the need of development of new, alternative antibacterial and anticancer efficient technologies.

In accordance with the intended objectives were defined the following tasks: to investigate photophysical properties of new cationic (metallo)porphyrins (to assess photobleaching and quantum yield of singlet oxygen generation of cationic (metallo)porphyrins); to study photodynamic inactivation of microorganisms by cationic (metallo)porphyrins *in vitro*; to investigate cytotoxic and phototoxic action of cationic (metallo)porphyrins on monolayer and suspension cancer cell lines; to study complexation of cationic (metallo)porphyrins with zeolite and silver nanoparticles.

Action of light on the investigated photosensitizers showed that cationic (metallo)porphyrins under irradiation by incandescent lamp are not exposed to photobleaching, and the action of sun bleaches them on 9-21%.

In photodynamic processes (PDT of tumors as well as PDI of microorganisms) the most important efficiency indicator of a photosensitizer is amount of singlet oxygen generation. The quantum yield of singlet oxygen ( $\gamma_{\Delta}$ ) is proportional to the amount of the formed singlet oxygen molecules and determining  $\gamma_{\Delta}$  we actually will determine the effectiveness of the photosensitizer (porphyrin). Examination of photophysical properties of cationic (metallo)porphyrins showed that: a) they have a high quantum yield of singlet oxygen generation, b) Zn- derivatives of porphyrins have much higher quantum yield of singlet oxygen generation (up to 0.97) compared with the free base porphyrins (0.75-0.78) and with the known porphyrin TMe4PyP (0.77).

The results show the high efficiency of inactivation of Gram (+) and Gram (-) microorganisms by cationic (metallo)porphyrins without any additional agents of enhancing their action (e.g., ethylene diamine tetra-acetic acid, or polymyxin antibiotic in which basis nanopeptid). Photophysical properties of (metallo)porphyrins are in accordance with their biological activity *in vitro*: the most effective inactivate Gram (+) and Gram (-) bacteria those Zn-derivatives of porphyrins that generate the singlet oxygen with the highest values of quantum yield.

On cultures of cancer cells it was obtained that: a) the presence of the hydrocarbon chain (-C12 or -C16) in the peripheral part of the (metallo)porphyrins substantially increases the cytotoxicity of the drug; b) Zn-derivatives of porphyrins with a hydrocarbon chain (-C12 or -C16) affect suspension culture of cancer cells K-562 with significantly higher photodynamic efficiency (5-10 times) that the Zn-porphyrin without hydrocarbon chain.

In solutions porohyrin-nanozeolite formed nanocomposites, on which the absorption percentage of (metallo)porphyrins is more than 95%; but in such nanocomposites fluoresces only 3-6% of the porphyrin. Such nanocomposites generate singlet oxygen with very low efficiency (0.01-0.04) and for photodynamic therapy purposes may not be effective.

Study of nanocomposites of anisotropic silver nanoparticles and (metallo)porphyrins showed that: a) in the aqueous solution adsorption percentage of (metallo)porphyrins is in the range of 70-90%; b) adding of NaCl (final concentration 0.3 M) leads to complete desorption of (metallo)porphyrins. This indicates to the prospects of such complexes for photodynamic therapy of tumors.

Thus, investigated new cationic (metallo)porphyrins are compounds with high biological activity and can be effectively used against various microorganisms and in the photodynamic therapy of tumors.