

PACS numbers: 81.07.Pr, 82.80.Pv, 87.15.Pc, 87.64.Dz, 87.64.ks, 87.80.Dj, 87.85.jf

Вплив наночастинок золота на цілісність білкової оболонки вірусів

Н. А. Курган, Л. І. Карбівська, Н. О. Зуєва, С. І. Шулима,
В. Л. Карбівський

*Інститут металофізики ім. Г. В. Курдюмова НАН України,
бульв. Акад. Вернадського, 36,
03142 Київ, Україна*

Методами рентгенівської фотоелектронної спектроскопії та спектрофотометрії досліджено взаємодію наночастинок золота з білковою оболонкою вірусу тютюнової мозаїки. Встановлено, що через взаємодію наночастинок золота з вірусом тютюнової мозаїки й утворення комплексів спостерігається зменшення енергії зв'язку остових електронів $Au4f$ внаслідок металізації наночастинок $Au^{3+} \rightarrow Au^0$. Через оброблення комплексів ультразвуком в $Au4f$ -спектрах РФС з'являються зарядові стани, які свідчать про утворення окремих наноструктур з білкових фрагментів вірусів і наночастинок золота внаслідок руйнування білкової оболонки вірусів.

Interaction of gold nanoparticles with the protein shell of the tobacco mosaic virus is studied by x-ray photoelectron spectroscopy and spectrophotometry. As established, due to both the interaction of gold nanoparticles with the tobacco mosaic virus and the formation of complexes, a decrease in the binding energy of the $Au4f$ core electrons by means of the $Au^{3+} \rightarrow Au^0$ metallization of nanoparticles is observed. Due to the sonication of complexes, in the $Au4f$ spectra of the XPS, charge states appear, which indicate the formation of individual nanostructures from protein fragments of viruses and gold nanoparticles due to the destruction of the protein shell of viruses.

Ключові слова: рентгенівська фотоелектронна спектроскопія, наночастинки золота, вірус тютюнової мозаїки, ультразвук.

Key words: x-ray photoelectron spectroscopy, gold nanoparticles, tobacco mosaic virus, sonication.

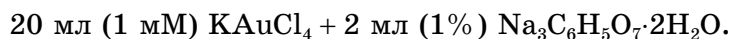
(Отримано 26 жовтня 2020 р.; після доопрацювання — 6 листопада 2020 р.)

1. ВСТУП

Віруси відіграють особливу роль у розробках нових застосувань нанотехнологій, оскільки мають унікальні властивості та функціонують як самозбірні нанощаблони, а також легко модифікуються [1]. Віруси також володіють певною хемічною лабільністю, а також цілим набором позицій на поверхні віріонів для приєднання наночастинок металів, що відкриває перспективи створення різних функціональних наносистем. При цьому, як правило, пріоритетним є використання відповідних процесів, що відбуваються в природних біонаносистемах [2]. Так, наприклад, здатність вірусів проникати в клітини може бути використана для створення внутрішньоклітинних нанозондів як наносенсорів для швидкої діагностики захворювань [3, 4], а також нового виду вакцин [5]. Вже сьогодні наночастинок золота використовуються в терапії раку, а також досліджуються в якості носіїв ліків, фототермічних агентів, контрастних речовин і радіосенсибілізаторів [6, 7]. Підвищений інтерес викликають дослідження взаємодії наночастинок металів з білковою оболонкою вірусних частинок. Найкраще для таких досліджень підходять рослинні віруси, оскільки вони толерантні до організмів людей і тварин, можуть бути одержані у великих кількостях і здатні витримувати різні модифікування. Серед них найбільш перспективним матеріалом є вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) [8], який має характерну структуру, що нагадує нанокабель — порожнисті білкові трубки, усередині яких проходить «жила» з РНК. Довжина вірусу складає $\cong 300$ нм, зовнішній діаметер — $\cong 18$ нм, внутрішній — 6 нм. Оскільки зовнішня поверхня віріону складається з великої кількості лізінових і агрінінових радикалів, то за рахунок Ван дер Ваальсових взаємодій здійснюється зв'язок із наночастинками металів (зокрема, золота, срібла, міді, ніклю та ін.) [9].

2. ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Наночастинок золота (НЧ Au) в сферичній формі були одержані класичним цитратним методом Туркевича [10] при кип'ятінні розчину тетрахлоороаурата Калію з додаванням розчину цитрату Натрію за схемою:



Перемішування проводилося до появи червоного кольору розчину, після чого відразу додавався етанол, щоб уникнути злипання наночастинок.

Для одержання гібридних наноструктур ВТМ і НЧ Au (ВТМ–

Au) очищені віруси ВТМ додавалися безпосередньо в процесі синтезу наночастинок; одержана суміш витримувалася в магнетній мішалці 10 хв., після чого додавався відновник боргідрид Натрію NaBH_4 . У роботі використовувався розчин вірусу тютюнової мозаїки у воді концентрацією у 200 мг/мл. За кімнатної температури віруси мають тенденцію злипатися між собою; щоб уникнути цього безпосередньо перед експериментом проводилося оброблення їх в ультразвуковій ванні протягом 30 хв. за частоти ультразвуку в 50 кГц та температури у 30°C.

Для останнього етапу дослідження проводилося оброблення одержаних гібридних наноструктур в ультразвуковій ванні протягом 30 хв. за частоти ультразвуку в 50 кГц і температури у 30°C з наступним відфільтруванням на воронці Бюхнера.

Рентгенівські фотоелектронні спектри остових рівнів досліджуваних елементів були одержані на рентгенівському спектрометрі фірми 'JEOL' JSPM-4610. Робочий вакуум під час проведення експерименту був у 10^{-7} Па. Використовувалася алюмінійова анода з енергією лінії AlK_α у 1486,7 еВ. Роздільча здатність за енергією становила 0,1 еВ. Калібрування енергій зв'язку проводилося по 1s-лінії Карбону 284,0 еВ. Спектрофотометричні дослідження зразків проводилися на однопроменевому спектрофотометрі Spekol 1500 у діапазоні довжин хвиль 190–1100 нм.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Взаємодія наночастинок золота з ВТМ чітко проявляється на оптичних спектрах поглинання (рис. 1). До взаємодії з ВТМ наночастинок золота мають пік плазмонного резонансу на 522 нм, що

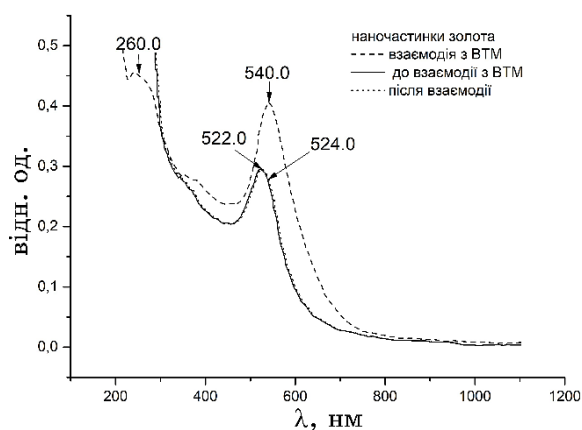


Рис. 1. Оптичний спектер наночастинок Au.¹

відповідає розміру частинок у 15–20 нм [11]. При взаємодії з вірусом спостерігається зміщення піку на 540 нм і поява піку на 260 нм, який відповідає піку поглинання РНК вірусу тютюнової мозаїки [12]. Можна зробити висновок, що для гібридних наноструктур ВТМ–Au характерна наявність оптичної активності. Після оброблення ультразвуком одержаних наноструктур і фільтрування їх спостерігається пік плазмонного резонансу НЧ Au на 524 нм і відсутність максимуму, властивого для вірусної РНК. Таким чином, ультразвукове оброблення призводить до розпаду гібридних наноструктур.

Для з'ясування механізмів поверхневої взаємодії НЧ Au з ВТМ були одержані рентгенівські фотоелектронні спектри остових електронів $Au4f$ (рис. 2). РФС-спектри НЧ Au демонструють наявність двох особливостей на 83,0 і 86,6 еВ, що відповідає пікам $Au4f_{5/2}$ та $Au4f_{7/2}$ відповідно. Для комплексів ВТМ–Au ці піки знаходяться відповідно на 86,2 еВ і 82,5 еВ. Зменшення енергії зв'язку остових електронів $Au4f$ при взаємодії наночастинок золота з ВТМ й утворенні комплексів ВТМ–Au свідчить про збільшення електронної густини на атомах Ауруму та зростання частки йонної складової в загальному балансі хемзв'язку. Даний ефект зумовлений металізацією наночастинок золота — $Au^{3+} \rightarrow Au^0$.

Після ультразвукового оброблення комплексів ВТМ–Au РФС-спектри $Au4f$ зазнають істотних метаморфоз. Спостерігається істотна трансформація форми спектрів, зумовлена появою нових піків, детермінованих різними зарядовими станами атомів Ауруму (рис. 3). Піки на 83,0 еВ і 86,6 еВ відповідають пікам $Au4f_{7/2}$ та $Au4f_{5/2}$ НЧ золота до взаємодії (рис. 2) та свідчать про наявність НЧ золота, які не провзаємодіяли з білковою оболонкою вірусів, швидше за все, внаслідок зв'язування з іншими НЧ золота, що може свідчити про те, що тільки НЧ з малим розміром

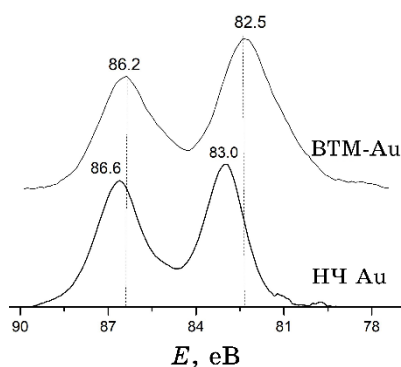


Рис. 2. РФС-спектри $Au4f$ до та при взаємодії НЧ Au з ВТМ.²

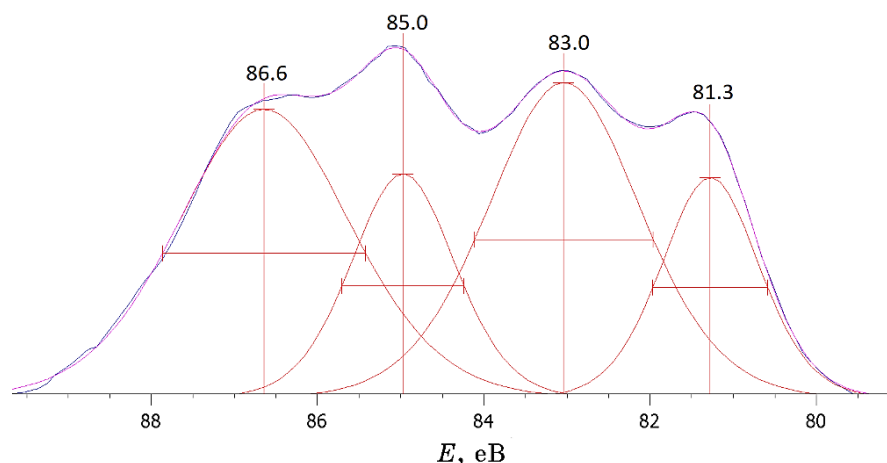


Рис. 3. РФС-спектри Au4f після взаємодії НЧ Au з ВТМ.³

мають здатність до зв'язування з віріонами ВТМ. Через вплив ультразвуку на такого роду комплекси відбувається їхній розпад.

Піки на 81,3 та 85,0 eV відображають стан остових електронів золота Au4f_{7/2} та Au4f_{5/2}, який відповідає комплексам ВТМ–Au. Спостерігається істотне зміщення енергії зв'язку остових електронів Au4f у сторону зменшення (рис. 3). Поява такого зарядового стану золота можлива за умови, коли при обробленні комплексів ВТМ–Au ультразвуком відбувається руйнування білкової оболонки вірусів і утворення окремих наноструктур з білкових фрагментів вірусів і НЧ золота (рис. 4). Спостерігається збільшення негативного некомпенсованого заряду на їхній поверхні, що і приводить до зміщення енергії зв'язку остових електронів Au4f у сторону зменшення. При цьому пік плазмонного резонансу зміщується на 2 нм, а не на 18 нм, як при утворенні комплексів ВТМ–Au, тобто розмір частинок не збільшується і не відбувається утворення кластерів з наночастинок, що також свідчить про утворення саме окремих наноструктур з білкових фрагментів вірусів і НЧ золота.

Руйнування вірусної оболонки підтверджується фактом відсутності піку РНК вірусу на спектрах оптичного поглинання (рис. 1), одержаних на останньому етапі експерименту. Через оброблення ультразвуком розпадається білкова оболонка з наночастинками золота, і вільна РНК видаляється при відфільтруванні. В силу того, що РНК без білкової оболонки не несе вірусної небезпеки, описана методика може застосовуватися в медицині для створення вірусоподібних частинок (ВПЧ), які можуть бути використані для подолання проблем, пов'язаних з традиційними стратегіями вакцинації на основі вірусів, включаючи імуноген-

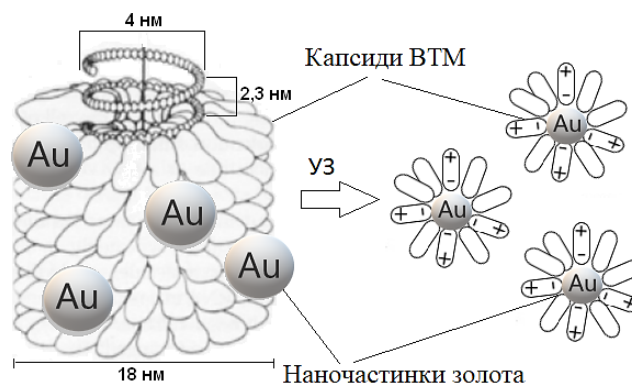


Рис. 4. Модель, який описує механізм руйнування протеїнових структур (капсидів) у вірусі тютюнової мозаїки за їхньої взаємодії з НЧ Au (УЗ — вплив ультразвуку).⁴

ність, повернення до вірулентності інсерційного мутагенезу [13]. ВПЧ являють собою частинки, які дуже схожі на вірусні структури, але за своєю природою значно більш толерантні, оскільки не містять вірусного генетичного матеріалу [14, 15]. Створення подібних ВПЧ структур є більш безпечною альтернативою ослабленим вірусам, оскільки вони не реплікуються і не є інфекційними [16].

З іншого боку, з огляду на той факт, що поверхня людських і тваринних клітин складається з білкових структур, ця методика також може ефективно використовуватися для руйнування потенційно небезпечних новоутворень. Необхідною умовою такого застосування може бути використання механізму закріплення на поверхні ракових клітин з наступним локальним впливом ультразвуку задля їхнього руйнування.

4. ВИСНОВКИ

Методами рентгенівської фотоелектронної спектроскопії та спектрофотометрії досліджено взаємодію наночастинок золота з білковою оболонкою вірусу тютюнової мозаїки. Встановлено, що через взаємодію наночастинок золота з ВТМ й утворення комплексів ВТМ–Au спостерігається зменшення енергії зв'язку остових електронів $Au4f$, що свідчить про збільшення електронної густини на атомах Ауруму та збільшення частки йонної складової в загальному балансі хемзв'язку внаслідок металізації наночастинок $Au^{3+} \rightarrow Au^0$.

Через оброблення ультразвуком комплексів ВТМ–Au, що утворилися, в РФС-спектрах $Au4f$ виявлено нові зарядові стани, які

свідчать про наявність НЧ золота з електронною структурою такою ж, як і до взаємодії з ВТМ, і окремих наноструктур з білкових фрагментів вірусів і НЧ золота, які утворилися внаслідок руйнування білкової оболонки вірусів через оброблення комплексів ВТМ–Au ультразвуком.

Виявлений вплив ультразвуку та наночастинок золота на вірус тютюнової мозаїки може бути використаний у медицині як для розробки методів безпосереднього руйнування потенційно небезпечних новоутворень, так і для створення вірусоподібних частинок, які використовуються для вирішення проблем, пов'язаних з традиційними стратегіями вакцинації.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА–REFERENCES

1. A. Liu, *Viral Protein Cages as Building Blocks for Functional Materials* (Enschede: University of Twente: 2017); <https://doi.org/10.3990/1.9789036543873>
2. S. Zhang, *Nature Biotechnology*, **2**: 1171 (2003); <https://doi.org/10.1038/nbt874>
3. M. E. Hamdy, M. Del Carlo, H. A. Hussein et al., *J. Nanobiotechnol.*, **16**, Article No. 48 (2018); <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0374-x>
4. A. M. Wen, M. Infusino, A. De Luca, D. L. Kernan, A. E. Czapar et al., *Bioconjugate Chemistry*, **26**, No. 1: 51 (2015); <https://doi.org/10.1021/bc500524f>
5. S. Al-Halifa, L. Gauthier, D. Arpin, S. Bourgault, and D. Archambault, *Front. Immunol.*, **10**: 22 (2019); <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00022>
6. S. Jain, D. G. Hirst, J. M. O'Sullivan, *The British Journal of Radiology*, **85**: 101 (2012); <https://doi.org/10.1259/bjr/59448833>
7. B. D. White, Ch. Duan, and H. E. Townley, *Biomolecules*, **9**: 202 (2019); <https://doi.org/10.3390/biom9050202>
8. M. Sarikaya, C. Tamerler, and A. Jen, *Nature Materials*, **2**: 577 (2003).
9. E. Dujardin, C. Peet, G. Stubbs, J. N. Culver, and S. Mann, *Nano Letters*, **3**, No. 3: 413 (2003); <https://doi.org/10.1021/nl034004o>
10. J. Turkevich, P. S. Stevenson, and J. Hiller, *Discuss. Faraday Soc.*, **11**: 55 (1951); <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>
11. P. K. Ngumbi, S. W. Mugo, and J. M. Ngaruiya, *IOSR Journal of Applied Chemistry*, **11**, Iss. 7 Ver. I: 25 (2018); <https://doi.org/10.9790/5736-1107012529>
12. В. А. Тиманюк, Е. Н. Животова, *Биофизика* (Харьков: Национальный фармацевтический ун-т: 2003); V. A. Timanyuk and E. N. Zhivotova, *Biofizika* (Khar'kov: Natsional'nyy Farmatsevticheskiy Univ.: 2003) (in Russian).
13. J.-P. Y. Scheerlinck and D. L. Greenwood, *Drug Discov. Today*, **13**: 882 (2008); <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.06.016>
14. Q. Zhao, S. Li, H. Yu, N. Xia, and Y. Modis, *Trends Biotechnol.*, **31**: 654 (2013); <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.09.002>
15. J. Fuenmayor, F. Gòdia, and L. Cervera, *New Biotechnol.*, **39**: 174 (2017); <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.010>

16. C. Ludwig and R. Wagner, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18**: 537 (2007);
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.013>

*G. V. Kurdyumov Institute for Metal Physics, N.A.S. of Ukraine,
36, Academician Vernadsky Blvd.,
UA-03142 Kyiv, Ukraine*

- ¹ Fig. 1. Optical spectrum of Au nanoparticles.
² Fig. 2. XPS spectra of Au4f before and during the interaction of Au NPs with TMV.
³ Fig. 3. XPS spectra of Au4f after interaction of Au NPs with TMV.
⁴ Fig. 4. A model describing the mechanism of destruction of the protein structures (capsids) within the tobacco mosaic virus during their interaction with Au NPs (УЗ—sonication).