

## БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ КОМПОЗИЦІЙ НАНОЧАСТИНОК НЕМЕТАЛІВ

С.В. Дерев'яно, А.В. Васильченко, Г.В. Цехмістер

*Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН*

*Досліджено біологічну активність композицій наночастинок (НЧ) неметалів S та I, Se та I. Встановлено, що композиція НЧ S та I проявляє високу віруліцидну активність щодо штаму РТВ-1 Дніпровський-34, знижуючи титр вірусу на  $5,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , і має хіміотерапевтичний індекс 8. Композиція НЧ Se та I володіє високою фунгістатичною активністю щодо штаму *A. cucurbitacearum* 502 упродовж усього терміну культивування. Зменшення діаметрів колоній за дії композиція НЧ Se та I сягає 94,13%. За результатами досліджень композицію НЧ S та I можна рекомендувати для створення на її основі антивірусних препаратів, віруліцидних та дезінфікувальних засобів, а композицію НЧ Se та I — для розробки засобів захисту сільськогосподарських рослин від грибних хвороб.*

**Ключові слова:** композиції наночастинок S та I, Se та I, *Teschovirus A*, *Acremonium cucurbitacearum*, віруліцидна активність, фунгістатична активність.

---

Сучасні наукові досягнення у галузі нанотехнологій відкривають широкі перспективи для виробництва та використання наночастинок неметалів у ветеринарній медицині та сільському господарстві. Відомо, що наночастинок металів у формі оксидів та гідроксидів можуть впливати на репродуктивну активність вірусів [1, 2]. Проте антивірусну активність наночастинок (НЧ) неметалів та їх композицій вивчено недостатньо.

Значна увага приділяється вивченню впливу НЧ металів на гриби. Зокрема продемонстровано, що НЧ міді мають широкий спектр фунгіцидної активності, впливають на фітопатогенні гриби родів *Phoma*, *Curvularia*, *Alternaria* та *Fusarium* [3]. Виявлено високу фунгіцидну активність НЧ срібла відносно представників родів *Candida*, *Saccharomyces*, *Bipolaris*, *Magnaporthe*, *Monosporascus* та ін. [4].

Однак фунгістатична активність композицій НЧ неметалів потребує ґрунтовних досліджень.

Тому метою нашої роботи було вивчити біологічну активність композицій НЧ S та I, Se та I щодо патогенних вірусів та грибів, збудників хвороб сільськогосподарських тварин та рослин.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У досліджах використовували штам Дніпровський-34, який належить до роду *Teschovirus*, виду *Teschovirus A* першого серотипу (РТВ-1) з колекції вірусів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН та штам гриба *Acremonium cucurbitacearum* 502 роду *Acremonium*, наданий д-м біол. наук Є.П. Копиловим.

Колоїдні розчини стабілізованих цитрат-аніонами композицій НЧ S та I, Se та I, які були отримані методом абляції, були одержані з ТОВ «Наноматеріали і нанотехнології» від д-ра техн. наук В.Г. Каплуненка [5].

Перещеплювану культуру клітин нирки ембріону свині (СНЄВ) одержано з НМЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН.

Перед використанням водні суспензії композицій НЧ S та I, Se та I розбавляли до потрібної концентрації та доводили значення рН до нейтрального. Суспензії стерилізували автоклавуванням.

Освіження, підтримання та накопичення штаму Дніпровський-34 проводили в культурі клітин СНЕВ на основі загальноприйнятих методик. Титрування вірусів за дії НЧ здійснювали в перещеплюваній культурі клітин у пробірках, спостерігаючи за цитопатичним ефектом (ЦПЕ) та визначаючи 50%-у тканинну цитопатичну дозу (ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>).

Антивірусну активність композицій НЧ S та I, Se та I визначали за профілактичною, лікувальною та віруліцидною схемою. За профілактичною схемою проводили обробку культури клітин композицією НЧ S та I, Se та I максимально допустимою концентрацією (МДК). Після експозиції впродовж 24 год здійснювали інокуляцію вірусом.

За лікувальною схемою культуру клітин СНЕВ заражали вірусами, після чого обробляли МДК композиції НЧ S та I, Se та I.

За віруліцидною схемою вірусовмісну суспензію та композиції НЧ S та I, Se та I змішували у співвідношенні 1:1 та витримували впродовж 24 год при температурі +4°C, після чого інокулянт вносили у культуру клітин. Облік результатів цитопатичної дії (ЦПД) проводили на 4-у та 7-у добу. Титр вірусу розраховували методом Ріда і Менча [6]. Порівнюючи інфекційну активність штамів вірусів, застосовували двовибірковий метод Ст'юдента [7]. Розрахунок проводили у програмі Microsoft Office Excel.

За різницею титрів визначали антивірусну активність композицій НЧ S та I, Se та I. Під час зниження титру вірусу за дії композицій НЧ на 2,0 lg ТЦД<sub>50</sub> і більше визначали хімотерапевтичний індекс (ХТІ). Для цього встановлювали мінімально активну концентрацію (МАК), тобто таку, що знижує інфекційний титр вірусу на 1,25–1,5 lg ТЦД<sub>50</sub> порівняно з титром вірусу без внесення НЧ; ХТІ визначали як відношення МДК до МАК.

Фунгістатичну активність композицій НЧ S та I, Se та I визначали відносно гриба штаму *A. cucurbitacearum* 502. Гриби вирощували у чашках Петрі на поживному середовищі сусло-агарі (6%). Кінцева концентрація композицій НЧ S та I, Se та I у поживному середовищі становила 30 мкг/см<sup>3</sup>. Як контрольне середовище використовували сусло-агар без додавання розчину НЧ. У стерильні чашки Петрі вносили 15 см<sup>3</sup> сусло-агару та середовища із додаванням розчину НЧ. Для кожного варіанта досліду використовували 5 чашок Петрі. Після застигання середовища вносили культури грибів методом уколу. На одну чашку робили три уколи. Гриби штаму *Acremonium* sp. 502 культивували у термостаті при температурі 25°C сім діб.

Оцінку фунгіцидної активності НЧ здійснювали на другу, третю, четверту та сьому добу після внесення культур грибів. Підраховували загальну кількість колоній, що утворилися на контрольному середовищі та на середовищі із додаванням композицій НЧ S та I, Se та I. Визначали розмір діаметра колоній, що утворювалися на місцях уколів. Діаметр колоній вимірювали у міліметрах із точністю до 0,5 мм. Статистичну обробку проводили у відповідних програмах за допомогою тестів Duncan's new multiple range test (DMRT) та Fisher's least significant difference test (Fisher's LSD). Середні діаметри колоній, що утворилися на контрольному середовищі та на середовищі із додаванням різних НЧ, порівнювали за допомогою *t*-критерію Ст'юдента для незалежних вибірок. Значення Valid N у всіх розрахунках становило не менше 24.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У культурі клітин СНЕВ проведено дослідження з визначення антивірусної активності композицій НЧ S та I, Se та I у МДК за профілактичною та лікувальною схемами. Встановлено, що композиції НЧ S та I, Se та I у МДК проявляли незначну антивірусну активність, знижуючи титр вірусу за обома схемами лише на 0,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Вивчено віруліцидну активність композиції НЧ S та I, Se та I у МДК. Встановлено, що композиція НЧ S та I у МДК за експозиції 24 год проявляли високу віруліцидну активність щодо штаму вірусу РТВ-1 Дніпровський-34, достовірно знижуючи його інфекційний титр у культурі клітин СНЕВ на  $5,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  (табл. 1).

На наступному етапі визначили МАК та ХТІ для композиції НЧ S та I. Результати досліджень наведено у таблиці 2.

Встановлено, що МАК для НЧ I та S становила  $1,25 \text{ мкг}/\text{см}^3$ . Визначено, що ХТІ композиції НЧ S та I становить 8. Отже, композиція НЧ S та I має високу антивірусну активність щодо TV-A і може бути рекомендована для створення на її основі антивірусних препаратів, віруліцидних та дезінфікувальних засобів.

Досліджено фунгістатичну активність композицій НЧ S та I, Se та I щодо фітопатогенних грибів за допомогою штаму *Acre-*

*monium cucurbitacearum* 502. Встановлено, що композиції НЧ S та I, Se та I діють на штам *A. cucurbitacearum* 502 фунгістатично, тобто значно вповільнюють ріст колоній та зменшують їх діаметр, проте не призводять до загибелі міцелію за досліджуваних концентрацій.

Незважаючи на однаковий характер впливу композицій НЧ S та I, Se та I на репродукцію штаму *A. cucurbitacearum* 502, рівень їх активності значно відрізнявся. Так, композиція НЧ S та I проявила сильну фунгістатичну активність лише впродовж перших трьох діб після початку культивування (табл. 3). Починаючи з четвертої доби після початку культивування, різниця у значеннях діаметрів колоній між контрольним варіантом та варіантом за дії композиції НЧ S та I не перевищувала 2,73%, і за результатами статистичних тестів ця різниця мала низький рівень значущості (табл. 3).

Таблиця 1

**Віруліцидна активність композицій НЧ S та I, Se та I у МДК щодо штаму РТВ-1 Дніпровський-34 у культурі клітин СНЕВ (експозиція 24 год)**

Досліджувана речовина	МДК, $\text{мкг}/\text{см}^3$	Титр вірусу, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	Різниця титрів вірусу, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$
НЧ S та I	10	$1,23 \pm 0,16$	5,0
НЧ Se та I	0,1	$6,23 \pm 0,12$	0
Контроль		$6,23 \pm 0,12$	–

Таблиця 2

**Віруліцидна активність композиції НЧ щодо штаму РТВ-1 Дніпровський-34 у культурі клітин СНЕВ за різної концентрації (експозиція 24 год)**

Досліджувана речовина	Концентрація НЧ, $\text{мкг}/\text{см}^3$	Титр вірусу, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	Різниця титрів вірусу, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	ХТІ
НЧ S та I	10,0	$1,23 \pm 0,16$	5,00	8
	5,0	$2,00 \pm 0,12$	4,23	
	2,5	$3,50 \pm 0,14$	2,73	
	1,25	$4,77 \pm 0,16$	1,46	
	0,62	$5,23 \pm 0,11$	1,00	
Контроль	–	$6,23 \pm 0,12$	–	–

Таблиця 3

**Фунгістатична активність композиції НЧ S та I щодо штаму *A. cucurbitacearum* 502**

Тривалість культивування	Діаметр колоній (WM*±std.err**), мм		Δ, %	Значущість	
	НЧ I+S	Без НЧ		DMRT	Fisher's LSD
2 доби	3,06±0,09	3,75±0,10	-18,32	p<0,0006	p<0,0004
3 доби	6,00±0,15	6,75±0,16	-11,11	p<0,009	p<0,02
4 доби	9,27±0,15	9,50±0,19	-2,42	p>0,59	p>0,60
7 діб	18,89±0,14	19,42±0,58	-2,73	p>0,50	p>0,54

Примітка: \*WM – зважене середнє арифметичне (weighted mean); \*\*std.err – стандартна похибка (standard error).

Таблиця 4

**Фунгістатична активність композиції НЧ Se та I щодо штаму *A. cucurbitacearum* 502**

Тривалість культивування	Діаметр колоній (WM±std.err), мм		Δ, %	Значущість	
	Se+I	Без НМ		DMRT	Fisher's LSD
2 доби	0,22±0,10	3,75±0,10	-94,13	p<0,000005	p<0,000001
3 доби	1,10±0,31	6,75±0,16	-83,70	p<0,00002	p<0,000001
4 доби	2,00±0,56	9,50±0,19	-78,95	p<0,00002	p<0,000001
7 діб	6,47±1,28	19,42±0,58	-66,68	p<,000003	p<0,000001

На відміну від композиції НЧ S та I, композиція НЧ Se та I зберігала високу фунгістатичну активність впродовж усього терміну культивування (табл. 4). Зменшення діаметрів колоній порівняно з контролем за дії композиції НЧ Se та I було значно істотнішим, ніж за дії композиції НЧ S та I, та сягало 94,13%. За результатами статистичних тестів різниця у значеннях діаметрів колоній між контролем та дослідним варіантом з композицією НЧ Se та I мала високий рівень значущості.

Так, композиція НЧ Se та I володіє високою фунгістатичною активністю щодо штаму *A. cucurbitacearum* 502.

Отже, композиція НЧ S та I володіє високою антивірусною активністю щодо штаму TV-A Дніпровський-34, а композиція НЧ Se та I – високою фунгістатичною активністю щодо штаму *A. cucurbitacearum* 502. Потребує ретельного вивчення механізм віруліцидної та фунгістатичної дії композиції НЧ неметалів. Вважаємо, що композиції НЧ S та I, Se та I є перспек-

тивними для створення антивірусних та фунгістатичних препаратів.

**ВИСНОВКИ**

1. Встановлено, що композиція НЧ S та I проявляє високу віруліцидну активність щодо штаму TV-A Дніпровський-34; знижуючи титр вірусу на 5,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, має ХТІ 8 і може бути рекомендована для створення на її основі антивірусних препаратів, віруліцидних та дезінфікувальних засобів.

2. Композиція НЧ Se та I володіє високою фунгістатичною активністю щодо штаму *A. cucurbitacearum* 502: сповільнює ріст та зменшує діаметр колоній, проте не призводить до загибелі міцелію. Композиція НЧ Se та I проявляє високу фунгістатичну активність впродовж усього терміну культивування. Зменшення діаметрів колоній за дії композиції НЧ Se та I сягає 94,13%. За результатами досліджень композицію НЧ Se та I можна рекомендувати для розробки засобів захисту сільськогосподарських рослин від грибних хвороб.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пат. 106101 Україна, МПК А61К 33/08, А61Р 31/22. Спосіб виготовлення медичних протівірусних препаратів, що містять наночастинки, та препарат проти вірусів герпесу hіv і грипу h1n1, виготовлений за даним способом / М.М. Локшин, М.Я. Співак, В.С. Лисенко. — Заявл. 17.07.12; опубл. 25.07.2014, Бюл. 18.
2. Interaction of titanium dioxide nanoparticles with influenza virus / N.A. Mazurkova, Y.E. Spitsyna, N.V. Shikina et al. // *Nanotechnol. Russia*. — 2010. — No. 5. — P. 417–420.
3. *In vitro* antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi / P. Kanhed, S. Birla, S. Gaikwad [et al.] // *Materials Letters*. — 2014. — Vol. 115. — P. 13–17.
4. *Nasrollahi A.* Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi / A. Nasrollahi, K.H. Pourshamsian, P. Mansourkiaee // *International Journal of Nano Dimension*. — 2011. — Vol. 1, No. 3. — P. 233–239.
5. Пат. 23550 Україна, МПК В22F 9/14. Спосіб ерозійно-вибухового диспергування металів / М.В. Косінов, В.Г. Каплуненко. — Заявл. 09.02.2007; опубл. 25.05.2007, Бюл. № 7.
6. *Reed L.J.* A simple method of estimation of fifty per cent endpoints / L.J. Reed, H. Muench // *The American Journal of Hygiene*. — 1938. — Vol. 27, No. 3. — P. 493–497.
7. *Student By Student.* The probable error of a mean / Student // *Biometrika*. — 1908. — No. 6 (1). — P. 1–25.

REFERENCES

1. Lokshyn, M.M., Spivak, M.Ya. & Lysenko, V.S. (2014). Sposib vyhotovlennia medychnykh proty-virusnykh preparativ, shcho mistiat nanochastyinky, ta preparat proty virusiv herpesu hiv i hrypu h1n1, vyhotovlenyi za danym sposobom [A method of production of medical antiviral drugs, which contain nanoparticle, and a drug against herpes virus hiv and influenza virus h1n1, which is produces by means of this way]. *Patent of Ukraine No.106101; 17<sup>th</sup> July; 25<sup>th</sup> July. Bul. No. 18, Ukraine* [in Ukrainian].
2. Mazurkova, N.A., Spitsyna, Y.E. & Shikina, N.V. et al. (2010). Interaction of titanium dioxide nanoparticles with influenza virus. *Nanotechnol. Russia*, 5, 417–420 [in English].
3. Kanhed, P., Birla, S., Gaikwad, S., Gade, A., Seabra, A., Rubilar, B., Duran, O. & Rai, N. (2014). *In vitro* antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi. *Materials Letters*, 115, 13–17 [in English].
4. Nasrollahi, A., Pourshamsian, K.H. & Mansourkiaee, P. (2011). Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. *International Journal of Nano Dimension*, 1(3), 233–239 [in English].
5. Kosinov, M.V., & Kaplunenko V.G. (2007). Sposib eroziino-vybukhovoho dysperhuvannia metaliv [A method of an erosive-bursting dispersion of metals]. *Patent of Ukraine No. 23550; 09<sup>th</sup> February; 25<sup>th</sup> May. Bul. No. 7, Ukraine* [in Ukrainian].
6. Reed, L.J. & Muench, H. (1938). A simple method of estimation of fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, 27(3), 493–497 [in English].
7. Student By Student (1908). The probable error of a mean *Biometrika*, 6(1), 1–25 [in English].

Стаття надійшла до редакції журналу 24.01.2020