

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри д. б. н., проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол №_____ засідання кафедри

від “_____” _____ 2023 р.

**ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИВІРУСНОГО
ПОТЕНЦІАЛУ СРІБЛОВМІСНИХ
НАНОКОМПОЗИТІВ**

Кваліфікаційна робота магістра

денної форми навчання

за спеціальністю 091 «Біологія»

Коновал Владислави Миколаївни

Науковий керівник від кафедри

старший науковий співробітник,

доцент, к. б. н. Шевченко О. В.

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

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

AgNP	–	наночастинки срібла
FCV	–	котячий каліцівірус
HA	–	гемаглютинін
HEF	–	білок гемаглютинін-естеразного злиття
IFN- α	–	інтерферон- α
KSHV	–	вірус герпесу, асоційований з саркомою Капоші
M	–	матриксний білок
M2	–	білок протонного каналу
MNV	–	мишачий норовірус
MPV	–	вірус віспи мавп
NA	–	нейрамінідаза
NP	–	нуклеопротеїн
NS2	–	ядерний експортний білок
PEDV	–	вірус епідемічної діареї свиней
PRRSV	–	вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ ГРИПУ ТА НАНОКОМПОЗИТІВ ІЗ СРІБЛОМ, ЦЕРІЄМ ТА ЛАНТАНОМ ЯК ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ	7
1.1. Характеристика вірусу грипу	7
1.1.1. Будова вірусу грипу	7
1.1.2. Життєвий цикл вірусу грипу	11
1.1.3. Протигрипозні препарати	12
1.2. Характеристика срібловмісних наноконпозитів	16
1.2.1. Будова срібловмісних наноконпозитів	16
1.2.2. Цитотоксичні властивості срібловмісних наноконпозитів..	21
1.2.3. Протівірусні властивості срібловмісних наноконпозитів ..	22
1.2.4. Віруліцидна дія срібловмісних наночастинок	26
1.3. Характеристика наночасток церію.....	27
1.3.1. Властивості наночасток церію	27
1.3.2. Токсичні ефекти наночастинок церію.....	28
1.4. Характеристика наночасток лантану	30
1.4.1. Загальні властивості та токсичність наночасток лантану	30
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	31
2.1. Культивування клітин та їх підготовка до експериментів	31
2.2. Методика підрахунку кількості клітин у камері Горяєва.....	32
2.3. Вірусні препарати та їх підготовка до досліджень	33

2.4. Досліджувані наноструктури.....	33
2.5. Дослідження цитотоксичної дії наноструктур	34
2.6. Дослідження антивірусної дії оксидів металів	35
2.7. Визначення інфекційного титру ізолятів вірусу грипу, отриманих <i>de novo</i> , після обробки срібловмісними нанокompозитами	36
2.8. Дослідження віруліцидної дії нанокompозитів з оксидами церію та лантану на вірус грипу	37
2.9. Статистична обробка даних.....	38
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	39
3.1. Оцінка цитотоксичності срібловмісних нанокompозитів	39
3.2. Оцінка антивірусної дії срібловмісних нанокompозитів проти вірусу грипу.	42
3.3. Оцінка інфекційного титру ізолятів вірусу грипу, отриманих <i>de novo</i> після обробки срібловмісними наночастинками	45
3.4. Оцінка віруліцидної дії нанокompозитів на основі оксидів лантану і церію з додаванням срібла відносно вірусу грипу	48
ВИСНОВКИ	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	54

ВСТУП

Вірусні інфекції широко розповсюджені серед людей, вони можуть призводити до гострих та хронічних захворювань і навіть стати причиною смерті. За своєю природою віруси — це нанорозмірні частинки, які здатні викликати інфекції [1]. Ефективних противірусних засобів наразі не так багато, проте і вони можуть призводити до побічних реакцій, або взагалі бути токсичними для здорових нормальних клітин або негативно впливати на важливі метаболічні бактерії. Через це перед вченими постійно постає завдання пошуку нових дієвих засобів проти вірусів. Одними із потенційно перспективних противірусних препаратів є наночастки срібла (AgNP) та срібловмісні нанокompозити, оскільки в численних дослідженнях вони продемонстрували ефективні противірусні властивості проти особливо небезпечних вірусів, зокрема вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) [2, 3].

Створенням наносполук та дослідженням їх хімічних властивостей займаються спеціалісти в галузі нанонауки або нанотехнологій. Синтез наночастинок проводиться шляхом об'єднання групи атомів або молекул різних матеріалів, розмір яких складає 10^{-9} м [4, 5]. Серед наночастинок виділяють декілька типів сполук: чистий метал, оксиди металу та полімери на основі вуглецю [6-8]. Металеві наночастинки широко досліджуються вченими для пошуку способів використання їх в наномедицині, текстилі, електроніці та сенсорах [9, 10]. Найпоширенішими наночастками металів є нанорозмірні частинки золота та срібла, які застосовуються в різноманітних галузях, зокрема в біомедицині [11, 12]. Срібловмісні наночастинки відрізняються досить різними унікальними властивостями залежно від їх морфології, розміру та поверхневого заряду [13], що безпосередньо впливає на їх біологічне використання. AgNP використовуються в біомедичних цілях, таких як лікування захворювань, доставка ліків, біосенсори, біовізуалізація і в

нутрицевці [14]. Наночастинки срібла відомі своєю підвищеною антимікробною активністю проти вірусів, грибів, бактерій та водоростів [15]. Проте у AgNP є обмеження, які звужують спектр їх використання через швидке окислення та високу залежність стабільності наночастинок від поверхневого заряду суспензуючого середовища [16]. Тому наночастинки срібла були включені в нанокompозити для підвищення їх стабільності [17] та запобіганню швидкому окисленню. Слід зазначити, що властивості AgNP переважно залежать від способу синтезу, що визначає морфологію, розмір, поверхневий заряд та біосумісність наночастинок для бажаного використання [18].

Метою роботи було визначення противірусного потенціалу срібловмісних нанокompозитів проти вірусу грипу А, (H1N1) штаму А/ФМ/1/47.

Завдання даної роботи:

1. Встановити показники цитотоксичності срібловмісних нанокompозитів на життєздатність популяції клітин MDCK.
2. Дослідити срібловмісні нанокompозити на наявність протигрипозної активності.
3. Встановити значення інфекційного титру *de novo* вірусу грипу після обробки срібловмісними нанокompозитами.
4. Визначити віруліцидну дію срібловмісних нанокompозитів відносно вірусу грипу.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ ГРИПУ ТА НАНОКОМПОЗИТИВ ІЗ СРІБЛОМ, ЦЕРІЄМ ТА ЛАНТАНОМ ЯК ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТИВ

1.1. Характеристика вірусу грипу

1.1.1. Будова вірусу грипу

Вірус грипу відноситься до родини *Orthomyxoviridae*. Зараження вірусом грипу викликає захворювання у людей із такими симптомами, як висока температура, кашель, біль у тілі та нежить. Слово «грип» походить з італійської мови, що означає «вплив». Оскільки захворювання, викликане вірусом грипу, частіше зустрічається в зимовий період, в стародавньому світі вважалося, що воно спричинене впливом астрологічних рухів. Віріон грипу містить оболонку з ліпідної мембрани, яка є похідною від плазматичної мембрани інфікованої клітини-хазяїна, місця збірки вірусу грипу (рис. 1.1.).

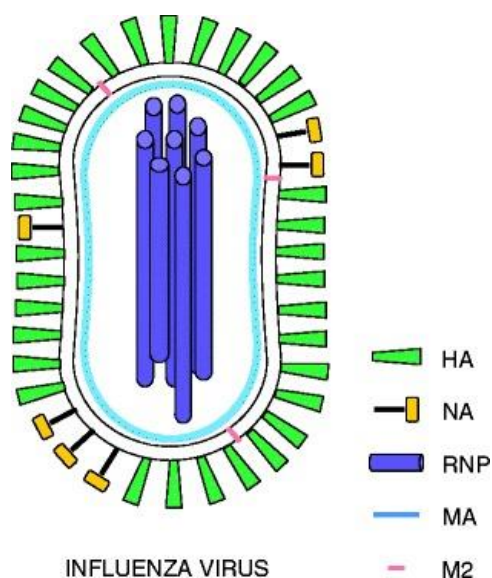


Рис. 1.1. Будова вірусу грипу: HA – гемаглютинін; NA – нейрамінідаза; RNP – нуклеопротеїн; MA – матриксний білок; M2 - білок протонного каналу

Мембранна оболонка утворює бар'єр, всередині якого знаходяться вірусні компоненти, захищені від навколишнього середовища, коли частинка вірусу знаходиться в циркуляції. Безпосередньо під оболонкою мембрани є шар матриксу, утворений матриксним білком. Шар матричного білка охоплює вірусний геном, який складається з восьми сегментів одноланцюгової РНК, обгорнутої нуклеопротеїном. Ці вісім сегментів геному кодують десять вірусних білків, включаючи три субодиниці, PA, PB1 і PB2, специфічної для вірусу РНК-полімерази, два поверхневі глікопротеїни, гемаглютинин (HA) і нейрамінідазу (NA), нуклеопротеїн (NP), матриксний білок (M), білок протонного каналу (M2), який транслюється зі сплайсованої мРНК, і два неструктурні білки NS1 і NS2, які є продуктами двох альтернативно сплайсованих восьми вірусних мРНК. NS2 також відомий як ядерний експортний білок [20]. Результатом проникнення вірусу грипу в клітину-хазяїна є вивільнення восьми сегментів вірусного геному в ядро для ініціації транскрипції та реплікації вірусу.

Весь процес проникнення вірусу можна розділити на кілька етапів. По-перше, частинка вірусу грипу повинна розпізнати специфічну молекулу рецептора на поверхні клітини-мішені, щоб дозволити частинці вірусу отримати доступ до конкретної клітини-хазяїна, в якій вірус грипу може реплікуватися. Рецепторною молекулою вірусу грипу є кінцева α -сіалова кислота, яка за допомогою різних механізмів пов'язана з сахаридами, закріпленими на поверхні клітини-хазяїна. На другому етапі тісна асоціація частинки вірусу грипу з клітиною-хазяїном викликає ендоцитоз, який створює ендосому для інкапсуляції частинки вірусу, що входить. Потім ендосома переміщується на наступному етапі в ділянку поблизу ядра. Четвертий крок — злиття вірусної мембрани з мембраною хазяїна, яка утворює ендосому, що опосередковується глікопротеїном HA, вбудованим у поверхню вірусу. Цей етап злиття мембран вивільняє всі вісім сегментів геному РНК в ядро, де

відбувається ініціація транскрипції вірусних генів і подальша вірусна реплікація.

Ключовим гравцем у проникненні вірусу є поверхневий глікопротеїн НА, який містить сайт зв'язування рецептора хазяїна, щоб дозволити частинці вірусу прикріпитися до певних клітин-хазяїв, пептид злиття, який вставляється в специфічний сайт зв'язування під час злиття мембрани, та інші структурні елементи, які може знову згортатися під час процесу злиття мембран. Оскільки НА є поверхневим глікопротеїном на частинці вірусу, його легко розпізнають антитіла хазяїна, коли вірус грипу інфікує хазяїна. Однак вірус грипу цілком здатний уникнути захисної системи господаря за допомогою унікальних механізмів. Під час циклу реплікації вірус-специфічна РНК-полімераза з високою частотою допускає помилки в синтезі вірусних РНК. Помилки під час реплікації створюють велику кількість варіантів глікопротеїну НА. Деякі з них дозволяють вірусу грипу стати стійким до нейтралізації наявними антитілами господаря. За допомогою цього механізму відбору створюється новий вірус грипу, який може уникнути імунної системи хазяїна і може легко реплікуватися в інфікованих клітинах хазяїна. Новий варіант вірусу грипу може поширюватися на інших хазяїв, якщо вони раніше не були заражені цим варіантом ні через вакцинацію, ні через природну інфекцію. Це є основною причиною того, що вірус грипу повертається з року в рік, оскільки з кожним сезоном нові штами вірусу грипу стають циркулюючими варіантами, до яких людська популяція не набула достатнього імунітету. Ті самі варіації відбуваються за тим же механізмом у глікопротеїну НА, іншого поверхневого глікопротеїну у вірусу грипу. Такі зміни в глікопротеїнах НА і NA називають «антигенним дрейфом» [21]. Під час антигенних дрейфів амінокислотні послідовності замінюються в областях, які піддаються розпізнаванню антитіл, і в той же час амінокислотні заміни обмежені в місцях, які необхідні для зв'язування рецепторів, підтримки функції злиття пептиду та належних структурних змін для опосередковує злиття мембран. Коли амінокислотні

заміни НА накопичуються в репертуарі штамів вірусу грипу, вони в основному знаходяться на відкритій поверхні глікопротеїну НА, за винятком сайту зв'язування рецептора, злитого пептиду та амінокислот, які вміщують злитий пептид до структурної НА-зміни для злиття мембран [22]. Крім антигенних дрейфів, іноді спостерігається різка зміна антигенності НА вірусу грипу А. Глікопротеїн НА вірусу грипу А був класифікований на 20 підтипів (Н1–Н20) на основі тесту на пригнічення гемаглютинації [23]. Підтипи Н3 і Н1 останніми роками циркулюють у всьому світі. Однак у певному році може статися раптова зміна підтипу НА, що називається «антигенним зсувом». Цей тип змін є результатом заміни одного сегмента гена циркулюючого вірусу грипу іншим сегментом гена, процес, який називається перегрупуванням. У вірусу грипу може відбутися ресортація, оскільки його геном, присутній у віріоні, сегментований. Глікопротеїн НА повинен бути сумісним з іншими сегментами нового вірусу грипу, отриманого з реасортименту. Якщо два штами вірусу грипу з абсолютно різними сегментованими геномами коінфікують спільного господаря, новий вірус грипу може з'явитися шляхом перегрупування набору сегментів геному з двох джерел. Антигенний зсув зазвичай призводить до глобальної пандемії грипу, наприклад, пандемії грипу 1918 року, яка стала результатом впровадження нового вірусу пташиного грипу H1N1 в популяції людей [24]. Вірус грипу поділяється на три типи: вірус грипу А, вірус грипу В і вірус грипу С. Для проникнення вірусу гемаглютинін, основний глікопротеїн на поверхні віріону грипу, відіграє кілька ролей на кожному етапі шляху проникнення вірусу. Для вірусу грипу А НА класифікується на 20 підтипів (Н1–Н20). Віруси грипу В і С мають лише один підтип, і ці два віруси циркулюють лише у людей.

1.1.2. Життєвий цикл вірусу грипу

Після того, як вірус прикріплюється до поверхні клітини-господаря через зв'язування з сіаловою кислотою за допомогою НА, починається процес імпорту вхідної вірусної частинки в місце всередині клітини. На частинках вірусу грипу міститься велика кількість молекул НА, які можуть знадобитися для адекватного зв'язування з поверхнею клітини, щоб запустити процес інтерналізації. На клітинній плазматичній мембрані вірус грипу поглинається ендоцитозом [25]. Вірусна частинка швидко проникає всередину клітини, покрита везикулами (ендосомами). Інтерналізовані частинки вірусу транспортуються всередині ендосом до місць поблизу ядра [26]. Злиття вірусних мембран з ендосомами викликається підкисленням пізніх ендосом. Результатом злиття є вивільнення вірусного РНК-залежного РНК-полімеразо-асоційованого нуклеокапсиду (RNP) у ядро, де ініціюється вірусна транскрипція.

Відщеплення частинок вірусу грипу від місця зв'язування поверхні клітини-хазяїна опосередковується дією вірусної НА. НА має ферментативну активність для сприяння розповсюдженню вірусу грипу в секретах слизової оболонки дихальних шляхів [27]. Важливо, що ферментативна активність НА видаляє сіалову кислоту з вірусів і клітинних глікопротеїнів, щоб полегшити вивільнення потомства частинок вірусу з клітин, а потім інфікувати інші клітини. Оскільки НА і NA відповідають за зв'язування з рецепторами клітини-хазяїна і вивільнення з них, вони мають вирішальне значення у визначенні специфічності господаря. Вірулентність вірусу грипу значною мірою залежить від координації НА та NA. Було помічено, що баланс НА/NA є одним із ключових факторів у передачі штамів, стійких до інгібіторів НА, у популяції людини [28]. На відміну від багатьох інших РНК-вірусів, реплікація і транскрипція вірусів грипу здійснюються в ядрі клітини-хазяїна. Усередині

частинок вірусу грипу NP зв'язується з сегментом гена вірусної РНК, а комплекс вірусної РНК-полімерази зв'язується з кінцем вірусної РНК, і вони разом утворюють vRNP, що містить комплекс РНК-білок [29]. vRNP вірусу грипу є основною одиницею реплікації вірусу грипу, що складається з РНК вірусу та чотирьох видів вірусних білків, включаючи NP, PB1, PB2 та PA. PB1, PB2 і PA разом утворюють комплекс РНК-полімерази, який бере важливу участь у реплікації генома та експресії вірусу грипу [30]. Крім того, патогенність вірусу грипу пов'язана з імунітетом господаря. Інфекція грипу викликає вроджену імунну відповідь господаря, що може призвести до припинення життєвого циклу вірусу. З іншого боку, вірус грипу розробив кілька стратегій, щоб обійти вроджений імунітет хазяїна для успішного інфікування та розмноження.

Початковою вродженою імунною відповіддю на вірусну інфекцію є вивільнення цитокінів, індукованих імунними сигнальними шляхами. Молекулярні структури, пов'язані з вірусними патогенами, такі як РНК вірусу грипу, розпізнаються як чужорідні за допомогою toll-подібних рецепторів, рецепторів, подібних гену I (RIG-I), і (NOD)-подібному рецептору, який запускає експресію інтерферонів I та III типу, прозапальних цитокінів та хемокінів [31]. Крім того, імунна система хазяїна може залучати альвеолярні макрофаги, моноцити та природні клітини-кілери.

1.1.3. Протигрипозні препарати

Нині популярними противірусними препаратами для терапевтичного лікування вірусної інфекції грипу є інгібітори NA [32]. Неминуче, що через певний період часу виникнуть варіанти лікарської стійкості, деякі з яких

можуть мати мутації в НА. Ключовою функцією НА є видалення фрагментів сіалової кислоти з олігосахаридів, приєднаних до НА, на недавно зібраних частинках вірусу грипу, коли вони виростають із інфікованих клітин. Якщо активність НА відсутня, частинки вірусу нащадків утворюють агрегати на поверхні клітини, оскільки сіалірована НА зв'язується один з одним між двома частинками вірусу грипу та з поверхнею клітини [33]. Агрегація запобігає вивільненню вірусу, що є механізмом, який використовується інгібіторами НА для припинення зараження вірусом грипу. Коли вірус грипу був перенесений у культуру клітин у присутності інгібіторів НА, мутації в НА були виявлені в деяких стійких до ліків мутантів, на додаток до стійких до ліків мутантів, які мали мутації в НА [34]. Очевидно, що вірус грипу може реплікуватися в присутності інгібіторів НА, якщо властивості НА зв'язувати сіалову кислоту були змінені. У клінічних ізолятах не повідомлялося про стійкі до інгібіторів НА мутанти з мутаціями в НА, але потенціал все ще існує.

Оскільки проникнення вірусу грипу є важливим етапом його циклу реплікації, інгібітори, які блокують цей етап, можуть бути ефективними противірусними препаратами. Інгібітор проникнення ВІЛ, Енфувіртид, є препаратом, який в даний час використовується для лікування ВІЛ-інфекції [35]. У світлі появи мутантних вірусів, стійких до сучасних препаратів, таких як інгібітори НА, потреба в нових противірусних препаратах очевидна для лікування інфекції вірусу грипу, особливо як комбінована терапія. Зусилля щодо розробки ефективних інгібіторів проникнення вірусу грипу вже були спроби кількох груп. Одне з ранніх повідомлень стосується триперидену, який, як було показано, пригнічує реплікацію вірусу грипу в концентрації 20 мкг/мл [36]. Пізніше було показано, що ця сполука інгібує гемоліз еритроцитів і чутливість НА1 до трипсину після обробки НА з низьким рН [37]. Реасортимент чутливого до препарату штаму зі штамом, який не був чутливим, підтвердив, що геном, чутливим до триперидену, був НА. Мутації, стійкі до триперидену, також були відображені на НА. Було показано, що

інгібування реплікації вірусу грипу трипериденом може бути пов'язано з його здатністю знижувати внутрішній рН у прелізосомному компартменті [38]. Пізнішими зусиллями група фармацевтичного науково-дослідного інституту BMS виявила новий інгібітор НА (BMY-27709), який має EC50 6–8 мкМ проти вірусів грипу, які мають підтипи НА Н1 і Н2, але не Н3. Було показано, що сполука пригнічує реплікацію вірусу на ранній стадії, і інгібування було оборотним. Ці дані свідчать про те, що мішенню інгібітора є НА. Це було додатково підтверджено мутаціями, стійкими до інгібіторів, знайденими в НА, і інгібуванням гемолізу сполукою. Група вчених виявила новий інгібітор, похідне подокарпінової кислоти, шляхом скринінгу хімічної бібліотеки. За допомогою скринінгу також був виявлений інший інгібітор, стахіфлін [39]. НА як мішень для стахіфліну також було підтверджено часом додавання, пригніченням гемолізу та перегрупуванням між підтипами Н1 та Н3.

Мутації, виявлені в процесі перевірки механізму дії інгібіторів злиття НА, можуть дати уявлення про те, як можна пригнічувати злиття НА. Мутації можуть відбуватися в молекулах НА1 і НА2, але більшість з них знаходиться в НА2. Загалом їх можна поділити на дві групи. Перша група включає мутації, які дестабілізують НА, тому конформаційна зміна НА2 все ще може відбуватися навіть у присутності інгібітора. Ці мутації в основному були виявлені в НА2 і зустрічалися частіше, як і в резистентних до BMS-27709, 180299 і S19 мутантів. Мутації знижують або стабілізують взаємодію із злитим пептидом, або інтерфейси, які стабілізують асоціацію тримерів НА. Таким чином, мутантні НА є більш фузогенними при рН, вищому, ніж необхідний для злиття НА дикого типу. Такі мутації в НА були також ідентифіковані у мутантних вірусів, які стійкі до високих концентрацій амантадину, противірусної сполуки, яка підвищує внутрішньоклітинний рН. Стабілізація за допомогою цих інгібіторів робить конформаційну зміну НА більш енергетично несприятливою, тому ймовірність злиття зменшується, що призводить до зменшення реплікації вірусу. Друга група мутацій була

ідентифікована шляхом відбору резистентних мутантів до С22, який є ефектором конформаційної зміни НА, замість інгібітора [40]. Як і очікувалося, мутантні НА мають зсув рН злиття вниз, і стійкі до інгібіторів віруси першої групи насправді більш чутливі до С22. Результати підтверджують думку, що інгібітори проникнення можуть ефективно пригнічувати реплікацію вірусу грипу. Завданням для розробки противірусного препарату, який можна було б використовувати клінічно, є виявлення інгібіторів проникнення, які мають високу дію проти всіх штамів вірусу грипу людини. Оскільки збереження амінокислотної послідовності серед НА вірусу грипу низьке, чіткої картини щодо того, як виявити зазвичай ефективний інгібітор проникнення, ще не з'явилося. Оскільки НА-опосередковане злиття мембрани є загальним механізмом проникнення вірусу грипу, існує потенціал для виявлення інгібітора, який блокує проникнення вірусу грипу через загальний механізм, якщо не загальний сайт зв'язування інгібітора в НА як такий.

Наприкінці 2000 року інгібітор нейрамідіази озельтамівір був схвалений Управлінням з контролю за продуктами і ліками (FDA) для противірусного лікування неускладненого грипу протягом 2 днів від початку захворювання у дітей віком ≥ 1 року в Сполучених Штатах. Наприкінці 2012 року FDA схвалило озельтамівір для лікування грипу протягом 2 днів від початку захворювання у дітей віком ≥ 14 днів. Озельтамівір доступний у вигляді ліків озельтамівіру фосфату і перетворюється в печінці в активний метаболіт озельтамівіру карбоксилат. Механізм дії озельтамівіру карбоксилату та інших інгібіторів нейромідіази полягає в тому, щоб перешкоджати вивільненню вірусних частинок грипу з інфікованих клітин-хазяїв шляхом зв'язування з нейрамідіазою вірусу грипу, що призводить до зниження поширення вірусів грипу в дихальних шляхах [41].

Фавіпіравір є заміщеним похідним піразину, який пригнічує реплікацію багатьох РНК-вірусів, включаючи віруси грипу А, В і С. Він був схвалений в

Японії в 2014 році з показаннями, які обмежуються лікуванням нових або знову виникаючих вірусних інфекцій грипу.

Піמודівір – це новий інгібітор аналога циклогексилкарбонової кислоти субодиноці РВ2-кеп-зв'язування вірусів грипу А, який перейшов до фази 3 тестування у госпіталізованих пацієнтів та амбулаторних пацієнтів високого ризику з інфекцією вірусу грипу А [42].

Амантадин діє шляхом блокування важливої функції підкислення вірусного каналу М2. Амантадин та ремантадин мають профілактичну та терапевтичну активність при інфікуванні людини вірусами грипу А Н1N1, Н2N2 та Н3N2. Профілактична активність приблизно на 80–90% подібна до інгібіторів нейрамінідази, як і терапевтична активність, яка зменшує хворобу приблизно на 1,5 дні, якщо препарат застосовувати протягом 36–48 год. появи симптомів [43].

Проте, РНК-віруси постійно мутують та набувають резистентності до більшості препаратів, тому важливо постійно відшукувати альтернативні методи боротьби із грипозною інфекцією.

1.2. Характеристика срібловмісних нанокompозитів

1.2.1. Будова срібловмісних нанокompозитів

Срібло — благородний метал з 11 групи періодичної системи елементів. Крім того, срібло переважно існує у ступені окислення + 1, яке стабільне у водному розчині $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{O})_2]^+$. Властивості наночастинок срібла відрізняються в межах нанометрового масштабу, як розміром частинок, так і

їх характеристиками, що визначають обсяг властивостей наноматеріалу. Найбільш прийнята класифікація наноструктур срібла заснована на розмірах. Вплив розміру наночастинок є одним з найбільш вивчених параметрів для біомедичних застосувань. Наприклад, посилені антимікробні властивості AgNP, порівняно з об'ємними іонами срібла та срібла, можуть бути пов'язані з нанорозміром частинок [44]. В принципі, невеликі за розміром AgNPs (як правило, менше 100 нм) демонструють високу біоцидну активність через більшу площу поверхні, порівняно з їх об'ємними аналогами (частинки мікророзміру). Окрім розміру, на антимікробну активність впливають такі параметри, як кристалографічні структури та форми наноструктур срібла. Далі мікробний ріст, що викликає інфекційні захворювання, можна знищити шляхом знезараження біоаерозолями та води з використанням антимікробних засобів. Варто відзначити, що AgNP можна включати в тканини для виробництва антимікробного текстилю для клінік. Крім того, за допомогою досліджень *in vitro* та *in vivo* було продемонстровано, що AgNP суттєво впливають на загоєння ран завдяки своїм протизапальним властивостям [45]. Крім того, властивий цільовий потенціал інгібування мікробних клітин AgNP використовується для приготування посилених антибактеріальних, протигрибкових та противірусних засобів. Крім того, AgNP також мають протипухлинну, антиангіогенну та антипроліферативну дію залежно від їх розміру та форми.

Нанокompозити срібла утворюються шляхом вбудовування нанорозмірних частинок срібла з іншими наноматеріалами або матрицями для дослідження синергічних функцій. Загалом, нанокompозити можуть містити одну або кілька матриць, таких як смола/полімер, неорганічні наночастинки, вуглець, полісахарид, діоксид кремнію та хітозан. Властивості нанокompозитів срібла зазвичай залежать від стабілізуючої матриці, яка використовується для диспергування AgNP [46].

AgNP можна синтезувати за допомогою фізичних, хімічних та біологічних підходів.

Фізичний метод являє собою використання механічної або інших форм енергії, ніж хімічні, для виготовлення AgNP. Кульове подрібнення є найпоширенішим механічним фізичним методом, коли макроскопічні попередники подрібнюються кульками в млині з високою енергією для отримання нанорозмірних частинок. Цей підхід дуже вигідний, виходить дуже тонкий порошок з розміром частинок менше 100 нм, який використовується для безперервного процесу та утворює високоабразивні матеріали. Однак забруднення продукту через зношування кульок, вимога тривалого часу подрібнення, високий рівень шуму машини та виснажливе машинне очищення є деякими з обмежень методу у синтезі наночастинок срібла [47]. Лазерна абляція — це ще один метод виготовлення наночастинок шляхом видалення матеріалів із твердої поверхні за допомогою сфокусованого імпульсного лазерного променя [48]. Цей метод використовується для синтезу AgNP з мінімальною теплопередачею та низькою вартістю без токсичності для навколишнього середовища. Проте вихід низької концентрації наночастинок срібла в розчині та використання високоенергетичних лазерів є основними обмеженнями цього методу, що з часом підвищить вартість синтезу та вплине на антимікробну активність нанорозмірного срібла. Підхід до електропрядіння є поширеним методом виготовлення AgNP, вбудованих у волокна на основі полімерів, за допомогою електричної сили шляхом витягування заряджених полімерних ниток або полімерних розплавів [49]. Перевагами цього методу є простота та ефективність процедури, низька вартість, а також можливість контролювати такі фактори, як розмір AgNP, орієнтація волокна, діаметр та склад. Проте використання токсичних органічних розчинників та обмежений контроль за структурою пор є обмеженням цього підходу при виготовленні AgNP. Також для виробництва наночастинок срібла застосовуються змішування розплаву, конденсація інертного газу, розпилення, діелектричний

бар'єрний розряд та фізичне осадження з пари. Однак, складність методів робить ці підходи придатними для виготовлення нанокompatитів на основі срібла, а не для чистих нанорозмірних частинок срібла.

Методи хімічного синтезу є найпоширенішим і широко використовуваним підходом до виготовлення. Ці методи включають золь-гель, преципітацію, поліол, гідротермальний та інші нові підходи до синтезу AgNP. Золь-гель — це один з унікальних вологих хімічних процесів, що використовуються для виготовлення наночастинок срібла, який включає гідроліз, поліконденсацію, гелеутворення, старіння, сушіння, ущільнення та кристалізацію. Основними перевагами золь-гель підходу в синтезі наночастинок срібла є використання відносно низької температури, вихід тонких нанопорошків та отримання AgNP з недосяжними композиціями шляхом твердотілого синтезу. Проте висока вартість прекурсорів та усадка вологого гелю при висиханні, що може призвести до пошкодження або агломерації наночастинок, є обмеженням використання золь-гель підходу для виробництва наночастинок срібла у великих масштабах [50]. Поліол є ще одним хімічним методом, який використовується для отримання AgNP, в якому попередники металу суспендують у розчиннику гліколю з наступним нагріванням суміші до кипіння. Перевагами цього підходу є хелатоутворююча здатність поліолу контролювати утворення, ріст і агломерацію наночастинок, а також знижена здатність при високій температурі, що в кінцевому підсумку зменшує розчин прекурсора срібла до утворення нанорозмірного срібла. Проте обмежена потужність зниження та недостатня стабілізація неполярних металевих поверхонь за допомогою полярного поліолу є обмеженнями цього методу. Гідротермальний або сольвотермальний підхід є іншим широко використовуваним методом виготовлення наночастинок срібла, в якому високий рівень тиску пари та високотемпературний водний розчин буде використовуватися для формування нанорозмірних кристалів [51].

Для виробництва AgNP були запроваджені біологічні (відновники та стабілізатори рослинного або мікробного походження) підходи, оскільки фізичні та хімічні підходи вимагали дорогого обладнання, високих затрат енергії та токсичних хімікатів. У той час як синтез на основі рослинних і мікробних екстрактів підпадає під зелений синтез. Для біологічного синтезу біохімічні речовини вилучаються з живих організмів, таких як бактерії, гриби, водорості та рослини, і використовуються для зменшення та стабілізації агентів для утворення нанорозмірних частинок за допомогою підходів «знизу вгору». У більшості методів біогенного синтезу тепло використовується для ініціювання зародження наночастинок. Однак ультразвук і світло в даний час використовуються як ініціатори біогенних реакцій, оскільки пряме тепло може денатурувати біомолекули, що представляють інтерес у реакції [52]. AgNP, синтезовані з біомолекул, виділених з мікробів, або підходи до внутрішньоклітинного синтезу, є поширеними біогенними методами, які все ще перебувають у стадії широких досліджень. Можна відзначити, що більшість AgNP, синтезованих за допомогою фізико-хімічних методів, ідентифіковано як токсичні або спричиняють несприятливий вплив на навколишнє середовище та впливають на врожай. Основною перевагою використання мікробних екстрактів є зниження токсичності підготовлених наночастинок і здатність використовувати менше енергії в порівнянні з фізичними та хімічними підходами. Проте великими обмеженнями цього методу є масштабний синтез, залежність швидкості мікробного ділення, забруднення культурального середовища та агрегація наночастинок. Усі біогенні підходи до виготовлення AgNP зазвичай використовують тепло як джерело передачі енергії для модифікації вилучених біомолекул і використання їх як потенційного відновника та стабілізуючого агента для швидкого утворення нанорозмірних частинок. Незважаючи на звичайний біогенний підхід на основі тепла, який дає менші нетоксичні наночастинки, енергія, необхідна протягом усього процесу, є високою, що обмежує вимоги

зеленого синтезу. Крім того, вихід AgNP з цих альтернативних методів менший із низькою стабільністю, ніж метод хімічного синтезу, що є основним обмеженням цього підходу для великомасштабного використання [53].

1.2.2. Цитотоксичні властивості срібловмісних нанокompозитів

Токсичність наночастинок срібла безпосередньо пов'язана з вільними іонами срібла. Через нанорозмір наночастинок срібла вони можуть легко порушувати біологічні молекули, клітини та органи людини. Деякі лабораторні дослідження повідомляють, що наночастинки срібла можуть викликати окислювальний стрес і порушувати мітохондріальну функцію клітин людини [54]. Крім того, срібло можна виявити в органах після введення великих доз наночастинок срібла, особливо в печінці та селезінці. Дослідники також стурбовані здатністю наночастинок срібла долати гематоенцефалічний бар'єр через трансинаптичний транспорт і накопичуватися в мозку [55]. Дослідження на тваринах на щурах не виявило жодного побічного ефекту при пероральному введенні наночастинок срібла. Дослідники виявили, що агрегат мінерального триоксиду з наночастинками срібла не викликав значної запальної реакції на підшкірну клітковину щурів. Також було доведено, що пародонтальна пов'язка з високою концентрацією наночастинок срібла біосумісна із загоєнням ясен. Іншою проблемою є їх потенційна небезпека для морського життя, якщо вони потрапляють у навколишнє середовище. Однак токсичність наночастинок срібла може бути підвищена або знижена, коли вони взаємодіють з матеріалами та органічними сполуками [56].

1.2.3. Протівірусні властивості срібловмісних нанокompозитів

AgNPs відомі своєю антимікробною властивістю проти бактерій, грибів і вірусів. Наночастинки срібла мають здатність безперервно вивільняти іони срібла, які можуть зв'язуватися з клітинною стінкою та цитоплазматичною мембраною мікробів за допомогою білків електростатичного притягання та спорідненості до сірки, що призводить до пошкодження та інгібування мікробів через дезактивацію дихальних ферментів, утворення активних форм кисню та аденозину. Незважаючи на те, що цей мікробний механізм інгібування наночастинок срібла пропонується в різних дослідженнях, їх точний антимікробний механізм до цього часу повністю не з'ясований. Останнім часом AgNP широко використовуються як потенційний протівірусний засіб завдяки їхнім антимікробним властивостям широкого спектру в порівнянні з об'ємними матеріалами срібла, мікрочастинок срібла, автономних іонів срібла та інших наночастинок металів. Численні дослідники вивчали протівірусну ефективність AgNP проти кількох вірусів, незалежно від конкретної родини, таких як вірус імунодефіциту людини (ВІЛ), вірус гепатиту В (HBV), вірус грипу H3N2, вірус простого герпесу (HSV) типів 1 і 2, вірусу парагрипу людини типу 3, вірусу жовтої мозаїки бобів (BYMV) та деяких інших.

Протівірусний потенціал захищених меркаптоетансульфонатом AgNP (Ag-MES), синтезованих за допомогою сонохімічної реакції, було перевірено проти HSV-1 [57]. ВПГ інтерналізується в клітинах-хазяїнах, коли позаклітинні віріони прикріплюються через глікопротеїн до поверхні клітини. Пізніше глікопротеїн взаємодіє з клітинним гепарансульфатом (HS) окремо під час фази приєднання. Повідомлялося, що наночастинки Ag-MES можуть обмежувати взаємодію вірус-господар, імітуючи HS на мембрані клітини-хазяїна, щоб блокувати приєднання вірусу. Так само, вчені виготовили

нанокомпозити з наночастинок сульфиду срібла (GO–AgNPs) з глутатіоном за допомогою електростатичної техніки самозбірки. Досліджено противірусну активність нанокомпозитів GO–AgNPs щодо вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (PRRSV) та вірусу епідемічної діареї свиней (PEDV). Їхні результати показали, що нанокомпозити GO–AgNPs пригнічують інфекцію PRRSV та PEDV, знижуючи рівень експресії білка нуклеокапсиду PRRSV та PEDV, таким чином зменшуючи реплікацію вірусу. Крім того, вони також виявили, що нанокомпозити GO–AgNPs запобігають потраплянню PRRSV і PEDV в клітини-господарі. Крім того, нанокомпозит GO–AgNPs також інгібував проліферацію вірусу, посилюючи вироблення інтерферону- α (IFN- α) та IFN-стимулюючих генів (ISG). В інших дослідженнях використовували техніку електропрядіння для синтезу поліволокон (3-гідроксибутират-со-3моль%-3-гідроксивалерату), покритих AgNPs (PHBV3/AgNPs). Ефективність PHBV3/AgNPs щодо інгібування сурогатів норовірусу, котячого каліцівірусу (FCV) та мишачого норовірусу (MNV) була визначена як діаметр плівки $1,1 \pm 0,40$ мкм. Крім того, PHBV3/AgNPs були інокульовані сурогатами норовірусу, і їхні результати показали, що титри FCV та MNV значно знизилися, що означає зниження інфекційності норовірусу [58].

Противірусну активність покритих полісахаридом AgNPs (PS–AgNPs) розмірами 10–80 нм було перевірено проти вірусу віспи мавп. Результати показали, що PS–AgNPs розміром 10 нм мають найвищу ефективність, що підтверджується зменшенням утворення бляшок MPV. Механізм вірусного інгібування може включати AgNP, які запобігають зв'язуванню вірусу з клітиною-хазяїном та переривання біохімічних шляхів клітини-хазяїна. Противірусну активність покритих PVP AgNPs також було перевірено проти ВІЛ, і було визначено, що механізмом дії є його здатність блокувати взаємодію між вірусним глікопротеїном gp120 і клітиною-хазяїном [59]. Крім того, дослідження прийшло до висновку, що AgNPs можуть взаємодіяти з

глікопротеїном gp120 і змінювати вірусний білок шляхом модифікації домену, пов'язаного з дисульфідними зв'язками, в області зв'язування CD4. Крім того, Cur-AgNPs використовували для лікування ВІЛ-інфікованих клітин. Результати показали, що експресія гена LTR ВІЛ-1 і рівні p24 ВІЛ-1 були значно зменшені, і довели, що Cur-AgNPs мають значний терапевтичний потенціал проти ВІЛ. Крім того, інфіковані клітини, оброблені Cur-AgNP, показали значне зниження експресії генів прозапальних цитокінів, таких як IL-6, TNF- α та IL-1 β . Крім того, вони також спостерігали значне зниження експресії гена NF κ B. Для лікування HBV використовували AgNP з розміром від 10 до 80 нм. Їхні результати показали, що AgNPs з 10 нм можуть ефективно запобігати реплікації ДНК HBV. У дослідженні висувається гіпотеза, що AgNP перешкоджають транскрипції вірусної РНК шляхом безпосереднього зв'язування або взаємодії з ДНК HBV, яка служить матрицею для синтезу РНК і згодом зменшує кількість позаклітинних віріонів.

Також науковці вивчали ефективність цитратних/ліпоєвих кислот, покритих AgNP, проти інфекції епітеліальних клітин легенів вірусом грипу. Результати показали, що AgNP знижують вивільнення індукованих грипом цитокінів, таких як CCL-5 та IFN- β , через інгібування RIG-I. Крім того, AgNPs також посилюють вироблення цитокінів, корисних для мобілізації антибактеріальних реакцій господаря через IL-8. Примітно, що активність AgNPs не залежить від процесу нанесення покриття і залежить лише від срібного ядра [60].

Крім того, хімічно синтезовані AgNPs та нанокompозити також використовувалися для лікування інших вірусів рослин і тварин, таких як вірус лихоманки долини Ріфт, коронавірус, вірусу епідемічної діареї свиней, вірус трансмісивного гастроентериту та ін. Варто зазначити, що найпоширенішим способом дії AgNP та їх асоційованих композитів щодо всіх вірусів є

інгібування приєднання вірусу до клітини клітина, проникнення AgNP в клітину та руйнування вірусних інфекційних груп.

Новий екологічно чистий метод біологічного синтезу полягає в тому, що AgNPs отримуються шляхом автоклавування комерційно доступних скляних порошків, які містять нітрат срібла та глюкозу як відновник [61]. Залежно від концентрації глюкози розміром наночастинок можна легко маніпулювати, а розмір наночастинок 5 ± 1 нм можна вміло синтезувати, тоді як у методі синтезу не було виявлено жодного шкідливого матеріалу. Таким чином, досліджували противірусну активність проти H1N1 синтезованих AgNP, покритих хітозаном. Результати показали, що ефект інгібування був значним при менших розмірах AgNP в композитах, в той час як при використанні лише чистого хітозану противірусної активності не спостерігалось. Крім того, зроблено висновок, що противірусна активність цього нанокompозиту обумовлена зв'язуванням AgNP з глікопротеїнами вірусу і, як наслідок, інгібуванням проникнення вірусу в клітину хазяїна. Крім того, фізичне зв'язування позаклітинних віріонів з хітозановими композитами може миттєво перешкоджати контакту вірусу з клітинами хазяїна.

Нещодавно також було продемонстровано потенціал наносрібла в лікуванні вірусних інфекцій і пов'язаних з ним онкогенних ракових захворювань, пов'язаних з вірусом герпесу. Що ще важливіше, AgNP інгібували вірус герпесу, асоційованого з саркомою Капоші (KSHV), блокували первинну інфекцію та помірно пригнічували ріст пухлин, асоційованих з KSHV.

1.2.4. Віруліцидна дія срібловмісних наночастинок

Віруліцидні агенти відрізняються від вірусостатичних препаратів тим, що вони діють безпосередньо та швидко, лізуючи вірусні мембрани при контакті або зв'язуючись із білками оболонки вірусу. Тим не менш, взаємодія AgNP з вірусами все ще залишається недостатньо вивченою.

Як пропонувалося в різних дослідженнях, найбільш поширеним способом інгібування вірусів за допомогою наночастинок срібла є зв'язування противірусних агентів з білками оболонки вірусу та порушення структури та функцій. Механізм можна класифікувати на основі підходів синтезу AgNP, таких як фізико-хімічні та біогенні методи. Отримана наночастинка з обох підходів зв'язується з поверхнею вірусного білка і руйнує її. Такий підхід дозволяє уникнути передачі вірусу в клітині-хазяїні на ранній стадії та є дуже корисним для контролю поширення вірусно-опосередкованої інфекції. Однак реакція AgNP буде відрізнятися, коли вірус інфікував і проник в клітині-господарів.

Фізично та хімічно синтезовані AgNP зв'язуються з клітиною-хазяїном та вірусом за допомогою хімічних функціональних груп, які діють як стабілізуючий або фіксуєчий агент, щоб уникнути агломерації та покращити стабільність. Оскільки вони синтетичного походження, ці функціональні групи виявляють інгібуючу активність щодо вірусів та порушують їхній вірусний капсидний білок. Крім того, наночастинка розпадається на іони срібла, вивільняє активні форми кисню, збільшує окислювальний стрес і сприяє пригніченню вірусу. Крім того, наночастинка срібла безпосередньо зв'язується з вірусним геномом, порушує його структуру та зупиняє його проліферацію в організмі хазяїна. Примітно, що біогенно синтезована наночастинка срібла дотримується того ж механізму, коли вірус інфікує клітину-хазяїна. Однак функціональна група на основі хімічних речовин у

AgNP, виготовлених за допомогою фізичного або хімічного підходу, може бути токсичною для інфікованої клітини-хазяїна. Фактично, токсичні функціональні групи можуть призводити до побічних ефектів у клітинах-хазяїнах, знижуючи або зупиняючи їх метаболічну активність, викликаючи серйозні ускладнення цитотоксичності щодо клітин-хазяїв, інфікованих вірусом. У разі біогенних AgNPs біомолекули діють як функціональна група, яка полегшує надходження AgNP в клітини-хазяї, інфіковані вірусом, що покращує їх біосумісність. Крім того, біомолекули також володіють противірусною ефективністю, що забезпечує синергетичний інгібуючий ефект щодо вірусної інфекції та захищає клітини-хазяїни. Більше того, біомолекули можуть служити живильними речовинами для росту клітин або стимулювати імунітет клітини-хазяїна, що дуже корисно для боротьби з вірусними інфекціями [62].

1.3. Характеристика наночасток церію

1.3.1. Властивості наночасток церію

Церій - це метал, який належить до групи лантаноїдів. Швидко окислюється при контакті з повітрям. У 2010 році Організація економічного співробітництва та розвитку включила наночастинки CeO_2 до списку пріоритетних наноматеріалів, які потребують термінової оцінки, оскільки мало відомо про їх вплив на здоров'я людини. Церій має два ступені окиснення в структурі ґратки: Ce^{3+} і Ce^{4+} . Таким чином, наноцерій має здатність діяти як каталізатор як для реакцій окислення, так і для відновлення, імітуючи активність різних ферментів, таких як супероксиддисмутаза, каталаза та пероксидаза [63]. Анти- та прооксидантні ефекти спостерігаються залежно від

поверхневих концентрацій Ce^{3+} або Ce^{4+} , рН, H_2O_2 та концентрації хелатного ліганду.

Завдяки своїм властивостям наночастинки CeO_2 в даний час вивчаються для використання в багатьох напрямках:

- як антиоксидант для лікування, призначеного для зниження окисного стресу в неврології, офтальмології, гепатології, кардіології, фертильності;
- як прооксидант, зокрема за реакцією Фентона, для знищення ракових клітин;
- як носій для цільової доставки ліків і генів, в основному в онкологічній терапії;
- як антибактеріальний засіб проти грампозитивних і грамнегативних бактерій;
- як противірусний препарат;
- як протидіабетичний препарат і проти ожиріння завдяки його міметичній та антиапоптичній активності супероксиддисмутази 1;
- у регенеративній медицині та тканинній інженерії шляхом підвищення тривалого виживання клітин, уможливлення міграції та проліферації клітин та сприяння диференціації стовбурових клітин.

1.3.2. Токсичні ефекти наночастинок церію

Більшість досліджень впливу наноцерію на здоров'я людини проводяться на гризунах або з використанням клітинних ліній людини. Потенційна токсичність наноцерію залежить від фізико-хімічних властивостей наносполук CeO_2 , використаних у дослідженні, контексту

клітини/тканини, доз і часу впливу. Більшість досліджень зосереджені на впливі наночерію на біологічні бар'єри (легеневі, гематоенцефалічні, кишкові) та на систему мононуклеарних фагоцитів (у печінці та селезінці), де від 90% до 95% наночерію потрапляє в кров, накопичується і зберігається місяцями. Дійсно, кліренс наночастинок CeO_2 , що вдихаються та розподіляються в організмі (легені, селезінка, печінка, нирки) у щурів є незначним через 48-72 години після впливу, що може свідчити про затримку наносполук в органах [64]. За оцінками, менше 1% дози, що осідає в легенях, проходить через легеневий бар'єр, а для кишкового бар'єру цей відсоток ще нижчий [65]. Дуже низькі рівні наночастинок CeO_2 можуть перетинати шкірний бар'єр за наявності шкірних уражень, з незначною шкірною абсорбцією та трансдермальним проникненням черію. У деяких типах клітин спостерігається цитотоксичність і генотоксичність. Відомі механізми дії, що викликають токсичність, в основному вони включають окислювальний стрес. Хоча утворення білкової корони на наночерії в біологічних рідинах, погано вивчене, воно може зменшити токсичний вплив. Що стосується можливої конституції корони в крові людини, було виявлено, що наночастинок CeO_2 мають більшу спорідненість до фібриногену, ніж до сироваткового альбуміну людини. Утворення білкової корони також могло б мати захисний ефект, наприклад, дозволяючи інтерналізацію наночерію за допомогою клатрин-опосередкованого ендоцитозу, тим самим запобігаючи цитотоксичності, спричиненої порушенням плазматичної мембрани. Опосередкований клатрином ендоцитоз, мабуть, пов'язаний із взаємодією трансферину, присутнього в білковій короні, з рецептором трансферину [66]. Шляхи клітинної інтерналізації наночастинок CeO_2 є множинними і залежать не тільки від білкової корони, а й від фізико-хімічних параметрів частинок. Визначення різних факторів, що впливають на токсичність наночастинок CeO_2 , а також розуміння механізмів їх дії є важливими не тільки для оцінки

ризика, але й можуть дозволити розробити більш безпечні наноцерії в майбутньому, в основному для біомедичних застосувань[67].

1.4. Характеристика наночастинок лантану

1.4.1. Загальні властивості та токсичність наночастинок лантану

Лантан – це рідкоземельний елемент, один із сімнадцяти f-електропозитивних металевих елементів. Незважаючи на назву, ці елементи не є особливо рідкісними і легко зустрічаються в організмі людини. Дослідження цих рідкоземельних елементів описували цитотоксичні та протипухлинні ефекти завдяки їх унікальній електронній конфігурації — включаючи радіосенсибілізацію за допомогою ефекту Оже та хіміотерапевтичну синергію через підвищену апоптотичну активність [68]. Було виявлено, що токсичність оксидів лантану підвищується в системі культивованих клітин, якщо розміри частинок стають меншими. Оброблені ультразвуком оксиди лантану також були більш токсичними. Токсичність низькотоксичних, малорозчинних частинок збільшується, коли розмір частинок зменшується та/або збільшується площа їх поверхні.

Подібно до культивованих клітин, токсичність нано-La₂O₃ у легенях була більш серйозною, ніж мікро-La₂O₃. При дозі, яка не викликала значних клінічних симптомів (тобто зміни маси тіла), спостерігалось значне ураження легень. Наприклад, кількість лейкоцитів та показники пошкодження клітин у сироватці крові були значно змінені. Вищу концентрацію лантану було виміряно в легенях щурів, які піддалися впливу нано-La₂O₃, ніж у щурів, які зазнали впливу мікро-La₂O₃. Крім того, елімінація була швидшою у щурів, які зазнали впливу мікро-La₂O₃, ніж у щурів, які зазнали впливу нано-La₂O₃ [69].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Культивування клітин та їх підготовка до експериментів

Для накопичення вірусу грипу та проведення досліджень використовували культури перещеплюваних клітин, що входить до каталогу Європейської колекції: MDCK - культура клітин нирок собаки, чутливі до вірусу грипу, отримана з ДУ Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України (Київ, Україна).

Клітини вирощували в стерильних пластикових флаконах (Sarstedt, Німеччина) у поживному середовищі, що складалося з 45% DMEM (Biowest, Франція), 45% RPMI 1640 (Biowest, Франція) та 8% ембріональної телячої сироватки (ETC, Biowest, Франція), інактивованої прогріванням протягом 30 хв. при 56 °С, антибіотику гентаміцину (100 мкг/мл). Клітини перещеплювали при утворенні моношару, а саме дезагрегували їх з поверхні флаконів за допомогою 0,025% розчину трипсину (Biowest, Франція), ресуспендували в поживному середовищі та доводили їх концентрацію у суспензії до $2-2,5 \times 10^5$ клітин/мл. Кратність розсіву встановлювали після підрахунку кількості клітин у камері Горяєва. Суспензію клітин в об'ємі 200 мкл вносили у лунки 96 лункового планшета. Планшети з клітинами культивували в термостаті при 37°C та в атмосфері 5% CO₂. Через 24 год. культивування проводили контроль стану моношару клітин в планшетах з використанням світлового інвертованого мікроскопу. До досліджень включали планшети у разі формування клітинами близько 70-90% моношару і при відсутності бактеріальної та грибової контамінації, в інших випадках клітини з досліджень виключали.

В якості підтримуючого середовища для клітин використовували суміш 49% ДМЕМ (Biowest, Франція), 49% RPMI 1640 (Biowest, Франція) та 2% ембріональної телячої сироватки (ЕТС, Biowest, Франція) [70].

2.2. Методика підрахунку кількості клітин у камері Горяєва

Підрахунок клітин у суспензії проводився за допомогою камери Горяєва з використанням інвертованого мікроскопа (Carl Zeiss Jena, Німеччина) із збільшенням 70х. В якості барвника використовували трипановий синій, який не забарвлює живі клітини, проте фарбує мертві. До 1 мл відібраних клітин культури MDCK додавали такий самий об'єм 0,1% розчину трипанового синього. Потім суспензію клітин перемішували з барвником і вносили в камеру Горяєва. Підраховували усі клітини в 4 великих квадратах, які були незабарвлені, мали ядро та не пошкоджену цитоплазму. Далі підрахувавши клітини в двох камерах, знаходили середнє арифметичне для камери і визначали кількість клітин в 1 мл суспензії (А) за формулою:

$$A = (B \times 2 \times 1000) / 0,9,$$

де В – це середня кількість клітин в одній камері, 2 – коефіцієнт розбавлення суспензії барвником, 1000 – кількість кубічних міліметрів у 1 см³, 0,9 – об'єм камери Горяєва, мм².

Зазвичай оптимальна посівна концентрація клітин становить 200–250 тис. клітин/мл [71].

2.3. Вірусні препарати та їх підготовка до досліджень

Вірус грипу типу А, (H1N1) штамп А/FM/1/47, отриманий із колекції ДУ Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України, культивували в культурі клітин MDCK. Моношар клітин в 650 мл флаконах через 1 добу росту промивали розчином стерильного фосфатно-сольового буферу (рН = 7,4) та вносили у невеликій кількості середовища (достатній для покриття моношару) вірус в розведенні 1:10000. Адсорбували протягом 1,5 год. при кімнатній температурі, потім додавали необхідну кількість підтримуючого середовища та інкубували клітини при 37°C протягом 3 - 4 діб до появи інтенсивної цитопатогенної дії (ЦПД). Для виділення вірусу з клітинного матеріалу проводили 3 кратне заморожування – розморожування до повного руйнування клітин, дентрит видаляли центрифугуванням при 3000 об/хв. протягом 30 хв. Визначали титри вірусу в надосаді, використовуючи фарбування кристалічним фіолетовим. Готували аліквоти заготовок в кріопробірках по 1 - 5 мл та зберігати при - 80°C. Використовували пул вірусу з титром 5×10^6 ТЦД₅₀/мл [70].

2.4. Досліджувані наноструктури

У роботі досліджували оксиди лантану та церію з додаванням срібла в різних концентраціях (від 2% до 5%) (табл. 2.1.), синтезовані в Інституті проблем матеріалознавства ім. І. М. Францевича НАН України. Наносполуки були отримані шляхом ультразвукового диспергування.

Таблиця 2.1.

Оксиди металів із сріблом

Номер	Наноккомпозити	Вміст Ag, мас. %
1	La ₂ O ₃ -CeO ₂ 0%	0
2	CeO ₂ -Ag 2%	2
3	CeO ₂ -Ag 4%	4
4	CeO ₂ -Ag >5%	>5
5	La ₂ O ₃ -Ag 2%	2
6	La ₂ O ₃ -Ag 4%	4
7	La ₂ O ₃ -Ag >5%	>5

2.5. Дослідження цитотоксичної дії наноструктур

Клітини для дослідження цитотоксичної дії наноструктур культивували в 96 лункових планшетах з посадковою щільністю 220 тис.к-н/мл, до лунок вносили по 200 мкл суспензії клітин в складі середовища росту та протягом 1 доби витримували при 37°C в 5% CO₂ до формування 70-90 відсоткового моношару. З 96 лункового планшета видаляли ростове середовище та вносили в десятикратні розведення оксидів металів в об'ємі 100 мкл/лунку. В якості контролю клітин використовували лунки з середовищем без додавання дослідних зразків. Планшети розміщували в 5% CO₂ при 37°C та витримували протягом 48 годин. Життєздатність клітин та їхню мітохондріальну активність досліджували з використанням розчину МТТ (NeoFroxx, Німеччина) за стандартною методикою. Далі до планшета вносили

по 20 мкл/лунку розчину МТТ (5 мг/мл) та витримували протягом 3 годин при 37°C в атмосфері 5% CO₂ для формування кристалів формазану в живих клітинах. Потім середовище видаляли, вносили по 100 мкл/лунку 96° етилового спирту, для вимивання фарбника планшети протягом 10 хв струшували, використовуючи програму рідера Multiscan FC (ThermoFisherScientific, США). Вимірювали оптичну щільність лунок при 540 нм, приймаючи лунку А1 (містить лише розчинник) за бланк, значення якого віднімались автоматично від значень оптичної щільності (ОЩ) в інших лунках. Вираховували середні значення оптичної щільності для кожного з зразків та контролю клітин та значення стандартної похибки, використовуючи функції програми Microsoft Excel 2016. Приймаючи значення середньої оптичної щільності контролю клітин за 100%, вираховували відсоток живих клітин для дослідних зразків за формулою:

$$\text{Відсоток живих клітин} = \text{ОЩ зразка} \times 100 / \text{ОЩ контролю клітин}$$

Значення відсотку живих клітин більше 50, свідчить про нетоксичність зразку в такій концентрації [72].

2.6. Дослідження антивірусної дії оксидів металів

Клітини MDCK знімались з культуральних матраців та висаджувались у 96-лункові культуральні планшети у концентрації 250 тис.к-н/мл. Через 24 години клітини створювали 80-90% моношар у лунках. Далі клітини інфікувались вірусом на середовищі без сироватки. Клітини не інфіковані вірусом слугують – контролем клітин. Інфікування клітин проходило півтори години, при 37°C та 5% CO₂. Неадсорбований вірус видалявся і до клітин додавалась підтримуюче середовище (4% ЕТС, з 46% ДМЕМ, 46% RPMI 1640, 0,01% трипсину) з відповідними концентраціями досліджуваних сполук.

Лунки без досліджуваних сполук приймалися за контроль вірусу. Інкубація проводилась доки у зразках з контролем вірусу не розвивалось 80-90% вірусної ЦПД, як правило 48 годин.

Після чого клітини фарбувались 0,3% спиртовим розчином кристалічного фіолетового на шейкері протягом 10 хвилин. Залишки фарбника видалялись водою, зразки підсушувались протягом доби. Для проведення спектрофотометрії барвник екстрагувався 96% етиловим спиртом, зчитування проводилось при 540 нм, використовуючи рідер для планшетів Multiscan FC (ThermoFisherScientific, США).

Визначення відсотка антивірусної дії проводилось за формулою:

$$\text{Антивірусна дія} = \frac{(OD_{exp.} - OD_{v.c.})}{(OD_{c.c.} - OD_{v.c.})} \times 100\%,$$

де O.D. – оптична щільність, exp. – експериментальний зразок, c.c. – зразок контролю клітин, v.c. – зразок контролю вірусу [73].

2.7. Визначення інфекційного титру ізолятів вірусу грипу, отриманих *de novo*, після обробки срібловмісними нанокompозитами

Інфекційний титр ізолятів вірусу, синтезованих у присутності оксидів лантану та церію зі сріблом, визначали за цитопатогенною дією на клітини (ЦПД) за кінцевою точкою розведення вірусу, яке викликає 50% ЦПД. Розведення вірусу, яке зменшує оптичну щільність зразка у порівнянні з оптичною щільністю контролю клітин на 50% і є титром вірусу та виражається в $\lg TЦД_{50}/мл$ (десятичних логарифмах 50 %-х тканинних цитопатичних доз в мл). Через 3 доби культивування клітини з вірусвмісним матеріалом відбирали, тричі заморожували-розморозували, центрифугували протягом 20

хв при 3 тисяч об/хв., видаляли осади клітин, готували серійні 10-кратні розведення та інфікували ними моношар добових чутливих до вірусу клітини [74]. Через 3 доби культивування до лунок вносили розчин МТТ та визначали оптичні щільності зразків, вираховували інфекційний титр вірусу та індекс пригнічення репродукції вірусу (ІПР) за формулою:

$$\text{ІПР} = \text{Титр вірусу контроль} - \text{Титр вірусу дослід (lg)}.$$

2.8. Дослідження віруліцидної дії нанокмпозитів з оксидами церію та лантану на вірус грипу

Клітини, чутливі до вірусів, культивували в 96 лункових планшетах до формування 70-90% моношару. Змішували однакові об'єми вірусу та оксиду металу (не розведений зразок) та витримували 1 годину при 37°C в 5% CO₂. Далі вносили 10-кратні розведення вірусомісного матеріалу після контакту в об'ємі 50 мкл/лунку. В якості контролю клітин використовували клітини без додавання вірусу, а в якості контролю вірусу – клітини інфіковані вірусом без контакту з оксидами металів. Всі матеріали використовували не менше, ніж в 3-х повторах. Адсорбцію вірусу на клітинах проводили протягом 1,5 год за кімнатної температури в атмосфері 5% CO₂. По завершенню часу адсорбції до лунок планшету вносили по 150 мкл/лунку підтримуючого середовища, не видаляючи вірусомісний матеріал. Культивували клітини протягом 72 год до утворення вираженої ЦПД в контролі вірусу. Далі з використанням барвника МТТ, та кристалічного фіолетового для вірусу грипу, визначали оптичну щільність в лунках планшету. Для кожного розведення вірусу визначали середню кількість живих клітин. Визначали розведення вірусу, яке зменшувало оптичну щільність зразка у порівнянні з оптичною щільність

контролю клітин на 50%, що і є титром вірусу та виражається в ТЦД₅₀/мл або lg ТЦД₅₀/мл [74]. Здатність перешкоджати репродукції вірусу визначали за значеннями зниження титру вірусу:

$$\text{Ефективність} = A - B,$$

де А – титр вірусу у контролі, а В – титр вірусу у дослідному зразку.

2.9. Статистична обробка даних

Статистична обробка даних здійснювалась за стандартними підходами для обчислення статистичних помилок (середнє значення та стандартне відхилення) з використанням Microsoft Excel 2016. Дані було отримано в результаті досліджень в трьох незалежних повторах. Для оцінки різниці між тестовим зразком та контролем використано t-тест Стьюдента, де значення $p < 0,05$ вважалося статистично значущим [75].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка цитотоксичності срібловмісних нанокompatитів

Першим етапом нашого скринінгового дослідження було встановлення значень цитотоксичності срібловмісних наночастинок на культуру клітин MDCK. Для оцінки токсичності нанокompatитів ми вираховували відсоток живих клітин (%ЖК) для семи зразків оксидів металів з різним вмістом срібла. Було досліджено розчини в 4 концентраціях: 2 мкг/мл, 20 мкг/мл, 200 мкг/мл та 2000 мкг/мл.

Відомо, що наноструктури із церієм здатні викликати токсичні ефекти шляхом спричинення окиснювального стресу [66]. Проте в нашому дослідженні було зафіксовано, що наносполуки із церієм не проявляли або мали низьку токсичну дію. Як видно з рис. 3.1. зразки $\text{La}_2\text{O}_3\text{-CeO}_2$ 0% та $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ >5 не проявляли токсичних ефектів навіть при концентрації 200 мкг/мл, адже відсоток живих клітин становив близько 100. Лише при максимальній концентрації 2000 мкг/мл спостерігалася токсична дія даних срібловмісних наносполук. Нанокompatит $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 4% також характеризувався відсутністю токсичної дії в концентрації до 200 мкг/мл. Сполука $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 2% не проявляла токсичних ефектів при низьких концентраціях, відсоток живих клітин був вище 50 при концентраціях до 20 мкг/мл, проте зі збільшенням концентрації речовини (від 200 мкг/мл до 2000 мкг/мл) токсична дія збільшувалась. Тобто, церійвмісні сполуки проявляли токсичну дію за великих концентрацій, а саме при 2000 мкг/мл.

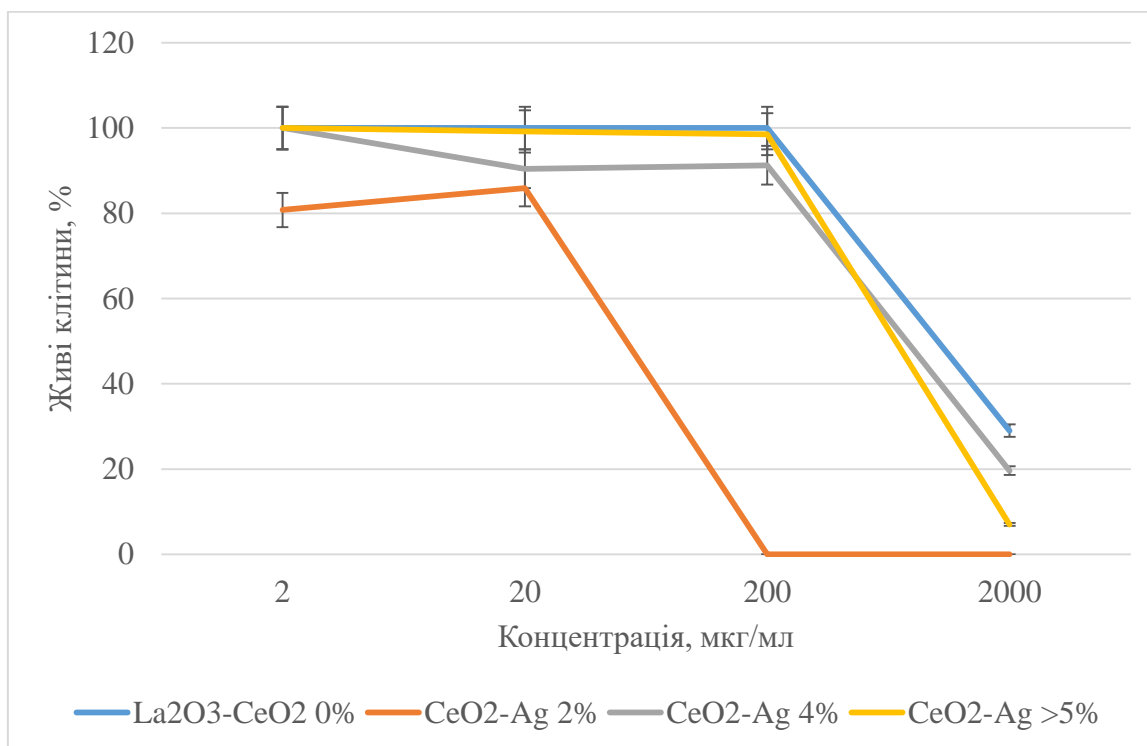


Рис. 3.1. Аналіз впливу срібловмісних наноконкомпозитів $\text{La}_2\text{O}_3\text{-CeO}_2$ 0% , $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 2%, $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 4% та $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ >5 в різних концентраціях на життєдіяльність культури клітин MDCK

Оксиди лантану можуть проявляти токсичність зі зменшенням розміру сполук. Встановлено, що чим менші розміри частинок і більша їх площа поверхні, тим більша їх токсична дія [69]. Проте в нашому дослідженні наночастинки з лантаном в поєднанні зі сріблом не виявили сильних токсичних ефектів при невеликих концентраціях (рис. 3.2.). Зокрема для всіх трьох зразків із лантаном $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 2%, $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 4% та $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ >5% не характерна токсичність при концентраціях до 200 мкг/мл, і лише при найбільшій концентрації 2000 мкг/мл зафіксовано токсичну дію на культуру клітин MDCK. Токсичність наноконкомпозитів може бути пов'язана із методом їх синтезу, згідно літературному огляду, лантановмісні наноструктури отримані фізико-хімічним шляхом в залежності від розміру (зі зменшенням розміру зростають токсичні властивості) здатні проявляти виражену токсичну дію [69]. Тестовані зразки були отримані в результаті ультразвукового

диспергування, що могло послугувати причиною прояву токсичних ефектів при великих концентраціях.

Дослідження токсичності срібловмісних нанокompatитів із лантаном свідчать про відсутність цитотоксичної дії при концентраціях до 2000 мкг/мл.

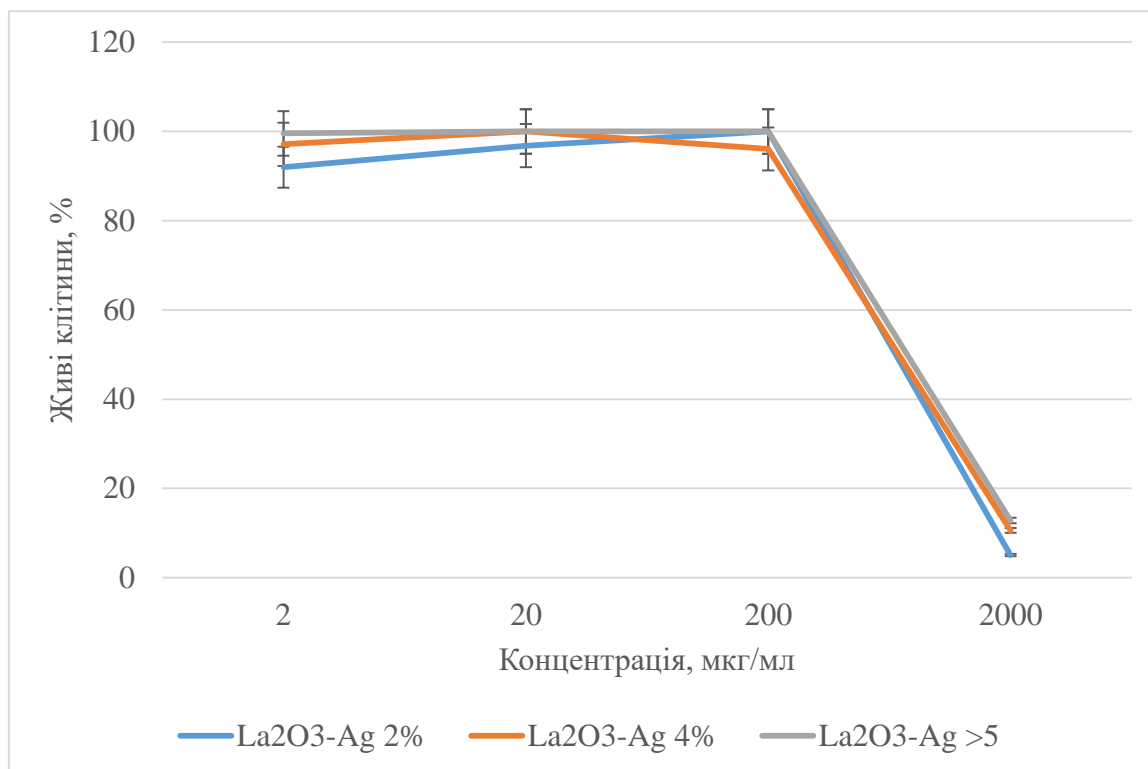


Рис. 3.2. Аналіз впливу срібловмісних нанокompatитів La₂O₃-Ag 2%, La₂O₃-Ag 4% та La₂O₃-Ag >5% в різних концентраціях на життєдіяльність культури клітин MDCK

В сучасній літературі стверджується, що срібловмісні наночастинки здатні проявляти низку токсичних ефектів, таких як порушення цілісності клітинних мембран та функцій мітохондрій, а також спричинення окиснювального стресу [54], проте нами було виявлено, що цитотоксична дія проявляється лише при великих концентраціях срібловмісних нанокompatитів від 2000 мкг/мл і більше. На основі отриманих даних було перевірено срібловмісні нанокompatити на наявність антивірусної дії проти вірусу грипу.

3.2. Оцінка антивірусної дії срібловмісних нанокompозитів проти вірусу грипу

Для визначення антивірусної дії використовувалися нетоксичні концентрації срібловмісних нанокompозитів, а саме 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл та 100 мкг/мл. До культури клітин MDCK, зараженої вірусом грипу, додавали тестовані речовини та інкубували допоки в зразках з контролем вірусу не розвивалася 80% - 90% ЦПД. Значення антивірусної дії більше 50% означають, що в досліджуваних сполук наявна висока протигрипозна активність, а 25% - 50% свідчать про низьке пригнічення розвитку цитопатичної дії вірусу. Результати досліджень, представлені на рисунку 3.3., свідчать про досить слабку антивірусну дію нанокompозитів із церієм.

Сполуки $\text{La}_2\text{O}_3\text{-CeO}_2$ 0% мають дуже низькі значення антивірусної дії, серед яких найбільше це 11% при концентрації 0,1 мкг/мл. Срібловмісні нанокompозити $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 2% проявили найбільшу протигрипозну активність серед усіх церійвмісних речовин, що становить 26% при концентрації 100 мкг/мл. Також низькою антивірусною дією характеризуються наночастинки $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 4%, їх значення протигрипозної дії коливаються від 13% до 20%. Найбільше пригнічення розвитку цитопатичної дії вірусу грипу нанокompозитами $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ >5 становило 19% при концентрації 1 мкг/мл.

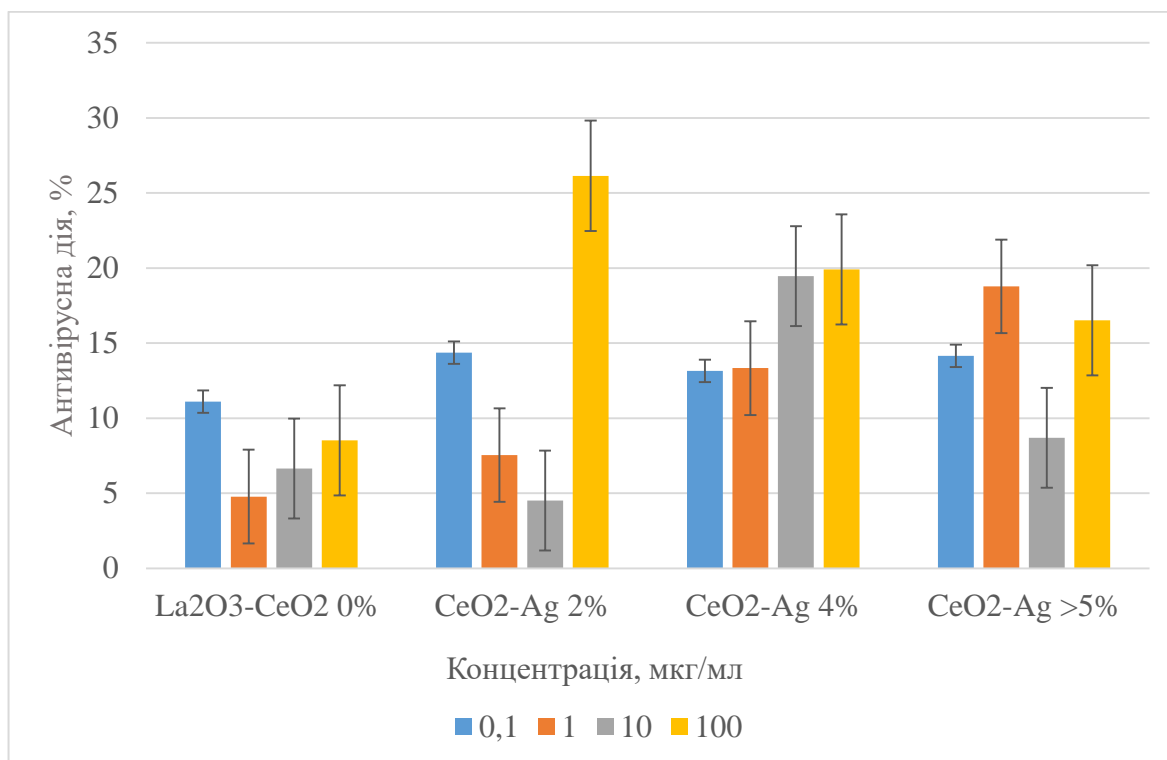


Рис. 3.3. Аналіз антивірусної дії оксидів лантану та церію з введенням срібла La₂O₃-CeO₂ 0% , CeO₂-Ag 2%, CeO₂-Ag 4% та CeO₂-Ag >5 щодо вірусу грипу

Оксиди лантану з різним вмістом срібла (2, 4 та 5%) виявили схожу ефективність (рис. 3.4.). Так, відсоток антивірусної дії наночастинок La₂O₃-Ag 2% становив від 12% до 17% при всіх досліджуваних розведеннях. Найбільша протигрипозна активність серед лантанвмісних сполук була зафіксована у La₂O₃-Ag 4% і становила 24% при концентрації 100 мкг/мл. У зразка La₂O₃-Ag >5% також не було виявлено значної антивірусної активності, вона складала 11% - 15% при всіх розведеннях.

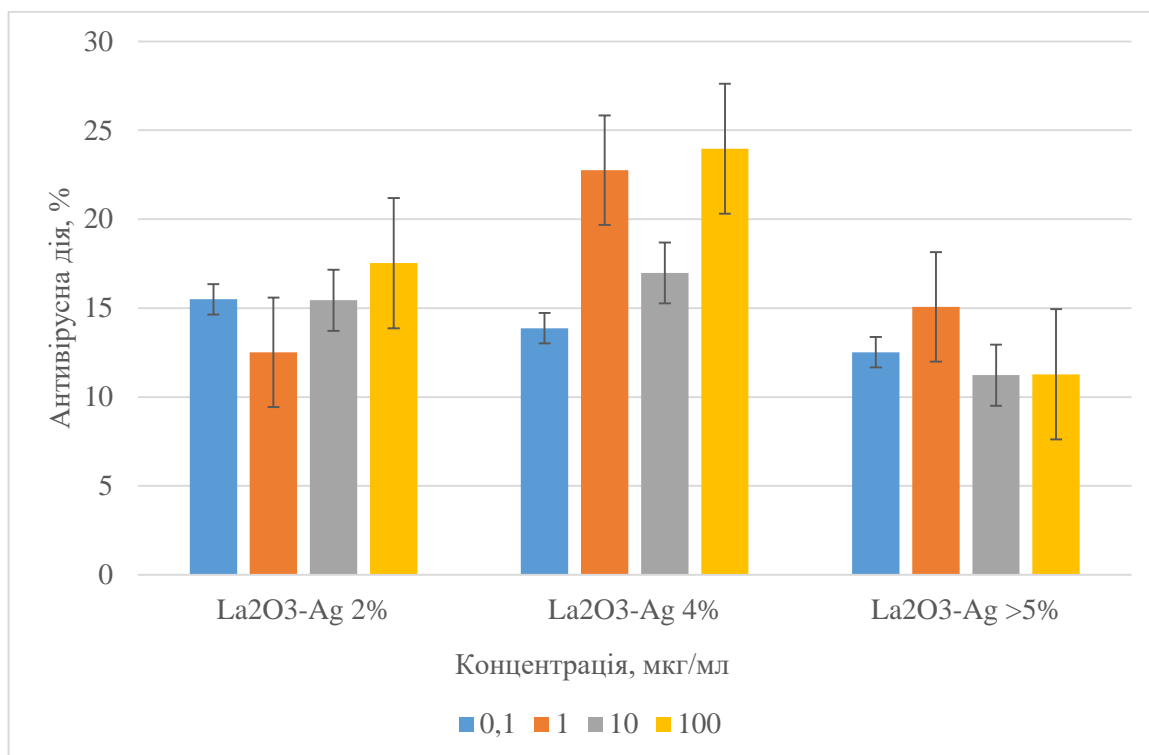


Рис. 3.4. Аналіз антивірусної дії оксидів лантану з введенням срібла La₂O₃-Ag 2%, La₂O₃-Ag 4% та La₂O₃-Ag >5% щодо вірусу грипу

Тож досліджувані зразки проявили досить слабку протигрипозну активність. Оксиди лантану та церію без додавання срібла (La₂O₃-CeO₂ 0%) мали найменші показники антивірусної дії, відсоток яких варіював від 4 до 11%. Присутність срібловмісних нанокompatитів малоефективно призупиняла розвиток цитодиструкції. Проте такі низькі значення протигрипозної активності можуть пояснюватися тим, що вірус проходить свій життєвий цикл, що і викликає цитопатичну дію клітин, але новоутворений вірус є дефектним і не здатним до реплікації. Таким чином, репродукується певна кількість неактивних вірусних частинок, які не здатні інфікувати клітини, але при цьому ми спостерігаємо наявність цитопатичної дії. Або ж срібловмісні нанокompatити повністю інгібують репродукцію вірусу грипу. Для перевірки даної гіпотези було проведено експеримент, де визначали титри ізолятів вірусу грипу, які були отримані після взаємодії з дослідними сполуками.

3.3. Оцінка інфекційного титру ізолятів вірусу грипу, отриманих *de novo* після обробки срібловмісними наночастинками

Срібловмісні препарати характеризуються тим, що мають високу противірусну дію і здатні інгібувати репродукцію вірусів [62]. Нами було перевірено сім зразків срібловмісних наносполук на наявність зниження інфекційного титру вірусу грипу (рис. 3.5.). Якщо індекс пригнічення репродукції вірусу становить 1 lg і менше, це свідчить про наявність незначного інгібуючого ефекту, значення 1-2 lg означає, що є помірна противірусна дія, 2 lg і більше – виражена противірусна активність. У зразка з $\text{La}_2\text{O}_3\text{-CeO}_2$ 0% спостерігається невелике збільшення противірусної активності зі збільшенням концентрації, адже при концентрації 100 мкг/мл титр вірусу знизився на 1 lg в порівнянні з контролем вірусу. Натомість наночастинки $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 2% взагалі не проявили жодної інгібуючої дії в порівнянні з контролем вірусу, що корелює з результатами антивірусної дії цього зразка і свідчить про відсутність противірусної дії. У зразка $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 4% найбільше зниження інфекційного титру склало 0,8 lg при концентрації 1 мкг/мл, що означає наявність відносної противірусної дії. Це може пояснюватися тим, що менш концентрований розчин міг зберегти свою стабільність і кількість збуджених наночасток була недостатньою для інгібування реплікації вірусу, в той час, коли за максимальної концентрації навпаки сполуки могли згрупуватися в великі конгломерати, що значно знизило їх реакційну здатність. Наночастинки $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ >5% не спричинили значного зниження інфекційного титру, значення індексу пригнічення репродукції вірусу становили 0,25 – 0,35 lg за усіх концентрацій. Отже, лантанвмісні наночастинки проявили досить слабку противірусну дію.

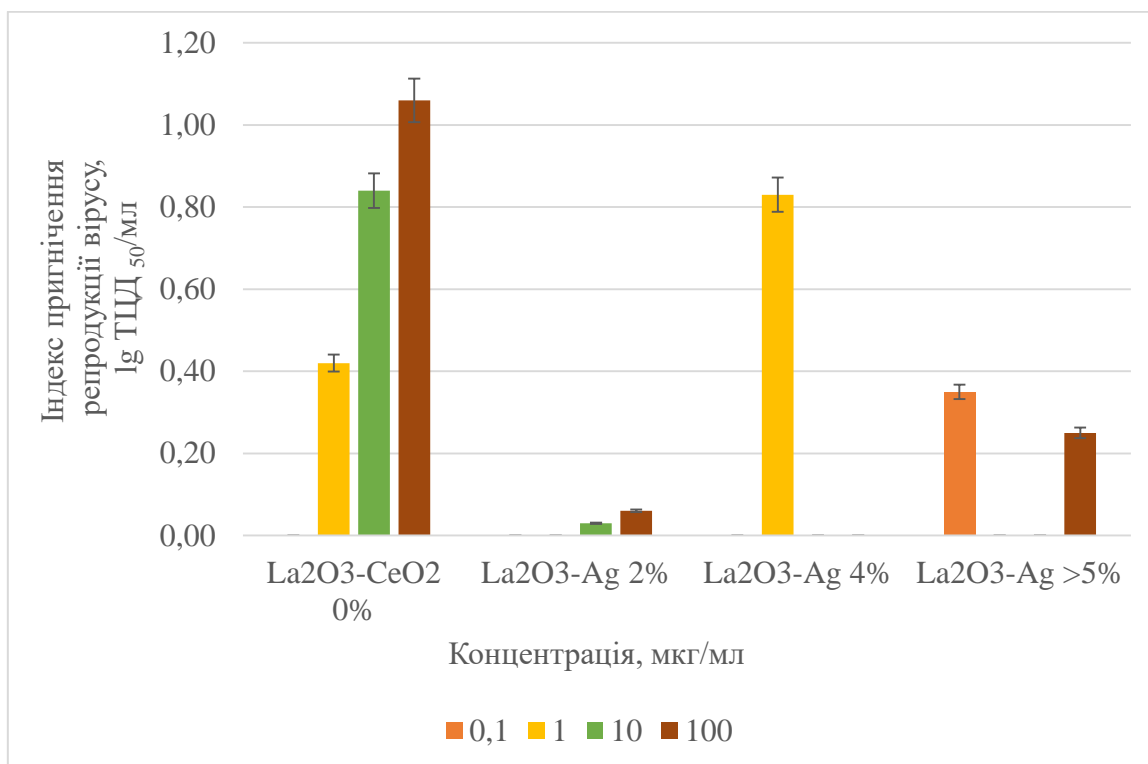


Рис. 3.5. Аналіз значень індексу пригнічення репродукції вірусу грипу, після обробки срібловмісними нанокompозитами з лантаном La₂O₃-CeO₂ 0%, La₂O₃-Ag 2%, La₂O₃-Ag 4% та La₂O₃-Ag >5%

Згідно рисунку 3.6. зразки з церійвмісними наночастинками з сріблом мають значне зниження інфекційного титру вірусу. Сполука CeO₂-Ag 2% проявила інгібуючий ефект на вірус грипу при концентраціях 1-100 мкг/мл. Найбільше зниження інфекційного титру становило 1,7 lg при концентрації 100 мкг/мл. Наночастинки CeO₂-Ag 4% при концентрації 1 мкг/мл мають найбільше зниження титру вірусу на 2,2 lg в порівнянні з контролем. Зразок CeO₂-Ag >5 має найкращий інгібуючий ефект, адже при найменшій концентрації 0,1 мкг/мл зменшення інфекційного титру становить 2,2 lg, а при найбільшій концентрації 100 мкг/мл зафіксовано найбільше зниження титру вірусу серед всіх зразків на 3,2 lg в порівнянні з контролем.

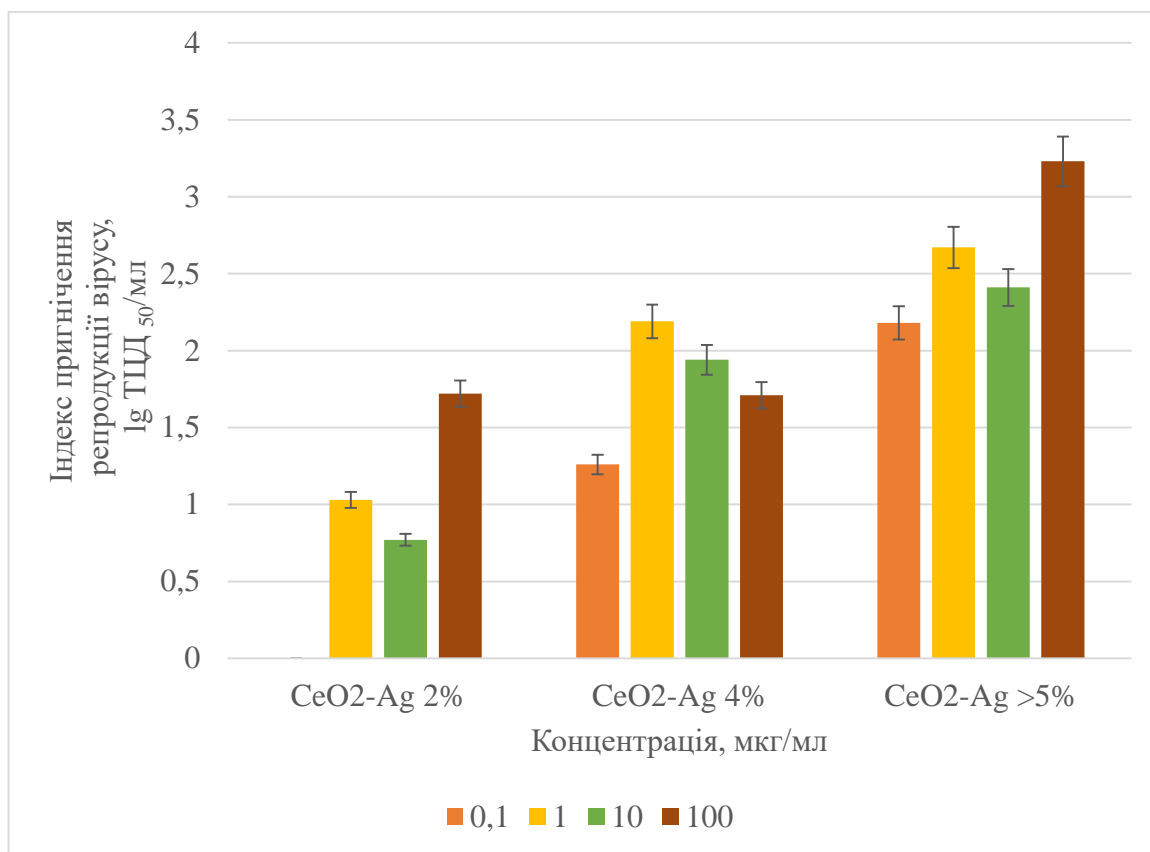


Рис. 3.6. Аналіз значень індексу пригнічення репродукції вірусу грипу, після обробки срібловмісними нанокompозитами з церієм CeO₂-Ag 2%, CeO₂-Ag 4% та CeO₂-Ag >5

Серед усіх проаналізованих сполук найбільший противірусний потенціал мали церійвмісні наночастинки CeO₂-Ag 2%, CeO₂-Ag 4% та CeO₂-Ag >5. Вони призвели до зменшення титру вірусу на 1 lg і більше. Також було виявлено залежність між пригніченням репродукції вірусу і збільшенням вмісту срібла в церійвмісних наночастинках, проте в лантанвмісних сполуках такої кореляції не виявлено. Тож срібловмісні нанокompозити з додаванням церію можуть взаємодіяти з новосинтезованим вірусом та знижувати його титри.

3.4. Оцінка віруліцидної дії нанокompозитів на основі оксидів лантану і церію з додаванням срібла відносно вірусу грипу

Для визначення противірусного потенціалу срібловмісних нанокompозитів на основі оксидів церію та лантану було визначено віруліцидну дію цих сполук на вірус грипу. Віруліцидна дія вважається ефективною, якщо досліджувані зразки призвели до зменшення титру вірусу на 2 lg і більше, різниця в 1 – 2 lg порівняно з контролем означає наявність помірного пригнічення вірусу грипу, якщо значення титру зменшились на 1 lg і менше – це відносна віруліцидна дія. Результати зображені на рисунку 3.7. вказують, що наночастинки $\text{La}_2\text{O}_3\text{-CeO}_2$ 0% проявили відносну віруліцидну дію проти вірусу грипу, зменшивши титр вірусу на 1 lg при експозиції 60 хв. Сполука $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 2% навіть при тривалому часі спостереження не виявила жодних віруліцидних ефектів, максимальне зменшення інфекційного титру становило 0,22 lg при експозиції 60 хв. У зразка $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 4% найбільшу віруліцидну дію було зафіксовано при безпосередньому додаванні наночастинок, при 0 хв титр вірусу зменшився на 1,1 lg, але з часом титри вірусу зростали, що може бути пов'язано з тим, що наночастинки можуть спочатку приєднуватись до віріонів, але з часом дисоціювати. Віруліцидна дія нанокompозиту $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ >5% є помірною, адже вона призвела до зменшення титру вірусу на 1,4 lg за годину часу. Тож, лантанвмісні наночастинки зі сріблом мають помірну віруліцидну активність.

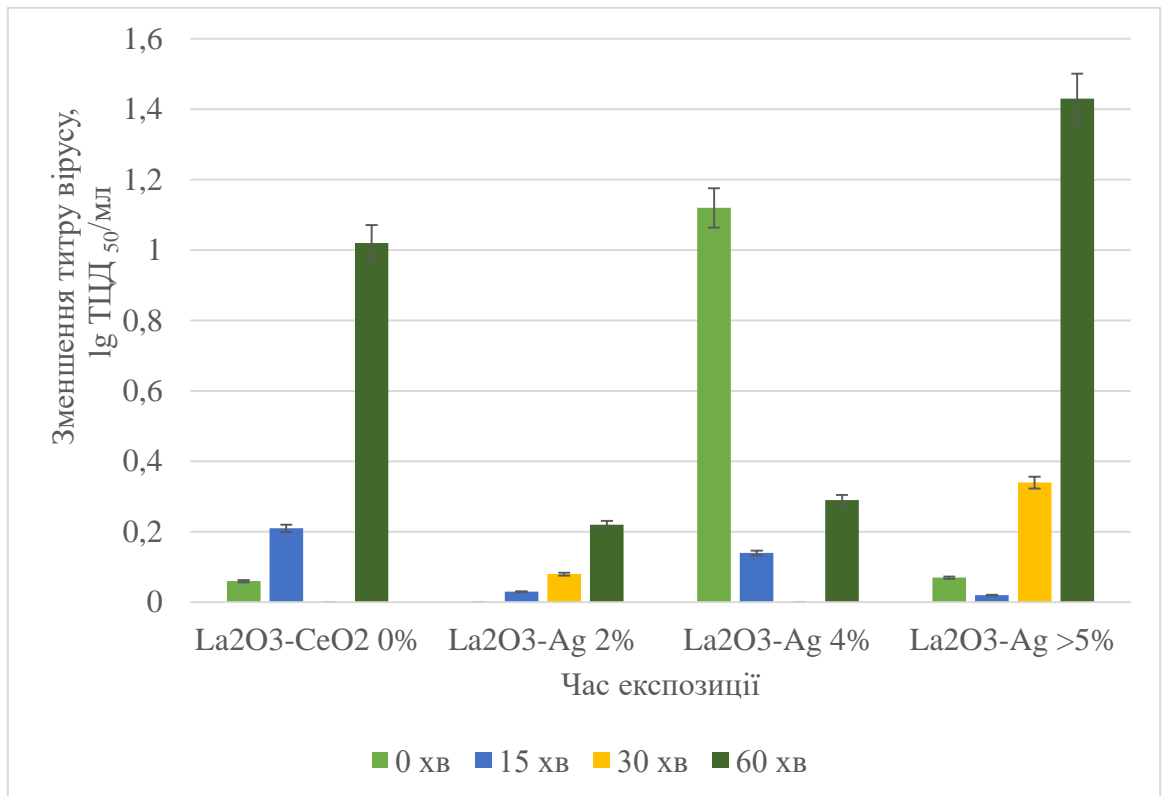


Рис. 3.7. Аналіз віруліцидної дії срібловмісних нанокompозитів

La₂O₃-CeO₂ 0%, La₂O₃-Ag 2%, La₂O₃-Ag 4% та La₂O₃-Ag >5% на вірус грипу

Церійвмісні нанокompозити характеризуються більш вираженою віруліцидною активністю. Зокрема на рисунку 3.8. можна спостерігати, що найкращу віруліцидну дію зафіксовано у зразка CeO₂-Ag 2%. Він має миттєвий противірусний ефект і вже через 15 хв було зафіксоване максимальне зменшення титру вірусу грипу. Віруліцидна дія цього зразка склала 6,1 lg, що свідчить про те, що в порівнянні з контролем в досліджуваних зразках взагалі не виявлено титр вірусу. Тестована речовина CeO₂-Ag 4% проявила слабку віруліцидну дію, через 60 хв експозиції титр вірусу зменшився на 0,9 lg. Сполука з найбільшою концентрацією срібла CeO₂-Ag >5 проявила досить сильну віруліцидну дію при експозиції 60 хв титр вірусу грипу зменшився на 3,6 lg, в порівнянні з контролем.

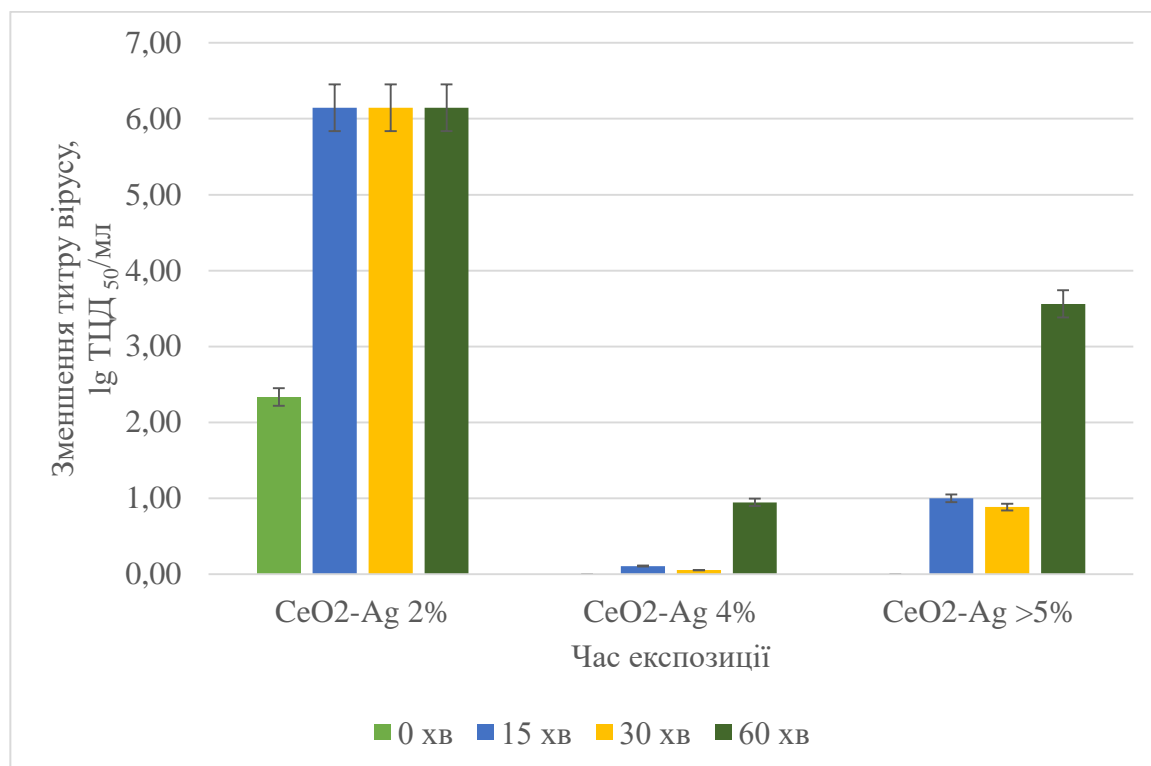


Рис. 3.8. Аналіз віруліцидної дії срібловмісних наноккомпозитів з церієм CeO₂-Ag 2%, CeO₂-Ag 4% та CeO₂-Ag >5 на вірус грипу

У даній роботі було проведено дослідження противірусного потенціалу срібловмісних наноккомпозитів відносно вірусу грипу. Усі досліджувані речовини були перевірені на наявність цитотоксичної дії. Встановлено, що зразки La₂O₃-CeO₂ 0%, La₂O₃-Ag 2%, La₂O₃-Ag 4%, La₂O₃-Ag >5%, CeO₂-Ag 4% та CeO₂-Ag >5 проявляють токсичну дію при концентрації 2000 мкг/мл. Срібловмісний наноккомпозит CeO₂-Ag 2% спричинив загибель клітин MDCK при концентрації 200 мкг/мл.

Наночастки із оксидами лантану мали проміжні значення протигрипозної активності. Відтак вони проявляли слабку антивірусну дію, значення якої для всіх лантанвмісних сполук зі сріблом коливались від 11% до 24%. Ці дані корелюють із результатами дослідження інгібування репродукції вірусу грипу після обробки срібловмісними наноккомпозитми, які також показали статистично незначне гальмування реплікації вірусу грипу. Проте нами було встановлено, що зразки La₂O₃-Ag 4% і La₂O₃-Ag >5% все-таки

проявляють помірну віруліцидну дію, для $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 4% вона становила 1,1 lg без інкубації, а для $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ >5% - 1,4 lg при експозиції 1 год. Але слід зазначити, що через годину інкубації вірусу грипу зі зразком $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 4% титр вірусу знову зростав і наближувався до значень контролю.

Срібловмісні наноккомпозити з церієм виявили більш ефективну протигрипозну дію, в порівнянні з лантанвмісними наночастками. Середні значення антивірусної дії церійвмісних сполук також були низькими і становили 5% - 26%. Однак цитопатична дія, зафіксована в зразках, могла бути результатом захисту клітин культури MDCK від новореplikованих дефектних віріонів вірусу грипу, які не спроможні до розмноження. Це підтверджують значення індексу пригнічення репродукції вірусу грипу наноккомпозитів $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 2%, $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 4% та $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ >5, які призвели до статистично значущого зменшення титру вірусу на 1 lg і більше. Також при аналізі титрів ізолятів вірусу, отриманих *de novo* після взаємодії з церійвмісними наночастками, було виявлено залежність між вмістом срібла та здатністю інгібувати репродукцію вірусу грипу. Зі зростанням масової частки срібла в церійвмісних наноккомпозитах, зменшувались титри вірусу в досліджуваних зразках, в порівнянні з контролем. Але в лантанвмісних наночасток такої кореляції не спостерігалось. Срібловмісні наноккомпозити із церієм також проявили досить сильну віруліцидну дію. Через годину інкубації вірусу з досліджуваними речовинами титри вірусу зменшилися на 1 lg і більше.

Наноккомпозит з лантаном і церієм без додавання срібла не виявив значущих відмінностей в противірусній дії, порівнюючи зі срібловмісними наноккомпозитами. Серед усіх досліджуваних зразків саме в сполук без срібла було визначено найнижчі значення антивірусної дії (до 11%). Індекс пригнічення репродукції вірусу грипу для лантан-церієвої наносполуки становив 1 lg при концентрації 100 мкг/мл. Також при інкубації 1 год вірусу

грипу з $\text{La}_2\text{O}_3\text{-CeO}_2$ 0% було зафіксовано відносну віруліцидну дію, яка становила 1 lg.

Отже, найбільш ефективними проти вірусу грипу виявились нанокompозити на основі срібла та оксидів церію, що пояснюється їх високою реакційною здатністю. Серед тестованих семи зразків наносполук найбільші протигрипозні властивості мали нанокompозити $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 2% та $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ >5. Значення віруліцидної дії зразків $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 2% і $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ >5 становили 6,1 lg та 3,6 lg відповідно. Наночастки $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 2% призвели до повного руйнування віріонів вірусу грипу. Оскільки ці сполуки також призвели до значного зменшення інфекційного титру вірусу грипу, синтезованого *de novo* та не проявили значних цитотоксичних ефектів, вони мають великих протівірусний потенціал і є перспективними препаратами проти РНК-вірусів та потребують подальшого вивчення.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено цитотоксичну концентрацію нанокompatитів на основі лантану та церію з різним вмістом срібла, що викликає 50% інгібування життєздатності популяції клітин MDCK. Для шести із семи досліджених сполук ($\text{La}_2\text{O}_3\text{-CeO}_2$ 0% , $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 4%, $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ >5, $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 2%, $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ 4% та $\text{La}_2\text{O}_3\text{-Ag}$ >5%) вона становить 2000 мкг/мл. Лише наночастинки $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 2% демонстрували токсичні ефекти за концентрації 200 мкг/мл.
2. Продемонстровано, що нанокompatити на основі лантану та церію з різним вмістом срібла мають слабку противірусну активність проти вірусу грипу у межах 4 – 24 % для всіх досліджуваних сполук.
3. Показано, що церійвмісні сполуки зі сріблом здатні знижувати інфекційний титр *de novo* вірусу грипу. Наночастинки $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ >5 пригнічували репродукцію вірусу грипу на 2,2 lg – 3,2 lg за різних концентрацій.
4. Підтверджено віруліцидну дію наночастинок $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ 2% і $\text{CeO}_2\text{-Ag}$ >5, які спричинювали зниження інфекційного титру вірусу грипу на 6,2 lg та 3,6 lg, відповідно, при експозиції 60 хв.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Jeevanandam, J., Pal K., Danquah, M.K. (2019). Virus-like nanoparticles as a novel delivery tool in gene therapy. *Biochimie*, 157, pp. 38–47.
2. Imani, S., Ladouceur, L., Marshall, T., Maclachlan, R., Soleymani, L., Didar, T. (2020). Antimicrobial nanomaterials and coatings: current mechanisms and future perspectives to control the spread of viruses including SARS-CoV-2. *ACS Nano*, 14, pp. 12341–12369.
3. Al-Sanea, M., Abelyan, N., Abdelgawad, M., Musa, A., Ghoneim, M., Al-Warhi, T., Aljaeed, N., Alotaibi, O., Alnusaire, T., Abdelwahab, S. (2021). Strawberry and ginger silver nanoparticles as potential inhibitors for SARS-CoV-2 assisted by in silico modeling and metabolic profiling. *Antibiotics*, 10, p. 824.
4. Sharma, G., Kumar, A., Sharma, S., Naushad, M., Dwivedi, R., Alothman, Z., Mola, G. (2019). Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites: a review. *J. King Saud Univ. Sci.*, pp. 257–269.
5. Li, Q., Liu, F., Li, M., Chen, C., Gadd, G.M. (2021). Nanoparticle and nanomineral production by fungi. *Fung. Biol. Rev.*
6. Jeevanandam, J.K., Danquah, M., Debnath, S., Meka, V., Chan, Y. (2015). Opportunities for nano-formulations in type 2 diabetes mellitus treatments. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16, pp. 853–870.
7. Rehman, S., Asiri, S.M., Khan, F.A., Jermy, B.R., Khan, H., Akhtar, S., Jindan, R.A., Khan, K.M., Qurashi, A. (2019). Biocompatible tin oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial, anticandidal and cytotoxic activities. *Chem. Sel.* 4, pp. 4013–4017.
8. Ghodrati, M., Mir, A., Farmani, A. (2021). Non-destructive label-free biomaterials detection using tunneling carbon nanotube-based biosensor. *IEEE Sens. J.* 21, pp. 8847–8854.

9. Pareek, V., Bhargava, A., Gupta, R., Jain, N., Panwar, J. (2017). Synthesis and applications of noble metal nanoparticles: a review. *Adv. Sci. Eng. Med.* 9, pp. 527–544.
10. Rehman, S., Asiri, S.M., Khan, F.A., Jermy, B.R., Ravinayagam, V., Alsalem, Z., Jindan, R.A., Qurashi, A. (2020). Anticandidal and in vitro anti-proliferative activity of sonochemically synthesized indium tin oxide nanoparticles. *Sci. Rep.* 10, p. 3228.
11. Kalimuthu, K., Cha, B.S., Kim, S., Park, K.S. (2020). Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: a review. *Microchem. J.* 152, pp. 104-296.
12. Hussein, H.A., Abdullah, M.A. (2020). Functional bionanomaterials. *New York: Springer*, pp. 313–332.
13. Burdusel, A.C., Gherasim, O., Grumezescu, A.M., Mogoanta, L., Ficai, A., Andronescu, E. (2018). Biomedical applications of silver nanoparticles: an up-to-date overview. *Nanomaterials*, 8, p. 681.
14. Behera, S., Debata, A. (2011). Biomedical applications of silver nanoparticles. *J. Asian Sci. Res* 1, p. 27.
15. Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L., Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *J. Adv. Res*, 7, pp. 17–28.
16. Hillenkamp, M., Di Domenicantonio, G., Eugster, O., Felix, C. (2006). Instability of Ag nanoparticles in SiO₂ at ambient conditions. *Nanotechnology*, 18, p. 157.
17. Travan, A., Marsich, E., Donati, I., Paoletti, S. (2010). Silver nanocomposites and their biomedical applications. *Weinheim: Wiley-VCH*.
18. Patra, J.K., Baek, K.H. (2014). Green nanobiotechnology: factors affecting synthesis and characterization techniques. *J. Nanomater*, p. 219.
19. Ming, Luo, Michael, G., Venigalla B. (2011). Influenza virus entry. *Viral Molecular Machines*, 726, pp. 201–221.

20. O'Neill, R.E., Talon, J., Palese, P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.*, 17, pp. 288–296.
21. Hay, A.J., Gregory, V., Douglas, A.R., Lin, Y.P. (2001). The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 356, pp. 1861–1870.
22. Wilson, I.A., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1981). Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*, 289, pp. 366–373.
23. Yen, H.L., Webster, R.G. (2009). Pandemic influenza as a current threat. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 333, pp. 3–24.
24. Compans, R.W., Klenk, H.D., Caligiuri, L.A., Choppin, P.W. Influenza virus proteins. I. (1970). Analysis of polypeptides of the virion and identification of spike glycoproteins. *Virology*.
25. Bottcher, C., Ludwig, K., Herrmann, A., Van Heel, M., Stark, H. (1999). Structure of influenza haemagglutinin at neutral and at fusogenic pH by electron cryo-microscopy. *FEBS Lett.*, 463, pp. 255–259.
26. Lakadamyali, M., Rust, M.J., Babcock, H.P., Zhuang, X. (2003). Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, pp. 9280–9285.
27. Gubareva, L.V. (2004). Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus. Res.*, 103, pp. 199–203.
28. Gaymard, A., Le Briand, N., Frobort, E., Lina, B., Escuret, V. (2016). Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses. *Clin. Microbiol. Infect.*, 22, pp. 975–983.
29. Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R.W., Baudin, F. (2007). Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus. Res.*, 124, pp. 12–21.

30. Herz, C. (1981). Influenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells. *Cell*, 26, pp. 391–400.
31. Goraya, M.U., Wang, S., Munir, M., Chen, J.L. (2015). Induction of innate immunity and its perturbation by influenza viruses. *Protein Cell*, 6, pp. 712–721.
32. Hayden, F. (2009). Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold? *Clin Infect Dis.*, 48 (1), pp. S3–S13.
33. Liu, C., Eichelberger, M.C., Compans, R.W., Air, G.M. (1995). Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol.*, 69, pp. 1099–1106.
34. Hurt, A.C., Holien, J.K., Barr, I.G. (2009). In vitro generation of neuraminidase inhibitor resistance in A (H5N1) influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, pp. 4433–4440.
35. Kilby, J.M., Hopkins, S., Venetta, T.M., Di Massimo, B., Cloud, G.A., Lee, J.Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M.R., Nowak, M.A., Shaw, G.M., Saag, M.S. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med.*, 4, pp. 1302–1307.
36. Heider, H., Markushin, S., Schroeder, C., Ghendon, Y. (1985). The influence of Norakin on the reproduction of influenza A and B viruses. *Arch Virol.*, 86, pp. 283–290.
37. Ghendon, Y., Markushin, S., Heider, H., Melnikov, S., Lotte, V. (1986). Haemagglutinin of influenza A virus is a target for the antiviral effect of Norakin. *J Gen Virol.*, 67 (Pt 6), pp. 1115–1122.
38. Ott, S., Wunderli-Allenspach, H. (1994). Effect of the virostatic Norakin (triperiden) on influenza virus activities. *Antiviral Res.*, 24, pp. 37–42.
39. Yoshimoto, J., Kakui, M., Iwasaki, H., Fujiwara, T., Sugimoto, H., Hattori, N. (1999). Identification of a novel HA conformational change inhibitor of human influenza virus. *Arch Virol.*, 144, pp. 865–878.

40. Hoffman, L.R., Kuntz, I.D., White, J.M. (1997). Structure-based identification of an inducer of the low-pH conformational change in the influenza virus hemagglutinin: irreversible inhibition of infectivity. *J Virol.*, 71, pp. 8808–8820.
41. Moscona, N/ (2005). A Neuraminidase inhibitors for influenza. *Engl J Med*, 353, pp. 1363–73.
42. Frederick, G. Hayden, Nahoko, Shindo. (2019). Influenza virus polymerase inhibitors in clinical development.
43. Oxford, J.S., Bossuyt, S., Balasingam, S., Mann, A., Novelli, P., Lambkin, R. (2003). Treatment of epidemic and pandemic influenza with neuraminidase and M2 proton channel inhibitors.
44. Dong, Y., Zhu, H., Shen, Y., Zhang, W., Zhang, L. (2019) Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against *Vibrio Natriegens*. *PLoS ONE*.
45. Sibbald, R.G., Contreras-Ruiz, J., Coutts, P., Fierheller, M., Rothman, A., Woo, K. (2007). Bacteriology, inflammation, and healing: a study of nanocrystalline silver dressings in chronic venous leg ulcers. *Adv. Skin Wound Care*, 20, pp. 549–558.
46. Makvandi, P., Nikfarjam, N., Sanjani, N.S., Qazvini, N.T. (2015). Effect of silver nanoparticle on the properties of poly (methyl methacrylate) nanocomposite network made by in situ photoiniferter-mediated photopolymerization. *Bull. Mater. Sci.*, 38, pp. 1625–1631
47. Ranu, B., Stolle, A., Cravotto, G., Juaristi, E., Su, W., Lamaty, F., Friscic, T., Mack, J., Takahiro, H., Kraus, G. (2014). Ball Milling Towards Green Synthesis: Applications, Projects, Challenges. *Royal Society of Chemistry*.
48. Serra, P., Duocastella, M., Fernández-Pradas, J.M., Morenza, J.L. (2010). Advances in laser materials processing: technology, research and applications. *Cambridge: Woodhead Publishing*, pp. 367–393.

49. Jose Varghese, R., Sakho, E.H.M., Parani, S., Thomas, S., Oluwafemi, O.S., Wu, J. (2019). Introduction to nanomaterials: synthesis and applications. *Nanomaterials for Solar Cell Applications. Amsterdam: Elsevier*, pp. 75–95.
50. Barry, C., Grant, N. (2007). *Sols, Gels, and Organic Chemistry. New York: Springer*, pp. 411–422.
51. Xu, Q.T., Li, J.C., Xue, H.G., Guo, S.P. (2018). Binary iron sulfides as anode materials for rechargeable batteries: crystal structures, syntheses, and electrochemical performance. *J. Power Sources*, 379, pp. 41–52.
52. Fayaz, M., Tiwary, C.S., Kalaichelvan, P.T., Venkatesan, R. (2010). Blue orange light emission from biogenic synthesized silver nanoparticles using *Trichoderma viride*. *Colloids Surf. B.*, 75, pp. 175–178.
53. Kaur, G., Kalia, A., Sodhi, H.S. (2020). Size controlled, time-efficient biosynthesis of silver nanoparticles from *Pleurotus florida* using ultra-violet, visible range, and microwave radiations. *Inorg. Nano-Met. Chem.*, 50, pp. 35–41.
54. Palacios-Hernandez, T., Diaz-Diestra, D.M., Nguyen, A.K. (2020). Cytotoxicity, cellular uptake and apoptotic responses in human coronary artery endothelial cells exposed to ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Appl Toxicol*.
55. Lebda, M.A., Sadek, K.M., Tohamy, H.G. (2018). Potential role of α -lipoic acid and Ginkgo biloba against silver nanoparticles-induced neuronal apoptosis and blood-brain barrier impairments in rats. *Life Sci.*, 212, pp. 251–260.
56. Iris Xiaoxue Yin, Jing Zhang, Irene Shuping Zhao, May Lei Mei, Quanli Li, Chun Hung Chu (2020). *The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry*
57. Ismail, G.A., El-Sheekh, M.M., Samy, R.M., Gheda, S.F. (2021). Antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities of biosynthesized silver

- nanoparticles by phycobiliprotein crude extract of the cyanobacteria *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia*. *Bionanoscience*, 11, pp. 355–370.
58. Castro-Mayorga, J.L., Randazzo, W., Fabra, M.J., Lagaron, J.M., Aznar, R., Sánchez, G. (2017). Antiviral properties of silver nanoparticles against norovirus surrogates and their efficacy in coated polyhydroxyalkanoates systems. *LWT Food Sci. Technol.*, 79, pp. 503–510.
59. Lara, H.H., Ayala-Nuñez, N.V., Ixtapan-Turrent, L., Rodriguez-Padilla, C. (2010). Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J. Nanobiotechnol.*, 8, p. 1.
60. Villeret, B., Dieu, A., Straube, M., Solhonne, B., Miklavc, P., Hamadi, S., Le Borgne, R.M., Mailleux, A., Norel, X., Aerts, J. (2018). Silver nanoparticles impair retinoic acid-inducible gene I-mediated mitochondrial antiviral immunity by blocking the autophagic flux in lung epithelial cells. *ACS Nano.*, 12, pp. 1188–1202.
61. Mori, Y., Tagawa, T., Fujita, M., Kuno, T., Suzuki, S., Matsui, T., Ishihara, M. (2011). Simple and environmentally friendly preparation and size control of silver nanoparticles using an inhomogeneous system with silver-containing glass powder. *J. Nanopart. Res.*, 13, pp. 2799–2806.
62. Lara, H.H., Garza-Treviño, E.N., Ixtapan-Turrent, L., Singh, D.K. (2011). Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *J Nanobiotechnology*.
63. Xu, C., Qu, X. (2014). Cerium oxide nanoparticle: A remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications. *NPG Asia Mater.*, p. 90.
64. Geraets, L., Oomen, A.G., Schroeter, J.D., Coleman, V.A., Cassee, F.R. (2012). Tissue distribution of inhaled micro- and nano-sized cerium oxide particles in rats: Results from a 28-day exposure study. *Toxicol Sci.*, 127, pp. 463–473.

65. Yokel, R.A., Hussain, S., Garantziotis, S., Demokritou, P., Castranova, V., Cassee, F.R. (2014). The Yin: An adverse health perspective of nanoceria: Uptake, distribution, accumulation, and mechanisms of its toxicity. *Environ. Sci. Nano.*, 1, pp. 406–428.
66. Mazzolini, J., Weber, R.J., Chen, H.S., Khan, A., Guggenheim, E., Shaw, R.K., Chipman, J.K., Viant, M.R., Rappoport, J.Z. (2016). Protein Corona Modulates Uptake and Toxicity of Nanoceria via Clathrin-Mediated Endocytosis. *Biol. Bull.*, 231, pp. 40–60.
67. Gaëlle DevaL, Sonja Boland, Thierry Fournier, Ioana Ferecatu (2021). On Placental Toxicology Studies and Cerium Dioxide Nanoparticles
68. Lachine, E.E., Noujaim, A.A., Ediss, C., Wiebe, L.I. (1976). Toxicity, tissue distribution and excretion of $^{46}\text{ScCl}_3$ and $^{46}\text{Sc-EDTA}$ in mice. *J. Appl. Radiat. Isot.*, 27, pp. 373–377.
69. Cheol-Hong Lim (2015). Toxicity of Two Different Sized Lanthanum Oxides in Cultured Cells and Sprague-Dawley Rats 31(2), pp. 181–189.
70. Xue, J., Chambers, B.S., Hensley, S.E., López, C.B. (2016). Propagation and Characterization of Influenza Virus Stocks That Lack High Levels of Defective Viral Genomes and Hemagglutinin Mutations. *Front. Microbiol.*, 7, p. 326.
71. Клестова, З.С. (2010) Методичні рекомендації з визначення та контролю антивірусних властивостей речовин в системі *in vitro*. К.: Центр інформаційних технологій, с. 32
72. Toned, A., Joubert, A., Cromarty, D. (2015) Limitation of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*, 8(47), pp. 1-10
73. Щербінська, А.М, Дяченко, Н.С, Рибалко, С.Л, Носач, Л.М, Дядюн, С.Т, Вринчану Н.О. (2001). Доклінічні дослідження лікарських засобів.

За редакцією Стефанова О.В. Вивчення антивірусної дії потенційних лікарських засобів. Київ. *Методичні рекомендації*, сс.371-395.

74. Kohn, L.K., Foglio, M.A., Rodrigues, R.A., Sousa, I.M., de O Martini, M.C., Padilla, M.A., Lima Neto, D.F. de Arns, C.W. (2015) In-Vitro Antiviral Activities of Extracts of Plants of The Brazilian Cerrado against the Avian Metapneumovirus (aMPV). *Brazilian Journal of Poultry Science*, 17(3), pp. 275-280.
75. Шеламова, М. А., Інсарова, Н. І., Лещенко, В. Г. (2018). Статистичний аналіз медико-біологічних даних з використанням програми EXCEL. Мінськ. *Методичні рекомендації*, сс.39-43