

І.В. Крулько<sup>1</sup>, С.А. Заїка<sup>1</sup>, А.В. Харіна<sup>1</sup>, Н.С. Водзінська<sup>2</sup>,  
В.П. Поліщук<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Одеський 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 антифiтовiрусну активнiсть у системi ВТМ – культура тканин *Nicotianum tabacum* виявляють вiльнi основи асиметрично мезо-замiщених синтетичних порфiринiв. Їх металокомплекси з цинком i марганцем були менш ефективними. У той же час, Си-вмiсний симетрично замiщений мезо-тетра (N-метил-4-пiридил) порфiрин тетраозилат суттєво пригнiчував розвиток вiрусної iнфекцiї в культурi тканин *N. tabacum*. Зроблено припущення про можливий механiзм антивiрусної дiї порфiринiв.*

*К л ю ч о в i с л о в а:* порфiрини, ВТМ, *Nicotiana tabacum*, iнгiбування вiрусної iнфекцiї.

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 антифiтовiрусну дiю. Метою даної роботи було вивчення противiрусних властивостей синтетичних порфiринiв на модельнiй системi ВТМ-культура тканин *Nicotiana tabacum* у темнових умовах.



## 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(N-метил-4-піридил)-20-(н-гексадецил)порфірин тритозилат (Мм=789); № 2 — 5,10,15-три(N-метил-4-піридил)-20-(н-гексадецил)порфіринато-цинк тритозилат (Мм=850); № 3 — 5,10,15-три(N-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфірин тритозилат (Мм=1267); № 4 — 5,10,15-три(N-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфіринато-цинк тритозилат (Мм=1292); № 5 — 5,10,15-три(N-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфіринато-марганець(III) хлорид (Мм=1070); № 6 — мезо-тетра(N-метил-4-піридил)порфіринато-мідь тетратозилат (Мм=1429). В ході роботи досліджували 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 пор=450 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).

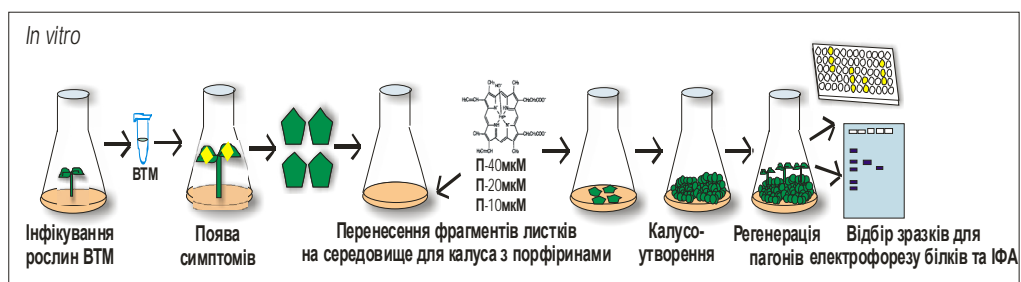


Рис. 1. Схема дослідження впливу порфіринів на накопичення ВТМ в культурі тканин *Nicotiana tabacum* при регенерації рослин з калусної тканини

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 подавали 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

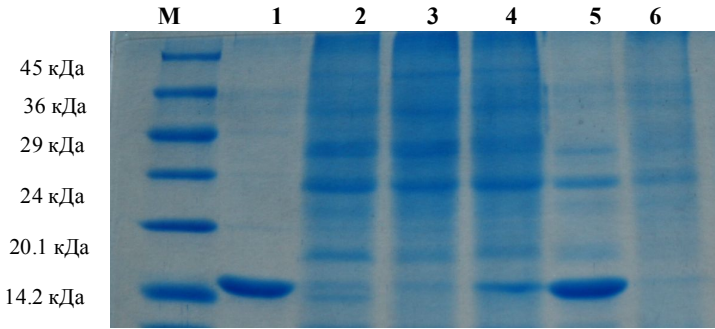
**Decrease of TMV antigenic determinants content in the callus tissue (%)  
under influence of porphyrins**

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.



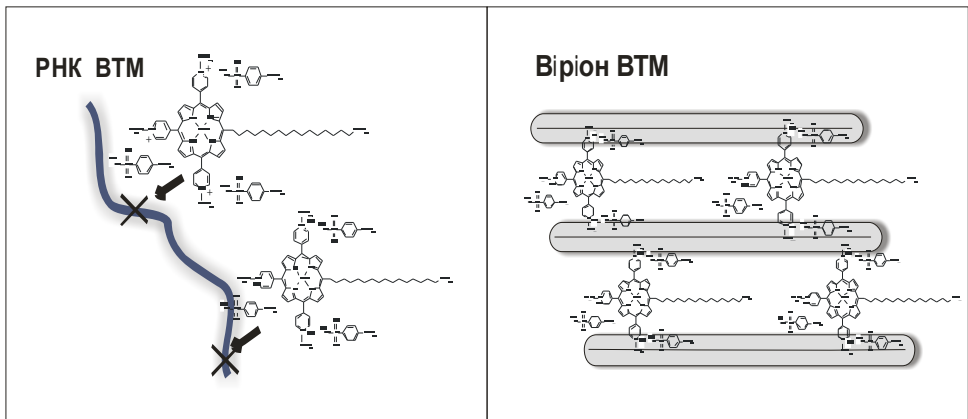
**Рис. 2.** Електрофореграма зразків гомогенату з калусу *N. tabacum*, отриманого на середовищі в присутності речовини № 1

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 compound № 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  $\mu\text{M}$  of compound № 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 (Н2ТРПС) 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 приєднуватися 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 антифітовірусними 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-пропиламино, 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 derivates // *Photochemistry and Photobiology.* — 2000. — V. 27. — P. 52-55.

**И.В. Крулько<sup>1</sup>, С. А. Заика<sup>1</sup>, А.В. Харина<sup>1</sup>, Н.С. Водзинская<sup>2</sup>, В.П. Полищук<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
ул. Владимирская, 64, Київ, 01033, Україна, тел.: 8 (044) 521-35-02  
e-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

<sup>2</sup>Одеський національний університет імені І.І. Мечникова  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Україна, 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. Krulko<sup>1</sup>, S.A. Zaika<sup>1</sup>, A.V. Kharina<sup>1</sup>, N.S. Vodzynska<sup>2</sup>, V.P.Polischuk<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>Odesa 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.

**К e y w o r d s:** porphyrins, TMV, *Nicotiana tabacum*, inhibition of viral infection.

