

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри професор Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 2025 р.

**АНТИВІРУСНІ ВЛАСТИВОСТІ МЕТАНСУЛЬФОНАТУ ЦЕРІЮ,
ЦИНКУ І МАГНІЮ**

Випускна кваліфікаційна робота студента
денної форми навчання
за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія»
Кайданюк Валерії Вікторівни

Науковий керівник від кафедри
кандидат біологічних наук, доцент
Шевченко О. В.

Робота виконана на базі Інституту мікробіології та вірусології
імені Д.К. Заболотного НАН України
під керівництвом к.б.н., старшого дослідника, старшого наукового
співробітника відділу проблем інтерферону та імуномодуляторів
Н.М. Жолобак

Оцінка захисту роботи

Київ – 2025 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

CeMs – метансульфонат церію;

MgMs – метансульфонат магнію;

ZnMs – метансульфонат цинку;

Ms – метансульфонова кислота;

L929 – лінія клітин фібробластів миші L929 (номер за каталогом ECACC 85011425);

PS – фосфатидилсерин (phosphatidylserine).

ROS – реактивні форми кисню (reactive oxygen species);

SI – індекс селективності (selectivity index);

VSIV – вірус везикулярного стоматиту, штам Індіана (vesicular stomatitis virus Indiana);

VSV-NJ – вірус везикулярного стоматиту, штам Нью-Джерсі (vesicular stomatitis virus New Jersey);

BBC (VSV) – вірус везикулярного стоматиту;

ВЧ – вірус Чикунгунья;

ГЦК – гранецентрована кубічна решітка;

КФ – кристалічний фіолетовий;

МТТ – метилтетразолій блакитний;

СОД – супероксиддисмутаза;

ЦПД – цитопатична дія;

СС – цитотоксична концентрація;

ЕС – ефективна концентрація;

SI – індекс селективності.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Характеристика метансульфонату церію та альтернативних сполук з антивірусними властивостями.....	6
1.1. Особливості метансульфонату церію (CeMs) та його антивірусних властивостей.....	6
1.1.1. Фізико-хімічні особливості метансульфонату церію.....	6
1.1.2. Метансульфонат церію в біологічних системах.....	11
1.2. Загальна характеристика метансульфонової кислоти (Ms).....	13
1.3. Характеристика солей магнію (MgMs) та цинку (ZnMs).....	15
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	17
2.1. Матеріали та зразки сполук.....	17
2.2. Культура клітин фібробластів лінії L929.....	18
2.3. Характеристика вірусу везикулярного стоматиту (ВВС).....	22
2.4. Методи визначення цитотоксичності зразків сполук.....	26
2.4.1. Тест із кристалічним фіолетовим (КФ).....	26
2.4.2. Тест із метилтетразолієм блакитним (МТТ).....	29
2.5. Визначення антивірусної активності зразків сполук <i>in vitro</i> за зміною прояву цитопатичної дії ВВС в культурі L929.....	31
2.6. Статистична обробка результатів.....	34
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....	35
3.1. Оцінка токсичності зразків сполук в культурах клітин L929.....	35
3.2. Оцінка антивірусної активності зразків сполук <i>in vitro</i> проти ВВС.....	44
3.3. Перспективи використання метансульфонату церію в якості антивірусного агента.....	51
ВИСНОВКИ	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	53

ВСТУП

Церій та його сполуки є перспективними матеріалами, які широко використовуються в сучасному матеріалознавстві, альтернативній енергетиці, радіоелектроніці, хімії, хімічній технології та машинобудуванні. Церій (III/IV) і його сполуки мають особливий інтерес у медичній та біологічній практиці завдяки здатності специфічно впливати на живі організми та організм людини.

В останні десять років активно ведуться дослідження щодо отримання різних сполук церію, таких як наночастки оксиду церію та метансульфонат церію, що пов'язано з перспективами їх використання у біомедичній практиці як антиоксидантів та імуномодуляторів. Для різних напрямків використання порошки сполук церію повинні мати відповідні фізико-хімічні характеристики, такі як хімічний та фазовий склад, тощо.

Перспективи біомедичного застосування метансульфонату церію досліджуються в Україні в ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет», а його активність як антивірусного агента вивчається в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Традиційний метод отримання сполук церію включає використання неорганічних солей церію з подальшим їх гідролізом, термогідролізом або термічним розкладанням в окиснювальній атмосфері.

Потенційними антивірусними агентами також є солі магнію та цинку, що в нещодавніх дослідженнях показали ефективність *in vitro* проти арбовірусу Чикунгуня. Дані твердження також підкреслюють необхідність дослідження метансульфонатів даних речовин на антивірусну активність проти ВВС та визначення серед них найбільш ефективного.

Везикулярний стоматит є вірусним захворюванням, що вражає переважно худобу, свиней та коней, спричиняючи значні економічні збитки через зниження продуктивності тварин. Зокрема, в США та деяких країнах Латинської Америки спостерігаються спалахи ВВС, що створює ризик його поширення через міжнародні торговельні шляхи. Окрім того, вірус

везикулярного стоматиту належить до сімейства *Rhabdoviridae*, до складу якого входить також і вірус сказу. Саме тому дослідження, проведені в модельній системі культура клітин – вірус везикулярного стоматиту, є цікавими в плані аналізу отриманих результатів щодо можливої широкої антивірусної ефективності досліджених сполук проти вірусів сімейства *Rhabdoviridae*. Зважаючи на це, визначення антивірусної активності представлених в роботі сполук та порівняння їх антивірусного профілю є актуальною на сьогодні задачею.

Метою кваліфікаційної роботи є дослідження антивірусних властивостей метансульфонату церію, магнію та цинку в порівнянні з метансульфоною кислотою в умовах *in vitro*.

Завдання кваліфікаційної роботи включають:

1. Визначити цитотоксичність метансульфонату церію у порівнянні з метансульфоною кислотою, метансульфонатами магнію та цинку.
2. Визначити антивірусну активність метансульфонату церію у порівнянні з метансульфоною кислотою, метансульфонатами магнію та цинку.

Наукова новизна полягає в тому, що вперше було досліджено цитотоксичність та антивірусну активність в умовах *in vitro* проти вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) метансульфоною кислоти, метансульфонату церію, магнію та цинку на культурі клітин фібробластів L929. Доведено нижчу токсичність та вищу антивірусну активність метансульфонату церію у порівнянні з Ms, MgMs та ZnMs.

Практичне значення роботи полягає у отриманих результатах цитотоксичності метансульфоною кислоти та її сполук з церієм, цинком, магнієм, а також у власне результатах антивірусної активності. Доведено, що метансульфонат церію може надалі розглядатись як перспективний антивірусний агент для подальших випробувань на інших модельних системах *in vitro* та *in vivo*.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАНСУЛЬФОНАТУ ЦЕРІЮ ТА АЛЬТЕРНАТИВНИХ СПОЛУК З АНТИВІРУСНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

1.1. Особливості метансульфонату церію (CeMs) та його антивірусних властивостей

1.1.1. Фізико-хімічні особливості метансульфонату церію

Церій є членом групи лантаноїдів і вважається найпоширенішим серед рідкоземельних металів з атомним номером 58. У нього широка заборонена зона 3,19 еВ та висока енергія збудження. Каталітичні властивості церію пояснюються екрануванням електронів 5p і 4d на 4f орбіталі [1].

Діоксид церію (представлено на рис. 1.1. [1]) може існувати в сипучому стані як у формі +3, так і +4, що сприяє утворенню CeO_2 і CeO_{2-x} , і тим самим проявляє антиоксидантні властивості [2].

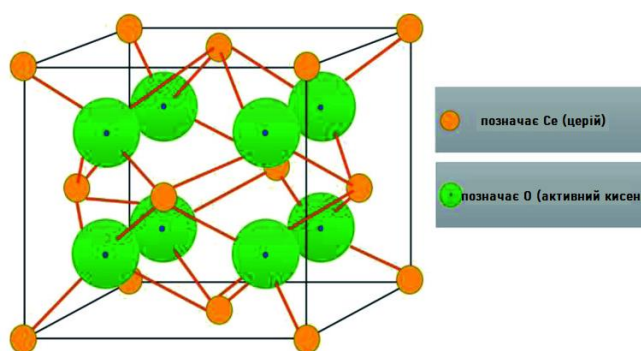


Рис. 1.1. Загальна структура: гранецентрована кубічна структура церію (CeO_2)

Завдяки високій реакційно-здатній поверхні, що забезпечується флюоритною кристалічною решіткою, церій може нейтралізувати вільні радикали. Церій використовується для виготовлення сонячних елементів, як

каталізатор окислення палива, хіміко-механічної поляризації, та захисту від корозії; наночастинки церію також проявляють біологічну активність і розглядаються як потенційні фармакологічні агенти.

Таблиця 1.1 демонструє основні фізико-хімічні властивості церію.

Таблиця 1.1

Фізико-хімічні властивості церію

Властивість	Значення
Густина, г/см ³	6,770
Молярна маса, г/моль	140,12
Температура плавлення, °С	798
Температура кипіння, °С	3424

Церій демонструє винятковий характер циклічності між двома іонними станами – Ce^{3+} і Ce^{4+} , що можливо завдяки наявності основного електрона на орбіталі 4f ($\text{Xe } 4f^1 5d^1 6s^2$), який дозволяє йому проявляти окисно-відновні властивості. Крім того, наночастинка оксиду церію (Ce_4O_8) являє собою гранецентровану кубічну (ГЦК) решітку флюориту, що складається з восьми атомів кисню, зв'язаних з атомом церію (Рис. 1.2. [4]), а повна елементарна комірка (Ce_4O_8) має розмір 5,1 Å по краю [3].

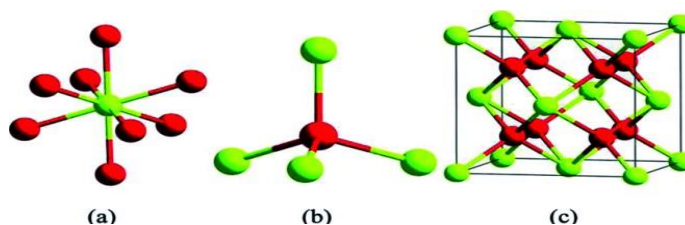


Рис. 1.2. Структурний аналіз кристалів церію Ce_4O_8 (елементарна комірка); в (а) і (б) жовтим кольором позначено восьмикратну кількість атомів церію, а червоним – чотирикратну кількість атомів кисню в кристалічній структурі церію; (с) – основна структура кристалічної решітки флюориту Ce_4O_8 [4].

Перспективним напрямком у хімії та технології церійвмісних матеріалів, зокрема для отримання нанорозмірних порошків CeO_2 , є застосування органічних прекурсорів церію. Малодосліджені, але перспективні органічні сполуки для отримання нанорозмірних порошків простих і складних оксидів різного функціонального призначення – це солі метансульфонової кислоти. Вони привернули увагу хіміків після впровадження промислової технології виробництва метансульфонової кислоти [22].

У 60-70-х роках минулого століття були отримані метансульфонати багатьох елементів, вивчені їх первинні фізико-хімічні властивості та запропоновані можливі галузі використання. Літературний аналіз показав, що метансульфонати та їх комплексні сполуки знаходять широке застосування в прикладній електрохімії. Висока ефективність їх використання підтверджена у катодному осадженні металів та анодному отриманні оксидних плівкових покриттів.

Науковці з ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет» [5] встановили, що в результаті взаємодії церій (III) карбонату з метансульфоновою кислотою утворюється церій (III) метансульфонат складу $\text{Ce}(\text{SO}_3\text{CH}_3)_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Термоліз комплексних сполук $\text{Ce}(\text{CH}_3\text{SO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ протікає за складним хімічним механізмом і закінчується при температурі 540-550°C з утворенням нанокристалічних порошків церій (IV) оксиду кубічної структури з розмірами первинних часток 20-30 нм, розмірами агрегатів 50-200 нм та питомою поверхнею 62-68 м²/г. Запропоновано [5] ймовірний механізм термічного розкладання церій (III) метансульфонату, який змінюється зі зміною температурних умов процесу термічного розкладання.

При низьких температурах процес термолізу $\text{Ce}(\text{CH}_3\text{SO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ відбувається за механізмом поверхневого окиснення з утворенням церій оксиду. При температурах, вищих 450°C, він переходить в режим горіння зі значним тепловим ефектом та формуванням нанорозмірних порошків церій (IV) оксиду відповідної морфологічної структури. Водні розчини церій (III)

метансульфонату за умов *in vitro* пригнічують активність патогенних організмів.

Результати фізико-хімічного аналізу церій (IV) оксиметансульфонату наведені в таблиці 1.2.

Таблиця 1.2

Фізико-хімічний аналіз церій (IV) оксиметансульфонату

Хімічний елемент	Ce	C	H	S	O
Експериментальні дані для церій (IV) метансульфонату	12,9	4,46	4,46-	13,15	63,5

Згідно з даними елементного аналізу хімічна формула одержаної сполуки може бути представлена як церій (III) тетрагідрометансульфонат $Ce(CH_3SO_3)_3 \times nH_2O$, де кількість молекул гідратаційної води може змінюватись від $n=2$ до $n=6$.

Синтезований церій (III) гідрометансульфонат є білою гігроскопічною дрібно-кристалічною речовиною, питома вага якої за даними пікнометричних досліджень дорівнює $2,8 \text{ г/см}^3$. Сполука добре розчиняється у воді, частково в етиловому та ізопропиловому спиртах, легко наноситься та має гарну адгезію до металевих і діелектричних (оксидно-керамічних) поверхонь. За даними фізико-хімічного аналізу хімічна формула одержаного церію метансульфонату може бути записана наступним чином: $Ce(CH_3SO_3)_3 \times 4H_2O$.

Для встановлення основних характеристик і підтвердження хімічного складу та визначення фізико-хімічних характеристик одержаної сполуки авторами були здійснені рентгеноструктурні, ІЧ-спектроскопічні та термічні дослідження одержаних зразків.

Згідно з даними ІЧ-спектроскопії (рис. 1.3.) $Ce(CH_3SO_3)_2 \times nH_2O$, однією з найбільш інтенсивних смуг є смуга при 3461 см , яка відноситься до коливань гідратаційних, абсорбованих або міжкристалічних молекул води.

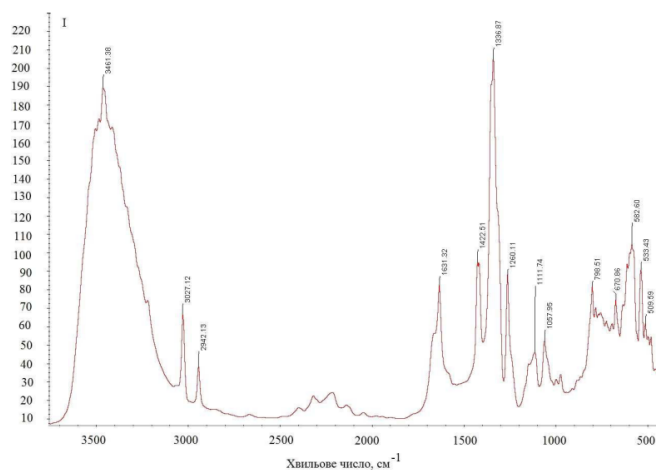


Рис. 1.3. ІЧ-спектр церій метансульфату [5]

В спектрі спостерігається також смуга деформаційних коливань метильної (CH_3) групи з частотами 1482, 1452 cm^{-1} . Поряд з частотами коливань води в ІЧ спектрах синтезованого продукту виявлені також смуги з частотами 1613, 1422 та 1336 cm^{-1} , які відносяться до антисиметричних коливань в групі SO_2 .

Смугу поглинання при 798 cm^{-1} вірогідно віднести до коливань метильної групи відносно атома сірки. Смуги в низькочастотній ділянці 582, 533, 509 cm^{-1} характерні для зв'язку Ce-O .

Таким чином, наявність в одержаній сполуці церію і основних груп характерних для солей метансульфонової кислоти дозволяє стверджувати, що одержаний продукт є хімічною сполукою з брутто формулою $\text{Ce}(\text{CH}_3\text{SO}_3)_2 \times n\text{H}_2\text{O}$.

Оскільки утворена сіль церій (III) метансульфату є термічно нестійкою, для аналізу процесів, що протікають при її термічному розкладанні, застосували дериватографічний метод та метод диференційної скануючої калориметрії.

Термічне розкладання зразка $\text{Ce}(\text{CH}_3\text{SO}_3)_3 \times 4\text{H}_2\text{O}$ протікає в декілька стадій, що фіксується на кривих DTA і DTG (Рис. 1.4).

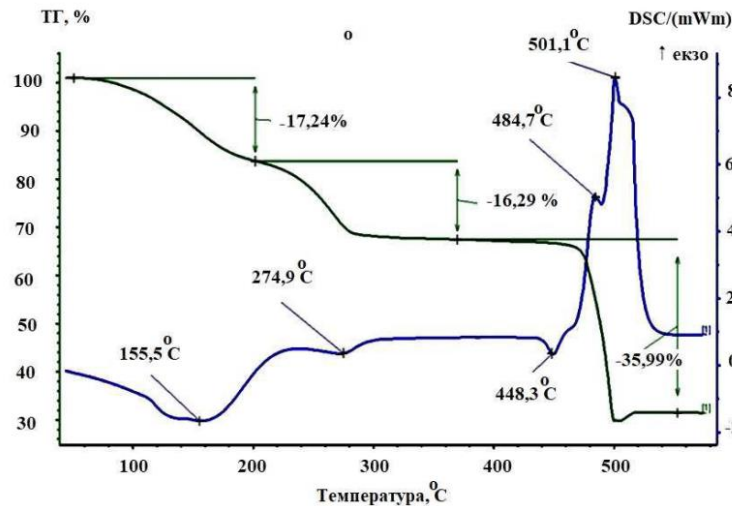


Рис. 1.4. DTA і DTG криві термічного розкладання $\text{Ce}(\text{CH}_3\text{SO}_3)_3 \times 4\text{H}_2\text{O}$ [5]

В інтервалі температур 100-200°C метансульфонат церію втрачає вільну та кристалічну воду. В інтервалі температур 200-290°C спостерігається зменшення маси зразка за рахунок виділення метансульфонової кислоти та утворення основної солі метансульфонату церію $\text{CeO}_x(\text{CH}_3\text{SO}_3)_{(3-x)}$. Подальше розкладання проміжної сполуки оксометансульфонату церію протікає в інтервалі 448-500°C, що характерно для більшості солей метансульфонової кислоти.

1.1.2. Метансульфонат церію в біологічних системах

Метансульфонат церію має кілька важливих властивостей в біологічних системах, які роблять його цікавим об'єктом для біомедичних досліджень та потенційного терапевтичного застосування. Однією з головних характеристик цієї сполуки є його значна антиоксидантна активність. Завдяки здатності іонів церію циклічно переходити між станами Ce^{3+} і Ce^{4+} , метансульфонат церію ефективно нейтралізує реактивні форми кисню (ROS), знижуючи окислювальний стрес у біологічних системах. Це важливо для захисту клітин від окислювального пошкодження, яке сприяє розвитку різних захворювань, включаючи нейродегенеративні розлади та рак [6].

Метансульфонат церію також має імуномодулюючі властивості в біологічних системах. Його антиоксидантна активність допомагає зменшити рівень про-запальних цитокінів та маркерів окислювального стресу, що сприяє зниженню запалення. Це може бути корисним у лікуванні станів, пов'язаних з хронічним запаленням, таких як ревматоїдний артрит та запальні захворювання кишечника. Дослідження показали, що метансульфонат церію має низьку цитотоксичність для ряду клітин в умовах *in vitro*, що робить його перспективним кандидатом для терапевтичного застосування [23].

Завдяки здатності зменшувати окислювальний стрес та запалення, метансульфонат церію може також сприяти загоєнню ран, захищаючи клітини від окислювальних пошкоджень та модулюючи імунну відповідь, що покращує процес загоєння та відновлення тканин.

Таким чином, метансульфонат церію демонструє значні антиоксидантні та імуномодулюючі властивості при низькій цитотоксичності, що робить його перспективним кандидатом для терапевтичного застосування у лікуванні станів, пов'язаних з окислювальним стресом, хронічним запаленням, вірусними інфекціями та для покращення загоєння ран. Ці властивості в біологічних системах зумовлені здатністю сполуки циклічно переходити між різними окисно-відновними станами, ефективно нейтралізуючи реактивні кисневі форми та модулюючи відповідь клітин. Подальші дослідження та клінічні випробування необхідні для розуміння його потенціалу та ефективності у різних медичних застосуваннях [24].

Нормальний аеробний метаболізм у клітинах ссавців супроводжується продукцією ряду вільних радикалів, що діють як сигнальні молекули, відомі як супероксидні радикали; ці радикали відіграють вирішальну роль у патогенезі через процес окислення. У клітинах ссавців ці супероксидні радикали є в надлишку, але якщо їхня концентрація зростає, це може призвести до ряду порушень.

Збільшення кількості супероксидних радикалів зазвичай контролюється СОД, яка зрештою знищує надлишок радикалів. Відомо, що атоми церію з

високим співвідношенням +3 і +4 впливають на СОД-міметичну активність; вони проявляють СОД-подібну активність у фракції Ce^{3+} [7].

Дослідження [8] демонструє, що наночастинки оксиду церію здатні багатократно імітувати активність СОД за рахунок оборотних окисно-відновних переходів між Ce^{3+} і Ce^{4+} . У процесі реакції супероксид зв'язується з кисневими вакансіями, утворюється H_2O_2 , а іони церію проходять цикли окиснення і відновлення. H_2O_2 виступає як окисником, так і відновником, що дозволяє наночастинкам зберігати каталітичну активність [8], [9].

1.2. Загальна характеристика метансульфонової кислоти (Ms)

Метансульфонова кислота (Ms), або $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$, є сильною органічною кислотою, що широко використовується у різних галузях хімічної промисловості та біомедичних дослідженнях. Вона має кілька важливих фізико-хімічних та біологічних властивостей.

Метансульфонова кислота є прозорою, безбарвною рідиною з низькою летючістю з хімічною формулою $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$, яка є найпростішою з алкансульфонових кислот. Вона добре розчиняється у воді та багатьох органічних розчинниках, що робить її універсальним реагентом для різних хімічних процесів. Основні властивості метансульфонової кислоти включають її високу густину (1.48 г/см^3 при кімнатній температурі) і високу температуру кипіння (167°C при 10 мм рт. ст.). Вона є сильною кислотою, що легко віддає протони (H^+), і, на відміну від багатьох інших сильних кислот, не є леткою і не має окислювальних властивостей. Це робить її більш безпечною для використання, оскільки знижує ризики утворення шкідливих парів та корозії матеріалів [32].

Таблиця 1.3 характеризує основні фізико-хімічні особливості метансульфонової кислоти.

Таблиця 1.3

Фізико-хімічні особливості метансульфонової кислоти

Властивість	Значення
Формула	$\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$
Молекулярна маса, г/моль	96,10
Температура плавлення, °C	20
Температура кипіння при 10 мм. рт. ст., °C	167
Густина при 20°C, г/см ³	1,48
Кислотність (pKa)	-1.9

Метансульфонова кислота стійка до окиснення та термостабільна, що дозволяє використовувати її у високотемпературних реакціях. Вона є ефективним каталізатором для естерифікації та алкілування. Завдяки хімічній стабільності має тривалий термін зберігання без втрати активності та є екологічно безпечною, оскільки біологічно розкладається до безпечних компонентів, зменшуючи вплив на навколишнє середовище [32].

Метансульфонова кислота також виявляє наступні біологічні властивості [25]:

1. Метансульфонова кислота проявляє цитотоксичність, що дозволяє інгібувати ріст мікроорганізмів та клітин, використовуючи її в складі антимікробних і антиканцерогенних агентів.
2. Вона може пригнічувати реплікацію вірусів, що робить її перспективною для антивірусної терапії (потрібні додаткові дослідження).
3. Як сильна кислота, вона взаємодіє з біомолекулами (білками, нуклеїновими кислотами), що дозволяє використовувати її в біохімічних дослідженнях для модифікації біомолекул.

Метансульфонова кислота — хімічно стабільна, екологічно безпечна сполука, яка широко застосовується як каталізатор, розчинник і реагент в

органічному синтезі, фармацевтиці, агрохімії та виробництві електролітів [11]. Завдяки своїм властивостям вона використовується в електролітичному осадженні металів, очищенні обладнання, гідрометалургії, а також у нафтовій промисловості (створення та експлуатація свердловин) [31, 32]. У біомедичних дослідженнях Ms слугує модельною сполукою для аналізу клітинних реакцій і створення нових антимікробних/антивірусних засобів [31].

1.3. Характеристика солей магнію (MgMs) та цинку (ZnMs)

Іони металів, такі як цинк і магній, беруть участь у численних біохімічних процесах, включаючи регуляцію імунної відповіді та реплікацію вірусів [33, 34]. Їхні солі, зокрема сульфати, продемонстрували дозозалежну антивірусну активність проти вірусу Чикунгунья, з IC_{50} ~24 мкМ для сульфату цинку та ~28 мкМ для сульфату магнію. В експериментах на мишах пероральне введення цих сполук сприяло швидшому зниженню вірусного навантаження [33].

Останні дослідження звертають увагу на метансульфонати цинку та магнію як більш стабільні, водорозчинні форми з потенційно кращою біодоступністю.

Метансульфонат цинку ($Zn(CH_3SO_3)_2$), відомий також як цинк метансульфонат, використовується у гібридних редокс-батареях завдяки стабільності та контролю іонного переносу [45]. Така властивість може бути релевантною і для біологічних систем – стабільні метансульфонати здатні забезпечувати поступове вивільнення іонів Zn^{2+} , що може знижувати токсичність і справляти антивірусний ефект.

Метансульфонат магнію ($Mg(CH_3SO_3)_2 \cdot 12H_2O$) є кристалічно стабільною формою, добре розчинною у воді, що дозволяє створювати прозорі розчини навіть при високих концентраціях [46]. Така властивість робить його зручним для перорального або парентерального застосування у медичних препаратах. Крім того, наявність метансульфонатної групи

сприяє кращій сумісності з іншими активними компонентами в препаратах для лікування вірусних інфекцій.

В таблиці 1.4 підсумовано основні фізико-хімічні властивості магнію [38].

Таблиця 1.4

Фізико-хімічні властивості магнію та цинку

Властивість	Значення для Mg	Значення для Zn
Густина, г/см ³ (при 20°C)	1.738	7.133
Молярна маса, г/моль	24.305	65.39
Температура плавлення, °C	650	420
Температура кипіння, °C	1090	907
Ступінь окиснення	+2	+2

Метансульфонати цинку та магнію є стабільними, водорозчинними формами, що забезпечують поступове вивільнення іонів Zn²⁺ і Mg²⁺ та мають потенційно високу біодоступність. Ці властивості сприяють необхідності дослідження токсичності та антивірусного ефекту цих сполук.

Таким чином, власне метансульфонова кислота, а також метансульфонати церію, цинку та магнію є цікавими сполуками, щодо яких зафіксовано цілий ряд біологічних ефектів. Досліджень щодо їх цитотоксичності та антивірусної активності в умовах *in vitro* проти вірусів родини *Rhabdiviridae* немає. Викладена інформація стала обґрунтуванням для проведення таких досліджень в модельній системі культура клітин фібробластів мишей (L929) – вірус везикулярного стоматиту.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та зразки сполук

У дослідженні використовували наступні матеріали та хімічні розчини, що були необхідні для проведення експериментів з клітинними культурами та аналізу антивірусної активності. Одним з основних матеріалів стало середовище для вирощування клітин DMEM-F12 (Biowest, Франція [38]). Середовище DMEM-F12 від компанії Biowest (Франція) є сумішшю середовищ DMEM та Ham's F12 у співвідношенні 1:1. Це середовище розроблене для культивування різних типів ссавцевих клітин, таких як MDCK, фібробласти та ендотеліальні клітини. Формула середовища включає L-глутамін та HEPES (15 мМ). Концентрація глюкози становить 3,151 г/л. Для підтримки відповідного рН середовища та стабільних умов культивування використовували також CO₂-інкубатор, що дозволяє підтримувати рівень CO₂, необхідний для регулювання кислотно-лужного балансу в середовищі [38].

Також в процесі культивування клітин використовували 0,02% розчин Версену, що застосовувався для дезагрегації моношару клітин з метою їх підрахунку для висіву у планшети чи для проведення послідовних пасажів, а також фізіологічний розчин для промивання клітинних культур та проведення послідовних розведень зразків з метою їх внесення до клітин. Крім того, використовували робочий розчин кристалічного фіолетового 4%, який застосовувався для мікроскопії, зокрема для фарбування клітин та дослідження їх морфології.

Для проведення дезінфекції та підтримання чистоти лабораторного середовища використовували дезінфікуючий розчин Blanidas 300 (Бланідас, Україна) [39]. Цей розчин використовується для обробки робочих поверхонь та інструментів, що забезпечує ефективне знищення патогенних мікроорганізмів і запобігає їх поширенню в лабораторії.

У процесі виконання роботи також використовували спеціалізоване обладнання, що включало інвертований бінокулярний мікроскоп Біолам для детального вивчення клітинних культур та спостереження за морфологічними змінами клітин. Термостат сухоповітряний ТС-80 використовували для підтримки постійної температури в умовах вирощування клітин, а фотометр з вертикальним променем LabSystem Multiskan – для вимірювання оптичної густини лунок планшету, де культивували клітини, інфікували їх, вносили різні концентрації досліджуваних сполук з метою визначення їх цитотоксичності та прояву антивірусної активності.

До витратних матеріалів відносяться одноразовий пластиковий посуд, включаючи матраси та 96-лункові планшети з плоским дном для вирощування клітин. Також використовували пробірки типу «Епендорф» для проведення реакцій та зберігання зразків, а також наконечники для механічних дозаторів, що дозволяють точно вимірювати об'єми розчинів.

У дослідженні було використано чотири зразки: розчин метансульфонової кислоти (M_s , вміщує HSO_3CH_3 176 г/л, молярна концентрація = 1,833 М), розчин (CeM_s), приготовлений розчиненням солі церію складу $Ce(CH_3SO_3)_3 \cdot 4H_2O$ 220 г/л H_2O . Згідно цієї формули склад досліджуваного розчину: 61 г/л $Ce(III)$, (молекулярна маса церію 140, молярна концентрація = 0,44 М) та 129 г/л HSO_3CH_3 (метансульфонової кислоти, молярна маса = $1+32+16 \times 3+12+3=96$, молярна концентрація відповідно = 1,344 М). Розчин MgM_s був приготовлений шляхом розчинення метансульфонату магнію складу $Mg(CH_3SO_3)_2 \cdot 12H_2O$ у воді в концентрації 600 г/л. З урахуванням молекулярної маси цієї сполуки (≈ 253 г/моль), молярна концентрація іонів магнію (Mg^{2+}) у розчині становить 2,37 М. Таким чином, досліджуваний зразок містив 2,37 моль/л іонів Mg^{2+} і 4,74 моль/л метансульфонат-аніону ($CH_3SO_3^-$), що зумовлює високий іонний фон розчину. Розчин ZnM_s було отримано розчиненням цинку метансульфонату складу $Zn(CH_3SO_3)_2$ у воді у кількості 780 г/л. Виходячи з молекулярної маси цієї солі (≈ 276 г/моль), молярна концентрація Zn^{2+} у готовому розчині становить

2,83 М, а відповідна концентрація метансульфонат-аніону – 5,66 М. Такий склад забезпечує наявність значної кількості іонів цинку в системі, що дозволяє ефективно оцінити як антивірусну активність, так і потенційну цитотоксичність досліджуваного зразка.

Матеріали та зразки були надані керівником практики на базі проведення досліджень у відділі проблем інтерферону і імуномодуляторів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

2.2. Культура клітин фібробластів лінії L929

Для визначення антивірусних властивостей речовин використовували культуру первинних клітин. Ці клітини отримують з живої тканини і культивують в умовах *in vitro*. Вважається, що первинні клітини більш схожі за фізіологічним станом і генетичним фоном до клітин тканини, з якої вони походять, ніж іморталізовані або пухлинні клітинні лінії. З цієї причини первинні клітини є корисною моделлю для вивчення біологічних питань. Однак, на відміну від сформованих клітинних ліній, які ростуть нескінченно, первинні клітини з часом зазнають старіння в культурі і потребують частого відновлення.

До найпоширеніших первинних клітин належать фібробласти, епітеліальні клітини, ендотеліальні клітини, Т-лімфоцити, В-клітини, макрофаги і дендритні клітини, отримані з кісткового мозку. Фібробласти часто використовують як первинну модель культури клітин. Вони мають ключові переваги над іншими первинними клітинами. Клітинні культури легко створюються, легко підтримуються і не потребують очищення клітин перед культивуванням. Вони мають швидку початкову проліферацію і не потребують спеціалізованого середовища або протоколів активації.

Фібробласти можна ефективно трансформувати, використовуючи біологічні, хімічні та фізичні протоколи. Фібробласти є важливими клітинами сполучної тканини, які секретують білки колагену та позаклітинний матрикс.

Вони забезпечують структурний каркас багатьох тканин і відіграють важливу роль у загоєнні ран та відновленні тканин [15].

Фібробласти мишей лінії L929 (Рис. 2.1 [40]) є однією з найпоширеніших та найчастіше використовуваних клітинних ліній у біомедичних дослідженнях. Лінія L929 була отримана у 1948 році з нормальної підшкірної сполучної та жирової тканини миші C₃H/An і є похідною від штаму L929 [16]. Клітини L929 мають типову для фібробластів витягнуту, веретеноподібну форму і здатні активно ділитися, утворюючи моношар при культивуванні. Клітини L929 культивували у стандартному середовищі, яке містить мінімальні необхідні компоненти, доповнене 10% фетальної бичачої сироватки та антибіотиками (50 U/mL пеніциліну і 50 µg/mL стрептоміцину). Оптимальні умови культивування включають температуру 37°C і 5% CO₂ вологу атмосферу [17].

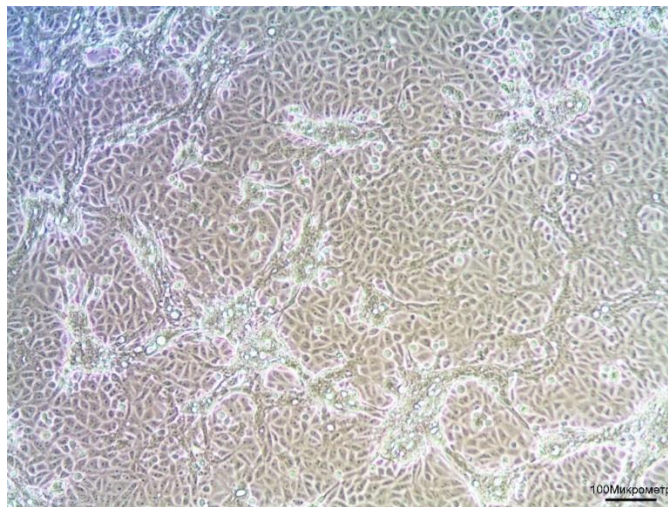


Рис. 2.1. Мікрофотографія культури клітин фібробластів миші L929 на середовищі DMEM + 2mM глутаміну + 10% FBS [40]

Особливості клітин L929 включають їхню здатність до високого рівня продукції білків екстрацелюлярного матриксу, таких як колаген та фібронектин, що робить їх важливими для дослідження процесів загоєння ран і тканинної інженерії. Вони також демонструють значну здатність до адгезії та міграції, що використовуються у дослідженнях клітинної поведінки та експресії білків. Однією з ключових переваг використання клітин L929 є їхня

стійкість та надійність у різних експериментальних умовах. Вони широко використовуються для тестування цитотоксичності різних хімічних речовин та лікарських засобів, що робить їх незамінними у фармакологічних дослідженнях [16]. Крім того, ці клітини можуть продукувати різні цитокіни, такі як M-CSF, що впливає на фенотип макрофагів і дозволяє вивчати взаємодію між клітинами та імунною системою [18]. Клітини L929 також застосовують для дослідження механізмів апоптозу, аутофагії та інших клітинних процесів.

Наприклад, дослідження показали, що 25-гідроксихолестерол може викликати оксиапоптофагію в клітинах L929, що є важливим для вивчення клітинних відповідей на стресові фактори [17]. Ця клітинна лінія є цінним інструментом для розробки нових методів лікування і терапевтичних стратегій завдяки своїм унікальним властивостям і широкому спектру застосувань у біології та медицині.

Культура клітин фібробластів лінії L929 широко використовується у вірусологічних дослідженнях завдяки своїй високій чутливості до різних вірусів. Ця властивість робить їх незамінним інструментом для вивчення механізмів вірусної інфекції, оцінки вірусної реплікації та тестування антивірусних препаратів. Одним із прикладів є їхня чутливість до вірусу везикулярного стоматиту. Цей вірус є добре відомим своїми вираженими цитопатичними ефектами в клітинах L929, які включають утворення синцитій та клітинну деструкцію. Це робить цю лінію клітин ідеальною для вивчення механізмів розвитку інфекційних процесів, викликаних ВВС, та оцінки ефективності антивірусних засобів проти цього вірусу.

Використання фібробластів лінії L929 дозволяє детально досліджувати клітинні та молекулярні механізми, що лежать в основі багатьох фізіологічних та патологічних процесів, що робить їх важливим компонентом багатьох біомедичних досліджень.

Скринінг антивірусних властивостей зразків проводили, використовуючи перещеплювану культуру фібробластів мишей L929 з

колекції культур клітин Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ та як індикатор – вірус везикулярного стоматиту з колекції вірусів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ, оцінюючи ступінь цитопатичної дії тест-вірусу (інфекційний титр ВВС – 5 lgТЦД50).

2.3. Характеристика вірусу везикулярного стоматиту

Вірус везикулярного стоматиту (ВВС) належить до родини *Rhabdoviridae*, роду *Vesiculovirus*. Існує два різних імунологічних класи ВВС: Нью-Джерсі (NJ) та Індіана (IND). Існує три підтипи серогрупи IND на основі серологічних взаємозв'язків: IND-1 (класичний IND), IND-2 (кокаїновий вірус) і IND-3 (вірус алагоас) [12].

Загальна класифікація для двох видів вірусу везикулярного стоматиту має наступний вигляд [36, 37]:

Царство: Віруси (*Vira*)

Реалм вірусів: Рибовіруси (*Riboviria*)

Королівство: *Orthornavirae*

Філум: *Negarnaviricota*

Клас: *Monjiviricetes*

Порядок: *Mononegavirales*

Родина: *Rhabdoviridae*

Підродина: *Alpharhabdoviridae*

Рід: *Vesiculovirus*

Види: *Vesicular stomatitis virus Indiana* (VSIV)

та *Vesicular stomatitis virus New Jersey* (VSV-NJ)

Везикулярний стоматит – це хвороба великої рогатої худоби, що викликається деякими представниками роду *Vesiculovirus* (родина *Rhabdoviridae*), два з яких називаються "вірусом везикулярного стоматиту". Клінічно хвороба проявляється у вигляді сильних везикул та/або виразок на

язиці, тканинах ротової порожнини, ногах та дійках, що призводить до значного зниження продуктивності. За винятком зовнішнього вигляду у коней, ця хвороба клінічно не відрізняється від ящуру. На відміну від ящуру, він дуже заразний для людини і може викликати тимчасово виснажливе захворювання.

Везикулярний стоматит має сезонний характер у США, Мексиці, Центральній та Південній Америці; також ендемічний в Індії та Африці. Передається членистоногими, ймовірно як віруси комах, здатні інфікувати ссавців. Везикуловіруси мають лінійний одноланцюговий (-)РНК-геном і кодують п'ять білків. Після проникнення у клітину вони пригнічують експресію клітинних генів і порушують цитоскелет, спричиняючи деструкцію тканин [26].

Вірусна інфекція у тварин стимулює продукцію інтерферону та оксиду азоту, що пригнічують реплікацію вірусу та активують імунну відповідь. Геном везикуловірусу змінюється через помилки реплікації, хоч у межах ендемічних зон залишається відносно стабільним. Вакцини досі немає, що разом із подорожами та зростанням сприйнятливих тварин підвищує ризик спалахів [13].

Схема вірусу везикулярного стоматиту показана на рис. 2.2. разом з електронною мікрофотографією, на якій зображені частинки вірусу. Частинки мають форму кулі, довжину приблизно 180 нм і діаметр 70 нм. Частинки складаються з 74% білка, 20% ліпідів, 3% РНК і 3% вуглеводів. Вірус має ліпідну оболонку, на поверхні якої присутні тримерні шипи глікопротеїну прикріплення (G) масою 67 кДа. Всередині частинки міститься рибонуклеопротеїновий (РНП) каркас геномної РНК, з'єднаний з вірусним білком нуклеокапсидом (N). Ядро N-РНК пов'язане з РНК-залежною РНК-полімеразою (RdRp), вірусними компонентами якої є великий білок (L) розміром 241 кДа і тетрамер допоміжного фосфопротеїну (P) розміром 29 кДа. Разом вони утворюють внутрішній спіральний нуклеокапсид [27].

Іншим важливим структурним компонентом вірусних частинок є матричний білок (M) масою 26 кДа, який розташований під мембраною і

пов'язаний з нуклеокапсидом. Приблизний склад частинки: одна молекула РНК, 1200 копій N, 500 копій Р, 1800 копій М, 1200 копій G і 50 копій L. Роль цих білків у вірусній реплікації більш детально описана нижче.

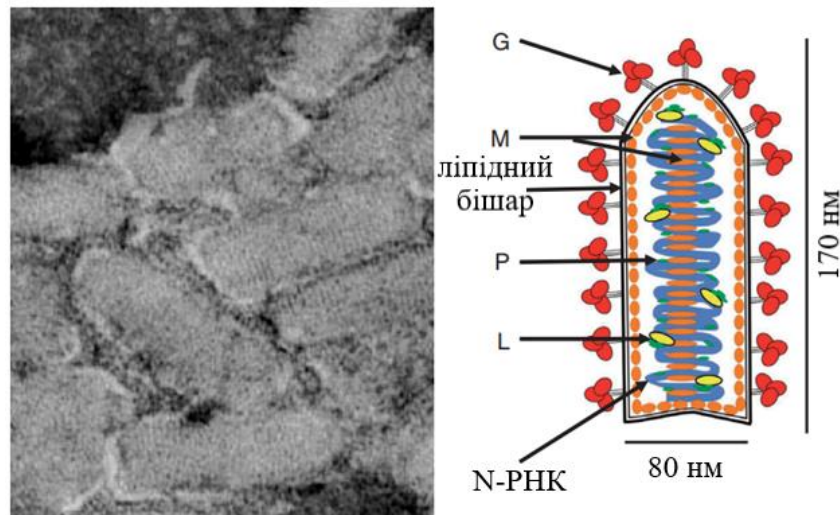


Рис. 2.2. Електронна мікрофотографія частинок ВВС та схематичне зображення віріону [27]

Зліва показано електронно-мікроскопічне зображення групи вірусних частинок (негативне контрастування). Праворуч – схематичне зображення віріона із зазначенням розмірів вірусної частинки. N-РНК, нуклеокапсидна РНК, вкрита білком; Р, фосфопротеїн; М, матричний білок; G, глікопротеїн прикріплення; L, велика субодиниця полімерази.

Геном ВВС складається з несеgmentованої «-» РНК довжиною 11 161 т.п.н. Геном складається з лідерної ділянки (le) довжиною 50 т.п.н., п'яти генів, які кодують по порядку білки N, Р, М, G і L, та трейлерної ділянки довжиною 59 т.п.н. (Рис. 2.3.). 50 і 30 кінці геному не модифіковані і містять 50 трифосфат і 30 гідроксил. Ключовою особливістю всіх мононегавірусів є те, що РНК-геном не присутній в інфікованих клітинах у відкритому вигляді. Замість цього він присутній у вигляді рибонуклеопротеїнового комплексу, в якому він повністю покритий вірусним нуклеокапсидним білком. Цей шаблон N-РНК, асоційований з вірусними білками L і Р, становить транскрипційно-

компетентне ядро вірусу, і доставка цього комплексу необхідна для запуску інфекційного циклу. Отже, на відміну від «+» РНК вірусів, «гола» РНК вірусу везикулярного стоматиту не є інфекційною [28].

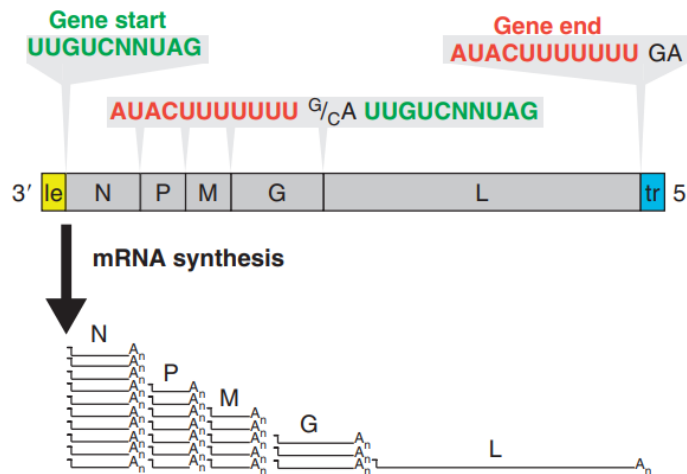


Рис. 2.3. Схематична ілюстрація геному VSV з виділенням регуляторних елементів полімерази [28]

Примітки: консервативні цис-елементи, які регулюють полімеразну активність під час синтезу мРНК, показано підкресленням; кольори: зелений – консервативні залишки початкової послідовності гена; червоний – консервативні залишки кінцевої послідовності гена; чорний – нетранскрибовані залишки з'єднання генів.

Ділянки лідера і трейлера також містять ключові елементи, які регулюють роботу полімерази.

Цикл реплікації вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) складається з трьох основних етапів: прикріплення, адсорбція та зняття оболонки. Прикріплення вірусу до клітини хазяїна здійснюється за допомогою глікопротеїну G, що взаємодіє з клітинною поверхнею. Оскільки вірус може інфікувати більшість клітин у культурі, ймовірно, він або використовує поширений рецептор, або здатен зв'язуватись із різними поверхневими молекулами. Раніше вважали, що рецептором є фосфатидилсерин (PS), однак нові дані це спростовують. Сайт зв'язування PS розташований усередині тримера G у префузійній формі. Після прикріплення вірус адсорбується до клітини через клатрин-залежний ендоцитоз і переміщується до ранньої

ендосоми. Там, при рН $\sim 6,2$, відбувається злиття вірусної та клітинної мембран, що забезпечує вивільнення транскрипційно-компетентного ядра РНК у цитоплазму. Проте нові дослідження пропонують змінену модель проникнення: злиття та вивільнення РНК відбуваються у різних місцях і в різний час. Зокрема, спочатку РНК доставляється у внутрішньопросвітну везикулу всередині ендосоми, а потім ще одне злиття забезпечує її вихід у цитоплазму. Незалежно від маршруту, результат один – РНК вірусу потрапляє в цитоплазму, а білок М вивільняється та може пригнічувати експресію генів клітини-хазяїна, мігруючи в ядро [14, 29].

2.4. Методи визначення цитотоксичності зразків сполук

Цитотоксичність зразків сполук визначали в культурі фібробластів (перещеплювана культура клітин L929 – клітини мишей) за умови 24 год контакту клітин зі зразками. Кількість життєздатних клітин визначали за допомогою двох методів: тесту на основі кристалічного фіолетового (КФ) [20] та тесту на основі метилтетразолію блакитного (МТТ) [41]. Ці методи дозволяють оцінити вплив зразків на життєздатність клітин та їх метаболічну активність, що є важливим для визначення токсичності речовин.

Метод КФ застосовувався для визначення загальної кількості адгезованих клітин в культурі, оскільки цей тест не розрізняє живі та мертві клітини, оцінюючи лише присутність клітин у зразках за допомогою барвника, який зв'язується з ДНК. Він дозволяє отримати загальну картину про кількість клітин після експозиції зразками, що є корисним для оцінки пошкодження клітин і деструкції моношару, як результату такого впливу.

У той час як метод МТТ використовувався для визначення життєздатних клітин, оскільки він дає змогу оцінити тільки ті клітини, які зберігають свою метаболічну активність, надаючи точну інформацію про їх здатність до відновлення [41].

2.4.1 Тест з кристалічним фіолетовим (КФ)

Тест з кристалічним фіолетовим (КФ) є одним із широко застосовуваних методів для визначення загальної кількості клітин у культурах [20]. Цей метод заснований на здатності кристалічного фіолетового барвника взаємодіяти з ДНК клітин. Тест є простим, швидким і неферментативним, що робить його корисним для первинного скринінгу токсичності. Кількість поглинутого барвника залежить від загального вмісту ДНК в культурі та дозволяє оцінити кількість клітин. Застосування КФ-тесту дозволяє уникнути можливих хибних результатів у випадку безпосереднього впливу досліджуваних речовин на мітохондріальну активність [21].

В експерименті з КФ метод використовувався для оцінки цитотоксичності зразків на клітинах культури L929 – фібробластах мишей. Після інкубації клітин зі зразками протягом 24 годин, до клітин додавали 0,5% розчин кристалічного фіолетового у 30% етанолі. Фарбування тривало 10 хвилин при кімнатній температурі. Після цього фарбник видаляли, а клітини промивали водою для повного видалення незв'язаного барвника. Клітини висушували, і для подальшого аналізу визначали оптичну густину (ОГ) в кожній лунці.

Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі Multiskan Ascent (Thermo Labsystems, Фінляндія) при довжині хвилі 540 нм, що відповідає максимуму поглинання кристалічного фіолетового. Вимірювання проводили в чотирьох повторах для кожного зразка, що дозволяло отримати більш точні й репрезентативні результати. Для оцінки життєздатних клітин використовувалася наступна формула:

$$\text{ОГ}_д / \text{ОГ}_к \times 100\%,$$

де $\text{ОГ}_к$ – оптична густина розчину у контрольних лунках;

$\text{ОГ}_д$ – оптична густина розчину у дослідних лунках.



Рис. 2.4. Методологія проведення тесту на цитотоксичність зразків сполук на культурі клітин L929 за допомогою кристалічного фіолетового (КФ)

Отже, результати, отримані в чотирьох повторах, дадуть змогу розрахувати життєздатність клітин за співвідношенням ОГ дослідних і контрольних лунок.

Після отримання результатів цитотоксичності за КФ-тестом визначались концентрації сполук, що справляли цитотоксичну дію. Для обрахунку цих концентрацій використовувались значення CC_{10} , CC_{50} та CC_{90} , що відповідають певній цитотоксичній концентрації (CC).

CC_{10} – це така концентрація зразку сполуки, за якої спостерігається цитотоксичний ефект, який є не вище 10%, тобто життєздатність клітин складає близько 90%. Це значення вказує на максимально наближену до нетоксичної концентрацію сполуки.

CC_{50} – це концентрація, за якої близько 50% клітин зберігають свою життєздатність, цей показник є загальноприйнятим і ключовим у дослідженні цитотоксичності сполук.

CC_{90} – це найвища концентрація, за якої хоча б 10% клітин зберігають життєздатність. Це значення вказує на максимальну токсичну концентрацію, за якої гинуть майже всі клітини.

Розрахунок цих показників може відбуватись як емпірично (за графіком), так і математично (за формулою). У нашому випадку ми поєднали ці два шляхи для більш точного обрахунку значень. Нижче представлено формулу для обрахунку CC_{10} - CC_{50} - CC_{90} (на прикладі CC_{50}), в залежності від діапазонів концентрацій.

$$CC_{50} = \log_{10} C_1 + \left(\frac{50 - \%_1}{\%_2 - \%_1} \right) \cdot \log_{10}(\text{інтервал})$$

Де, C_1 – концентрація, за якої життєздатність клітин складала вище 50% (мМ), $\%_1$ – кількість життєздатних клітин при C_1 (%), $\%_2$ – кількість життєздатних клітин при концентрації, коли життєздатність клітин складала менше 50% (%), інтервал – кратність розведення (в нашому випадку – 2).

2.4.2 Тест з метилтетразолієм блакитним (МТТ)

Тест на цитотоксичність за допомогою метилтетразолію блакитного (МТТ) є одним з найбільш поширених методів оцінки зміни показників метаболічної активності клітин. МТТ є ферментативним барвником, який здатний проникати в живі клітини, де він редукується мітохондріальними ферментами до нерозчинного диформазану. Оскільки реакція редукції МТТ залежить від життєздатності клітин, кількість утвореного диформазану пропорційна інтенсивності метаболізму присутніх в лунках клітин [41].

Цей метод дозволяє отримати кількісні дані щодо життєздатності клітин і оцінити їх метаболічну активність.

Процедура тесту включала наступні етапи: клітини L929 були інкубовані з різними концентраціями зразків протягом 24 годин. Після цього середовище було замінено на підтримуюче середовище, у складі якого 0,5 мг/мл МТТ (Sigma-Aldrich, США), і клітини інкубували ще 3-4 години при

37°C в атмосфері 5% CO₂. Активність внутрішньоклітинних дегідрогеназ зумовлює відновлення яскраво-жовтого розчинного МТТ до темно-синього нерозчинного у воді диформазау, який утворював всередині та на поверхні клітин кристали. Після інкубації для вимірювання оптичної густини лунок, диформазан переводили у розчинну форму шляхом додавання DMSO.

На рисунку 2.5 показано послідовність етапів визначення метаболічної активності культури клітин L929 через 24 год контакту з різними концентраціями досліджуваних сполук за допомоги метилтетразолію блакитного (МТТ).

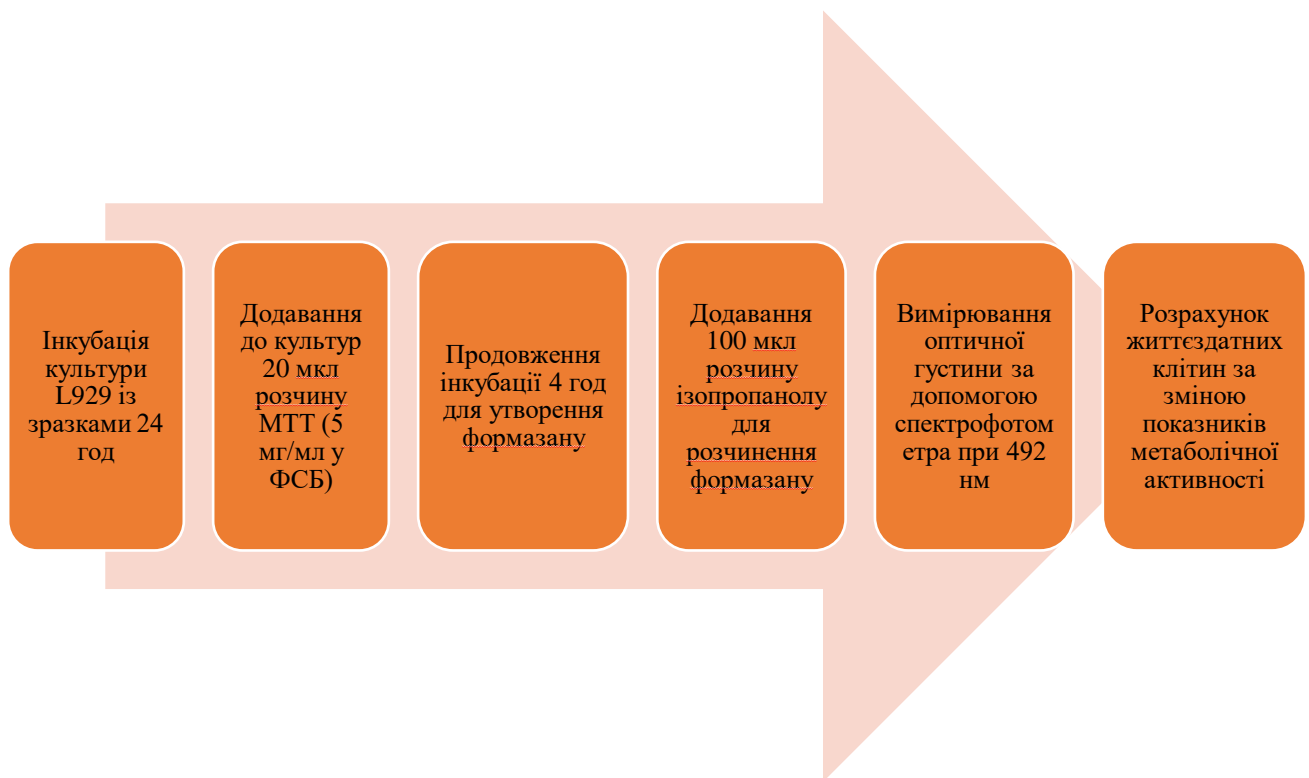


Рис. 2.5. Методологія проведення тесту на цитотоксичність зразків сполук на культурі клітин L929 за допомогою метилтетразолію блакитного (МТТ)

Інтенсивність забарвлення розчину вимірювали за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 492 нм. Результати виражали як відсоток метаболічно активних клітин в дослідних лунках відносно значень, отриманих

в лунках контролю клітин. Формула для розрахунку метаболічної активності клітин подібна як і у КФ:

$$\text{ОГ}_д / \text{ОГ}_к \times 100\%,$$

де $\text{ОГ}_к$ – оптична густина розчину у контрольних лунках;

$\text{ОГ}_д$ – оптична густина розчину у дослідних лунках.

У результаті проведеного тесту, було зафіксовано значення оптичної густини (ОГ) у контрольних та дослідних лунках. Дані отримували для кожного зразка в чотирьох повтореннях, що дозволяло забезпечити точність і надійність результатів. За допомогою цього методу було можливе точне вимірювання рівня метаболічної активності клітин, що дало змогу оцінити їх життєздатність під впливом різних концентрацій досліджуваних агентів.

МТТ-тест дозволяє оцінити цитотоксичність зразків на клітинах L929 шляхом вимірювання оптичної густини диформазану, утвореного в результаті редукції МТТ у живих, метаболічно активних клітинах.

2.5. Визначення антивірусної активності зразків сполук *in vitro* за зміною прояву цитопатичної дії ВВС в культурі L929

Дослідження антивірусної активності зразків проведено на модельній системі: клітини лінії L929 (фібробласти мишей) та РНК-вмісний вірус везикулярного стоматиту (ВВС, ATCC №VR-158) з інфекційним титром не менше 10^5 ТЦД₅₀/0,1 мл. Вказана тест-система відповідає вимогам USP «*Draft Guidance for Industry on Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics; Availability, 2014*».

Спочатку клітини лінії L929 вирощували на 96-лункових планшетах до досягнення 80% конфлуентності, після чого їх інкубували з вірусом везикулярного стоматиту (ВВС) в титрі 10^5 ТЦД₅₀/0,1 мл протягом 30 хвилин. Після цього в лунки до середовища додавали попередньо приготовлені на ФСБ аліквоти двократних розведень зразків (метансульфонату магнію,

метансульфонату цинку, метансульфонату церію та метансульфонової кислоти), надалі клітини інкубували з ними при 37°C протягом 24 годин.

Оцінку антивірусної дії зразків проводили за умови, коли в лунках контролю клітин був 100% збережений моношар клітин, а в лунках контролю вірусу спостерігалась чітка цитопатична дія вірусу, що супроводжувалась значущою деструкцією моношару вірус-інфікованих клітин. Кількість живих адгезованих клітин в лунці визначали після їх фарбування кристалічним фіолетовим (КФ). Для цього з лунок видаляли надосад у дезрозчин, а до клітин вносили 0,2 % розчин барвника *crystal violet* («Sigma», США) в 2% етанолі. Через 10 хв барвник видаляли, а зафарбований моношар клітин промивали. Оптичну густину зафарбованих клітин вимірювали при довжині хвилі 540 нм. Отримані результати приймали до уваги за умови, коли в контрольних культурах, що не містили вірус, цитодеструктивні зміни були відсутні, а в контролі вірусу спостерігалась значуща деструкція моношару клітин.

Антивірусну активність зразків вивчено за лікувальної схеми, коли їх вносили до клітинного середовища над сформованим моношаром клітин через 30 хв після інфікування ВВС.

Подібно як для цитотоксичності так і для антивірусної активності розраховували ефективні концентрації (EC) зразків сполук.

В діапазоні ефективних концентрацій зразків встановлено EC_{50} – ефективну концентрацію, необхідну для пригнічення цитопатичного ефекту вірусу на 50%, EC_{90} – ефективну концентрацію зразка, необхідну для пригнічення цитопатичного ефекту вірусу на 90%, а також індекс селективності (SI) – відношення CC_{50} до EC_{50} – SI_{50} , а також відношення CC_{50} до EC_{90} – SI_{90} . EC розраховували за тією ж формулою, що і для CC, але за даними антивірусної ефективності зразків сполук.

На рисунку 2.6 показано методику визначення антивірусної активності зразків (метансульфонова кислота, метансульфонат церію, метансульфонат цинку та метансульфонат магнію) на культурі клітин L929 за допомоги кристалічного фіолетового (КФ).

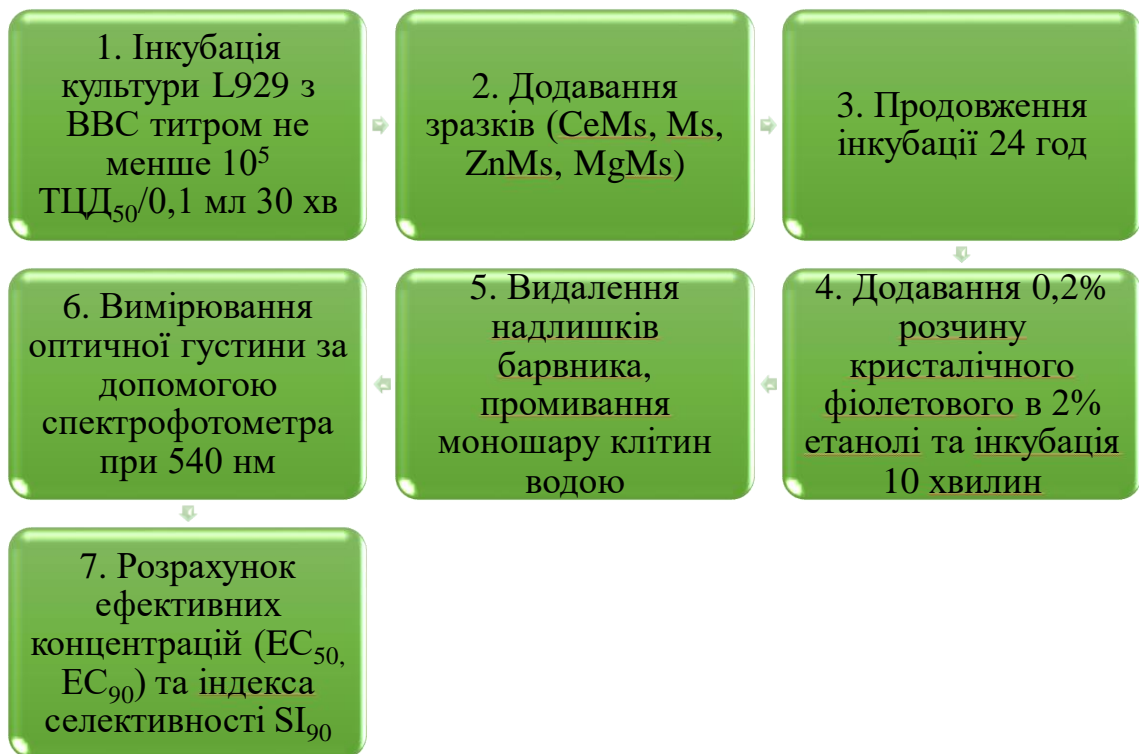


Рис. 2.6. Методологія визначення антивірусної активності зразків сполук на культурі клітин фібробластів L929 за зміною прояву цитопатичної дії ВВС з використанням кристалічного фіолетового (КФ)

Отже, антивірусну активність зразків солей метансульфонату магнію, метансульфонату цинку, метансульфонату церію та метансульфонової кислоти планується оцінювати за лікувальною схемою на клітинах L929, інфікованих вірусом везикулярного стоматиту, шляхом вимірювання оптичної густини моношару після його фарбування кристалічним фіолетовим.

2.6. Статистична обробка результатів

У дослідженні результати представлені у вигляді таблиць та діаграм, що забезпечує наочність та зручність сприйняття даних. Для статистичної обробки отриманих результатів застосовані методи непараметричної

статистики, зокрема обчислення медіани та першого (Q_1) і третього (Q_3) кватилів, що дозволяє оцінити центральну тенденцію та розсіювання даних.

Медіана є значенням, яке ділить впорядкований набір даних на дві рівні частини. Якщо кількість спостережень непарна, медіаною є середнє значення; якщо парна — середнє арифметичне двох центральних значень. Медіана є стійкою до впливу екстремальних значень (викидів) і є кращою характеристикою центральної тенденції, коли дані мають асиметричний розподіл або містять викиди [42, 43].

Кватилі та медіана поділяють впорядкований набір даних на наступні частини [41]:

1. Перший кватиль (Q_1) – значення, нижче якого знаходиться 25% даних.
2. Медіана (Q_2) – значення, нижче якого знаходиться 50% даних.
3. Третій кватиль (Q_3) – значення, нижче якого знаходиться 75% даних.

Інтерквартильний діапазон (IQR) визначається як різниця між третім та першим кватилем ($IQR = Q_3 - Q_1$) і відображає розкид середніх 50% даних. Використання медіани та інтерквартильного діапазону є стандартною практикою в непараметричній статистиці, особливо коли дані не підкоряються нормальному розподілу або містять похибки [42].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка токсичності зразків сполук в культурах клітин L929

З метою підбору адекватних концентрацій для вивчення антивірусної активності зразків, насамперед, було досліджено їх цитотоксичність за умови 24 год контакту зі сформованим моношаром клітин та на підставі отриманих значень встановлено CC_{50} – концентрацію препарату, що викликає руйнування моношару клітин на 50%.

Результати цитотоксичності досліджені та розраховані окремо для метансульфонової кислоти, метансульфонату церію, метансульфонату магнію і метансульфонату цинку. Отримані результати токсичності зразка метансульфонової кислоти (Ms) для культури клітин фібробластів L929 за умови 24 год контакту представлено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Показники життєздатності клітин L929 через 24 год контакту зі зразком метансульфонової кислоти (Ms) за КФ-тесту

Зразок	Концентрація Ms, mM										
	183	46	23	11,5	5,7	2,9	1,4	0,7	0,4	0,2	0,1
Ms	74	71	80	84	83	84	86	89	88	93	95
1 квартиль	73,9	69,9	79,0	83,9	82,1	82,4	84,7	89,3	88,0	92,6	94,5
3 квартиль	74,2	71,8	80,8	84,9	84,0	85,4	86,8	89,6	88,5	93,3	95,2
Контроль клітин	100										
1 квартиль	96										
3 квартиль	102										

Отримані дані свідчать, що статистично значуща концентрація метансульфонової кислоти, яка знижувала життєздатність клітин не більше, ніж на 10% (CC₁₀), становила 0,3 мМ.

Критерієм токсичності речовини є її значення CC₅₀. Виходячи із отриманих значень, CC₅₀ для метансульфонової кислоти становить більше 200 мМ, а розраховане значення – 250 мМ для культури клітин L929 за умови 24 год контакту зразків із клітинами.

Отримані результати токсичності зразка метансульфонату церію (CeMs) для культури клітин фібробластів L929 за умови 24 год контакту (цифрові значення відсотку живих адгезованих клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних адгезованих клітин, прийнятих за 100% живих), представлено у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

**Показники життєздатності клітин L929 через 24 год контакту
зі зразком метансульфонату церію (CeMs) за КФ-тесту**

Зразок	Концентрація Ms, мМ										
	134	34	17	8,4	4,2	2,1	1,1	0,5	0,3	0,1	0,07
	Концентрація Ce, мМ у складі CeMs										
	44	11	5,5	2,8	1,4	0,7	0,3	0,2	0,1	0,04	0,02
CeMs	59	59	85	105	103	95	94	93	90	91	97
1 квартиль	58,1	53,7	82,0	103	102	94,3	93,6	92,5	89,9	90,6	94,6
3 квартиль	59,0	60,0	87,1	106	105	95,7	94,6	95,1	91,7	92,7	97,6
Контроль клітин	100										
1 квартиль	96										
3 квартиль	102										

З даних, представлених у таблиці 3.2, можна стверджувати, що церій у складі метансульфонату церію в концентрації 2,8 мМ не справляє цитотоксичної дії на культуру клітин L929, а CC_{10} становить 5,0 мМ.

Розрахована CC_{50} для церію у складі церій метансульфонату в культурі клітин L929 за умови 24 год контакту зразків з клітинами склала 50 мМ, а для церію метансульфонату – 200 мМ.

Як видно із наведених даних, у культурі клітин L929 у максимально досліджених концентраціях метансульфонат церію проявляє достовірно вищу токсичність, ніж метансульфонова кислота: у порівнянні із контрольними інтактними клітинами кількість живих клітин в присутності метансульфонату церію на 15-17% нижча, ніж в присутності метансульфонової кислоти. Але зі зниженням концентрації досліджуваних зразків співвідношення їх токсичності змінюється на протилежне: метансульфонат церію є менш токсичним для досліджених культур клітин, ніж метансульфонова кислота.

Критерієм токсичності речовини є її значення CC_{50} . Узагальнюючи, за отриманими значеннями, CC_{50} для метансульфонової кислоти становить більше 200 мМ, розраховане значення – 250 мМ для культури клітин L929 за умови 24 год контакту зразків з клітинами. Для метансульфонату церію в культурі клітин L929 CC_{50} за аналогічних умов склала 150 мМ.

Тобто, метансульфонат церію має нижчу цитотоксичність порівняно з метансульфоновою кислотою для культури клітин фібробластів мишей лінії L929, що робить його перспективним для подальшого вивчення з метою потенційного використання в медичній практиці. Ці результати є важливим кроком у розумінні безпечності та ефективності цих сполук при взаємодії з клітинами.

Для визначення оптимальних концентрацій метансульфонатів магнію та цинку, що використовуються для вивчення їх антивірусної активності, подібно до попередніх сполук також спочатку була оцінена їх цитотоксичність при 24-годинному контакті з моношаром клітин L929 із застосуванням МТТ-тесту

(визначення метаболічної активності клітин) та КФ-тесту (визначення загальної кількості живих адгезованих клітин).

Отримані результати токсичності зразка метансульфонату магнію (MgMs) для культури клітин фібробластів L929 за умови 24 год контакту представлено у табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Показники життєздатності клітин L929 через 24 год контакту зі зразком метансульфонату магнію (MgMs) за КФ та МТТ тестів

КФ тест											
Зразок	Концентрація MgMs, мМ										
	18,6	9,3	4,7	2,3	1,2	0,6	0,3	0,15	0,07	0,04	0,02
Концентрація Mg, мМ											
	11,8	5,9	2,9	1,5	0,7	0,4	0,2	0,09	0,05	0,02	0,01
MgMs	39,8	20,3	103,6	107,1	105,1	99,9	101,4	86,1	79,7	86,6	84,3
1 кuartиль	38,7	19,9	101,2	104,8	100,2	99,7	100,4	80,2	79,1	82,3	83,3
3 кuartиль	40,9	21,1	106,4	108,9	109,7	100,9	104,6	90,6	82,1	90,8	88,7
МТТ тест											
	Концентрація MgMs, мМ										
	18,6	9,3	4,7	2,3	1,2	0,6	0,3	0,15	0,07	0,04	0,02
Концентрація Mg, мМ											
	11,8	5,9	2,9	1,5	0,7	0,4	0,2	0,09	0,05	0,02	0,01
MgMs	17,8	21,4	87,5	92,1	99,2	92,3	92,1	88,4	84,6	83,4	76,6
1 кuartиль	17,6	21,2	86,2	89,3	92,2	89,3	89,9	88,1	83,6	81,3	73,2
3 кuartиль	18,3	21,6	90,6	94,7	99,7	94,0	93,7	88,6	84,8	84,8	78,1
Контроль клітин	100										
1 кuartиль	95										
3 кuartиль	105										

Як видно з наведених даних, MgMs демонструє виражений концентраційно залежний цитотоксичний ефект. Так, за концентрації 11,8 мМ спостерігалось зниження кількості живих клітин до 39,8%, що свідчить про токсичну дію на культуру клітин. Розраховане значення CC_{50} для MgMs становить 7,3 мМ, тоді як для магнію у складі цієї сполуки, відповідно, $CC_{50} = 4,5$ мМ.

За концентрацій у діапазоні 0,2–2,9 мМ магній у складі метансульфонату не виявляє помітної цитотоксичної дії, не впливаючи на життєздатність клітин. Було визначено також CC_{10} – концентрацію, яка знижує життєздатність клітин не більше, ніж на 10%. Для MgMs вона становила 10,2 мМ, а для іонів магнію у складі MgMs – 6,3 мМ. Дані тестів токсичності метансульфонату магнію свідчать про його помірну токсичну дію на культуру клітин фібробластів L929.

Слід зазначити, що показники цитотоксичності MgMs, які визначались із застосуванням КФ-тесту (загальна кількість живих адгезованих клітин) та МТТ-тесту (метаболична активність клітин) є практично тотожними, що свідчить про можливий механізм реалізації цитотоксичної дії MgMs, пов'язаний із пригніченням метаболичної активності клітин L929.

Отримані результати цитотоксичності зразка метансульфонату цинку (ZnMs) для культури клітин фібробластів L929 за умови їх 24 год контакту із застосуванням КФ-тесту та МТТ-тесту представлено у табл. 3.4.

Як видно з результатів, ZnMs викликає виражену токсичну дію навіть за низьких концентрацій: при 0,4 мМ життєздатність клітин становить лише 14,3%, що є критичним показником токсичності. У вищих концентраціях токсичність зростає ще більше, тоді як при зниженні концентрації до 0,07 мМ життєздатність клітин, відповідно, підвищується до 64,1%. На основі цих даних було розраховано, що CC_{50} для ZnMs становить 0,2 мМ, тоді як для іонів цинку в складі цієї сполуки – відповідно – 0,08 мМ. Розраховане значення CC_{10} для ZnMs становить 0,4 мМ, а для Zn у складі ZnMs – 0,1 мМ відповідно. Дані

тестування токсичності метансульфонату цинку свідчать про його високу токсичність для культури клітин фібробластів L929.

Таблиця 3.4

Показники життєздатності клітин L929 через 24 год контакту зі зразком метансульфонату цинку (ZnMs) за КФ та МТТ тестів

КФ тест											
Зразок	Концентрація ZnMs, мМ										
	13,8	6,9	3,5	1,7	0,9	0,4	0,2	0,1	0,05	0,03	0,01
	Концентрація Zn, мМ										
	4,3	2,2	1,1	0,5	0,3	0,14	0,07	0,03	0,02	0,01	0,004
ZnMs	48,5	39,2	33,8	33,5	24,4	14,3	64,1	88,2	87,6	86,4	95,5
1 квартиль	46,3	38,5	32,2	32,1	23,7	13,7	60,0	86,4	84,1	81,3	85,2
3 квартиль	50,6	39,2	35,5	34,3	25,1	15,3	69,3	88,7	93,1	90,4	104,3
МТТ тест											
	Концентрація ZnMs, мМ										
	51,2	25,6	12,8	6,4	3,2	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05
	Концентрація Zn, мМ										
	4,3	2,2	1,1	0,5	0,3	0,14	0,07	0,03	0,02	0,01	0,004
ZnMs	18,4	21,5	22,3	21,1	19,2	15,8	72,9	93,8	90,5	84,5	84,0
1 квартиль	18,2	21,0	21,8	20,8	18,9	15,5	65,6	92,5	90,1	82,7	82,8
3 квартиль	18,9	22,3	23,5	22,2	20,1	16,5	76,0	94,7	91,0	87,0	85,6
Контроль клітин	100										
1 квартиль	95										
3 квартиль	105										

Як і для MgMs, показники цитотоксичності ZnMs, визначені із застосуванням КФ-тесту та МТТ-тесту, практично не відрізняються, що свідчить про можливий однотипний механізм дії метансульфонатів, пов'язаний із пригніченням метаболічної активності клітин, мітохондрій зокрема.

На рисунку 3.1 наведено значення цитотоксичності метансульфонатів магнію та цинку за результатами МТТ тесту.

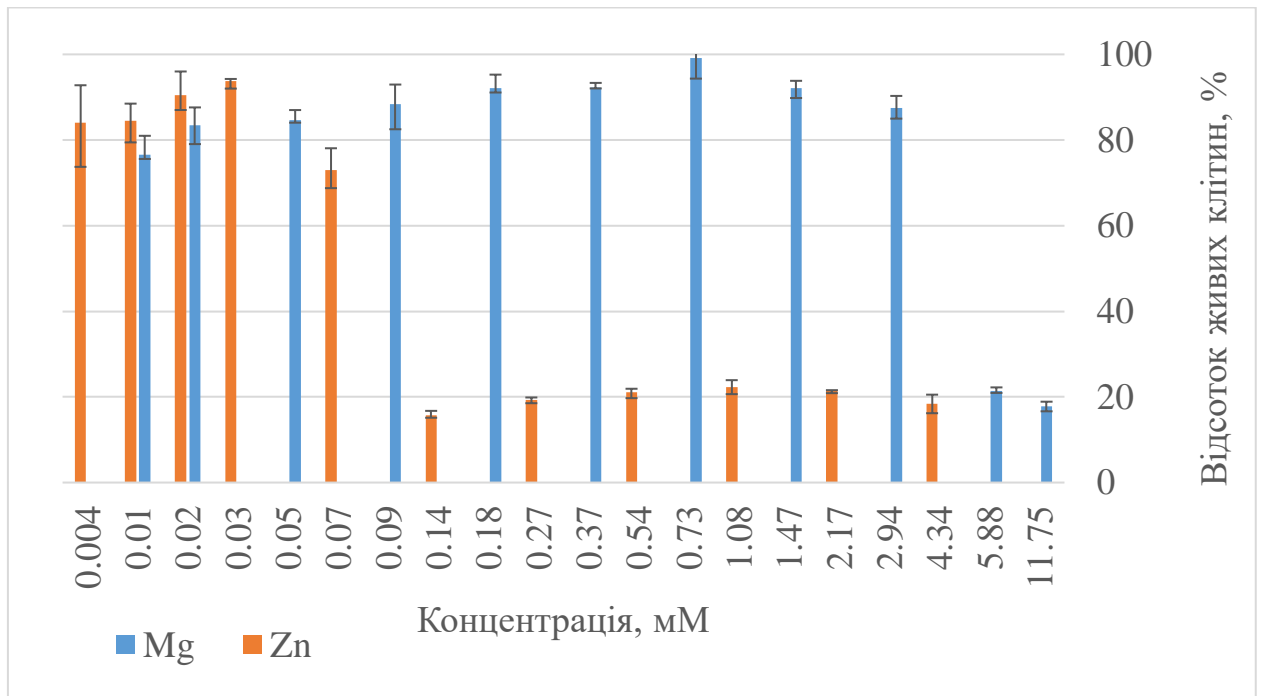


Рис. 3.1. Узагальнені результати визначення цитотоксичності MgMs та ZnMs за умови 24 год контакту з клітинами L929 – визначення кількості адгезованих клітин (МТТ-тест).

Примітка: контроль клітин становить 100% живих метаболічно активних.

З рисунку 3.1 видно, що метансульфонат магнію є помірно токсичним, тоді як метансульфонат цинку є суттєво більш токсичним для культури клітин фібробластів L929. Візуальні результати з рисунку 3.1 підтверджують попередньо зроблені висновки стосовно цитотоксичності даних зразків сполук.

Встановлено, що для метансульфонової кислоти CC_{10} становить 0,3 мМ, для метансульфонату церію (CeMs) – 5,0 мМ, для іонів церію у складі CeMs – 50 мМ. Метансульфонат магнію (MgMs) має $CC_{10} = 10,2$ мМ, тоді як для іонів магнію у складі MgMs це значення становить 6,3 мМ. Найнижчі значення CC_{10} визначено для метансульфонату цинку (ZnMs) – 0,02 мМ та іонів цинку у

складі ZnMs – 0,007 мМ, що свідчить про їх суттєво вищу цитотоксичність у порівнянні з іншими дослідженими сполуками.

На рис. 3.2 продемонстровано отримані результати цитотоксичності всіх зразків сполук (Ms, CeMs, MgMs та ZnMs) за КФ-тестом для загального порівняння і визначення найменш токсичного зразка сполуки.

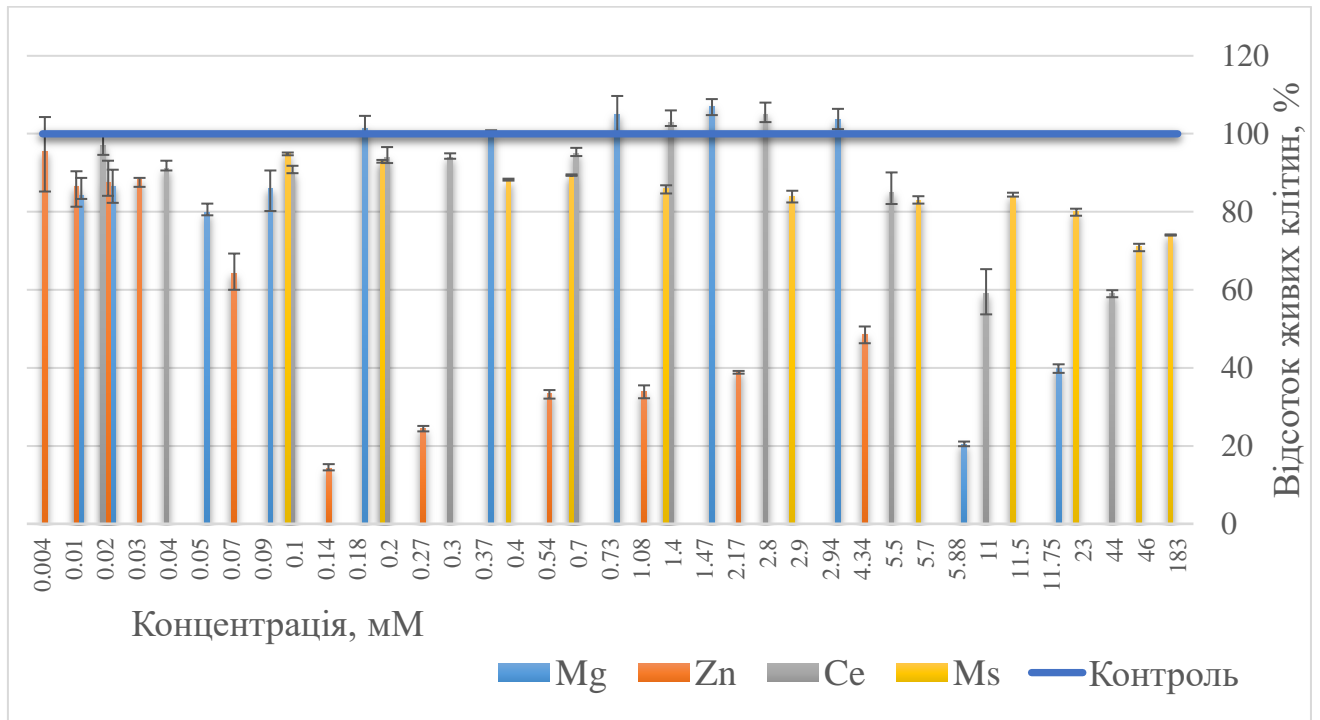


Рис. 3.2. Загальні результати цитотоксичності досліджених зразків сполук (Ms, CeMs, MgMs та ZnMs) за 24 год контакту з клітинами L929 за методом визначення кількості адгезованих клітин (КФ-тест)

З отриманих даних, підсумованих на рисунку 3.2, можна стверджувати, що метансульфонат церію є найменш токсичним для культури клітин L929 за умови 24 годин контакту порівняно з метансульфоною кислотою, метансульфонатами магнію та цинку.

З метою отримання ряду цифрових значень, що конкретно відображають цитотоксичність сполук-метансульфонатів та власне метансульфонової кислоти проведено узагальнення наведених вище результатів. У таблиці 3.5 представлено результати визначення цитотоксичності зразків Ms, CeMs,

MgMs та ZnMs за умови їх 24 год контакту з клітинами L929 за методом визначення кількості адгезованих клітин (КФ-тест).

Таблиця. 3.5

**Узагальнені результати цитотоксичності Ms, CeMs, MgMs та ZnMs
за 24 год контакту з клітинами L929
за методом визначення кількості адгезованих клітин (КФ-тест)**

Зразок	CC ₁₀ , мМ	CC ₅₀ , мМ
Ms	0,3	250
CeMs	25	200
Ce*	5,0	50
MgMs	4,1	7,3
Mg*	2,5	4,5
ZnMs	0,02	0,2
Zn*	0,007	0,07

Примітка: * – для зразків метансульфонатів вказано концентрацію іонів Ce, Mg, Zn у складі сполук.

Таким чином, за показником CC₁₀ досліджені зразки метансульфонатів та метансульфонової кислоти можна розмістити в порядку зменшення їх цитотоксичності: Ms > ZnMs > MgMs > CeMs. За показником CC₅₀ ряд має вигляд: ZnMs > MgMs > CeMs > Ms. Отримані результати свідчать, що присутність іонів у складі метансульфонової кислоти суттєво звужує її цитотоксичний діапазон. І серед досліджених речовин саме CeMs справляє найвищий ефект. Слід зазначити, що саме іони цинку у складі метансульфонату реалізували максимально токсичний ефект, зменшуючи (відносно відповідних значень для метансульфонової кислоти) CC₁₀ більш, ніж в 10 разів, а CC₅₀ – в 1250 разів.

3.2. Оцінка антивірусної активності зразків *in vitro* проти ВВС

Отримані результати антивірусної активності зразка метансульфонової кислоти за лікувальної схеми на культурі клітин фібробластів L929 графічно представлено на рис. 3.3.

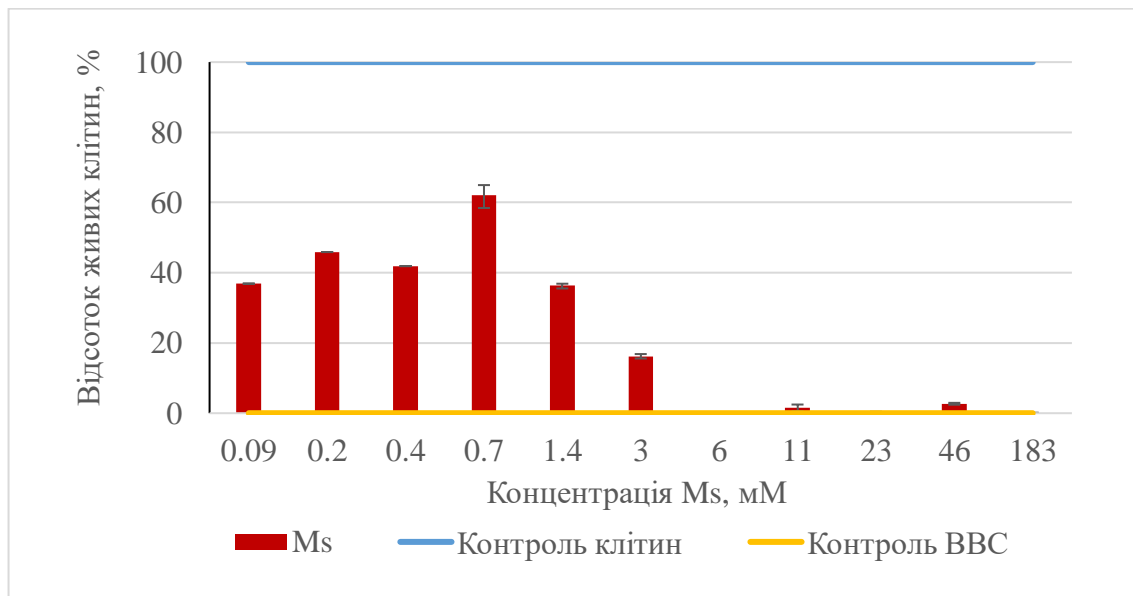


Рис. 3.3. Життєздатність клітин L929, оброблених Ms через 40 хв після інфікування ВВС (терапевтична схема).

З рисунку 3.3 видно, що зразок метансульфонової кислоти проявляє виражену антивірусну ефективність за терапевтичної схеми внесення на моделі L929/ВВС за концентрацій від 3 мМ та вище. Нижчі концентрації: 0,1-1,4 мМ не справляють будь-якого захисного впливу на інфіковані вірусом везикулярного стоматиту клітини L929. Більш, ніж 50% збереженість моношару клітин показана за умови застосування метансульфонової кислоти в концентрації 10 мМ.

Отримані результати антивірусної активності зразка метансульфонату церію за лікувальної схеми на культурі клітин фібробластів L929 за КФ-тестом графічно представлено на рис. 3.4.

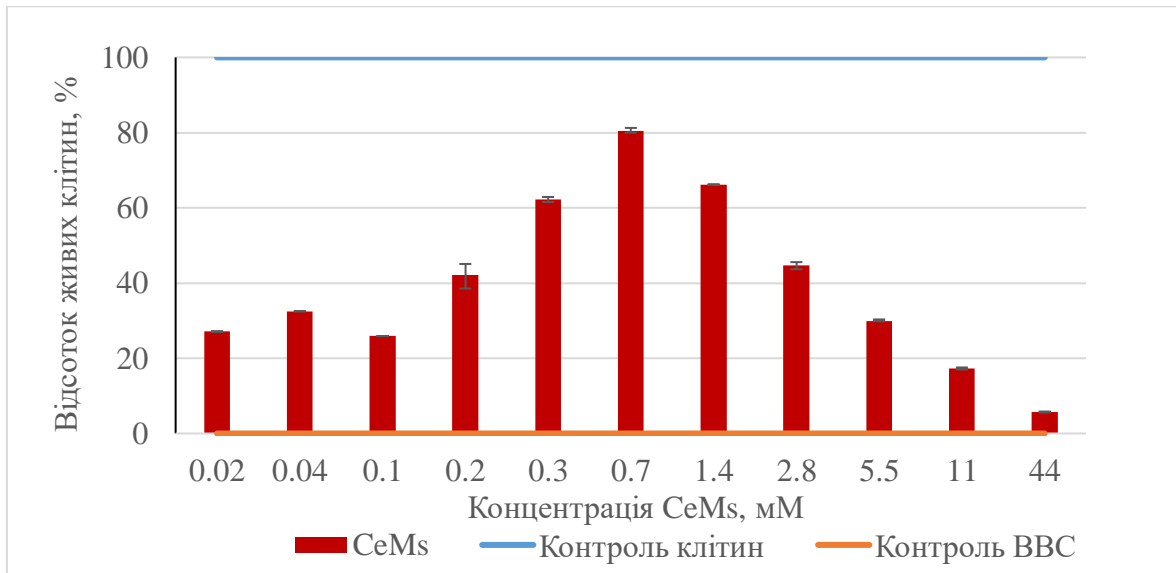


Рис. 3.4. Життєздатність клітин L929, оброблених CeMs через 40 хв після інфікування ВВС (терапевтична схема).

З рисунку 3.4 видно, що зразок церію метансульфонату проявляє виражену антивірусну ефективність за терапевтичної схеми внесення на моделі L929/ВВС за усіх досліджених концентрацій. Більш, ніж 50% збереженість моношару клітин показана за умови застосування метансульфонату церію в діапазоні концентрацій 0,25-2,5 мМ, а у концентрації 0,7 мМ показано 80% захист клітин від ЦПД ВВС. Отримані результати свідчать про суттєву антивірусну активність церію метансульфонату в модельній системі L929/ВВС за терапевтичної схеми застосування.

Результати антивірусної активності препаратів магнію метансульфонату та цинку метансульфонату за лікувальної схеми графічно представлено на рис. 3.5 і рис. 3.6 відповідно.

Як видно із рис.3.5 MgMs забезпечував захист клітин від цитопатичної дії ВВС менше, ніж на 10% у максимальній дослідженій концентрації 1,2 мМ. Зменшення концентрації сполуки супроводжувалось різкою втратою захисного ефекту: нижче 10% живих адгезованих клітин.

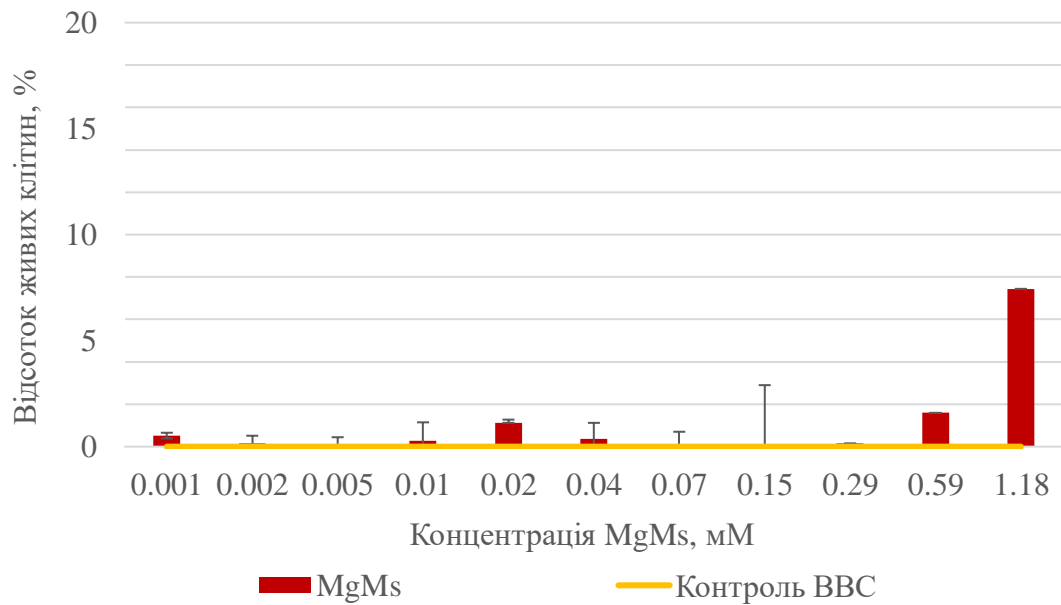


Рис. 3.5. Життєздатність клітин L929, оброблених MgMs через 40 хв після інфікування ВВС (терапевтична схема).

Примітка: контроль клітин становить 100% живих адгезованих.

Для ZnMs, як і для MgMs показано (рис.3.6), що максимальний захист моношару клітин від цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту не перевищує навіть 10% адгезованих клітин, що забезпечує концентрація 0,05 мМ.

Наступне двократне зменшення концентрації ZnMs супроводжується лінійним зниженням антивірусного захисту моношару клітин. Тобто ZnMs не справляє значущого захисного впливу на інфіковані ВВС клітини L929.

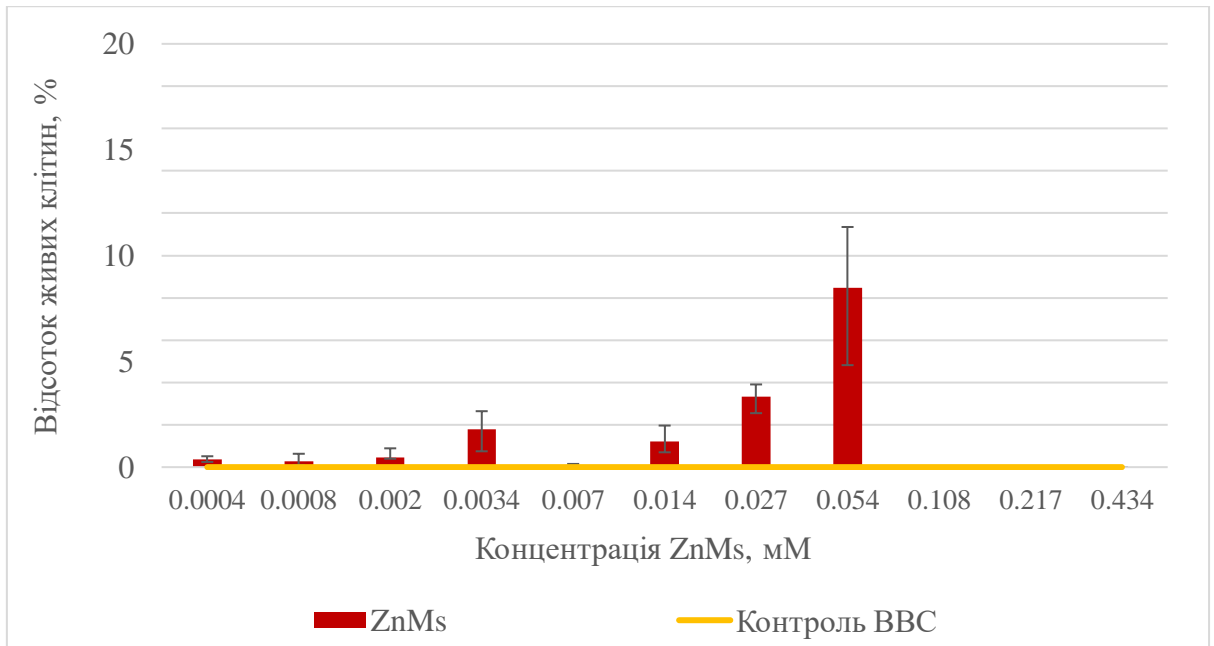


Рис. 3.6. Життєздатність клітин L929, оброблених ZnMs через 40 хв після інфікування ВВС (терапевтична схема).

Примітка: контроль клітин становить 100% живих адгезованих.

Узагальнені дані дослідження антивірусних властивостей зразків сполук на культурі клітин L929 проти ВВС представлено на рисунку 3.7.

Як видно із представлених сумарних даних, найвищу антивірусну активність у найширшому діапазоні концентрацій реалізує церій метансульфонат, наступним за активністю є зразок власне метансульфонової кислоти, який справляє антивірусну дію тільки у вищому діапазоні концентрацій, зразки цинку метансульфонату та магнію метансульфонату справляють мінімальний ефект, що й відображено на гістограмі.

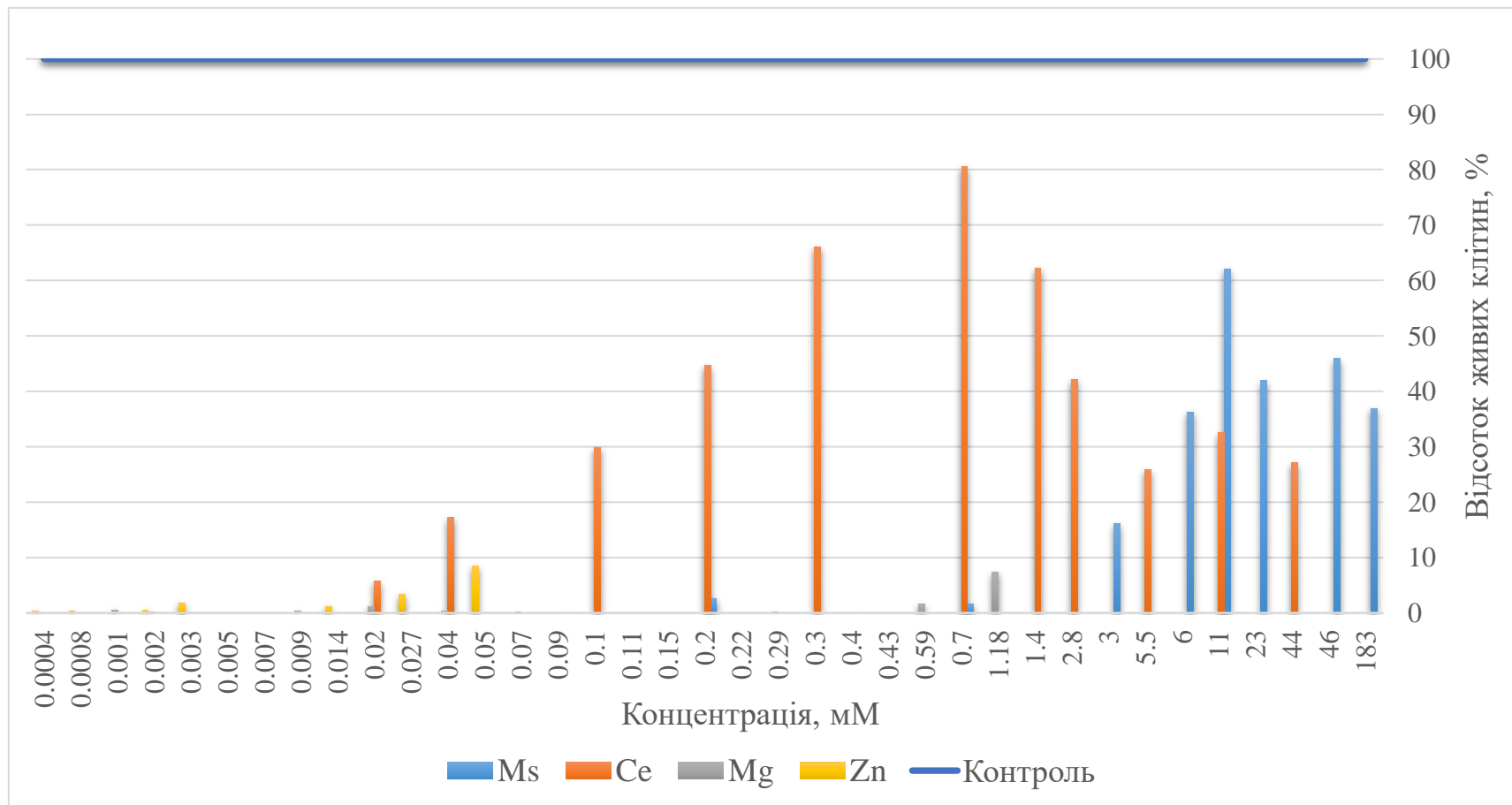


Рис. 3.7. Узагальнена гістограма життєздатності клітин L929, оброблених Ms, CeMs, MgMs та ZnMs через 40 хв після інфікування ВВС (терапевтична схема)

Отримані узагальнені результати дослідження цитотоксичної та антивірусної дії представлених в роботі сполук: метансульфонової кислоти (Ms), метансульфонату церію (CeMs), метансульфонату магнію (MgMs) та метансульфонату цинку (ZnMs) на модельній системі *in vitro* – культура клітин L929 та вірус везикулярного стоматиту – ВВС зведено у таблиці 3.6.

Таблиця 3.6

Показники цитотоксичності та антивірусної активності зразків метансульфонової кислоти, CeMs, MgMs та ZnMs за умов *in vitro* проти РНК-вмісного вірусу (ВВС) за лікувальної схеми

Зразок	Концентрація, мМ		SI ₅₀
	CC ₅₀	EC ₅₀	
Ms	250	10,0	25
CeMs	200	0,1	2000
MgMs	7,3	н.в.	–
ZnMs	0,2	н.в.	–

Примітка: н.в. – не визначено через низьку активність; для зразків метансульфонатів вказано концентрацію іонів Ce, Mg, Zn у складі сполук.

Оскільки мінімальне значення SI, що допускає розгляд сполуки як перспективної антивірусної, становить 8, можна зробити висновок, що за показниками SI за лікувальної схеми *in vitro* метансульфонова кислота та церій метансульфонат проявляють антивірусну активність. Для інших досліджених сполук метансульфонової кислоти індекс селективності не визначений через їх низьку активність, що не дозволяє розглядати їх як такі, що проявляють антивірусну активність в модельній системі L929/ВВС за лікувальної схеми.

Отже, вивчення антивірусної активності зразків розчинів метансульфонової кислоти, метансульфонату церію, метансульфонату цинку та метансульфонату магнію за умов *in vitro* за лікувальної схеми проти РНК-вмісного вірусу (ВВС) дозволило зробити висновок про наявність значної антивірусної активності у Ms та CeMs.

Слід зазначити, що введення церію до складу сполуки суттєво підвищує антивірусну активність метансульфонової кислоти. Якщо для метансульфонової кислоти в модельній системі L929/VBC SI₅₀ склав 25, то для CeMs від був в 80-кратно вищим: 2000.

Отже, в роботі вперше досліджено антивірусну дію зразків розчину метансульфонової кислоти (Ms) та її солей: церію (CeMs), магнію (MgMs) та цинку (ZnMs) на клітинах L929, інфікованих вірусом везикулярного стоматиту *in vitro*. Результати показали, що метансульфонат церію значно перевищує власне метансульфову кислоту за ефективністю інгібування вірусного інфекційного процесу *in vitro*, що підтверджується суттєво вищими значеннями індексів селективності (SI). Тоді як метансульфонати магнію та цинку не відповідають вимогам до відбору антивірусних сполук.

Ймовірний механізм виявленого ефекту антивірусної дії метансульфонату церію може бути пов'язаний із можливим гальмуванням на ранніх стадій процесу реплікації вірусу, зумовленим присутністю іонів церію, здатних до ефективної взаємодії з фосфатними залишками у складі нуклеїнових кислот. Вказані процеси, ймовірно, і забезпечують захист клітини-господаря від цитодеструктивних процесів, що супроводжують реплікацію ВВС. Отримані результати вказують на значний потенціал метансульфонату церію, як перспективного об'єкта при вирішенні задач розробки лікувальних антивірусних засобів та їх ефективного використання за розвитку вірусних інфекційних процесів.

Узагальнюючи, за допомогою тестів на цитотоксичність із застосуванням методів забарвлення кристалічним фіолетовим та метилтетразолієм блакитним була досліджена цитотоксичність метансульфонової кислоти та метансульфонату церію, метансульфонату магнію та метансульфонату цинку. В умовах *in vitro* в модельній системі L929/VBC за лікувальної схеми застосування показана суттєва антивірусна активність водного розчину метансульфонату церію у порівнянні з метансульфоновою кислотою, метансульфонатом магнію та метансульфонатом цинку.

3.3. Перспективи використання метансульфонату церію в якості антивірусного агента

Дослідження показали, що CeMs виявляє значну антивірусну активність *in vitro* проти РНК-вмісного вірусу (*Rhabdoviridae*), такого як вірус везикулярного стоматиту (ВВС). При концентрації 0,7 мМ CeMs забезпечує 80% захист клітин від цитопатичного ефекту ВВС, а в діапазоні концентрацій 0,25–2,5 мМ — 50% захист.

Індекс селективності (SI) для CeMs становить 2000 при 50% захисті, що значно перевищує мінімальне значення $SI=8$, необхідне для розгляду сполуки як перспективного антивірусного агента. Натомість для метансульфонової кислоти (Ms) значення SI_{50} становило лише 25. Для метансульфонатів магнію (MgMs) та цинку (ZnMs) EC_{50} не визначені, а концентрації 1,2 мМ і 0,005 мМ відповідно, це – єдині концентрації в ряду досліджених розведень цих сполук, які забезпечували рівень інгібування цитопатичного ефекту вірусу, що не перевищував 10%. Відповідно, SI для цих сполук не визначений, що не дозволяє розглядати їх як перспективні антивірусні агенти у даних умовах.

Механізм антивірусної дії CeMs, імовірно, пов'язаний із впливом на ранні етапи реплікації вірусу, що забезпечує ефективний захист клітин-господарів від цитопатичних ефектів. Це підкреслює доцільність подальших досліджень CeMs як перспективного кандидата для створення нових антивірусних засобів. Відомо, що наночастинки діоксиду церію (CeO_2) виявляють антивірусну активність проти вірусу грипу та SARS-CoV-2 при концентраціях від 100 мкМ, що підтверджує потенціал сполук церію як антивірусних агентів [44]. Отримані результати свідчать про високий потенціал CeMs для використання в біомедичних застосуваннях, що обґрунтовує необхідність подальших досліджень його механізмів дії та ефективності в клінічних умовах.

ВИСНОВКИ

1. В умовах *in vitro* охарактеризовано метансульфонат церію та інші потенційні антивірусні агенти – метансульфонову кислоту, метансульфонат магнію та метансульфонат цинку. Дослідження показали, що всі зразки за терапевтичної схеми застосування в різній мірі можуть пригнічувати розвиток характерної цитопатичної дії РНК-вмісного вірусу (ВВС).
2. Визначено, що цитотоксичність сполук зумовлена їх пригнічуючим впливом на метаболічну активність клітин. Найнижчу цитотоксичність серед сполук метансульфонової кислоти (з урахуванням діапазону цитотоксичних концентрацій) проявляє метансульфонат церію: CC_{50} для $SeMs$ – 200 мМ, для $MgMs$ – 7,3 мМ, а для $ZnMs$ – 0,2 мМ.
3. Метансульфонат церію проявляє високу антивірусну ефективність, забезпечуючи більш ніж 50% захист клітин від цитопатичного ефекту вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) в діапазоні концентрацій 0,25-2,5 мМ.
4. У порівнянні з метансульфоновою кислотою, метансульфонат церію виявляє значно вищу антивірусну активність, що підтверджується значенням індексу селективності (SI), який для $SeMs$ становить 2000, тоді як для Ms – лише 25. При цьому метансульфонати магнію та цинку практично не спричиняли пригнічення розвитку цитопатичної дії ВВС: рівень інгібування цитопатичної дії вірусу не перевищував 10%.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Singh, K., Nayak, V., Sarkar, T., et al. (2020). Cerium oxide nanoparticles: properties, biosynthesis and biomedical application. *RSC Adv.*, 10, pp. 27194-27214.
2. Hirst, S., Karakoti, A., Tyler, R., et al. (2009). Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small*, 24, pp. 2848-2856.
3. Sayle, T., Molinari, M., Das, S., et al. (2013). Environment-mediated structure, surface redox activity and reactivity of ceria nanoparticles. *Nanoscale*, 13, pp. 6063-6073.
4. Reed, K., Cormack, A., Kulkarni, A., et al. (2014). Exploring the properties and applications of nanoceria: is there still plenty of room at the bottom? *Environmental Science: Nano*, 1, pp. 390-405.
5. Верещак, В., Скиба, М., Баскевич, О., та ін. (2021). Одержання, властивості та застосування метансульфонату церію (III). *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii*, (5), сс. 30-36.
6. Cho, L., Madurro, J., Romero, J. (1999). Electrooxidation of β -Dicarbonyl Compounds Using Ceric Methanesulfonate as Mediator: Some Kinetics and Spectroscopic Studies. *Journal of Catalysis*, 186, pp. 31-35.
7. Korsvik, S., Patil, S., Seal, S., et al. (2007). Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem Commun (Camb)*, 13, pp. 1056-1058.
8. Celardo, I., Pedersen, J., Travensa, E., et al. (2011). Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale*, 3, pp. 1411-1420.
9. Dutta, P., Pal, S., Seehra, S., et al. (2006). Concentration of Ce³⁺ and Oxygen Vacancies in Cerium Oxide Nanoparticles. *Chem. Mater.*, 12, pp. 5144-5146.
10. Methanesulfonic Acid [Електронний ресурс]. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6395> [Accessed 02 May 2024].

11. Luong, B., Petre, A., Hoelderich, W., et al. (2004). Use of methanesulfonic acid as catalyst for the production of linear alkylbenzenes. *Journal of Catalysis*, 226, pp. 301-307.
12. Brown, C., Torres, A. (2008). USAHA Foreign Animal Diseases Revised 2008. Seventh edition. Committee of Foreign and Emerging Diseases of the US Animal Health Association, p. 472.
13. Letchworth, G., Rodriguez, L., Del carrera, J. (1999). Vesicular stomatitis. *Vet. J.*, 157, pp. 239-260.
14. Whela, S. (2008). Vesicular Stomatitis Virus. *Encyclopedia of Virology*, pp. 291–299.
15. Khan, M., Gasser, S. (2016). Generating Primary Fibroblast Cultures from Mouse Ear and Tail Tissues. *J Vis Exp.*, 107, pp. 535-565.
16. Jiang, L., Qi, Y., Kong, X., et al. (2021). Activin A as a Novel Chemokine Induces Migration of L929 Fibroblasts by ERK Signaling in Microfluidic Devices. *Front. Cell Dev. Biol.*, 9, p. 11.
17. You, J.-S., Lim, H., Seo, J.-Y., et al. (2022). 25-Hydroxycholesterol-Induced Oxidative Phagocytosis in L929 Mouse Fibroblast Cell Line. *Molecules*, 27, p. 199.
18. Heap, R., Marin-Rubio, J., Peltier, J., et al. (2021). Proteomics characterisation of the L929 cell supernatant and its role in BMDM differentiation. *Life Science Alliance*, 4, p. 10.
19. Saotome, K., Morita, H., Umeda, M. (1989). Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicology in Vitro*, 3, pp. 317–321.
20. Chiba, K., Kawakami, K., Tohyama, K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro*, 12, pp. 251-258.
21. Sliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., et al. (2016). The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PLoS ONE*, 11, pp. 155-172.

22. Li, Y., He, X., Yin, J.-J., et al. (2015). Acquired superoxide-scavenging ability of ceria nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl*, 54, pp. 1832-1835.
23. Corsi, F., Tarquini, G., Urbani, M., et al. (2023). The Impressive Anti-Inflammatory Activity of Cerium Oxide Nanoparticles: More than Redox? *Nanomaterials (Basel)*, 13, pp. 28-31.
24. Kim, J., Hong, G., Mazaleuskaya, L., et al. (2021). Ultrasmall Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles for Regulation of Acute Inflammation. *ACS Appl Mater Interfaces*, 13, pp. 60852-60864.
25. Kelly, D., Murrell, J. (1999). Microbial metabolism of methanesulfonic acid. *Arch Microbiol.*, 172, pp. 341-348.
26. McCluskey, B., Beaty, B., Salman, M. (2004). Climatic factors and the occurrence of vesicular stomatitis in New Mexico, United States of America. *Revue Scientifique et Technique de.*, 22, pp. 849-856.
27. Cureton, D., Massol, R., Whelan, S., et al. (2010). The Length of Vesicular Stomatitis Virus Particles Dictates a Need for Actin Assembly during Clathrin-Dependent Endocytosis. *PLoS Pathog.*, 6, pp. 100-127.
28. Stillman, E., Whitt, M. (1998). The Length and Sequence Composition of Vesicular Stomatitis Virus Intergenic Regions Affect mRNA Levels and the Site of Transcript Initiation. *J Virol.*, 72, pp. 5565-5572.
29. Sun, X., Roth, S., Bialecki, M., et al. (2010). Internalization and fusion mechanism of vesicular stomatitis virus and related rhabdoviruses. *Future Virol.*, 5, pp. 85-96.
30. Balachandran, S., Barber, G. (2000). Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life*, 50, pp. 135-138.
31. Methanesulfonic Acid [Электронный ресурс]. Available at: <https://www.arkema.com/usa/en/product/thiochemicals/sulfonyls/msa-70/> [Accessed 14 May 2024].
32. Lobree, L., Bell, A. (2001). K2S2O8 – Initiated Sulfonation of Methane to Methanesulfonic Acid. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40, pp. 736-742.

33. Davuluri K., Shukla S., Kakade M., et al. (2024). Explorations on the antiviral potential of zinc and magnesium salts against chikungunya virus: implications for therapeutics. *Front Cell Infect Microbiol*, 14, pp. 135-189
34. Jamison J., Gilloteaux J., Nassiri M. R., Tsai C. C., & Summers, J. (1999). Antiviral Activity of Magnesium and Magnesium/poly r(A-U) Combinations Against two RNA Viruses. *Nucleosides and Nucleotides*, 18, pp. 1221–1222.
35. Krabill K., Jamison J., Gilloteaux J., Summers J. (1992). Enhanced antiviral activity and altered subcellular distribution of magnesium/poly r(A-U) combinations. *Cell Biology International Reports*, 16, pp. 975-984.
36. Vesicular stomatitis Indiana virus [Електронний ресурс]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=11277> [Accessed 25 February 2025].
37. Vesicular stomatitis New Jersey virus [Електронний ресурс]. Available at: <https://www.genome.jp/virushostdb/11280> [Accessed 25 February 2025].
38. DMEM – F12 w/ L-Glutamine w/ 15 mM Hepes – L0093 [Електронний ресурс]. Available at: <https://biowest.net/10093-dmem-f12-w-l-glutamine-w-15-mm-hepes/> [Accessed 3 March 2025].
39. Бланидас 300 засіб для дезінфекції і миття (в таблетках – 300 шт) [Електронний ресурс]. Available at: <https://profiplus.in.ua/ua/p77094040-blanidas-300-sredstvo.html> [Accessed 3 March 2025].
40. L929 cell line [Електронний ресурс]. Available at: https://commons.m.wikimedia.org/wiki/File:L929_cell_line.jpg [Accessed 5 March 2025].
41. Дмитруха Н., Короленко Т., Лагутіна О., та ін. (2022) Оцінка потенційної токсичності мийно-дезінфекційних засобів на культурі клітин *in vitro*. *Environment and Health*. 4. с. 4-9.
42. Теорія статистики - Мармоза А. Т. - 4.4. Мода, медіана, квартилі і децилі [Електронний ресурс]. Available at: https://ukrtextbook.com/teoriya-statistiki-marmoza-a-t/teoriya-statistiki-marmoza-a-t-4-4-moda-mediana-kvartili-i-decili.html?utm_source=chatgpt.com [Accessed 5 March 2025].

43. Розуміння інтерквартильного діапазону в статистиці [Електронний ресурс]. Available at:

<https://www.greelane.com/uk/%D0%BD%D0%B0%D1%83%D0%BA%D0%B0-%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F-%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B5%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B0/%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B5%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%BD%D0%B8%D0%B9/what-is-the-interquartile-range-3126245/> [Accessed 5 March 2025].

44. Nefedova A., Rausalu K., Zusinaite E., Vanetsev A., Rosenberg M., Koppel K, Lilla S., Visnapuu M., Smits K., Kisand V., Tätte T., Ivask A. (2022) Antiviral efficacy of cerium oxide nanoparticles. *Sci Rep.* 12. Pp. 187-246.