

**Н. С. Водзінська, Т. О. Філіпова, Б. М. Галкін, Ю. В. Ішков,
Г. М. Кириченко**

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

ІНАКТИВАЦІЯ СТАФИЛОКОКОВОГО БАКТЕРІОФАГА В ПРИСУТНОСТІ СИНТЕТИЧНИХ ПОРФІРИНІВ

*У модельній системі “бактеріофаг – бактерія хазяїн” вивчений вплив синтетичних порфіринів на інфекційні властивості стафілококового фага. Показано, що у темнових умовах антифагову активність чинять металокомплекси тетрахінолінилпорфірину з цинком і вісмутом в концентрації 10 мкМ. Вісмутові комплекси протопорфірину IX і тетрапіридилпорфірину знижують інфекційність бактеріофага за усіх досліджених концентрацій (0,1; 1 і 10 мкМ). Після фотоактивації всі сполуки на 30-70 % пригнічували здатність бактеріофага лізувати клітини *S. aureus*. Інактивація стафілококового бактеріофага у темнових умовах спостерігалася через 24 години після додавання порфіринів, а за фотоактивації – через 20 хвилин.*

К л ю ч о в і с л о в а: стафілококовий бактеріофаг, синтетичні порфірини, антифагова активність, фотоактивація.

Фотодинамічна терапія (ФДТ), основним принципом якої є використання фотосенсибілізаторів, активованих світлом, являється ефективним методом лікування онкологічних захворювань [5,11]. Одними з найбільш ефективних фотосенсибілізаторів на даний момент є порфірини та їх похідні. Останнім часом показано, що вони є не тільки ефективними протипухлинними агентами, але й проявляють фотодинамічну та темнову активність щодо патогенних та умовно-патогенних бактерій. Одним з перспективних напрямків використання порфіринів може стати інактивація вірусів та дезінфекція крові та її компонентів [9-13].

Незважаючи на успішне використання ФДТ механізми вірусної фотоінактивації та взаємодії вірусів з фотосенсибілізаторами все ще активно вивчаються [6,7,13]. Вважають, що віруси, які мають суперкапсид можуть бути інактивовані внаслідок пошкоджень, спричинених фотодинамічними реакціями в їх протеїнових молекулах [5]. Щодо вірусів, які не мають суперкапсиду, є припущення, що їх інактивація в присутності порфіринів обумовлена взаємодією останніх з нуклеїновими кислотами [6,8]. В останній час при вивченні антивірусних властивостей і механізмів дії нових сполук широко використовують бактеріофаги, які слугують моделлю патогенних ДНК вірусів людини [1,4]. Крім того, знешкодження саме бактеріофагів, що заражують стартерні культури бактерій, має значення для виробництва.

Метою даної роботи було вивчення здатності нових синтетичних порфіринів викликати фотоіндуковану та темнову інактивацію стафілококового бактеріофага.



Матеріали та методи дослідження

Об'єктом дослідження були синтетичні порфірини, а саме вільна основа хінолінілпорфірину та її комплекси із цинком, оловом та вісмутом, а також вісмутові комплекси протопорфірину IX та тетрапіридилпорфірину, синтезовані в ПНДЛ-5 Одеського національного університету імені І. І. Мечникова. Антифагова дія досліджуваних сполук перевірялася у модельній системі стафілокок – полівалентний стафілококовий бактеріофаг. Штам *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 отриманий з музею кафедри мікробіології і вірусології Одеського національного університету. Зберігання культури *S. aureus* проводили на поверхні скошеного м'ясо-пептонного агару при температурі 4 °С.

Концентрування фага проводили за методом Ямомото [14]. Отриману суспензію зберігали у холодильнику.

Для визначення інфекційного титру бактеріофага використовували метод титрування за Грація [3].

Для визначення темного впливу порфіринів фагову суспензію розливали у стерильні пробірки по 1 мл з розведення, при якому бактеріофаг утворював на бактеріальному газоні окремі негативні колонії. Усі досліджувані сполуки розчиняли у дистильованій воді і додавали у пробірки з бактеріофагом до кінцевих концентрацій 0,1; 1 та 10 мкМ. Після цього пробірки інкубували у холодильнику при температурі 4 °С протягом 24 годин.

Після закінчення терміну інкубації проводили титрування бактеріофага методом подвійних агарових шарів [3]. Кількість паралелей для кожного варіанту дорівнювала 3. За контроль правила фагова суспензія без додавання досліджуваних речовин. Для контролю росту культури у поверхневий шар агару вносили тільки *S. aureus*, а для визначення можливого впливу досліджуваних речовин на формування бактеріального газону – культуру бактерії і розчини порфіринів у досліджуваних концентраціях.

Облік результатів проводили через 24 години, підраховуючи кількість негативних колоній на бактеріальному газоні у досліді та контролі.

Антифагову активність (А) виражали у відсотках інактивації, які підраховували за формулою:

$$A = (1 - N_0/N_k) \cdot 100 \%,$$

де N_0 – кількість негативних колоній у досліді, N_k – кількість негативних колоній у контролі.

Всі експерименти проводили у трьох повторях.

Для визначення фотоіндукованого впливу порфіринів на бактеріофаг фагову суспензію одразу ж після додавання сполук піддавали опроміненню за допомогою лампи розжарювання денного світла потужністю 500 Вт протягом 20 хв. Інтенсивність опромінення складала 40 J/cm² [9].

Одразу ж після опромінення проводили титрування бактеріофага за методом подвійних агарових шарів. Кількість повторів та оцінка результатів аналогічні попередній методиці.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного та кореляційного аналізу. Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel [2].



Результати та їх обговорення

При вивченні темної активності досліджуваних сполук виявилося, що найбільшу активність у темних умовах проявляє вісмутовий комплекс тетрапіридилпорфірину. Так, за присутності даної речовини у концентрації 0,1 мкМ антивірусна активність складала 34 %, 1 мкМ – 22 %, 10 мкМ – 74 % (рис. 1).

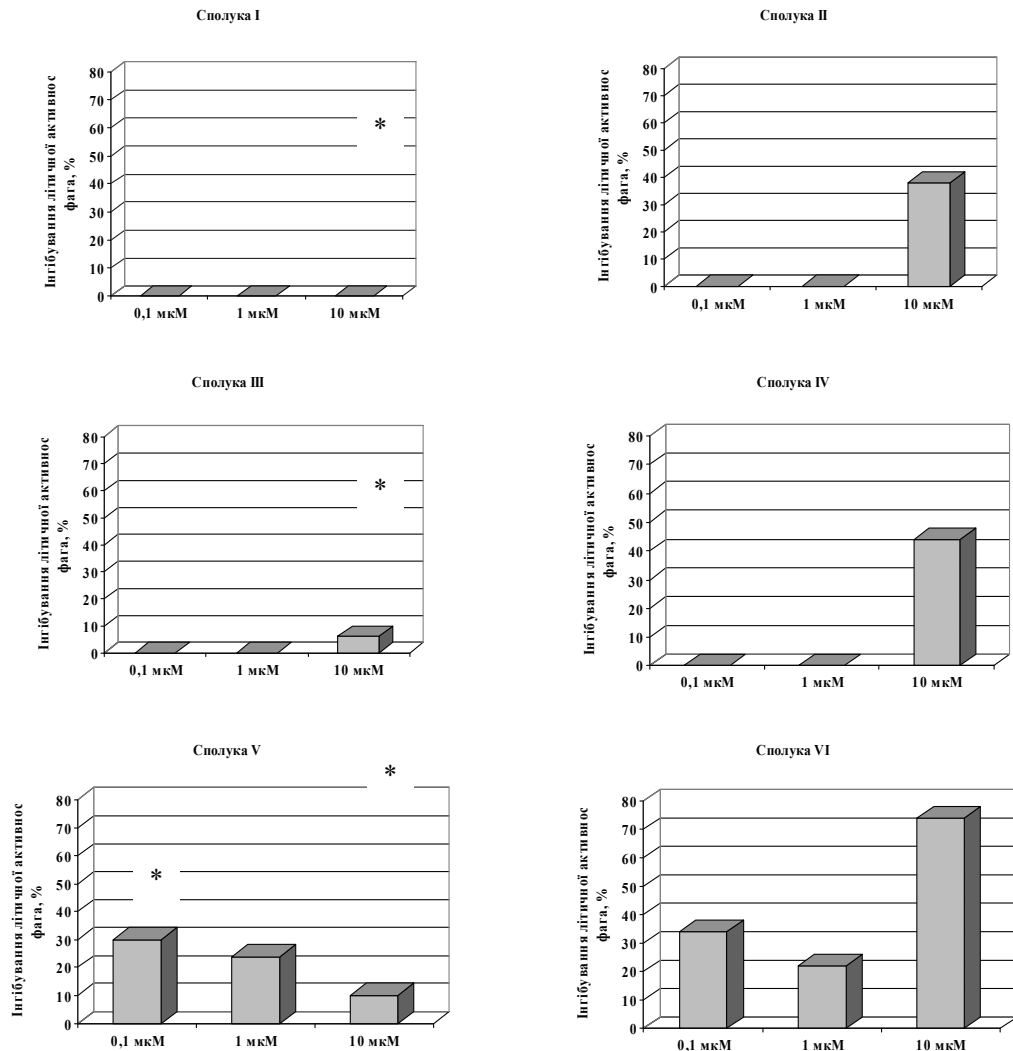


Рис. 1. Антифагова активність досліджуваних сполук за темних умов

Сполуки: I – вільна основа хінолінілпорфірину, II – цинковий комплекс хінолінілпорфірину, III – олов'яний комплекс хінолінілпорфірину, IV – вісмутовий комплекс хінолінілпорфірину, V – вісмутовий комплекс протопорфірину IX, VI – вісмутовий комплекс тетрапіридилпорфірину.

* – різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Fig. 1. Antiphage activity of studied compounds under the dark condition
 Compounds: I – free base of quinolinilporphyrin, II – quinolinilporphyrin zinc complex, III – quinolinilporphyrin tin complex, IV – quinolinilporphyrin bismuth complex, V – protoporphyrin IX bismuth complex, VI – tetrapyrroldiporphyrin bismuth complexes



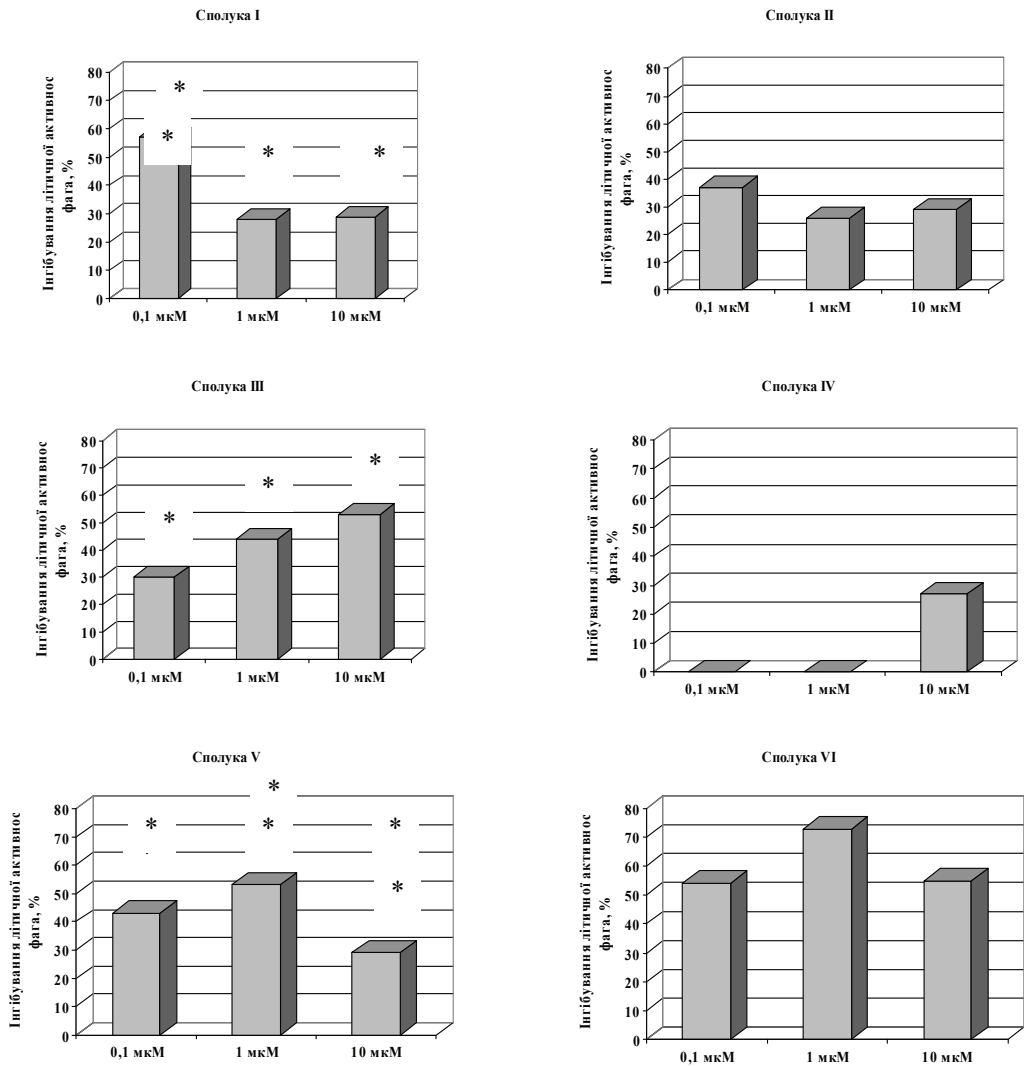


Рис. 2. Антифагова активність досліджуваних сполук після фотоактивації

Сполуки: I – вільна основа хінолінілпорфірину, II – цинковий комплекс хінолінілпорфірину, III – олов'яний комплекс хінолінілпорфірину, IV – вісмутівий комплекс хінолінілпорфірину, V – вісмутівий комплекс протопорфірину IX, VI – вісмутівий комплекс тетрапіридилпорфірину. * – різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Fig 2. Antiphage activity of studied compounds after fotoactivation

Compounds: I – free base of quinolinilporphyrin, II – quinolinilporphyrin zinc complex, III – quinolinilporphyrin tin complex, IV – quinolinilporphyrin bismuth complex, V – protoporphyrin IX bismuth complex, VI – tetrapyrrodidporphyrin bismuth complexes

Концентрація 10 мкМ виявилася також ефективною для вісмутового, цинкового та олов'яного комплексів хінолінілпорфірину, де інактивація вірусу складала 44 %, 38 % та 6 %, відповідно, тоді як інші концентрації цих сполук не впливали на активність вірусу.

Вільна основа хінолінілпорфірину у досліджуваних концентраціях не призводила до зниження інфекційності стафілококового бактеріофага. У присутності вісмутового комплексу протопорфірину IX спостерігали зворотню залежність активності сполуки від її концентрації. Так, за найменшої концентрації цієї сполуки антивірусна активність складала 30 %, тоді як при концентраціях 1 мкМ та 10 мкМ — 24 % та 10 % відповідно (рис. 1).

Вивчення фотодинамічної активності досліджуваних сполук показало, що серед досліджених хінолінілпорфіринів максимальну інгібуючу дію — 57 % — спостерігали при опроміненні бактеріофага у присутності 0,1 мкМ вільної основи хінолінілпорфірину. Фотоінактивація фагу у присутності 1 мкМ та 10 мкМ цієї сполуки складала 28 % та 29 % відповідно (рис. 2).

Така зворотня залежність активності сполуки від її концентрації спостерігалася також при опроміненні у присутності цинкового комплексу хінолінілпорфірину. Так, за найменшої концентрації цієї сполуки фотоінактивація складала 37 %, тоді як при концентраціях 1 мкМ та 10 мкМ — 26 % та 29 %, відповідно. Опромінення у присутності 10 мкМ олов'яного комплексу хінолінілпорфірину знижувало інфекційність фагових часток на 53 %. Антифагова дія цього порфірину за концентрації 1 мкМ складала 44 %, а за концентрації 0,1 мкМ — 30 %. Отже, залежність між активністю та концентрацією сполуки була прямою (рис. 2).

Для вісмутових комплексів порфіринів найбільш ефективною виявилася концентрація у 1 мкМ, при якій антифагова активність складала 53 % для вісмутового комплексу протопорфірину IX та 73 % для вісмутового комплексу тетрапіридилпорфірину. За присутності інших концентрацій цих сполук фотоінактивація фага була у межах 29 - 45 % та 54 - 55 %, відповідно. Вісмутівий комплекс хінолінілпорфірину проявляв фотодинамічну дію тільки у концентрації 10 мкМ, за якої інфекційність фагових часток знижувалася на 27 % (рис.2).

Усі вивчені порфірини у досліджених концентраціях не впливали на формування бактеріального газону стафілококом.

Таким чином, досліджені порфірини здатні впливати на інфекційність стафілококового бактеріофагу як в темнових умовах, так і при опроміненні. Більш ефективною була інактивація фага в умовах фотоактивації. Вона спостерігалася вже через 20 хвилин у присутності не тільки металокомплексів, але і вільної основи. Слід відмітити, що, на відміну від існуючих в літературі даних про темнову ефективність лише асиметрично заміщених порфіринів [6,7], у нашій роботі виявлена висока антифагова активність вісмутових комплексів симетрично заміщених синтетичних аналогів і протопорфірину IX. Це свідчить про доцільність подальшого вивчення антивірусних властивостей порфіринів, а також механізмів їх взаємодії з бактеріофагами, що мають різну будову.



ЛІТЕРАТУРА

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. — М.: Мир, 2002. — 589 с.
2. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 260 с.
3. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике: Пер. с англ. — М.: Мир, 1976. — 436 с.
4. *Bacteriophages: biology and applications* / Ed. by Elizabeth Kutter, Alexander Sulakvelidze. — CRC Press, Inc. Boca Raton, London New York Washington, 2005. — 470 p.
5. Ben-Hur R., Hoeben C., Van Ormondt H., Dubbelman T. M., Van Steveninck J. Photodynamic inactivation of retroviruses by phthalocyanines: the effects of sulphonation, metal ligand and fluoride // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* — 1992. — V. 13. — P. 145–152.
6. Egyeki M., Turyczy G., Majer Zs., Tyth K., Fekete A., Maillard P., Csik G. Photosensitized inactivation of T7 Phage as surrogate of non-enveloped DNA viruses. Efficiency and mechanism of action // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2003. — V. 1624. — P. 115-124.
7. Gbbor F., Szolnoki, J., Tyth K., Fekete A., Maillard P., Csik G. Photo-induced inactivation of T7 phage sensitized by symmetrically and asymmetrically substituted tetraphenyl porphyrin: Comparison of efficiency and mechanism of action // *Photochem. Photobiol.* — 2001. — V. 73. — P. 304-311.
8. Kasturi C., Platz M. S. Inactivation of lambda phage with 658 nm light using a DNA binding porphyrin sensitizer // *Photochem. Photobiol.* — 1992. — V. 56. — P. 427-429.
9. Matthews J. L., Sogandares-Bernal F., Judy M., Gulliya K., Newman J., Chanh T., Marengo-Rowe A. Inactivation of viruses with photoactive compounds. — *Blood Cells.* — 1992. — V. 18. — P. 75–89.
10. Smetana Z., Mendelson E., Manor J., van-Lier J. E., Ben-Hur E., Salzberg S., Malik Z. Photodynamic inactivation of herpes viruses with phthalocyanine derivatives // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* — 1994. — V. 22. — P. 37–43.
11. Trannoy L. L., Lagerberg J. W. M., Dubbelman T. M. A. R., Schuitmaker H. J., Brand A. Positively charged Porphyrins: a new series of photosensitizers for sterilization of red blood cell concentrates // *Transfusion.* — 2004. — V. 44. — P. 231-239.
12. Vyas G. N. Inactivation and removal of blood-borne viruses // *Transfusion.* — 1995. — V. 35. — P. 367– 370.
13. Wainwright M. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy // *Int. J. Antimicrob. Agents.* — 2003. — V. 21. — P. 510– 520.
14. Yamamoto K. R., Alberts B. M., Benzinger R., Hawthorne L., Treiber G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification // *Journal of Virology.* — 1970. — V. 40. — P. 734-744.

Н. С. Водзинская, Т. О. Филиппова, Б. Н. Галкин, Ю. В. Ишков, А. М. Кириченко

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

ИНАКТИВАЦИЯ СТАФИЛОКОККОВОГО БАКТЕРИОФАГА В ПРИСУТСТВИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОРФИРИНОВ

Реферат

В модельной системе “бактериофаг—бактерия хозяин” изучено влияние синтетических порфиринов на инфекционные свойства стафилококкового фага. Показано, что в темновых условиях антифаговую активность оказывают металлокомплексы тетрахинолинилпорфирина с цинком и висмутом в концентрации 10 мкМ. Висмутовые комплексы протопорфирина IX и тетрапиридилпорфирина снижают инфекционность бактериофага при всех изученных концентрациях (0,1, 1 и 10 мкМ). После фотоактивации все изученные соединения на 30 - 70 % подавляли способность бактериофага лизировать клетки *S. aureus*. Инактивация стафилококкового бактериофага в темновых условиях наблюдалась через 24 часа после внесения порфиринов в среду инкубации, а при фотоактивации — через 20 минут.

К л ю ч е в ы е с л о в а: стафилококковый бактериофаг, синтетические порфирины, антифаговая активность, фотоактивация.

N. S. Vodzinska, T. O. Filipova, B. M. Galkin, Yu. V. Ishkov, G. M. Kirichenko

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

STAPHYLOCOCCAL BACTERIOPHAGE INACTIVATION IN THE PRESENCE OF SYNTHETIC PORPHYRINS

Summary

Synthetic porphyrin influence on the staphylococcal bacteriophage infectious ability has been studied in the bacteriophage — host bacterium model system.

There has been shown that 10 мкМ of zinc and bismuth tetraquinolinyлporphyrin complexes are characterized by antiphage activity under the dark conditions. The studied (0,1, 1 и 10 мкМ) concentrations of protoporphyrin IX and tetrapyritylporphyrin bismuth complexes decreased the bacteriophage infectious ability. After photoactivation the bacteriophage ability of *S. aureus* cell lysis was suppressed by all compounds on 30 - 70 %. Under the dark conditions staphylococcal bacteriophage inactivation has been observed in 24 hours after porphyrin inoculation in the incubation medium, but in the presence of light activation — in 20 min.

К e y w o r d s: staphylococcal bacteriophage, synthetic porphyrins, antiphage activity, photoactivation.

