

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри Будзанівська Ірина Геннадіївна

Протокол №__ засідання кафедри

від «__» _____ 2023 р.

**ВИВЧЕННЯ ПРОТИВІРУСНОЇ ДІЇ НАНОКОМПОЗИТИВ
РІДКОЗЕМЕЛЬНИХ МЕТАЛІВ НА МОДЕЛІ ВІРУСУ ЕПШТЕЙНА-
БАРР**

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 «Біологія»
Омельченко Яніни Ігорівни

Науковий керівник від кафедри
к.б.н., доц. кафедри вірусології
Коротєєва Г.В.

Робота виконана на базі Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д.К.Заболотного НАН України під керівництвом к. б. н., старшого
дослідника Загородньої С. Д.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕБ	Вірус Епштейна-Барр	<i>Human gammaherpesvirus 4 / Epstein–Barr virus (EBV)</i>
ДК	Дендритні клітини	<i>Dendritic cells (DC)</i>
ДНК	Дезоксирибонуклеїнова кислота	<i>Deoxyribonucleic acid (DNA)</i>
ІФА	Імуноферментний аналіз	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i>
ПЛР	Полімеразна ланцюгова реакція	<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>
РНК	Рибонуклеїнова кислота	<i>Ribonucleic acid (RNA)</i>
РЗЕ	Рідкісноземельні елементи	<i>Rare earth elements (REEs)</i>
АТФ	Аденозинтрифосфат	<i>Adenosine triphosphate (ATP)</i>
АФК	Активні форми кисню	<i>Reactive oxygen species (ROS)</i>
СОД	Супероксиддисмутаза	<i>Superoxide dismutase (SOD)</i>
МТТ	3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)</i>
ЕТС	Ембріональна теляча сироватка	<i>Embryonic calf serum (ECS)</i>
ФСБ	Фосфатно-сольовий буфер	<i>Phosphate-salt buffer (PBS)</i>
ПМ	Плазматична мембрана	<i>Plasma membrane (PM)</i>
iNOS	Індуцибельна синтаза оксиду азоту	<i>Inducible nitric oxide synthase (iNOS)</i>

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Загальна інформація про інфекційні захворювання, асоційований з ними вірус Епштейна-Барр та методи лікування.....	7
1.1. Дані про вірусні захворювання людини.....	7
1.2. Інформація про вірус Епштейна-Барр.....	10
1.2.1. Характеристика вірусу Епштейна-Барр.....	10
1.2.2. Історія вивчення вірусу Епштейна-Барр.....	12
1.2.3. Епідеміологія ВЕБ-інфекції.....	12
1.2.4. Патогенез ВЕБ-інфекції.....	13
1.2.5. Захворювання, асоційовані з вірусом Епштейна-Барр.....	16
1.2.6. Терапія ВЕБ-асоційованих інфекцій.....	17
1.3. Наночасточки металів та їх властивості.....	17
1.3.1. Наночасточки лантану та церію з сріблом.....	18
1.3.2. Значення наночасточок лантану та церію з сріблом в біології.....	20
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження.....	23
2.1.1. Віруси.....	23
2.1.2. Досліджувані речовини.....	23
2.1.3. Культури клітин.....	23
2.2. Культивування ліній клітин.....	24
2.3. Підрахунок клітин у суспензії.....	24
2.4. Кріоконсервування та розмороження клітин.....	25
2.5. Визначення життєздатності культур клітин МТТ-методом визначення мітохондріальної активності.....	26
2.6. Визначення лізосомальної активності з використанням барвника нейтрального червоного.....	27
2.7. Дослідження антивірусної активності наночасточок лантану та церію з різним вмістом срібла.....	28
2.8. Полімеразна ланцюгова реакція.....	29

2.9.	Аналіз результатів та їх статистична обробка.....	29
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень.....		30
3.1.	Результати дослідження цитотоксичності наночастинок рідкоземельних металів за МТТ-методом.....	30
3.2.	Результати дослідження цитотоксичності наночастинок рідкоземельних металів з використанням барвника нейтрального червоного.....	33
3.3.	Результати антивірусної активності наночастинок рідкоземельних металів.....	36
РОЗДІЛ 4. Обговорення результатів.....		38
4.1.	Аналіз впливу наночастинок рідкоземельних металів на життєздатність клітин-продуцентів В95-8.....	38
4.2.	Аналіз протівірусної дії наночастинок рідкоземельних металів на життєздатність клітин-продуцентів В95-8.....	46
ВИСНОВКИ.....		50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....		51

ВСТУП

Наразі існує нагальна необхідність у вивченні різноманітних вірусних інфекцій, щоб визначити більш специфічні засоби та методи лікування з метою остаточного подолання вірусних захворювань. Віруси людини та тварини можуть спричинювати широкий спектр найрізноманітніших форм інфекцій, а при певних умовах навіть призводити до онкологічних захворювань. Велика кількість досліджень проводиться, щоб отримати змогу попередити інфікування людей або мінімізувати ризик повторних уражень. Вчені проводять експерименти з визначеними видами вірусів в онкологічних новоутвореннях та вивчають, яким саме чином можна вплинути на дані віруси, котрі асоційовані з дефектними пухлинами. Серед цих вірусів одними із найбільш небезпечних є саме ті, що можуть безсимптомно персистувати в організмі хазяїна. Одним з найвідоміших таких вірусів є вірус Епштейна-Барр (ВЕБ). [1, 2]

Серопозитивні результати аналізів по відношенню до ВЕБ характерні більше ніж 90% дорослих. Вірус викликає розвиток інфекційного мононуклеозу в більшості випадків при первинному інфікуванні організму, а після одужання – здатний довічно хронічно персистувати в ньому. [3] З активацією персистуючої форми вірусу асоційовані: гемофагоцитарний лімфогістіоцитоз, посттрансплантаційні лімфопроліферативні захворювання і синдром хронічної втоми. У зв'язку з фізіологічним імунодефіцитом дітей, більшість з цих захворювань розвиваються у них частіше і супроводжуються високою летальністю (до 50%). [4-43]

Розробка нових підходів до лікування захворювань, асоційованих з вірусом Епштейна-Барр, є одним з найбільш перспективних напрямків. Наночасточки металів та оксидів металів викликають особливий інтерес у вчених у цьому аспекті, адже такі наноструктури виявляють унікальні біологічні, фізико-хімічні та фармакологічні властивості, мають виражений

фунгіцидний, бактерицидний та, що особливо важливо для нас, вірицидний потенціал. [36, 40, 45-48, 54]

Актуальність первинної профілактики та пошук нових засобів лікування вірусних інфекцій на тепер має вагомим значення, виходячи зі стрімкого розповсюдження вірусних інфекцій та представленої статистики ВООЗ. Саме тому метою роботи було визначення цитотоксичності та антивірусної дії сполук лантану та церію з різним вмістом срібла в клітинах-продуцентах вірусу Епштейна-Барр.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ІНФЕКЦІЙНІ ЗАХВОРЮВАННЯ, АСОЦІЙОВАНИЙ З НИМИ ВІРУС ЕПШТЕЙНА-БАПП ТА МЕТОДИ ЛІКУВАННЯ

1.1. Дані про вірусні захворювання людини

Вірусними захворюваннями прийнято вважати інфекційні хвороби і пухлини [2] [3], що зумовлені більшою частиною вірусів. Головною особливістю вірусних інфекцій є облігатний внутрішньоклітинний паразитизм вірусів і тропізм. Ця своєрідність робить дані неклітинні форми життя енергетично, метаболічно і екологічно залежними від клітини-хазяїна [6]. Переважно в ядрі клітини відбувається стадія реплікації ДНК-вірусів людини, а в цитоплазмі – РНК-вірусів. Але існують винятки, такі як: поксвіруси (адже їх реплікація ДНК відбувається в цитоплазмі), а також вірус гепатиту D і ортоміксовіруси (оскільки їх реплікація РНК відбувається в ядрі клітини). Важливо зауважити, що клінічні прояви вірусних захворювань мають широкий спектр варіацій для різних видів вірусів (навіть в межах однієї родини). Найбільш клінічно значущими вірусами та родини, до яких вони відносяться, можна вважати такі:

- Аденовіруси (*Adenoviridae*),
- Вірус краснухи (*Togaviridae*),
- Віруси Коксакі (*Picornaviridae*),
- Вірус гепатиту А (*Picornaviridae*),
- Вірус поліомієліту (*Picornaviridae*),
- Вірус Епштейна-Барр (*Herpesviridae*),
- Вірус простого герпесу людини 1-го типу (*Herpesviridae*),
- Цитомегаловірус (*Herpesviridae*),
- Вірус простого герпесу людини 2-го типу (*Herpesviridae*),
- Герпесвірус людини 3-го типу (*Herpesviridae*),

- Герпесвірус людини 8-го типу (*Herpesviridae*),
- Вірус гепатиту С (*Flaviviridae*),
- Вірус гепатиту В (*Hepadnaviridae*),
- Вірус імунодефіциту людини (*Retroviridae*),
- Вірус грипу (*Orthomyxoviridae*),
- Вірус кору (*Paramyxoviridae*),
- Вірус парагрипу (*Paramyxoviridae*),
- Респіраторно-синцитіальний вірус людини (*Pneumoviridae*),
- Вірус епідемічного паротиту (*Paramyxoviridae*),
- Папіломавірус людини (*Papillomaviridae*),
- Вірус сказу (*Rhabdoviridae*) [1]

Важливо також наголосити на механізмах передачі вірусних інфекцій. Основними механізмами, на сьогодні, є повітряно-крапельний, фекально-оральний, статевий та контактний. Вертикальний та трансплацентарний натеper є менш розповсюдженими.

Щоб довести нагальну актуальність та справжність будь-якого наукового дослідження, необхідно підкріпити його відповідними та конкретними статистичними даними. На основі досліджень World Life Expectancy (аналітичний сайт, котрий зберігає статистику смертності по всьому світу), який використовує звітні дані Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), World Bank Data (всесвітній банк даних), ЮНЕСКО та CDC (центри з контролю та профілактики захворювань США) й NIIH (національні інститути здоров'я США), можна отримати розуміння щодо смертності від інфекційних хвороб, збудниками яких, в тому числі, є віруси. Гострі респіраторні інфекції нижніх дихальних шляхів одними з найбільш смертоносних хвороб людства (після серцево-судинних хвороб, інсультів та захворювань легень). Вони є четвертою за поширеністю первопричиною смертей у світі.

Основними проявами гострих респіраторних інфекцій залишаються сезонний грип та пневмококова пневмонія. Від цих двох хвороб в 2021 році загинуло майже шість мільйонів людей. Також в 2021 році на планеті загинуло близько двох мільйонів людей, уражених вірусом імунодефіциту людини та хворих на СНІД. Такі гострі кишкові захворювання, як ротавірусна інфекція, шигельоз, сальмонельоз, на сьогодні все ще залишаються небезпечними для життя. Кожний рік від них помирає близько півмільйона дітей віком до 5 років. [6]

У 2021 році, за звітними дослідженнями ВООЗ, близько 5,5 мільйона людей загинули внаслідок коронавірусної хвороби 2019. Інші небезпечні інфекційні хвороби, такі як: менінгіт, енцефаліт, тиф, кір, сифіліс, холера та кашлюк спричиняють масову гибель населення по всій планеті. [4]



Рис. 1.1. Інфографіка поширення коронавірусної хвороби на території Європи в 2021 р. [4]

Серед усіх інфекційних захворювань особливу увагу привертають саме герпесвірусні інфекції. Герпесвірусні інфекції характеризуються тривалим,

різноманітним, складним і важким перебігом з ураженням багатьох органів і тканин, що дає можливість визначити їх як загальні системні захворювання організму. Герпесвірус людини 4 типу (ВЕБ) відноситься до підродини *γ-Herpesviridae*. Віруси цієї підродини уражують лімфоїдні клітини, мають тропність до Т- і В-лімфоцитів з довготривалою персистенцією в них і викликають лімфопроліферативні захворювання [4].

1.2. Інформація про вірус Епштейна-Барр

Багато злоякісних новоутворень можуть бути спричинені вірусом Епштейна-Барр. Серопозитивними по відношенню до ВЕБ є більше ніж 90% дорослих. При первинному інфікуванні вірус здатен викликати розвиток інфекційного мононуклеозу, а після одужання – здатний довільно персистувати в організмі. Назофарингеальна карцинома, різноманітні лімфоми та від 10% до 20% онкологічних новоутворень шлунково-кишкового тракту пов'язані з активацією персистуючої форми вірусу. У дітей, більшість з цих захворювань розвиваються у них частіше і супроводжуються високою летальністю (до 50%) у зв'язку з їх фізіологічним імунодефіцитом. [3]

Саме тому пошук ліків, які б пригнічували репродукцію вірусу, а також могли б стимулювати елімінацію пухлинних клітин, є важливим питанням для лікування вірус-асоційованих злоякісних новоутворень. Для того, щоб визначити перспективні методи боротьби з вірусом Епштейна-Барр, потрібно провести літературний огляд його властивостей та особливостей.

Тому необхідно проаналізувати морфологію, епідеміологію, етимологію, патологію та основні риси й характеристики ВЕБ.

1.2.1. Характеристика вірусу Епштейна-Барр

Вірус Епштейна-Барр (Human gammaherpesvirus 4, EBV) – один з дев'яти, відомих на сьогодні, типів герпесвірусів людини в родині *Herpesviridae* (підродина *Lymphocryptovirinae*). [5]

Сферичний діаметр віріону, сягає близько 122–180 нм. Геном представлений у вигляді подвійної спіралі ДНК, яка складається приблизно зі 85 генів і 172 тисяч пар основ. Віріон має зовнішню оболонку (суперкапсид) та нуклеокапсид, між якими розташовано тегумент. Він містить ліпіди та поверхневі виступи глікопротеїнів, які відіграють важливе значення під час ураження чутливої клітини-хазяїна. [6, 7]

ВЕБ може інфікувати як епітеліальні клітини, так і В-клітини. Механізми інфікування цих двох типів клітин є різними:

- вірусний білок взаємодіє з клітинними $\beta 1$ інтегринами при інфікуванні епітеліальних клітин. Потім вірусний білок gH / gL взаємодіє з клітинними інтегринами $\alpha v\beta 6$ / $\alpha v\beta 8$, в результаті відбувається злиття вірусної оболонки з мембраною епітеліальної клітини – це дозволяє ВЕБ проникнути в епітеліальні клітини.

- вірусний глікопротеїн gp350 зв'язується з клітинним рецептором при інфікуванні В-клітин. Потім вірусний глікопротеїн gp42 взаємодіє з клітинними молекулами МНС класу II, внаслідок чого, починається злиття вірусної оболонки з клітинною мембраною – це дозволяє ВЕБ проникати у В-клітини.

Вірусний капсид руйнується, а вірусний геном транспортується до ядра клітини, як тільки ВЕБ потрапляє до клітини. Надалі і у В-клітинах, і в епітеліальних клітинах репродукція ВЕБ може відбутися за літичним типом. Літична реплікація у В-клітинах зазвичай відбувається лише після реактивації із затримкою. Літична реплікація в епітеліальних клітинах часто виникає безпосередньо після проникнення вірусу. Оскільки латентний геном ВЕБ є кільцевим, то в процесі реактивації він повинен розгорнутися в лінійну

форму. ДНК-полімераза вірусу відповідає за копіювання вірусного геному під час літичної інфекції. [8, 9, 10]

1.2.2. Історія вивчення вірусу Епштейна-Барр

Інфекційний мононуклеоз вперше був описаний вченими назвою «ідіопатичне запалення лімфатичних залоз», як форма вірусної інфекції Епштейна-Барр. Дитячий характер інфекції та її відносно високу заразність відзначив педіатр Н.Ф. Філатов у 1884 р.. Також німецький педіатр Е. Пфейффер в своїх роботах занотував спалах цієї інфекції у 1889 р., через це вона свого часу отримала назву гарячки Пфейффера та привернула увагу суспільства на цю проблему. Гарячка Пфейффера у 1920 р. отримала іншу назву – «інфекційний мононуклеоз». Тільки у 1961 р. на Міжнародному з'їзді інфекціоністів назва була остаточно затверджена. [11, 12]

Вірус Епштейна-Барр вперше був виділений з клітин злоякісної лімфоми Беркітта та отримав назву на честь канадських вчених, які займалися його культивуванням у 1964 р. Вже в 1968 р., коли серонегативний працівник лабораторії захворів на інфекційний мононуклеоз та набув антитіла до даного вірусу, встановили причинний взаємозв'язок між вірусом Епштейна-Барр та інфекційним мононуклеозом. У наступні роки стало очевидно, що ВЕБ, крім інфекційного мононуклеозу, спричинює цілу низку інших захворювань. В основному, ці хвороби об'єднує неконтрольоване зростання кількості ВЕБ-інфікованих В-лімфоцитів (через порушене імунологічне розпізнавання ВЕБ-зв'язаних антигенів). [13, 14]

1.2.3. Епідеміологія ВЕБ-інфекції

Вірус Епштейна-Барр поширений по всій земній кулі, адже приблизно 80-95% населення уражено ним. У родинях з низькою соціальною підтримкою, в країнах з низьким і середнім рівнем доходу на душу населення, більшість дітей інфікується вірусом Епштейна-Барр до 3 років, а інші вікові групи населення такої країни – до настання повноліття. У розвинутих країнах з високим рівнем доходу на душу населення інфікування ВЕБ може відбуватися значно пізніше. [11-14]

З організму хворого (носія вірусу) вірус Епштейна-Барр виділяється з орофарингеальним секретом, який і є основним джерелом вірусу. Основним шляхом передачі інфекції є повітряно-краплений через заражену слину, наприклад, під час поцілунку. Саме через це інфекційний мононуклеоз інколи прийнято називати «хворобою поцілунків». Відомі часті випадки ураження дітей хворобою через іграшки, що забруднені інфікованою слиною носія вірусу Епштейна-Барр. На зараз також відомі гемотрансфузійний та статевий шляхи передачі даної інфекції. Вченими були описані випадки передачі ВЕБ від матері до плоду (вертикальний шлях передачі). [15, 16] Існує гіпотеза, що вірус Епштейна-Барр може бути однією з причин розвитку внутрішньоутробних аномалій. Контагіозність ВЕБ-інфекції вважається помірною через низьку концентрацією вірусу в слинній рідині. Спільне користування людей білизною та посудом відіграє важливу роль у поширенні ВЕБ-інфекції. Фактори зниження загального та місцевого імунітету зумовлюють активацію інфекції, зумовленої вірусом Епштейна-Барр. [17, 18, 19, 20]

1.2.4. Патогенез ВЕБ-інфекції

Вірус Епштейна-Барр здатний спричинювати більшість випадків серонегативного інфекційного мононуклеозу і всі випадки серопозитивного. Такі віруси, як: цитомегаловірус, віруси краснухи, гепатиту А, герпесвірус

людини 6-го типу (HHV-6), вірус імунодефіциту людини (HIV) та аденовірус – можуть бути іншими збудниками серонегативного інфекційного мононуклеозу. [21, 22, 23]

При інфекційному мононуклеозі інкубаційний період переважно сягає 4–6 тижнів при зараженні (незалежно зараження відбулося під час гемотрансфузії або через інфікований секрет). Млявість та помірний головний біль можуть спостерігатися протягом 3–5 днів. Основні клінічні симптоми з'являються далі: висипи на шкірі, гарячка, біль у горлі, фарингіт, лімфаденопатія, гепатоспленомегалія та, можливо, гепатит. Здебільшого гарячка спостерігається від 5 до 10 днів, але може триматись 2 тижні (чи навіть більше). Температура тіла хворого, як правило, підвищується до 39–40°C, однак у інфікованих людей молодого віку температура може закріпитися в нормальних значеннях. Однією з характерних ознак інфекційного мононуклеозу є біль у горлі. При огляді ротоглотки хворого через набряк язичка та піднебінних мигдаликів відзначають їхнє помітне зростання. Через таке збільшення існують випадки стикання мигдаликів між собою. Надалі можуть виникати утруднення дихання носом (закладеність носа), осиплість голосу і дихання напіввідкритим ротом та з хрипотою, як наслідок ураження носоглоткового мигдалика. Також може бути збільшена та вкрита густим слизом задня стінка глотки, спостерігаються її набряклість та збільшені фолікули (гранульозний фарингіт). Приблизно на 5–17-й день перебігу хвороби у 25% хворих виникають поодинокі точкові крововиливи на м'якому піднебінні. На мигдаликах в перші дні хвороби і навіть через 3–4 дні можуть з'явитися нашарування різного характеру і величини (через активацію супутньої бактеріальної флори). Найбільш важливим показником інфекційного мононуклеозу є збільшення лімфатичних вузлів – лімфаденопатія (особливо характерне збільшення шийних та задньошийних лімфатичних вузлів). Вона може продовжуватися від декількох днів до декількох тижнів, а деколи навіть місяців. [24, 25] Збільшення селезінки (спленомегалію) виявляють близько у 50% хворих, найчастіше через 2–3

тижні захворювання. Спленомегалія може бути помірною, у деяких хворих – безсимптомною, але значною. Також у великій кількості хворих виявляють збільшення печінки (гепатомегалію). Від 4-го до 10-го дня захворювання печінка досягає фактично максимальних розмірів, що супроводжується помірною болючістю під час пальпації. Іноді у хворих з'являються іктеричність склер та помірна жовтяниця шкіри. [26, 27]

Під час інфекційного мононуклеозу незначне підвищення активності трансаміназ в сироватці крові спостерігається у 70–80% хворих. У 3–19% хворих з'являються шкірні висипи. Цей вияв хвороби формується в розпал захворювання, здебільшого має локалізацію на тулубі та руках, може триматися декілька днів та мати характер: еритематозний, геморагічний, плямисто-папульозний (кіроподібним), уртикарний та дрібноточковий (скарлатиноподібний). На слизовій оболонці ротової порожнини з'являється енантема (висип на слизових оболонках). [28, 29] В половині випадків інфекційного мононуклеозу, при ураженні носоглотки, можливі набряк повік та обличчя внаслідок лімфостазу (збій лімфатичної системи, як результат порушення руху лімфи у судинах, через що вона затримується у тканинах). Відомі поодинокі випадки, коли у деяких інфікованих розвинувся кашель судомоподібного характеру (дані рентгенодіагностики свідчать про атипову пневмонію з можливістю випоту у плевру). При інфекційному мононуклеозу з боку нервової системи описані випадки мієліту, енцефаліту, поліневриту (синдром Гієна-Барре), серозного менінгіту, невриту черепних нервів, мозочкової атаксії, підгострого склерозивного паненцефаліту, лімфоми ЦНС й психозу. Незначне послаблення серцевих тонів, тахікардію, іноді систолічний шум, що по мірі одужання зникають, відзначають у хворих на інфекційний мононуклеоз. Існують випадки перикардиту та міокардиту на тлі інфекційного мононуклеозу. Розвиток панкреатиту, артриту, простатиту, гломерулонефриту та інтерстиціального нефриту також пов'язують з інфекційним мононуклеозом. [30, 31]

В периферичній крові виявляють помірний лейкоцитоз, хоча іноді може бути лейкопенія, а інколи і нормальний вміст лейкоцитів. Підвищення вмісту лімфоцитів та моноцитів також відзначають. Швидкість осідання еритроцитів, як правило, помірно підвищена. На початку хвороби у більшості пацієнтів збільшується кількість паличкоядерних нейтрофільних гранулоцитів і зменшується кількість сегментоядерних нейтрофільних гранулоцитів. [32, 33]

Найбільш типовою ознакою з боку крові інфекційного мононуклеозу є наявність віроцитів (також називають широкоплазмовими лімфоцитами, атиповими мононуклеарами, монолімфоцитами). Розмір таких клітин існує в межах від середнього лімфоцита до великого моноцита, вакуолі зустрічаються в цитоплазмі, відносно широка протоплазма, має значну базофілію на периферії та характерну світлу смугу навколо ядра. Ядро віроцитів має залишки нуклеол та губчасту структуру. Вони з'являються в крові під час активної стадії захворювання і виявляються зазвичай протягом 2–3 тижнів, а іноді через декілька місяців в кількості від 5–10% до 50% чи більше. Відомі випадки інфекційного мононуклеозу, коли виявляються атиповими майже всі мононуклеари. Простежується характерний прямий зв'язок між тяжкістю хвороби та кількістю віроцитів. [34, 35]

1.2.5. Захворювання, асоційовані з вірусом Епштейна-Барр

Вірус Епштейна-Барр є одним з найбільш поширених вірусів у людській популяції. Він найбільш відомий як першопричина інфекційного мононуклеозу (також званої як «залозиста гарячка»). ВЕБ тісно пов'язаний з різноманітними злоякісними лімфопроліферативними захворюваннями: лімфогранулематозом (хвороба Ходжкіна), деякими з неходжкінських лімфом (зокрема лімфома Беркітта – центральноафриканська лімфома), посттрансплантаційною лімфопроліферативною хворобою та

гемофагоцитарним лімфогістіоцитозом. На рік, за статистичними даними, з вірусом Епштейна-Барр асоційовані приблизно 200 тисяч випадків онкологічних новоутворень. [6-46]

1.2.6. Терапія ВЕБ-асоційованих інфекцій

Загальноприйнята терапія включає: охоронний режим, дієту, ентеросорбенти, симптоматичне лікування та місцеве лікування.

Переважно для лікування ВЕБ-інфекції застосовують:

- противірусні засоби з протигерпетичною активністю (аналоги гуанозину);
- імуномодулятори;
- протизапальні ліки, кортикостероїди, анальгетики;
- антигістамінні засоби;
- антисептики для локального застосування та антибіотики (якщо на тлі вірусного зараження відбулося приєднання бактеріальної інфекції).

На цей час, специфічних препаратів для терапії інфекції, спричиненої вірусом Епштейна-Барр, як і стандартної схеми лікування, немає. []

Тому особливу увагу вчених в цьому питанні викликають наночасточки рідкоземельних металів.

1.3. Наночасточки металів та їх властивості

Наночасточка (або надтонка частка) зазвичай характеризується як частинка речовини з діаметром 1-100 нм. Такий термін також іноді застосовують для порівняно більших частинок (до 500 нм) або трубок і волокон, розмір котрих менше за 100 нм у двох напрямках. [36] Атомовими кластерами переважно називають частинки металу у найнижчому діапазоні розміром менше за 1 нм. [37] Наночасточки здебільшого відрізняють від

«грубих частинок» (розміром від 2500 до 10000 нм), «дрібних частинок» (розміром від 100 до 2500 нм) і мікрочастинок (розміром від 1 до 1000 мкм), оскільки їхній менший розмір зумовлює достатньо різноманітні хімічні або фізичні властивості, такі як оптичні або електричні властивості та колоїдні властивості. Через те, що наночасточки мають тенденцію до броунівського руху, вони переважно не осідають, на відміну від колоїдних частинок, яким притаманно явище седиментації. [38]

За допомогою звичайних оптичних мікроскопів не можна побачити наночасточки через те, що довжини хвиль видимого світла (400–700 нм) набагато більша за них. Така властивість зобов'язує використовувати лазерні або електронні мікроскопи. З тієї ж причини у прозорих середовищах можуть бути прозорими дисперсії наночастинок [39], у той час як суспензії більших частинок здебільшого розсіюють все видиме світло або частину, що падає на них. Наночасточки мають здатність легко проходити через загальновідомі фільтри, до прикладу, керамічні бактеріальні фільтри (свічки Шамберлана або Беркефельда) [40], тому їх відділення від рідин зумовлюється спеціальними методами нанофільтрації. В цілому, невеликий розмір наночастинок спричиняє меншу концентрацію точкових дефектів, в порівнянні з їхніми обширними аналогами, але вони зберігають різносторонні дислокації, які за допомогою електронних мікроскопів високої роздільної здатності можливо візуалізувати. Однак наночасточки мають різноманітну механіку локалізації, що разом із їхньою особливою поверхневою структурою зумовлює появу механічних властивостей, які суттєво різняться від об'ємного матеріалу. [41]

1.3.1. Наночасточки лантану та церію з сріблом

Наночасточки лантану широко використовуються у промисловості, сільському господарстві та біомедицині. Вони, які також зустрічаються у

природі у вигляді оксиду рідкісноземельного металу, мають сферичну структуру, а унікальні фізико-хімічні властивості становлять основу для безлічі потенційних застосувань. Наночасточки оксиду лантану (La_2O_3) більш розчинні у кислому клітинному середовищі, наприклад, у присутності фаголізосомальної рідини. Термодинамічні властивості, такі як вільна поверхнева енергія, забезпечують розчинення наночасточок, яке може посилюватися в кислих умовах та у присутності реактивних біомолекул. Ця зміна наноструктури наночасточок оксиду лантану зі сферичною структурою у формі «морського їжака» може призвести до дефосфорилювання мембран ліпідів та голчастим випинанням у мембранах. У порівнянні з іншими оціненими наночасточками рідкісноземельних елементів (РЗЕ), наночасточки оксиду лантану мають більшу здатність порушувати цілісність мембрани. Неясно, як послідовний нано-біоінтерфейс сприятиме розчиненню та токсичності в суспендуючому середовищі або культурі клітин. [36]

Оксид церію (IV) з хімічною формулою CeO_2 відомий як оксид металу лантаноїдів із антиоксидантними властивостями. [37] Натепер у великій кількості звітів хвалять широкий спектр ферменто-міметичної активності та імуномодуючі властивості наночасточок оксиду церію, які захищають тканини від надмірної продукції активних форм кисню (АФК) та запалення. Дослідниками було показано, що наночасточки оксиду церію модулюють окисний стрес при таких захворюваннях, як: дегенерація сітківки, неврологічні розлади, ішемія, кардіопатія, діабет, запалення шлунково-кишкового тракту, захворювання печінки та рак. Також наночасточки оксиду церію активно використовуються у регенеративній медицині та тканинній інженерії. [38]

Наночасточки срібла є новим матеріалом з високим відношенням площі поверхні до об'єму та унікальними фізико-хімічними властивостями завдяки своїм нанорозмірам, які показали широкий спектр перспективних біомедичних застосувань. В області онкологічних досліджень деякі експерименти продемонстрували, що наночасточки срібла виявляють

протиракову активність, особливо більш високу чутливість мають саме злоякісні клітини, на відмінну від нормальних клітин по відношенню до наночастинок срібла. Сферичні наночасточки срібла мають значні ефекти та застосування у багатьох областях досліджень та можуть легше проникати через плазматичну мембрану, ніж інші форми, а наночасточки срібла невеликого розміру також мають тенденцію до більшої швидкості розчинення, ніж наночасточки срібла великого розміру. [39]

1.3.2. Значення наночастинок лантану та церію з сріблом в біології

Біологічна активність наночастинок оксиду лантану в залежності від рН і розміру заслуговує на подальше вивчення. Зрозуміло, що наночасточки, щоб взаємодіяти з різними клітинами та органами, повинні потрапити в організм. Ймовірно, що кращим шляхом для введення наночастинок оксиду лантану є аерозольний. Шляхом транслокації з поверхні провідних дихальних шляхів до бронхіальних епітеліальних клітин наночасточки оксиду лантану можуть вислизати з мукоциліарного кліренсу. Вони можуть швидко всмоктуватися зі шлунково-кишкового тракту та відкладатися у печінці. Наночасточки оксиду лантану після можливого попадання в кровотоки можуть розподілятися і відкладатися в головному мозку, серці, сім'яниках, селезінці, нирках та печінці. Клітинне поглинання та біотрансформація наночастинок оксиду лантану у макрофагах демонструють пермеабілізацію мембран та підвищення внутрішньоклітинного та мітохондріального рівнів Ca^{2+} , некротичні стимули. Отже, наночасточки оксиду лантану значно знижують мітохондріальний потенціал (буферизуючи від навантаження Ca^{2+}), що призводить до набухання мітохондрій та некрозу в макрофагах. Оскільки наночасточки оксиду лантану мають найбільшу здатність секвеструвати внутрішньоклітинні фосфати, вони порушують цей баланс. Зниження лізосомальних фосфатів призводить до дисбалансу

внутрішньоклітинних фосфатів, порушуючи синтез мітохондріального аденозинтрифосфату (АТФ). Підвищена активність в клітинах малонового діальдегіду та 8-OHdG, а також знижена активність СОД вказують на те, що окисне пошкодження ДНК може статися на ранній стадії після впливу наночасточок. [36]

Наночасточки оксиду церію здатні знижувати печінкову експресію медіаторів запалення (таких як інтерлікіну-1 β (IL-1 β), фактору некрозу пухлини- α (TNF- α), індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) та циклооксигенази-2 (ЦОГ-2)), а також судинозвужувального ендотеліну-1. Цікаво, що наночасточки оксиду церію також мають властивість значно зменшувати кількість печінкових макрофагів M1 (прозапальна функція), але не змінювати експресію маркера M2 (макрофаги з імунорегуляторною функцією). Важливо відзначити, що волокноподібні матеріали обманюють макрофаги вродженого імунітету під час фагоцитозу, що в подальшому призводить до хронічного запалення. Однак це стосується виключно мікроструктур (монокристалів чи агрегатів), але ніяк не ізольованих наноструктур, якими є наночасточки оксиду церію. [37]

Наночастинки оксиду церію, також відомі як наноцерія, виявляють протизапальну активність завдяки ауторегенеративним поглиначам вільних радикалів. Наноцерія здатна очищати від вільних радикалів і знижувати вироблення АФК при запаленнях, що запобігає виробленню медіатора запалення. Збільшення виробництва вільнорадикального оксиду азоту за допомогою цього ферменту, що індукується індукцибельною синтазою оксиду азоту (iNOS), вважається важливим медіатором запалення. У нормі високі рівні вільнорадикального оксиду азоту пов'язані з активністю захворювання та відіграють роль у хронічному запаленні та складному імунологічному порушенні, що викликає незворотні пошкодження тканин та органів. Після інтерналізації клітини, наноцерії можуть знижувати прозапальну експресію білка iNOS. [38]

У області противірусних досліджень деякі експерименти продемонстрували чудову антивірусну здатність наночастинок срібла по відношенню до кількох вірусів, включаючи вірус імунодефіциту людини (ВІЛ), вірус гепатиту В (ВГВ), вірус простого герпесу (ВПГ) та вірус грипу. Через складні етапи взаємодії наночастинок з клітинами для кожної вірусної інфекції детальний механізм дії наночастинок срібла проти конкретної вірусної інфекції може бути різним. Наприклад, потенційні механізми противірусної активності наночастинок срібла можуть базуватися на взаємодії з поверхневими глікопротеїнами вірусу, або на конкуренції за зв'язування вірусу з клітинами-хазяями, або на інактивації вірусних частинок перед проникненням, або на пошкодженні дволанцюгової ДНК вірусу. Однак, на відміну від звичайних противірусних препаратів, наночастинок срібла можуть атакувати різні віруси та широкий спектр вірусних компонентів, що може знизити ймовірність лікарської стійкості. [39]

Отже, вірус Епштейна-Барр наразі прийнято вважати одним з найбільш поширених вірусів людини, адже більше 90% дорослих є серопозитивними по відношенню до нього. В ряді випадків при первинному зараженні ВЕБ викликає інфекційний мононуклеоз, а після одужання здатний хронічно персистувати в організмі хазяїна. З активацією персистуючої форми вірусу пов'язана велика кількість онкологічних новоутворень, а також: різноманітні лімфоми, назофарингеальна карцинома та від 10% до 20% онкологічних новоутворень шлунково-кишкового тракту. У дітей більшість з цих захворювань розвиваються частіше (внаслідок їх фізіологічного імунодефіциту) і закінчуються летально (смертність до 50%). Наночастинок срібла в багатьох дослідженнях продемонстрували чудову антивірусну активність по відношенню до кількох вірусів, включаючи вірус простого герпесу (що відноситься до родини *Herpesviridae*). Наночастинок лантану та церію раніше не використовувались в вірусологічних дослідженнях, але їх потенційний вплив на клітини імунної системи привертає увагу для подальшого вивчення.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1.1. Віруси

У роботі використовували вірус Епштейна-Барр (*Human gammaherpesvirus 4*, EBV), що був отриманий з клітин-продуцентів, B95-8, за стандартно визначеною методикою [17]. Вірусомісний матеріал зберігали в аліквотах за температури -70°C .

2.1.2. Досліджувані речовини

Наночасточки лантану та церію з додаванням срібла (в різних концентраціях), які використовували в дослідженні, були синтезовані та люб'язно надані співробітниками Інституту проблем матеріалознавства ім. І.М.Францевича НАН України у концентраціях 10 мг/мл.

2.1.3. Культури клітин

Культури клітин (клітинні культури) – популяції клітин, що є генетично однорідними та ростуть у сталих умовах навколишнього середовища. Культура клітин B95-8 є лінією лімфоцитів мавп-мармазеток, що трансформовані вірусом Епштейна-Барр та хронічно продукують його. Ця клітинна лінія походить з Банку клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кравецького НАН України (Київ, Україна).

2.2. Культивування ліній клітин

Вирощували культури клітин на поживному середовищі. До його складу входили:

- антибіотик (50 мкг/мл гентаміцину) (Sigma, США),
- 10% ЕТС (ембріональної телячої сироватки) (Sigma, США),
- 90% середовища RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) з L-глутаміном (2 мМ) (Sigma, США).

Вирощували клітини в пластикових флаконах (Sarstedt, Німеччина), за температури 37⁰ С в термостаті з атмосферою 5% CO₂. Проводили пасажі кожні три доби до концентрації 5x10⁵ кл/мл. За допомогою світлового мікроскопу Micromed XS-3320 (Україна) при двадцятикратному збільшенні (20x) перевіряли активність клітин до проліферації кожні дві доби [45].

2.3. Підрахунок клітин у суспензії

Трипановий синій є азобарвником. В цитологічних дослідженнях він використовується як барвник для вибіркового фарбування мертвих тканин або клітин у синій колір.

Піпетуванням перемішували суспензію клітин (за допомогою піпетки) безпосередньо перед забором проби (для тієї чи іншої процедури), включаючи і сам підрахунок клітин. Для підрахунку клітин використовували лічильну камеру Горяєва. Відбирали аліквоту (100 мкл) в окрему ємність та додавали 0,4% розчин трипанового синього (Sigma, США) для визначення кількості клітин, ресуспендували суспензію клітин, для підрахунку загальної кількості клітин (кількості мертвих клітин (що пофарбовані в синій колір) і живих (що в синій колір непофарбовані)) відбирали по 25 мкл і вносили до камери Горяєва [19]. За допомогою світлового мікроскопу Micromed XS-3320

(Україна) при двадцятикратному збільшенні (20х) перевіряли активність клітин.

За формулою вираховували кількість живих чи мертвих клітин в 1 мл суспензії [45]:

$$S = A \times B \times 16665,$$

де А – середнє значення кількості живих чи мертвих клітин в 15 квадратах по двох діагональних лініях камери; В – кратність розведення суспензії клітин барвником; S – кількість живих клітин в 1 мл.

2.4. Кріоконсервування та розмороження клітин

Для зберігання культур клітин використовувався метод кріоконсервування культур клітин, які знаходяться в фазі логарифмічного росту (приблизно 4-5 пасажі). Максимальний відсоток мертвих клітин в такій популяції клітин – 5%.

Після підрахунку клітин та визначення їх стану, за допомогою трипанового синього клітини відбирали та осаджували в стерильних пробірках об'ємом 15 мл центрифугуванням протягом 10 хв за швидкості 1000 об/хв. Потім надосадову рідину видаляли. До осаджених клітин додавали середовище для кріоконсервування, що складалося з ЕТС 10% кріопротектору (диметилсульфоксиду (Sigma, США)).

Суспензію розливали аліквотами по 1 мл у спеціальні кріопробірки (Sarstedt, Німеччина), які здатні витримувати низькі температури, і заморожували. Клітини поступово охолоджували на 1⁰ С за 1 хв при +4⁰ С та кріопробірки з клітинами переносили в пінопластовому блоці до морозильної камери, витримували протягом 24 годин при температурі -70⁰ С. Зберігали клітини в рідкому азоті при -196⁰ С.

За потреби використання клітин вміст кріопробірок швидко розморожували на водяній бані при температурі 37⁰ С. Для видалення кріопротектора клітини осаджували центрифугуванням. Далі у середовищі їх ресуспендували, підраховували концентрацію та додавали об'єм ростового середовища, при якому клітини знаходяться в щільності 7-8x10⁵ кл/мл. Через 24 год та 48 год проводився підрахунок клітин. В подальшому поживне середовище додавали до клітин в наявному об'ємі для того, щоб їхня щільність поступово знижувалася до дози посадки – 5x10⁵ кл/мл. [48]

2.5. Визначення життєздатності культур клітин МТТ-методом визначення мітохондріальної активності

МТТ-метод дослідження життєздатності клітин базується на функціонуванні дегідрогеназної системи мітохондрій інтактних клітин. За нормальних умов вони переробляють в формазан штучний субстрат МТТ (3,(4,5-диметилтріазол-2-іл)-2,5дифенілтетразоліум бромід). Продукт реакції можна визначити кількісним спектрофотометричним методом. Дозозалежно перетворення МТТ в формазан під впливом досліджуваних токсичних для клітин речовин зменшується при загибелі клітин.

Субстрат МТТ ("Sigma", США) розчиняли в стерильному фосфатному буфері (рН 7,2) при кімнатній температурі до концентрації 5 мг/мл. В об'ємі 20 мкл профільтрований розчин МТТ вносили в лунки 96-лункової планшети та інкубували з клітинами при 37⁰ С протягом 2-4 год. Середовище видаляли після інкубації клітин. До клітин додавали 96% етанолу по 150 мкл для розчинення кристалів формазану. Ми спектрофотометрично визначали оптичну густина розчинів при довжині хвилі 540 нм, використовуючи спектрофотометр для плашок Multiscan FC (ThermoFisherScientific, США).

Контролем слугувала оптична щільність розчинника, тому ми порівнювали з нею визначені оптичні густини кожної лунки та за формулою

вираховували відсоток пригнічення життєздатності клітин за дії різних концентрацій сполуки:

$$\% \text{ пригнічення життєздатності} = 100 - (A/B \times 100)$$

де А – середнє значення оптичної густини дослідних зразків для певної концентрації сполуки, В – середнє значення оптичної густини зразків контролю клітин [47].

2.6. Визначення лізосомальної активності з використанням барвника нейтрального червоного

Клітини зі щільністю 5×10^5 кл/мл культивували в ростовому середовищі (з 10% ЕТС), яке також містило досліджувані речовини в різних концентраціях в 96-лункових планшетах. Клітини, які були необроблені препаратами, використовували в якості контролів. Планшети з клітинами витримували в термостаті при 37^0 С в атмосфері 5% CO_2 протягом 48 год. Після інкубації планшет з клітинами центрифугували для осадження клітин при 1500 об/хв протягом 10 хв. Потім видаляли надосад. Далі стерильним розчином фосфатно-сольового буфера (ФСБ) (рН 7,2) промивали клітини, по 150 мкл у кожному лунку, для осадження клітини центрифугували при 1500 об/хв протягом 10 хв. Знову видаляли надосад. В стерильному середовищі RPMI-1640 з L-глутаміном (2мМ) (Sigma, США) розчиняли барвник нейтральний червоний при кімнатній температурі до концентрації 50 мг/мл. Фільтрований розчин барвника вносили до лунок по 100 мкл й інкубували протягом 3 год при 37^0 С в атмосфері 5% CO_2 . Після інкубації планшет з клітинами центрифугували для осадження клітин при 1500 об/хв протягом 10 хв та видаляли надосад. Далі промивали стерильним розчином ФСБ (рН 7,2), по 150 мкл у кожному лунку, для осадження клітини центрифугували при 1500

об/хв протягом 10 хв. Потім надосад видаляли. До осаду додавали свіжого десорбуючого розчину (до 4,9 мл води додавали 5 мл 96% етанолу та 100 мкл оцтової кислоти) по 150 мкл. 10 хв ретельно струшували, а після при 37⁰ С на спектрофотометрі Multiskan FC (ThermoFisherScientific , США) при довжині хвилі 538 нм спектрофотометрично визначали оптичну густину розчинів.

За формулою ми вираховували відсоток пригнічення життєздатності клітин за дії різних концентрацій сполуки:

$$\% \text{ пригнічення життєздатності} = 100 - (A/B \times 100)$$

де А – середнє значення оптичної густини дослідних зразків для певної концентрації сполуки, Б – середнє значення оптичної густини зразків контролю клітин [48, 49].

2.7. Дослідження антивірусної активності наночасточок лантану та церію з різним вмістом срібла

Наночастки в концентрації 100 мкг/мл додавали до культури клітин В95-8. В подальшому через 48 годин відбирали проби та визначали ДНК вірусу Епштейна-Барр. Для цього використовували комерційну тест-систему до вірусу Епштейна-Барр, що містить праймери до капсидного білку ВЕБ, методом ПЛР з детекцією в реальному часі (Real-time PCR – один із багатьох різновидів полімеразної ланцюгової реакції, який використовується переважно для одночасної ампліфікації та детекції отриманих під час експерименту продуктів). За 100% відсотків вважали контроль з необроблених клітин та визначали інгібування (%). Досліджувалась кожна проба в трьох повторах та визначалось середнє значення. Стандартне відхилення при цьому не перевищувало 0,09.

2.8. Полімеразна ланцюгова реакція

Використовуючи комерційний набір BC-E50 Набір для виділення нуклеїнових кислот із колонками, 50 реакцій (BIOCORP LTD, Україна), проводили виділення ДНК вірусу. Також використовували спектрофотометр DS-11 FX + (DeNovix, США) для визначення концентрації ДНК.

В досліджуваних клітинах для визначення рівня репродукції вірусів застосовували метод полімеразної ланцюгової реакції. Для виявлення ДНК вірусу Епштейна-Барр використовували тест-системи BC-EBV (Набір для виявлення вірусу Епштейн-Барр), (BIOCORP LTD, Україна) згідно інструкції виробника із детекцією в реальному часі. Система для проведення ПЛР з детекцією в реальному часі – Quant Studio 3 biosystems, Life Technologies, Сінгапур, (Thermo Fisher Scientific).

2.9. Аналіз результатів та їх статистична обробка

У трьох повторах проводили усі дослідження. Різницю між середніми значеннями оцінювали відповідно до t-критерію і вважали достовірною при $p \leq 0,09$. Проводили статистичну обробку даних за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2010.

Концентрації речовин, що інгібують 50% життєздатності клітин порівняно з контрольними клітинами (CC_{50}), вимірювали за допомогою методу лінійної регресії в Microsoft Excel 2010. [54]

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Результати дослідження цитотоксичності наночасточок рідкоземельних металів за МТТ-методом

Першочергово було проведено дослідження цитотоксичності наночасточок лантану й церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag 2%, 4% та 5%) в клітинах-продуцентах В95-8. Для цього ми застосували МТТ-метод (для визначення мітохондріальної активності клітин). На спектрофотометрі Multiskan FC (ThermoFisherScientific, США) при довжині хвилі 540 нм (для МТТ-методу) ми спектрофотометрично визначали оптичну густина розчинів. Контролем слугувала оптична густина розчинника. Щоб перевести отриманні дані в більш наочні, використовуючи формулу, ми вираховували відсоток пригнічення життєздатності клітин за дії різних концентрацій сполуки:

$$\% \text{ пригнічення життєздатності} = 100 - (A/B \times 100)$$

де А – середнє значення оптичної густини дослідних зразків для певної концентрації сполуки, Б – середнє значення оптичної густини зразків контролю клітин.

Отримані результати інгібування культури клітин В95-8 при взаємодії з наночасточками лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag 2%, 4% та 5%) та наведені нижче на діаграмах (рис. 3.1 та рис. 3.2).

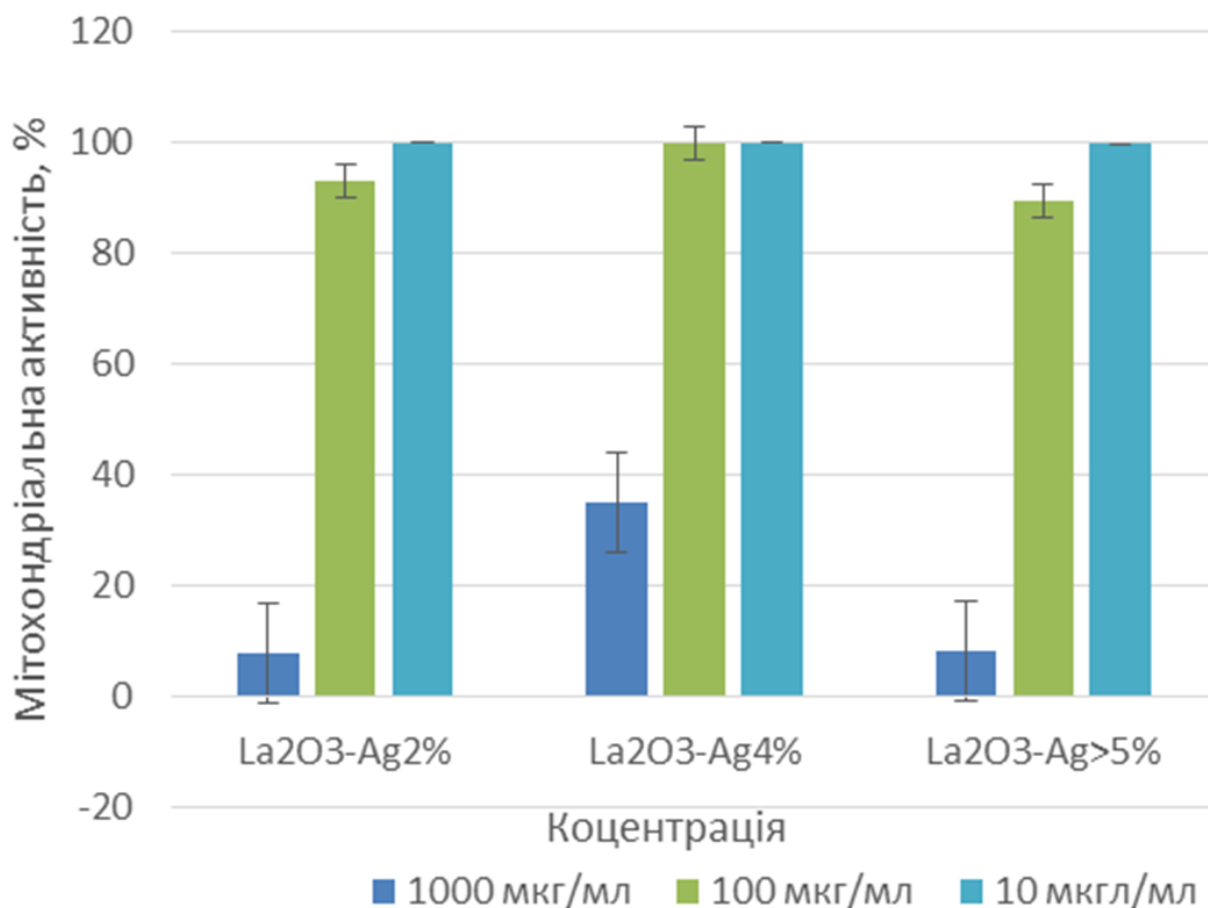


Рис. 3.1. Аналіз мітохондріальної активності клітин-продуцентів B95-8 за умов впливу наночасточок оксиду лантану з різним вмістом срібла (Ag 2%, 4% та 5%). ($p \leq 0,05$)

Для наночасточок лантану відсоток мітохондріальної активності коливався в межах 7,7% – 100%. Максимально низький відсоток мітохондріальної активності спостерігався при взаємодії з наночасточками La₂O₃-Ag 2% при концентрації 1000 мкг/мл і становив 7,7%. Необхідно зазначити, що близькі за значенням (8,3%) інгібування мітохондріальної активності культур клітин відбулося під впливом наночасточок La₂O₃-Ag 5% при концентрації 1000 мкг/мл. Мінімальне інгібування мітохондріальної активності культур клітин відбулося наночасточками La₂O₃-Ag >5% при концентрації 10 мкг/мл і становило 0,17%.

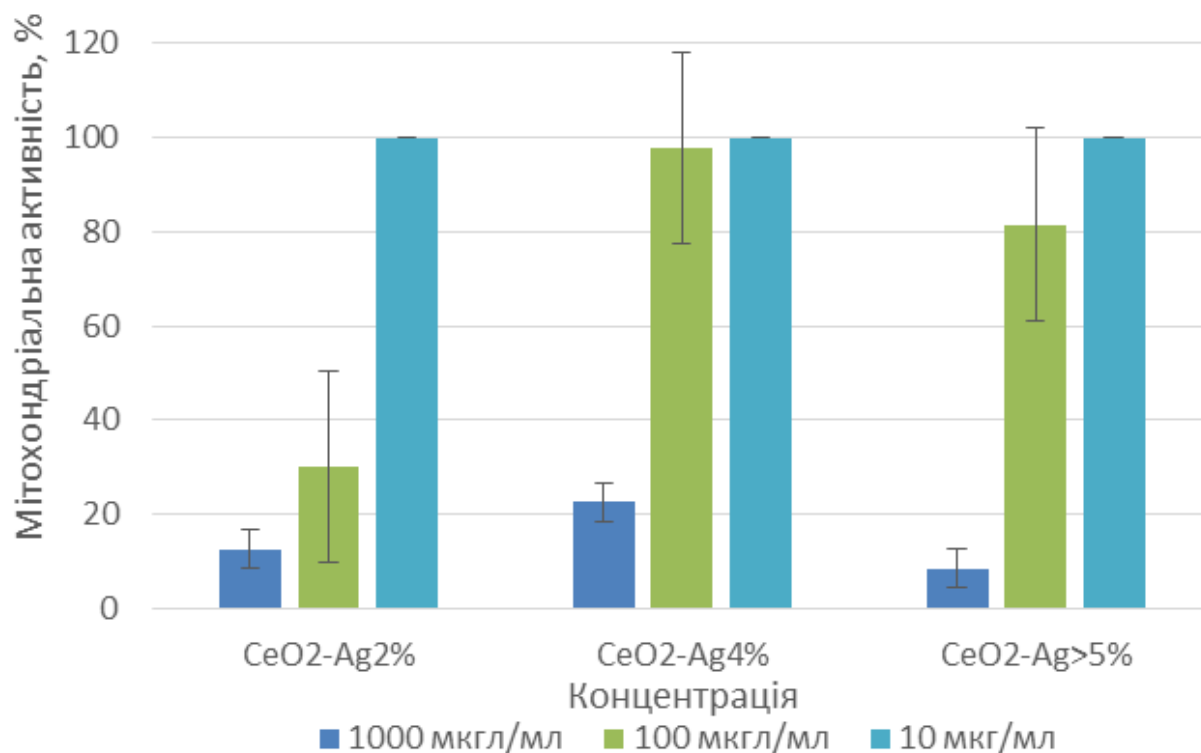


Рис. 3.2. Аналіз впливу наночасточок оксиду церію з різним вмістом срібла (Ag 2%, 4% та 5%) на мітохондріальну активність клітин В95-8. ($p \leq 0,05$)

Для наночасточок церію відсоток мітохондріальної активності коливався в межах 8,5% – 100%. Максимально низький відсоток мітохондріальної активності спостерігався при взаємодії з наночасточками CeO₂-Ag>5% при концентрації 1000 мкг/мл і становив 8,5%. Мінімальне інгібування мітохондріальної активності культур клітин відбулося наночасточками CeO₂-Ag 4% при концентрації 100 мкг/мл і становило 2,13%.

Індекс CC_{50} оцінювали за допомогою МТТ-методу (представлений на **рис. 3.3**).

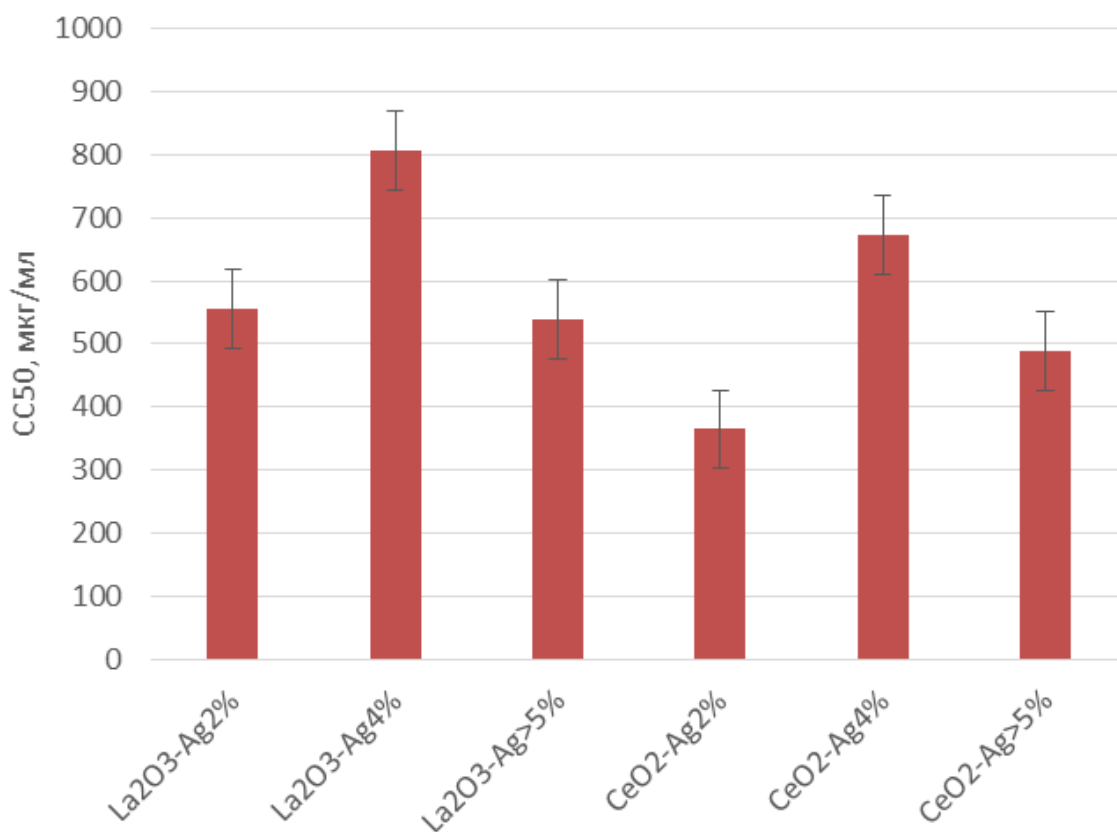


Рис. 3.3. Цитотоксична концентрація (CC₅₀) наночасточок лантану та церію з різним вмістом срібла (2%, 4% та 5%) за МТТ-методом. ($p \leq 0,05$)

Показник CC₅₀ за МТТ-методом коливався в межах 365,09 мкг/мл – 805,93 мкг/мл.

3.2. Результати дослідження цитотоксичності наночасточок рідкоземельних металів з використанням барвника нейтрального червоного

Було проведено дослідження цитотоксичності наночасточок лантану й церію (La₂O₃, CeO₂) з різним вмістом срібла (Ag), а саме – 2%, 4% та 5%, в клітинах-продуцентах В95-8. Для цього використовували метод визначення лізосомальної активності культур клітин з використанням барвника нейтрального червоного. За допомогою спектрофотометра Multiskan FC

(ThermoFisherScientific, США) при довжині хвилі 538 нм спектрофотометрично визначали оптичну густина розчинів.

За формулою ми вираховували відсоток пригнічення життєздатності клітин за дії різних концентрацій сполуки:

$$\% \text{ пригнічення життєздатності} = 100 - (A/B \times 100)$$

де А – середнє значення оптичної густини дослідних зразків для певної концентрації сполуки, Б – середнє значення оптичної густини зразків контролю клітин [48, 49].

Отримані результати лізосомальної активності культури клітин В95-8 та її інгібування при взаємодії з наночасточками лантану й церію з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) наведені нижче на діаграмах (рис. 3.4 та рис. 3.5).

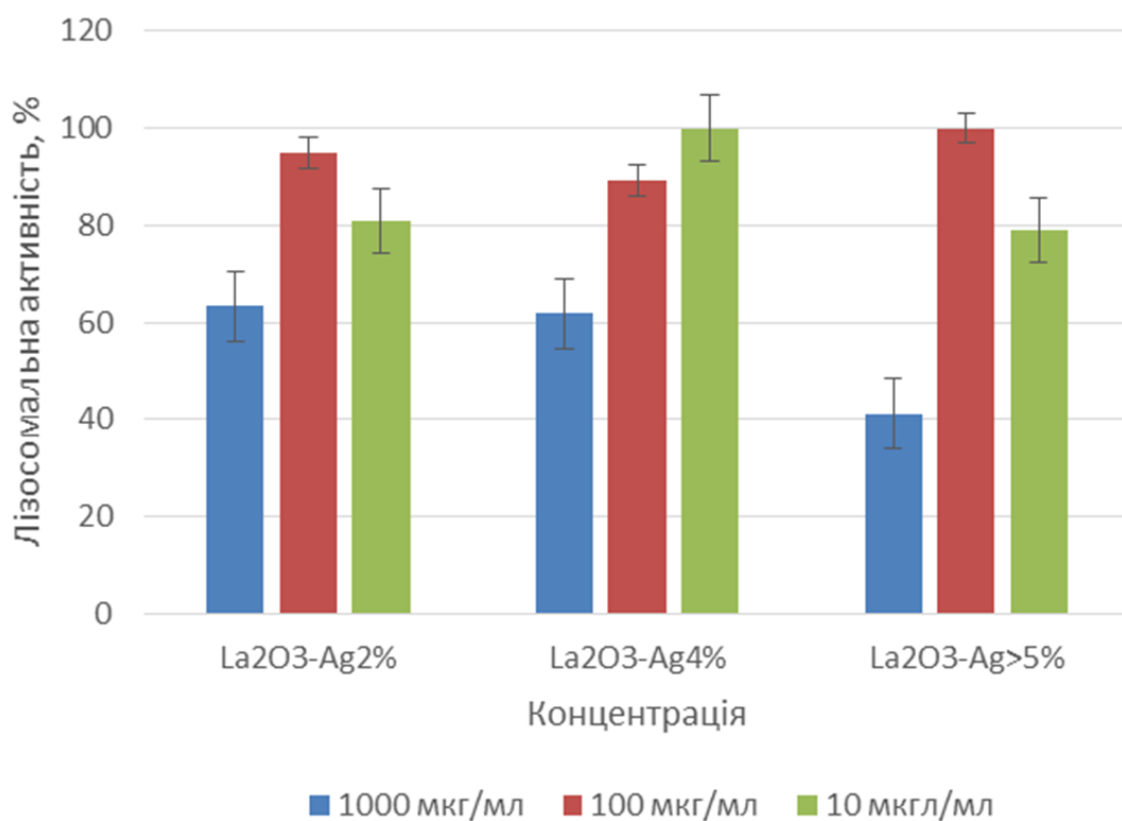


Рис. 3.4. Аналіз впливу наночасточок лантану та церію з різним вмістом срібла (Ag 2%, 4% та 5%) та в різних розведеннях на життєздатність клітин B95-8. ($p \leq 0,05$)

Для наночасточок лантану відсоток лізосомальної активності коливався в межах 30,8% – 100%. Максимально низький відсоток лізосомальної активності спостерігався при взаємодії з наночасточками $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}>5\%$ при концентрації 1000 мкг/мл і становив 30,8%.

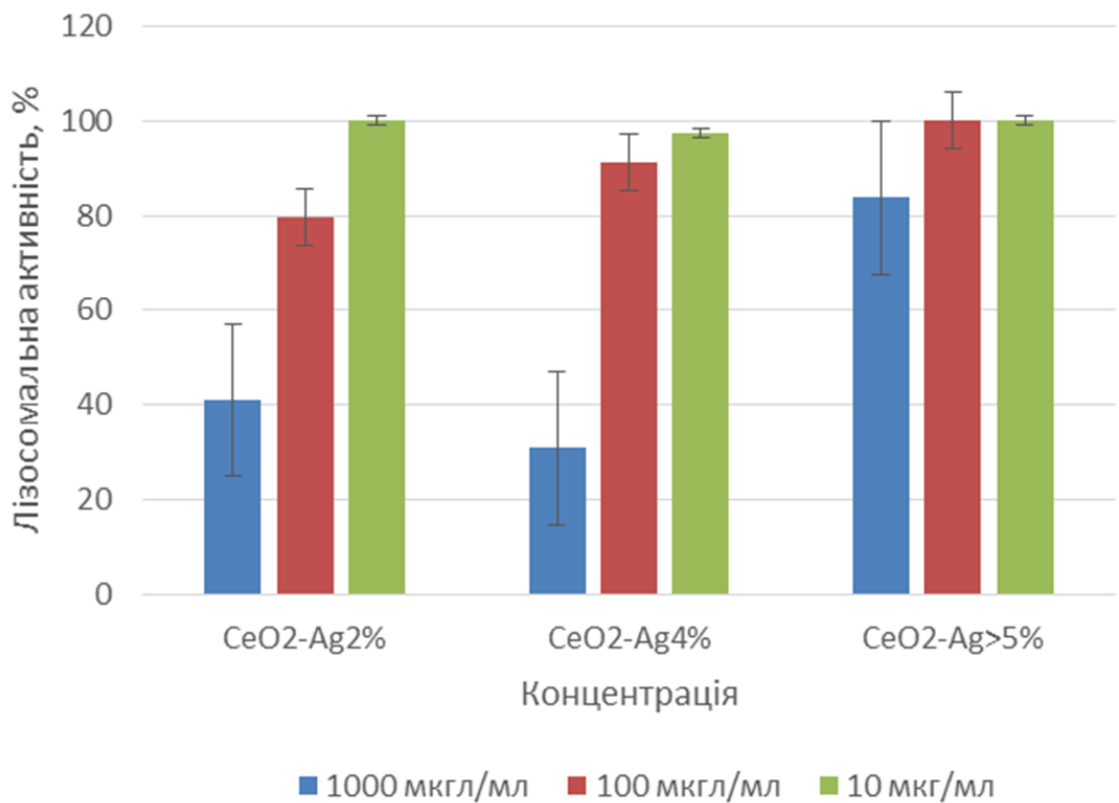


Рис. 3.5. Аналіз впливу наночасточок оксиду церію з різним вмістом срібла (2%, 4% та 5%) та в різних розведеннях на життєздатність клітин-продуцентів B95-8. ($p \leq 0,05$)

Для наночасточок церію відсоток лізосомальної активності коливався в межах 41,2% – 100%. Максимально низький відсоток лізосомальної активності спостерігався при взаємодії з наночасточками $\text{CeO}_2\text{-Ag } 4\%$ при концентрації 1000 мкг/мл і становив 41,2%.

Отримані результати підтверджують перспективність вивчення наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (2%, 4% та 5%) для подальшого визначення їх антивірусного потенціалу з метою розробки на їх основі медичних препаратів.

3.3. Результати антивірусної активності наночасточок рідкоземельних металів

Після визначення цитотоксичності наночасточок лантану та церію з різним вмістом срібла (2%, 4% та 5%) в клітинах-продуцентах В95-8 ми перейшли до визначення антивірусної дії наночасточок лантану та церію відносно вірусу Епштейна-Барр. Оскільки ми працювали з вже трансформованими клітинами-продуцентами В95-8 (тобто з тими, що мали в своєму генетичному апараті хронічно вбудовану вірусну ДНК), то першочергово ми провели в досліджуваних клітинах кількісне визначення концентрації тотальної ДНК (ng) на 1 μl . Для цього застосовували метод полімеразної ланцюгової реакції. Також використовували спектрофотометр DS-11 FX + (DeNovix, США) для визначення концентрації ДНК.

Другим кроком стало виявлення специфічних ділянок ДНК вірусу Епштейна-Барр з тотальної ДНК, оскільки ми працювали з клітинами, які в своєму генетичному апараті мали вбудований геном вірусу Епштейна-Барр.

Для цього ми використовували метод полімеразної ланцюгової реакції та тест-системи BC-EBV (Набір для виявлення вірусу Епштейн-Барр), (BIOCORP LTD, Україна) згідно інструкції виробника із детекцією в реальному часі. Після визначення кількості специфічних ділянок вірусної ДНК з тотальної, ми визначили відсоток інгібування реплікації вірусної ДНК.

Антивірусна активність наночасточок лантану та церію з різним вмістом срібла (2%, 4% та 5%) в концентрації 100 мкг/мл відносно вірусу Епштейна-Барр була в межах 54% – 74%. Найбільший відсоток пригнічення

реплікації вбудованої вірусної ДНК становив 74% при впливі наночасточок CeO_2 з вмістом срібла 2%. Отримані результати наочно зображено на діаграмі нижче (рис. 3.6).

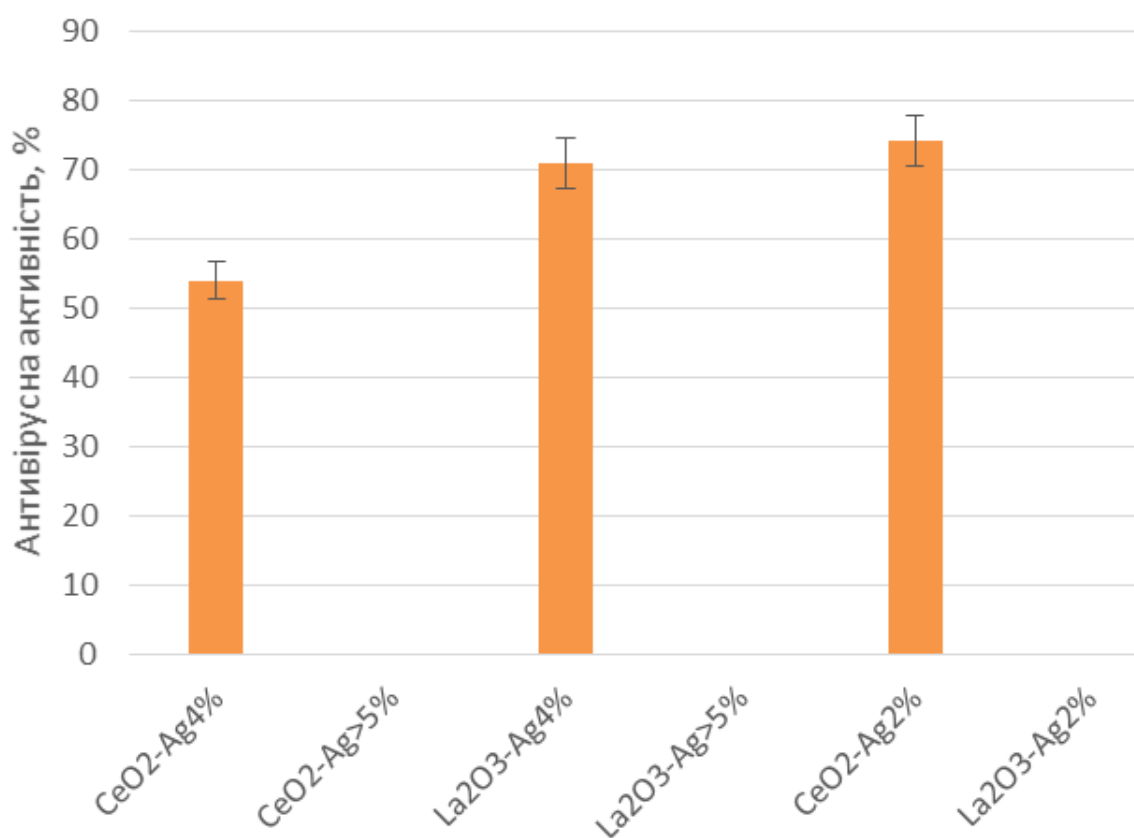


Рис. 3.6. Графічне зображення відсотків інгібування реплікації вірусної ДНК при дії наночасточок лантану та церію з різним вмістом срібла (2%, 4% та 5%) в концентрації 100 мкг/мл. ($p \leq 0,05$)

Отже, за допомогою МТТ-методу визначення мітохондріальної активності, методу визначення лізосомальної активності з використанням барвника нейтрального червоного та методу полімеразної ланцюгової реакції ми отримали дані щодо цитотоксичності та антивірусної активності наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (2%, 4% та 5%) з метою їх подальшого аналізу.

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

4.1. Аналіз впливу наночасточок рідкоземельних металів на життєздатність клітин-продуцентів B95-8

Наночасточки широко використовуються в різних галузях, у тому числі пов'язаних із біомедициною, споживчими товарами, енергетикою та біоінформатичним моделюванням. Наночасточки зв'язуються з білками крові та взаємодіють із клітинами органів, потрапляючи в організм людини, що, в теорії, може зумовлювати їх токсичність. [51]

Цитотоксичністю прийнято вважати властивість певних біогенних речовин, хімічних елементів або сполук згубно впливати на клітини живих організмів. Шкідливий вплив токсичних речовин може призвести не тільки до зниження різноманітних процесів життєдіяльності клітин, а також і до фатальних (смертельних) наслідків. Найбільш важливими процесами в життєдіяльності клітин є мітохондріальна активність та проникність мембран, тому їх вважають «маркерами життєдіяльності клітин». Мітохондрії в клітині відіграють важливу роль в процесах окислювального метаболізму поживних речовин та синтезу високоенергетичних молекул – аденозинтрифосфату (АТФ). [52]

Щоб клітини функціонували належним чином, між мітохондріями та ядром має бути зворотний зв'язок, так званий антеградна та ретроградна передача сигналів. Ядерні гени контролюють біогенез мітохондрій, щоб синтезувати більше мітохондрій і задовольнити збільшені метаболічні потреби. Протилежний біогенез – це ще один рівень ядерного контролю за допомогою генів аутофагії та мітофагії. Відсутність накопичення патогенних мутацій мітохондріального геному при онкологічних новоутвореннях у людей передбачає задіяння активних механізмів контролю якості

мітохондрій, що запобігають накопиченню дефектних мітохондрій. Мітофагія – це спеціалізована форма аутофагії, яка вибірково руйнує та усуває зайві або пошкоджені мітохондрії. Біогенез та мітофагія працюють спільно, щоб регулювати масу, функцію та якість мітохондрій. У свою чергу, дефектні мітохондрії передають сигнал «з'їж мене» безпосередньо механізми мітофагії за рахунок деполяризації мембрани і каскаду фосфорилування та убіквітації мітохондріальних білків, а зниження виходу клітинної енергії (як це відбувається при недостатній загальній кількості мітохондрій) запускає біогенез за допомогою загальної енергетичної сенсорної кінази AMP та інших механізмів. [53]

Мітохондрії відіграють важливу роль у розвитку раку завдяки синтезу макромолекул та виробленню енергії. Злоякісні пухлини вибірково зберігають мітохондріальний геном та функцію ЕТС, тоді як пухлини з патогенними мутаціями мітохондріальної ДНК є доброякісними, що вказує на важливість дихання для прогресування раку. Навпаки, мутантні ферменти циклу ТСА продукують онкометаболіти, які сприяють онкогенезу. [54]

Тому для нас було особливо важливо проаналізувати цитотоксичний вплив наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) на мітохондріальну активність клітин. Для дослідження цієї властивості наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) ми використовували МТТ-метод (для визначення мітохондріальної активності клітин) та метод спектрофотометрії (використовуючи спектрофотометр Multiskan FC (ThermoFisherScientific, США), при довжині хвилі 540 нм).

Отримані результати життєздатності культури клітин В95-8 та її інгібування при взаємодії з наночасточками лантану (La_2O_3) з різним вмістом срібла показали різний рівень цитотоксичності.

Максимальний низький відсоток життєздатності клітин-продуцентів вірусу Епштейна-Барр В95-8 ми спостерігався при взаємодії з наночасточками La_2O_3 -Ag 2% (за методом визначення мітохондріальної активності клітин, МТТ-методом) при концентрації 1000 мкг/мл і він

становив 7,7%. Мінімальний вплив на мітохондріальну активність клітин (за МТТ-методом) відбувався при взаємодії з наночасточками $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ >5% в концентрації 10 мкг/мл і показник життєздатності сягав 99,8%. Наночасточки $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 4% в концентраціях 100 мкг/мл та 10 мкг/мл і $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 2% в концентрації 10 мкг/мл не впливали на життєздатність клітин-продуцентів В95-8, що було визначено за допомогою МТТ-методу.

Отримані результати життєздатності культури клітин В95-8 та її інгібування при взаємодії з наночасточками церію (CeO_2) з різним вмістом срібла також вказували на достатньо різний рівень цитотоксичності. Максимальний низький відсоток життєздатності клітин-продуцентів вірусу Епштейна-Барр В95-8 спостерігався при взаємодії з наночасточками $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ >5% (за методом визначення мітохондріальної активності клітин, МТТ-методом) і становив 8,45% при концентрації 1000 мкг/мл. Мінімальний вплив на мітохондріальну активність клітин (за МТТ-методом) відбувався при взаємодії з наночасточками $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 4% в концентрації 10 мкг/мл і показник життєздатності становив 97,8%. Наночасточки $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 2%, $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 4% та $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ >5% в концентрації 10 мкг/мл не впливали на життєздатність клітин-продуцентів В95-8, що було визначено за допомогою МТТ-методу.

Також ми спостерігали підвищення мітохондріальної активності клітин при взаємодії з наночасточками $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 4% в концентрації 100 мкг/мл та $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 2%, $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 4%, $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 2%, $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 4% та $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ >5% при концентрації 10 мкг/мл за методом визначення мітохондріальної активності. Ми дійшли висновку, що відбулася проліферація клітин-продуцентів вірусу Епштейна-Барр В95-8. Такий парадокс для ВЕБ-асоційованих клітин лінії В95-8 може бути зумовлений зміною ростових властивостей трансформованих клітин. Саме вона вважається однією з основних адаптивних особливостей, яка дозволяє клітинам набувати здатності до проліферації в тих умовах, які могли би бути несприятливими для нормальних, тобто нетрансформованих, клітин. Таким чином, в умовах, які здатні обмежувати проліферацію звичайних, нетрансформованих, клітин,

трансформовані клітини будуть рости та збільшувати щільність популяції. Ця властивість опосередковано пов'язана з їх мінімальними вимогами до чинників, що зумовлюють нормальну проліферацію. [53]

Такі результати цитотоксичності наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) за МТТ-методом вказують на відносну нетоксичність досліджуваних сполук по відношенню до клітин-продуцентів вірусу Епштейна-Барр лінії В95-8. Результати цитотоксичності наночасточок в певних концентраціях перевищують референтні значення (50%) пригнічення процесів мітохондріальної активності клітин. Цитотоксична концентрація (CC_{50}) в культурі клітин В95-8 для наночасточок CeO_2 -Ag 2% становила 365,09 мкг/мл, La_2O_3 -Ag 2% – 555,27 мкг/мл, CeO_2 -Ag 4% – 671,9 мкг/мл, CeO_2 -Ag >5% – 487,96 мкг/мл, La_2O_3 -Ag 4% – 805,93 мкг/мл та La_2O_3 -Ag >5% – 538,83 мкг/мл.

Лізосоми клітини відповідають за внутрішньоклітинне перетравлювання макромолекул (також у них наявне явище аутофагії), здатні до секреції свого вмісту в процесі лізосомного екзоцитозу та беруть участь в певних внутрішньоклітинних сигнальних шляхах, які пов'язані з метаболізмом і ростом клітин.

Злоякісні новоутворення стають все більш серйозною проблемою зі здоров'ям, що зумовлює зростання смертності на сьогодні. Найчастіше традиційні методи лікування дають лише обмежений ефект. Проблеми в терапії існують у складних пухлинних клітинах, а й у складному пухлинному мікрооточенні (СПМ), котре складається з макрофагів, Т-клітин, дендритних клітин, фібробластів та інших клітин. Прогресування та регресія пухлин сильно залежить від динамічних взаємодій між різними клітинами в межах СПМ. У мікросередовищі, що характеризується недостатніми поживними речовинами, кислотністю та гіпоксією, пухлинні клітини перепрограмують фенотипи та поведінку стромальних клітин, щоб сприяти прогресуванню пухлини шляхом індукції проліферації, лікарської стійкості, інвазії,

метастазування та імуносупресії. Ці взаємодії здійснюються через мембранні білки, цитокіни, метаболіти, екзосоми та лізосоми. [54]

За останні десятиліття були накопичені величезні знання про пухлинні клітини. Пухлинні клітини наразі розглядаються як група клітин, які містять нестабільний геном з численними мутаціями і здатні безперервно проліферувати, уникати загибелі клітин, індукувати ангіогенез, інвазувати, метастазувати, уникати імунного контролю, стійкі до хіміотерапії та стійкі до променевої терапії. Були запропоновані такі парадигми, як епітеліально-мезенхімальний перехід та ракові стовбурові клітини, щоб пояснити та пов'язати ці злякисні новоутворення. Крім того, активність лізосом пов'язана з фенотипами злякисних клітин. Всеосяжна лізосомальна активність, себто аутофагія, інгібує онкогенез, але сприяє прогресуванню онкологічних новоутворень. Аутофагія запобігає онкогенезу, пригнічуючи трансформацію передракових клітин. Генотоксичні АФК та дисфункціональні мітохондрії усуваються шляхом аутофагії. Більше того, аутофагія може обробляти геномну нестабільність, таку як екструдовані фрагменти цитоплазматичного хроматину, мікроядра та ендегенні ретротранспозони. Однак підвищення рівня аутофагії було показано у первинних пухлинних клітинах та клітинних лініях. Порівняння відмінностей аутофагії між передраковими клітинами та раковими клітинами розглядається як цікава тема для вивчення. Аутофагія, а також інші механізми, пов'язані з лізосомами, сприяють прогресуванню пухлини, сприяючи розвитку злякисних фенотипів. [55]

Тому для нас було особливо важливо проаналізувати цитотоксичний вплив наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) на лізосомальну активність клітин. Для дослідження цієї властивості наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) ми застосовували метод визначення лізосомальної активності (з використанням барвника нейтрального червоного) та метод спектрофотометрії (використовуючи спектрофотометр Multiskan FC (ThermoFisherScientific, США) при довжині хвилі 538 нм. Отримані результати прояснюють подальші перспективи

застосування наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (0%, 2%, 4% та 5%) щодо розробки різноманітних антивірусних засобів запобігання та поширення ВЕБ-інфекції.

Отримані результати показали нам, що наночасточки лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) мають найрізноманітніші впливи на лізосомальну активність клітин.

Цитотоксична дія наночасточок лантану (La_2O_3) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) була в межах 41,1% – 94,9%. Максимально високий відсоток лізосомальної активності клітин спостерігався при взаємодії з наночасточками La_2O_3 -Ag 2% при концентрації 100 мкг/мл і становив 94,9%. Максимально низький відсоток лізосомальної життєздатності клітин спостерігався при взаємодії з наночасточками La_2O_3 -Ag >5% і становив 41,1% при концентрації 1000 мкг/мл.

Цитотоксична дія наночасточок церію (CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) спостерігалася у всіх концентраціях та була в межах 30,8% – 97,3%. Максимально високий відсоток лізосомальної активності клітин спостерігався при взаємодії з наночасточками CeO_2 -Ag 4% при концентрації 10 мкг/мл і становив 97,3%. Максимально низький відсоток лізосомальної життєздатності клітин спостерігався при взаємодії з наночасточками CeO_2 -Ag 4% і становив 30,8% при концентрації 1000 мкг/мл.

Також ми спостерігали підвищення життєздатності клітин при взаємодії з наночасточками CeO_2 -Ag >5% та La_2O_3 -Ag >5% при концентраціях 100 мкг/мл та CeO_2 -Ag 2%, CeO_2 -Ag >5% й La_2O_3 -Ag 4% при концентрації 10 мкг/мл за методом визначення лізосомальної активності (з використанням барвника нейтрального червоного).

Такі результати цитотоксичності наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) вказують на відносну нетоксичність досліджуваних сполук по відношенню до клітин-продуцентів вірусу Епштейна-Барр лінії В95-8. Результати цитотоксичності наночасточок CeO_2 -Ag 4%, La_2O_3 -Ag >5% та CeO_2 -Ag 2% лише в найвищих

концентраціях (1000 мкг/мл) перевищують референтні значення (50%) пригнічення процесів загальної життєздатності клітин за методом визначення лізосомальної активності (з використанням барвника нейтрального червоного). Тому нами було прийняте рішення не визначати показник CC_{50} в культурі клітин В95-8 для наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) за методом визначення лізосомальної активності (з використанням барвника нейтрального червоного).

На нашу думку, отримані дані щодо токсичності досліджуваних наночасточок можуть бути зумовлені різними причинами:

- кількість збуджених наночасточок була зavelика для того, щоб вони почали безпечно взаємодіяти з культурою клітин,
- більш концентрований базовий розчин наночасточок мали змінені фізико-хімічні властивості,
- проблемами підготовки проб (наприклад, ультразвуковим диспергуванням),
- базовий розчин наночасточок з вмістом срібла 2%, 4% та 5% при низьких концентраціях проявив свою токсичність через більший відсоток лантану і церію у своєму складі,
- базовий розчин наночасточок церію та лантану з вмістом срібла 2%, 4% та 5% при концентрації 1000 мкг/мл зберіг свою стабільність та гомогенність. [45]

Потрібно мати на увазі, що загалом дослідження цитотоксичної дії наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) сильно залежить від їх проникнення в клітини лінії В95-8, оскільки ми працювали з клітинами, що є продуцентами вірусу Епштейна-Барр, тобто мають в своєму геномі вбудовану ДНК ВЕБ, яка здатна впливати на різні функціональні процеси в клітині.

Отже, ми провели дослідження цитотоксичності наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) та

з'ясували, що вони мають високий рівень цитотоксичності у вищих концентраціях (1000 мкг/мл та 100 мкг/мл). Для наночасточок лантану (La_2O_3) відсоток життєздатності клітин коливався в межах 7,7% – 99,8% (за МТТ-методом) та 41,1% – 94,9% (за методом визначення лізосомальної активності з використанням барвника нейтрального червоного). Для наночасточок церію (CeO_2) відсоток життєздатності клітин коливався в межах 8,4% – 97,8% (за МТТ-методом) та 30,8% – 97,3% (за методом визначення лізосомальної активності з використанням барвника нейтрального червоного). Такі результати цитотоксичності наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) вказують на відносну токсичність досліджуваних сполук по відношенню до клітин-продуцентів вірусу Епштейна-Барр лінії В95-8, оскільки показники в певних їх концентраціях перевищують референтні значення (50%). За МТТ-методом цитотоксична концентрація (CC_{50}) в культурі клітин В95-8 для наночасточок CeO_2 -Ag 2% становила 365,09 мкг/мл, La_2O_3 -Ag 2% – 555,27 мкг/мл, CeO_2 -Ag 4% – 671,9 мкг/мл, CeO_2 -Ag >5% – 487,96 мкг/мл, La_2O_3 -Ag 4% – 805,93 мкг/мл та La_2O_3 -Ag >5% – 538,83 мкг/мл. За методом за методом визначення лізосомальної активності (з використанням барвника нейтрального червоного) показник CC_{50} в культурі клітин В95-8 для наночасточок лантану та церію не визначався через те, що результати цитотоксичності наночасточок CeO_2 -Ag 4%, La_2O_3 -Ag >5% та CeO_2 -Ag 2% перевищували референтні значення (50%) лише в найвищих концентраціях (1000 мкг/мл).

Також ми спостерігали підвищення життєздатності клітин при взаємодії з наночасточками La_2O_3 -Ag 4%, CeO_2 -Ag 4% при концентраціях 10 мкг/мл та La_2O_3 -Ag 4% й CeO_2 -Ag 4% при концентрації 100 мкг/мл за методом визначення мітохондріальної активності. Ми дійшли висновку, що відбулася проліферація клітин-продуцентів вірусу Епштейна-Барр В95-8.

Завдяки подальшим дослідженням впливу наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) на

трансформовані клітини-продуценти вірусу Епштейна-Барр лінії В95-8 існує можливість їх подальшого вивчення в галузях фармакології та медицині.

4.2. Аналіз протівірусної дії наночасточок рідкоземельних металів на життєздатність клітин-продуцентів В95-8

Антивірусною активністю вважається властивість медичного препарату, біогенних речовин, хімічних сполук чи елементів негативно впливати на вільні вірусні частинки або вбудований вірусний геном (в клітину). Антивірусна активність може проявлятися в блокуванні адсорбції вільної вірусної частки на клітинній мембрані, перешкоджанні зв'язування вірусу з поверхневими та внутрішньоклітинними рецепторами клітини, інгібуванні синтезу вірусних структурних та неструктурних білків, пригніченні реплікації вірусного генома та неправильній збірці вірусної частки (при виході з клітини), що в подальшому призводить до її деструкції. Зазвичай для терапії захворювань, що спричинені вірусами родини *Herpesviridae*, застосовують декілька класів етіотропних антивірусних препаратів: аномальні нуклеозиди (для вірусу простого герпесу типів 1 та 2, цитомегаловірусу та вірусу вітряної віспи), похідні адамантану (для вірусу простого герпесу типів 1 та 2), аналоги пірофосфату (для вірусу простого герпесу типів 1 та 6 й цитомегаловірусу) та віруліцидні препарати (переважно для вірусу простого герпесу типів 1 та 2 й вірусу вітряної віспи).

Тому головною метою нашої роботи було виявлення антивірусної активності наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) відносно вірусу Епштейна-Барр з подальшими перспективами застосування досліджуваних наночасточок в лікуванні хвороб, спричинених цим вірусом.

Очевидно, що для визначення антивірусної дії наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) відносно

вірусу Епштейна-Барр необхідною умовою було «розділення» тотальної нуклеїнової кислоти на клітинну та вірусну (оскільки ми працювали з клітинами, які в своєму генетичному апараті мали вбудовану ДНК вірусу Епштейна-Барр). Тому ми застосували метод полімеразної ланцюгової реакції. Спершу було проведене виділення тотальної нуклеїнової кислоти, використовуючи комерційний BC-E50 набір для виділення нуклеїнових кислот із колонками, 50 реакцій (BIOCORP LTD, Україна). Надалі для виявлення ДНК вірусу та визначення рівня його репродукції в клітинах застосовували молекулярно-біологічні методи. Для визначення концентрації ДНК ми використовували спектрофотометр DS-11 FX + (DeNovix, США). Для виявлення ДНК вірусу Епштейна-Барр проводили ПЛР із детекцією в реальному часі, використовуючи тест-систему BC-EBV (набір для виявлення вірусу Епштейн-Барр), (BIOCORP LTD, Україна) згідно інструкції виробника. Після проведених досліджень ми перейшли до аналітичної обробки результатів інгібування реплікації вірусної ДНК в клітинах-продуцентах вірусу Епштейна-Барр лінії B95-8 під впливом наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) в концентрації 100 мкг/мл.

Отримані результати показали нам, що наночасточки CeO_2 -Ag 2%, CeO_2 -Ag 4% та La_2O_3 -Ag 4% в концентрації 100 мкг/мл здатні інгібувати реплікацію вірусу Епштейна-Барр. Антивірусна активність наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) в концентрації 100 мкг/мл відносно вірусу Епштейна-Барр коливалась в межах 53,9% – 74,1%. Найбільший відсоток пригнічення реплікації вбудованої вірусної ДНК становив 74,1% при концентрації 100 мкг/мл при взаємодії з наночасточками CeO_2 -Ag 2%. Мінімальне інгібування реплікації вірусної ДНК при дії наночасточок CeO_2 -Ag 4% в концентрації 100 мкг/мл сягало 53,9%.

Наночасточки $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 2%, $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ >5% та $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ >5% не інгібували ДНК вірусу Епштейна-Барр, а навпаки підвищили реплікацію на 41,099%, 30,975% та 18,125% відповідно.

На нашу думку, отримані дані антивірусної дії можуть бути зумовлені різними причинами:

- кількість збуджених наночасточок була замала для того, щоб вони почали взаємодіяти своїми вільними радикалами з ДНК вірусу Епштейна-Барр, окиснюючи при цьому С–Н зв'язки,
- розчин наночасточок середньої концентрації (100 мкг/мл) мав змінені фізико-хімічні властивості,
- проблемами підготовки проб (до прикладу, ультразвуковим диспергуванням),
- базовий розчин наночасточок лантану і церію з вмістом срібла 2% та 5% підвищив реплікацію вірусної ДНК через більший відсоток рідкоземельного металу у своєму складі,
- базовий розчин наночасточок лантану та церію з вмістом срібла 2% та 5% при концентрації 100 мкг/мл зберіг свою стабільність та гомогенність.

Потрібно мати на увазі, що загалом дослідження антивірусної активності наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) сильно залежить від їх проникнення до клітин лінії В95-8, оскільки ми працювали з клітинами, що є продуцентами вірусу Епштейна-Барр, тобто мають в своєму геномі хронічно вбудовану ДНК ВЕБ.

Отже, наночасточки лантану (La_2O_3) впливали на життєздатність клітин таким чином, що відсоток мітохондріальної активності коливався в межах 7,7% – 99,8% (що було визначено за допомогою МТТ-методу) та відсоток лізосомальної активності варіював в межах 41,1% – 94,9% (що було визначено за допомогою методу визначення лізосомальної активності з використанням барвника нейтрального червоного). В свою чергу, наночасточки церію (CeO_2) впливали на життєздатність клітин таким чином,

що відсоток мітохондріальної активності коливався в межах 8,4% – 97,8% (що було визначено за допомогою МТТ-методу) та відсоток лізосомальної активності варіював в межах 30,8% – 97,3% (що було визначено за допомогою методу визначення лізосомальної активності з використанням барвника нейтрального червоного). Показник цитотоксичної концентрації (CC_{50}) в культурі клітин В95-8 для наночасточок CeO_2-Ag 2% становив 365,09 мкг/мл, La_2O_3-Ag 2% – 555,27 мкг/мл, CeO_2-Ag 4% – 671,9 мкг/мл, $CeO_2-Ag >5\%$ – 487,96 мкг/мл, La_2O_3-Ag 4% – 805,93 мкг/мл та $La_2O_3-Ag >5\%$ – 538,83 мкг/мл, що було визначено за допомогою ММТ-методу. За допомогою методу полімеразної реакції було з'ясовано, що наночасточки CeO_2-Ag 2%, CeO_2-Ag 4% та La_2O_3-Ag 4% в концентрації 100 мкг/мл здатні інгібувати реплікацію вірусу Епштейна-Барр. Антивірусна активність наночасточок лантану та церію (La_2O_3 , CeO_2) з різним вмістом срібла (Ag) (2%, 4% та 5%) в концентрації 100 мкг/мл відносно вірусу Епштейна-Барр варіювала в межах 53,9% – 74,1%.

ВИСНОВКИ

1. Проведено дослідження цитотоксичності наночасточок лантану та церію з різним вмістом срібла (2%, 4% та 5%) відносно клітин-продуцентів вірусу Епштейна-Барр В95-8 і виявлено, що вони проявляють токсичну дію в високих концентраціях.

2. Встановлено, що показник CC_{50} за МТТ-методом коливався в межах 365,09 мкг/мл – 805,93 мкг/мл. Це свідчить про нетоксичність досліджуваних речовин.

3. Проведено дослідження антивірусного впливу наночасточок лантану та церію з різним вмістом срібла (2%, 4% та 5%) відносно клітин-продуцентів вірусу Епштейна-Барр В95-8 у концентрації 100 мкг/мл і виявлено, що три з них проявляють протівірусну дію відносно вірусу Епштейна-Барр.

4. Зазначено, що наночасточки La_2O_3-Ag 2%, CeO_2-Ag >5% та La_2O_3-Ag >5% не інгібували реплікацію ДНК вірусу Епштейна-Барр, а навпаки підвищили реплікацію на 41,099%, 30,975% та 18,125%, відповідно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Viral infectious disease (2021). *Disease ontology*, [online] Available at: <https://disease-ontology.org/?id=DOID:934>
[Accessed 9 Feb. 2021].
2. Інфографіка: Від яких інфекційних хвороб найбільше помирають люди у світі. *Радіо Свобода*, [online] Available at: <https://www.radiosvoboda.org/a/infografika-vid-yakyh-infekciynych-chvorob-naybilshe-pomyrauit-luidy-u-sviti/30482100.html>
[Accessed 11 March. 2020].
3. Taxonomy History. *ICTV*, [online] Available at: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20181486
[Accessed 6 Feb. 2021].
4. Zanella M., Cordey S., Kaiser L. (2020). Beyond Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus: a Review of Viruses Composing the Blood Virome of Solid Organ Transplant and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(4), 120-127.
5. Rezk S.A., Zhao X., Weiss L.M. (2018). Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoid proliferations, a 2018 update. *Human Pathology*, 79, 18-41.
6. Maeda E., Akahane M., Kiryu S., Kato N., Yoshikawa T., Hayashi N., et al. (2009). Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review. *Japanese Journal of Radiology*. [online] Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11604-008-0291-2>
[Accessed 21 Apr. 2009].
7. Оксана Виговська (2014). Сучасні підходи до лікування хронічної форми Епштейн-Барр інфекції у дітей, *3 турботою про дитину*, 2 (47), 15-20.
8. Pender M.P. (2012). CD8+ T-Cell Deficiency, Epstein-Barr Virus Infection, Vitamin D Deficiency, and Steps to Autoimmunity: A Unifying Hypothesis. *Autoimmune Diseases*. [online] Available at: <https://www.hindawi.com/journals/ad/2012/189096/>

[Accessed 23 March. 2012].

9. Ascherio A., Munger K.L. (2010). Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. [online] Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11481-010-9201-3>

[Accessed 1 Sept. 2010].

10. Epstein M.A. (2005). The origins of EBV research: discovery and characterization of the virus. In Robertson ES (ed.). *Epstein–Barr Virus. Trowbridge: Cromwell Press*, p. 1–14.

11. Erle S. Robertson (2005). Epstein–Barr Virus. *Horizon Scientific Press*. p. 18.

12. Miller G. (21 December 2006). Book Review: Epstein–Barr Virus. *New England Journal of Medicine*, 355(25), 2708–2709.

13. Henle W., Henle G. (1980). Epidemiologic aspects of Epstein-Barr virus (EBV)-associated diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 354(5), 326-331.

14. Pannone G., Zamparese R., Pace M., Pedicillo M.C., Cagiano S., Somma P., et al. (2014). The role of EBV in the pathogenesis of Burkitt's Lymphoma: an Italian hospital based survey. *Infectious Agents and Cancer*, 9(1), 33-34.

15. Gandhi M.K., Tellam J.T., Khanna R. (2004). Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Haematology*, 125(3), 267-281.

16. Yau T.O., Tang C.M., Yu J. (2014). Epigenetic dysregulation in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: disease and treatments. *World Journal of Gastroenterology*. 20 (21), 6448–6456.

17. Dogan S., Hedberg M.L., Ferris R.L., Rath T.J., Assaad A.M., Chiosea S.I. (2014). Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma in a low-incidence population. *Head & Neck*. 36 (4): 511–516.

18. Mechelli R., Manzari C., Policano C., Annese A., Picardi E., Umeton R., et al. (2015). Epstein-Barr virus genetic variants are associated with multiple sclerosis. *Neurology*, 84 (13): 1362–1368
19. Tagliavini E., Rossi G., Valli R., Zanelli M., Cadioli A., Mengoli M.C., et al. (2013). Lymphomatoid granulomatosis: a practical review for pathologists dealing with this rare pulmonary lymphoproliferative process. *Pathologica*, 105 (4): 111–116.
20. Kyriakidis I., Vasileiou E., Karastrati S., Tragiannidis A., Gompakis N., Hatzistilianou M. (2016). Primary EBV infection and hypersensitivity to mosquito bites: a case report. *Virologica Sinica*, 31 (6), 517–520.
21. Shannon-Lowe C., Rickinson A.B., Bell A.I. (2017). Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences*, 372 (1732), 2016-271
22. Arora N., Gupta A., Sadeghi N. (2017). Primary effusion lymphoma: current concepts and management. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 23 (4), 365–370.
23. Woulfe J., Hoogendoorn H., Tarnopolsky M., Muñoz D.G. (2000). Monoclonal antibodies against Epstein-Barr virus cross-react with alpha-synuclein in human brain. *Neurology*, 55 (9), 1398–1401.
24. Amon, W., Farrell P. J. (2005). Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Reviews in medical virology*, 15(3), 149-156.
25. Green M., Reyes J., Webber S., Rowe D. (2016). The role of antiviral and immunoglobulin therapy in the prevention of Epstein-Barr virus infection and post-transplant lymphoproliferative disease following solid organ transplantation. *Transplant infectious disease*, 3(2), 97-103.
26. Epstein M.A., Achong B.G., Barr Y.M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*, 1 (7335), 702-703.
27. Young L.S. (2009). Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology. *Boston: Academic Press*, p. 532–533.

28. Arvey A., Tempera I., Tsai K., Chen H.S., Tikhmyanova N., Klichinsky M., et al. (2012). An atlas of the Epstein-Barr virus transcriptome and epigenome reveals host-virus regulatory interactions. *Cell Host & Microbe*, 12 (2), 233-245.
29. Hoshino Y., Katano H., Zou P., Hohman P., Marques A., Tying S.K., et al. (2009). Long-term administration of valacyclovir reduces the number of Epstein-Barr virus (EBV)-infected B cells but not the number of EBV DNA copies per B cell in healthy volunteers. *Journal of Virology*, 83 (22), 11857-11861.
30. De Paor M., O'Brien K., Smith S.M. (2016). Antiviral agents for infectious mononucleosis (glandular fever). *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12 (12), p. 11487
31. Барчук, А. А. (2018). АА Барчук. С. 324–333.
32. Nussinovitch M., Prais D., Volovitz B., Shapiro R., Amir J. (2003). Post-infectious acute cerebellar ataxia in children. *Clinical Pediatrics*, 42 (7), 581-584.
33. Toussiroit E., Roudier J. (2008). Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, 22 (5), 883–896.
34. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2012). *A review of human carcinogens*. International Agency for Research on Cancer.
35. Mohammad Malvandi A., Shahba S., Mohammadipour A., Rastegar-Moghaddam S., Abudayyak M. (2021). Cell and molecular toxicity of lanthanum nanoparticles: are there possible risks to humans? *Nanotoxicology*, 15(7), 951-972.
36. Casals E., Zeng M., Parra-Robert M., Fernández-Varo G., Morales-Ruiz M., Jiménez W., Puentes V., Casals G. (2020). Cerium Oxide Nanoparticles: Advances in Biodistribution, Toxicity, and Preclinical Exploration. *Small*, 16(20), 1-20.
37. Asgharzadeh F., Hashemzadeh A., Rahmani F., Yaghoubi A., Nazari S., Avan A., Mehr S., Soleimanpour S., Khazaei M. (2021). Cerium oxide

nanoparticles acts as a novel therapeutic agent for ulcerative colitis through anti-oxidative mechanism. *Life Sciences*, 278(119500), 1-8.

38. Wan, C., Tai, J., Zhang, J., Guo, Y., Zhu, Q., Ling, D., Gu F., Gan J., Zhu C., Wang Y. , Liu S., Wei F., Cai Q. (2019). Silver nanoparticles selectively induce human oncogenic γ -herpesvirus-related cancer cell death through reactivating viral lytic replication. *Cell Death & Disease*, 10(6), 1-15.

39. Amy L. Linsebigler, Guangquan Lu, and John T. Yates Jr. (1995). Photocatalysis on TiO₂ Surfaces: Principles, Mechanisms, and Selected Results. *Surface Science Center, Department of Chemistry, University of Pittsburgh*, 95(3), 735–758.

40. Amy L. Linsebigler, Guangquan Lu, and John T., Yates Jr. (1996). Photocatalysis on TiO₂ Surfaces: Principles, Mechanisms, and Selected Results. *Surface Science Center, Department of Chemistry, University of Pittsburgh*, 95(3), 735–758.

41. Hassani A., Corboy Jr., Al-Salam S., Khan G. (2018). Epstein-Barr virus is present in the brain of most cases of multiple sclerosis and may engage more than just B cells. *PLOS ONE*, 13 (2), p. e0192109

42. Arvey A., Tempera I., Tsai K., Chen H. S., Tikhmyanova N., Klichinsky M., Lieberman P. M. (2012). An atlas of the Epstein-Barr virus transcriptome and epigenome reveals host-virus regulatory interactions. *Cell host & microbe*, 12(2), 233-245.

43. Busch M. P., Glynn S. A., Stramer S. L., Strong D. M., Caglioti S., Wright D. J., NHLBI-REDS NAT Study Group. (2005). A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion*, 45(2), 254-264.

44. Паньківська Ю.Б., Білявська Л.О., Повниця О.Ю., Загорний М.М., Рагуля А.В., Харчук М.С., Загородня С.Д. (2019). Антиаденовірусна активність наночастинок діоксиду титану. *Мікробіологічний журнал*, Т. 81(5), 73-81.

45. Білявська Л. О., Повниця О. Ю., Нестерова Н.В., Загородня С.Д., Бобко Т.М., Головань А.В., Войчук С.І. (2014). Вивчення репродукції аденовірусів у різних лініях лімфобластоїдних клітин. *Мікробіологічний журнал*, Т. 76(6), 34-39.
46. Головань А.В., Науменко К.С., Мучник Ф.В., Баранова Г.В., Зелена Л.Б., Загородня С.Д. (2020). Антивірусна активність екстрактів з диких трав проти вірусу Епштейна-Барр та індукція апоптозу у вірус Епштейна-Барр-позитивних лімфобластоїдних клітинах. *Мікробіологічний журнал*, Т. 82(4), 71-79.
47. Загородня С. Д., Баранова Г. В., Нестерова Н.В. (2015). Вплив доксорубіцину і етопозиду на процес СД 95-опосередкованого апоптозу у ВЕБ-інфікованих лімфомних клітинах BL-41 і DG-75. *Мікробіологічний журнал*, Т. 77(4), 69-74.
48. Khan G., Fitzmaurice C., Naghavi M., Ahmed L.A. (2020). Global and regional incidence, mortality and disability-adjusted life-years for Epstein-Barr virus-attributable malignancies, 1990-2017. *BMJ Open*, 10 (8), p. e037505.
49. Centers for Disease Control and Prevention. (2020). Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis. *MMWR. National Center for Immunization and Respiratory Diseases*, (RR-19), 1.
50. Ченцов Ю.С. (2010). Цитология с элементами целлюлярной патологии: Учебное пособие для университетов и медицинских вузов. Москва, *МИА*, 361 с.
51. Альбертс Б., Джонсон А., Льюис А. (2013). Молекулярная биология клетки: в 3-х томах, НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», *Институт компьютерных исследований*, II, с. 1196-1208.
52. Корнієнко І. М. (2017). Конспект лекцій з дисципліни «Біотехнологія рослинних і тваринних клітин». *Міністерство освіти і науки України Дніпровський державний технічний університет*, с. 14-96.

53. Паньківська Ю.Б., Білявська Л.О., Повниця О.Ю., Загородня С.Д. (2016). Вивчення антиаденовірусної дії фторвмісних сполук нуклеозидної та нуклеозидної природи. *Мікробіологічний журнал*, Т. 4(36), 60-66.

54. Najafi M., Hashemi Goradel N., Farhood B. (2018). Tumor microenvironment: interactions and therapy. *J Cell Physiol*, 6, с. 17.

55. Bartsch K., Knittler K., Borowski C. (2017). Absence of RNase H2 triggers generation of immunogenic micronuclei removed by autophagy. *Hum Mol Genet*, 26, с. 60–72.