

УДК 578.865.1

**ВПЛИВ ГЕТЕРОПОЛІЯДЕРНИХ КООРДИНАЦІЙНИХ СПОЛУК МЕТАЛІВ ТА СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА РОЗВИТОК ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У РОСЛИН *NICOTIANA TABACUM***

Корнійчук І.В., Устьяненко Д.О., Кот Т.Г., Харіна А.В., Поліщук В.П.

Кафедра вірусології, Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
вул. Володимирська 64, Київ 01033, Україна  
<http://www.univ.kiev.ua/>  
e-mail: [virus@biocc.univ.kiev.ua](mailto:virus@biocc.univ.kiev.ua)

Хіміотерапія рослин на сьогодні є одним з найбільш радикальних та ефективних способів оздоровлення рослин від вірусних інфекцій. Поряд з чисельними методами, які забезпечуть певний захист рослин від даних патогенів або безпосередню боротьбу з ними, хіміотерапія без сумнівів показала найкращі результати та до тепер успішно використовується в ряді країн [1]. Вивчено багато речовин, які здатні інактивувати рослинні віруси. В якості прикладу можна привести аналін, фенол, саліцилову кислоту, тіонін, які здатні знижувати інфекційність вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ). В літературі також наявності є дані про інгібуючий вплив гіберреліна, тіоурацила, 2.4Д, індолацтової кислоти та багатьох інших.

Різні метали здатні пригнічувати інфекційність вірусу тютюнової мозаїки в значній мірі. Останнім часом значний науковий інтерес викликають комплекси важких металів, які наряду з вираженими бактерицидними [2] та антинеопластичними властивостями [3], проявили виражену антивірусну дію. Дані сполуки у модельній системі вірус-рослина у невеликих дозах проявляли протівірусний ефект, при цьому не впливаючи на фенотип та процес росту самої рослини. Так, був показаний антифітовірусний

ефект комплексів N-аліл-N'-2-піридил-тіомочевини та N-феніл-N'-2-піридил-тіомочевини з  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  по відношенню до X вірусу картоплі [4]. Солі важких металів, до складу яких входять  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{+}$ ,  $\text{Br}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , викликали антифітовірусний ефект, що проявлявся у зниженні кількості вірусних симптомів та зменшення концентрації вірусу тютюнової мозаїки в дослідних рослинах *Nicotiana tabacum* [5]. Дана робота була спрямована на дослідження віруліцидної дії гетерополяядерних сполук перехідних металів, а також антивірусного ефекту основних солей важких металів на перебіг вірусної хвороби тютюну, викликаной вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ).

### Матеріали та методи

Гетерополяядерні сполуки перехідних металів та солі важких металів були отримані на кафедрі неорганічної хімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка шляхом прямого синтезу [7]. Сполуки досліджувались у наступних концентраціях: 1%, 0.1%, 0.01% та 0.001%. Дані концентрації координаційних речовин були підібрані, враховуючи результати попередніх досліджень щодо ефективних концентрацій антифітовірусних хімічних сполук [5, 7, 12].

Досліджувались наступні координаційні сполуки:

H201  $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{L})_2][\text{CuCo}(\text{L})_2(\text{H}_2\text{L})(\text{NCS})]_2\text{Br}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; M = 1448.69

H399  $[\text{CuCoZn}(\text{L})_2(\text{H}_2\text{L})(\text{OAc})_3]$ ; M = 676.45 (Рис 1)

H417  $[\text{CuCoZn}_2(\text{L})_3\text{Cl}_3(\text{CH}_3\text{OH})] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ ; M = 733.11,

де L – 4,6,6-діаміно-3,7-діазона-3-ен

та солі важких металів:

$\text{CdBr}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ; M=288

$\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ; M=146

$\text{CoCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; M=147

$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; M=151

Диетаноламін ( $\text{H}_2\text{Dea}$ ); M=105.14

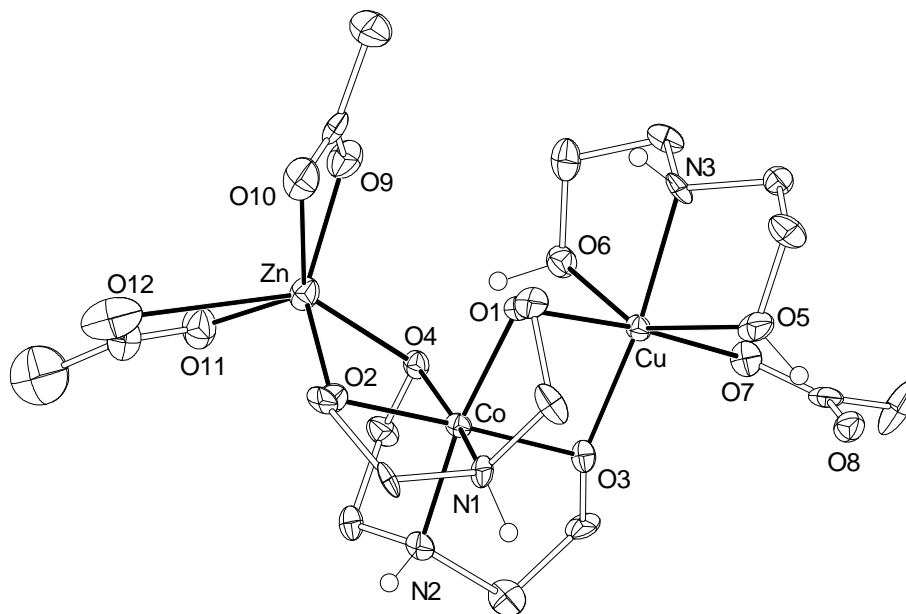


Рис 1 Структурна формула речовини H399 [6]

Як модельна система використовувались рослини тютюну (*Nicotiana Tabacum*) сорту Трапезон та вірус тютюнової мозаїки штам U1 з робочою дозою 0.8мг/мл. Для встановлення можливої токсичної дії препаратів на рослину проводили зараження листкових пластинок 1%, 0.1%, 0.01% та 0.001% концентраціями речовин та спостерігали за фенотипом та процесом росту рослин.

Для вивчення віруліцидної дії досліджуваних сполук відповідні розведення (1% та 0,1% ) речовин змішували з вірусвмісним матеріалом та інкубували протягом 1 та 24 годин. Після інкубації проводили механічне ураження половинок листкових пластин дорослих здорових рослин тютюну. Одна половинка листка була інокульована обробленим комплексною сполукою вірусом, інша – необробленим вірусом. Кожний експеримент проводився у трьох повторностях. Для визначення концентрації вірусу в рослинах, інокульованих сумішшю вірусу та відповідних розведень речовин, проводили непрямий імуноферментний аналіз (ІФА) [8, 9, 10].

Для дослідження антивірусної дії сполук важких металів на процес розвитку вірусної інфекції при регенерації рослин з калусної тканини фрагменти листків рослин тютюну, інфікованих ВТМ, оброблялись 0.7% розчином досліджуваної речовини та переносились на поживне середовище Мурасіге-Скуга (MS) [11] для калусоутворення. Після початку калусоутворення шматки калусної тканини тестували на наявність вірусу шляхом ІФА. Калус був перенесений на поживне середовище для регенерації рослин, яке містило 0.1, 0.01 та 0.001%-ні концентрації сполук H201, H399, H417. Паралельно робили контроль. Регеновані пагони переносились на безгормональне поживне середовище та були перевірені на наявність вірусу за допомогою ІФА.

З метою визначення антифітовірусної активності основних компонентів координаційних сполук важких металів був використаний метод регенерації рослин з культури тканин рослинних організмів [11]. Дослідна сіль додавалась в поживне середовище в концентрації 0,01%. До середовища з контрольними рослинами солі не додавались. Регеновані пагони

були перевірені на наявність вірусного антигену за допомогою ІФА.

Відсоток інгібуючого впливу дослідних сполук на накопичення в рослинах тютюну ВТМ було підраховано з результатів ІФА за допомогою наступного рівняння (1) та формули (2):

$$\text{ОГ (Квір)} = 100\% \quad (1)$$

$$\text{ОГ (Зр.)} = x \%,$$

де ОГ (К вір.)- одиниці оптичної густини для зразку із калусу чи рослини, інфікованої ВТМ

ОГ (Зр.)– одиниці оптичної густини для зразку із калусу чи рослини, інфікованої ВТМ, що підлягали обробці дослідними сполуками.

$$\text{ІВ} = 100\% - x, \quad (2)$$

де ІВ – інгібуючий вплив дослідної сполуки на накопичення ВТМ в зразках, %

### Результати та обговорення

Попередні дослідження антифітовірусної дії гетерополярних координаційних сполук важких металів, таких як H221, H377, H380, H299, H491, PO39, H379, PO172 та інших, показали різний рівень віруліцидної та антивірусної активності даних препаратів, що було виражено у зниженні інфекційності ВТМ у рослинах *Nicotiana tabacum* на 10-92%. При порівнянні складу найактивніших сполук встановлено, що спільним для них є наявність міді та кобальту, що, можливо, обумовлює активність даних сполук [5, 6]. Координаційні сполуки важких металів, що були досліджені у даній роботі, також в своєму складі несуть такі важливі хімічні елементи, як мідь та кобальт, які могли б призвести до гальмівного впливу речовини на вірус.

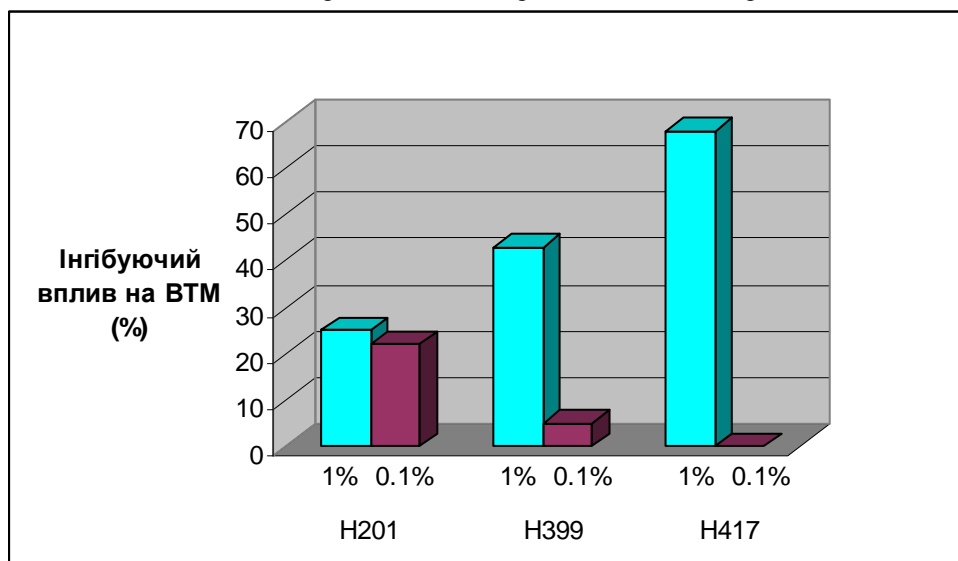
У результаті проведених досліджень показано, що сполуки H417, H201 та H399 мають різний ступень інгібуючого впливу на вірус. Так, після інкубування вірусвмісного матеріалу з 0.1, та 0.01 % концентраціями дослідних речовин, спостерігалось зниження кількості некротів, що свідчить про зменшення кількості інфекційних вірусних часток. (Таб.1).

**Таблиця 1 Вплив комплексних сполук на інфекційність ВТМ**

Дослідна сполука	Матеріал для інфікування	Кількість некротів 1 година	Кількість некротів 24 години
H417	ВТМ	4±,1.71	14.75±0,98
	1 % + ВТМ	3±0,56	4,5±0,94
	0,1 % + ВТМ	13,33±0,32	5±0.2
H201	ВТМ	12±0,79	13,33±0.7
	1 % + ВТМ	10±2,3	9,66±0,9
	0,1 % + ВТМ	11,9±0.71	9,5±0,89
H399	ВТМ	15.9±0, 34	14.4±0,53
	1 % + ВТМ	4,7±2,67	7,8±2,71
	0,1 % + ВТМ	15,3±1.2	13,8±0,63

Результати ІФА зразків, отриманих з інфікованих сумішню вірусу та досліджуваної речовини рослини, показали, що сполука Н417 має найбільшу ступінь віруліцидної активності та у 1% концентрації пригнічує розвиток ВТМ в тютюні приблизно на

$68 \pm 3.4\%$ . Речовина Н399 призводила до зменшення кількості інфекційного вірусу більше, ніж на  $40 \pm 1.2\%$ , в той час як сполука Н201 мала до  $20 \pm 5.6\%$  інгібуючого впливу на вірус. Всі досліджувані речовини проявили більш виражений віруліцидний ефект при більших концентраціях (Рис.2).



**Рис.2 Пригнічення інфекційності ВТМ у рослинах *Nicotiana tabacum* після інокуляції сумішню ВТМ та дослідної координаційної сполуки**

Таким чином, за ступенем противірусної дії препаратів можуть бути розташовані у наступному порядку:

$$417 > 399 > 201$$

Попередні дослідження координаційних сполук важких металів РО39, 718, 252, РО239, РО80, Н201 показали значний рівень гальмування перебігу вірусної хвороби *Nicotiana tabacum* в культурі тканин. Було з'ясовано, що сполуки РО80 та РО39 викликали зниження вмісту ВТМ в калусі на  $46.7 \pm 3.7\%$  та  $74.2 \pm 5.6\%$ , відповідно. Рівень антивірусної та фітотоксичної активності значно варіював для кожної з досліджених речовин [5]. З огляду на перспективність перевірених препаратів встановлювали з чим пов'язана їх активність, що являється активним центром даних сполук.

Результати ІФА показали що речовина  $\text{CdBr}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  інгібувала розвиток вірусу у калусній культурі на 39%, проте при цьому негативно впливала на калусну культуру, що проявлялось у почорнінні та слабкій регенерації експлантів.  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  інгібував вірус на 36%. Інші речовини не проявили антивірусної активності. Крім того,  $\text{H}_2\text{Dea}$  стимулювала розвиток калусної культури, що проявлялось в інтенсивному рості калусу на середовищі, в якому містилася дана сполука. Як видно з отриманих результатів, більшість солей не проявили антифітовірусної активності, крім сполуки  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , яка не інгібувала розвиток калусу та пригнічувала розвиток вірусу на 36%. З цього можна зробити висновок, що основні центральні компоненти комплексних неорганічних сполук ряду перехідних металів не відповідають за проявлену речовинами антивірусну актив-

ність, оскільки солі їх основних компонентів не дали очікуваного впливу на вірус.

Таким чином, в модельній системі вірус-рослина було показано віруліцидну активність гетерополядерних координаційних сполук перехідних металів Н417, Н309 та Н201. Найбільший вплив на інфекційність ВТМ спричиняла речовина Н417, яка інгібувала інфекційність вірусу тютюнової мозаїки на 40%. При дослідженні солей основних компонентів деяких комплексних сполук ряду перехідних металів була показана активність  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , яка пригнічувала розвиток калусу та інгібувала вірус на 36%.

#### Список літератури

1. Sharma R.K., Agrawal M. Biological effects of heavy metals: an overview // J.Environ Biol.-2005.-Vol.26.-P.301-313.
2. Loginova et al. Synthesis and biological evaluation of copper (II) complexes of sterically hindered o-aminophenol derivatives as antimicrobial agents // Bio-org. Med Chem Lett.- 2006.-Vol.16.-P.5403-5407.
3. Wang T., Guo Z. Copper in medicine: homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design // Curr. Med.Chem.-2006.-Vol.13.-P.525-537.
4. Shuster G., Davarsky K.A., Vassilev G.N Enhanced inhibition of plant virus replication by pyridylthiourea compounds complexed with metal ions // Antiviral Res.-1989.-Vol.11.-P.307-311.
5. Харіна А.В., Будзанівська І.Г., Поліщук В.П. Вступ до хіміотерапії вірусних інфекцій.-К.: Фітосоціоцентр, 2003.- с.118-124.
6. Харіна А.В., Корнійчук І.В., Бисова М.С., Козкозей В.М, Нестерова О.В. Дослідження антивірусної ак-

тивності гетерополядерних координаційних сполук перехідних металів на різних рівнях взаємодії вірус-рослина // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка.-2005.-№44.-С.51-53

7. Pryma O., Petrusenko S., Kokozay V. et al Antiphytoviral activity of heterometallic copper containing amine complexes // Eur. J. Inorg.Chem.-2003.-Vol.5.-P.1426-1432.

8. Crowther J. ELISA.-Theory and practice Humana Press N.Y.,1995.-P.38-39.

9. Кэти Д. Антитела 1. Методы.-М.: Мир,1991.-92с.  
Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусос растений.-М.:Наука,1993.-264с

10. Мусієнко М.М., Панюта О.О Культура ізольованих клітин, тканин і органів рослин. – К.: Фітосоціоцентр, 2001.–с.13-22.

11. Мартынова Р.В., Рейфман В.Г Химиотерапия вирусных болезней растений.-Вирусные болезни сельскохозяйственных растений дальнего Востока.-М.:Мир,1971.-с.102-106

#### УДК 578.865.1

### ВПЛИВ ГЕТЕРОПОЛЯДЕРНИХ КООРДИНАЦІЙНИХ СПОЛУК МЕТАЛІВ ТА СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА РОЗВИТОК ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У РОСЛИН *NICOTIANA TABACUM*

Корнійчук І.В., Устьяненко Д.О, Кот Т.Г, Харіна А.В., Поліщук В.П.

Проведено вивчення антифітовірусної активності гетерополядерних сполук металів H201, H399, H417 та солей важких металів на модельній системі вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) - *Nicotiana tabacum*. Найбільший вплив на інфекційність ВТМ спричиняла речовина H417, яка інгібувала інфекційність вірусу тютюнової мозаїки на 40%. При дослідженні основних компонентів деяких комплексних сполук ряду важких металів була показана активність  $NiCl_2 \times 6H_2O$ , яка пригнічувала розвиток калусу та інгібувала вірус на 36%.

**Ключові слова:** гетерополядерні сполуки, калус, регенерація, інгібування.

#### УДК 578.865.1

### ВЛИЯНИЕ ГЕТЕРОПОЛЯДЕРНЫХ КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТАЛЛОВ И СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА РАЗВИТИЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM*

Корнейчук И.В., Устьяненко Д.А, Кот Т.Г, Харина А.В., Полищук В.П.

Проведено изучение антивирусной активности гетерополядерных соединений металлов H201, H399, H417 и солей тяжелых металлов на модельной системе вирус табачной мозаики (ВТМ) - *Nicotiana tabacum*. Самое большое влияние на инфекционность ВТМ проявляло вещество H417, которое тормозило инфекционность вируса табачной мозаики на 40%. При исследовании основных компонентов некоторых комплексных соединений ряда тяжелых металлов была показана активность  $NiCl_2 \times 6H_2O$ , которая тормозила развитие каллуса и ингибировала вирус на 36%.

#### УДК 578.865.1

### INFLUENCE OF HETEROPOLYNUCLEAR COORDINATE COMPOUNDS OF METALS AND SALTS OF HEAVY METALS ON THE DEVELOPMENT OF VIRAL INFECTION IN PLANTS OF *NICOTIANA TABACUM*

Korniichuk I, Ustyanyenko D., Kot T., Kharina A., Polishuk V.

The antiphytoviral activity of heteropolynuclear compounds of metals H201, H399, H417 and salts of heavy metals on the model system tobacco mosaic virus (TMV) - *Nicotiana tabacum* was studied. The substance H417 showed the largest influence on the TMV infectivity. It inhibited the infectivity of tobacco mosaic virus for 40%. While studying the main contents of some complex substances of heavy metals the activity of  $NiCl_2 \times 6H_2O$  was showed. The substance inhibited the development of callus for 36%.