

УДК 582.282.23.043

**Н. С. Водзінська, О. Ю. Зінченко, Т. О. Філіпова, Б. М. Галкін,
С. В. Водзінський, Ю. В. Ішков**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 7653361,
email: nsvod@ukr.net

ЧУТЛИВІСТЬ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* FA2 ДО ДІЇ СИНТЕТИЧНИХ ПОРФІРИНІВ

*Досліджено темнову та фотоіндуковану дію нових синтетичних порфіринів з різними зарядами молекул на збудника бактеріального раку рослин – *Agrobacterium tumefaciens*. Показано, що найбільш ефективними як у темнових умовах, так і при фотоактивації є катіонні порфірини. Найбільш активними з цієї групи сполук виявилися асиметрично заміщені порфірини, що в одному з мезо-положень мають н-ноніл, які практично повністю пригнічують ріст *A. tumefaciens* при фотосенсibiliзації. Встановлено, що ці порфірини за темнових умов мають бактерицидну дію, яка, вірогідно, обумовлена блокуванням важливих процесів життєдіяльності.*

*К л ю ч о в і с л о в а : *Agrobacterium tumefaciens*, порфірини, антибактеріальна активність, фотосенсibiliзація.*

Погіршення фітосанітарної ситуації в сільському господарстві обумовлює необхідність удосконалення захисту рослин і пошуку альтернативних шляхів боротьби з патогенами на додаток до традиційних методів. На сьогодні у світовій практиці прийнята концепція інтегрованої системи захисту рослин, в основі якої лежить обмеження використання хімічних пестицидів, які залишаються серйозним фактором забруднення навколишнього середовища, за рахунок застосування альтернативних екологічно безпечних препаратів.

Інфекційні хвороби рослин викликаються фітопатогенними грибами й бактеріями. Одним із цих патогенів є *Agrobacterium tumefaciens*, що викликає захворювання на бактеріальний рак у плодівих рослин. Уражуючи виноградники, вона стає причиною масових збитків виноградарів внаслідок зменшення врожайності кущів і погіршення якості продукції. Сортів винограду, стійких до бактеріального раку, не зафіксовано.

Прямі заходи боротьби з бактеріальним раком, які дозволили б звільнити хворі рослини від інфекції або поліпшити їх стан, немає.

На сьогоднішній день існує новий підхід до лікування бактеріальних і вірусних захворювань людини – фотодинамічна терапія, головним принципом якої є використання фотосенсibiliзаторів (ФС) – молекул, здатних поглинати світло з певною довжиною хвилі і генерувати активні форми кисню, цитотоксичні для клітини-мішені [1, 7 – 9]. Одними з найефективніших ФС на даний момент є порфірини та їх похідні [7, 8]. Останнім часом показано, що порфірини мають не лише фотодинамічну, а й

© Н. С. Водзінська, О. Ю. Зінченко, Т. О. Філіпова, Б. М. Галкін, С. В. Водзінський,
Ю. В. Ішков, 2008



темнову активність щодо патогенних та умовно-патогенних для людини бактерій [2 – 7, 11, 13]. Відомості щодо активності цих сполук у відношенні фітопатогенних бактерій на сьогоднішній день у літературі відсутні. Тому метою роботи було визначення чутливості *Agrobacterium tumefaciens* FA2 до низки синтетичних порфіринів та їх металокомплексів.

Матеріали і методи

У роботі досліджували активність 10 сполук, синтезованих в проблемній лабораторії синтезу лікарських засобів Одеського національного університету імені І. І. Мечникова (табл.). Усі досліджувані сполуки розчиняли у дистильованій воді. З вихідного розчину готували робочі розведення.

Тест-об'єктом слугував штам фітопатогенної бактерії *Agrobacterium tumefaciens* (за новою класифікацією *Rhizobium radiobacter*) FA2, люб'язно наданий д. б. н. Мілкусом Б. Н.

Зберігання тест-штаму проводили на поверхні скошеного картопляного агару при температурі 4 °С. Для експерименту брали добову культуру, яку вирощували у пробірці на скошеному картопляному агарі при 25 °С.

Дію досліджуваних сполук на тест-штам вивчали шляхом визначення їх так званого темного та фотоіндукованого впливу.

Таблиця

Перелік досліджених сполук

Table

The studied compounds list

Назва речовини	№
Катіонні мезо-хінолінілзаміщені	
Германієвий комплекс мезо-тетра (N-метил-6-хінолініл) порфіринато тетратозилату	I
Олов'яний комплекс мезо-тетра (N-метил-6-хінолініл) порфіринато хлориду тетратозилату	II
Марганцевий комплекс мезо-тетра (N-метил-6-хінолініл) порфіринато тетратозилату	III
Марганцевий комплекс мезо-тетра (N-метил-6-хінолініл) порфіринато тетратозилату ацетату	IV
Катіонні асиметрично заміщені	
5,10,15-три (N-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл) порфіринато тритозилат	V
Цинковий комплекс 5,10,15-три (N-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл) порфіринато тритозилату	VI
5,10, 15-три (N-метил-4-піридил)-20-(н-гексадецил)-порфіринато тритозилат	VII
Цинковий комплекс 5,10, 15-три (N-метил-4-піридил)-20-(н-гексадецил)-порфіринато тритозилату	VIII
Аніонні	
Мезо-тетра (п-карбоксіфеніл) порфірин	IX
Цинковий комплекс мезо-тетра (п-карбоксіфеніл) порфірину	X

Для вивчення темного впливу досліджуваних речовин готували рідке середовище LB [14]. Середовище розливали в пробірки по 1 мл. Для кожної сполуки



ставили три ряди пробірок з середовищем, які містили 10, 20 та 40 мкМ досліджуваної сполуки. Кількість паралелей для кожного варіанту дорівнювала 5. Пробірки з середовищем стерилізували в автоклаві при 1 атм. Всі експерименти проводили у 3 – 5 повторях.

Культури тест-мікроорганізмів, вирощені на скошеному картопляному агарі в пробірках, змивали стерильним фізіологічним розчином. Суспензію розводили до концентрації 10^3 кл/мл і вносили по 50 мкл в пробірки зі стерильним середовищем LB.

Культури з порфіринами інкубували в термостаті при температурі 25 °С протягом 24 годин. Інтенсивність росту тест-штамів визначали за оптичною густиною культури, яку вимірювали на спектрофотометрі “Spekol-10” при довжині хвилі 540 нм [4]. За контроль правили культури мікроорганізмів, паралельно вирощені в середовищі LB без додавання досліджуваних речовин.

Для визначення фотоіндукованого впливу порфіринів готували суспензію клітин тест-мікроорганізмів аналогічно попередній методиці. Суспензію розводили до концентрації 10^3 кл/мл і вносили по 50 мкл в пробірки зі стерильним середовищем LB.

Культури з порфіринами інкубували при сонячному світлі та кімнатній температурі протягом 24 годин. Інтенсивність росту тест-штамів визначали за оптичною густиною культури, яку вимірювали на спектрофотометрі “Spekol-10” при довжині хвилі 540 нм. За контроль правили культури мікроорганізмів, паралельно вирощені в середовищі LB без додавання досліджуваних речовин. Кількість повторів та оцінка результатів аналогічні попередній методиці.

Для найбільш активних сполук було визначено характер дії порфіринів на бактеріальні клітини. Для цього культуру *Agrobacterium tumefaciens* вирощували протягом 24 годин при 25 °С на поверхні скошеного картопляного агару та змивали стерильним фізіологічним розчином. Суспензію клітин тест-мікроорганізму вносили у 20 мл свіжого стерильного середовища LB таким чином, щоб кінцева концентрація клітин у середовищі дорівнювала 10^3 і підрозували на водяній бані з шейкером при 25 °С до початку логарифмічної фази, вимірюючи оптичну густину культури при довжині хвилі 540 нм через кожні 30 хв [7]. Після чого до поживного середовища додавали досліджувані речовини у відповідних концентраціях і визначали екстинкцію культуральної рідини з порфіринами. Після додавання досліджуваних речовин продовжували вимірювання оптичної густини культури через кожні 30 хв протягом 4 годин. Про характер дії судили, виходячи зі швидкості накопичення біомаси, яку реєстрували вимірюванням оптичної густини.

За контроль правили культури тест-мікроорганізму, вирощені в аналогічних умовах без додавання досліджуваних сполук.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного та кореляційного аналізу. Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel [5].

Результати та їх обговорення

У групі мезо-хінолінілзаміщених порфіринів найбільш активними щодо клітин *A. tumefaciens* виявились марганцевий комплекс (III) у концентрації 20 мкМ та олов'яний комплекс (II) у концентрації 40 мкМ, які пригнічували ріст культури на 29 % у порівнянні з контролем (рис. 1). Затримка росту на 23 % спостерігалася при максимальній концентрації марганцевого комплексу (III). Олов'яний комплекс (II) у



концентрації 20 мкМ пригнічував ріст 5 % клітин. Мінімальний вміст цих сполук у поживному середовищі знижував інтенсивність росту бактерій на 10 %.

При вивченні дії сполук I та IV виявлено, що залежність ефекту від концентрації в даному випадку була зворотною. (Ряд авторів, зокрема, Merchat M. та ін. [12], вважають причиною цього явища ефект насичення поверхневих клітинних рецепторів молекулами порфіринів.) Крім того, обидві речовини майже однаково впливали на ріст культури. Так, найменша концентрація затримувала ріст *A. tumefaciens* на 20 %, концентрація у 20 мкМ – на 12 %. Максимальна концентрація германієвого комплексу (I) інгібувала ріст 9 % клітин, тоді як марганцевий комплекс (IV) у цій концентрації не впливав на ріст культури (рис. 1).

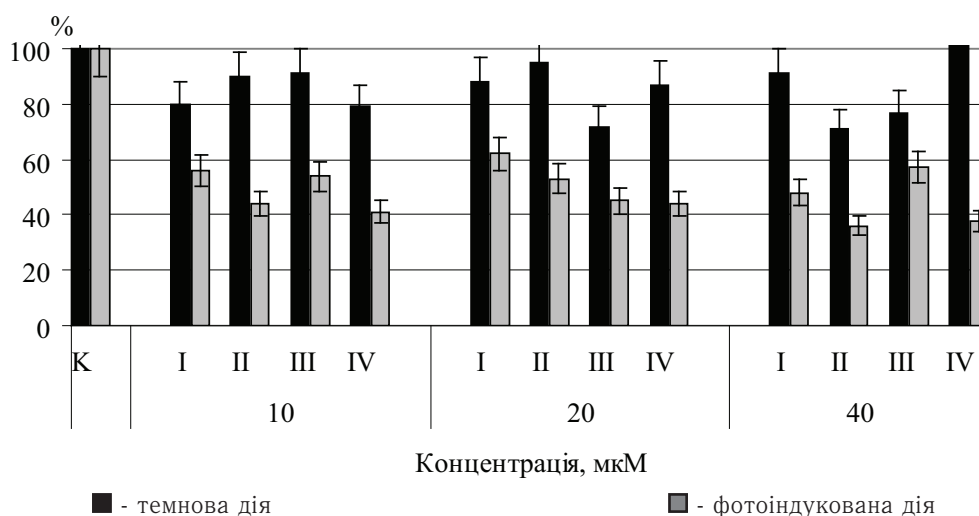


Рис. 1. Ріст культури *Agrobacterium tumefaciens* FA2 за темної та фотоіндукованої дії мезо-хінолінілзаміщених порфіринів

Fig. 1. The *Agrobacterium tumefaciens* FA2 culture growth under dark and photoinduced action of meso-quinolinyl substituted porphyrins

Вивчення фотодинамічної дії досліджуваних сполук показало, що найбільшу активність виявили сполуки II та IV, які знижували ріст культури після опромінення на 64 % та 62 %, відповідно, у концентрації 40 мкМ. Ця ж концентрація виявилась найбільш ефективною у сполуки I, де затримка росту складала 52 %, а для сполуки III – 43 %.

Сполуки I, II та IV у концентрації 20 мкМ викликали фотосенсибілізацію 38 %, 47 % та 56 % клітин, відповідно. Для речовини III концентрація 20 мкМ виявилася максимально ефективною і викликала зменшення росту на 55 % (рис. 1).

При опроміненні у присутності найменшої концентрації 10 мкМ більш ефективними виявилися сполуки II та IV, вони зменшували ріст у межах 56 – 59 %. Для інших сполук цієї групи пригнічення росту становило 45 %.

Порівняння даних з темної та фотодинамічної антимікробної активності мезо-хінолінілзаміщених порфіринів дозволяє стверджувати, що всі досліджені сполуки виявляють фотосенсибілізуючу активність щодо клітин тест-мікроорганізму.

При вивченні дії синтетичних порфіринів з асиметричною будовою молекули найбільш потужне пригнічення росту *A. tumefaciens* спостерігали при додаванні

до поживного середовища сполуки VI (рис. 2). Так у присутності 10 мкМ цієї речовини ріст культури інгібувався на 31 %, а у присутності 20 мкМ та 40 мкМ – на 55 % та 65 %, відповідно. Для сполук V, VII та VIII концентрація у 40 мкМ також виявилася найефективнішою і пригнічувала ріст бактерій на 24 %, 27 % та 25 %, відповідно, а концентрація у 20 мкМ – на 3 %, 21 % та 6 %, відповідно. При додаванні до поживного середовища 10 мкМ сполук V та VIII затримка росту культури складала 21 % та 9 %, відповідно, а речовина VII у цій концентрації ніяк не впливала на ріст бактерій. Таким чином, для сполук VI та VII спостерігалася пряма залежність між активністю та концентрацією речовини у середовищі.

Вивчення фотодинамічної активності синтетичних порфіринів з асиметричною будовою молекули показало, що досліджені сполуки виявляють високий ступінь фотосенсибілізуючої активності щодо культури *A. tumefaciens* (рис. 2). Найактивнішими фотосенсибілізаторами виявилися вільна основа (V) та її комплекс з цинком (VI).

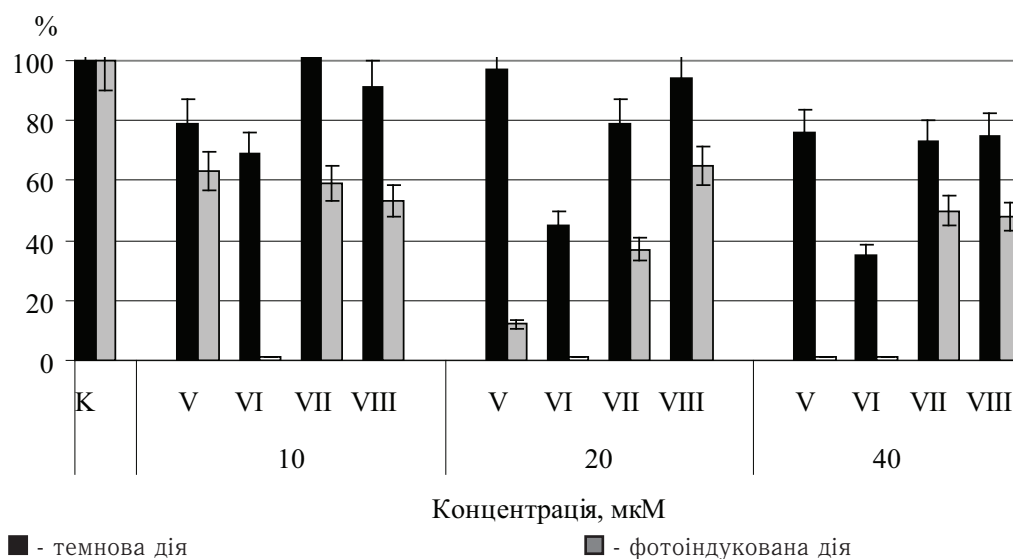


Рис. 2. Ріст культури *Agrobacterium tumefaciens* FA2 за темної та фотоіндукованої дії порфіринів з асиметричною будовою молекули

Fig. 2. The *Agrobacterium tumefaciens* FA2 culture growth under dark and photoinduced action of porphyrins with asymmetric molecular structure

При опроміненні у присутності цинкового комплексу (VI) ріст бактерій пригнічувався повністю в усіх використаних концентраціях. Висіви на щільні поживні середовища не зареєстрували присутності жодної живої клітини. За присутності вільної основи (V) у концентрації 40 мкМ також спостерігалася 100 % фотосенсибілізація клітин, а у концентраціях 10 мкМ та 20 мкМ вона становила 27 % та 88 %, відповідно.

Також фотодинамічні дослідження виявили, що при опроміненні у присутності 40 мкМ сполук VII та VIII життєздатність бактерій знижувалася наполовину. Але для вільної основи (VII) більш ефективною виявилась концентрація у 20 мкМ, яка призводила до фотодеструкції 63 % клітин, тоді як для металокомплексу вона

складала 35 %. Під дією 10 мкМ сполук VII та VIII спостерігався фотодинамічний ефект у межах 41 – 47 %.

Отже, вивчення фотосенсибілізуючих властивостей сполук даної групи показало, що більшу активність мають порфірини з коротшим вуглецевим ланцюгом в одному з *мезо*-положень, які повністю пригнічують ріст культури *A. tumefaciens*. Можливо, асиметричний замісник сприяє ефективному приєднанню молекул досліджуваних сполук до поверхні бактеріальних клітин, проте, вірогідно, що надто довгий боковий ланцюг віддаляє від неї порфіринове кільце [15]. Це може перешкоджати фотодеструкції клітин, оскільки активні радикали, що утворюються при збудженні молекули фотосенсибілізатора світлом, здатні реагувати тільки з найближчим оточенням. Таким чином, ці порфірини є дуже ефективними фотосенсибілізаторами.

Серед аніонних порфіринів активнішою виявилася вільна основа (IX), де максимальне зниження інтенсивності росту культури складало 24 % у присутності 20 мкМ речовини (рис. 3). Зменшення росту культури на 13 % спостерігалось при додаванні до поживного середовища до 10 мкМ цієї сполуки, а при концентрації 40 мкМ – на 10 %. Для цинкового комплексу (X) залежність пригнічувальної дії від дози речовини була зворотною. Найменша концентрація пригнічувала життєдіяльність 18 % клітин, а концентрація 20 мкМ – 14 %. Максимальна концентрація сполуки не впливала на ріст культури.

Максимальну фотосенсибілізацію 43 % спостерігали у присутності 40 мкМ металокомплексу (X). У нижчих концентраціях пригнічення росту було у межах 35 – 37 % (рис. 3).

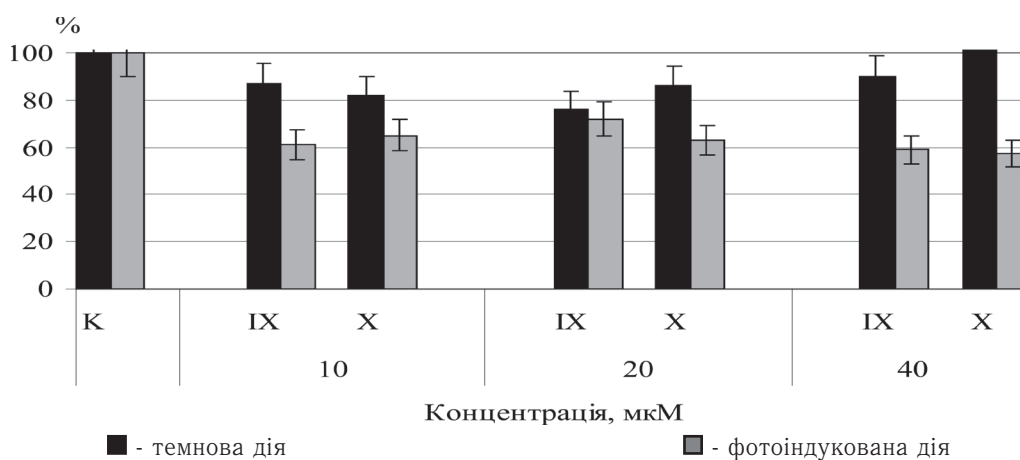


Рис. 3. Ріст культури *Agrobacterium tumefaciens* FA2 за темної та фотоіндукованої дії аніонних порфіринів

Fig. 3. The *Agrobacterium tumefaciens* FA2 culture growth under dark and photoinduced action of anionic porphyrins

При опроміненні у присутності вільної основи (IX) найбільш ефективними концентраціями виявилися 10 мкМ та 40 мкМ, за яких відбувалася сенсибілізація 40 % клітин (рис. 3).

Таким чином, досліджені аніонні порфірини виявляють більш високу активність при опроміненні світлом, тоді як у темних умовах спричиняють незначне змен-

шення розмноження бактерій. Дані літератури [10, 11] свідчать про неможливість фотосенсибілізації клітин мікроорганізмів за допомогою аніонних порфіринів. Отже, фотодинамічну активність аніонних порфіринів показано нами вперше.

Для визначення характеру антимікробної дії асиметрично заміщених порфіринів були відібрані сполуки, які проявили найбільшу активність щодо *Agrobacterium tumefaciens* FA2.

Спочатку було побудовано криву росту тест-мікроорганізму, за якою визначали початок логарифмічної фази. Початок експоненційного росту культури реєстрували після 120 хв культивування. Суспензії клітин даного мікроорганізму вносили у рідке середовище LB та підрощували протягом цього часу, після чого додавали розчини сполук V та VI, з кінцевим вмістом порфіринів у середовищі 40 мкМ.

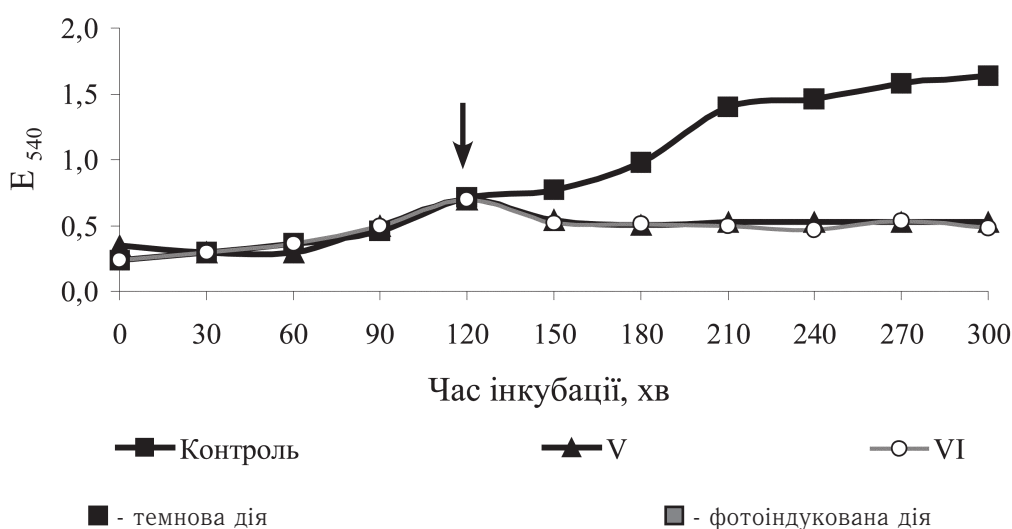


Рис. 4. Вплив синтетичних порфіринів на накопичення біомаси *Agrobacterium tumefaciens* FA2

Примітка: Стрілкою ▲ показано час додавання досліджуваних сполук.

Fig. 4. The synthetic porphyrin influence on *Agrobacterium tumefaciens* FA2 biomass accumulation

Note: The arrow ▲ shows the studied compound addition time

Після додавання сполук V та VI до культури *A. tumefaciens* у логарифмічній фазі росту, зростання оптичної густини відразу припинялося (рис. 4). Проте, зменшення оптичної густини культури протягом 3 годин не спостерігалось, тобто, лізису клітин не відбувалося. Однак, результати висіву на картопляний агар показали, що через 30 хв після додавання сполуки V кількість живих клітин у культурі зменшилася приблизно у 200 разів порівняно з попереднім значенням, сполуки VI – у 105 разів. Через годину після додавання порфіринів у дослідних варіантах живих клітин не було виявлено. У контролі кількість клітин продовжувала зростати.

Таким чином, можна припустити, що загибель клітин *A. tumefaciens* настає не внаслідок руйнування клітинних структур, а завдяки блокуванню порфіринами важливих процесів життєдіяльності.

Проведене дослідження свідчить про доцільність подальшого вивчення анти-мікробних властивостей синтетичних порфіринів. Перспективним напрямком є визначення їх активності стосовно широкого кола збудників захворювань рослин – не тільки бактеріальної, але й вірусної та грибової природи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Быховский В. Я. Тетрапирролы: разнообразие, биосинтез, биотехнология; Койфман О. И., Агеева Т. А. Структурные типы порфиринов; Миронов А. Ф. Фотодинамическая терапия рака // *Успехи химии порфиринов*. Т. 1. Под ред. проф. О. А. Голубчикова. – Санкт-Петербург: Изд-во НИИ Химии СПбГУ, 1997. – С. 6 – 74.
2. Зінченко О. Ю. Вплив порфіринів на ріст грам-позитивних і грам-негативних бактерій // *Вісник ОНУ. Біологія*. – 2003. – Т. 8, вип. 2. – С. 157 – 160.
3. Зінченко О. Ю., Русакова М. Ю., Філіпова Т. О., Галкін Б. М., Жиліна З. І. Антимікробні властивості марганецьвмісних синтетичних порфіринів // *Biomedical and Biosocial Anthropology*. – 2004. – № 3. – С. 40 – 42.
4. Зінченко О. Ю., Філіпова Т. О., Галкін Б. М., Жиліна З. І. Антимікробні властивості асиметрично мезо-заміщених порфіринів // *Вісник ОНУ. Біологія*. – 2005. – Т. 10, вип. 7. – С. 110 – 117.
5. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морин, 2001. – 260 с.
6. Філіпова Т. О., Галкін Б. М., Зінченко О. Ю., Русакова М. Ю., Жиліна З. І., Водзінський С. В., Ішков Ю. В. Взаємодія мікроорганізмів з природними і синтетичними порфіринами // *Вісник ОНУ. Біологія*. – 2001. – Т. 6, вип. 2. – С. 317 – 322.
7. Філіпова Т. О., Зінченко О. Ю., Галкін Б. М., Жиліна З. І. Темнова та фотоіндукована дія синтетичних порфіринів на клітини *Pseudomonas aeruginosa* // *Одеський медичний журнал*. – 2004. – Т. 81, № 1. – С. 29 – 32.
8. *Coordination chemistry of macrocyclic compounds* // Ed. by G. A. Melson. – New York - London: Plenum Press, 1998. – 573 p.
9. Helander I. M., Alakomi H. L., Latva-Kala K., Koski P. Poly-ethyleneimine is an effective permeabilizer of gram-negative bacteria // *Micryobiology*. – 1997. – V. 143. – P. 3193 – 3199.
10. Lavi A., Weitman H., Holmes R. The depth of porphyrin in a membrane and membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency // *Biophys. J.* – 2002. – V. 82, № 4. – P. 2101 – 2110.
11. Malik Z., Hanania J., Nitzan Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins – an alternative approach to antimicrobial drugs // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – № 5. – P. 281 – 293.
12. Merchat M., Spikes J. D., Bertoloni G. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 1996. – V. 32, № 2. – P. 149 – 157.
13. Philippova T. O., Galkin B. N., Zinchenko O. Yu., Rusakova M. Yu., Ivanitsa V. A., Zhilina Z. I., Vodzinskij S. V., Ishkov Yu. V. The antimicrobial properties of new synthetic porphyrins // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – 2003. – V. 7, № 11 – 12. – P. 737 – 742.
14. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning*. 2nd ed. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 1659 p.
15. Soukos N. S., Hamblin M. R., Hasan T. The effect of charge on cellular uptake and phototoxicity of polylysine chlorin e6 conjugates // *J. Photochem. Photobiol.* – 1997. – V. 65, № 6. – P. 723 – 729.



**Н.С. Водзинская, О.Ю. Зинченко, Т.О. Филиппова, Б.Н. Галкин,
С.В. Водзинский, Ю.В. Ишков**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (048) 765 33 61,
email: nsvod@ukr.net

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* FA2 К ДЕЙСТВИЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОРФИРИНОВ

Реферат

Исследовано темновое и фотоиндуцированное действие новых синтетических порфиринов с разными зарядами молекул на возбудителя бактериального рака растений — *Agrobacterium tumefaciens*. Показано, что наиболее эффективными, как в темновых условиях, так и при фотоактивации являются катионные порфирины. Наиболее активными из этой группы соединений были асимметрично замещенные порфирины, имеющие в одном из *мезо*-положений *n*-нонил, которые практически полностью подавляли рост *A. tumefaciens* при фотосенсибилизации. Установлено, что эти порфирины в темновых условиях обладают бактерицидным действием, которое, по-видимому, обусловлено блокированием важных процессов жизнедеятельности.

К л ю ч е в ы е с л о в а : бактериальный рак растений, порфирины, антибактериальная активность, фотосенсибилизация.

**N.S. Vodzinska, O.Yu. Zinchenko, T.O. Philipova, B.M. Galkin,
S.V. Vodzinskiy, Yu.V. Ishkov**

Odesa National Mechnikov University, Dvoryanska str., 2,
Odesa, 65082, Ukraine, tel.: 8 (048) 765 33 61,
e-mail: nsvod@ukr.net

***AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* FA2 SENSITIVITY TO THE SYNTHETIC PORPHYRINS ACTION**

Summary

Dark and photoinduced action of new synthetic porphyrins with different molecular charges has been studied towards plant bacterial cancer agent *Agrobacterium tumefaciens*. It has been shown that cation porphyrins are most effective upon both dark condition and photoactivation. The most active compounds in this group are asymmetric substituted porphyrins, with *n*-nonyl in one of *meso*-positions. They caused almost total photoactivated inhibition of *A. tumefaciens* growth. Under dark conditions these porphyrins also have bactericidal effect. The death of *A. tumefaciens* cells probably occurs as the result of important metabolic function inhibition.

Key words: bacterial plant cancer, porphyrins, antibacterial activity, photosensitization.

