



Тваринництво, ветеринарна медицина

УДК 544.02:631

© 2020

ПРОТИВІРУСНІ ВЛАСТИВОСТІ НАНОЧАСТИНОК ТИТАНУ

С.В. Дерев'янка¹, А.В. Васильченко²

¹кандидат біологічних наук

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна

e-mail: ¹biopreparat@i.ua, ²top.leader.number.1@gmail.com

ORCID: ¹0000-0002-9409-2473, ²0000-0003-2263-8702

Надійшла 3.06.2020

Мета. Вивчити антивірусні властивості наночастинок (НЧ) титану (Ti) на репродукцію вірусів рослин і тварин. **Методи.** Аналіз літературних джерел, вірусологічні, серологічні, інструментальні та статистичні. **Результати.** Установлено, що досліджувані препарати містять НЧ Ti сферичної форми розмірами від 2 до 81 нм. Проведено дослід з визначення антивірусної активності НЧ Ti щодо штаму *Teschovirus A* першого серотипу (PTV-1) Дніпровський-34 та некротичного штаму *Potato virus Y* (PVY) МЛ-1 за профілактичною, лікувальною та віруліцидною схемами. У перещеплюваній культурі клітин нирки ембріона свині (СНЕВ) установлено, що НЧ Ti виявляють незначну антивірусну активність, знижуючи титр вірусу за обома схемами лише на 0,50 Ig ТЦД₅₀/см³. Проте за віруліцидною схемою встановлено, що НЧ Ti за експозиції 24 год у максимально допустимій концентрації, яка для культури СНЕВ становить 12,5 мкг/см³, виявили високу віруліцидну активність щодо штаму вірусу PTV-1 Дніпровський-34, достовірно знижуючи його інфекційний титр у культурі клітин СНЕВ на 4,46 Ig ТЦД₅₀/см³. Установлено, що за профілактичною і лікувальною схемами НЧ Ti антивірусної активності до PVY не мають. У результаті досліджень антивірусної активності НЧ Ti за віруліцидною схемою на рослинах тютюну виявлено, що НЧ Ti мають високу антивірусну активність щодо PVY. **Висновки.** Установлено, що НЧ Ti мають високу антивірусну активність щодо штаму *Teschovirus A* першого серотипу Дніпровський-34 та некротичного штаму PVY МЛ-1, який належить до роду *Potyvirus* родини *Potyviridae*. Отримані результати переконливо свідчать про перспективність розробки ефективних антивірусних нанопрепаратів і потребу всебічного вивчення впливу НЧ Ti не тільки на збудників хвороб, а й на організм тварин та сільськогосподарські культури.

Ключові слова: наночастинок Ti, *Teschovirus A*, *Potato virus Y*, антивірусна активність, електронно-мікроскопічні дослідження.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202008-06>

Пошук речовин з антивірусною активністю та розробка на їх основі нових противірусних препаратів і дезінфекційних засобів є одним із пріоритетних напрямів досліджень сучасної вірусології. Застосування біогених металів у вигляді наночастинок (НЧ) відкриває перед людством перспективи створення нових ефективних противірусних препаратів [1, 2].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Серед наноматеріалів титану найбільшу увагу вчені приділяють вивченню антивірусної активності НЧ діоксиду титану (TiO_2). Вивчено механізм антивірусної активності наноколоїдів (НК) TiO_2 щодо вірусу хвороби Ньюкасла [3]. Установлено, що НК TiO_2 ушкоджують ліпіди оболонки вірусу завдяки реакції G-Sol [4], а також ушкоджують глікопротеїнові шипики. Це унеможливорює зв'язування вірусних частинок з чутливими клітинами та зумовлює втрату вірусом інфекційності [3]. За таким самим механізмом НК Ag/TiO_2 інактивують віруси *Porcine epidemic diarrhea virus* та *Transmissible gastroenteritis coronavirus* [4].

Визначено, що НЧ TiO_2 розміром 4–10 нм мають віруліцидну дію щодо вірусу грипу H_3N_2 . Дані електронної мікроскопії свідчать, що НЧ TiO_2 руйнують віруси протягом 30 хв інкубації. Автори зробили припущення, що противірусна дія наноматеріалу пояснюється прямим контактом НЧ із вірусом, що й призводить до подальшого руйнування капсиду [5].

Установлено, також, що НЧ TiO_2 мають антивірусну активність не тільки проти вірусів людини і тварин, а й проти вірусів рослин, наприклад щодо *Broad bean stain virus*. Припускають, що, найімовірніше, НЧ TiO_2 блокують взаємодію вірусу з чутливими клітинами та індують резистентність рослин до вірусу [6].

Проте вплив НЧ TiO_2 на інші віруси рослин і тварин вивчено вкрай недостатньо. Таким чином, вивчення антивірусних властивостей НЧ Ti щодо репродукції пікорнавірусів та потівірусів є актуальним і має велике наукове та практичне значення.

Мета досліджень — вивчити антивірусні властивості НЧ Ti на репродукцію вірусів рослин і тварин.

Матеріали і методи досліджень. У досліджах використано штам Дніпровський-34,

який належить до роду *Teschovirus*, виду *Teschovirus A* першого серотипу (PTV-1) та некротичний штам *Potato virus Y* (PVY), МЛ-1, який належить до роду *Potyvirus* родини *Potyviridae* з колекції вірусів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (ІСМАВ НААН).

Стабілізовані цитрат-аніонами НЧ Ti одержано від доктора технічних наук В.Г. Каплуненка (ТОВ «Наноматеріали і нанотехнології»). Досліджувані НЧ було отримано методом абляції [7].

У досліджах використано перещеплювану культуру клітин нирки ембріона свині (СНЕВ), одержану з ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», та рослини тютюну (*Nicotiana tabacum* L.).

Перед використанням водну суспензію НЧ розводили до концентрацій 125 і 25 мкг/см³ та доводили значення рН до нейтрального. Потім суспензії автоклаували за тиску 0,6 атм упродовж 20 хв. Перед використанням приготовані суспензії наночастинок вносили у живильні середовища та буферні розчини до необхідної концентрації.

Антивірусну активність НЧ Ti стосовно досліджуваних вірусів визначали за профілактичною, лікувальною і віруліцидною схемами.

За профілактичною схемою проводили обробку культури клітин або рослини тютюну суспензією НЧ Ti у концентрації 12,5 мкг/см³. Після експозиції впродовж 24 год проводили інокуляцію рослин вірусами.

За лікувальною схемою культуру клітин СНЕВ або здорові рослини тютюну заражали вірусами, після чого обробляли НЧ Ti у концентрації 12,5 мкг/см³.

За віруліцидною схемою вірусовмісну суспензію та НЧ Ti змішували у співвідношенні 1:1 та витримували впродовж 24 год за температури 4°C, після чого інокулянт вносили у культуру клітин або інокулювали рослини.

Освіження, підтримання та накопичення штаму Дніпровський-34 проводили в культурі клітин СНЕВ за використання загальноприйнятих методик [8]. Титр вірусу розраховували за методом Ріда і Менча [9]. Наночастинок використовували у максимальній допустимій концентрації (МДК), яка для культури клітин СНЕВ становить

12,5 мкг/см³ [10]. За різницею титрів визначали антивірусну активність НЧ Тi. У разі зниження титру вірусу за дії НЧ на 2,0 lg 50 % тканинних цитопатичних доз (ТЦД₅₀/см³) і більше було визначено хіміотерапевтичний індекс (ХТІ). Для цього визначали мінімально активну концентрацію (МАК), тобто таку, що знижує інфекційний титр вірусу на 1,25–1,5 lg ТЦД₅₀ порівняно з титром вірусу на контролі. ХТІ визначали як співвідношення МДК і МАК.

Порівнюючи інфекційну активність штамів вірусів, застосовували 2-вибірковий метод Ст'юдента, за яким і визначали достовірність різниці між двома порівнюваними показниками. Розрахунок значення *t* порівнювали з таблицею Ст'юдента [11] і визначали достовірність. Розрахунок проводили в програмі Microsoft Office Excel.

Антивірусну активність НЧ Тi щодо PVY вивчали у вегетаційному досліді. Рослини тютюну заражали у фазі 3–4-х справжніх листків методом механічної інокуляції з попереднім опудрюванням карборундом (500–600 меш).

Інокулюм готували з листків уражених рослин картоплі з додаванням буферного розчину в пропорції 1:1–1:3. Використовували фосфатний буфер із рН 7,2–7,5 і молярністю 0,01 М. Після інокуляції поверхню листків промивали дистильованою водою. Як контроль за механічного зараження рослин використовували інокуляцію дистильованою водою. Рослини вирощували в умовах вегетаційних приміщень за температури 20–25°C і фотоперіоду 16 год.

Оцінку ступеня ураженості рослин PVY проводили візуально за зовнішніми симптомами, електронно-мікроскопічними та серологічними методами. Для проведення серологічних аналізів використовували антисироватки, одержані у лабораторії вірусології ІСМАВ НААН.

Електронно-мікроскопічні дослідження проводили на електронному мікроскопі JEOL JEM-1400 (Японія) в Інституті мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН. Мікроскопію здійснювали на сіточках із формваровою плівкою. Проби контрастували в 1%-му розчині ацетату урану впродовж 30 с.

Результати досліджень та їх обговорення. У результаті електронно-мікроскопічних досліджень установлено, що препарат Тi містить сферичні НЧ з розмірами від 2 до 81 нм, що перебувають як у вільному стані, так і у складі агрегатів (рис. 1).

У культурі клітин СНЕВ проведено досліді з визначення антивірусної активності НЧ Тi за профілактичною та лікувальною схемами. Установлено, що НЧ Тi виявляли незначну антивірусну активність, знижуючи титр вірусу за обома схемами лише на 0,50 lg ТЦД₅₀/см³.

Вивчено віруліцидну активність НЧ Тi. Установлено, що НЧ Тi за експозиції 24 год у максимально допустимій концентрації виявляли високу віруліцидну активність стосовно штаму вірусу РТВ-1 Дніпровський-34, достовірно знижуючи його інфекційний титр у культурі клітин СНЕВ на 4,46 lg ТЦД₅₀/см³.

Досліджено віруліцидну активність НЧ Тi в максимально допустимій концентрації щодо штаму РТВ-1 Дніпровський-34 залежно від експозиції часу. Установлено, що віруліцидну активність НЧ Тi виявляють уже з першої години і з часом вона зростає (табл. 1). Це може бути спричинено зв'язуванням НЧ з білками вірусних капсидів. Відомо, що НЧ срібла зв'язуються з глікопротеїновими шипиками вірусних частинок вірусу ВІЛ-1 [12]. Однак, на відміну від ВІЛ-1, пікорнавіруси є безоболонковими, є підстави вважати, що НЧ Тi можуть зв'язуватися з білками капсидів віріонів пікорнавірусів так само, як інші НЧ зв'язуються з глікопротеїнами оболонкових вірусів. Так, відомо, що НЧ срібла виявляють

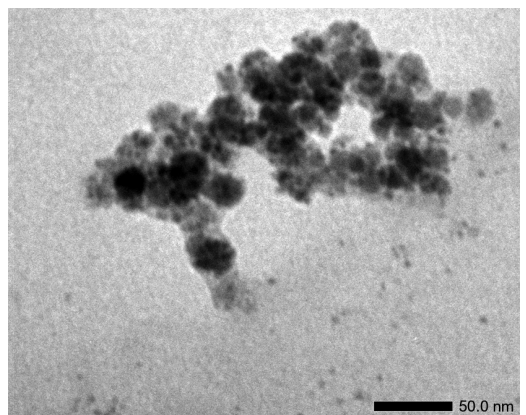


Рис. 1. Електронна мікрофотографія зразка НЧ Тi

сильну взаємодію з тіоловою групою залишків цистеїну у білках [12]. Отже, якщо молекула білка містить принаймні один залишок цистеїну, НЧ будуть активно зв'язуватися з нею. В основі такого зв'язування може бути дія локальних полів [13], яка може зумовлювати взаємодію з вірусними частинками не тільки НЧ срібла, а й НЧ інших металів та їхніх оксидів. Серед інших механізмів віруліцидної активності НЧ Ті та інших металів — генерація активних форм кисню [3, 14, 15], реакція G-Sol [4] та ін.

На наступному етапі визначили МАК і ХТІ для НЧ Ті (табл. 2). Установлено, що НЧ Ті впродовж 24 год за МДК знижували титр вірусу на 4,46 lg ТЦД₅₀/см³. За концентрації 0,125 мкг/см³ зниження титру вірусу становило 1,23 lg ТЦД₅₀/см³. Саме цю концентрацію ми вважатимемо мінімально активною. Отже, ХТІ для НЧ Ті становить 10.

Отже, НЧ Ті мають високу антивірусну активність стосовно TV-A і можуть бути рекомендовані для створення на їх основі антивірусних препаратів, віруліцидних та дезінфекційних засобів.

Вивчено антивірусну активність НЧ Ті проти штаму PVY МЛ-1 на рослинах тютюну за профілактичною та лікувальною схемами. Установлено, що як за профілактичною, так і за лікувальною схемами НЧ Ті антивірусну активність щодо PVY не виявляють.

У результаті досліджень антивірусної активності НЧ Ті за віруліцидною схемою виявлено, що НЧ Ті мають високу антивірусну активність (рис. 2).

Дослідні рослини впродовж 28-ми діб не виявляли ознак вірусної інфекції та залишалися здоровими (див. рис. 2, а), як і рослини у негативному контролі (див. рис. 2, б). За результатами серологічних та

1. Віруліцидна активність НЧ Ті в максимально допустимій концентрації щодо штаму PTV-1 Дніпровський-34 у культурі клітин СНЕВ залежно від експозиції

Експозиція, год	НЧ	Титр вірусу, lg ТЦД ₅₀ /см ³	Різниця титрів вірусу, lg ТЦД ₅₀ /см ³
1	Ті	3,67±0,11	2,56*
	Контроль	6,23±0,12	—
3	Ті	3,23±0,10	3,00*
	Контроль	6,23±0,12	—
12	Ті	2,77±0,10	3,46*
	Контроль	6,23±0,12	—
24	Ті	1,77±0,12	4,46*
	Контроль	6,23±0,12	—

*За результатами t-тесту Ст'юдента різниця між титрами вірусу у контрольному та дослідному варіантах є статистично значущою з рівнем значущості P<0,05 (для табл. 1 і 2).

2. Віруліцидна активність наночастинок щодо штаму PTV-1 Дніпровський-34 у культурі клітин СНЕВ за різної концентрації (експозиція 24 год)

Речовина	Концентрація НЧ, мкг/см ³	Титр вірусу, lg ТЦД ₅₀ /см ³	Різниця титрів вірусу, lg ТЦД ₅₀ /см ³	ХТІ
Ті	12,5	1,77±0,12	4,46*	10
	1,25	2,23±0,14	4,00*	
	0,5	2,77±0,12	3,46*	
	0,25	3,50±0,18	2,73*	
	0,125	5,00±0,14	1,23*	
	0,062	6,50±0,12	0,73*	
Контроль	—	6,23±0,12	—	—

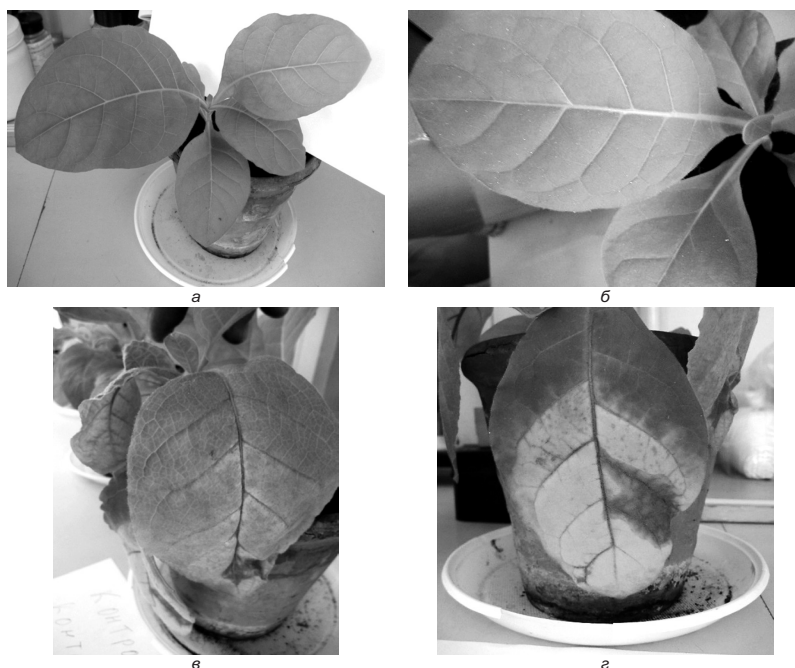


Рис. 2. Антивірусна активність НЧ Ті щодо PVY на рослинах тютюну: а — дослідні рослини без симптомів; б — негативний контроль; в, г — симптоми ураження рослини PVY (позитивний контроль)

електронно-мікроскопічних досліджень, PVY у цих рослинах як і симптомів їх захворювання не виявлено.

Зараження контрольних рослин тютюну штамом PVY МЛ-1 спричиняло з'явлення симптомів некротичної інфекції (рис. 2, в, г). На початку ураження спостерігали посвітління жилок, слабку мозаїку на верхніх листках (рис. 2, в). Надалі виявляли некроз і деформацію листкових пластинок та жилок листків, що характерно для некротичних штамів PVY

(рис. 2, г). Наявність PVY у цих рослинах підтверджено серологічними й електронно-мікроскопічними методами досліджень.

Отже, НЧ Ті інактивують PVY у реакційній суміші в умовах *in vitro* за віруліцидною схемою дослідів. Білок *Coat protein*, що утворює капсид PVY, містить залишок цистеїну, з яким можуть зв'язуватися НЧ. Інші можливі механізми віруліцидної активності — такі самі як у випадку з TV-A: дія локальних полів, генерація активних форм кисню, реакція G-sol та інші.

Висновки

Установлено, що наночастинок Ті мають високу антивірусну активність щодо штаму *Teschovirus A* першого серотипу Дніпровський-34 та некротичного штаму *Potato virus Y* МЛ-1, який належить до роду *Potyvirus* родини *Potyviridae*. Отримані

результати переконливо свідчать про перспективність розробки ефективних антивірусних нанопрепаратів і потребу всебічного вивчення впливу наночастинок Ті не тільки на збудників хвороб, а й на організм тварин і сільськогосподарські культури.

Derevianko S.¹, Vasylichenko A.²

Institute of Agricultural Microbiology and Agro-industrial Production of NAAS, 97 Shevchenko Str.,

Chernihiv, 14027, Ukraine; e-mail: 1biopreparat@i.ua,

2top.leader.number.1@gmail.com; ORCID: ¹0000-0002-9409-2473, ²0000-0003-2263-8702

Anti-virus properties of titanium nano-particles

Goal. To study the influence of antiviral properties of titanium (Ti) nano-particles (NP) on the reproduction of plant and animal viruses. **Methods.** Analysis of literature sources, virological, serological, instrumental, and statistical. **Results.** It was found that the studied preparations contain spherical TiNP with sizes from 2 to 81 nm. Experiments were performed to determine the antiviral activity of TiNP against the strain *Teschovirus A* of the first serotype (PTV1) Dniprovskiy 34, and the necrotic strain Potato virus Y (PVY) ML1 by prophylactic, therapeutic, and virucidal schemes. In the transplanted culture of swine embryonic kidney cells (SEKC), it was found that TiNP showed little antiviral activity, reducing the virus titer in both schemes by only 0.50 lg TCD₅₀/cm³. However, according to the virucidal scheme, it was found that TiNP at 24 h exposure at the maximum allowable concentration (for SEKC culture — 12.5 µg/cm³) showed high virucidal

activity against virus strain PTV1 Dniprovskiy 34, significantly reducing its infectious titer in SEKC cell culture by 4.46 lg TCD₅₀/cm³. It was found that TiNP does not have the antiviral activity to PVY in prophylactic and treatment regimens. As a result of the study of the antiviral activity of TiNP according to the virucidal scheme on tobacco plants, it was found that TiNP has high antiviral activity against PVY. **Conclusions.** TiNP were found to have high antiviral activity against *Teschovirus A* strain of the first serotype of Dniprovskiy 34, and necrotic strain of PVY ML1, which belongs to the genus *Potyvirus* of the *Potyviridae* family. The obtained results convincingly testify to the prospects of development of effective antiviral nano-preparations and the need for a comprehensive study of the effect of TiNP not only on pathogens but also on the body of animals and crops.

Key words: *Ti nano-particles, Teschovirus A, Potato virus Y, antiviral activity, electron microscopic studies.*
DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202008-06>

Бібліографія

1. Galdiero S., Falanga A., Vitiello M. et al. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules*. 2011. V. 16. Is. 10. P. 8894–8918. doi: 10.3390/molecules16108894
2. Rogers J.V., Parkinson Ch.V., Choi Y.W. et al. A preliminary assessment of silver nanoparticles inhibition of monkeypox virus plaque formation. *Nanoscale Res. Lett.* 2008. Is. 3. P. 129–133. doi: 10.1007/s11671-008-9128-2
3. Akhtar S., Shahzad K., Mushtaq S. et al. Antibacterial and antiviral potential of colloidal Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles suitable for biological applications. *Materials Research Express*. 2019. V. 6. Is. 10. Id. 105409. doi: 10.1088/2053-1591/ab3b27
4. Jong-Pyo Kim, Il-Hoon Cho, In-Tae Kim et al. Manufacturing of antiviral inorganic materials from colloidal silver and titanium oxide. *Revue Roumaine De Chimie*. 2006 V. 51. Is. 11. P. 1121–1129.
5. Mazurkova N.A., Spitsyna Yu.E., Shikina N.V. et al. Interaction of titanium dioxide nanoparticles with influenza virus. *Nanotechnol. in Russia*. 2010. Is. 5. P. 417–420. doi:10.1134/s1995078010050174
6. Elsharkaway M., Derbalah A. Antiviral activity of titanium dioxide nanostructures as a control strategy for broad bean strain virus in faba bean. *Pest management science*. 2019. V. 75. Is. 3. P. 828–834. doi: 10.1002/ps.5185
7. Пат. № 23550 України, МПК B22F 9/14. Спосіб ерозійно-вибухового диспергування металів. М.В. Косінов, В.Г. Каплуненко, заявл. 09.02.2007; опубл. 25.05.2007, бюл. № 7.
8. Дерев'янюк С.В., Бова Т.О., Сорока В.І. та ін. Методичні рекомендації з вірусологічного моніторингу ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней. Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, Чернігів: ЧДЦНІ. 2014. 18 с.
9. Reed L.J., Hugo Muench. A simple method of estimation of fifty per cent endpoints. *The American J. of Hygiene*. 1938. V. 27. Is. 3. P. 493–497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
10. Дерев'янюк С.В., Решотько Л.М., Дмитрук О.О., Васильченко А.В. Визначення токсичності металовмісних наночастинок в культурі клітин та на білих мишах. *Агроекологічний журнал*. 2019. № 2. С. 91–95. doi: 10.33730/2077-4893.2.2019.174076
11. Student. By Student. The probable error of a mean. *Biometrika*. 1908. V. 6. Is. 1. P. 1–25. doi: 10.2307/2331554
12. Elechiguerra J.L., Burt J.L., Morones J.R. et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. of nanobiotechnology*. 2005. V. 3. Is. 1. P. 1–10. doi: 10.1186/1477-3155-3-6
13. Lozovski V., Lysenko V.S., Piatnytsia V. et al. Physical point of view for antiviral effect caused by the interaction between the viruses and nanoparticles. *J. of Bionanoscience*. 2012. V. 6. Is. 2. P. 109–112. doi: 10.1166/jbns.2012.1084
14. Ma H., Brennan A., Diamond A.S. Photocatalytic reactive oxygen species production and phototoxicity of titanium dioxide nanoparticles are dependent on the solar ultraviolet radiation spectrum. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2012. V. 31. Is. 9. P. 2099–2107. doi: 10.1002/etc.1916
15. Hyun Jik Kim, Chang Hoon Kim, Ji Hwan Ryu et al. Reactive oxygen species induce antiviral innate immune response through IFN-λ regulation in human nasal epithelial cells. *American j. of respiratory cell and molecular biology*. 2013. V. 49. Is. 5. P. 855–865. doi: 10.1165/rcmb.2013-0003OC