

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2024 р.

**РОЗВИТОК ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ РОСЛИН ЗА ДІЇ ГРАФЕНУ**

Кваліфікаційна робота бакалавра

денної форми навчання

за спеціальністю Біологія

Вауліної Поліни Єгорівни

Науковий керівник від кафедри

к.б.н, старший науковий

співробітник, доцент Шевченко О.В.

Робота виконана на кафедрі вірусології ННЦ “Інституту біології та медицини”

під керівництвом к.б.н. Шевченка О.В.

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2024 р.**

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

GO – оксид графену

НМ – наноматеріали

НЧ - наночастинки

TMV – вірус тютюнової мозаїки

MDA – малондіальдегід

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - пероксид водню

CAT – каталаза

POD – пероксидаза

GSH – глутатіон

SOD – супероксиддисмутаза

АФК - активні форми кисню

WT – дикий тип

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	4
<b>РОЗДІЛ 1. Наносполуки та їх характеристики</b> .....	6
1.1 Структура та властивості графену.....	6
1.2 Взаємодія наносполук та вірусів.....	9
1.3 Вплив графену на рослинні ферменти.....	13
<b>РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень</b> .....	21
2.1. Матеріали .....	21
2.2. Інокуляція дослідних рослин.....	22
2.3. Імуноферментний аналіз.....	23
2.4. Трансмісійна електронна мікроскопія.....	24
2.5. Визначення активності маркерних рослинних ферментів.....	24
<b>РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення</b> .....	28
3.1. Вплив графену на перебіг системної вірусної інфекції в модельних рослинах.....	28
3.2. Візуальна оцінка взаємодії вірусу та графену <i>in vitro</i> .....	34
3.3. Аналіз активності рослинних ферментів за умов оксидативного стресу..	40
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	47
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	48

## ВСТУП

Вважається, що вплив графену на ріст рослин пов'язаний з його фізико-хімічними властивостями, способом застосування, рівнем і тривалістю впливу, а також видом рослин, що досліджуються. Численні дослідження повідомляють про позитивний вплив графену на ріст пшениці, коріандру, часнику, кукурудзи, шпинату, шніт-цибулі, бавовника звичайного, катарантуса рожевого, арабідопсису, кавуна та алое вера в концентраціях від 10 до 200 мг/л. Графен може сприяти росту рослин за допомогою декількох різних механізмів. Як транспортер води, графен може прискорювати поглинання води в коренях і насінні. Обробка графеном може підвищувати здатність рослин поглинати активні форми кисню (АФК) для полегшення окислювального стресу, підвищувати вміст розчинного білка та зменшувати загибель клітин. Крім того, застосування графену може підвищувати ефективність використання добрив і впливати на активність ґрунтових мікроорганізмів, таким чином опосередковано впливаючи на ріст рослин [1].

Попередні дослідження показали, що наночастинки (НЧ), до яких у широкому розумінні відноситься і графен, здебільшого порушують ранні стадії реплікації вірусів. Однак необхідні додаткові дослідження, щоб визначити точні механізми, за допомогою якого НЧ впливають на мобільність, реплікацію, інкапсуляцію та передачу вірусів. Одна з інгібуючих стратегій, на якій базується застосування наночастинок, може включати вивільнення іонів металів, що супроводжується окислювальним та іншими неокислювальними стресами. В основі цього механізму лежить інактивація та денатурація капсидних та інших білків, нуклеїнових кислот (РНК або ДНК) та інших компонентів вірусів. Крім того, НЧ можуть мати віруліцидну активність, пригнічуючи зв'язування, злиття, інфекційність та здатність до реплікації вірусів через утворення АФК та подальше окислення білків [2].

НЧ посилюють захисні механізми рослин і захищають від ряду патогенів, активуючи накопичення вторинних метаболітів, АФК, білків, пов'язаних з патогенезом та ферментів, пов'язаних із захисними реакціями, а також посилюючи гіперчутливу відповідь та комплексну сигнальну трансдукцію. Наприклад, НЧ можуть збільшувати концентрацію рослинних гормонів, пов'язаних із захистом, таких як сіалова кислота (SA), та активувати системну набуту резистентність у рослинах, допомагаючи запобігти розвитку бактеріальних інфекцій та зменшити шкоду, яку ці патогени завдають сільському господарству [3].

Метою даного дослідження було визначити перспективність використання графену для протидії вірусній інфекції, проаналізувати реакцію рослин на наноматеріал, в тому числі за дії вірусної інфекції, за рахунок визначення активності ряду маркерних ферментів рослин, та вивчити взаємодію графену та вірусних частинок у водному розчині *in vitro* за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії.

## РОЗДІЛ 1

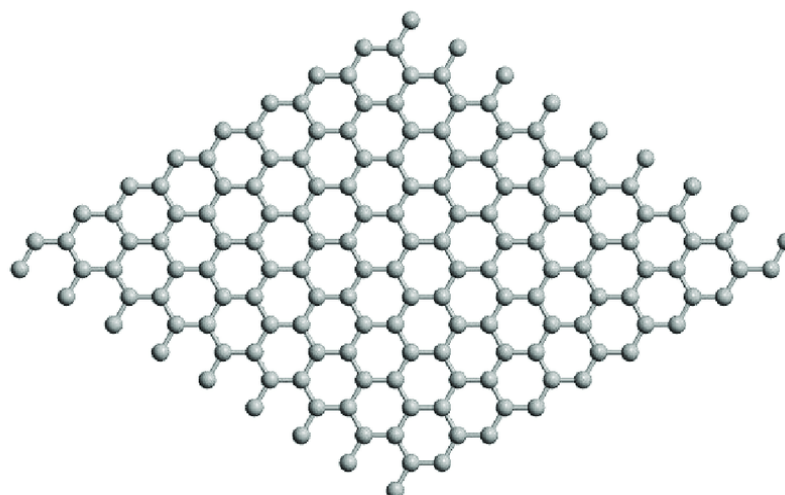
### НАНОСПОЛУКИ ТА ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Графен - двовимірна форма кристалічного вуглецю, або один шар атомів вуглецю, що утворюють гексагональну решітку. Графен – це батьківська форма всіх графітових структур вуглецю:

- 1) графіт, що представляє собою тривимірний кристал, що складається з відносно слабо зв'язаних шарів графену;
- 2) нанотрубки, які можуть бути представлені у вигляді шарів графену;
- 3) бакіболи (від бакмінстерфулерен, з формулою  $C_{60}$ ) - сферичні молекули, виготовлені з графену з деякими шестикутними кільцями, заміненими п'ятикутними кільцями [4].

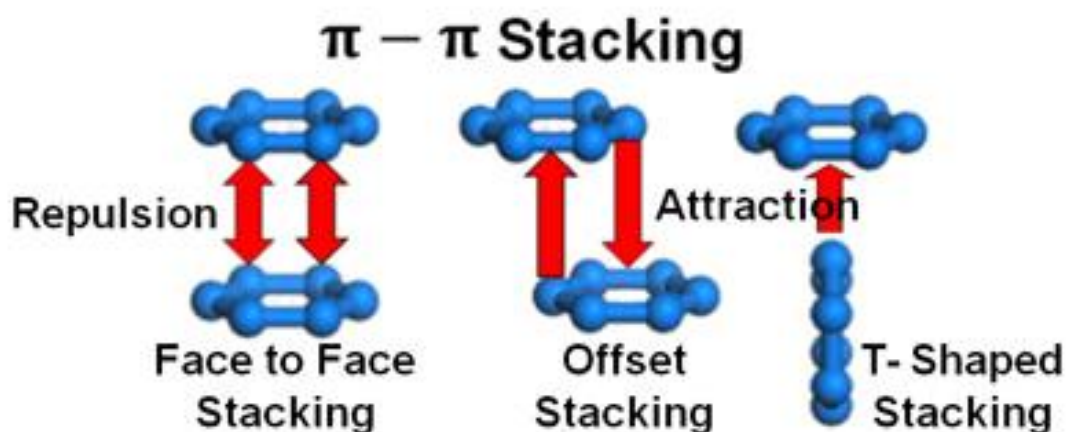
#### 1.1. Структура та властивості графену

Графен, за визначенням, являє собою алотроп вуглецю у вигляді двовимірної, атомно-масштабної, гексагональної решітки, в якій один атом утворює кожну вершину з  $sp^2$ -гібридизацією. Графен складається з щільно упакованого одного шару атомів вуглецю, що формує 2D-гратчасту площину, схожу на медові соти. В одношаровому графені атоми вуглецю зв'язуються з навколишніми атомами вуглецю з  $sp^2$ -гібридизацією і утворюють бензоллоподібне кільце, в якому кожен атом віддає неспарений електрон (рис.1.1).



**Рис.1.1.** Одношарова структура графену [5]

Стабільність графену обумовлена його щільно упакованими атомами вуглецю і  $sp^2$  орбітальна гібридизація — комбінація орбіталей  $s$ ,  $p_x$  і  $p_y$ , які формують  $\sigma$ -зв'язок. Кінцевий електрон  $p_z$  формує  $\pi$ -зв'язок (рис.1.2). Ці зв'язки відповідають за відомі електронні властивості графену через зону провідності, яка пропускає вільно рухомі електрони [6].



**Рис.1.2.** Стекінг-взаємодії у  $\pi$ -зв'язках [7]

Однією з найбільш корисних властивостей графену є те, що він являє собою напівметал з нульовим перекриттям (з електронами в якості носіїв заряду) з дуже високою електропровідністю.

Здатність графену поглинати біле світло є досить великою - 2,3% , що є унікальною і цікавою властивістю, особливо якщо врахувати, що його товщина - лише 1 атом. Це пов'язано з його вищезгаданими електронними властивостями. Електрони, що діють як безмасові носії заряду, характеризуються дуже високою рухливістю.

Завдяки таким вражаючим характеристикам було відзначено, що як тільки оптична інтенсивність досягає певного порогового значення, відбувається насичене поглинання (світло дуже високої інтенсивності викликає зменшення поглинання). Окрім того, графен характеризується надзвичайно високою теплопровідністю і механічною міцністю (рис.1.3).

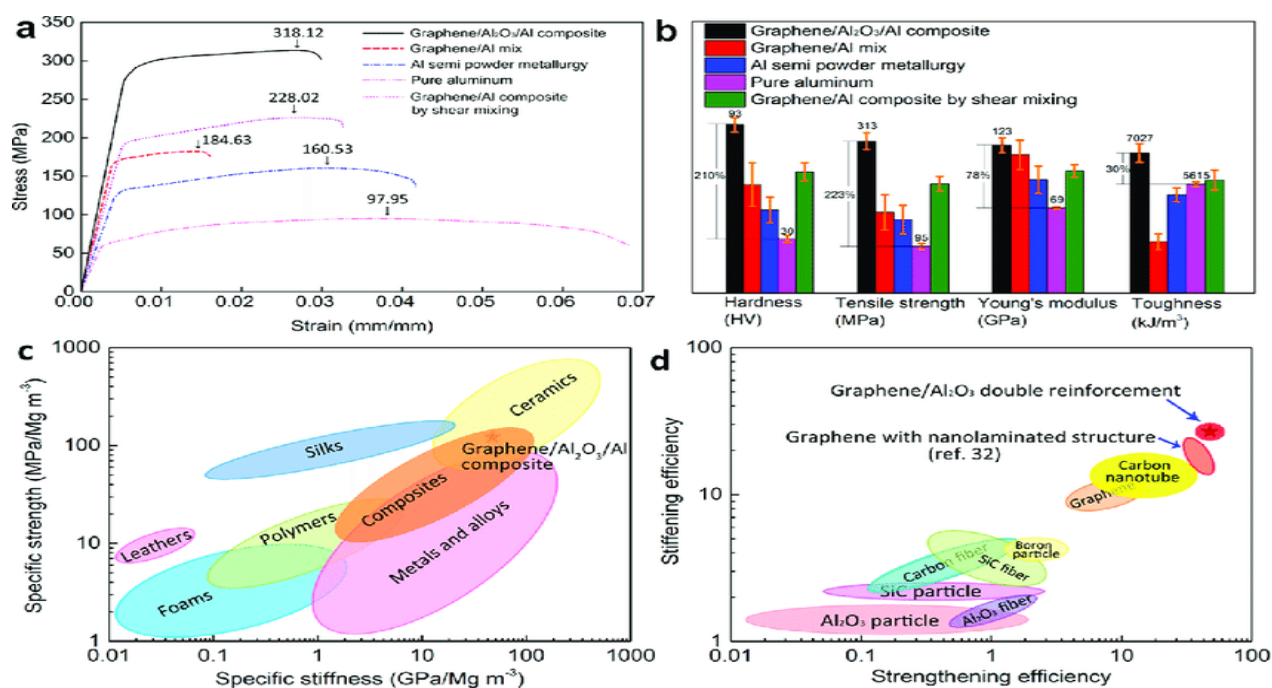


Рис.1.3. Механічна міцність графену [8]

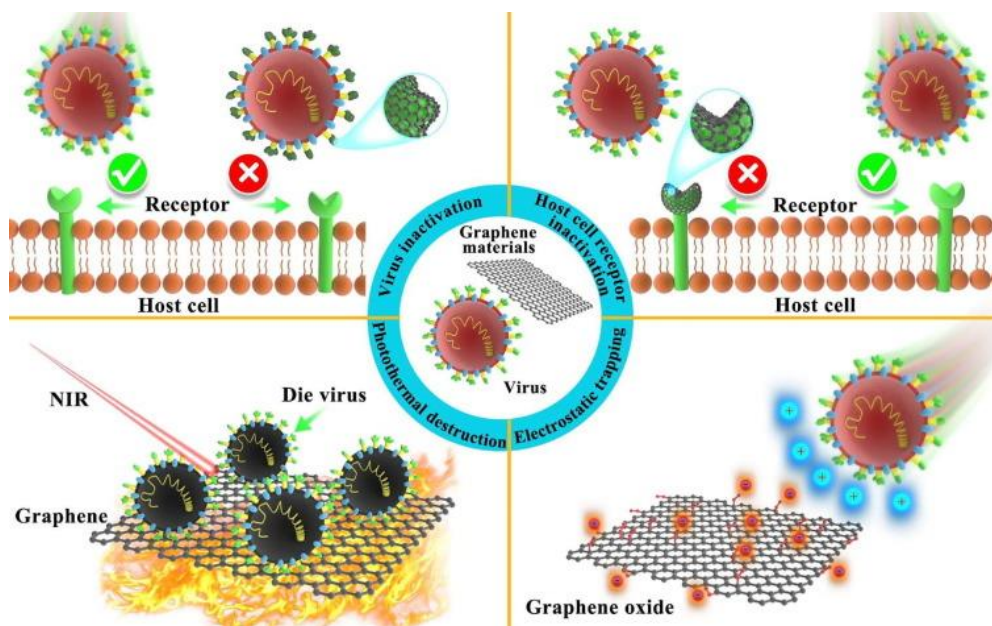
Графен має найбільш жорстку і тверду кристалічну структуру серед усіх відомих матеріалів. За однакової товщини міцність графену перевищує міцність сталі приблизно у 100 разів.

Графен - це єдина форма вуглецю (і взагалі всіх твердих матеріалів), в якій кожен окремий атом може вступати в хімічну реакцію з двох сторін (завдяки 2D-структурі). Відомо, що атоми вуглецю на краях графенових листів мають особливу хімічну реактивність, і графен має найвищий вміст крайових вуглецевих атомів. Крім того, різні типи дефектів всередині листа, які є дуже поширеними, підвищують хімічну реактивність [9].

## 1.2. Взаємодія наносполук та вірусів

На відміну від графену, оксид графену - це окислена форма графену з розташованими на поверхні функціональними групами. Наявність кисню на краях і базальних площинах оксиду графену підвищує його гідрофільність, розсіюваність води, приєднуваність в порівнянні з неокисленим графеном. GO був визнаний ефективним для руйнування покривних білків, доступних на вірусах, і виділення вірусної РНК у водному середовищі. Ця взаємодія призводить до поверхневого біовідновлення оксиду, що призводить до перетворення оксиду графену у його графенову форму, інактивує вірусні частинки [10].

Для зв'язування і проникнення вірусів в клітину-хазяя вірус повинен спочатку взаємодіяти з поверхневими рецепторами клітини-хазяя. Функціональні графенові матеріали можуть запобігти проникненню вірусів до клітини за рахунок взаємодії негативно заряджених функціональних груп (рис.1.4). На додаток до цього, розміри графену може також впливати на антивірусну активність функціоналізованих графенових матеріалів. Молекула розміром близько 300 нм із приблизно 10% функціоналізацією можуть забезпечити оптимальну продуктивність. Антивірусні характеристики графенових матеріалів можна пояснити на основі хімічної/фізичної взаємодії з вірусами, які залежать саме від вибору «правильного» вірусу для експерименту [10].



**Рис.1.4.** Основні механізми у взаємодії між графеном та вірусом [10]

Було продемонстровано, що за відсутності електричного потенціалу графен може руйнувати клітинні мембрани шляхом безпосереднього механічного впливу, викликаючи нестабільність у клітинній системі внаслідок нанорозмірного “змочування”, тобто гідрофобної взаємодії та окиснення важливих клітинних компонентів, тим самим підсилюючи загибель клітин. Тим самим, збільшення електричного потенціалу може посилити електрофоретичний рух віріонів, що призводить до прямого окиснення вірусів та їх подальшої загибелі. Різноманітні фізико- та електрохімічні ефекти графену потенційно також можуть бути корисними для інактивації вірусів [11].

Останні роботи показали, що графен може пригнічувати ріст рослин і впливати на активність їх антиоксидантних ферментів. Як наслідок, недавнє використання метаболомних стратегій має великий потенціал при оцінці цитотоксичності наночастинок і, таким чином, допомагає зрозуміти молекулярні механізми, що лежать в основі нанотоксичності. Крім того, пошкодження органел, ультраструктурні зміни та молекулярні механізми нанотоксичності, що

виникають внаслідок покриття оксидом графену або його потрапляння в клітини рослин, залишаються невирішеним питанням [12].

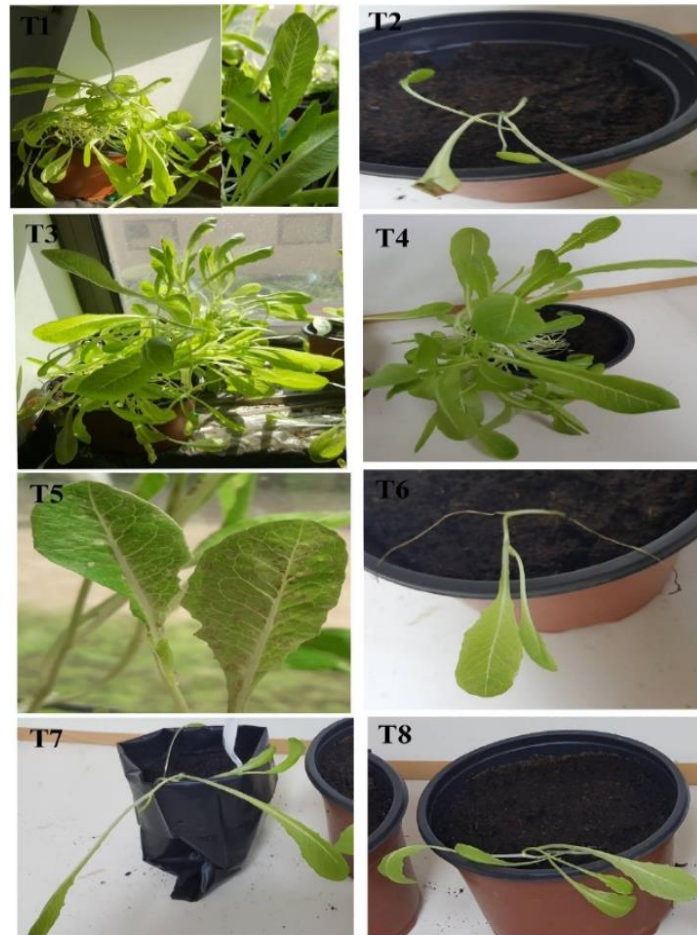
Генотоксичність матеріалів (шкідливість для генетичного матеріалу) на основі графена привертає велику увагу у наш час. Відсутність негативного впливу GO (виражається меншою токсичністю у порівнянні з графеном) на ріст і біомасу вищих рослин, таких як капуста, помідор, червоний шпинат і салат, спостерігалися за концентрацій нижче 400 мг/л. Обробка оксидом графену в діапазоні від 0,1 до 10 мг/л істотно не чинить негативного впливу на насіння пшениці, що було продемонстровано на основі аналізу його проростання, біомаси і окислювального стресу рослин. При цьому був відзначений незначний негативний вплив GO на ріст коренів [13].

Непряма нанотоксичність оксиду графена відбивається на принаймні п'ятьох компонентах: 1) посилене гальмування росту і оксидативний стрес; 2) регулювання ключових форм метаболізму, зокрема, вуглеводів; 3) більш значне пошкодження клітинних структур і проникності мембран [13].

Для *in vivo* скринінгу антивірусної активності графену та наночастинок срібла проти вірусу кущистої карликовості томату використовували рослини салату. В інокульованій розсаді салату спостерігалися типові симптоми вірусної інфекції, на відміну від неінокульованих рослин. Суворі симптоми вірусної інфекції спостерігалися на контрольному інфікованому зразку. Обробка графеном і композитом оксиду графену та наночастинок срібла візуально зменшувала суворість вірус-індукованих симптомів на інокульованих рослинах салату. Така обробка також призвела до зниження концентрації вірусу, відсотка інфікованих рослин та тяжкості захворювання інокульованої розсади салату порівняно з інфікованим контролем (рис.1.5).

Дослідження пригнічення вірусної інфекції показали, що активність графену чітко залежить від його розмірів і просторового розподілу взаємодіючих молекул ліганду/рецептора між білками оболонки вірусу та клітинами рослини.

Оксид графену може проникати до клітини і проявляти антивірусну активність через взаємодію з вірусними нуклеїновими кислотами [14].



**Рис.1.5.** Вплив графену, наночастинок срібла на основі графену та оксиду графену на чутливі рослини салату, інфіковані вірусом кущистої карликовості томату. Т1: здоровий контроль; Т2: інфікований контроль; Т3: графен з вірусом; Т4: наночастинок срібла на основі графену з вірусом; Т5: оксид графену (12 мкг/мл) з вірусом; Т6: оксид графену (6 мкг/мл) з вірусом; Т7: оксид графену (3 мкг/мл) з вірусом; Т8: оксид графену (1,5 мкг/мл) з вірусом [14]

При дослідженні впливу на інфекцію, викликану вірусом хлоротичного пожовтіння гарбузових (*cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV)*) у рослин, оброблених наночастинками металу на основі графену, спостерігався нормальний ріст рослин порівняно з інфікованим контролем, а системні листки

не виявляли симптомів інфекції. Поширенню вірусної інфекції з інокульованих листків можна було запобігти шляхом позакореневого застосування наночастинок.

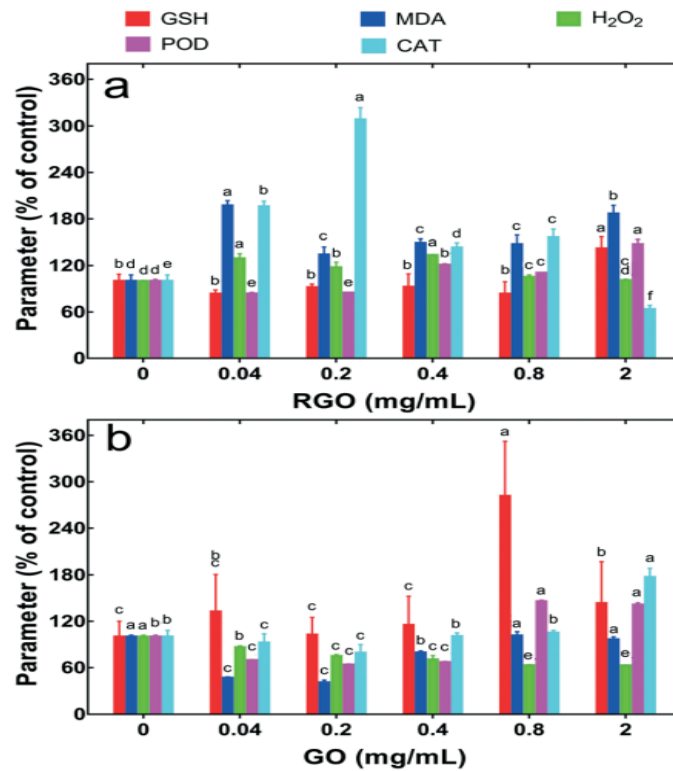
Крім того, подібна обробка частинками Fe та Zn дещо знижувала концентрацію мРНК капсидного білка вірусу, що свідчить про обмежений позитивний вплив, але ефект може бути не таким сильним, як у випадку впливу частинок на основі вуглецю [15].

### 1.3. Дія графену на рослинні ферменти

Було припущено, що інгібування фотосинтезу редукованим оксидом графену може бути пов'язане з оксидативним стресом. У всіх концентраціях графен підвищував рівень малондіальдегіду (MDA) та пероксиду водню ( $H_2O_2$ ) в листках. Активність каталази (CAT) зростала за низьких концентраціях і значно знижувалася за обробки 2,0 мг/мл графеном. При цьому активність пероксидази (POD) знижувалася за нижчих концентрацій і зростала за обробки 0,8 та 2,0 мг/мл графену. Цікаво, що графен спричиняв сильніший оксидативний стрес у листках, ніж у коренях. У коренях вміст глутатіону (GSH) та активність POD і CAT зростали, а рівні MDA і  $H_2O_2$  залишалися незмінними за обробки.

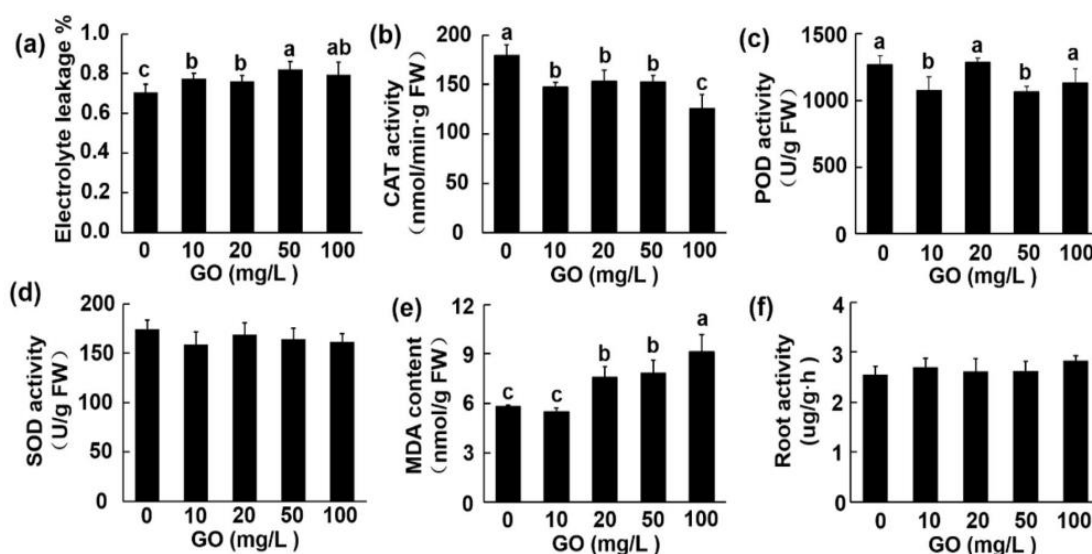
На противагу цьому, оксид графену спричиняв менш оксидативний стрес у листках. Вміст MDA та  $H_2O_2$  були нижчими за обробки 0,04, 0,2 та 0,4 мг/мл GO, ніж за обробки 0,04, 0,2 та 0,4 мг/мл графену були нижчими, ніж у контролі (рис. 1.6).

Вищезазначені експериментальні дані вказують на те, що оксидативне пошкодження було пов'язане з листям. На відміну від цього, у групі, що зазнала впливу графену, активність хлорофілу фотосистеми II не знижувалася, що було пов'язано з механізмом самозахисту рослин від оксидативного стресу [16].



**Рис. 1.6.** Оксидативний стрес у листках гороху за дії редукованого оксиду графену (а) та GO (б). Різні літери в кожному стовпчику для кожного параметра вказують на суттєві відмінності між двома групами [16]

У деяких роботах повідомляється про пошкодження мембран та оксидативний стрес, індукований обробкою графеном, який часто проявлявся у підвищенні витоку електролітів, вмісту MDA та активності антиоксидантних ферментів. Відповідно до попередніх досліджень, витік електролітів електролітного витоку корневих тканин демонстрував приблизно лінійну зміну з концентрацією графену (рис.1.7а). Для подальшого аналізу особливостей оксидативного стресу на корені алое вера (*Aloe vera*), активність антиоксидантних ферментів (POD, супероксиддисмутази (SOD), CAT) та вміст MDA. На подив, результат не показав підвищення активності жодного з трьох антиоксидантних ферментів після лікування оксидом графену. Графен значно пригнічував активність ферменту CAT у всіх концентраціях, тоді як активність ферменту POD була значно нижчою за концентрації 10 та 50 мг/л (рис.1.7б-с).

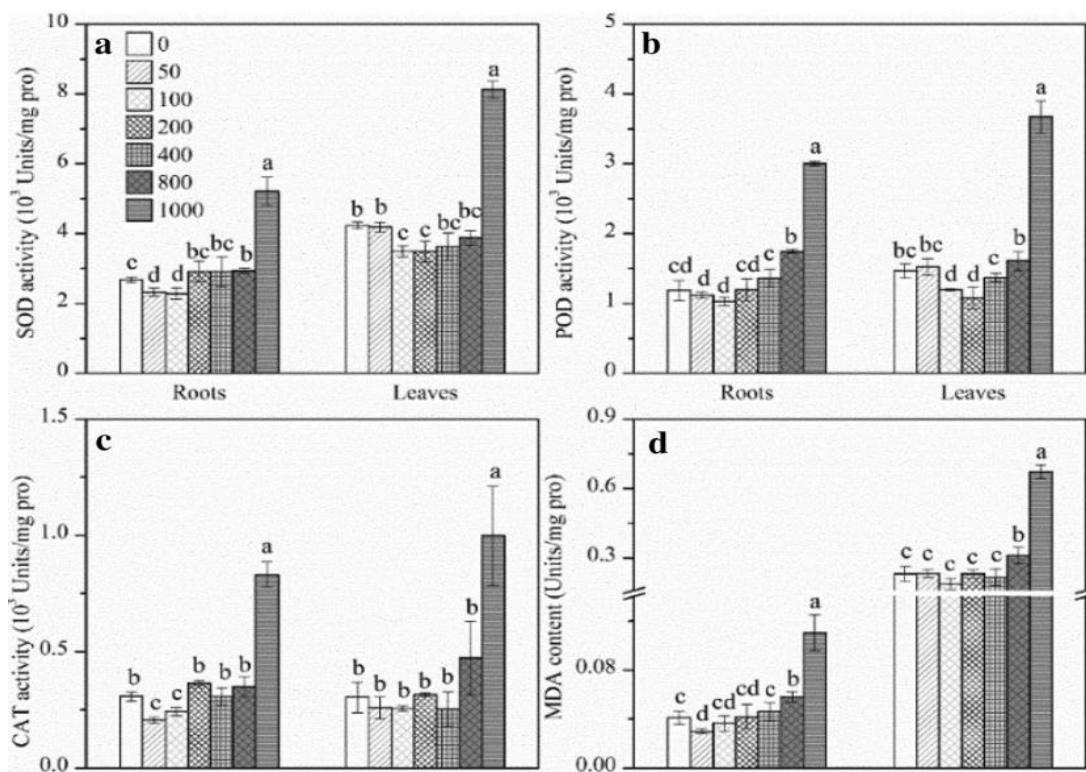


**Рис.1.7.** Вплив GO на витік електроліту (а); активність ферменту CAT (б); активність ферменту POD (в); активність ферменту SOD (г); вміст MDA (д); та активність кореневої системи проростків алое вера (*Aloe vera*) [17]

Очевидної різниці в активності SOD між різними концентраціями графену не виявлено. Вміст MDA демонстрував дозозалежне зростання, яке достовірно збільшувалося на 30,7%, 35,5% та 57,4% за концентрацій 20, 50 та 100 мг/л, відповідно (рис. 1.7d). Вміст MDA, важливого показника стресового пошкодження, значно підвищувався у рослинах після окислення ліпідів. Щоб перевірити, чи означає збільшення вмісту MDA зниження фізіологічної активності, оцінювали енергію росту коренів, і суттєвої різниці після обробки оксидом графену не було виявлено (рис. 1.7f). Ці результати свідчать про те, що обробка графеном не індукує типову стресову реакцію [17].

За високих концентрацій графену було продемонстровано оксидативний стрес і на прикладі проростків пшениці. Активність усіх антиоксидантних ферментів та вміст MDA в коренях після впливом наноматеріалу залежали від концентрації. Низька концентрація GO (50 мг/мл) значно знижувала активність ферментів, окрім POD. Проте за вищих концентрацій (400-1000 мг/мл)

активність цих трьох ензимів зростала зі збільшенням концентрації графену. Порівняно з контролем, активність SOD, POD та CAT у коренях, що зазнали впливу оксиду графену у концентрації 1000 мг/мл зростала на 94%, 153% та 170%, відповідно. Щоб підтримувати внутрішньоклітинний стабільний стан і нормальну фізіологічну активність під час стресів, у рослин виникають складні мережі для протистояння цим стресам, в яких антиоксидантні реакції були первинними (рис.1.8).



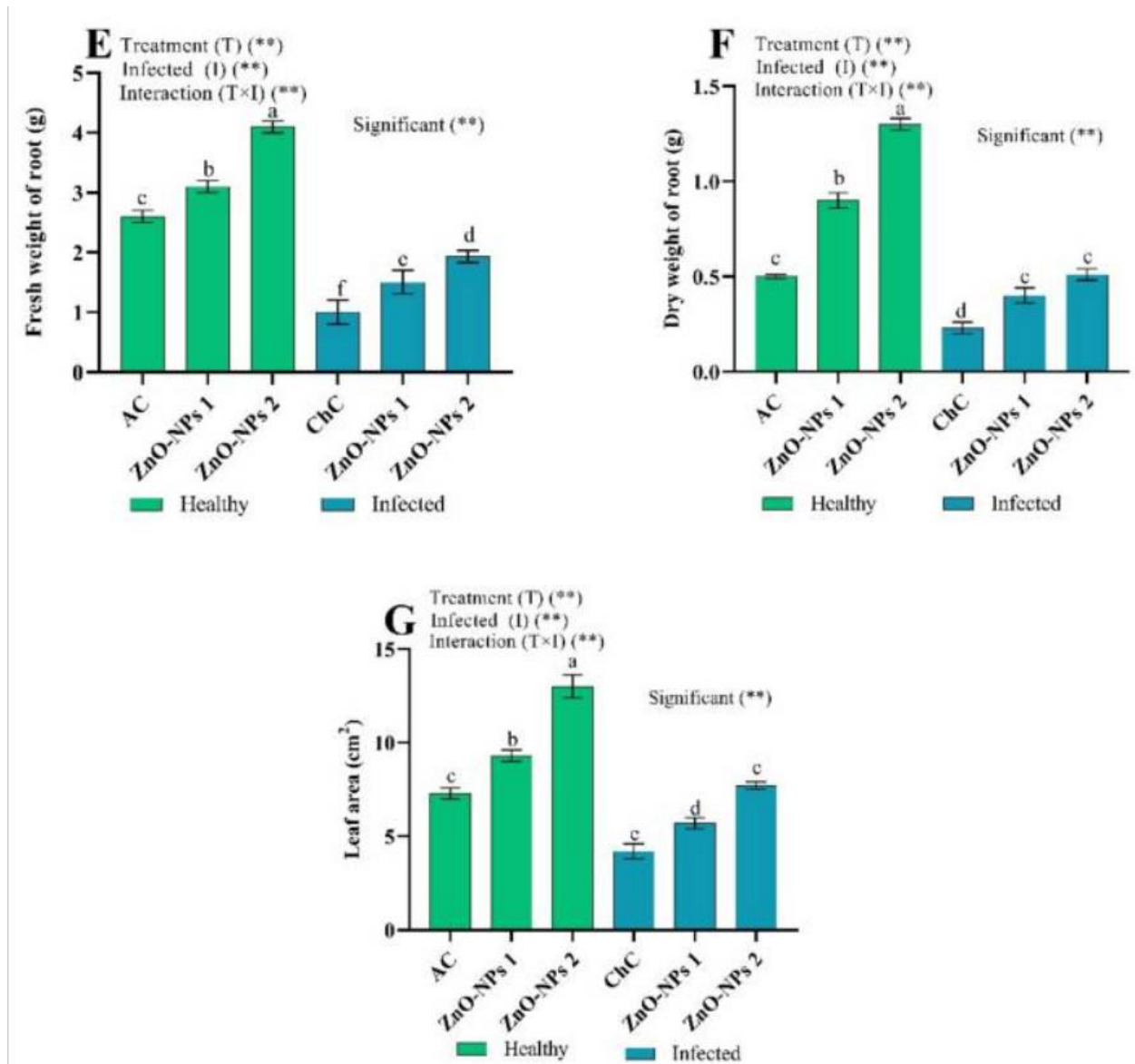
**Рис.1.8.** Оксидативний стрес пшениці проростків, що піддавалися впливу оксиду графену впродовж 14 діб: а) активність SOD; б) активність POD; в) активність CAT; г) активність MDA [18]

Результати показують, що активність трьох критично важливих антиоксидантних ферментів, включаючи SOD, POD і CAT, були підвищені у проростках, оброблених графеном в концентрації 1000 мг/мл. Через електронний транспорт, що каталізується трьома антиоксидантними ферментами, АФК могли

трансформуватися у воду та кисень і, таким чином, ці процеси певною мірою позбавляли проростки пшениці від стресу, спричиненого графеном [18].

Накопичені АФК швидко пошкоджують клітини пшениці через низку механізмів взаємодії, таких як взаємодія з біомолекулами, порушення роботи органел, атака на клітинні мембрани, що, зрештою, призводить до незворотних метаболічних дисфункцій, руйнування цілісності клітин, некрозу клітин та пригнічення росту. Тим не менш, деякі показники не були настільки чутливими за низьких концентрацій, наприклад, такі як активність САТ та вміст МДА. Графен у концентрації 1000 мг/мл продовжував помітно сприяти активності цих трьох ферментів та вмісту МДА в листках, на 92%, 150%, 228% та 189% вище за контроль для SOD, POD, САТ і МДА, відповідно [18].

У листках томатів, інфікованих ToMV, спостерігалось значне підвищення вмісту маркерів оксидативного стресу (проліну, фенолу, аскорбінової кислоти (AsA), глутатіону (GSH), перекисного окиснення ліпідів (MDA), загальної антиоксидантної активності (ТАА), пероксиду водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) та кисню (O<sub>2</sub>)) на 90,82%, 70,73%, 33,64%, 47,62%, 63,73%, 9,76%, 26,28% та 99,79%, відповідно, порівняно з контрольними значеннями (рис. 1.9) [19].



**Рис. 1.9.** Вплив позакореневого обприскування наночастинок оксиду цинку (50 мг/л) та (100 мг/л) на активність рослинних ферментів за умов абсолютного контролю (АК) та інфікування вірусом мозаїки томатів (ТоMV) [19]

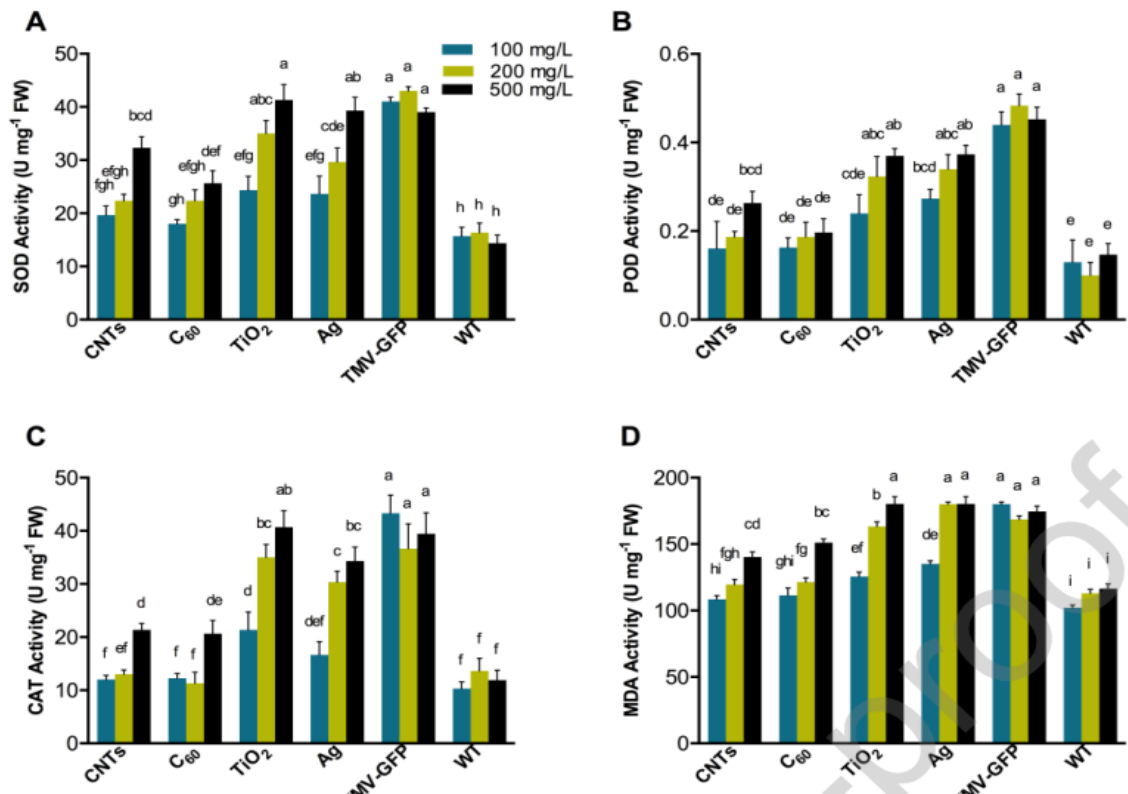
Різні біотичні стреси прискорюють генерування АФК, включаючи O<sub>2</sub>, 1O<sub>2</sub>, OH та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, що призводить до оксидативного стресу та/або АФК, основними АФК є радикали NO та NO<sub>2</sub>, а також нерадикали, включаючи N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, HNO<sub>2</sub>, NO- та ONOO-. Компоненти клітинних органел, такі як нуклеїнові кислоти, білки та ліпіди, порушуються під впливом окисного стресу, який, у свою чергу, втручається в регулярні функції мембран і клітинний метаболізм, що призводить

до перекисного окислення ліпідів і, зрештою, до запрограмованої загибелі клітин. Тому регулювання виходу АФК та/або РНС необхідне для уникнення шкідливого впливу АФК та/або РНС і забезпечення належної реалізації їхніх сигнальних функцій. Механізм антиоксидантного захисту ефективно усуває надлишок АФК, контролюючи активність різних ферментів, включаючи САТ, SOD, АРХ, на додаток до кількох неферментативних реакцій. SOD є важливим ферментним антиоксидантом для всіх аеробних видів, чутливих до оксидативного стресу, спричиненого АФК. САТ - фермент, який може розщеплювати  $H_2O_2$  безпосередньо на  $H_2O$  та  $O_2$  і є необхідним для детоксикації АФК за несприятливих умов. Пероксидаза відіграє вирішальну роль у захисті клітин вищих рослин шляхом знешкодження  $H_2O_2$  у водно-водному та глутатіон-аскорбатному циклах [19].

TMV збільшував активність SOD, POD та САТ на 161, 344 та 319% порівняно з контролем – дикий тип (WT), відповідно. НМ на основі вуглецю 100 мг/мл знижували рівні SOD, POD та САТ на 15-25% порівняно з контролем WT, що свідчить про те, що присутність НМ з вірусом незначно індукує оксидативний стрес. Аналогічно, вміст поглиначів АФК після обробки вуглецевими НМ значно збільшувався за концентрації 200 мг/мл порівняно з контролем WT. За концентрації 500 мг/мл НМ на основі вуглецю достовірно підвищували рівні SOD, POD та САТ ( $P \leq 0,005$ ) на 63-106%, 51-102% та 100-106%, відповідно, порівняно з контролем WT (рис. 1.10). І навпаки, НМ на основі вуглецю мали низький вміст АФК за концентрації 500 мг/л порівняно з контролем вірусу [20].

Коли рослини піддаються біотичному або абіотичному стресу, клітини, що зазнали впливу, беруть участь у метаболічному перепрограмуванні, щоб протидіяти токсичності. На відміну від тварин, рослини не диференціюють клітини для виконання імунної функції. Однак, рослинні тканини містять складні захисні системи, включаючи вироблення антиоксидантних ферментів. Зазвичай, значне збільшення активності антиоксидантної системи відбувається як частина загальної реакції на стрес. В результаті було виявлено, що активність каталази

залишалася низькою порівняно з зараженими рослинами після впливу 250 мг/мл наночастинок; також повідомлялося про зниження тяжкості захворювання на 51%.



**Рис. 1.10.** Вплив різних наночастинок на поглиначі АФК у листках *N. benthamiana*: (A) активність SOD, (B) активність POD, (C) активність CAT та (D) активність MDA [20]

Наночастинки можуть регулювати надлишкове утворення антиоксидантних ферментів, і після зараження рослинним клітинам не потрібно було підвищувати активність САТ, оскільки їхні рівні були достатньо високі, щоб відповісти на інфекцію. Ранній позакореневий вплив С60 у дозі 200 мг/мл не тільки пригнічує реплікацію ТМВ, але й обмежує його системне поширення в апікальні тканини. Водночас, ці частинки посилюють імунітет рослини, покращуючи продуктивність фотосинтезу та запускаючи захисні реакції проти ТМВ, що відображається у вигляді змінених рівнів антиоксидантних ферментів та фітогормонів, пов'язаних із захисними реакціями рослин [20].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали

Під час експерименту були використані наступні матеріали:

- стерильна дистильована вода;
- графен;
- неорганічні солі для приготування буферних розчинів;
- реактив Бредфорда;
- перекис водню;
- розчини метіоніну, рибофлавіну, нітросинього тетразолію;
- гваякол;
- розчини трихлороцтової та тіобарбітурової кислоти;
- Tween-20 (Loewe, Німеччина);
- карборунд;
- формвар (Serva, США);
- уранілацетат (Serva, США);
- мідні сіточки для електронної мікроскопії (Merck, Німеччина);
- 96-лунковий планшет для ІФА (Greiner Bio-One, Німеччина);
- колби;
- ступки;
- пробірки пластикові фірми «Eppendorf» на 1,5-2 мл (Eppendorf, Німеччина);
- насадки пластикові для автоматичних піпетних дозаторів;
- автоматичні піпетні дозатори на 20-200 мкл, 100-1000 мкл, 1000-5000 мкл.

Графен був наданий виробником – ФОП Мельник Ю.В. (Буча, Україна), за що висловлюється окрема подяка.

## 2.2. Інокуляція дослідних рослин

Для вивчення потенційного впливу графену на розвиток вірусної інфекції, появу симптомів та для оцінки вмісту вірусу використовували класичну модельну систему TMV – рослини тютюну *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, які реагують на вірус тютюнової мозаїки утворенням мозаїчних симптомів листках з їх подальшої деформацією.

Для експерименту рослини були поділені на чотири групи:

1. Рослини, інокульовані вірусом
2. Рослини, оброблені графеном
3. Рослини, інокульовані вірусом та оброблені графеном
4. Негативний контроль

Рослини інокульовали вірусом на стадії 4 справжніх листків. . Рослини інокульовали вірусом механічно, концентрація вірусу (TMV) становила 200 мкг/мл. Обробку графеном проводили обприскуванням двічі (одночасно з інокуляцією вірусом та ще через 2 тижні) у концентрації 1 мг/л. Групу рослин негативного контролю інокульовали таким же чином з використанням стерильного 0,1 М PBS, рН 7,4.

На третій тиждень (21 день після інфікування) після початку експерименту проводили огляд рослин на предмет появи візуальних симптомів інфекції та відбирали рослинний матеріал для подальших досліджень [21].

### 2.3. Імуноферментний аналіз

Для оцінки наявності та вмісту вірусу у дослідних рослинах використовувати імуноферментний аналіз (ІФА) у непрямій модифікації [22]. Сік здорових рослин тютюну слугував зовнішнім негативним контролем. Непрямий ІФА проводили у 96-лунковому планшеті за наступною методикою [23]:

- 1) Наносили АГ (рослинний матеріал розтирали у PBS, центрифугували при 4000 об/хв протягом 15 хв, відбирали надосад і вносили його безпосередньо у планшет по 50 мкл). Інкубували протягом ночі при +4°C. Відмивали 3 рази буфером відмивки (0,1М PBS + Tween-20).
- 2) Блокували 1% сухим молоком на PBS по 100 мкл. Інкубували протягом 2 годин при 37 °С. Відмивали 3 рази буфером відмивки.
- 3) Наносили АТ1 (поліклональні, кролячі) (вироблено на кафедрі вірусології) (у розведенні 1:10000 та 1:8000 – відповідно до сироваток, вносили у планшет по 100 мкл). Інкубували протягом ночі при +4°C. Відмивали 3 рази буфером відмивки.
- 4) Наносили АТ2 (антикролячі, баранячі), кон'юговані з лужною фосфатазою (Sigma, США) (у розведенні 1:30000, вносили у планшет по 100 мкл). Інкубували протягом 2 годин при температурі +4°C. Відмивали 3 рази буфером відмивки і 1 раз 0,1М PBS.
- 5) Вносили субстратний буфер з хромогеном - пара-нітрофенілфосфат (Loewe, Німеччина). Результати враховували на мікропланшетному спектрофотометрі (БіоТек, США) при довжині хвилі 405 нм. За позитивні результати приймали значення, що перевищували негативний контроль у три рази.

## 2.4. Трансмійна електронна мїкроскопїя

Чисте предметне скельце швидко занурювали в розчин формвару, через 5-10 с скло витягали та підсушують. Плівку, що утворилася на склі, можна виявити, якщо подихати на скло. Отриману плівку підрізали лезом бритви, потім знімали плівку на воду (скло повільно занурювали у воду під кутом 45°). На плівку викладали сітки і знімали їх за допомогою фільтрувального паперу. Сітки з плівкою висушувалися та зберігалися в чашках Петрі. На сіточку з плівкою наносили краплю суспензїї вірусного препарату. Рїдину відбирали фільтрувальним папером через 30-60 с, сіточку висушували. Надалі на сіточку наносили краплину контрастуючої речовини (2% уранїацетат) і через 1 хв відібрали рїдину; після просушування препарат готовий для дослідження [24]. Досліджували препарат в електронному мїкроскопї. Кїнцева концентрація вірусу, що використовувалася для аналізу під електронним мїкроскопом становила 150 мкг/мл. Концентрація графену складала 1 мг/л. Аналізувалися препарати вірусу, графену та їх комбїнація у зазначених концентрацїях.

## 2.5. Визначення активностї маркерних рослинних ферментів

Для визначення активностї ферментів, які вважаються маркерами оксидативного стресу рослин, готували екстракт з рослинного матерїалу. 0,15 г рослинного матерїалу розтирали у рїдкому азотї і додавали 2 мл 0,05 М калїй-фосфатного буферу (рН 7,8), переносили в мїкропробїрки. Надалі отриману суспензїю центрифугували протягом 5 хв при 15000 об/хв при +4°С. Відбирали супернатант, який використовували для визначення активностї ферментів [25].

### 2.5.1. Визначення супероксиддисмутазної активності

Для визначення активності SOD використовували наступні реакційні суміші:

1. 1 мл 0,0015% розчину рибофлавіну
2. 1 мл 5,82% розчину метіоніну в 0,5М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
3. 0,05 мл рослинного екстракту
4. 1 мл 0,154% нітросинього тетразолію в 0,5М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Досліджувані зразки інкубували протягом 5-8 хв на світлі.

Вимірювання оптичної густини проводили відносно контролю, що містив 0,05 М калій-фосфатний буфер (рН 7,8) замість рослинного екстракту. Оптичну густину визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 560 нм на спектрофотометрі Shimadzu UV1800 (Японія). Оцінку супероксиддисмутазної активності визначали проводили за її здатністю інгібувати утворення формагану відносно контролю [26].

### 2.5.2. Визначення каталазної активності

Для визначення активності САТ використовували наступні реакційні суміші:

1. 2,9 мл 0,05 М калій-фосфатного буферу (рН 7,0)
2. 0,09 мл екстракту
3. 0,01 мл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

До контрольної кювети не додавали перекис водню. Вимірювання оптичної густини проводили при  $\lambda = 240$  нм протягом 1 хв на спектрофотометрі Shimadzu UV1800 (Японія). Каталазну активність розраховували за коефіцієнтом молярної екстинції перекису водню [27].

### 2.5.3. Визначення гваяколпероксидазної активності

Для оцінки гваяколпероксидазної активності використовували наступні реакційні суміші:

1. 2,3 мл 0,05 М калій-фосфатного буферу (рН 7,0)
2. 0,6 мл 1% гваяколу
3. 0,01 мл екстракту
4. 0,01 мл  $\text{H}_2\text{O}_2$

До контрольної кювети не додавали перекис водню. Вимірювання проводили протягом 1 хв при  $\lambda = 470$  нм на спектрофотометрі Shimadzu UV1800 (Японія). Розрахунок гваяколпероксидазної активності проводили з урахуванням коефіцієнту молярної екстинції тетрагваяколу [28].

### 2.5.4. Визначення ТБК-активних сполук (за вмістом MDA)

Гомогенізували наважку (0,2 г) рослинного матеріалу у ступці з 0,1 М Тріс-НСІ буфером (рН 7,6). Переносили матеріал в мірні пробірки, доводили до 3 мл вміст. Додавали 2 мл 20% трихлороцтової кислоти та 1 мл 0,67% тіобарбітурової кислоти. Перемішували вміст пробірок. Надалі пробірки інкубували на киплячій водяній бані протягом 30 хв. Реакцію зупиняли охолодженням. Розчин центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв.

Вимірювали оптичну густину розчинів при двох довжинах хвиль –532 нм та 600 нм на спектрофотометрі Shimadzu UV1800 (Японія). Проводили вимірювання проти контролю, в який замість рослинного екстракту додавали буфер. Розрахунок вмісту MDA проводили з урахуванням коефіцієнту молярної екстинції малонового діальдегіду [29].

## **2.6. Статистична обробка експериментальних даних**

Статистичний аналіз експериментальних даних проводили за параметричними критеріями середнього значення даних, стандартне відхилення середніх значень визначали з використанням комп'ютерної програми Excel Office365.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Вплив графену на перебіг системної вірусної інфекції в модельних рослинах

Для вивчення потенційного впливу графену на розвиток системної вірусної інфекції використовували класичну модельну систему «ВТМ – *Nicotiana tabacum* cv. Samsun». Дані рослини реагують на інокуляцію ВТМ з утворенням мозаїчних симптомів на листках (10-14 д.п.і.) з їх подальшою деформацією (21-35 д.п.і.), що веде до загальної затримки росту.

Для визначення стану дослідних рослин використовували їх візуальну оцінку на предмет часу появи вірус-індукованих симптомів та можливого токсичного впливу графену, а також імуноферментний аналіз для порівняльного аналізу вмісту вірусу в рослинах під дією графену.

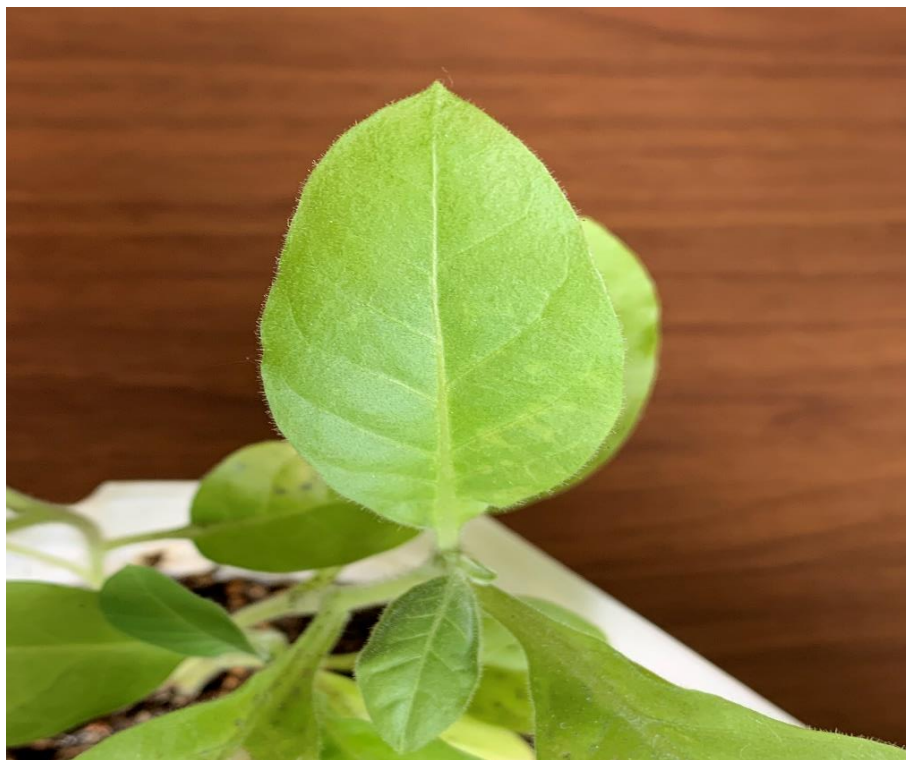
Візуальна оцінка дослідних рослин показала, що на шостий день після інокуляції з'явилася перша пара листків із вірусоподібними симптомами. Це проявлялося у групі рослин, інфікованих вірусом (TMV) (рис. 3.1).

На наступний день (7 д.п.і.) у групі вірус-інфікованих рослин спостерігали листки із закрученістю по краях. У той же час, симптомів у групі вірус-інфікованих рослин, оброблених графеном, не спостерігали. Системні ознаки вірусної інфекції на оброблених графеном рослинах з'явилися лише на 20-21 день після інфікування (рис. 3.2), тобто із затримкою у 14-15 діб порівняно з інокульованими рослинами, які не оброблялися наносполукою. Контрольні рослини не проявляли симптомів (рис. 3.3). При цьому станом у неінокульованих

рослин, оброблених графеном, не спостерігали візуальних ознак токсичного впливу наносполуки на рослини (рис. 3.4).



**Рис.3.1.** Системні мозаїчні вірусоподібні симптоми на вірус-інфікованій рослині, необробленій графеном (6 день після інфікування)



**Рис.3.2.** Системні мозаїчні вірусоподібні симптоми на вірус-інфікованій рослині, обробленій графеном (21 день після інфікування)



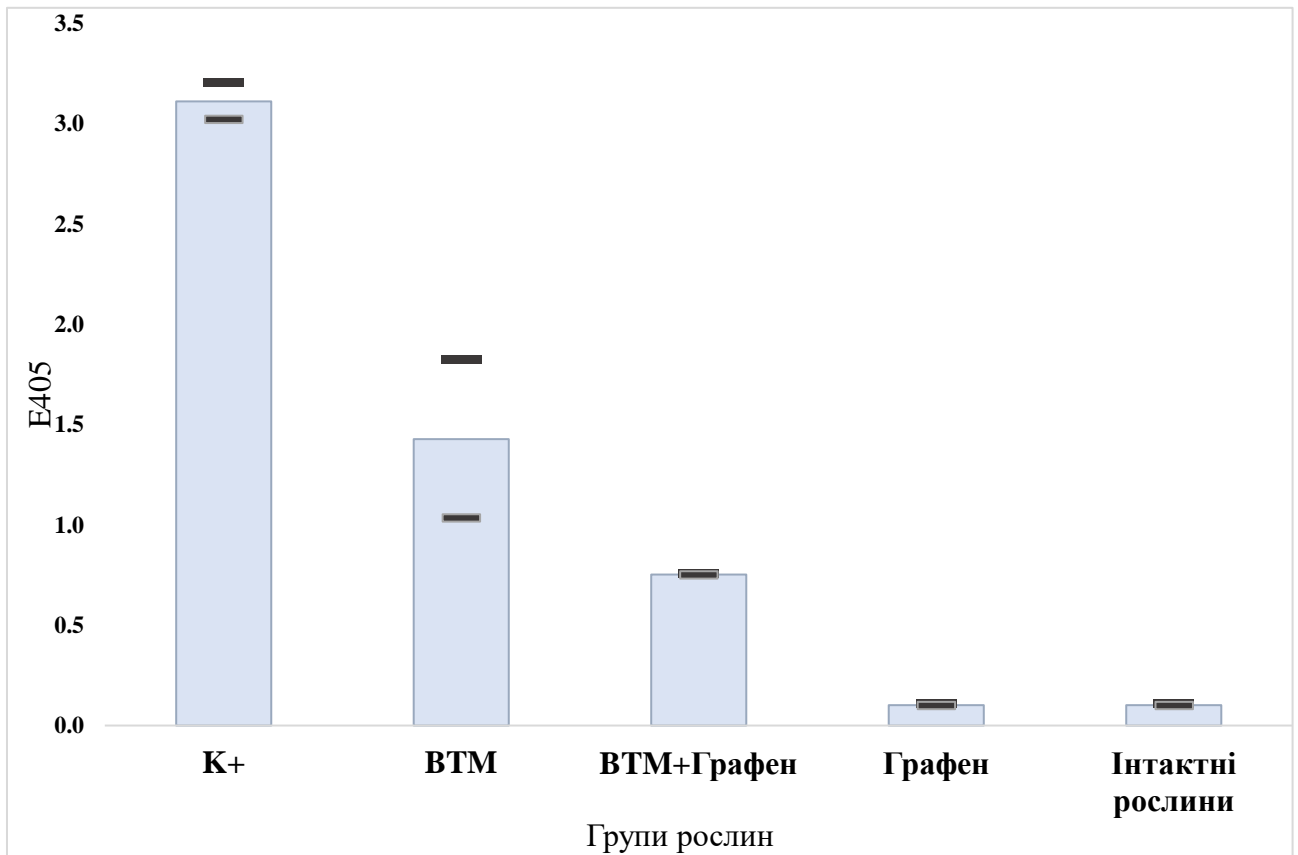
**Рис.3.3.** Інтактні рослини



**Рис.3.4.** Неінокульовані рослини, оброблені графеном

Таким чином, виходячи з візуальної оцінки впливу графену власне на рослини чи на розвиток системної інфекції у сприйнятливих рослинах тютюну підтверджено інгібуючий вплив наносполуки на появу вірусоспецифічних симптомів та відсутність її токсичної дії на рослини.

Надалі проводили ІФА у непрямій модифікації для оцінки впливу обробки рослин графеном на вміст вірусу в інокульованих рослинах. Для визначення вмісту вірусу використовували показник оптичної густини ( $\lambda = 405$  нм) для зразків рослин (описані вище дослідні групи 1-4), що мали еквівалентну масу і були відібрані на 21 день після інфікування (рис.3.5).



**Рис.3.5.** Вплив графену на вміст вірусу тютюнової мозаїки в системно інфікованих рослинах *N. tabacum* cv. Samsun. Позначення: E405 – оптична густина при довжині хвилі 405 нм; К+- внутрішній позитивний контроль в ІФА, ВТМ - вірус-інфіковані рослини; ВТМ + Графен - вірус-інфіковані рослини, оброблені графеном; Графен - неінфіковані рослини, оброблені графеном; Інтактні рослини – здорові рослини в якості негативного контролю

Як видно з рис. 3.5, графен індукує значне і достовірне зниження вмісту ТМВ у дослідних рослинах у 53%. Таким чином, результати ІФА (рис.3.5) узгоджуються з даними візуальної оцінки розвитку вірусної інфекції (рис. 3.1-3.4) і свідчать про інгібуючий вплив графену на розвиток системної вірусної інфекції *in vivo*.

Дослідження такого роду проводилися і на інших модельних об'єктах, зокрема на арабідопсісі. Через п'ять днів площа листків *A. thaliana*, вирощених на середовищі MS та на середовищі 1000 мкг/л GO/MS, була дещо більшою, ніж

у рослин, вирощених на середовищах 100 та 10 000 мкг/л GO/MS. Площа рослин у всіх експериментальних групах збільшилася через 10 днів після висаджування, причому найбільшою вона була у рослин, вирощених на середовищі 1000 мкг/л GO/MS. Площі рослин, вирощених на середовищі MS та 100 і 10 000 мкг/л GO/MS, суттєво не відрізнялися одна від одної. Через 10 днів після висаджування середня свіжа маса становила 5,03 мг для групи з середовищем MS, 4,98 мг для групи з середовищем 100 мкг/л GO/MS, 5,13 мг для групи з середовищем 1000 мкг/л GO/MS і 4,50 мг для групи з середовищем 10 000 мкг/л GO/MS, без суттєвих відмінностей між різними групами [30].

Ці спостереження за високими концентраціями узгоджуються з даними вчених, які піддавали боби фави впливу GO у концентрації 1600 мг/л і виявили, що GO призводить до зменшення росту, зниження активності антиоксидантних ферментів, загибелі та більшого витоку електролітів, але токсичність не спостерігалася при концентрації нижче 800 мг/л GO. Це явище, можливо, пов'язане з властивостями наноматеріалів. У попередньому дослідженні повідомлялося, що листи GO можуть діяти як фактор росту клітин та індукувати їх поділ і проліферацію при низьких дозах. Цікаво, що ріст стебла пригнічувався після інкубації з суспензією GO, а інгібуючий ефект посилювався зі збільшенням концентрації. Довжина кореня і стебла збільшилася на 19,27% і 19,61% за впливу 2000 мкг/мл. Ці результати узгоджуються з висновком попереднього дослідження рослин, що графен значно індукує фітотоксичність у овочевих рослин після 20 днів експозиції в модифікованому середовищі Хогланда при концентраціях 500-2000 мкг/мл. Більше того, ще одне спостереження показало, що комбінований вплив GO і ПЕГ 6000 (20%) або NaCl (200 мМ) призводить до більш сильної токсичності для проростків арабідопсису, зменшуючи свіжу вагу або довжину коренів. Видно, що функціоналізація поверхні суттєво впливає на біологічні ефекти вуглецевих наноматеріалів [31].

Проростки рису піддавалися гідропонному впливу суспензій НМ з концентраціями 0, 10, 50, 150 мг/л протягом 20 днів. Вплив 150 мг/л наноматеріалу призвів до зменшення довжини коренів та пагонів на 21% та 29%

відповідно. НМ значно зменшував довжину коренів і пагонів приблизно на 70% і 57% за концентрації 150 мг/л [32].

Швидкість появи симптомів квасолі кутастої (*V. angularis*) розраховували протягом п'яти послідовних днів після одного тижня висаджування з шістьма концентраціями графену: 0 мг/л, 0,01 мг/л, 0,10 мг/л, 1,00 мг/л, 10,00 мг/л, 100,00 мг/л. Результати показали, що графен затримував час появи симптомів у *V. angularis* з першого по четвертий день, за винятком групи 1,00 мг/л, яка мала підвищену швидкість появи симптомів. На п'яту добу частота появи в усіх експериментальних групах становила 100%. Загалом, результати показали, що вплив графену на висоту рослин, діаметр стебла та площу листків *V. angularis* був послідовним. Було виявлено, що концентрація графену 1,00 мг/л найкраще стимулювала ріст рослин *V. angularis* [33].

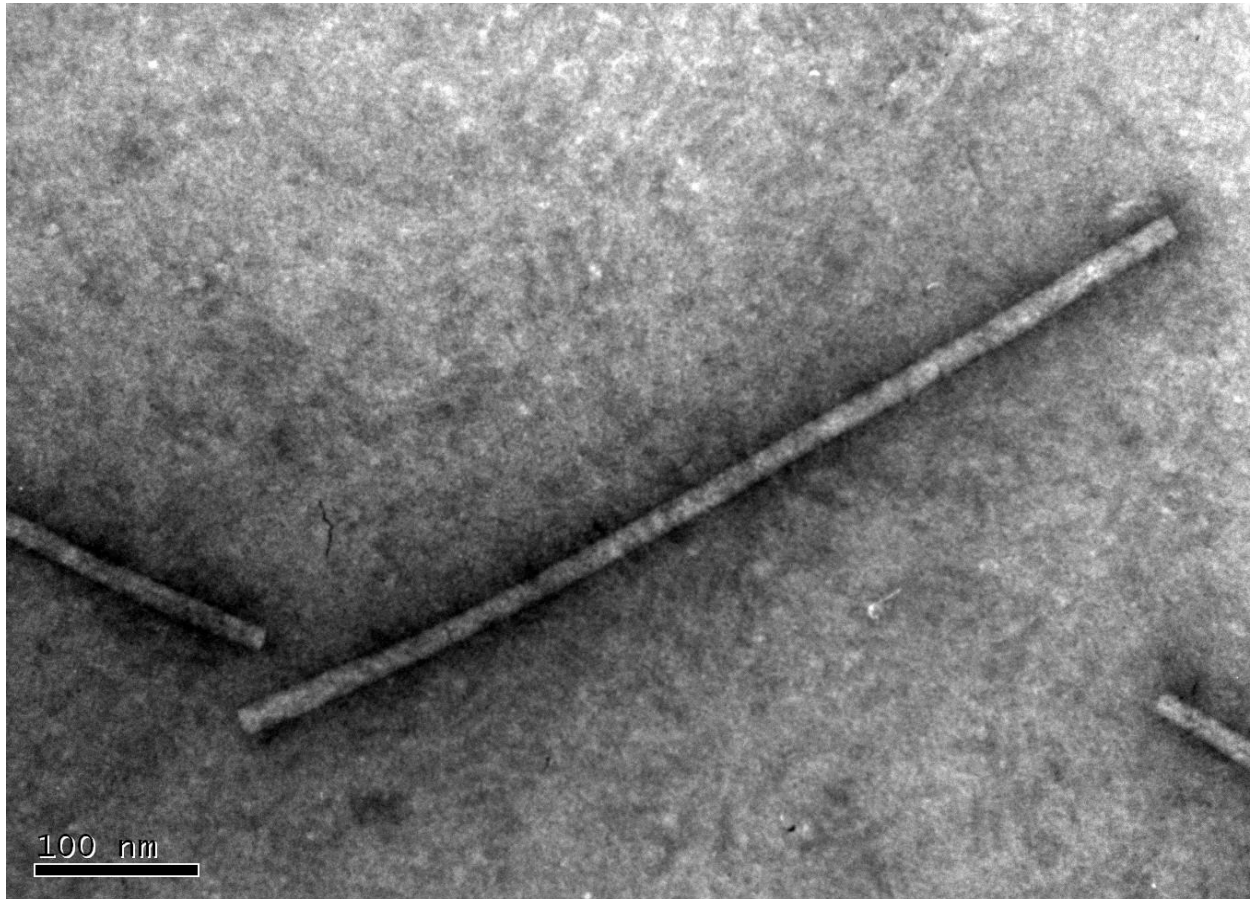
Наші дані частково узгоджуються з результатами інших дослідників.

### **3.2. Візуальна оцінка взаємодії вірусу та графену *in vitro***

З урахуванням наведених вище результатів наступним етапом роботи були електронно-мікроскопічні дослідження взаємодії віріонів TMV та наночастинок графену в умовах *in vitro*. Це дозволить визначити, чи може графен утворювати агрегати з вірусними частинками, що теоретично могло б завадити потраплянню вірусу до клітин чи його подальшій депротейнізації, та пояснити механізм інгібуючого впливу наносполуки на розвиток вірусоспецифічних симптомів та зниження вмісту вірусу у системно інфікованих рослинах.

Для дослідження використали три зразки у формі водної суспензії: вірус, графен та вірус + графен. Кінцева концентрація вірусу становила 150 мкг/мл, що забезпечувало достатньо чітку візуалізацію вірусних частинок без надмірного скупчення агрегатів віріонів. Концентрація графену становила 1 мг/л.

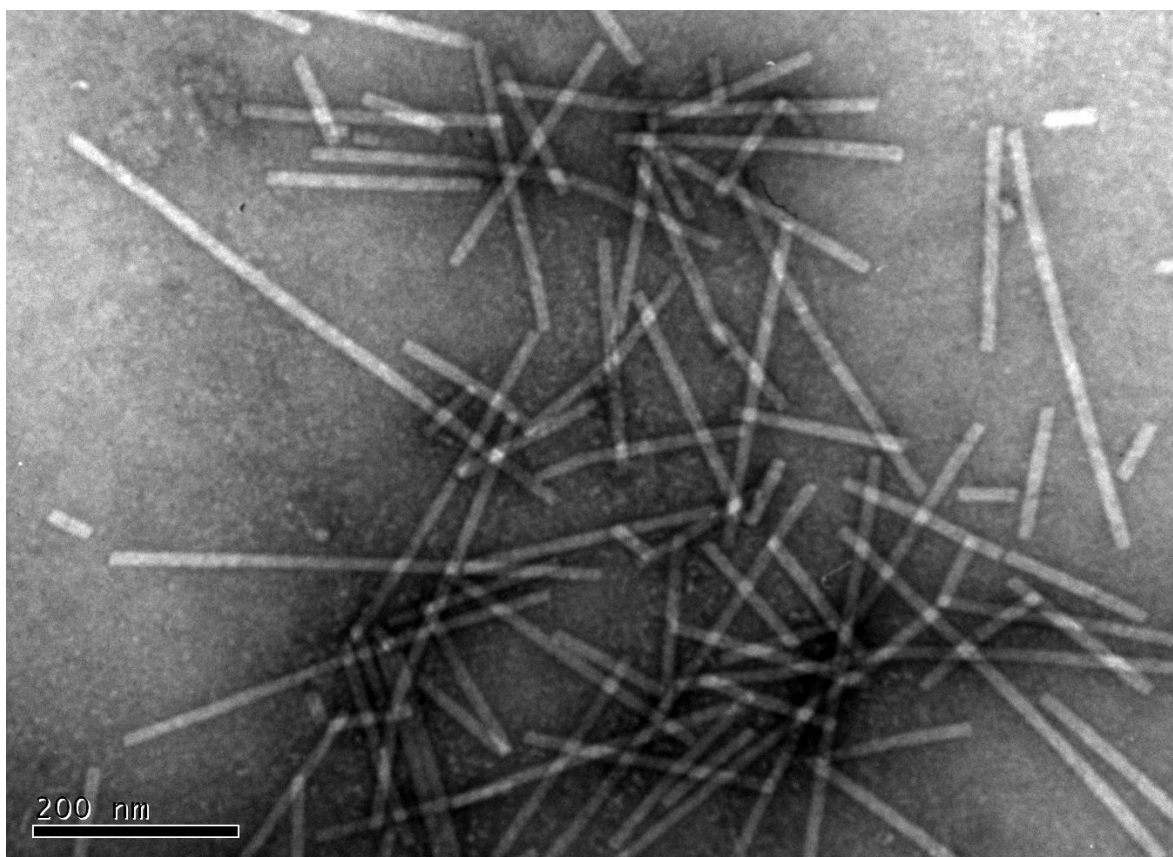
На рис. 3.6 та 3.7 показані мікрофотографії вірусних частинок очищеного препарату TMV, який був використаний у роботі.



**Рис.3.6.** Мікрофотографія вірусу тютюнової мозаїки. Масштабна лінійка: 100 нм. Збільшення: x10800

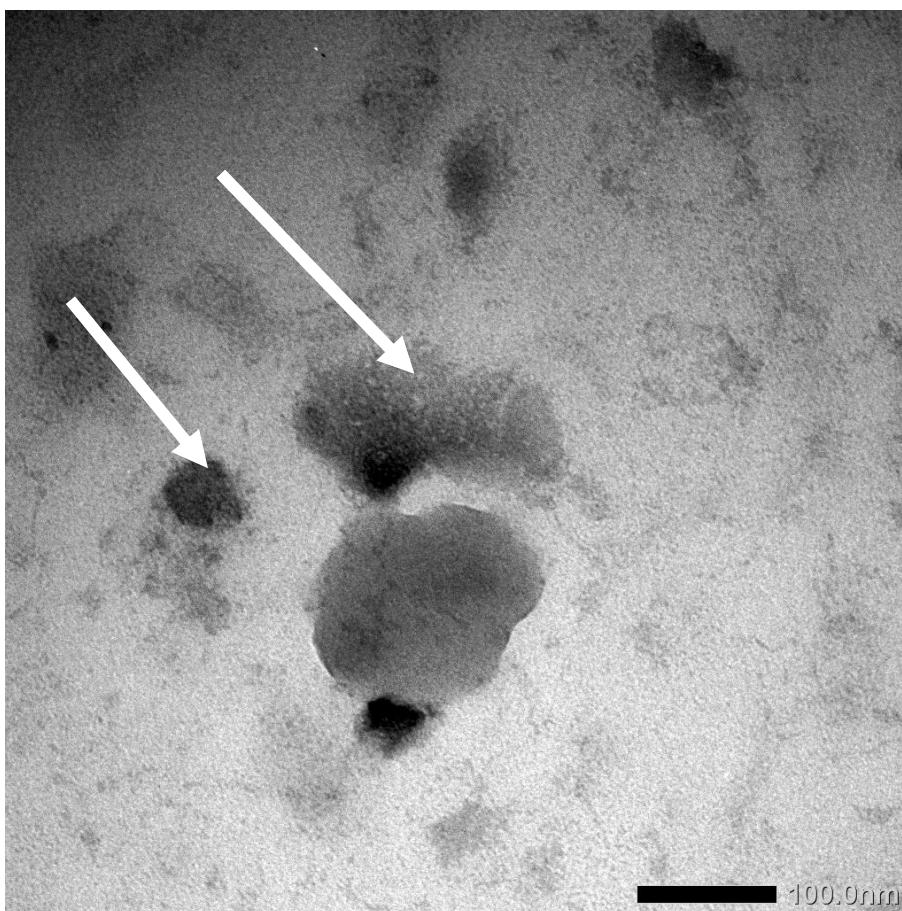
Як видно з рис.3.6, препарат вірусу відрізнявся високим ступенем очистки, а у полях зору були помітні окремі паличкоподібні віріони TMV.

Концентрація використаної суспензії вірусу була достатньо низкою, щоб запобігти утворенню щільних агрегатів віріонів (рис. 3.7).



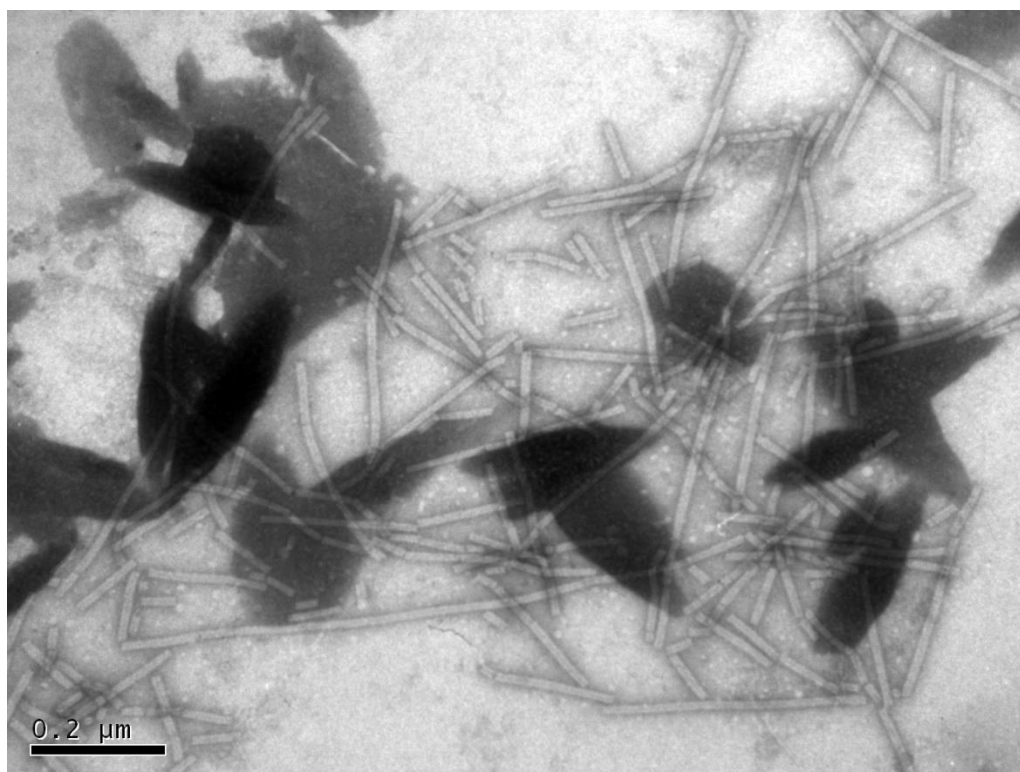
**Рис.3.7.** Мікрофотографія скупчення вірусу тютюнової мозаїки. Масштабна лінійка: 200 нм. Збільшення: x11000

Як видно з наведеного рис.3.8, порошкоподібний графен у вигляді розведеної суспензії утворював дисперсно розташовані гранули (на рисунку показані стрілками).

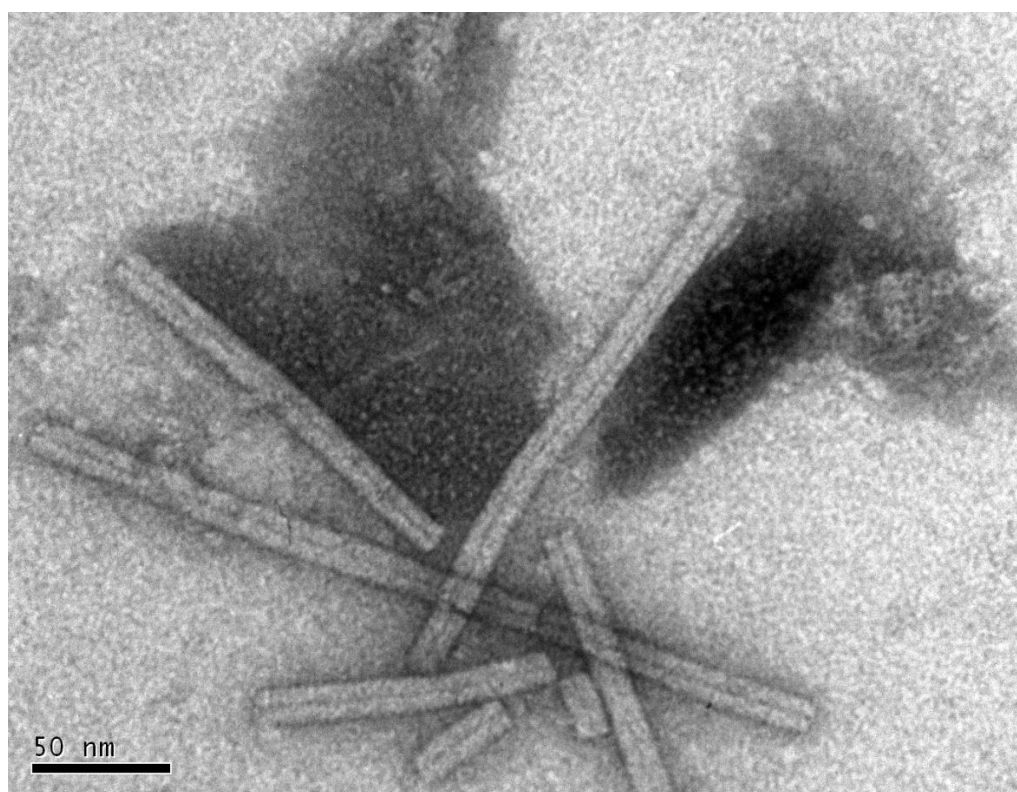


**Рис.3.8.** Мікрофотографія графену. Стрілками показані гранули графену..  
Масштабна лінійка: 100 нм. Збільшення: x12500

На рис.3.9, 3.10 представлені скупчення вірусних частинок при додаванні графену.



**Рис.3.9.** Мікрофотографія скупчень віріонів вірусу тютюнової мозаїки та наночастинок графену. Масштабна лінійка: 0,2 мкм. Збільшення: x12000



**Рис.3.10.** Мікрофотографія віріонів вірусу тютюнової мозаїки та наночастинок графену. Масштабна лінійка: 50 нм. Збільшення: x10500

Таким чином, порівнюючи отримані дані мікроскопічних досліджень (зокрема, рис.3.9 та 3.10), нами не було отримано підтверджень того, що графен помітно сприяє утворенню скупчень віріонів вірусу тютюної мозаїки. Отже, зазначений раніше супресивний вплив графену на вміст вірусу у рослинах не може пояснюватися його безпосередньою нейтралізуючою дією на вірусні частинки.

Графенові мембрани були виявлені за випадковими плямами бруду на поверхні та ідентифіковані як моношари за дифракційними картинами, що спостерігалися під нахилом. Більш детальний огляд виявив наявність молекул TMV на поверхні. На зразках графену видно два типи забруднення. Один - плямистий, з типовим розміром у кілька сотень нанометрів і висококонтрастними характеристиками. Другий тип забруднення демонструє суцільний сірий фон, який забезпечує високий контраст між графеном і порожнім простором. Теоретично, краще центрифугування і фільтрація повинні допомогти в усуненні такого забруднення. Незважаючи на сильне забруднення, окремі віріони TMV чітко видно (навіть без фарбування) як стрижнеподібні об'єкти, а їхня довжина і діаметр оцінюються приблизно в 18 нм завширшки і 300 нм завдовжки, що цілком узгоджується з описами, згаданими вище. Контраст, досягнутий в наших експериментах, становить близько 0,3. Таку гарну видимість вірусів можна пояснити тим, що графен сам по собі забезпечує надзвичайно слабе поглинання, а адсорбоване забруднення все одно нижче, ніж на звичайних підкладках (аморфна вуглецева плівка) [34].

На відміну від інших досліджень, графен, що використовувався при дослідженні був у формі не нанолістів, а у вигляді порошку.

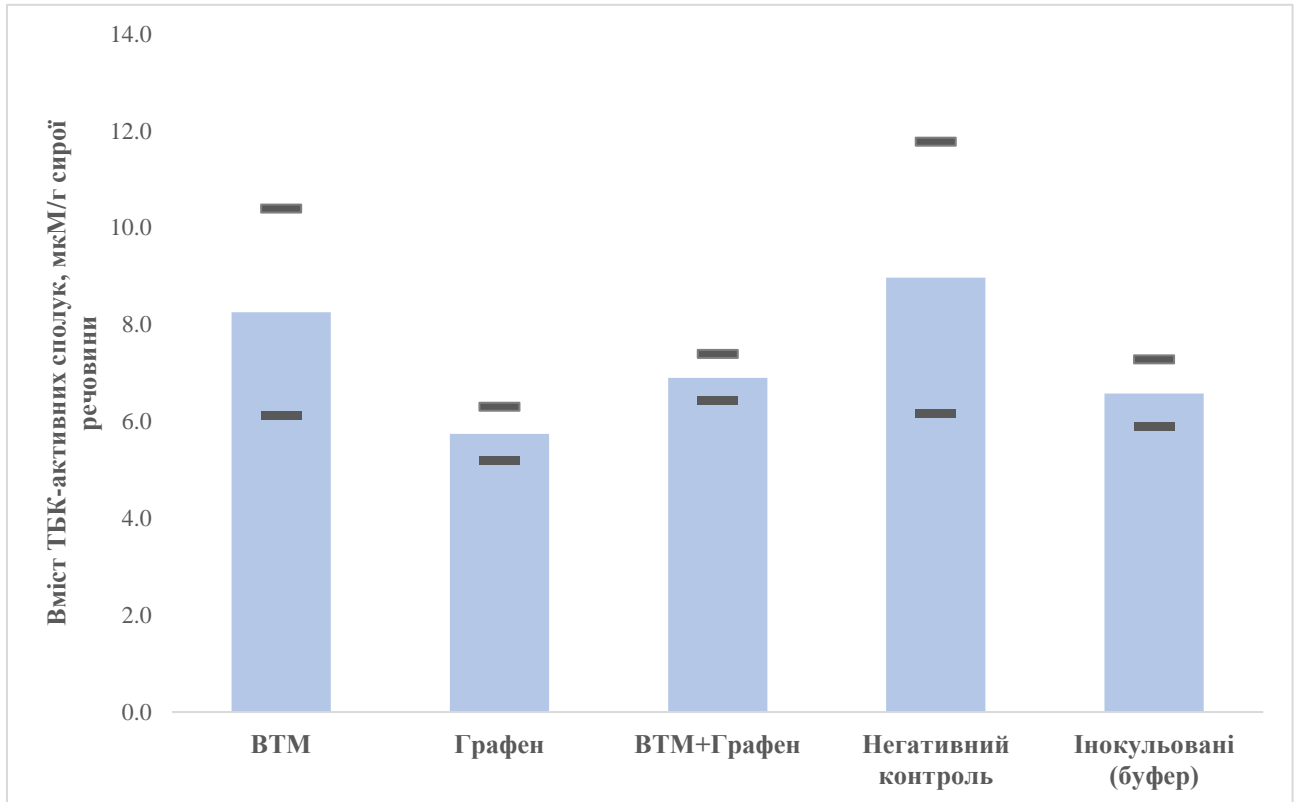
### **3.3. Аналіз активності рослинних ферментів за умов оксидативного стресу**

Для оцінки активності ферментів на стрес, вірогідно спричинений вірусом та/або графеном, рослини були поділені на п'ять експериментальних груп:

1. Рослини, інокульовані вірусом
2. Рослини, оброблені графеном
3. Рослини, інокульовані вірусом та оброблені графеном
4. Негативний контроль
5. Інокульовані рослини (буфер)

MDA, CAT, SOD та POD є основними маркерами оксидативного стресу. MDA є одним з кінцевих продуктів перекисного окислення поліненасичених жирних кислот у клітинах рослини. CAT - ключовий фермент у метаболізмі  $H_2O_2$  та активних форм азоту, що також регулює вміст АФК. Завдяки своїй активності фермент SOD контролює рівні різноманітних АФК та азоту, таким чином обмежуючи потенційну токсичність цих молекул. POD також є ферментом, що окислює різні субстрати за допомогою  $H_2O_2$  і запобігає надмірному накопиченню  $H_2O_2$ , що утворюється в умовах стресу. Тому були вибрані дані ферменти для аналізу їх активності за умов оксидативного стресу.

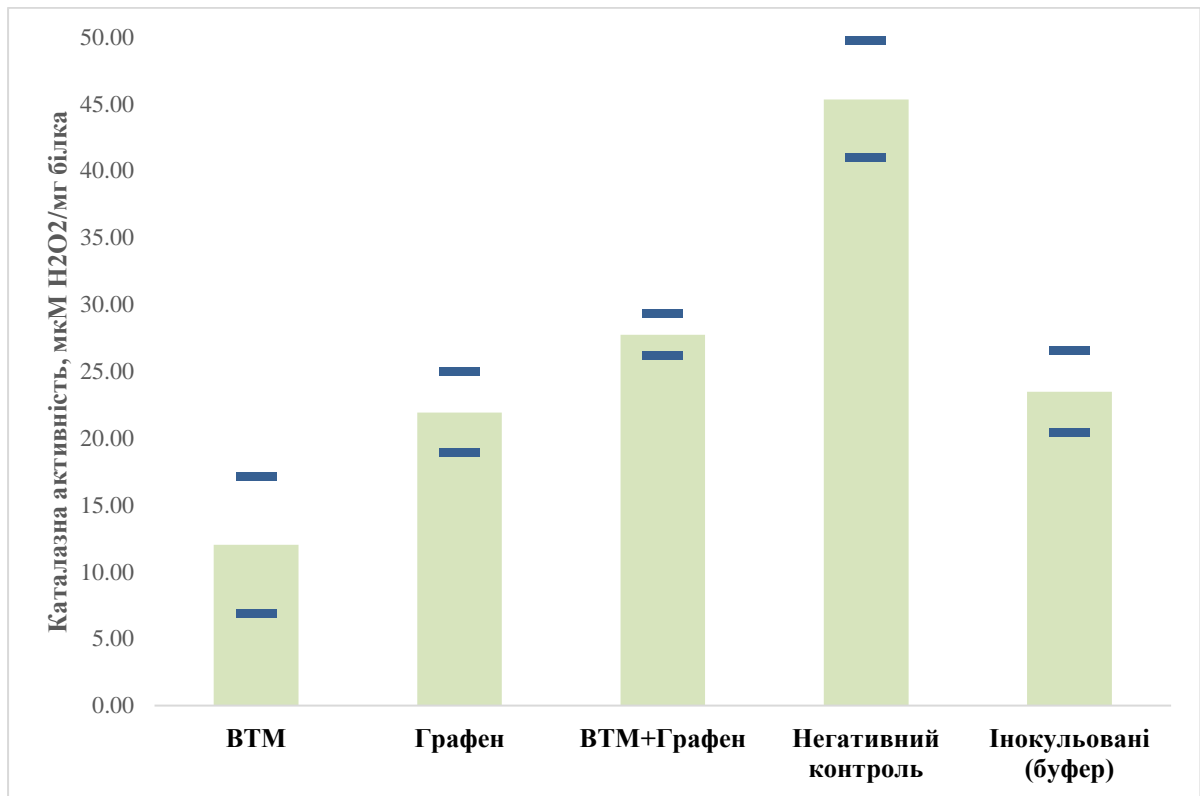
Як видно з рис.3.11, активного виділення MDA не було зареєстровано.



**Рис.3.11.** Вміст ТБК-активних сполук в дослідних рослинах *N. tabacum* cv. Samsun. Позначення: ВТМ - вірус-інфіковані рослини; ВТМ + Графен - вірус-інфіковані рослини, оброблені графеном; Графен - неінфіковані рослини, оброблені графеном; Негативний контроль - інтактні рослини; Інокульовані (буфер) – здорові рослини, механічно інокульовані 0,1М PBS в якості негативного контролю

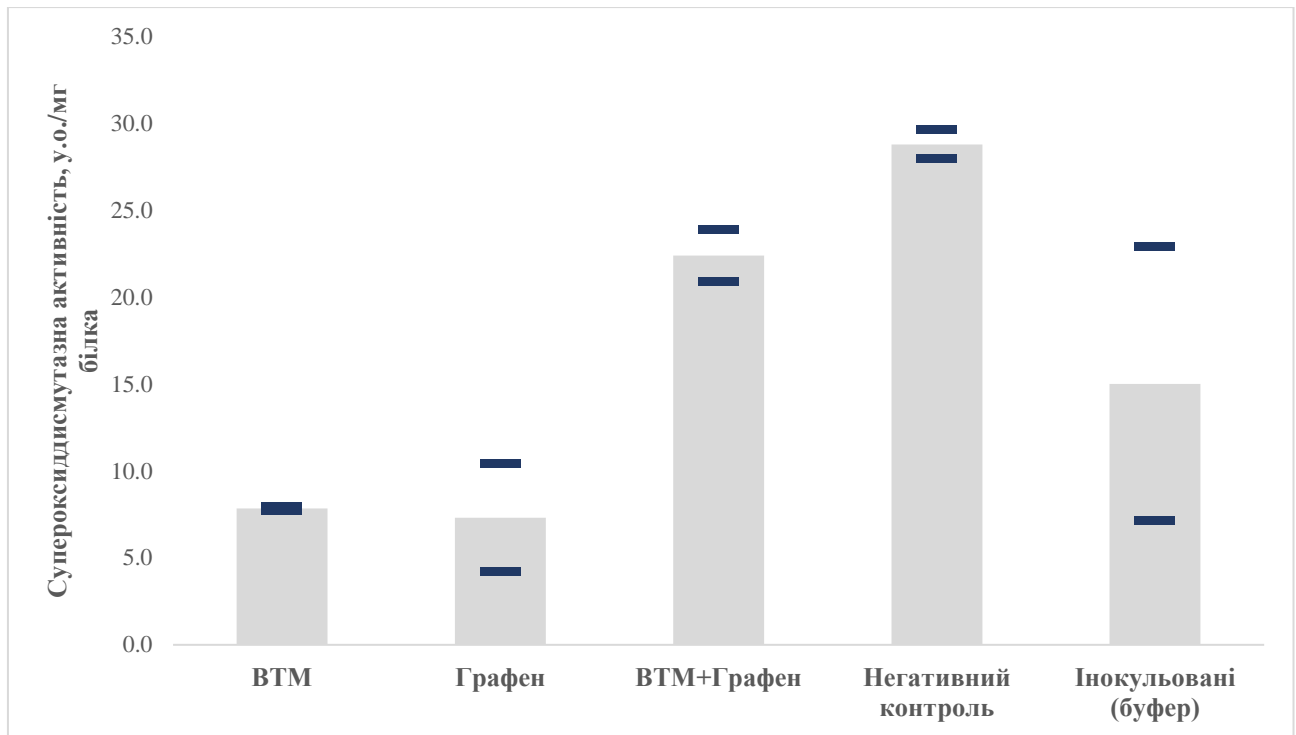
Виходячи з літературних даних [40], вміст MDA зазвичай збільшується при обробці графеном. Тим не менш, значення для груп рослин «Графен» та «Графен + вірус» майже не відрізняються.

На рис.3.12 можна спостерігати високе виділення каталази у рослин з групи негативного контролю. На противагу цьому, всі інші значення не були високими. Найнижчі показники були зареєстровані для групи рослин, які були інокульовані TMV.



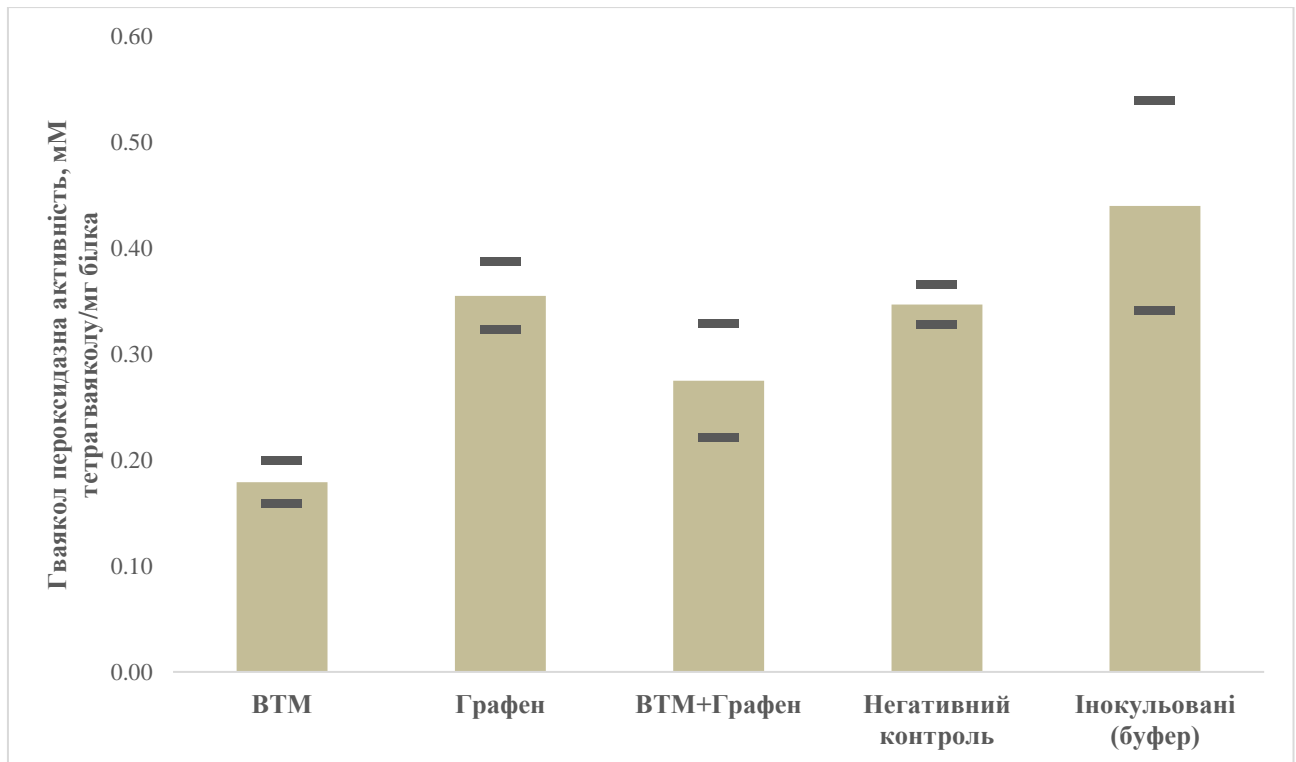
**Рис.3.12.** Каталазна активність в дослідних рослинах *N. tabacum* cv. Samsun. Позначення: ВТМ - вірус-інфіковані рослини; ВТМ + Графен - вірус-інфіковані рослини, оброблені графеном; Графен - неінфіковані рослини, оброблені графеном; Негативний контроль - інтактні рослини; Інокульовані (буфер) – здорові рослини, механічно інокульовані 0,1М PBS в якості негативного контролю

Виходячи з результатів, наведених на рис. 3.13, помітно, що активність SOD проявлялася у зразках рослин з груп негативного контролю та «ВТМ + графен». Активність даного ферменту у зразках рослин «ВТМ + графен» не проявлялася.



**Рис.3.13.** Супероксиддисмутазна активність в дослідних рослинах *N. tabacum* cv. Samsun. Позначення: ВТМ - вірус-інфіковані рослини; ВТМ + Графен - вірус-інфіковані рослини, оброблені графеном; Графен - неінфіковані рослини, оброблені графеном; Негативний контроль - інтактні рослини; Інокульовані (буфер) – здорові рослини, механічно інокульовані 0,1М PBS в якості негативного контролю

З рис.3.14 видно, що активність POD спостерігалася у зразках рослин, оброблених графеном, та рослинах, які були інокульовані буфером.



**Рис.3.14.** Гваякол-пероксидазна активність в дослідних рослинах *N. tabacum* cv. Samsun. Позначення: ВТМ - вірус-інфіковані рослини; ВТМ + Графен - вірус-інфіковані рослини, оброблені графеном; Графен - неінфіковані рослини, оброблені графеном; Негативний контроль - інтактні рослини; Інокульовані (буфер) – здорові рослини, механічно інокульовані 0,1М PBS в якості негативного контролю

Таким чином, результати (рис.3.11-3.14) показують, що вірусна інфекція може бути причиною низького вмісту рослинних ферментів (маркерів оксидативного стресу), що частково узгоджується з наявними літературними даними.

Зокрема, було вивчено вплив тобамовірусної інфекції на часові зміни активності пероксидази, каталази, а також на показники оксидативного стресу. Паростки томатів показали сильне зростання активності пероксидази через 24 год після інокуляції TMV або ToMV, тоді як у проростків перцю спостерігалось менше зростання активності пероксидази. Щодо активності каталази, то у всіх випадках вірусна інфекція викликала її зниження, особливо у ToMV-інфікованих

проростках болгарського перцю та TMV-інфікованих проростках томату. Ці взаємодії між рослинами та вірусами призводили до накопичення більшої кількості  $H_2O_2$ , і, відповідно, вищих рівнів окислення білків та перекисного окислення ліпідів, відповідно [35].

Активність антиоксидантних ферментів підтримує АФК на оптимальному рівні. Зниження активності антиоксидантних ферментів, зокрема SOD і CAT в рослинах, інфікованих вірусом, може бути захисною реакцією рослини на вірусну інфекцію, оскільки це призводить до збільшення кількості супероксидних аніон-радикалів і пероксиду водню. Ці ферменти можуть бути біомаркерами, які пояснюють низьку сприйнятливість вірусу. Іншим можливим поясненням значно нижчої активності SOD і CAT може бути втручання вірусу [36].

Аналізуючи рівні  $H_2O_2$ , через 7 днів вони значно знижувалися зі збільшенням концентрації GO порівняно з контролем. Можна помітити, що в міру росту проростків рівень  $H_2O_2$  знижувався, згідно з аналізами, проведеними на 14 і 21 день. Однак наприкінці періоду, коли проростки були добре розвинені, рівень  $H_2O_2$  мав тенденцію до зростання, причому вищі значення спостерігалися в контрольному варіанті без додавання GO.

Що стосується рівня малонового діальдегіду (MDA), продукту перекисного окислення ліпідів, то не було виявлено суттєвої взаємодії між часом оцінки та концентрацією GO. Рівень MDA знижувався через 14 днів, що збігається з розвитком проростків. Найвище початкове значення спостерігалось на 7 добу, що відповідає початковій фазі проростання з проростанням проростків.

Що стосується питомої активності ферменту POD, то активність була вищою на 7 день, початковий період проростання, і знижувалася в подальшому з розвитком проростків. Крім того, активність була вищою в контрольному варіанті порівняно з проростками, обробленими GO. Аналізуючи активність SOD, спостерігали збільшення активності ферменту з часом [37].

Активність САТ знижувалася під впливом сольового стресу у всіх досліджуваних видів і це зниження ставало більш серйозним з часу після сольової обробки, хоча конститутивна активність у контролі та швидкість зниження за сольового стресу були різними для різних видів рослин. Активність САТ знижувалась сильніше під впливом сольового стресу у порівняно чутливих до солі рису та огірка порівняно з пшеницею. Це свідчить про те, що на активність САТ впливає як окислювальний стрес, так і сольовий стрес, і що падіння активності САТ за сольового стресу є явищем, яке спостерігається у багатьох видів рослин, а не лише у видів рослин, а не лише у злакових [38].

Експресія та активність САТ змінюються під час взаємодії між рослиною та патогеном. Наприклад, зниження активності каталази відбувається у стійких рослин у відповідь на спробу інфікування вірусами. Вважається, що це дозволяє накопичуватися  $H_2O_2$ , що призводить до антимікробної активності через зміцнення клітинної стінки рослин, активацію захисних генів, надчутливу загибель клітин і подальше припинення інфікування патогеном. На противагу цьому, у сприйнятливих хазяїв спостерігається підвищення активності каталази хазяїна, екзогенно застосована каталаза може призвести до зменшення гіперчутливої загибелі клітин і збільшення проникнення патогенів у нормально стійкі хазяїни. Ці спостереження свідчать про те, що підвищена активність ферментів, що поглинають АФК, як рослинного, так і патогенного походження, в місці інфікування може бути важливим аспектом успішного зараження рослин [39].

У листках салату, оброблених лише  $Cd^{2+}$ , вміст MDA був значно вищим ( $p < 0,05$ ), тоді як позакореневе внесення 30 мг/мл GO призводило до зниження вмісту MDA в листках і коренях салату. Позакореневе застосування 30 мг/мл GO призводило до зниження SOD, САТ та GSH на 11,63%, 7,49% та 7,54%, відповідно, у листках салату за  $Cd^{2+}$  стресу та 23,37%, 11,00%, 24,15%, відповідно, у коренях. Однак, незначне збільшення цих показників спостерігали у салату, обробленого концентрацією GO 60 мг/мл, порівняно з тим, що містив лише  $Cd^{2+}$  [40].

## ВИСНОВКИ

Вивчено вплив графену на розвиток системної вірусної інфекції в модельній системі вірус тютюнової мозаїки - тютюн (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun). Підтверджено інгібуючий вплив наносполуки на появу вірусоспецифічних симптомів та вміст вірусу в інфікованих рослинах. Встановлено відсутність безпосереднього впливу графену на вірусні частинки *in vitro* та активність маркерних рослинних ферментів *in vivo*.

1. За результатами візуального спостереження встановлено, що обробка графеном веде до 15-денної затримки появи мозаїчних симптомів на рослинах тютюну (*N. tabacum* cv. Samsun), системно інфікованих вірусом тютюнової мозаїки, та не має токсичного впливу на рослини.
2. Серологічно підтверджено, що графен індукує достовірне зниження вмісту вірусу тютюнової мозаїки в інфікованих рослинах тютюну на 53%, що узгоджується з результатами візуальної оцінки розвитку вірусної інфекції і свідчить про загальний інгібуючий вплив графену на розвиток системної вірусної інфекції *in vivo*.
3. Згідно результатів порівняльних електронно-мікроскопічних досліджень, графен не сприяє утворенню скупчень віріонів вірусу тютюнової мозаїки *in vitro*, і отже вірогідно не характеризується безпосередньою нейтралізуючою дією на вірусні частинки.
4. Аналіз активності рослинних ферментів (маркерів оксидативного стресу) не підтвердив її явної кореляції з інфікуванням рослин тютюну вірусом тютюнової мозаїки, обробкою рослин графеном чи комбінованою дією цих двох факторів. Натомість, відмічене зниження активності каталази та супероксиддисмутази, що може пояснюватися впливом вірусної інфекції на захисні реакції рослини.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Zhang, X., Cao, H., Wang, H., Zhang, R., Jia, H., Huang, J. (2021). Effects of graphene on morphology, microstructure and transcriptomic profiling of *Pinus tabuliformis* Carr. roots. *PLoS ONE*, [online]. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253812>
2. Warghane, A., Saini, R., Shri, M., Andankar, I., Ghosh, DK., Chopade, BA. (2024). Application of nanoparticles for management of plant viral pathogen: Current status and future prospects. *Virology*, Volume 592. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.109998>
3. Muthuramalingam, R., Barroso, K., Milagres, J., Tedardi, V., de Oliveira, FF., Takeshita, V., Karmous, I., El-Tanbouly, R., da Silva, W. (2024). Tiny but Mighty: Nanoscale Materials in Plant Disease Management. *Plant Disease*, Volume 108, pp. 241- 255. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-23-0970-FE>
4. Katsnelson, M. (2016). *graphene*. *Encyclopedia Britannica*, [online]. Available at: <https://www.britannica.com/science/graphene>
5. Karle, N. (2017). *DFT Study of adsorption of trimetallic endohedral fullerenes on graphene*. MS. The University of Texas at El Paso. DOI:10.13140/RG.2.2.29119.00167.
6. Zhen, Z., & Zhu, H. (2018). Structure and Properties of Graphene. *Graphene*, pp. 1–12. DOI:10.1016/b978-0-12-812651-6.00001-x
7. Graphene nanomaterials: Properties, Processes and Applications (2017). [online]. Available at: Graphene Nanomaterials - Properties, Processes and Applications (mpoweruk.com)
8. Zhang, Y. & Li, X. (2017). Bio-inspired, Graphene/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Doubly Reinforced Aluminum Composites with High Strength and Toughness. *Nano Letters*, [online]. DOI:17. 10.1021/acs.nanolett.7b03308.
9. Radadiya, T. (2015). A PROPERTIES OF GRAPHENE. *European Journal of Material Sciences*, Volume 2, pp. 6-18.

10. Seifi, T., Reza Kamali, A. (2021). Antiviral performance of graphene-based materials with emphasis on COVID-19: A review, *Medicine in Drug Discovery*, Volume 11. DOI: 10.1016/j.medidd.2021.100099.
11. Barbhuiya, Najmul, H., Singh, S., Arik, M., Pradnya, N., Ziv, O., Yaakov, A., Edith, L., Lilach, C., Arik, M., Arnusch, C. (2021). Virus Inactivation in Water Using Laser-Induced Graphene Filters. *Materials 14*, no. 12: 3179. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma14123179>.
12. Hu, X., Lu, K., Mu, L., Kang, J., & Zhou, Q. (2014). Interactions between graphene oxide and plant cells: Regulation of cell morphology, uptake, organelle damage, oxidative effects and metabolic disorders. *Carbon*, 80, pp.665–676. DOI: 10.1016/j.carbon.2014.09.010.
13. Hu, X. et al. (2014). Graphene oxide amplifies the phytotoxicity of arsenic in wheat. *Scientific Reports 4*, [online]. DOI:10.1038/srep06122.
14. Elazzazy, A. & Elbeshehy, E. & Betiha, M. (2017). In vitro assessment of activity of graphene silver composite sheets against multidrug-resistant bacteria and Tomato Bushy Stunt Virus. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, pp. 2705-2711. DOI: 10.4314/tjpr.v16i11.19.
15. Al-Zaban, M.I.; Alhag, S.K.; Dabool, A.S.; Ahmed, A.E.; Alghamdi, S.; Ali, B.; Al-Saeed, F.A.; Saleem, M.H.; Poczai, P. (2022). Manufactured Nano-Objects Confer Viral Protection against Cucurbit Chlorotic Yellows Virus (CCYV) Infecting *Nicotiana benthamiana*. *Microorganisms*, Volume 10, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091837>.
16. Chen, L.; Wang, C.; Yang, S.; Guan, X.; Zhang, Q.; Shi, M.; Yang, S.-T.; Chen, C.; Chang, X.-L. (2019). Chemical reduction of graphene enhances in vivo translocation and photosynthetic inhibition in pea plants. *Environmental Science: Nano*, pp. 1077-1088. DOI: 10.1039/c8en01426d
17. Xiao, Z.; Huifen, C.; Jianguo, Z.; Haiyan, W.; Baoyan, X.; Zhiwen, C.; Xinyu, L.; Jin, Zhang. (2021). Graphene oxide exhibited positive effects on the growth of Aloe

- vera L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, pp. 815-824. DOI: 10.1007/s12298-021-00979-3
18. Ren, W.; Chang, H.; Li, L.; Teng, Y. (2020). Effect of Graphene Oxide on Growth of Wheat Seedlings: Insights from Oxidative Stress and Physiological Flux. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, [online]. DOI:10.1007/s00128-020-02888-9
19. Sofy, AR., Sofy, MR., Hmed, AA., Dawoud, RA., Alnaggar, AEM., Soliman, AM., El-DougDoug, NK. (2021). Ameliorating the Adverse Effects of Tomato mosaic tobamovirus Infecting Tomato Plants in Egypt by Boosting Immunity in Tomato Plants Using Zinc Oxide Nanoparticles. *Molecules*, [online]. DOI: 10.3390/molecules26051337
20. Adeel, M.; Farooq, T.; White, J. C.; Hao, Y.; He, Z.; Rui, Y. (2020). Carbon-based nanomaterials suppress Tobacco Mosaic Virus (TMV) infection and induce resistance in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Hazardous Materials*. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124167
21. Zhao, L., Wang, W., Fu, X., Liu, A., Cao, J., Liu, J. (2022). Graphene Oxide, a Novel Nanomaterial as Soil Water Retention Agent, Dramatically Enhances Drought Stress Tolerance in Soybean Plants. *Front. Plant Sci*, [online] Volume 13. DOI: 10.3389/fpls.2022.810905
22. Indirect ELISA Protocol. (2023). *Bio – Rad*, [online]. Available at: [Indirect ELISA Protocol | Bio-Rad \(bio-rad-antibodies.com\)](https://www.bio-rad.com/indirect-elisa-protocol)

23. Clark, MF., Adams, AM. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J Gen Virol*, Volume 34, pp.475–483.
24. Поліщук В.П., Будзанівська І.Г., Шевченко Т.П. та ін. Вірусологія. Навчальний посібник для лабораторних занять. -К.: ТОВ "Центр поліграфії "КОМПРИНТ", 2017 р. -262 с.
25. Pan, X., Zhang, B. (Eds.). (2021). Environmental Toxicology and Toxicogenomics. *Methods in Molecular Biology*, [online]. DOI:10.1007/978-1-0716-1514-0
26. Giannopolitis, CN., Ries, SK. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol*, pp.309-314. DOI: 10.1104/pp.59.2.309
27. Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol*, pp.121-126. DOI: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3
28. Dias, MA., Costa, MM. (1983). Effect of Low Salt Concentrations on Nitrate Reductase and Peroxidase of Sugar Beet Leaves. *Journal of Experimental Botany*, Volume 34, pp. 537–543. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/34.5.537>
29. Kumar, G., Knowles, NR. (1993). Changes in Lipid Peroxidation and Lipolytic and Free-Radical Scavenging Enzyme Activities during Aging and Sprouting of Potato (*Solanum tuberosum*) Seed-Tubers. *Plant Physiol*, pp.115-124. DOI: 10.1104/pp.102.1.115
30. Park, S., Kyoung, SC., Sujin, K., Yonghyun, G., Jangho, K. (2020). Graphene Oxide-Assisted Promotion of Plant Growth and Stability. *Nanomaterials*, [online]. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano10040758>
31. Chen, J., Yang, L., Li, S., Ding, W. (2018). Various Physiological Response to Graphene Oxide and Amine-Functionalized Graphene Oxide in Wheat (*Triticum aestivum*). *Molecules*, [online]. DOI: 10.3390/molecules23051104
32. Yi, H., Bolong, X., Chuanxin, M., Jianying, S., Wenqian, G., Wei, L, Tianqi, H., Yuxi, X., Weidong, C., Baoshan, X., Yukui, R. (2019). Synthesis of novel mesoporous carbon nanoparticles and their phytotoxicity to rice (*Oryza sativa L.*),

*Journal of Saudi Chemical Society*, Volume 23, pp. 75-82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2018.05.003>

33. Qiao, J., Chen, Z., Zhao, J., Ren, J., Wang, H., Zhi, C. (2024). Graphene promotes the growth of *Vigna angularis* by regulating the nitrogen metabolism and photosynthesis. *PLoS ONE*, [online] Volume 19. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297892>
34. Raveendran-Nair, R., Blake, P., Blake, J., Zan, R., Anissimova, S., Bangert, U., Golovanov, A., Morozov, S., Latychevskaia, T., Geim, A., Novoselov, K. (2010). Graphene as a transparent conductive support for studying biological molecules by transmission electron microscopy. *Applied Physics Letters*, [online]. DOI:153102.10.1063/1.3492845
35. Hernandez, JA. (2015). Oxidative stress and antioxidative responses in plant-virus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Volume 94, pp. 134-148. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.09.001>
36. Dandlen, SA., Da Silva, JP., Miguel, MG., Duarte, A., Power, DM., Marques, NT. (2023). Quick Decline and Stem Pitting *Citrus tristeza virus* Isolates Induce a Distinct Metabolomic Profile and Antioxidant Enzyme Activity in the Phloem Sap of Two Citrus Species. *Plants*, [online] Volume 12. DOI: 10.3390/plants12061394
37. Duarte de Oliveira, PP., Correa da Silva, DP., da Silva, BR., de Sousa, IP., Paiva, R., dos Reis, MV. (2023). How Scarification, GA<sub>3</sub> and Graphene Oxide Influence the In Vitro Establishment and Development of *Strelitzia*. *Plants*, [online] Volume 12. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12112142>
38. Shim, IS., Momose, Y., Yamamoto, A. (2003). Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, Volume 39, pp. 285–292. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1022861312375>
39. Blackman, LM., Hardham, AR. (2008). Regulation of catalase activity and gene expression during *Phytophthora nicotianae* development and infection of tobacco. *Mol Plant Pathol*, Volume 9, pp. 495-510. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2008.00478.x

40. Gao, M., Chang, X., Yang, Y., & Song, Z. (2020). Foliar graphene oxide treatment increases photosynthetic capacity and reduces oxidative stress in cadmium-stressed lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, [online]. DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.06.021