

УДК 578.4

*Харіна А. В., Будзанівська І. Г., Поліщук В. П.*

## **ВПЛИВ ГЕТЕРОАНІОННИХ КООРДИНАЦІЙНИХ СПОЛУК МІДІ ТА КОБАЛЬТУ НА БАКТЕРІОФАГ Т4**

*На модельній системі бактеріофаг Т4 - бактерія E.coli вивчався вплив гетерометальних комплексів на інфекційні властивості вірусів in vitro. Показана антифагова дія препарату № 88 у концентрації 1 %. Методом ІФА виявлено, що сполука № 66 впливає на антигенні детермінанти бактеріофага Т4.*

©Харіна А. В., Будзанівська І. Г., Поліщук В. П., 2002

## Вступ

Дослідження антивірусних властивостей нових синтетичних сполук є основою для створення нових антивірусних препаратів. Постійне поповнення баз даних новою інформацією дає можливість коригувати закономірність взаємозв'язку структура-активність. Цінність такої інформації зростає зі збільшенням кількості досліджених сполук. У цілому багаторічний скринінг сотень тисяч хімічних сполук показав, що антивірусні властивості має незначна їх кількість. Насамперед це аномальні нуклеозиди, похідні адамантану, синтетичні амінокислоти, аналоги пірофосфату, тіосемікарбозони. До цього списку необхідно додати також деякі препарати, які мають пряму віруліцидну дію на віріони, що знаходяться поза клітинами.

Метою нашої роботи було вивчення антибактеріофагової дії координаційних сполук міді та кобальту, синтезованих на кафедрі неорганічної хімії КНУ ім. Т. Шевченка. Оскільки попередніми дослідженнями було встановлено високу інактивуючу здатність сполук № 66 та № 380 [4], було вирішено продовжувати вивчення антифагової активності сполук цього ряду.

## Матеріали і методи

Гетерометалні комплекси № 66  $\text{CuNiBr}(\text{Ea})^3\text{Hea}$  (Hea - моноетаноламін); № 88  $\text{CuNiBr}(\text{Me}^2\text{Ea})^3$ ; № 72  $\text{CuNiCl}^4\text{En}^4$ ; № 283  $[\text{Cu}^2\text{Co}(\text{Dea})^2(\text{H}^2\text{Dea})^4]\text{I}$  ( $\text{H}^2\text{Dea}$  - діетаноламін); № 379  $[\text{Cu}^2\text{Co}(\text{Dea})^2(\text{H}^2\text{Dea})^4]\text{X}$   $\times \text{Br}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{CH}_2\text{OH}$  одержано прямим синтезом [3] на кафедрі неорганічної хімії Київського національного університету ім. Т. Шевченка.

У роботі використовували бактеріофаг Т4Д і культура чутливих до нього клітин *Esherichia coli B*, люб'язно надані Ф. І. Товкачем (Інститут мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ).

**Виділення та накопичення бактеріофага Т4.** Для виділення бактеріофага Т4 накопичували компетентну культуру *E. coli B* у колбі (100 мл), де поживним середовищем були амінопептид з фізіологічним розчином (1 : 1), в яке додавали глюкозу до кінцевої концентрації 5 %. «Нічну культуру» бактерії залишали на шутелі в термостаті при 37 °С протягом 4 годин у 100 мл середовища, доводили розчин до 500 мл і знову залишали на шутелі в термостаті при 37 °С упродовж 3 годин. При концентрації компетентних клітин, яка досягала  $10^8$  кл./мл (перевіряли за стандартом каламутності) додавали 25 мкл фага і залишали на ніч у термостаті при 37 °С (на шутелі).

Суспензію центрифугували при 3000 об./хв (20 хв) на центрифугу РС-6. Ультрацентрифугу-

вання проводили на центрифугу «Весктап» упродовж 60 хв при 20 000 об./хв (ротор SV-60).

У подальшому використовували метод центрифугування в градієнті щільності сахарози 20-30-40-50 % протягом 60 хв при 20 000 об./хв (ротор SV-60). Бактеріофаг збирали в нижній частині пробірки. Осад ресуспендували у ФБР рН-7,4.

**Визначення інфекційного титру бактеріофага.** Для визначення інфекційного титру проводили титрування фага методом агарових шарів (за Грація) [2].

**Обробка препарату бактеріофага Т4 комплексними сполуками.** Для дослідження дії комплексних сполук на інфекційність бактеріофага Т4 готували 1- 0,1- та 0,01%-ні розчини: брали 1 мл розчину сполуки і додавали 20 мкл фага, інкубували упродовж 1 год при кімнатній температурі.

**Імуноферментний аналіз.** Для вивчення впливу координаційних сполук на антигенні детермінанти бактеріофага Т4 спочатку була отримана кроляча поліклональна сироватка. Імунізацію проводили в три етапи з інтервалом у 21 день. При першій імунізації антиген вводили підшкірно в чотири точки під кінцівками в кількості 250 мкг білка в 750 мкг фізрозчину з 1000 мкг повного ад'юванта Фрейнда. Другу імунізацію проводили внутрішньом'язово в чотири точки (300 мкг антигена з 700 мг фізіологічного розчину). Третю імунізацію: 1000 мкг бактеріофага вводили внутрішньовенно (крайова вужна вена).

ІФА застосовували в модифікації непрямого пляшкового ELISA на полістиролових планшетах (фірми Lab System) за загальноприйнятою методикою [5].

**Статистична обробка отриманих результатів** здійснювалась за допомогою комп'ютерної системи управління базами даних MS EXCEL 2000. Середнє арифметичне та середню квадратичну похибку обчислювали за формулами:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}, \text{ де } \bar{X} - \text{середнє арифметичне;}$$

$$m = \frac{\delta}{\sqrt{n}}; \text{ де } \delta = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}; m - \text{середня квадратична похибка.}$$

Антифагову активність виражали в % інактивації, яку вираховували за формулою:  $A = (1 - N/N^k) \cdot 100 \%$ , де  $N^0$  - кількість негативних колоній у досліді,  $N^k$  - кількість негативних колоній у контролі [1].

**Результати та їх обговорення.** Була проведена статистична обробка даних дослідження координаційних сполук № 88, № 72, № 283,

Таблиця 1. Вплив комплексної сполуки № 88 на інфекційність бактеріофага Т4

Розведення вірусу	Контроль	1%	0,1%	0,01 %
$1 \times 10^{-10}$	0	0	0	0
$1 \times 10^{-9}$	11,33 ± 1,67	0	16 ± 0,71	16,33 ± 1,08
$1 \times 10^{-8}$	116,67 ± 4,08	78,0 ± 2,45	111,67 ± 2,04	113,3 ± 2,04

№ 379 на інфекційний титр бактеріофага Т4. Показано, що сполука № 88 в 1 %-й концентрації інактивує бактеріофаг Т4 на 33 %; 0,1 %-та 0,01 %-не розведення не проявили антифагової активності (табл. 1). Сполуки № 72, № 283, № 379 не впливали на інфекційний титр бактеріофага Т4.

Попередніми дослідженнями встановлено, що при обробці бактеріофага Т4 сполукою № 66 остання адсорбується на поверхні вірусу і сприяє значній агрегації часточок, що, можливо, і призводить до утворення неінфекційних комплексів. Втрата інфекційності бактеріофагом Т4 не супроводжується порушенням структури віріону.

Можливо, при утворенні неінфекційних комплексів сполука блокує білкові групи бактеріофага Т4, які відіграють важливу роль у процесі інфікування бактеріальної клітини. Слід зауважити, що поряд з утворенням неінфекційних конгломератів бактеріофага Т4 спостерігається порушення серологічних властивостей цього вірусу, що було показано за допомогою методу ІФА. Сполука № 66 впливає на антигенні детермінанти бактеріофага Т4, що проявляється в значному зниженні показника оптичної густини в порівнянні з контролем (рис. 1). У даному випадку можна припустити, що сполука № 66 маскує рецепторні ділянки бактеріофага, внаслідок чого погіршується процес прикріплення віріонів до клітини і, як наслідок, знижується інфекційність вірусу.

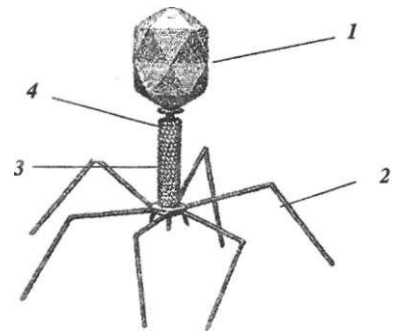


Рис. 2. Можливі мішені бактеріофага Т4, на які діють гетероіонні сполуки:

1 - головка (деградація ДНК); 2 - хвостові фібрили (маскування рецепторних ділянок, фіксування в положенні «up»); 3 - базальна пластинка (маскування рецепторних ділянок, блокування процесу зміни конформації); 4 - хвостовий відросток (склеювання субодиниць, що унеможливує процес скорочення чохла)

Необхідно відмітити, що можливе поєднання декількох названих вище механізмів інактивації бактеріофага Т4. Можливі мішені для дії гетероіонних сполук проілюстровано на рис. 2.

Аналіз хімічного складу активних сполук показав, що всі вони містять Cu, Vg та Ea. Слід зауважити, що серед усіх досліджених сполук (за винятком сполуки № 379, яка є подвійною сіллю) лише у комплексах № 66, № 380 та № 88 міститься Vg. Тому, найвірогідніше, антивірусний ефект даних речовин пов'язаний з присутністю в їх структурі іонів Vg. Серед цих антивірусних речовин проміжне місце як за складом, так і за активністю посідає речовина № 66, що, як і № 88, містить Ni (сполука № 380 замість Ni містить Co). Подібність сполук № 66 і № 380 полягає в тому, що у своєму складі вони містять Nea, і, можливо, з цим компонентом й пов'язаний більш ефективний вплив даних сполук на інфекційний титр коліфага Т4 у порівнянні з речовиною № 88. Оптимальна комбінація Cu, Vg, Ea, Tea та Co сполуки № 380 [4] і зумовлює її сильний вплив на вірулентність бактеріофага Т4.

Майже півстолітня історія створення антивірусних препаратів пов'язана із скринінгом сотень тисяч природних та синтетичних високо- та низькомолекулярних сполук. Активність цих сполук вивчається спочатку на більш зручних модельних об'єктах, потім ідуть трудомісткі експериментальні та доклінічні дослідження і, нарешті, клінічна апробація відібраних препаратів. Отримані останніми роками результати свідчать про появу нових поколінь антивірусних препаратів, які, можливо, в недалекому майбутньому застосовуватимуться проти неконтрольованих вірусних інфекцій тварин та рослин.

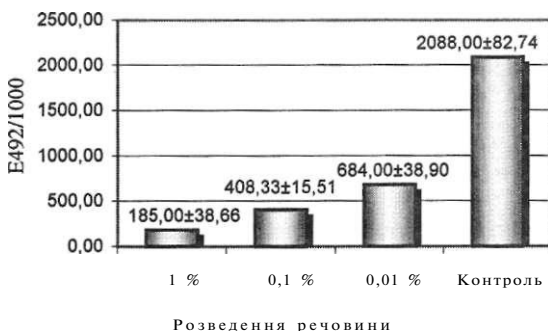


Рис. 1. Вплив сполуки № 66 на антигенні детермінанти бактеріофага Т4

1. Клименко С. К., Столбова Т. В., Куликова Л. К Синтез, противомикробная и антифаговая активность сульфониевых и оксисульфониевых солей конденсированных тианов и тианоциклогексана//Хим.-фарм. журн,-2001.-Т. 35.-№ 1.-С. 22-24.
2. Практикум по общей вирусологии / Под ред. И. Г. Атабекова - М: Изд-во Моск. ун-та, 1981- 192 с.
3. Прямой синтез координационных соединений / Под ред акад. В. В. Скопенко. Монография.-К.: Вентури, 1997 - 176 с.
4. Рижкова А. Є., Поліщук В. Д, Будзанівська І. Г. та ін. Антивірусна дія різнометальних комплексів міді та кобальту з аміноспиртами, одержаних прямим синтезом в умовах in vitro // Бюл. ін-ту с.-г. мікробіології - 2000 - № 7 - С. 38-39.
5. Crowther J. R. ELISA.Theory and practice.- N. Y.: Humana Press, 1995- P. 38-39.

*A. V. Kharina, V. P. Polyschuck, I. G. Budzanivska*

## **AN IMPACT OF HETEROANION COORDINATION COMPLEX OF COPPER AND COBALT ON PHAGE T4**

*Effect of heteroanion complexes on in vitro virus inhibition was studied on the bacteriophage T4 — E coli B model system. Antiphagal effect of preparation № 88 in concentration 1 % was shown. The results of ELISA make possible a supposition of an impact compound № 66 on bacteriophage T4 antigen determinants.*