

**І.В. Крулько¹, С.А. Заїка¹, А.В. Харіна¹, Н.С. Водзінська²,
В.П. Поліщук¹**

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська 64, Київ, 01033, Україна, тел.: 8 (044) 521-35-02,
e-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

²Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 63-57-61,
e-mail: nsvod@ukr.net

ПОРФІРИНИ ЯК ІНГІБІТОРИ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ В КУЛЬТУРІ РОСЛИННИХ ТКАНИН

*Встановлено, що в темнових умовах найвищу антифітовірусну активність у системі ВТМ – культура тканин *Nicotiana tabacum* виявляють вільні основи асиметрично мезо-заміщених синтетичних порфіринів. Їх металокомплекси з цинком і марганцем були менш ефективними. У той же час, Си-вмісний симетрично заміщений мезо-тетра(Н-метил-4-піридил)порфірин тетраозилат суттєво пригнічував розвиток вірусної інфекції в культурі тканин *N. tabacum*. Зроблено припущення про можливий механізм антивірусної дії порфіринів.*

К л ю ч о в і с л о в а: порфірини, ВТМ, *Nicotiana tabacum*, інгібування вірусної інфекції.

Особливі властивості та велике різноманіття тетрапірольних сполук — порфіринів, а особливо металопорфіринів, є причиною їх широкого використання в різних наукових дослідженнях фізичного, хімічного та біологічного характеру, в промисловості барвників, напівпровідників, в нанотехнологіях та медицині. На сьогодні дані речовини визнані перспективними поліфункціональними агентами, що разом з антибактеріальною [1, 9] і антипухлинною діями показали антивірусну активність відносно ряду вірусів збудників хвороб людини і тварин [12].

Дослідження показали, що опромінення видимим світлом безоболонкових вірусних часток у присутності порфіринів ефективно нейтралізує їх інфекційність. Час та особливості інактивації залежать від характеристик груп-замісників у порфіриновому ядрі. Взаємодія з безоболонковими віріонами вірусу гепатиту А, ймовірно, зумовлена електростатичним притяганням між негативно зарядженими білками капсиду та катіонною структурою порфіринів. Дослідження фотодинамічної інактивації вірусу простого герпесу I типу, виділеного від хом'яків, коней та пацюків, аніонними похідними 5,10,15,20-тетра-(сульфонато-феніл)порфірину в культурі клітин показали наявність віруліцидного та віростатичного ефекту [12]. Відмічено пряму залежність активності порфірину від його концентрації [5, 7].

На сьогодні питання дії порфіринів на віруси рослин є майже не вивченим. Тому, важливим напрямком досліджень є пошук нових препаратів порфіринів, які б мали виражену антифітовірусну дію. Метою даної роботи було вивчення протівірусних властивостей синтетичних порфіринів на модельній системі ВТМ-культура тканин *Nicotiana tabacum* у темнових умовах.

© І.В. Крулько, С.А. Заїка, А.В. Харіна, Н.С. Водзінська, В.П. Поліщук, 2009



Матеріали і методи

Вивчалася дія порфіринів на модельну систему вірус-культура рослинних тканин (вірус тютюнової мозаїки штам U1 (ВТМ) — культура тканин тютюну *Nicotiana tabacum* сорту *Trapeson*).

Досліджувані сполуки були представлені вільними основами порфіринів (№ 1, 3) та їх металокомплексами (№ 2, 4, 5, 6): № 1 — 5,10,15-три(Н-метил-4-піридил)-20-(н-гексадецил)порфірин тритозилат ($M_m=789$); № 2 — 5,10,15-три(Н-метил-4-піридил)-20-(н-гексадецил)порфіринато-цинк тритозилат ($M_m=850$); № 3 — 5,10,15-три(Н-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфірин тритозилат ($M_m=1267$); № 4 — 5,10,15-три(Н-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфіринато-цинк тритозилат ($M_m=1292$); № 5 — 5,10,15-три(Н-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфіринато-марганець(III) хлорид ($M_m=1070$); № 6 — мезо-тетра(Н-метил-4-піридил)порфіринато-мідь тетратозилат ($M_m=1429$). В ході роботи досліджувані речовини використовували в кінцевих концентраціях 10 мкМ, 20 мкМ та 40 мкМ. Вихідні розчини порфіринів мали концентрацію 2 мМ/мл. Отриманий розчин стерилізували шляхом холодної стерилізації через бактеріальний фільтр ($d \text{ пор}=450 \text{ нм}$). Робоча концентрація ВТМ складала 0,8 мг/мл.

Вивчення впливу порфіринів на накопичення ВТМ при регенерації рослин *Nicotiana tabacum* з калусної тканини проводили за наступною схемою (рис.1).

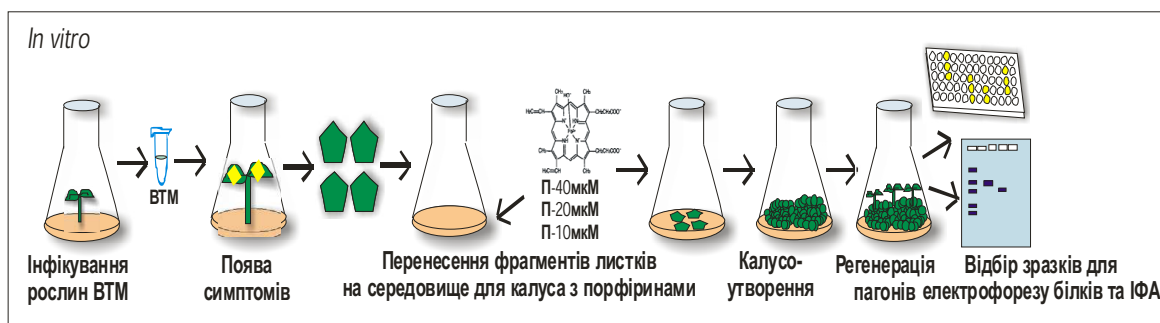


Рис. 1. Схема дослідження впливу порфіринів на накопичення ВТМ в культурі тканин *Nicotiana tabacum* при регенерації рослин з калусної тканини

Fig. 1. Study of porphyrin influence on the TMV accumulation in the *Nicotiana tabacum* tissue culture while plant regeneration from the callus tissue

Фрагменти стерильних листових пластинок інфікованих ВТМ рослин *Nicotiana tabacum* переносили на гормонвмісне поживне середовище MS-1 [2], що містило досліджувані порфірини № 1–6 у кінцевих концентраціях 40, 20 та 10 мкМ. За контроль слугували експланти з рослин, інфікованих ВТМ та посаджених на середовище без речовин, а також експланти із здорових рослин *N. tabacum*. Через 30–40 днів з утвореного калусу відбирали зразки для дослідження наявності вірусу в експериментальних і контрольних зразках за допомогою непрямого імуноферментного аналізу (ІФА). Після проведення ІФА зразки білків гомогенату калусу піддавали електрофорезу з використанням додецил-сульфату натрію (SDS).

Результати та їх обговорення

Порфірини — складні макрогетероциклічні сполуки, в основі яких лежить цикл порфіну. Унікальність структури та біологічних функцій порфіринів пов'язана з особливостями їх електронної системи. Наявність 20 електронів в макроциклічному кільці забезпечує високу реакційну здатність порфіринів. Метал-іон, що вступив в

комплекс з порфірином, передає свій вплив на найвіддаленіші атоми молекули та змінює властивості порфірину, включаючи окисно-відновні, кислотно-основні, електронно-оптичні тощо [3]. Тому, в ході роботи досліджувався антивірусний вплив синтетичних порфіринів: як вільних основ (№ 1, 3), так і металовмісних (№ 2, 4, 5, 6).

Для звільнення рослинного матеріалу від вірусу ефективним є метод регенерації рослин з калусної тканини [8, 11]. Цей метод застосовується поряд з методом хіміотерапії, що дозволяє досягти більш високого антивірусного ефекту. Саме тому, було зроблене припущення, що використання методу регенерації рослин тютюну з калусної тканини на середовищі з різними концентраціями синтетичних порфіринів може підвищувати відсоток виходу безвірусних рослин.

Проведене дослідження виявило антивірусну активність усіх сполук у системі ВТМ—культура тканин *N. tabacum*.

Результати ІФА свідчать, що найбільший ефект зниження вмісту антигенних детермінант ВТМ в калусній тканині, що не залежить від концентрації речовини, проявляє сполука № 1 (табл.). Її металвмісний аналог — сполука № 2, показав дещо слабшу антивірусну дію, що проявлялась в зниженні вмісту антигенних детермінант ВТМ в калусі приблизно на 68–73 %. Речовина № 3 виявила вищий рівень антивірусної активності порівняно з речовиною № 4.

Таблиця 1

**Зниження вмісту антигенних детермінант ВТМ в калусній тканині (%)
під впливом порфіринів**

Table 1

**Decrease of TMV antigenic determinants content in the callus tissue (%)
under influence of porphyrins**

Концентрація речовини	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
10 мкМ	84	68	40	33	16	82
20 мкМ	95	68	60	34	21	58
40 мкМ	84	73	70	45	25	66

Вона знижувала вміст вірусу в калусі приблизно на 40–70 %, в той час як для речовини № 4 максимальний антивірусний ефект досягав приблизно 45 %. Сполука № 6 знижувала кількість антигенних детермінант ВТМ в калусі приблизно на 58–82 %. Найнижчий відсоток зниження кількості антигенних детермінант ВТМ показала речовина № 5 — приблизно на 16 % в концентрації 10 мкМ та 25 % при 40 мкМ.

Результати електрофорезу білків з гомогенату калусу (рис. 2), отриманого з експлантів з інфікованих ВТМ рослин на середовищі в присутності речовини № 1, свідчать, що досліджувана сполука значно знижує вміст специфічного для ВТМ білку в калусі.

Таким чином, в ході досліджень виявлено антивірусну дію порфіринів, що проявлялась у зниженні вмісту антигенних детермінант ВТМ в калусній культурі. Антивірусний ефект сполук майже не залежав від наявності іону металу, що говорить про можливу роль лігандів молекули в антивірусній дії.

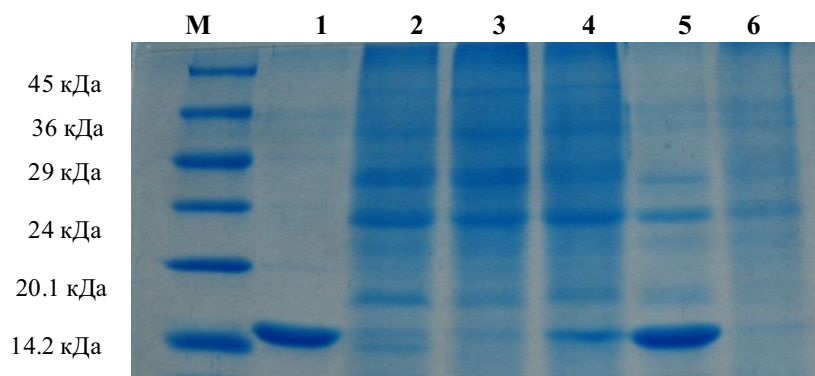


Рис. 2. Електрофореграма зразків гомогенату з калусу *N. tabacum*, отриманого на середовищі в присутності речовини № 1

М — маркерні білки; 1 — препарат виділеного ВТМ; 2, 3, 4 — зразки з калусів інфікованих ВТМ *N. tabacum*, отриманих на середовищі з 40, 20 та 10 мкМ сполуки № 1, відповідно; 5 — зразок з калусу з інфікованого ВТМ *N. tabacum*; 6 — зразок з калусу із здорового *N. tabacum*

Fig. 2. Electrophoregram of homogenate samples from *N. tabacum* callus obtained on the medium in presence of compaund № 1

М — marker proteins; 1 — released TMV specimen; 2, 3, 4 — samples from the *N. tabacum* callus infected by TMV in presence of 40, 20 and 10 μM of compaund № 1; 5 — the sample from the *N. tabacum* callus infected by TMV; 6 — the sample from the intact *N. tabacum* callus

З літературних даних відомо, що порфірини володіють високою здатністю до агрегації. В природі порфірини в основному знаходяться в комплексі з білками. Так, наприклад, при обробці лектину *Artocarpus integriflora* мезо-тетра (сульфонатофеніл) порфірином (H2TPPS) відбувається з'єднання молекул порфірину з білковими молекулами з утворенням «білкової сітки» [6].

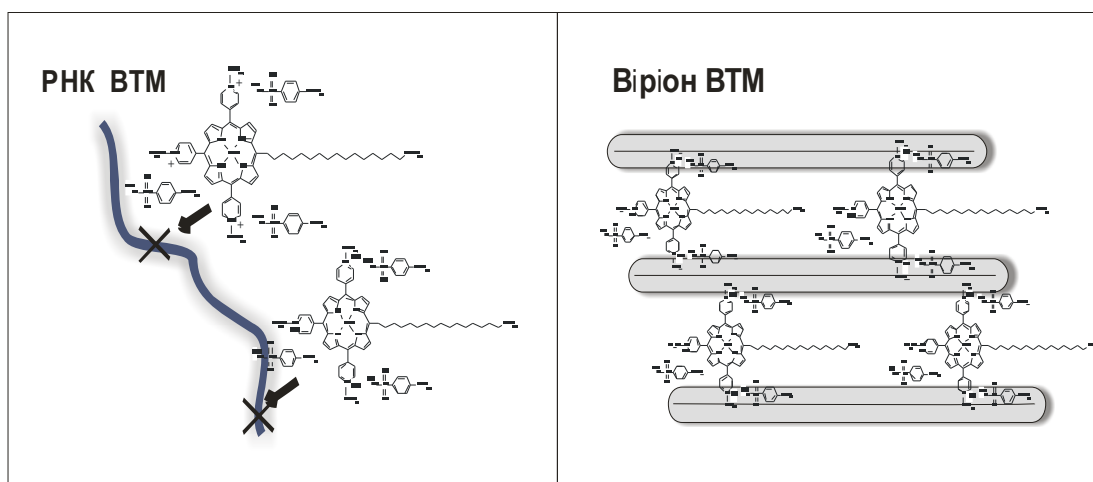


Рис. 3. Можливий механізм дії порфіринів на РНК та віріони ВТМ

Fig. 3. Possible mechanism of porphyrin action on the RNA and TMV virions

Порфірини здатні приєднуватись до ДНК або РНК та викликати їх деградацію [4,10]. Так, було показано, що дані сполуки можуть приєднуватись до кінців ДНК чи до малої заглибини в спіралі, причому атом металу утворює координаційні

зв'язки з пуриновими та піримідиновими основами, після чого може відбуватись їх руйнування або загальна дестабілізація спіралі та поява розривів в цукрофосфатному остові [5].

Зважаючи на отримані нами результати та враховуючи літературні дані, можна зробити припущення, що досліджувані в даній роботі синтетичні порфірини здатні інгібувати розвиток ВТМ в калусі шляхом приєднання до структурних білків ВТМ, таким чином зумовлюючи «склеювання» віріонів, та формування конгломератів. Іншим можливим механізмом віруліцидної дії порфіринів є деградація РНК вірусу (рис. 3). Таким чином досліджувані синтетичні порфірини, як вільні основи так і їх металокомплекси, можливо, є потенційно перспективними антифіїтовірусними сполуками. Проте, таке ствердження має бути підтверджено низкою експериментів у системі вірус-рослина.

ЛІТЕРАТУРА

1. Зінченко О.Ю. Антибактеріальна активність синтетичних порфіринів: Автореф. дис. канд. біол. наук. К., 2006. — 21 с.
2. Мусієнко М.М., Панюта О.О. Культура ізольованих клітин, тканин і органів рослин. — К.: Фітосоціоцентр, 2001. — 34 с.
3. Якубов С.П. Молекулярные комплексы цинк(II)- и железо(III)порфиринов с пиридином, н-пропиламином, метиловым эфиром глицина: Автореф. дис. канд. биол. наук. Иваново, 2006. — 25 с.
4. Bejune A.S., Shelton A.H., McMillin D.R. New dicationic porphyrin ligands suited for intercalation into B-Form DNA // *Inorg. Chem.* — 2003. — V. 42, № 25. — P. 8465-8475.
5. Chikako T., Takuya M., Tomoji K. Single molecular morphology of Porphyrin/DNA Complex // *Chemistry Letters.* — 2006. — V. 35, № 1. — P. 46-51.
6. Goel, M. et al. Porphyrin binding to jacalin is facilitated by the inherent plasticity of the carbohydrate-binding site: novel mode of lectin-ligand interaction // *Acta Crystallographica.* — 2004. — V. 60, № 2. — P. 281-288.
7. Liu J., Shi S., Ji L., Me W. Investigation on DNA binding and photo-cleavage properties of water-soluble porphyrin and metalloporphyrins // *Transition Metal Chemistry.* — 2006. — V. 30, № 6. — P. 684-690.
8. Lazarraga R., Panta A., Jaysinghe U., Dodds J.H. Tissue culture for elimination of pathogens // *CIP Research Guide of International Potato Center (CIP).* — 1991. — V. 23, № 4. — P.56-59.
9. Maisch T. et al. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2007. — V. 104, № 17. — P. 7223-7228.
10. Specht K.G. The role of DNA damage in PM2 viral inactivation by methylene blue photosensitization // *Photochem. Photobiology.* — 1994. — V. 59, № 5. — P. 435-437.
11. Walker J. M. *New Nucleic acid techniques.* — London: Humana Press, 1988. — 248 p.
12. Zecasin S.A. Giovanni N. et al. Photodynamic inactivation of herpes simplex viruses with porphyrin derivatives // *Photochemistry and Photobiology.* — 2000. — V. 27. — P. 52-55.

И.В. Крулько¹, С. А. Заика¹, А.В. Харина¹, Н.С. Водзинская², В.П. Полищук¹

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка
ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина, тел.: 8 (044) 521-35-02
e-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

²Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 63-57- 61
e-mail: nsvod@ukr.net

ПОРФИРИНЫ КАК ИНГИБИТОРЫ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В КУЛЬТУРЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

Реферат

Показано, что в темновых условиях наибольшую антифитовирусную активность в системе ВТМ — культура тканей *N. tabacum* проявляют свободные основания асимметрично мезо-замещенных синтетических порфиринов. Их металлокомплексы с цинком и марганцем были менее эффективными. В то же время, Cu-содержащий симметрично замещенный мезо-тетра(N-метил-4-пиридил) порфирин тетратозилат существенно угнетал развитие вирусной инфекции в культуре тканей *N. tabacum*. Сделано предположение о возможном механизме антивирусного действия порфиринов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: порфирины, ВТМ, *Nicotiana tabacum*, ингибирование вирусной инфекции.

I.V. Krulko¹, S.A. Zaika¹, A.V. Kharina¹, N.S. Vodzynska², V.P. Polischuk¹

¹Taras Shevchenko Kyiv National University
Volodymyrska Str. 64, Kyiv. 01033, Ukraine, tel.: 8 (044) 521-35-02
e-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

²Odesa National Mechnykov University
Dvoryanska Str. 2, Odesa, 65082, Ukraine, tel.: 8 (0482) 63-57-61
e-mail: nsvod@ukr.net

PORPHYRINS AS THE INHIBITORS OF VIRAL INFECTION IN PLANT TISSUE CULTURE

Summary

It was shown that free bases of asymmetric meso-substituted synthetic porphyrins possess the most high antiphytovirus activity under the dark conditions in the model system TMV- *N. tabacum* tissue culture. Their Zn and Mn complexes were less effective. In the same time Cu-containing symmetric substituted meso-tetra(N-methyl-4-piridyl)porphyrin tetratosilat inhibited viral infection in *N. tabacum* tissue culture. The assumption of possible mechanism of antiviral activity of porphyrins was made.

Key words: porphyrins, TMV, *Nicotiana tabacum*, inhibition of viral infection.

