

ДІЯ РІЗНОМЕТАЛЬНИХ КОМПЛЕКСІВ МІДІ, КАДМІЮ ТА НІКЕЛЮ НА БАКТЕРІОФАГ Т4

На модельній системі бактеріофаг Т4 - бактерія E. coli вивчено вплив різнометальних комплексів міді, кадмію та нікелю на інфекційні властивості вірусу та морфологічні особливості фага. Встановлено зниження інфекційного титру під дією різнометальних комплексів $[Cu(En)_2CdCl_4DMF]$, $[CuNiCl(H_2L)]$. Досліджено вплив металів на морфологію віріонів.

Вірусиздатні викликають різноманітні пошкодження та інфекційні захворювання. Так, бактеріофаги викликають лізис технічних бактеріальних культур; представники різних родин вірусів є джерелом таких найбільш розповсюджених інфекцій, як грип, кір, герпес, паротит, гепатит, інфекції ЦНС, а також СНІД та асоційовані з ним хвороби. Віруси також здатні впливати на фізіологічні процеси інфікованої рослини, що призводить до значних втрат врожаю сільськогосподарських культур. Враховуючи недостатню ефективність як профілактичних заходів боротьби з вірусними інфекціями, так і сучасних антивірусних агентів, необхідні пошуки альтернативних ефективних хіміопрепаратів. Сьогодні відомі такі синтетичні хімічні сполуки, як сульфонієві та оксисульфонієві солі конденсованих тіанінватіа-

циклогексани, що проявляють помірну антифагову активність [1]. Противірусну дію мають йодидні та тіоцеонатні сполуки, а також комплекси, які містять іони цинку та кобальту [6; 7]. Ця інформація надихає на подальший скринінг новосинтезованих хімічних сполук неорганічної природи. Метою наших досліджень було детальне вивчення впливу різнометальних комплексів міді, кадмію та нікелю на інфекційність та морфологічну цілісність бактеріофага Т4 як модельної системи.

У роботі використовували бактеріофаг Т4 і культуру чутливих бактеріальних клітин *E. coli* B. Різннометальні сполуки синтезовано на кафедрі неорганічної хімії Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. Досліджувались такі сполуки: $[Cu(En)_2CdCl_4DMF]$, $[Cu(En)_7CdI_4DHF]$,

[Cu(En)₂CdBr₄DMSO], [CuNiCl(H₂L)], що містили іони міді, кадмію та нікелю.

Виділення, накопичення та концентрування бактеріофага Т4 проводили за загальноприйнятими методиками [4].

Визначення інфекційного титру бактеріофага Т4. Для цього використовували титрування фага методом агарових шарів (за Грація) [3].

Обробка препарату бактеріофага Т4 різнометальними комплексами. При дослідженні дії комплексних сполук на інфекційний титр бактеріофага Т4 готували: 1; 0,1 та 0,01 %-ні розчини. Брали 1 мл розчину комплексної сполуки і додавали 20 мкл фага, залишали на 1 год при температурі 4°C.

Електронномікроскопічні дослідження. Для приготування препаратів використовували мідні сіточки діаметром 3 ММ, покриті формваровими плівками-підкладками (0,2%-й розчин полівінілформальдегіду у хлороформі). На сіточки наносили препарат, який потім контрастували 2 %-м водним розчином уранілацетату. Дослідження препаратів проводили на електронному мікроскопі JEM100В [2].

Атомно-силова мікроскопія. Для вивчення вірусних препаратів без додаткової фіксації було застосовано атомно-силову мікроскопію. Дослідження виконували на атомно-силовому мікроскопі (Nanoscope D 3000, Digital Instruments, USA). Для покращення адсорбції, аналогічно приготуванню препаратів для електронної мікроскопії, використовували формвар, який наносили на сльоду. Для контролю поверхні знімали показники рельєфу чистої сльоди та сльоди, обробленої формваром [5].

У дослідіах використовували бактеріофаг Т4, який мав концентрацію 12-10⁹ у бідистилаті. Краплю розчину (25 мкл) наносили на свіжий відкол сльоди, через 20-30 ХВ препарат промивали водою та поступово висушували на повітрі в

закритій чашці Нетрі. В іншій модифікації препарат наносили на сльоду, витриману протягом 10 с у 0,2 %-му розчині формвару в хлороформі.

Статистична обробка отриманих результатів здійснювалася за допомогою комп'ютерної системи електронних таблиць MS EXCEL 2000 [4]. Для статистичної достовірності кожен дослід пов-1 торговали тричі.

При вивченні інфекційного титру бактеріофага Т4 під впливом 1, 0,1 та 0,01 %-х розчинів комплексних сполук за допомогою методу агарових шарів (за Грація) встановлено, що сполука [Cu(En)₂CdCl₄DMF] проявляла антифагову активність у 1%-му розведенні, при 0,1 та 0,01 %-х розведеннях зниження інфекційного титру не спостерігалось. Сполука [CuNiCl(H₂L)] також проявляла антифагову активність у 1 %-му розведенні. У 0,1 та 0,01 %-х розведеннях не спостерігалось зниження інфекційного титру. Інші перевірені сполуки не впливали на інфекційну активність бактеріофага Т4.

Була проведена статистична обробка даних щодо впливу комплексних сполук [Cu(En)₂CdCl₄DMF] (табл. 1) та [CuNiCl(H₂L)] (табл. 2) на інфекційний титр бактеріофага Т4.

В результаті проведених експериментів було доведено, що сполука ([Cu(En)₂CdCl₄DMF]) знижує інфекційний титр даного вірусу в концентрації 1 % більше, ніж на 55 %, але є неактивною в 0,1 та 0,01 %-х розведеннях. Така ж картина спостерігалась при дії речовини [CuNiCl(H₂L)].

За допомогою методу електронної мікроскопії показано, що координаційна сполука [CuNiCl(H₂L)] при інкубації з фагом 1 год (4 °С) утворювала скупчення бактеріофагів Т4. Віруси «склеювалися» головками, але морфологічна цілісність їх не порушувалась (рис. 1,2).

За допомогою методу атомно-силової мікроскопії виявлено, що при дії сполуки [Cu(En)₂CdCl₄DMF]

Таблиця 1. Вплив комплексної сполуки [Cu(En)₂CdCl₄DMF] на інфекційний титр бактеріофага Т4

Розведення вірусу	Контроль	1%	0,1%	0,01%
1*10 ⁻¹⁰	11,00 ± 2,55	3,33 ± 0,82	11,33 ± 1,63	12,00 ± 1,00
1*10 ⁻⁹	160,00 ± 24,66	87,33 ± 4,02	167,33 ± 3,56	158,67 ± 20,02
1*10 ⁻⁸	712,00 ± 41,67	290,00 ± 1,41	688,67 ± 6,38	682,00 ± 5,10

Таблиця 2. Вплив комплексної сполуки [CuNiCl(H₂L)] на інфекційний титр бактеріофага Т4

Розведення вірусу	Контроль	1%	0,1%	0,01%
1*10 ⁻¹⁰	7,33 ± 2,16	1,00 ± 0,71	9,33 ± 0,82	8,00 ± 1,22
1*10 ⁻⁹	160,00 ± 24,69	82,67 ± 8,29	176,67 ± 4,55	157,33 ± 24,18
1*10 ⁻⁸	712,00 ± 41,67	347,67 ± 32,78	684,67 ± 32,96	669,00 ± 13,47



Рис. 1. Електронномікроскопічне зображення бактеріофага Т4 (контроль)

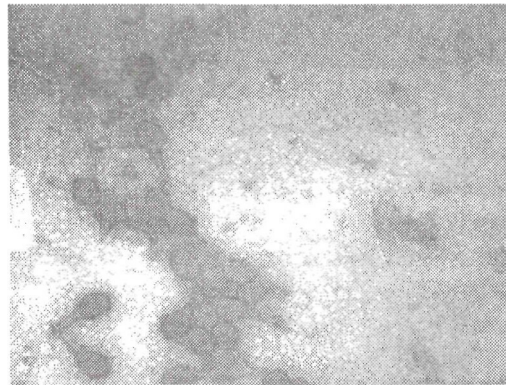


Рис. 2. Електронномікроскопічне зображення бактеріофага Т4 після обробки сполукою $[CuNiCl(H_2L)]$

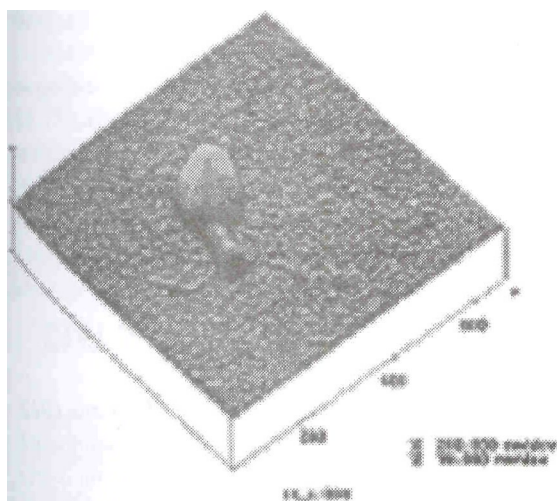


Рис. 3. Зображення бактеріофага Т4, отримане в атомно-силовому мікроскопі (контроль)

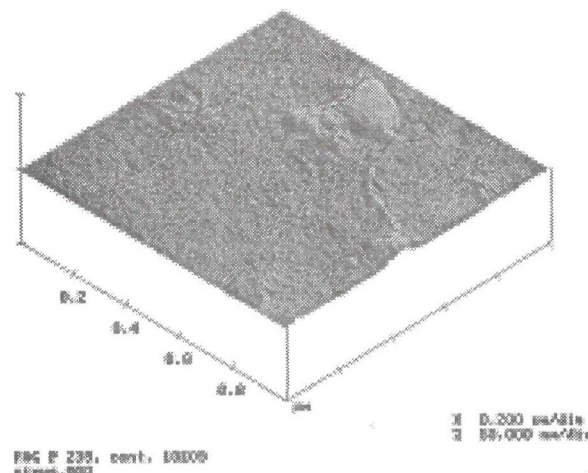


Рис. 4. Зображення бактеріофага Т4, отримане в атомно-силовому мікроскопі при дії речовини $[Cu(En)_2CdCl_4DMF]$ у 1 %-ному розчині

у 1 %-му розчині на бактеріофаг Т4 відбувалося скорочення чохла відростку та вихід нуклеїнової кислоти з головки фага (рис. 3, 4).

Таким чином, ми вважаємо, що комплексні сполуки $[Cu(En)_2CdCl_4DMF]$ та $[CuNiCl(H_2L)]$ при дії на бактеріофаг Т4 проявляють віруліцидну активність, тобто частково інактивують позаклітинний вірус. Дію досліджених препаратів можна порівняти з дією таких відомих хіміопрепаратів, як оксалін та гліоксаль. Антифагову активність різнометальних комплексів міді, кадмію та нікелю на бактеріофаг Т4 можна пояснити наявністю кількох гіпотетичних механізмів. Перший - маскування рецепторних ділянок вірусу, що не дозволяє фагу адсорбуватися на бактери-

альній клітині. Другий - адгезивні процеси, а саме, «склеювання» вірусних головок та хвостів; при цьому речовина виступає як «біологічний клей», що призводить до зниження неінфекційної активності віріонів (знижується вірогідність контакту фага з бактерією). Зазначимо, що можливе поєднання двох механізмів одночасно.

Аналіз експериментальних даних при дослідженні впливу різнометальних комплексів на метаболізм системи вірус - бактерія може лише частково висвітлити механізм дії досліджуваних речовин, оскільки дослідження є якісними (тобто речовина або впливає на систему, або ні). Надалі перспективні речовини вивчатимуться на кількісному рівні.

1. Клименко С. К., Сталбова Т. В., Куликова Л. К. Синтез, противомикробная и антифаговая активность сульфониевых и окисульфониевых солей, конденсированных тианов и тианоциклогексанов // Хим.-фарм. журн.- 2001,- Т. 35,- № 1.- С. 22-24.

2. Миронов А. М., Комиссарчик Я. Ю., Миронов В. А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине: Методологическое руководство.-СПб.: Наука, 1994.-400с.

3. Практикум по общей вирусологии / Под. ред. И. Г. Атабекова.- М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981,- 192 с.

4. Харіна А. В., Будзанівська Л. Г., Поліщук В. ІІ. Вплив гетероаніонних координаційних сполук міді та кобальту на бактеріофаг // Наукові записки НаУКМА.- 2002.- Т. 20- С. 438-441.
5. Nagao E., Dvorak J. A. Developing the atomic force microscope for studies of living cells // International Laboratory,- 1999.- № 1-Р. 21-23.
6. Panteva H. et all. Effect of zinc complexes HSV-I ocular infection // X* Congr. of virology (Jerusalim, Israel, 11-12 August, 1996).-P. 151.
7. Shishkov S. et all. Role of the ligand in expression of antigerpes virus activity of Zn (II) and Co (II) // IX* Congr. of virology (Glasgow, Scotland, 8-13 August, 1993).- P. 205.

N. Prydaus, A. Kharina, V. Polyschuck

EFFECT OF COPPER, CADMIUM AND NICKEL HETEROMETALLIC COMPLEXES ON T4 BACTERIOPHAGE

Effect of copper, cadmium and nikel heterometallic complexes on infections properties and morfology of viruses have been studied in mode system T4 bacteriophage E. coli. A decrease of infections litre of virus under influence of complex $[Cu(En)_2CdClf]MF$, $[CuNiCl(H_2L)J$ has been demonstrated. An impact of heterometallic complexes on the morfology T4 virions has been studied using atomicforce and electronic microscopy.