

УДК 616.98: 578.812.1

Н.С. Водзінська, Б.М. Галкін, С.В. Водзінський, Т.О. Філіпова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +38 (048)765 33 61, e-mail: tphilippova@ukr.net

АНТИФАГОВА АКТИВНІСТЬ АСИМЕТРИЧНО-ЗАМІЩЕНИХ ПІРИДИЛПОРФІРИНІВ

Мета. Вивчення антивірусних властивостей нових синтетичних асиметрично-заміщених порфіринів з використанням бактеріофагів як модельних вірусів. **Матеріали та методи.** У роботі вивчено здатність вільної основи 5,10,15-три(N-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфірина та її комплексу з цинком інгібувати активність стафілококового фага, фага T4 та фага T7. Бактеріофаги інкубували у присутності досліджуваних сполук у темнових умовах та при опроміненні видимим світлом, після чого їх титрували за методом подвійних агарових шарів. Кінцеві концентрації порфіринів складали 0,1; 1 та 10 мкМ. Спектри поглинання порфіринів записували після інкубації з фаговою суспензією за допомогою спектрофотометра «Spekol-10» та оцифровували. **Результати.** Показано, що найчутливішим до дії сполук є стафілококовий бактеріофаг, активність якого пригнічувалася вільною основою порфірину на 68% у темнових умовах, та на 80% при фотоактивації. Цинковий комплекс порфірину повністю інактивував цей фаг, як у темнових умовах так і при опроміненні. Бактеріофаг T4 був чутливішим до дії досліджуваних сполук за темнових умов. Так, за темнових умов зниження активності фага у присутності вільної основи порфірину досягало 68%, а цинкового комплексу – 88%, в той час за фотоактивації – 24% та 35%, відповідно. Бактеріофаг T7 навпаки був чутливішим до дії фотоактивованих порфіринів. Зниження його активності у темнових умовах вільною основою порфірину досягало 21%, а цинковим комплексом – 16%, тоді як за опромінення – 28% та 53%, відповідно. Спектроскопічні дослідження показали, що досліджувані порфірини зв'язуються з фагами. **Висновки.** Синтетичні асиметрично-заміщені порфірини пригнічують активність досліджуваних бактеріофагів завдяки формуванню комплексів з фаговими частками.

Ключові слова: антифагова активність, асиметрично-заміщені порфірини, бактеріофаги.

Контроль над вірусними інфекціями є однією з найважливіших проблем сучасної науки. На сьогоднішній день переважна більшість вірусних інфекцій по суті не має засобів етіотропної терапії. Залишається не ви-

© Н.С. Водзінська, Б.М. Галкін, С.В. Водзінський, Т.О. Філіпова, 2013



рішенням також питання хіміотерапії вірусних хвороб рослин та тварин. У пошуку нових препаратів для застосування у сільському господарстві особливу роль відіграє їх екологічна безпечність. До того ж усі виробництва, що засновані на великомасштабних бактеріальних ферментаціях зазнають шкоди від вірусів бактерій — бактеріофагів, боротьба з якими є однією з актуальних задач сучасної біотехнології [7].

Використовувати порфірини як антивірусні агенти було запропоновано, перш за все, для стерилізації крові та її компонентів. Фотосенсибілізація з допомогою порфіринів виявилася ефективною проти вільних вірусів, внутрішньоклітинних вірусів, вірустрасформованих клітин та вірусних контамінантів у крові [8]. Деякі похідні порфіринів здатні інактивувати специфічні вірусні мішені, у тому числі ретровірусну зворотню транскриптазу і протеазу ВІЛ-1 [9, 10]. На прикладі бактеріофага Т7 як модельного вірусу без суперкапсиду була показана можливість використання катіонних порфіринів для усунення вірусів з рідкого середовища [5].

Взагалі, бактеріофаги часто використовують як моделі патогенних вірусів, оскільки вони не шкідливі та не потребують спеціальних дослідницьких умов, а результати досліджень з бактеріофагами доступні вже через декілька годин після зараження. Їх з успіхом використовували як моделі вірусів при оцінюванні ефективності бар'єрних матеріалів, для перевірки ефективності очищення питної води, для оцінювання віруліцидних сполук, для визначення чутливості вірусів до дезінфектантів [2, 3, 6].

З огляду на зазначене вище метою даної роботи було вивчення антивірусних властивостей нових синтетичних асиметрично-заміщених порфіринів з використанням бактеріофагів як модельних вірусів.

Матеріали та методи

Вивчалась антифагова активність вільної основи 5,10,15-три(Н-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфірина та її комплексу з цинком, синтезованих у ПНДЛ-5 ОНУ імені І.І. Мечникова.

Антифагова дія досліджуваних сполук перевірялася на модельних системах *S. aureus* — полівалентний стафілококовий бактеріофаг, *E. coli* — бактеріофаги Т4 та Т7.

Штам бактерії *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 отриманий з музею кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова. Штам бактерії *E. coli* В та бактеріофаг Т4 люб'язно надані завідувачем кафедри вірусології Київського національного університету імені Т.Г. Шевченка, д.б.н. Поліщуком В.П.; бактеріофаг Т7 — завідувачем відділу молекулярної біології бактеріофагів ІМВ НАНУ, д.б.н. Товкачем Ф.І. Культивування бактерій *S. aureus* проводили на МПБ, бактерії *E. coli* — на середовищі LB. Щільні середовища містили 1,4% агар-агару, напіврідкі — 0,7% агар-агару. Зберігали культури мікроорганізмів та



бактеріофаги за температури 4 °С. Концентрування фагів проводили за методом Яомото [11].

Для визначення темного впливу порфірину на бактеріофаг фагову суспензію розливали у стерильні пробірки по 1 мл з розведення, при якому бактеріофаг утворював на бактеріальному газоні 50–70 негативних колоній. До фагової суспензії додавали порфірини таким чином, щоб кінцева концентрація сполук у пробірках складала 0,1; 1 та 10 мкМ. Вибір саме цих концентрацій базується на попередніх даних про відсутність антибактеріальної дії досліджуваних сполук за концентрації 10 мкМ і нижче. За контроль брали фагові суспензії без додавання досліджуваних речовин. Після цього пробірки інкубували у холодильнику за температури 4 °С протягом 24 год. Після закінчення терміну інкубації бактеріофаги титрували за методом подвійних агарових шарів [1].

Для визначення фотоіндукованого впливу порфіринів на бактеріофаг фагову суміш одразу ж після додавання сполук піддавали опроміненню лампою розжарювання денного світла потужністю 500 Вт протягом 20 хв. Інтенсивність опромінення складала 40 Дж/см² [10]. За контроль брали фагову суспензію без додавання досліджуваних речовин. Одразу ж після опромінення проводили титрування бактеріофага за методом подвійних агарових шарів. Облік результатів проводили через 24 год, підраховуючи кількість негативних колоній на бактеріальному газоні у досліді та контролі.

Для спектроскопічних досліджень використовували 10 мкМ розчини порфіринів. У дослідні пробірки вносили відповідні бактеріофаги до кінцевої концентрації 5×10^5 БУО/мл, а у пробірки, що слугували контролем, додавали відповідний об'єм фізіологічного розчину. Пробірки витримували 30 хв у темному місці. Спектри поглинання записували за допомогою спектрофотометра «Spekol-10». Отриманні дані були оцифровані за допомогою програм Grafula та Origin Pro 8.

Результати дослідження та їх обговорення

Результати дослідження показали, що високу темнову активність вільної основи досліджуваного порфірину щодо стафілококового фага та фага Т4. За найвищої концентрації порфірину зниження активності фагів досягало 68%. Найменша його концентрація пригнічувала інфекційність стафілококового фага на 35% та фага Т4 — на 15%. По відношенню до цих фагів має місце чітка залежність активності сполуки від її концентрації. Щодо фага Т7 такої залежності не виявлено. Максимальне зниження його активності (на 21%) відбувалося за концентрації 1 мкМ.

Тенденція впливу цинкового комплексу досліджуваного порфірину на фаги була однаковою. Найактивнішою виявилася концентрація 10 мкМ, за якої активність стафілококового фага пригнічувалася повністю, активність фага Т4 знижувалася на 88%, а фага Т7 — на 16%. Найменш ефективною була концентрація 1 мкМ, за якої активність



стафілококового фага знижувалася на 47%, а фага Т4 та Т7 — на 22% та 7%, відповідно (рис. 1).

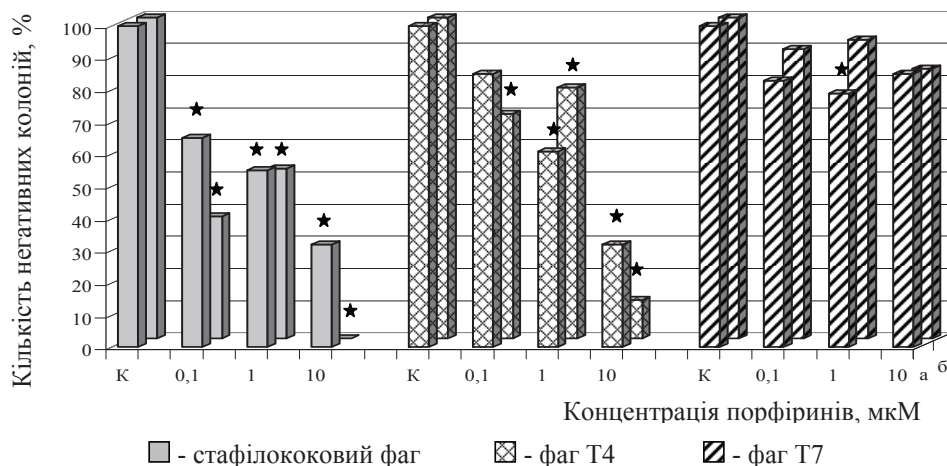


Рис. 1. Вплив вільної основи асиметрично-заміщеного піридилпорфірину (а) та її комплексу з цинком (б) на інфекційну активність бактеріофагів за темнових умов. Примітка: К — контроль, * — різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 1. Influence upon asymmetrically substituted pyridylporphyrin free base (a) and zinc complex (b) bacteriophage activity under the dark conditions. Note: K — control, * — significantly different from control

Таким чином, за ступенем чутливості до темної дії асиметрично-заміщених порфіринів фаги можна розташувати у такому порядку: стафілококовий фаг > фаг Т4 > фаг Т7. Вищу активність у темнових умовах встановлено для металокомплексу порфірину.

За фотоактивації вільної основи досліджуваного порфірину пригнічення активності стафілококового фага прямо залежало від її концентрації і становило 31–80%. Аналогічні результати отримано і при визначенні фотодинамічної інактивації вірусів в присутності катіонних порфіринів. Вважається, що пропорційно до зростання концентрації фотосенсибілізаторів підвищується утворення синглетного кисню, який пошкоджує структурні компоненти вірусів [12]. При опроміненні за присутності цього порфірину зниження активності фага Т4 не перевищувало 24%. Фотоінактивація фага Т7 під дією вільної основи була у межах 16–28%. Фотоактивований цинковий комплекс досліджуваного порфірину повністю пригнічував активність стафілококового фага за концентрації 10 мкМ. Зниження активності цього фагу складало за концентрації 0,1 мкМ 41%, а за концентрації 1 мкМ — 19% (рис. 2).

При опроміненні фагів Т4 та Т7 у присутності 10 мкМ даного металокомплексу їх інфекційність знижувалася на 35% та 53%, а за найменшої концентрації — на 12% та 8%, відповідно. Отже, фаг Т4 є більш чутливим до темної дії сполук.

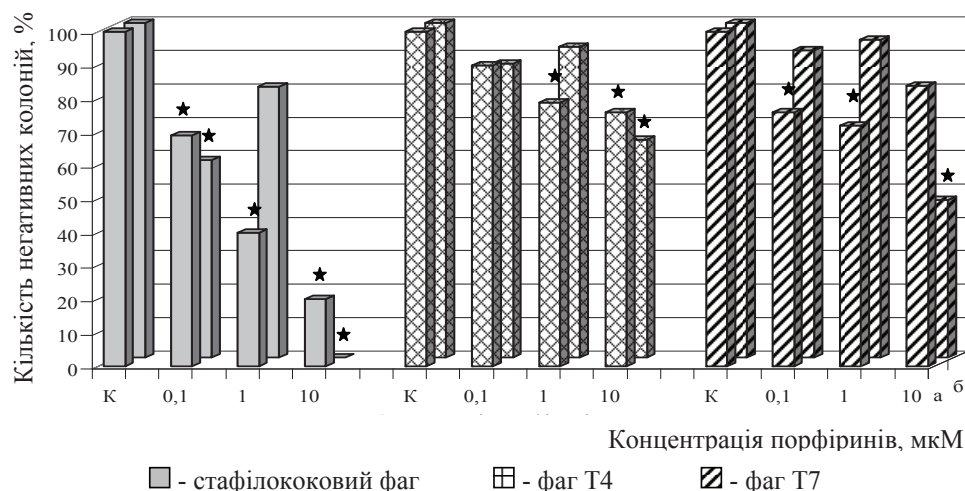


Рис. 2. Вплив вільної основи асиметрично-заміщеного піридилпорфірину (а) та її комплексу з цинком (б) на інфекційну активність бактеріофагів за умов фотоактивації.

Примітка: К — контроль, * — різниця достовірна порівняно з контролем

Fig. 2. Influence upon asymmetrically substituted pyridylporphyrin free base (a) and zinc complex (b) on bacteriophage activity after photoactivation.

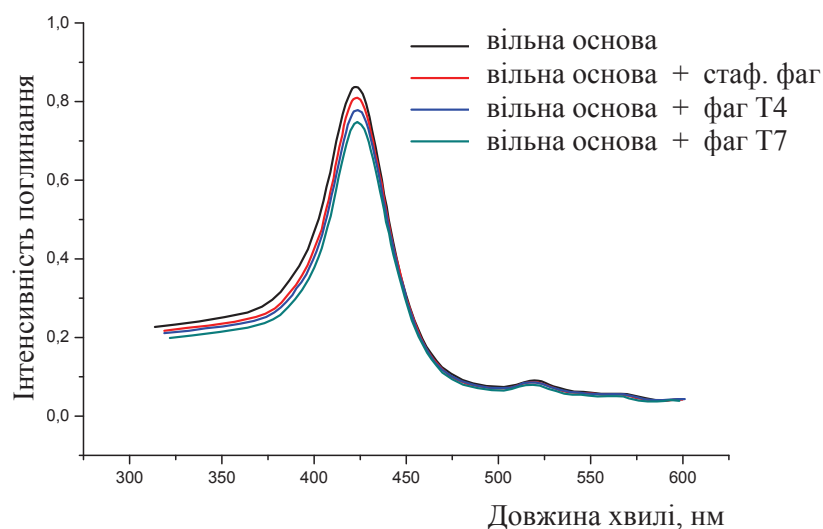
Note: K — control, * — significantly different from control

Відомо, що порфірини здатні формувати різноманітні комплекси з ДНК. Результати досліджень [4] показують, що вони зв'язуються з ДНК незалежно від того чи є полінуклеотид частиною нуклеопротейного комплексу чи ні. Використовуючи спектроскопічні методи дослідження можна визначити наявність та характер зв'язування порфіринів з нуклеїновою кислотою або нуклеопротейним комплексом, яким є фагова частка. Для порфіринів у складі комплексів найбільш характерними змінами є зрушення смуги Соре до більших довжин хвиль, яка супроводжується гіпохромним або гіперхромним ефектом (тобто зменшення або збільшення екстинкції) [14].

Встановлено, що за взаємодії фагів із досліджуваними порфіринами відбуваються певні зміни їх спектральних характеристик. Максимум смуги Соре вільної основи у присутності фагів зрушувався на 0,7 нм, та в усіх випадках спостерігався гіпохромний ефект: 3,3 % для стафілококового фага, 7% — для фага Т4 та 10,7% — для фага Т7 (рис. 3).

Значний зсув у червоний бік спектру смуги Соре цинкового комплексу — на 12 нм — спостерігався у присутності стафілококового фага та фага Т4, причому інтенсивність поглинання світла порфірином за присутності першого фага не змінювалася, а за присутності другого знижувалася на 2,3%. Найбільший гіпохромізм — 11,4% — спостерігався за взаємодії сполуки з фагом Т7, але при цьому відбувався незначний (на 1,5 нм) зсув смуги Соре порфірина.

А



Б

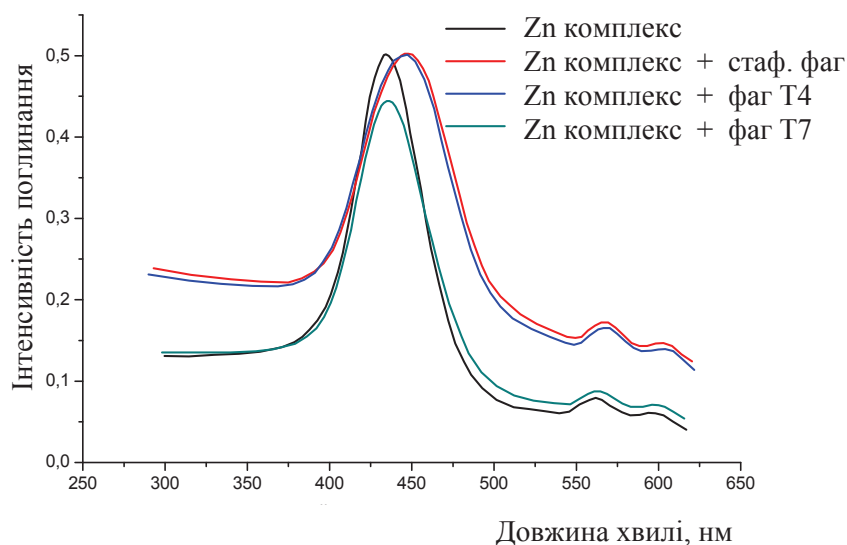


Рис. 3. Спектри поглинання вільної основи асиметрично-заміщеного піридилпорфірину (А) та її комплексу з цинком (Б) у присутності бактеріофагів.

Fig. 3. Asymmetrically substituted pyridylporphyrin free base (A) and zinc complex (B) absorption spectra in presence of bacteriophages.

Таким чином, результати спектроскопічних досліджень свідчать про зв'язування порфіринів з фагами. За даними літератури відомо, що форми зв'язування, а саме інтеркаляція та зовнішнє неінтеркалятивне зв'язування, як з ізолюваною ДНК, так і з ДНК всередині фагового капсида, схожі [14]. Встановлено, що в ізолюваній ДНК і фагових частках

розподіл та співвідношення форм зв'язування аналогічні, але доступність сайтів зв'язування залежить від структури ДНК.

Структура протейнового комплексу також відіграє важливу роль у взаємодії порфіринів з нуклеопротейном, навіть якщо нема прямого зв'язування порфірину з білками [13]. Цим можна пояснити різницю у чутливості фагів до дії сполук, оскільки усі досліджувані фаги належать до різних родин та мають різну морфологічну будову. Однак зв'язування з порфірином не завжди впливає на структуру капсиду або на взаємодію ДНК з білком у фаговій частці [4].

На відміну від темнових ефектів порфіринів за фотоактивації цих сполук суттєво змінюється структура білків нуклеопротейнового комплексу. Слід зазначити, що зв'язування порфірину з фаговою часткою не є необхідною умовою ефективної фотосенсибілізуючої дії. Це можна пояснити тим, що молекули вільних порфіринів більш активно утворюють синглетний кисень [12].

Таким чином, проведені дослідження показали, що найбільш чутливим до темнового та фотоіндукованого впливу порфіринів є стафілококовий бактеріофаг, в той час як фаг Т7 виявляє високу стійкість до дії цих сполук. Зв'язування вільної основи 5,10,15-три(Н-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфірину з досліджуваними фагами супроводжується гіпохромним ефектом, який для цинкового комплексу виявлено лише за присутності фага Т7. Для стафілококового та Т4 фагів виявлено батохромний ефект — зсув смуги Соре металокомплексу у червоний бік спектру.

Н.С. Водзинская, Б.Н. Галкин, С.В. Водзинский, Т.О. Филиппова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38 (048)765 33 61, e-mail: tphilippova@ukr.net

АНТИФАГОВАЯ АКТИВНОСТЬ АСИММЕТРИЧНО-ЗАМЕЩЕННЫХ ПИРИДИЛПОРФИРИНОВ

Реферат

Цель. Изучение антивирусных свойств новых синтетических асимметрично-замещенных порфиринов с использованием бактериофагов в качестве модельных вирусов. **Материалы и методы.** В работе изучалась способность свободного основания 5,10,15-три(Н-метил-4-пиридил)-20-(н-нонил)порфирина и его комплекса с цинком ингибировать активность стафилококкового фага, фага Т4 и фага Т7. Бактериофаги инкубировали в присутствии исследуемых соединений в темновых условиях и при облучении видимым светом, после чего их титровали методом двойных агаровых



слоев. Конечные концентрации порфиринов составляли 0,1 мкМ, 1 мкМ и 10 мкМ. Спектры поглощения порфиринов записывали после инкубации с фаговой суспензией с помощью спектрофотометра «Spekol-10» и оцифровывали. **Результаты.** Показано, что наиболее чувствительным к действию соединений оказался стафилококковый бактериофаг активность которого подавлялась свободным основанием исследуемого порфирина на 68% в темновых условиях, и на 80% при фотоактивации. Цинковый комплекс порфирина полностью инактивировал этот фаг, как в темновых условиях так и при облучении. Бактериофаг Т4 был более чувствительным к действию соединений при темновых условиях. Так, в темновых условиях снижение активности фага в присутствии свободного основания порфирина достигало 68%, а цинкового комплекса — 88%, тогда как при фотоактивации — 24% и 35%, соответственно. Бактериофаг Т7 наоборот был более чувствительным к действию фотоактивированных соединений. Снижение его активности в темновых условиях свободным основанием исследуемого порфирина достигало 21%, а цинковым комплексом — 16%, тогда как при облучении — 28% и 53%, соответственно. Спектроскопические исследования показали, что исследуемые порфирины связываются с фагами. **Выводы.** Синтетические асимметрично-замещенные порфирины угнетают активность исследуемых бактериофагов благодаря формированию комплексов с фаговыми частицами.

Ключевые слова: антифаговая активность, асимметрично-замещенные порфирины, бактериофаги.

N.S. Vodzinska, B.M. Galkin, S.V. Vodzinskii, T.O. Filipova

Odesa Mechnykov National University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.:+38 (048)765 33 61,
e-mail: tphilippova@ukr.net

ANTIPHAGE ACTIVITY OF ASYMMETRICALLY-SUBSTITUTED PYRIDYLPORPHYRINS

Summary

Aim. Study of the new synthetic asymmetrically-substituted porphyrins antiviral properties with the use of bacteriophages as model viruses. **Materials and methods.** In this work the ability of 5,10,15-tri(N-methyl-4-pyridyl)-20-(n-nonyl) porphyrin free base and its zinc complex to inhibit staphylococcal phage, phage T4 and T7 activity had been studied. Bacteriophages were incubated in presence of studied porphyrins in the dark and during irradiation, and then plated using the standard double-layer method. Final porphyrin concentrations were 0,1 M, 1 M and 10 M. Porphyrin absorption spectra were recorded after incubation with phage



suspension with spectrophotometer "Spekol-10" and then were digitized.

Results. It was shown, that staphylococcal phage is more sensible to the porphyrin action. Porphyrin free base suppress its activity on 68% in the dark and 80% after photoactivation. Phage inactivation with porphyrin zinc complex reached up to 100% in the dark and after irradiation. Phage T4 is more sensible to the porphyrins action in the dark. Decrease of the phage activity in the dark reached up to 68% in presence of porphyrin free base, and 88% in presence of porphyrin zinc complex, and 24% and 35%, respectively, after photoactivation. Inversely, phage T7 is more sensible to the photoactivated compounds action. Decrease of its activity in the dark reached up to 21% in presence of porphyrin free base, and 16% in presence of porphyrin zinc complex, and 28% and 53%, respectively, after irradiation. Spectroscopic studies show that studied porphyrins bind to the phage nucleoproteins. **Conclusion.** Synthetic asymmetrically-substituted porphyrins affect the studied bacteriophage activity due to complex formation with phage particles.

Key words: antiphage activity, asymmetrically-substituted porphyrins, bacteriophages.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Муллер Д.* Эксперименты в молекулярной генетике: Пер. с англ. — М.: Мир, 1976. — 436 с.
2. *Aranha-Creado H., Brandwein H.* Application of bacteriophages as surrogates for mammalian viruses: a case for use in filter validation based on precedents and current practices in medical and environmental virology // PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. — 1999. — V. 53, № 2. — P. 75–82.
3. *Bienek C., MacKay L., Scott G., Jones A., Lomas R., Kearney J. N., Galea G.* Development of a bacteriophage model system to investigate virus inactivation methods used in the treatment of bone allografts // Cell and Tissue Banking. — 2007. — V. 8 (2). — P. 115–124.
4. *Csik G., Egyeki M., Herenyi L., Majer Z., Toth K.* Role of structure-proteins in the porphyrin-DNA interaction // J. Photochem. & Photobiol. B: Biology. — 2009. — V. 96. — P. 207–215.
5. *Gábor F., Szolnoki J., Tyth K., Fekete A., Maillard P., Csik G.* Photoinduced inactivation of T7 phage sensitized by symmetrically and asymmetrically substituted tetraphenyl porphyrin: comparison of efficiency and mechanism of action // Photochem. Photobiol. — 2001. — V. 73, № 3. — P. 304–311.
6. *Jones M., Bellamy K., Alcock R., Hudson R.* The use of bacteriophage MS2 and a model system to evaluate virucidal hand disinfectants // Journal of Hospital Infection. — 1991. — V. 17. — P. 279–285.
7. *Los M., Czyz A., Sell E., Wegrzyn A., Neubauer P., Wegrzyn G.* Bacteriophage contamination: is there a simple method to reduce its del-



eterious effects in laboratory cultures and biotechnological factories? // J. Appl. Genet. — 2004. — Vol. 45, № 1. — P. 111–120.

8. *Matthews J.L., Sogandares-Bernal F., Judy M., Gulliya K., Newman J., Chanh T., Merengo-Rowe A.* Inactivation of viruses with photoactive compounds // Blood Cells. — 1992. — V. 18. — P. 75–89.

9. *Staudinger R., Abraham N.G., Levere R.D., Kappas A.* Inhibition of human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase by heme and synthetic heme analogs // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 2002. — V. 46, № 12. — P. 3917–3925.

10. *Vzorov A.N., Dixon D.W., Trommel J.S., Marzilli L.G., Compans R.W.* Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by porphyrins // Antimicrobial Agents Chemother. — 2002. — V. 46. — P. 3917–3925.

11. *Yamamoto K.R., Alberts B.M., Benzinger R.* Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification // J. Virology. — 1970. — V. 40. — P. 734–744.

12. *Zupan K., Egyeki M., Toth K., Fekete A., Herényi L., Mydos K., Csik G.* Comparison of the efficiency and the specificity of DNA-bound and free cationic porphyrin in photodynamic virus inactivation // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. — 2008. — V. 90. — P. 105–112.

13. *Zupan K., Herényi L., Toth K., Egyeki M., Csik G.* Binding of cationic porphyrin to isolated DNA and nucleoprotein complex: quantitative analysis of binding forms under various experimental conditions // Biochemistry. — 2005. — V. 44, № 45. — P. 15000–15006.

14. *Zupan K., Herényi L., Toth K., Majer Z., Csik G.* Binding of cationic porphyrin to isolated and encapsidated viral DNA analyzed by comprehensive spectroscopic methods // Biochemistry. — 2004. — V. 43, № 28. — P. 9151–9159.

Стаття надійшла до редакції 01.08.2013 р.

