

Міністерство освіти і науки України  
Національний університет “Києво-Могилянська Академія”  
Факультет природничих наук  
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

**Магістерська робота**

Освітній ступінь – магістр

на тему: «**ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ СОЛЕЙ ЦЕРІЮ НА БІОЛОГІЧНУ СИСТЕМУ ВІРУС-КЛІТИНА**»

Виконала: студентка 2-го року навчання,  
Спеціальності  
091 Біологія

Шеревера Христина Петрівна

Керівник Жолобак Н. М.,

кандидат біологічних наук, старший  
науковий співробітник Інституту  
мікробіології та вірусології імені Д. К.  
Заболотного НАН України

Рецензент: Волошина І.М.

Магістерська робота захищена з  
оцінкою \_\_\_\_\_

Секретар ЕК Пахаренко М. В.

« 7 » червня 2021 р.

Київ – 2021 р.

## ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	4
ВСТУП .....	5
РОЗДІЛ 1 .....	6
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	6
1.1. Взаємодія вірусів із клітинами .....	6
1.2. Роль металів у клітині .....	15
1.3. Вільні оксидні радикали у функціонуванні клітини .....	17
1.4. Наночастинки діоксиду церію як антиоксиданти .....	24
1.5. Інтерферонова відповідь на вірусну інфекцію .....	30
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....	35
РОЗДІЛ 2.....	35
ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	35
2.1. Об'єкти дослідження.....	35
2.2. Реактиви та обладнання, необхідні для досліджень .....	35
2.2.1. Реактиви:.....	35
2.2.2. Обладнання: .....	36
2.3. Техніка методу .....	36
2.3.1. Методи культивування клітин. ....	36
2.3.2. Методи роботи з вірусом. ....	39
2.3.3. Методика роботи з солями церію. ....	39
2.3.4. Методи аналізу результатів. ....	42
РОЗДІЛ 3.....	43
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	43
3.1. Антивірусна дія солей церію за профілактичної схеми.....	43
3.2. Антивірусна дія наночастинок діоксиду церію.....	45
3.3. Антивірусна дія солей церію за лікувальної схеми .....	46
3.4. Дослідження виділення інтерферону клітинами під дією солей церію .....	47
3.5. Сумісна дія церію та інтерферону.....	48
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	52

ВИСНОВКИ.....	57
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	58
ДОДАТКИ .....	66

## СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

длДНК	дволанцюгова ДНК
ЕПС	ендоплазматична сітка
ІНФ	інтерферон
НДЦ	наночастинки діоксиду церію
олДНК	одноланцюгова ДНК
РФО	реактивні форми оксигену
ASK-1	апоптоз-регулююча кіназа-1 (apoptosis signal regulating kinase 1)
EGF	епідермальний фактор росту (epidermal growth factor)
HSV	вірус простого герпесу
PAMP	маркери вірусної інфекції (pathogen associated molecular pattern)
PDGF	тромбоцитарний фактор росту (platelet-derived growth factor)
Pkr	протеїн-кіназа R (dsRNA-activated protein kinase)
TNF	фактор некрозу пухлин (tumor necrosis factor)
Trx	тіоредоксин

## ВСТУП

Біометали перебувають в організмі у йонній формі – як катіони або ж утворюють ковалентні пари з білками. До перших належать натрій і калій. До другої категорії відносяться купрум, цинк, ферум, молібден та більшість металів мікроелементів. Ці метали мають кілька ступенів окиснення та змінюють свій ступінь окиснення залежно від зовнішніх умов. Завдяки цьому вони беруть участь в окисно-відновних процесах. Найчастіше вони є кофакторами окисно-відновних ферментів та приймають і віддають електрони.

Церій – метал-лантаноїд. Дотепер церію не було виявлено у клітині. Елемент церій має три ступені окиснення: +2, +3, +4. Раніше було показано, що церій може змінювати ступінь окиснення між значеннями +3/+4. Найчастіше це відбувається на поверхні наночасток діоксиду церію –  $\text{CeO}_2$ . Саме тому лантаноїд церій може слугувати одноелектронним передавачем, як ферум, купрум та цинк. Таким чином, дослідження його дії на клітину може виявитися цікавим та корисним.

Тема антивірусної активності металів та їх наночасток вивчалася і раніше. Однак, більшість статей із цієї теми стосувалися наночасток срібла. Так, було доведено, що наночастки аргентуму мають віруліцидну дію проти ВІЛу, гепатиту В, респіраторно-синцитіального вірусу та ряду інших вірусів [1]. Звісно, володіти антивірусними властивостями може значна частина металів. Вважається, що пристосування збудників до металів відбувається повільніше, ніж до органічних терапевтичних засобів.

Метою роботи було визначення впливу солей церію на біологічну систему вірус-клітина. Завданнями роботи було дослідити антивірусні властивості солей церію, вивчити механізм антивірусної дії солей та визначити сумісну дію солі церію та інтерферону. Дослідження виконане *in vitro*. Об'єктом роботи є модельна система вірусу та чутливої культури, при дії солей. Предмет дослідження – антивірусні властивості солей церію.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Взаємодія вірусів із клітинами

Оскільки дане дослідження стосується не просто клітини, а вірусу та чутливої до нього клітини, доцільно було би згадати основні етапи взаємодії вірусу та клітини.

Тягар розмноження вірусів цілковито лягає на клітину. Синтетичні процеси у клітині перепрограмовуються на синтез вірусних складових: геному та білкових оболонок. Розмноження вірусу дещо нагадує виробництво на фабриці, бо нуклеїнова кислота та білки синтезуються, як і фабричні деталі – окремо, а потім збираються разом у новий віріон. Таке особливе розмноження (диз'юнктивне) властиве лише вірусам і не властиве жодній іншій формі живого. Тому диз'юнктивне розмноження вірусів – одна з підстав сумніватися в тому, чи належать віруси до живого [2].

Процес взаємодії вірусу і клітини розділяють на такі етапи: адсорбція вірусу на поверхні клітини; проникнення вірусу в клітину; роздягання (депротеїнізація) вірусу; синтез білків; реплікація вірусного геному; збирання вірусних часток; вихід віріонів із клітини.

Саме за цими стадіями відбувається інфікування вірусом окремої клітини. Розмноження вірусів розпочинається з адсорбції або прикріплення до поверхні клітини. Викликати адсорбцію вірусу можуть і неспецифічні взаємодії. Наприклад, електростатичне притягання між негативно зарядженою групою на капсидній оболонці та позитивно зарядженою групою на поверхні клітини наближує вірус до клітини. Проте ці неспецифічні взаємодії короткотривалі і не забезпечують стійкого необоротного зв'язування. Для подальшого проникнення нуклеїнової кислоти всередину віріону необхідне високоспецифічне зв'язування – між клітинним

рецептором та прикріпним білком вірусу. Найчастіше прикріпними білками вірусу є глікопротеїни, які виступають над поверхнею віріону; їх іще називають шипи [2].

Тест-вірусом цього дослідження є вірус везикулярного стоматиту, штам Індіана. Його прикріпний білок – G-білок, поверхневий глікопротеїд. G-білок зв'язується зі LDL-рецептором (рецептор ліпопротеїнів низької щільності) на поверхні клітини. Взагалі, G-білку властива широка специфічність, і він зв'язується з різними білковими молекулами, котрі належать до рецепторів ліпопротеїнів низької щільності [3].

Як відомо, віруси є паразитами всього живого. Вони є у бактерій, у архей, одноклітинних водоростей та протистів, у рослин та у тварин. Проте клітини у кожного з хазяїв є дуже різними. Перш за все, вони вкриті різноманітними оболонками, а саме, бактеріальними клітинними стінками, мішкоподібним паракристалом у архей, клітинними стінками у рослинних чи грибних клітин, або ж відносно тонкою плазмалемою у тварин. Відповідно, різноманітними є і стратегії вірусів – як наблизитися до клітини та проникнути у потрібну.

Деякі віруси активно долають клітинні покриви. Більшість бактеріофагів кодує у своєму геномі ферменти, які локально пошкоджують клітинну стінку. Наприклад, бактеріофаг T4 впорскує свій геном всередину бактерії завдяки білку gp5, який має лізоцимну активність та локалізований на базальній пластинці [4].

На відміну від бактеріофагів, віруси рослин проникають у клітину пасивно: через пошкодження клітинної стінки та завдяки переносникам – комахам, нематодам та ін. Також віруси рослин передаються від батьківської рослини до дочірньої при розмноженні – статевому та вегетативному.

Проте, навіть серед вірусів людини та тварин, які долають лише плазматичну мембрану, є сотні способів проникнення всередину клітини. В їх основі лежить один з трьох процесів: проникнення вірусу шляхом

ендоцитозу; злиття вірусної оболонки з цитоплазматичною мембраною; проникнення лише вірусного геному крізь цитоплазматичну мембрану.

У першому випадку після адсорбції вірусу утворюється клатрин-облямована ямка. Ямка, у якій міститься віріон, поглиблюється і перетворюється в увігнутість цитоплазми, а вірус зусібіч оточується клітиною. Таким чином вірус, що зв'язався зі своїм рецептором, замикається всередині везикули та проходить у цитоплазму. Згодом везикула, що містить вірус, зливається з клітинними ендосомами, у яких містяться кислі ферменти. У результаті внутрішнє середовище везикули закислюється так, що експонуються гідрофобні домени капсиду. Це і запускає процес злиття між вірусною оболонкою та мембраною везикули, а серцевина складного вірусу разом із геномом вивільняється в цитоплазму. Згодом вірусна ДНК чи РНК вивільниться і від білків нуклеокапсиду – відбудеться роздягання або ж депротейнізація вірусу. Прості віруси, що не мають біліпідної мембрани, часто також замикаються у везикулу.

Для вірусу поліомієліту, який належить до родини *Picornaviridae*, властивий наступний механізм. Коли рН везикули падає, вірусний капсид перебудовується таким чином, що одноланцюгова +РНК може “вийти” з капсиду. Тим часом від білків капсида звільняється міристинова кислота, що пронизує мембрану везикули та утворює в ній пори. Через ці пори +РНК вірусу поліомієліту проходить в цитоплазму [5].

Складні віруси крім білкової оболонки – капсиду – оточені ще й біліпідним шаром – суперкапсидом. Можливо, через це складні віруси проникають всередину клітини злиттям мембран вірусу та плазмалеми. Злиття може відбуватися як на поверхні клітини, так і в ендосомі. Так, на поверхні цитоплазматичної мембрани проходить злиття вірусів, що входять до родин *Coronaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Retroviridae*. Злиття віріона з мембраною у ендосомі властиве родинам *Orthomyxoviridae* та *Rhabdoviridae* [6]. Однак, для злиття мембрани вірусу та клітини потрібно, щоб вірус попередньо зв'язався зі своїм рецептором.

Щодо везикуловірусу Індіана, то після зв'язування G-білка з LDL-рецептором вірус потрапляє у везикулу, частково облямовану клатрином. Везикула формується завдяки АТФ-залежній полімеризації клатрину. А завдяки білку динаміну інвагінація цитоплазми відбруньковується від плазмалеми у вигляді клатрин-облямованої везикули. Транспорт везикул із везикуловірусом відбувається за допомогою перебудов актину. Згодом вірусна мембрана та мембрана ендосоми зливаються, а нуклеокапсид потрапляє в цитоплазму [3].

Проникнення лише вірусного геному через плазматичну мембрану властиве більшості бактеріофагів. Такий спосіб проникнення вірусу в клітину називається впорскуванням нуклеїнової кислоти. У цьому разі проникнення нуклеїнової кислоти та депротейнізація вірусу відбуваються одночасно, оскільки пустий капсид залишається ззовні клітини.

Основною метою для вірусу є розмноження власного геному. У 1971 році вірусолог Девід Балтімор підготував статтю *Expression of Animal Virus Genomes*, у якій класифікував віруси за типом нуклеїнової кислоти. Пізніше було запропоновано розділити віруси на 7 груп за типом геному [7]. До першого типу належать віруси із дволанцюговою ДНК, до другого – віруси із одноланцюговою ДНК, до третього – із дволанцюговою РНК, до четвертого – віруси із одноланцюговою (+)РНК, до п'ятого – із одноланцюговою (-)РНК, до шостого – із одноланцюговою (+)РНК із етапом зворотної транскрипції, та, нарешті, до сьомого типу – віруси із дволанцюговою ДНК з етапом зворотної транскрипції.

Зручність класифікації за Балтімором полягає у тому, що транскрипція вірусів, що входять до однієї групи, є подібною. Варто зазначити, що дві нитки геному у подвійній спіралі ДНК відрізняються між собою. Та нитка, з якої відбувається транскрипція мРНК, називається некодуючою або антисенс-ниткою, а нитка ДНК, що є комплементарною антисенс-нитці, називається кодуючою або сенс-ниткою. Хоч транскрипція відбувається не із

сенс-нитки, а з антисенс-нитки ДНК, новоутворена молекула РНК буде подібною саме до сенс-нитки ДНК.

Для РНК також існують плюс (+) та мінус (-) молекули. Однак у цьому випадку (+)РНК слугує матрицею для трансляції білка, а (-)РНК – для транскрипції та реплікації.

У длДНК вірусів мРНК транскрибується з антисенс-ланцюга ДНК, як і в еукаріотів. Транскрипцію зазвичай виконує клітинна ДНК-залежна РНК-полімераза II [8]. Одним із винятків є представники *Poxviridae*, оскільки у складі їхнього віріону запаковано власну вірусну полімеразу.

Одноланцюгова ДНК спершу перетворюється у двониткову форму, а з дволанцюгової форми транскрипція відбувається з антисенс-ланцюга ДНК.

Одноланцюгові (+)РНК геноми є одночасно і матричними РНК. Однак, для розмноження (+) РНК молекул потрібно синтезувати дволанцюгову РНК, яка би складалася з плюс та мінус РНК. На (+)-нитці РНК утворюється (-)-нитка РНК, із якої знову синтезується (+)РНК або малі фрагменти цієї (+)РНК, що мають назву субгеномні РНК. Вигідність субгеномних РНК полягає у тому, що кожна з цих невеликих молекул РНК кодує окремий білок. Субгеномні РНК утворюються, коли на геномі декілька промоторних ділянок, які заякорюють полімеразу, і фермент може зв'язатися з матрицею в декількох місцях – утворюються РНК-транскрипти різної довжини. Транскрипцію зазвичай виконує вірусна РНК-залежна РНК-полімераза.

Мінус РНК слугують матрицею для транскрипції та реплікації, тоді як для трансляції білків вірусам потрібний (+)РНК відповідник їхнього геному. Віруси з одноланцюговим (-)РНК-геномом уражують лише еукаріотів. Відомо, що в еукаріотів з однієї зрілої мРНК синтезується один білок. Саме тому (-)РНК-вмісним вірусам довелося пристосовуватися транскрибувати (-) РНК геном частинами. Геном тест-вірусу, використаного в цій роботі, везикуловірусу Індіана, також представлений (-)РНК. У вірусу везикулярного стоматиту послідовності, що кодують окремі білки, розділені поліуридиловими сайтами. Поліуридиловий сайт – це сигнал термінації

транскрипції. Цікаво, що на цих полі-У послідовностях РНК-полімераза ніби «пробуксовує», одночасно додаючи більше аденілових залишків на 3'-кінець транскрипту [3].

Одноланцюгова (+)РНК з етапом зворотної транскрипції – це особливий тип геному ретровірусів. Його унікальність полягає у тому, що за допомогою вірусної зворотної транскриптази на матриці РНК синтезується ДНК. Ця ДНК потім вбудовується в геном клітини, і тільки після інтегрування вірусної ДНК в геном клітинні ферменти транскрибують вірусну мРНК одночасно з власними.

Вірусні родини *Caulimoviridae* та *Hepadnaviridae*, у тому числі і вірус гепатиту В, мають дволанцюговий кільцевий ДНК-геном. ДНК-геном слугує матрицею для синтезу мРНК та РНК-посередника. Згодом на матриці РНК за допомогою зворотної транскриптази реплікується ДНК-геном дочірніх вірусів [9].

Реплікація геному – найважливіше завдання вірусів. Для цього використовуються ферменти ДНК-полімераза та репліказа (РНК-полімераза). Усі РНК-вмісні віруси кодують власні полімерази, у той час як ДНК-віруси або мають власний запакований фермент всередині віріону, або ж використовують клітинний реплікаційний апарат.

Якщо геном вірусу представлений сенс-олДНК, то спершу на матриці геному синтезується комплементарна нитка антисенс-ДНК. Так утворюється дволанцюгова реплікативна форма. Далі сенс-нитка витісняється з дуплексу, а на антисенс-нитці синтезується багато копій сенс-нитки ДНК.

Якщо геном вірусу представлено антисенс-олДНК, то реплікація відбувається навпаки. На матриці геному синтезується комплементарна нитка сенс-ДНК, утворюється дволанцюгова реплікативна форма. Після цього антисенс-нитка витісняється з дуплексу, а матриця звільняється для синтезу багатьох копій геному.

Для одноланцюгових РНК-вірусів реплікація проходить подібно, з утворенням невласливих для клітини дволанцюгових реплікативних форм.

Однак завжди для РНК-вірусів, перш ніж реплікуватиметься геном, повинна синтезуватися репліказа (РНК-залежна РНК-полімераза). Зазвичай, реплікація геному РНК-вмісних вірусів проходить у цитоплазмі (за виключенням вірусу грипу), а ДНК-вмісних – у ядрі клітини (виключення – поксвіруси). Реплікація геному відбувається рано в ході інфекції – перед накопиченням структурних білків вірусу. Реплікація геному залежна від транскрипції. Транскрипція вірусів проходить по черговому. У ДНК-вірусів розрізняють три періоди транскрипції: надранній, ранній і пізній, а у РНК-вірусів – лише два: транскрипцію ранніх генів та транскрипцію пізніх генів. У ході ранньої транскрипції з'являються ферменти, необхідні для реплікації та транскрипції. Під час другої хвилі транскрипції синтезуються структурні білки – компоненти капсиду та нуклеокапсиду.

Трансляція вірусного геному – це синтез вірусних білків. Як і клітинна трансляція, вона має стадію ініціації, елонгації, термінації та посттрансляційну модифікацію. Трансляція вірусних білків може відбуватися з моноцистронних мРНК, синтезованих на матриці ДНК, (+)РНК-геному та (-)РНК-геному. Якщо вірус має (+)РНК-геном, найвигідніше для нього – розпочати трансляцію відразу. В ході такої “експрес”-трансляції утворюється поліпротеїн, який згодом повинен розщепитися на окремі білки. У флавівірусів протеоліз протеїну відбувається ще до завершення трансляції. У пікорнавірусів поліпротеїн розщеплюється на поліпептиди, які у свою чергу нарізаються на функціональні білки. Якщо ж геном вірусу представлений (-)РНК, то у будь-якому разі трансляції буде передувати транскрипція. Вигідним для (-)РНК-вмісних вірусів є синтез субгеномних РНК – таких РНК-транскриптів, які би кодували по одному білку. Варто зазначити, що усі еукаріотичні зрілі мРНК кодують один білок.

Цікавою є трансляція тогавірусів. Їхня РНК є амбісенсовою: частина РНК є плюс-последовністю, а частина – мінус-последовністю. Через це трансляція їхнього геному відбувається за обидвома механізмами: синтез

поліпротеїну для неструктурних білків та субгеномна РНК для структурних білків.

Збирання вірусних часток – етап репродукції, який відмежовує віруси від всього живого. Це тому, що синтез компонентів вірусної частинки відбувається окремо. Компоненти вірусу збираються разом як деталі фабричного виробу. Так, у вірусів грипу геном реплікується в ядрі, білки синтезуються в цитоплазмі, а збірка віріонів відбувається на плазматичній мембрані. Такий тип розмноження називають диз'юнктивним. І у простих, і в складних вірусів процес збирання розпочинається зі взаємодії нуклеїнової кислоти та білка. Зазвичай одна або кілька білкових субодиниць впізнають сигнальну послідовність на геномі та приєднуються до неї. За першою приєднаною субодиницею слідує наступні. Приєднання наступних білкових субодиниць відбувається значно швидше. У складних вірусів таким чином формується їхній нуклеокапсид, а для формування суперкапсиду родини ортоміксо-, рабдо- та параміксовірусів кодують спеціальний гідрофобний білок, який прийнято позначати літерою М (матриксний). М-білок огортає нуклеокапсид та сполучає його з мембраною, із якої буде формуватися суперкапсид. Саме на М-оболонку лягає суперкапсид вірусу

Часто у ході дозрівання прості віруси проходять стадію провіріона. Щоб утворився інфекційний віріон, білкові субодиниці модифікуються, змінюється їхня морфологія, зникаються щілини між ними.

Вихід вірусів із клітини відбувається двома способами: вибухом, тобто деструкцією інфікованих клітин, або брунькуванням. Віруси, що брунькуються, виходять з інфікованої клітини, прихопивши із собою ділянку клітинної мембрани (плазматичної, ендоплазматичного ретикулуму, апарату Гольджі чи ядерної). Клітинна мембрана стає основою для суперкапсидної оболонки, тому цей спосіб виходу притаманний для складних вірусів. Для виходу брунькуванням, спершу поверхня мембрани модифікується. У мембрані з'являються вірусні глікопротеїди (шипи). Білки шипів синтезуються на рибосомах ЕПС, модифікуються в апараті Гольджі та у

складі везикул переносяться у клітинну мембрану. Неглікозильовані вірусні білки формують нуклеокапсид, який підходить до мембрани у місці, збагаченому на шипи. Далі модифікована ділянка плазмалеми випинається і формується брунька, всередині якої міститься нуклеокапсид. Врешті, брунька та клітина залишаються зв'язаними лише малою порогою, яка згодом закривається, і вірус остаточно відділяється від клітини. Через плазмалеми брунькуються представники родин *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*, *Retroviridae* та інших [10]. Деякі віруси, що відбруньковуються від мембран ЕПС та апарату Гольджі, потрапляють всередину везикул, котрі транспортуються до плазмалеми. Везикули зливаються з поверхнею клітини, а віруси виявляються в позаклітинному просторі. Так, шляхом екзоцитозу, звільняються представники родин *Poxviridae*, *Herpesviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae* та інших.

Прості віруси зазвичай виходять із клітини, руйнуючи клітину зсередини. Цей процес нагадує вибух. Деякі віруси порушують такі важливі процеси як транскрипція та трансляція. Віруси унеможливають продовження життя клітини. Починається процес некрозу, і вірус може вийти з клітини завдяки руйнуванню мембрани. Інші безоболонкові віруси лізують клітину зсередини завдяки власним ферментам. Так, фаг  $\phi$ X174 кодує фермент лізин, який перешкоджає транспортуванню пептидоглікану для оновлення клітинної стінки бактерії. Це призводить до порушення цілісності клітинної мембрани та розповсюдження вірусного потомства.

В даній дипломній роботі було використано вірус везикулярного стоматиту, штам Індіана, який віднесено до родини *Rhabdoviridae*. Геном вірусу – одноланцюгова неінфекційна РНК. Вірус везикулярного стоматиту швидко реплікується в культурі клітин із яскраво вираженою цитопатичною дією та має широку клітинну специфічність. Цитотоксичність вірусу везикулярного стоматиту значною мірою пов'язана з М-білком вірусу, який припиняє транскрипцію в клітині та транспорт мРНК із ядра в цитоплазму. Такі клітини приречені на апоптоз. Інфіковані клітини виділяють багато

вірусу ( $>10^9$  БОУ/мл) та урешті гинуть. Загибель клітин викликає гостру клітинну та гуморальну імунну відповідь. У клітині синтезується багато вірусного білка, що презентується в комплексі з білками гістосумісності I типу. У відповідь на експресію МНС I активуються CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцити. Антиген-презентуючі клітини поглинають антигени, виділені інфікованими клітинами, та презентують їх у комплексі з МНС II. АПК виконують функцію праймування та активації CD8<sup>+</sup> Т-клітин.

Характерною рисою вірусу везикулярного стоматиту є виникнення в ході інфікування квазівидів – вірусів із дуже подібними, але неідентичними геномами. Одна з важливих відмінностей між вірусними геномами є їхня здатність індукувати чи пригнічувати виділення інтерферону (ІФН). Кількість ІФН, виділеного клітинами у результаті інфекції різними квазівидами, може варіювати в 10 000 разів. Певні квазівиди індукують високі концентрації ІФН, є чутливими до дії ІФН та легко елімінуються *in vivo*. Інші генотипи вірусу везикулярного стоматиту повністю інгібують виділення ІФН, часто це дикі ізоляти, виділені з навколишнього середовища [11].

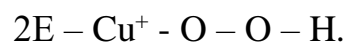
## 1.2. Роль металів у клітині

Метали можуть виконувати у клітині роль стабілізаторів молекул. Вони стабілізують структуру багатьох білків. Деякі ензими мають третинну або четвертинну структуру, що може бути нестабільною за відсутності металів. Зміни рН, температури, осмолярності призводять до втрати активності цих ензимів, якщо у розчині немає металів-кофакторів. До цих ензимів належить алкоголь-дегідрогеназа – фермент, який окиснює етанол. Алкоголь-дегідрогеназа складається із чотирьох субодиниць, кожна з яких зв'язана з іоном Zn<sup>2+</sup>. Йон Zn<sup>2+</sup> входить до складу “цинкового пальця”. Це білкова вторинна структура, характерна для білків, що зв'язуються з ДНК. У цинковому пальці Zn<sup>2+</sup> утворює 4 координаційні зв'язки: із двома

амінокислотними залишками цистеїну та двома залишками гістидину. Ці амінокислоти розділені послідовністю з 20 амінокислот. Залежно від складу цієї послідовності цинковий палець специфічно зв'язується з певною ділянкою ДНК.

Окрім стабілізації молекули білка-ферменту, йони металів можуть бути задіяні у ферментативних реакціях. У цьому випадку йони металів розміщені в активному центрі. Йони металів можуть стабілізувати активний центр ферменту або конформацію субстрату.

Метали, які стабілізують активний центр ферменту, є містком між ферментом та субстратом. Без них у ферменті не підтримується структура активного центру, і фермент не функціонує. Такі ферменти називають металоензимами, а кофакторами є  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ . Ці метали мають кілька ступенів окиснення та можуть перемикатися між ними. Наприклад, купрум має 2 ступені окиснення: +1 та +2. Він є кофактором важливого ферменту – дофамінгідроксилази і міститься в активному центрі. Дофамінгідроксилаза каталізує реакцію гідроксилювання дофаміну, таким чином перетворюючи його на норадреналін. Купрум виконує свою функцію завдяки перемиканню між двома ступенями окиснення. У результаті гідроксилювання дофаміну,  $\text{Cu}^{1+}$  окиснюється до  $\text{Cu}^{2+}$ . Для того, щоб фермент “відновився”, тобто для того, аби реакція могла відбуватися знову,  $\text{Cu}^{2+}$  відновлюється до  $\text{Cu}^{1+}$ . Група, яка приєднується до молекули дофаміну, надходить від  $\text{Cu}^{1+}$ . Це гідроксильна група, що утворюється на  $\text{Cu}^{1+}$  в реакції з  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}^+$  та  $2e^-$ . Як продукт реакції утворюється пероксидна сполука, яку можна схематично зобразити так:



Саме від неї і відділяється гідроксильна група, що йде на гідроксилювання дофаміну. Цікаво, що пероксид є одним із різновидів реактивних форм кисню (РФО), і ця молекула генерується на йоні металу в клітині. Тобто це є одним із випадків, коли РФО пов'язані з йонами металів у клітині.

Відновлення  $\text{Cu}^{2+}$  до  $\text{Cu}^{1+}$  відбувається за участі аскорбінової кислоти. Після перетворення молекули дофаміну на молекулу норадреналіну  $\text{Cu}^{1+}$  знову повертається до окисненого стану  $\text{Cu}^{2+}$ .

Перемикання між двома ступенями окиснення характерне для металів в електронтранспортному ланцюзі, гемах гемоглобіну та міоглобіну.

Іони металів також можуть бути стабілізаторами молекули субстрату. Адже для багатьох ферментів необхідне сполучення субстрату з йоном металу. Кінази – ферменти, що фосфорилують білкові молекули. Принцип їхньої дії –перенесення фосфатного залишку з молекули АТФ на молекулу-мішень. Однак АТФ як субстрат кіназ майже завжди зв'язаний з йоном  $\text{Mg}^{2+}$ .  $\text{Mg}^{2+}$  нейтралізує від'ємний заряд фосфатних залишків АТФ та полегшує перенесення останнього фосфатного залишку на молекулу субстрату, тобто його фосфорилування. Фермент гліколізу гексокіназа, що фосфорилує молекулу глюкози, також “використовує” АТФ у комплексі з  $\text{Mg}^{2+}$  [12].

Отже, метали у клітині виконують важливі ролі: стабілізують білкові молекули та беруть участь у ферментативних реакціях. Метали, які мають кілька ступенів окиснення, можуть перемикатися між ступенями окиснення і задіяні в окисно-відновних реакціях. Часто окисні сполуки генеруються з  $\text{O}_2$  та протонів саме на йоні металу чи пов'язані саме з металом.

### 1.3. Вільні оксидні радикали у функціонуванні клітини

Вільні оксидні радикали або РФО – це молекули, до складу яких входить кисень і які здатні до активного окиснення. Найвідомішими РФО у клітині є супероксидний аніон ( $\text{O}^*_2$ ), гідроген пероксид  $\text{H}_2\text{O}_2$  та гідроксильний аніон. Раніше вважалося, що РФО лише шкодять клітині. У великих концентраціях РФО окиснюють мембранні ліпіди, пошкоджують ДНК та білки. Однак, РФО необхідні клітині, оскільки вони беруть участь у клітинному сигналінгу. РФО відіграють роль у прогресуванні клітинного циклу, проліферації, диференціюванні клітини, міграції, апоптозі, імунній відповіді.

Отто Генріх Варбург був ученим, який першим наблизився до відповіді на запитання, як відбувається вироблення РФО у клітині. У 1908 році, працюючи на морській біологічній станції Неаполя, він показав, що відразу після запліднення яйцеклітини морських їжаків збільшували своє споживання кисню в 6 разів. Отто Варбург пояснив збільшення споживання кисню активацією окисного фосфорилування в мітохондріях після запліднення, пов'язане з необхідністю енергії. Однак гіпотеза виявилася помилковою. Майже 100 років потому було доведено, що кисень використовується NADPH-залежним ферментом, закореним у мембрані зиготи, який продукує гідроген пероксид. Гідроген пероксид не пошкоджує мембрану клітини, а використовується для побудови черепашки. Щодо ферменту, то існує родина, до складу якої входять 7 білків – NADPH-залежних оксидаз. Ці ферменти виробляють РФО, необхідні для клітини. Ще одним джерелом РФО у клітині є мітохондрія. По електрон-транспортному ланцюзі мітохондрій відбувається транспорт електронів, які у підсумку реагують з киснем з утворенням води. Під час транспортування електронів цитохромами можуть випадково утворюватися РФО. Було виявлено, що події утворення супероксидних аніонів найчастіше локалізовано у мітохондріальних комплексах I та III [13]. У нефізіологічних умовах, у ізольованих мітохондріях з усього спожитого кисню 1-2% перетворюється на РФО. *In vivo* ця цифра значно менша [14]. Окрім NADPH-залежних Nox-ферментів та мітохондріальних ферментів, ще ряд клітинних ферментів можуть утворювати РФО. До них належать ксантин-оксидаза, циклооксигеназа, ліпооксигеназа, цитохром р450.

Щодо функцій РФО в клітині, то раніше вважалося, що вони можуть виникати випадково в електрон-транспортному ланцюзі мітохондрій, а також що їх продукують клітини імунної системи для захисту організму від патогенів. Проте, згідно з останніми даними, РФО у клітині є набагато більш поширеними, а їх функції різноманітнішими.

Для ефективного сигналінгу епідермального та тромбоцитарного факторів росту – EGF та PDGF відповідно – потрібний гідроген пероксид [15]. Нейтралізація  $H_2O_2$ , в цьому випадку, блокує нормальний сигналінг від факторів росту. Мішенню для гідроген пероксиду є ланка ланцюга сигналінгу – сім'я специфічних фосфатаз. В активному центрі фосфатаз містяться амінокислотні залишки цистеїну. Саме цистеїн, який містить у своєму радикалі тіонову групу, є безпосередньою мішенню  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  зворотно окиснює RSH – тіонову групу до  $-RSOH$ , а в більших концентраціях незворотно до  $-SO_2H$  та до  $-RSO_3H$ . Фосфатази з окисненими тіоновими групами інактивуються.

За допомогою комп'ютерного аналізу було встановлено, що близько 500 білків у клітині володіють цистеїновими амінокислотними залишками, що можуть бути мішенями дії РФО [16]. Наразі точно не відомо, як  $H_2O_2$  окиснює саме ті цистеїнові залишки, які належать цим специфічним фосфатазам, а не інші. Можливо, це досягається генерацією гідроген пероксиду в місці локалізації його мішені. Так, епідермальний фактор росту зв'язується зі своїм рецептором, а спряжений з ним Nox-ензим виробляє супероксидні радикали. Супероксидні радикали не відразу потрапляють всередину клітини, а виходять у позаклітинний простір. Там супероксидний радикал перетворюється в гідроген пероксид, який потрапляє в клітину транспортуванням через аквапорин [17]. Одночасно зі стимулюванням Nox-ферменту, який виробляє супероксидні радикали, комплекс фактору з рецептором забезпечує інактивацію клітинного антиоксиданту пероксиредоксину (Prx 1) [18]. Річ у тому, що  $H_2O_2$ , щойно транспортований до клітини, швидко би інактивувався клітинними антиоксидантами, як-от пероксиредоксином. Однак нейтралізація антиоксиданту відбувається лише в місці розташування рецептора фактора росту, не в усій клітині, а в обмеженому її компартменті. Таким чином, РФО діють на правильні мішені, бо генеруються якраз у тому місці, де перебуває їх мішень. Таке пояснення специфічності дії РФО є одним із припущень. Зазначена фосфатаза є лише

одною з мішеней для РФО, а описаний каскад, у якому бере участь  $H_2O_2$ , є одним з багатьох сигнальних шляхів за участю РФО.

Нейтралізація та регулювання РФО є настільки ж важливими, як і їхня генерація. Відповідно важливими є і антиоксиданти. Найвідомішим клітинним антиоксидантом є трипептид глутатіон. Це L-у-глутаміл-L-цистеїніл-гліцин. Причому, глутамінова кислота та цистеїн поєднані не пептидним зв'язком, а поєднанням карбоксильної групи бічного радикалу глутаміну та аміногрупи цистеїну. Окиснення та відновлення глутатіону відбувається за рахунок цистеїну в сайті  $-SH$ . Дві молекули окисненого глутатіону димеризуються з утворенням дисульфідного зв'язку  $-S-S-$ . Глутатіон впливає на каталітичну активність багатьох ферментів. Глутатіон – це низькомолекулярний відновник, що присутній у клітині в мілімолярних концентраціях. Є ще і інші відновники. Білок-фермент супероксиддисмутаза нейтралізує супероксидний радикал, каталаза та пероксиредоксин – гідроген пероксид, а тіоредоксин та глутаредоксин відновлюють дисульфідні зв'язки в білкових молекулах.

На сьогоднішній день вважають, що функція антиоксидантів не лише нейтралізувати оксидні радикали. Антиоксиданти регулюють свою активність залежно від зовнішніх умов, наприклад, від рівня РФО. Прикладом слугує транскрипційний фактор Nrf2, який зв'язується з консенсусною послідовністю на ДНК. Nrf2 активує експресію генів антиоксидантів та детоксифікувальних білків [19]. У свою чергу Nrf2 має інгібіторну молекулу Keap1, яка зв'язує цей транскрипційний фактор. У складі інгібітору Keap 1 є багато цистеїнових залишків. Цистеїн є мішенню дії РФО. Таким чином, коли у клітині росте рівень РФО, то РФО окиснюють спеціальні сайти на Keap 1, Nrf2 вивільняється, переміщується до ядра та стимулює експресію генів антиоксидантів [20]. Отже, концентрація антиоксидантів збільшується у відповідь на зростання рівня оксидантів.

Мітохондрії у клітині утворюються шляхом поділу. Транскрипційний фактор PGC-1 регулює експресію генів, продукти яких необхідні для

біогенезу мітохондрій. Разом з тим, одночасно PGC-1 стимулює експресію антиоксидантів. Таким чином, мітохондрії є органелами, які виробляють найбільшу частку РФО. Одночасно з мітохондріями клітина запасється антиоксидантами, щоб зберегти окисно-відновний баланс клітини [21].

Антиоксиданти не є пасивними нейтралізаторами РФО, вони виступають у ролі чутливих сенсорів окисно-відновного балансу. Цитокін фактор некрозу пухлин (TNF) може призводити до апоптозу. Передача сигналу здійснюється за допомогою ASK-1 кінази, що регулює сигнал апоптозу (*apoptosis signal-regulating kinase*). Спершу ASK-1 перебуває у інгібованому стані та не може здійснювати фосфорилування. Інгібіторною молекулою є антиоксидант тіоредоксин Trx. Як і EGF та PDGF, TNF, зв'язуючись зі своїм рецептором, запускає вироблення у клітині РФО. Оксидні радикали окиснюють тіоредоксин, і він від'єднується від ASK-1. “Звільнена” кіназа фосфорилує наступну мішень. У цьому випадку, дія Trx не схожа на класичний антиоксидант, він діє як сенсор окисно-відновного балансу [22].

Цікаву властивість антиоксиданту пероксиредоксину виявили на еритроцитах. Ця властивість стосується механізмів регуляції циркадних ритмів. На даний час відомо, що експресія певних генів та білків відбувається злагоджено з циркадними ритмами. Існує також зворотний зв'язок, що припиняє експресію цих білків у певний момент, у відповідності із ритмами. Проте нещодавно стало відомо, що антиоксиданти працюють у відповідності з циркадними ритмами. Як відомо, еритроцити не мають ядра і в них не відбувається трансляції РНК. При культивуванні еритроцитів на поживному середовищі було помічено, що антиоксидант пероксиредоксин набував окисненої чи відновленої форми у відповідності з циркадними ритмами [23].

У літературі РФО пов'язують з багатьма хворобами. Однією з них є діабет 2-го типу. Головною причиною діабету 2-го типу є резистентність клітини до інсуліну. Поруч з інсулінорезистентністю при даному захворюванні у клітинах спостерігається підвищений рівень оксидних

радикалів [24]. Джерелом цих пошкоджуючих оксидантів є мітохондрії. Показано, що постійно високий рівень цукру в крові спричиняє фрагментацію мітохондрій клітин [25]. На культурах клітин та у дослідженнях на тваринах показано, що додавання антиоксидантів частково виправляє метаболічні дефекти, викликані продукцією РФО.

Відкритим залишається запитання, чи насправді оксиданти, які продукує мітохондрія, впливають на клітинні каскади та порушують чутливість клітини до інсуліну. Досі механізм розкрито не повністю. Можливо, РФО впливають на JNK-сигнальний шлях у клітині. Цей шлях пов'язаний із чутливістю клітини до інсуліну [26].

Стосовно патогенезу діабету 2-го типу існує і протилежна думка – про те, що РФО потрібні, щоб клітина була чутлива до інсуліну. По-перше, мітохондріальні оксиданти необхідні для виділення інсуліну  $\beta$ -клітинами підшлункової залози [27]. По-друге, як і інші цитокіни PDGF, EGF, зв'язування інсуліну зі своїм рецептором стимулює продукцію  $H_2O_2$  [28]. Утворений гідроген пероксид необхідний для інактивації фосфатаз та реалізації чутливості клітини до інсуліну.

У мишей, у яких був відсутній ген антиоксиданту глутатіон-пероксидази, закономірно був високий рівень РФО у клітині. РФО інактивували фосфатазу PTEN, що призводило до активації сигналіngu PI3-K/Akt та до покращення чутливості до інсуліну. Нейтралізація РФО викликала погіршення метаболізму глюкози [29]. Отже, різні дослідження мають суперечливі результати. В одних йдеться про роль РФО у розвитку діабету, тоді як інші доводять потрібність РФО для нормального метаболізму глюкози. Можливо, оксиданти, які знаходили в клітинах із інсулінорезистентністю, надходять із одного джерела, тоді як корисні оксиданти надходять із зовсім іншого джерела. Шкідливі оксиданти перешкоджають нормальному сигналіngu, а корисні необхідні для функціонування сигнальних шляхів у клітині.

Цілком імовірно, що при діабеті 2-го типу в клітинах різного походження відбуваються протилежні процеси, оскільки багато досліджень виконувалося на різних моделях, наприклад, на різних культурах клітин.

Припущення щодо ролі вільних оксидних радикалів у процесі старіння було зроблено Денхемом Харманом у 1950 році [30]. З того часу виконано багато досліджень, що присвячені ролі РФО у процесі старіння. Показано, що старіння супроводжується зростанням рівня оксидантів чи окиснених білків, ліпідів та ДНК у клітині. РФО нейтралізували додаванням антиоксидантів – і, як наслідок, зростав термін життя клітини. Згідно з протилежними даними, сполуки, які продукують низькі рівні РФО, продовжують життя біологічних об'єктів. Певні РФО стимулюють мітохондрії. Цей феномен називається мітохондріальним гормезисом. У третьому випадку, на деяких лініях мишей, було показано, що збільшення чи зменшення концентрації оксидантів не впливає на тривалість життя. А мутації мітохондрій призводять до швидкої смерті клітини, тоді як оксиданти не залучені в цей процес.

Хотілося б описати іще один цікавий механізм, пов'язаний зі старінням, а саме із здатністю гематопоетичних стовбурових клітин до поновлення. Коли ділиться гематопоетична стовбура клітина, то одна з дочірніх клітин підлягає диференціюванню, а інша залишається стовбуровою. Такий асиметричний поділ дозволяє зберегти кількість стовбурових клітин на сталому рівні. У людей із хворобою атаксія-телангіектазія відбувається мутація в однойменній кіназі – *ataxia telangiectasia mutated* (АТМ) *protein kinase*. Симптомами цієї хвороби є атаксія, схильність до пухлин та втрата здатності гематопоетичних стовбурових клітин до самопоновлення. Механізми розвитку хвороби досить складні. Однак відомо, що АТМ-кіназа активується у разі виникнення дволанцюгових розривів у молекулі ДНК. Для активації АТМ-кінази потрібен гідроген пероксид. Він каталізує утворення дисульфідного зв'язку між двома молекулами АТМ, цим активуючи кіназу. В *Atm*<sup>-/-</sup> мишей наявний дефект АТМ у генах, і, як наслідок, у них був високий рівень РФО в гематопоетичних стовбурових клітинах. Кровотворні

стовбурові клітини вичерпувалися швидше, ніж у звичайних мишей [31]. Згодом було показано, що дефект антиоксидантів обов'язково позначається на гематопоетичних стовбурових клітинах. Стовбурові клітини зазнають чи не найбільшої шкоди від перевищення рівня РФО. Можна припустити, що процес старіння відбувається якраз тому, що стовбурові клітини пошкоджуються РФО. Однак ймовірність цієї гіпотези потребує подальшого дослідження, а сама гіпотеза – доведення [32].

#### **1.4. Наночастинки діоксиду церію як антиоксиданти**

Важкі метали є токсичними для живого у найменших концентраціях ( $1 \times 10^{-8}$ ). До важких металів належать хімічні елементи з високою густиною, а саме, Pb, As, Hg, Cr, Mn, U, Mo, Ni, Se та інші. Токсичність важких металів у клітині реалізується збільшенням продукції РФО. Як вже було описано вище, метали Fe, Cu та деякі інші беруть участь в окисно-відновних реакціях, у яких на металах створюються вільні оксидні радикали або електрофільні групи. Важкі метали не виконують фізіологічних функцій та генерують РФО неконтрольовано. Вони активують специфічні NADPH-оксидази та зв'язуються з SH-групами ферментів, що спричиняє появу РФО. Підвищена продукція РФО порушує антиоксидантні системи клітини. Як наслідок, у клітині виникає окисний стрес [33]. Церій не належить до важких металів, однак механізми взаємодії церію з клітиною теж можуть бути пов'язані з вільними оксидними радикалами.

Зокрема, відомо, що наночастки діоксиду церію (НДЦ) мають антиоксидантні властивості. Діоксид церію – це наночастки, що мають кубічну гранецентровану решітку (структурний тип флуориту). На поверхні цих наночасток церій може перебувати в тривалентному ( $\text{Ce}_2\text{O}_3$ ) або ж у чотиривалентному ( $\text{CeO}_2$ ) станах. Таке перемикання ступенів окиснення надає наночастинкам властивостей ензимів. НДЦ за одних умов виконують функції ензимів-антиоксидантів: супероксиддисмутази, каталази, а за інших

умов реакції – оксидантів: пероксидази, оксидази.

НДЦ ще називають нанозимами. Як і природні ензими, нанозими пришвидшують перебіг реакції і самовідновлюються після завершення каталітичного циклу. Кінетика каталізованих ними реакцій описується рівнянням Міхаеліса-Ментен, як і звичайних ензимів. Однак, зазвичай нанозими менш активні та каталізують реакції повільніше, аніж природні ензими. У порівнянні з білковими ферментами нанозими не такі чутливі до умов реакції, зокрема, температури та рН. Проте нанозими є менш селективними. Зазвичай нанозими каталізують декілька реакцій, залежно від умов. Наприклад, у лужному середовищі НДЦ буде виконувати функції каталази, а у кислому – оксидази чи пероксидази. Також НДЦ є менш вибірковими до субстрату [34]. Наночастки  $\text{CeO}_2$  використовуються у каталітичних нейтралізаторах для зменшення токсичності відпрацьованих газів. Також НДЦ є перспективними сполуками для біомедичної галузі, адже токсичність НДЦ *in vivo* низька, як і наночастинок благородних металів. Разом з тим, НДЦ є значно дешевшими у порівнянні з наночастками золота та срібла. Водорозчинні солі церію в розчинах із лужним та нейтральним рН (а отже, і в біологічних середовищах) гідролізують з утворенням гідроксиду церію (III). Гідроксид церію (III) окиснюється до гідроксиду церію (VI), що переходить в нерозчинний діоксид  $\text{CeO}_2$ . При цьому утворюються колоїдні системи, що складаються з нанометрових частинок  $\text{CeO}_2$ .

Слід зазначити, що НДЦ здатні нейтралізувати супероксидний радикал ( $\text{O}^{\cdot-}$ ) у клітині. НДЦ діють подібно до супероксиддисмутази. В результаті дисмутації радикалу утворюється менш токсичний гідроген пероксид  $\text{H}_2\text{O}_2$  та  $\text{O}_2$  (рис. 1.1).

При цьому поверхневий церій окиснюється від +3 до +4. Згодом наночастинка повертається до вихідного ступеню окиснення +3, окиснюючи ще один супероксидний радикал. Таким чином за один каталітичний цикл нейтралізується 2 радикали [35].

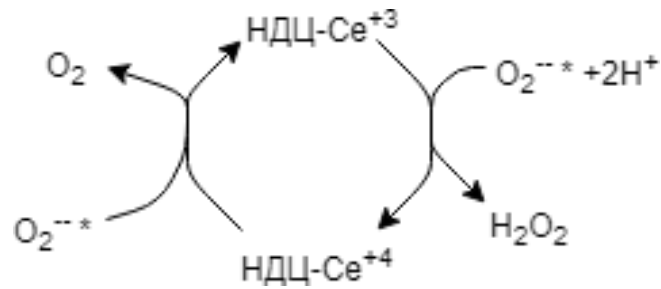


Рис. 1.1. Схема нейтралізації супероксидного радикалу наночастками діоксиду церію [36].

Отже, присутність церію +3 на поверхні наночастки є дуже важливою умовою для нейтралізації супероксидного радикалу (37). Якщо обробити наночастки гідроген пероксидом, поверхневі атоми Се окиснюються від +3 до +4. Як наслідок, наночастка повністю втратить супероксиддисмутазну активність [38].

Також здатність наноцерію нейтралізувати ( $\text{O}^{\cdot-}$ ) залежить від розміру наночастки. Так, наночастки діаметром 3-5 нм були більш активними, ніж наноцерій розміром 5-8 нм [35]. Загалом відомо, що ензиматична активність наночасток дуже залежить від розміру наночастки. Найкращими є наночастки, у яких відношення поверхневих атомів до атомів, що містяться всередині наночастки,  $\epsilon \geq 1$ . Для наночасток ікосаедричної форми відповідний розмір становить 4,7 нм. З погляду біології, перевага надається наночасткам, меншим ніж 6 нм, оскільки їхня токсичність для організму є найнижчою [39].

НДЦ нейтралізують також і гідроксильні радикали ( $\text{OH}^{\cdot}$ ). Особливістю гідроксильних радикалів є те, що вони дуже короткоживучі – час їхнього напівжиття дуже короткий, і у клітині немає спеціального ферменту, призначеного для нейтралізації цього радикалу. Це можна пояснити тим, що реакція нейтралізації ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) тривала би довше, ніж життя радикалу у клітині [40]. У клітині гідроксильні радикали зазвичай нейтралізують молекулярні

оксиданти, наприклад, вітамін Е та каротиноїди.

Однак, як і супероксидний радикал, гідроксильний радикал є досить агресивним. Він окиснює біополімери та ненасичені жирні кислоти. Доведено, що НДЦ каталітично руйнують гідроксил радикали [41]. Також повідомлялося, що наночастки діоксиду церію захищають барвник кристалічний фіолетовий від окиснення гідроксильними радикалами, утвореними в реакції Фентона [42].

Зупинимось детальніше на одному з двох імовірних механізмів нейтралізації гідроксил радикалу наночастками (рис. 1.2, А). Поверхневий  $\text{Ce}^{3+}$  окиснюється до  $\text{Ce}^{4+}$  і віддає електрон на гідроксильний радикал. Отримуючи електрон, гідроксильний радикал стає гідроксильною групою. Для завершення каталітичного циклу наночастка має відновитися: поверхневий окиснений  $\text{Ce}^{4+}$  повинен відновитися до  $\text{Ce}^{3+}$ . Це відбувається завдяки утворенню однієї молекули гідроген пероксиду з гідроксильної групи та гідроксильного радикалу. Таким чином, у ході одного каталітичного циклу нейтралізується 2 гідроксильних радикали з утворенням 1 молекули  $\text{H}_2\text{O}_2$  та однієї гідроксильної групи.

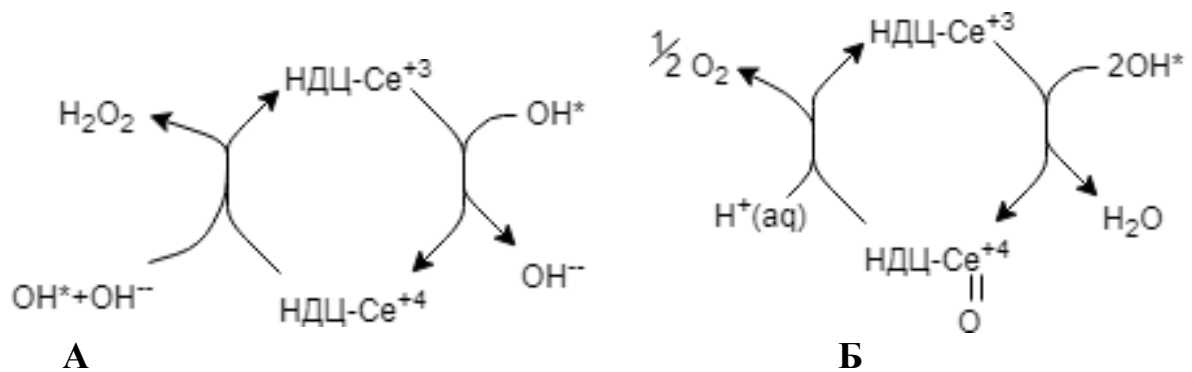


Рис. 1.2. Ймовірні варіанти нейтралізації гідроксильного радикалу наночастками діоксиду церію.

Варто зазначити також, що можливість наночасток знешкоджувати гідроксил радикал різко зростає зі зменшенням розміру наночастинки, що, на думку авторів, може бути пов'язано зі збільшенням вмісту  $\text{Ce}^{3+}$  на її

поверхні.

Слід також висвітлити каталазну активність НДЦ. У двох попередніх схемах зазначено, що нейтралізація обох видів РФО відбувається з утворенням гідроген пероксиду. Однак, це не зовсім справедливо, бо НДЦ також можуть нейтралізувати  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Нейтралізацію  $\text{H}_2\text{O}_2$  у клітині здійснює фермент каталаза. Як і каталаза, наночастинки розкладають гідроген пероксид із утворенням води та кисню. Як і у попередніх випадках, за 1 цикл нейтралізується 2 молекули гідроген пероксиду. Варто зазначити, що в дійсності реакція нейтралізації  $\text{H}_2\text{O}_2$  проходить двоступенево. При цьому поверхневий церій наночастинки зазнає хімічних змін. До поверхневих атомів Се приєднуються гідроксильні та пероксидні групи. Така модифікація необхідна для перетворення гідроген пероксиду на молекулу води.

Хімічну реакцію наноцерію з  $\text{H}_2\text{O}_2$  можна спостерігати і неозброєним оком. За додавання  $\text{H}_2\text{O}_2$  до наночастинок знижується коагуляційна стабільність золю.  $\text{H}_2\text{O}_2$  витісняє з поверхні наночастинок стабілізатори та барвники і наночастинки темніють. Варто зазначити, що в ході нейтралізації  $\text{H}_2\text{O}_2$  на поверхні наночастинок виникають гідропероксидні радикали, котрі є більш агресивними, ніж супероксидний та гідроксильний радикали. Каталазна активність наноцерію залежить від рН розчину (підвищується зі збільшенням рН розчину та знижується з його зниженням).

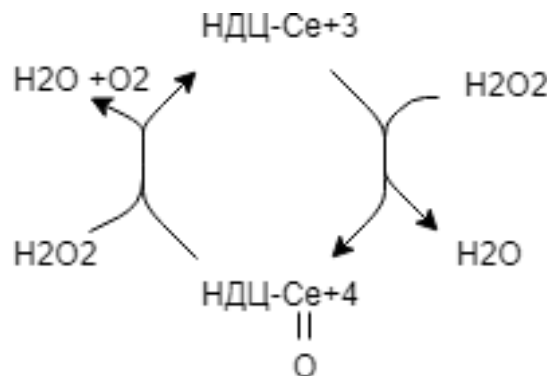


Рис. 1.3. Схема розкладу гідроген пероксиду під дією наноцерію.

Однак, наночастки можуть поводитися дwoяко. Вони можуть бути як відновниками (нейтралізаторами РФО), так і окисниками. Як буде реагувати наночастка значною мірою залежить від показника рН. За низьких рН НДЦ діють як окисники, а за високих – як відновники. Одночасно, за низьких значень рН на поверхні наночастки переважає  $\text{Ce}^{+4}$ , а за високих –  $\text{Ce}^{+3}$ . Як окисники НДЦ можуть імітувати дію оксидази та пероксидази.

Оксидази окиснюють субстрат, а електрони передають на кисень. У результаті утворюється  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  чи РФО -  $\text{O}_2^*$ . За кислих значень рН НДЦ проявляють властивості оксидаз. Оксидазна активність наночастинок залежить від наявності чотиривалентного церію на поверхні наночастинок. Підраховано, що концентрації  $\text{Ce}^{+3}$  та  $\text{Ce}^{+4}$  рівні за  $\text{pH} \approx 2,5$  [43]. Найбільш імовірний механізм окиснення субстрату під дією НДЦ показано на схемі (рис.1.4.).

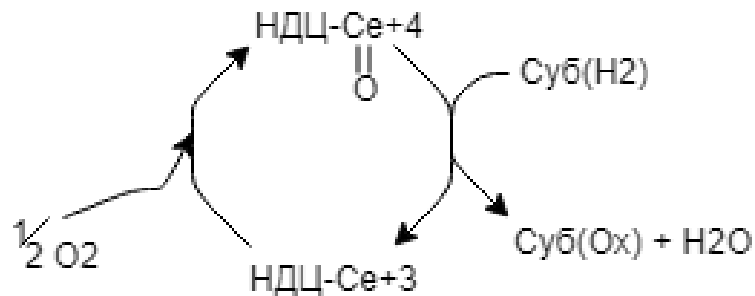


Рис. 1.4. Схема окиснення субстрату під дією наночерію. Оксидазна активність.

Важливо, що за кислих значень рН підвищується здатність  $\text{Ce}^{+4}$  на поверхні наночастинок окиснювати субстрат, тобто переважає реакція окиснення субстрату, однак за низьких рН регенерація  $\text{Ce}^{+3}$  до вихідного значення валентності +4 сповільнюється. Оксидазна активність наночерію може бути використана в імунологічних тестах, наприклад, для окиснення індикаторних барвників, ідентифікації ракових клітин [44].

Наночерій володіє пероксидазною активністю. Пероксидази каталізують окиснення органічного субстрату за допомогою гідроген пероксиду.

Унаслідок такого окиснення з молекули  $\text{H}_2\text{O}_2$  утворюється молекула  $\text{H}_2\text{O}$ . Наночастинки також здатні каталізувати окиснення субстрату гідроген пероксидом. Уперше це було показано на антоціанах винограду [34].

Окиснення субстрату  $\text{H}_2\text{O}_2$  під дією НДЦ проходить за нижченаведеною схемою (рис. 1.5).

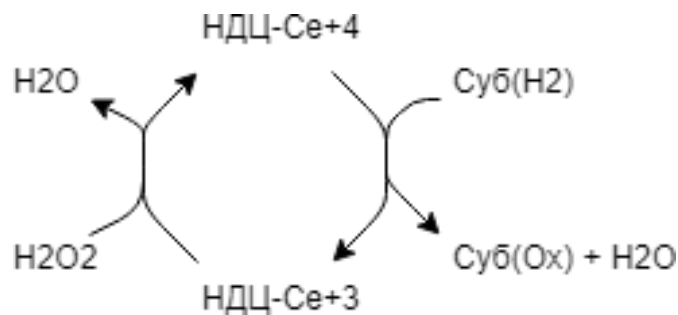


Рис. 1.5. Окиснення субстрату гідроген пероксидом.

Пероксидазна активність наночастинок є рН-залежною, вона є максимальною за  $\text{pH}=4$  і втрачається при  $2 < \text{pH} < 6$  [45]. Подібно до оксидазної активності НДЦ, зниження рН пришвидшує окиснення субстрату та відновлення церію, однак сповільнюється регенерація наночастинки. В одному з досліджень було доведено доцільність заміни в імунологічних тестах ферменту пероксидази хрому на наночастинки діоксиду церію. НДЦ окиснювали субстрат 3,3,5,5-тетраметилбіфеніл дигідрохлорид у глюкозному тесті швидше, ніж пероксидаза хрому ( $5,07 \times 10^{-8} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$  для НДЦ та  $3,34 \times 10^{-8} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$  для пероксидази хрому) [45].

### 1.5. Інтерферонова відповідь на вірусну інфекцію

Інфіковані клітини, сторожові фагоцити та імунні клітини секретують білки, які запускають внутрішньоклітинні каскади, активують імунну відповідь, спричиняють пошкодження тканин та жар. Це – хемокіни, ІФН та цитокіни. Наявність цих білків або збільшення їх концентрації у крові свідчать про хворобу. Секретовані білки, котрі впливають на міграцію

імунних клітин та залучають їх до місця інфекції, прийнято називати хемокінами. Білки, які забезпечують пригнічення реплікації вірусу всередині клітини, називаються інтерферонами. Решту білків, котрі посилюють чи гальмують імунну відповідь, називають цитокінами. Прозапальні цитокіни запускають синтез у печінці білків гострої фази, які потрібні для відновлення пошкоджених тканин. Колонієстимулюючі цитокіни синтезуються у кістковому мозку після запальної реакції та стимулюють проліферацію лімфоцитів, їх дозрівання. Цитокіни викликають такі симптоми як жар, сонливість, міалгія, відсутність апетиту та нудота.

У відповідь на вірусну інфекцію виділяються різні цитокіни. Перші у великих концентраціях в крові з'являються  $INF-\alpha$ ,  $INF-\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-12$ ,  $TNF-\alpha$  та  $INF-\gamma$ . Дію цитокінів у вогнищі інфекції та у крові називають “цитокіновим штормом”. При цьому в лабораторії найчастіше проводиться дослідження одного-двох цитокінів. Невідомо, чи реакція клітини на цитокін буде однаковою за умови дії на клітину лише одного цитокіну та в умовах цитокінового шторму, коли на цю ж клітину окрім одного цитокіну діятимуть ще 10 розчинних медіаторів. Всі цитокіни є потужними молекулами та діють у концентрації порядку нанограма на мілілітр.

Інтерферони – дуже давні білки, гени яких закодовані не лише у ссавців, а й у птахів, рептилій, амфібій та риб. У всіх тварин ІФН беруть участь в сигналінгу та є білками першої лінії захисту організму. Існує 3 типи ІФН: I, II та III типи. ІФН типу I зв'язуються з рецептором на клітинній поверхні –  $IFN\alpha_r$ , який складається з двох ланцюгів  $IFN\alpha_1$  та  $IFN\alpha_2$ . До ІФН типу I, що наявні у людини, належать  $IFN\alpha$ ,  $IFN\beta$ ,  $IFN\epsilon$ ,  $IFN\kappa$  та  $IFN\omega$ . Єдиний ІФН типу II – це ІФН  $\gamma$ . ІФН  $\gamma$  зв'язується з гетеродимерним рецептором  $INF\gamma_r$ . ІФН типу III – це ІФН  $\lambda$  [46].

ІФН синтезується у клітині, коли відбулося впізнавання маркерів вірусної інфекції (PAMP), наприклад, за допомогою Toll-рецепторів. Також приєднання певних вірусів до власних рецепторів є сигналом для виділення ІФН. Наприклад, вакцинні штами вірусу кору зв'язуються з CD46. Таке

зв'язування запускає потужну інтерферонову відповідь [47]. Певні віруси можуть деградувати інгібітор транскрипційного фактора  $\text{Nf-}\kappa\text{B}$  –  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , що призводить до транскрипції генів ІФН.

Інфіковані вірусом клітини продукують ІФН, але неінфіковані макрофаги та дендритні клітини, які патрулюють тканину, також можуть продукувати ІФН. Це відбувається, коли TLR рецептори на поверхні патрульних клітин знаходять вірусні білки, нуклеїнові кислоти чи маркери клітинного стресу. Якщо інфекцію не вдалося локалізувати і вона поширюється далі по організму, спеціалізовані клітини – плазмацитоїдні дендритні клітини, що містяться у крові, продукують велику кількість ІФН [48]. Висока концентрація ІФН у крові призводить до виникнення таких симптомів як жар, нудота, головний біль.

За своєю структурою ІФН  $\alpha$  та  $\beta$  значно відрізняються. Також існує лише один різновид гена ІФН  $\beta$ , у той час як для людини відкрито 13 різновидів генів ІФН  $\alpha$ . Гени різновидів ІФН  $\alpha$  гомологічні більш як на 80 %. Однак під час певної вірусної інфекції експресуються лише певні з них і у певному порядку. Експресія ІФН  $\beta$  передре експресії ІФН  $\alpha$  [49].

Клітини виділяють ІФН у високих концентраціях та активно, однак саме виділення цього цитокіну тимчасове. Виділення ІФН розпочинається протягом кількох годин після інфікування та спадає близько 10-ої години після інфікування. При цьому різні ізоляти одного виду вірусу індукують різну кількість ІФН. Так, концентрація ІФН у відповідь на інфекцію різними штамами вірусу везикулярного стоматиту варіює в 10000 разів [11].

Аби інтерферон подіяв на клітину, він обов'язково, повинен бути секретований в середовище і зв'язатися з рецептором на поверхні клітини. Інтерферон також може діяти аутокринно, але для цього спершу мусить бути виділений назовні і зв'язатися з рецепторами на цій клітині. В результаті зв'язування ІФН зі своїм рецептором всередині клітини запускається каскад подій. У клітині запускається щонайменше 300 генів, які залучені до

внутрішньоклітинного імунітету. Більш чутливі методи детектують експресію від 1000 до 2000 генів, які запускаються ІФН [50].

Результат дії ІФН на клітину – це антивірусний стан, тобто неможливість реплікації вірусу в цій клітині, або клітинна загибель. Найчастіше інфіковані клітини гинуть шляхом апоптозу, а в сусідніх клітинах розвивається антивірусний стан. Сусідні клітини також готуються до апоптозу, в тому разі якщо будуть інфікованими.

Після дії ІФН у клітині синтезуються кілька антивірусних білків. Зокрема, це Pkr (dsRNA-activated protein kinase) – антивірусний білок, кіназа, який ініціює припинення синтезу білка у клітині.

Відомо, що зазвичай у інфікованій клітині різко зупиняється синтез білка, як клітинного, так і вірусного. Така зупинка нерідко призводить до загибелі клітини, причому вірус гине разом із клітиною.

Коли у клітині відсутній вірус, у ній міститься декілька копій молекул Pkr. Коли ж на клітину діє інтерферон, кількість копій Pkr значно збільшується. Pkr активується дволанцюговою РНК. Як відомо, за нормальних умов у клітині відсутня власна дволанцюгова РНК і з'являється у клітині лише як проміжний етап реплікації вірусів. Pkr залишається неактивною, допоки в цитоплазмі ензим не зустрінє дволанцюгову РНК, що свідчить про присутність в клітині вірусу. Pkr активується та фосфорилує фактор ініціації трансляції білка eIF2, що робить його неактивним. Синтез білка у клітині припиняється [51].

У вірусу простого герпесу HSV наявний білок ICP34.5, який ініціює фосфатазну активність. Фосфатази дефосфорилують eIF2, тож таким чином білковий синтез відновлюється у клітині, інфікованій вірусом простого герпесу. Тому завдяки білку ICP34.5 HSV володіє стійкістю до дії Pkr [52].

У результаті ще одної антивірусної реакції клітини відбувається деградація РНК, як клітинної, так і вірусної. У цій реакції беруть участь два ферменти та дволанцюгова РНК. Під дією ІФН у клітині зростає рівень РНКаз L. РНКаз L (RNase L) деградує всю РНК, яку знаходить у клітині.

Однак РНКаз L залишається неактивною, доки не зустріне олігомери аденілової кислоти. Олігомери аденілової кислоти синтезує другий фермент-2'-5'-оліго(А)синтетаза (*2'-5'-oligo(A)synthetase*). Синтез відбувається лише у відповідь на вірусну дволанцюгову РНК у клітині [53].

Ця антивірусна реакція є замкнутою: ініціюється у відповідь на інтерферон та призводить до синтезу ІФН. Справа в тому, що РНКаз розщеплює дволанцюгову РНК із утворенням багатьох дволанцюгових фрагментів. Дволанцюгова РНК сприймається клітиною як сигнал тривоги. Дволанцюгові фрагменти ідентифікуються білком MDA5 і як наслідок синтез ІФН  $\beta$  посилюється.

На відміну від РНКаз L та Rkr, які протидіють багатьом вірусам, Мх-білок ефективний лише проти (-)РНК-вірусів. Його назва Мх походить від попередньої назви вірусу грипу – *myxovirus*. Дотепер знайдено один Мх-білок у мишей та два відповідні білки людини – МхА та МхВ. Як відомо, миші не хворіють на вірус грипу. Цей білок значно запобігає реплікації вірусу грипу у тваринній клітині. Він інгібує етап реплікації РНК-геному, що має назву кеп-снетчинг. Тоді як у мишей Мх-білки є захистом лише проти грипу, у людей Мх-білки є засобом клітини проти вірусу везикулярного стоматиту, кору та інших мінус-ланцюгових РНК-вірусів [54].

Pml-білки (*Promyelocytic leukemia proteins*) містяться у ядрі. Вони розчинені у нуклеоплазмі або агрегують у вигляді тілець. Pml-тіляця зв'язують чужорідну ДНК, яка потрапляє в ядро. Під час багатьох вірусних інфекцій вірус руйнує Pml-тіляця. Припускають, що, виводячи з ладу тіляця, вірус забезпечує своє розмноження у клітині [55].

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### РОЗДІЛ 2.

#### ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

##### 2.1. Об'єкти дослідження

У роботі використовували такі постійні перещеплювані моношарові культури клітин:

L929 – підшкірна сполучна тканина, фібробласти миші, *Mus musculus*;

ST – сім'яні залози свині, *Sus scrofa*;

Vero – нирковий епітелій африканської зеленої мавпи *Chlorocebus sabaues*;

MDBK – нирковий епітелій бика, *Bos Taurus*.

Було використано солі церію тривалентного –  $\text{CeCl}_3 \times 7\text{H}_2\text{O}$  та чотиривалентного  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  та наночастки діоксиду церію, отримані О.Б. Щербаковим, к.х.н., с.н.с. відділу проблем інтерферону та імуномодуляторів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Антивірусну активність перевіряли проти вірусу везикулярного стоматиту штаму Індіана. У роботі використано стандартний зразок ІФН *WHO International Standard INTERFERON ALPHA 2b (Human rDNA derived)* у концентрації 1 000 МО/мл.

##### 2.2. Реактиви та обладнання, необхідні для досліджень

###### 2.2.1. Реактиви:

- сіль церію тривалентного  $\text{CeCl}_3 \times 7\text{H}_2\text{O}$  та сіль церію чотиривалентного  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ ;
- культуральне середовище DMEM/F-12, у пропорції 1:1;

- гентаміцину розчин 10 мкг/мл (SIGMA, United Kingdom);
- канаміцину розчин (Україна, Київмедпрепарат);
- стандартний зразок ІФН в концентрації 1000 МО/мл;
- метиловий спирт.

### **2.2.2. Обладнання:**

- інвертований світловий мікроскоп;
- спектрофотометр;
- центрифуга;
- термостат;
- ламінарний бокс;
- ваги;
- морозильна камера;
- холодильна камера.

## **2.3. Техніка методу**

### **2.3.1. Методи культивування клітин.**

Для приготування робочого середовища для культивування культур клітин до 500 мл середовища DMEM/F-12 додали 500 мкл антибіотику гентаміцину та 250 мкл антибіотику канаміцину. Після додавання антибіотиків банку з середовищем злегка потрусили та розлили середовище у дві банки по 250 мл. Банки з середовищем підписали: позначили дату та наявність антибіотиків. До однієї з банок, у якій було 250 мл середовища, додали 12,5 мл ембріональної бичачої сироватки FBS. На банці позначали, що середовище містить сироватку. Середовища для культивування клітин зберігали в холодильнику.

У замороженому вигляді клітини зберігаються в морозильній камері при температурі нижче  $-135$  °C. Клітини перебувають у буфері для заморожування клітин. До складу цього буферу входить диметилсульфоксид.

Ця речовина токсична для метаболізуючих клітин, проте нетоксична для заморожених. За додавання диметилсульфоксиду всередині клітини не утворюються кристалики льоду, які руйнують органели клітини.

Діставши пробірку з клітинами з морозильної камери, чекали, поки розмерзнеться надосад – середовище для заморожування клітин. За допомогою самплера відбирали це середовище та зливали в дезрозчин. На дні пробірки залишався біластий осад з клітин. Після цього до осаду додавали 300 мкл середовища для культивування та ресуспендовували осад у середовищі за допомогою самплера.

Самплером утворену суспензію клітин переносили до флакону для культивування клітин. У флакон попередньо додавали 2 мл середовища, щоб клітинна суспензія потрапила у середовище, а не на суху поверхню флакона. Після того, як з пробірки для заморожування відібрали майже всю клітинну суспензію, туди знову додавали 300 мкл клітинного середовища. Кілька разів ресуспендували середовище у пробірці (аби забрати залишок клітин) та переносили його у флакон. Клітинну суспензію у флаконі додатково ресуспендували самплером та додавали клітинне середовище.

Для заморожування клітин необхідно приготувати суспензію. Її готували так само, як і при пасажуванні клітин. Отриману суспензію центрифугували протягом 5 хв при 100-200g, після чого видаляли надосад – середовище для культивування клітин та додавали 300 мкл середовища для заморожування. Підписані пробірки з клітинами швидко клали до морозильної камери.

Пасажування клітин – це пересівання клітин із однієї посудини на інші. Пересівання клітин проводили, коли клітини утворювали моношар, тобто ділилися, повністю заростаючи дно посудини. Утворення моношару збігається в часі з пожовтінням клітинного середовища, яке є індикатором рівня кислотності. Спершу обирали посуд, куди пересівали клітини. Це були пластикові флакони для культивування клітин, скляні банки об'ємом 200 мл та 500 мл. При пасажуванні клітин потрібно приготувати суспензію клітин. У

ході культивування клітини адгезують до поверхні посудини. Для того, щоб відокремити клітини одна від одної та від поверхні посудини, виливали середовище, у якому культивували клітини та додавали розчин Версену (розчин ЕДТА у фосфатно-сольовому буфері), так щоб розчин покрити усю поверхню посудини, де знаходиться моношар.

Флакони або банки з клітинами залишали в термостаті на 8-10 хвилин до округлення клітин. За зміною морфології клітин слідкували у світловому мікроскопі. Коли клітини цілком округлилися, розчин Версену зливали, залишивши 500-1000  $\mu$ л для змиву клітин. Клітини змивали, спрямовуючи з сеплера залишок Версену на поверхню посудини, де було видно плівку з клітин. Унаслідок цього отримували суспензію клітин.

Виходячи з розміру посудини, у яку пересівали клітини, туди переносили деяку кількість завису клітин. Якщо при пасажуванні необхідно посадити клітини у ще одну посудину такого ж розміру, то половину завису клітин переносили у нову ємність, а половину залишали у посудині, де ці клітини наростали. У “стару” посудину після перенесення суспензії клітин додавали середовище для культивування клітин. У нову посудину додавали необхідну кількість середовища перед тим, як внести туди клітинну суспензію.

Для посадки клітин у 96-лункові планшети потрібно приготувати суспензію клітин. Її отримували так само, як і при пасажуванні клітин. Клітинний завис переносили у пеніциліновий флакон та додавали середовище для отримання 10 мл завису.

Для підрахунку клітин використовували лічильну камеру Горяєва. Перед підрахунком клітинний завис необхідно перемішати піпетуванням. Для визначення кількості клітин відбирали аліквоту в окрему ємність та додавали барвник (трипановий синій). Ретельно перемішували і заповнювали камеру Горяєва. Підрахунок клітин проводили у 3 великих квадратах та виводили середнє значення, яке потім перемножували на коефіцієнт  $2,5 \times 10^5$  і в

результаті отримували показник кількості клітин у мл. До 96-лункової плати вносили по 100  $\mu$ л клітинної суспензії у кожен лунку.

### **2.3.2. Методи роботи з вірусом.**

Спочатку проводили титрування та приготування робочого розведення вірусу везикулярного стоматиту. Вірус везикулярного стоматиту титрували в десятикратних або двократних розведеннях. За допомогою світлового мікроскопа визначали ту лунку, де вірус вбиває 50 % клітин. Рахували розведення вірусу, яке відповідає вибраній лунці. Це розведення є цитотоксичною дозою 50 – ЦТД<sub>50</sub>. Робоче розведення вірусу, тобто розведення, яке вносили до клітин, на два порядки менше, ніж ЦТД<sub>50</sub>. Так, якщо вірус у розведенні  $10^{-8}$  викликає цитодеструкцію у 50 % клітин, то робоче розведення вірусу –  $10^{-6}$ . Якщо ЦТД<sub>50</sub> становить  $2^{-8}$ , то робоче розведення вірусу –  $2^{-6}$ . Розведення вірусу везикулярного стоматиту готували на середовищі для культивування клітин без сироватки.

Для інфікування клітин вірусом везикулярного стоматиту з 96-лункової плати видаляли середовище струшуванням над дезрозчином. У лунки додавали по 100 мкл робочого розведення вірусу везикулярного стоматиту. Появу цитопатичної дії везикуловірусу спостерігали під світловим мікроскопом через 18-20 годин після інфікування культур клітин везикуловірусом.

### **2.3.3. Методика роботи з солями церію.**

Спочатку проводили приготування розведень солей церію. В окремій платі готували послідовні концентрації розчинів солей церію. У вісім лунок планшету вносили 90 мкл стерильної води, а в першу лунку з водою – 10 мкл 0,1 М розчину солей. Розчин ресуспендували в лунці та послідовно переносили по 10 мкл у кожен наступний лунку з попередньої. Безпосередньо до плати з клітинами вносили по 10 мкл приготованого розведення.

Солі вносили до плати з клітинами за профілактичною схемою, а саме, перед інфікуванням клітин вірусом везикулярного стоматиту.

При застосуванні профілактичної схеми зразки вносили у середовище культивування клітин у лунках планшету за 24 години до інфікування клітин тест-вірусом (100 ТЦД<sub>50</sub> у 100,0 мкл середовища 199). Після внесення вірусу везикулярного стоматиту планшети інкубували у термостаті при 37 °С протягом 18-20 год у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем СО<sub>2</sub> (5 %) до настання 100 % цитопатичного ефекту у лунках контролю вірусу. Як контроль вірусу використовували необроблені дослідними сполуками клітини, інфіковані тест-вірусом. У лунки для визначення контролю клітин вносили середовище для підтримання росту клітин, у всі решта – суспензію вірусу.

Аналіз пригнічення вірусоспецифічного цитопатичного ефекту проводили після забарвлення моношару клітин у лунках кристалічним фіолетовим.

Для оцінки антивірусної активності солей церію використали значення ефективних концентрацій ЕС<sub>50</sub> та ЕС<sub>100</sub>. За величину ЕС<sub>50</sub> та ЕС<sub>100</sub> приймали такі концентрації солей (мкг/мл), при яких спостерігають пригнічення ЦПЕ тест-вірусу відповідно на 50 та 100 %, порівняно з повною деструкцією клітин у контролі вірусу.

Далі досліджували інтерферон-індукуючу дію солей церію. Індукцію ІФН проводили у клітинах L929, які обробляли досліджуваними розведеннями солей церію. Ряд концентрацій солей церію отримували послідовними десятикратними розведеннями від 10 мМ до 1 нМ. Кожне розведення вносили в чотири лунки планшету та інкубували з клітинами протягом 24 годин, після чого зразки середовища відбирали. Зразки середовища культивування зберігали до 7 діб при +6 °С.

Визначення ІФН-індукуючої активності у відібраних зразках проводили методом мікротитрування на культурі клітин L929 проти везикуловірусу Індіана, який використовували як тест-вірус. У 96-лункові планшети зі

сформованим моношаром клітин L929 вносили послідовні двократні розведення отриманих зразків, починаючи від 1:4 до 1:64.

Через 24 години клітини інфікували везикуловірусом Індіана у дозі 100 ТЦД<sub>50</sub> у 50,0 мкл середовища 199. Залишали вісім лунок для контролю вірусу (необроблені клітини, інфіковані вірусом) та стільки ж для контролю клітин (необроблені клітини, неінфіковані вірусом). Планшети культивували при 37 °С впродовж 24 год у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO<sub>2</sub> (5 %).

Проводили облік результатів за умови, коли в контролі інтактних клітин спостерігалась 100 % виживаність, а в лунках контролю вірусу – чітка дегенерація клітинного моношару (ЦПД). Облік кількості живих клітин проводили після їх забарвлення кристалічним фіолетовим (як описано вище). За титр ІФН приймали величину, обернену максимальному розведенню середовища, що викликало захист 40 % клітин від цитопатичної дії (ЦПД) вірусу. Титр ІФН виражали в  $\log_2$  (розведення)<sup>-1</sup>, яке забезпечувало виживання 40 % клітин.

Для дослідження спільної дії тривалентної солі церію та ІФН готували три стокових розчини робочих зразків. У кожен епендорф додавали 1800 мкл безсироваткового середовища для культивування. Далі у перший епендорф додали 200 мкл 100мМ розчину солі CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O. У другий епендорф додали 200 мкл розчину ІФН β, у концентрації 1000 МО. Стоковий розчин № 3 був дослідним. Для приготування розчину №3 1800 мкл безсироваткового середовища змішали з 200 мкл ІФН β, 1000 МО. До 1800 мкл суміші додали 200 мкл солі Ce<sup>+3</sup>. Зразки вносили до клітин: по 50 мкл у кожен лунку, в яких містилося 150 мкл безсироваткового середовища. Зразки титрували двократним розведенням. Таким чином, початкові дослідні концентрації були 2,5 мМ солі Ce<sup>+3</sup> та 25 МО ІФН. Зразки додавали до клітин за профілактичною схемою, як описано вище.

#### 2.3.4. Методи аналізу результатів.

Клітини забарвлювали кристалічним фіолетовим. Кристалічний фіолетовий має молярну масу 407,979 г/моль, формула –  $C_{25}N_3H_{30}Cl$ . Метод забарвлення клітин кристалічним фіолетовим – це простий, неферментативний тест для швидкого аналізу кількості життєздатних адгезованих клітин [56]. Після інкубації клітин з плати видаляли середовище, а до клітин на 10 хвилин вносили 0,4 % розчин барвника кристалічного фіолетового у 2 % етанолі. Барвник видаляли, а забарвлений моношар клітин 3-4 кратно промивали водою для видалення залишків кристалічного фіолетового. Оптичну густину забарвлених клітин вимірювали на спектрофотометрі з вертикальним променем за довжини хвилі 540 нм. Всі проби аналізували у чотирьох повторностях.

Далі проводили аналіз результатів та їх статистичну обробку. Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Отримані експериментальні дані у групах порівняння представлені у вигляді медіани та інтерквартильного інтервалу  $Me[LQ-UQ]$ , де  $Me$  – медіана (50% центиль),  $LQ$  – 25% центиль,  $UQ$  – 75% центиль. Графіки отримані за допомогою програми Microsoft Office Excel 2007 («Microsoft Corporation», США).

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Антивірусна дія солей церію за профілактичної схеми

Було проведено дослідження антивірусної дії солей церію на моделі культури клітин L929/VSV за профілактичною схемою. Виявили, що додавання солей перед інфікуванням клітин завжди забезпечувало антивірусний захист (рис. 3.1.).

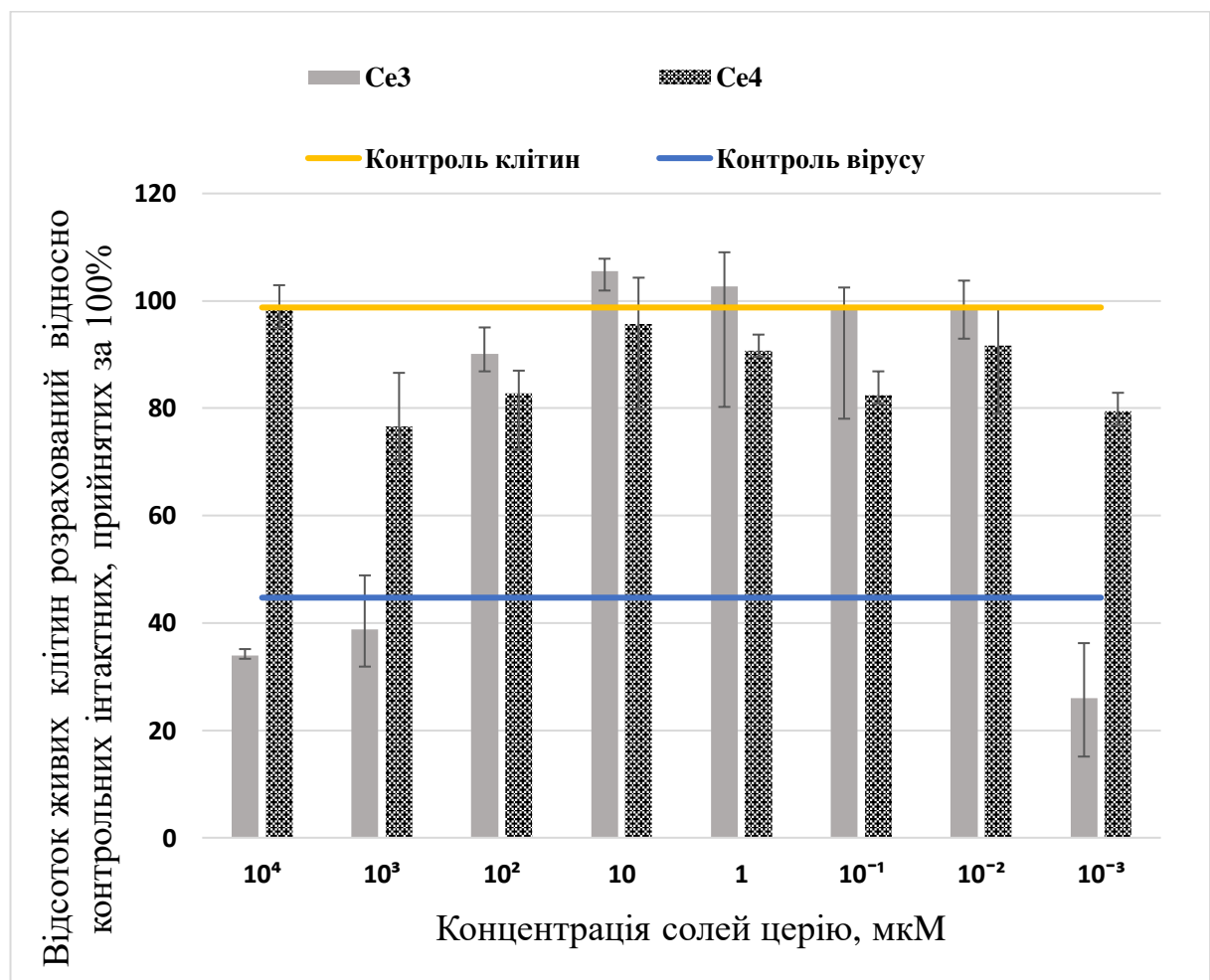


Рис. 3.1. Антивірусна дія солей церію на моделі культура клітин L929/VSV. Профілактична схема.

Примітки: Ce3 – показники життєздатності клітин, оброблених сіллю Ce(III), Ce4 – показники життєздатності клітин, оброблених сіллю Ce(IV).

Нами було показано, що солі церію є ефективними за дуже малих концентрацій – 10 нМ. При цьому з'ясувалося, що солі церію тривалентного та чотиривалентного діють по-різному (табл. 3.1.).

Таблиця 3.1.

Показники ефективних антивірусних концентрацій солей церію  
в культурах клітин L929 та ST  
проти вірусу везикулярного стоматиту, штам Індіана

Культура клітин	Схема застосування	EC50, нМ		EC100, нМ	
		Ce(III)	Ce(IV)	Ce(III)	Ce(IV)
L929	профілактична	5	0,62	1 000	–
ST	Лікувальна	–	$3 \cdot 10^5$	–	–

Примітка: “–” – антивірусний захист недостатній, ефективна концентрація не визначена.

Як показано на графіку на рис. 3.1., сіль церію тривалентного –  $\text{CeCl}_3 \times 7\text{H}_2\text{O}$  забезпечує 100% захист клітин від дії вірусу лише посередині діапазону концентрацій від 10  $\mu\text{M}$  до 10 нМ. Ефективна концентрація 50 (EC50) церій(III) хлориду становить 5 нМ, а 100% клітин є життєздатними за додавання розчину солі Ce(III) у концентрації 1 мкМ. Однак за високих концентрацій солі Ce(III) не захищає клітини проти цитопатичної дії вірусу, на відміну від чотиривалентної солі церію. Це можна пояснити різною токсичністю солей церію для клітин. Антивірусна дія солі Ce(III) швидко падає у діапазоні концентрацій від 10 нМ до 1 нМ.

Сіль церію чотиривалентного –  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  забезпечує високу виживаність клітин за усіх досліджуваних концентрацій. Найнижча виживаність клітин за додавання 1 мМ розчину солі Ce(IV) становила 65 %. Антивірусна дія була виявлена за найнижчих концентрацій (1-10 нМ) та спадала дуже повільно (EC50 = 0,62 нМ). Однак, на відміну від солі церію

тривалентного, при застосуванні солі церію (IV) 100% виживаність клітин не спостерігали.

### 3.2. Антивірусна дія наночастинок діоксиду церію

У результаті проведених досліджень було з'ясовано, що наночастинок діоксиду церію забезпечують нижчу виживаність клітин у порівнянні з солями церію (рис. 3.2). Максимальне значення виживання клітин було 86 %. Захист поступово спадає зі зниженням концентрації НДЦ.

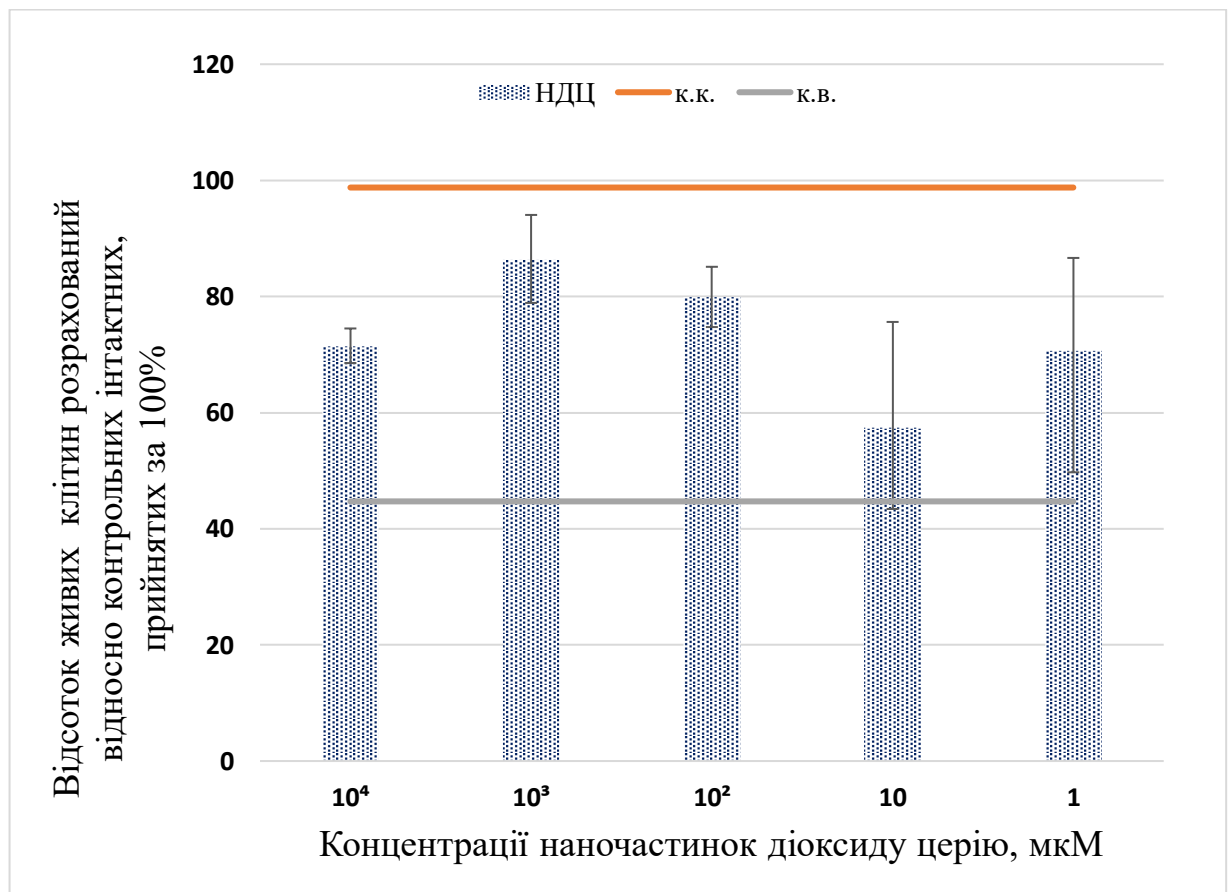


Рис. 3.2. Антивірусна дія наночастинок діоксиду церію на модельній системі L929/вірус везикулярного стоматиту, шт. Індіана. Профілактична схема.

Примітки: НДЦ – наночастки діоксиду церію, к.к. – показники життєздатності контрольних клітин, к.в. – показники життєздатності інфікованих вірусом клітин.

### 3.3. Антивірусна дія солей церію за лікувальної схеми

Коли солі церію додавали до культури після інфікування, клітини були значно більш чутливими до дії вірусу (рис. 3.3). Додавання солей церію за лікувальною схемою забезпечує низький рівень антивірусного захисту. Ефективна концентрація 50 амоній церій(IV) нітрату складає 300 мкМ. Для порівняння, EC50 за профілактичної схеми становить усього 0,62 нМ. Ефективна концентрація 100 для  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  взагалі не визначена. За лікувальної схеми максимальний рівень захисту клітин – 60-70 % реалізується лише за найвищої концентрації солі Ce(IV) – 500 мкМ, оскільки за лікувальної схеми сіль церію тривалентного є неефективною.

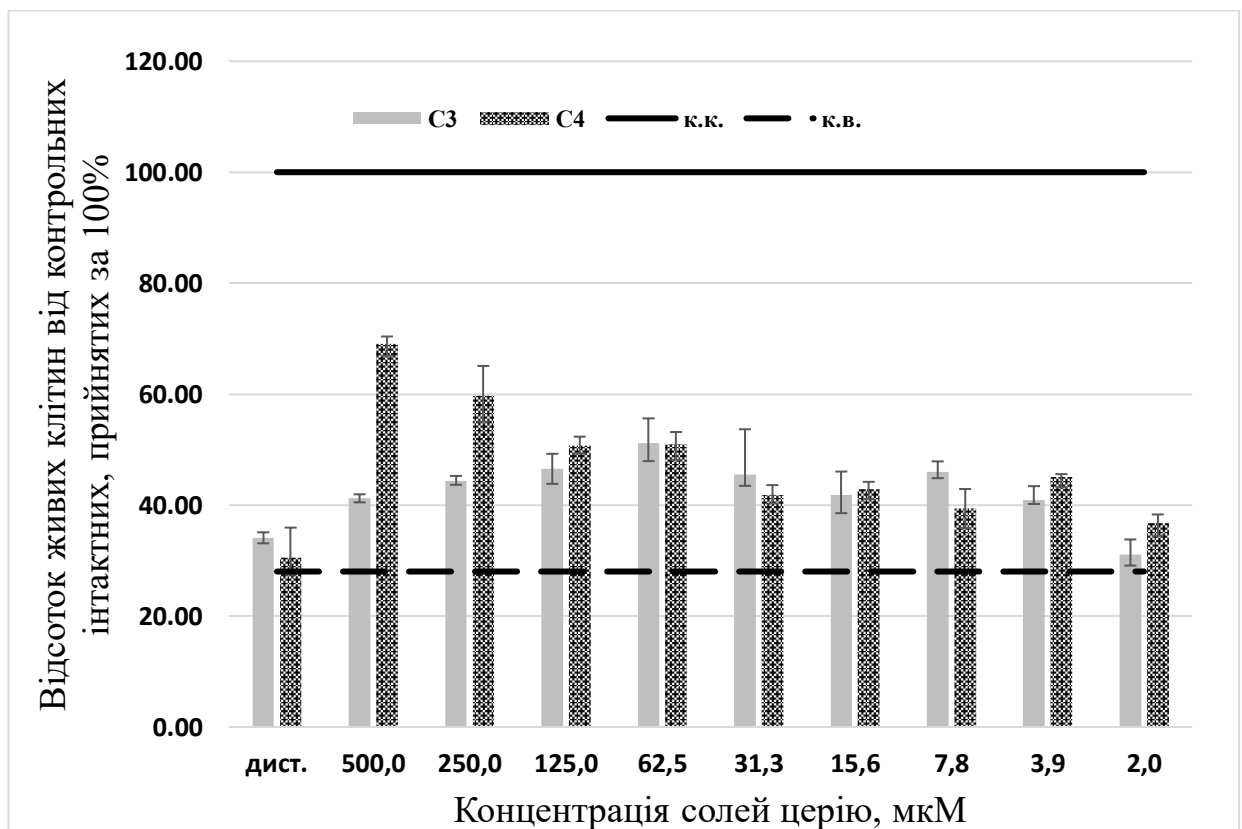


Рис. 3.3. Антивірусна дія солей церію на моделі культури клітин ST/вірус везикулярного стоматиту, штам Індіана. Лікувальна схема.

Примітки: С3 – сіль Ce(III), С4 – сіль Ce(IV), к.к. – показники життєздатності контрольних клітин, к.в. – показники життєздатності вірус інфікованих клітин.

### 3.4. Дослідження виділення інтерферону клітинами під дією солей церію

Отже, солі церію пригнічують реплікацію вірусу везикулярного стоматиту на культурі клітин за додавання солей перед інфікуванням клітин – за профілактичною схемою.

На підставі отриманих результатів, була досліджена антивірусна активність середовища, кондиціонованого клітинами, попередньо обробленими різними концентраціями солей церію (рис. 3.4.).

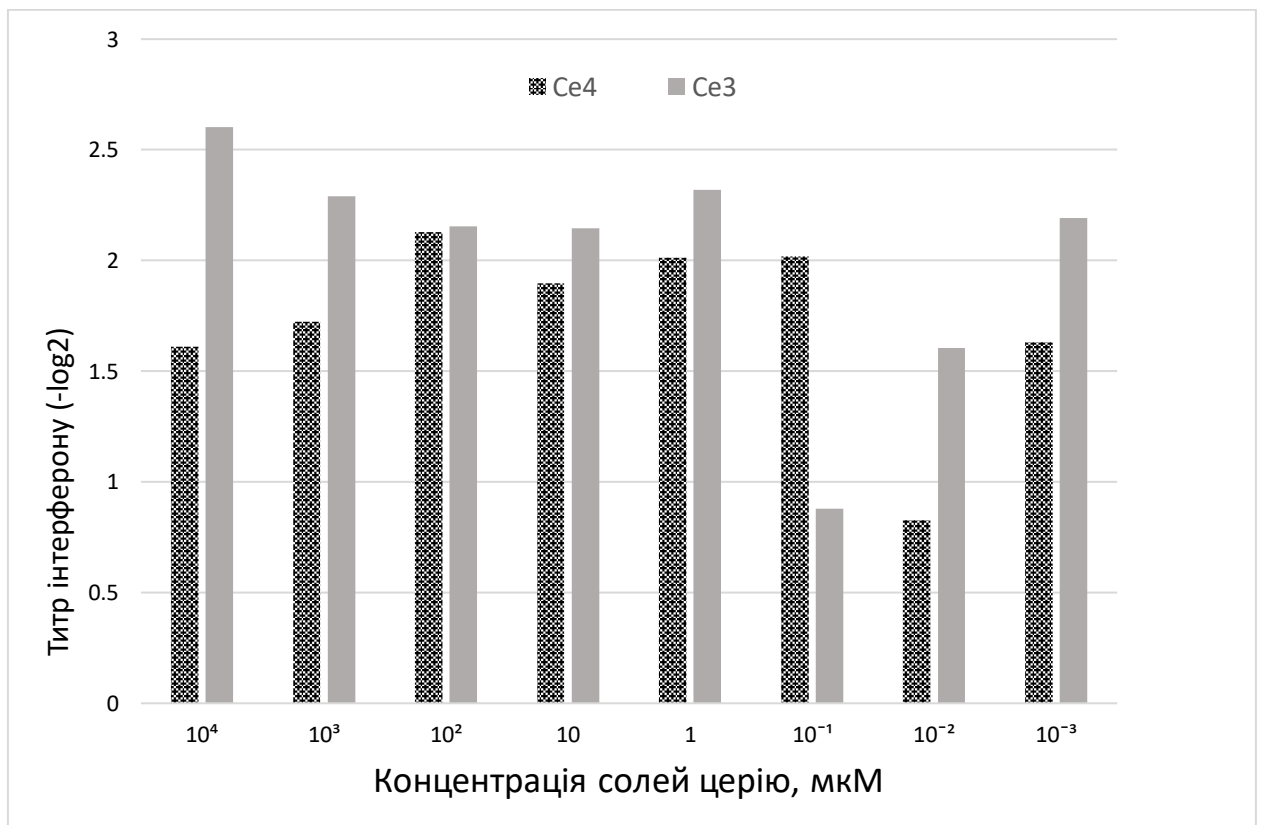


Рис. 3.4. Титр ІФН (log<sub>2</sub>) в середовищі, кондиціонованому клітинами L929 після 30 хв контакту з солями церію різної валентності.

Примітки: Ce3 – сіль Ce(III), Ce4 – сіль Ce(IV).

Надосад, отриманий із клітин, на які діяли високими концентраціями тривалентної солі церію, забезпечив найкращу виживаність клітин. Як видно з рисунка 3.4, сіль  $\text{Ce(III)}$  у низькій концентрації – 1 нМ забезпечила вищий антивірусний захист, аніж сіль  $\text{Ce(IV)}$ . Однак, за додавання до клітин власне солей, а не надосаду, за концентрації 1 нМ, сіль  $\text{Ce(IV)}$  була більш дієвою, ніж сіль  $\text{Ce(III)}$  (Рис. 3.1). Можна припустити, що солі церію призводили до виділення клітинами у середовище культивування неспецифічного фактора антивірусного захисту – ІФН. Інтерферон, виділений клітинами в середовище культивування, і пригнічував реплікацію вірусу везикулярного стоматиту, штам Індіана.

### 3.5. Сумісна дія церію та інтерферону

Було показано, що сіль церію  $\text{Ce(III)}$  не підвищує активності ІФН. Ми порівнювали антивірусну дію солі церію  $\text{Ce(III)}$ , ІФН та суміші ІФН та солі (рис. 3.5.).

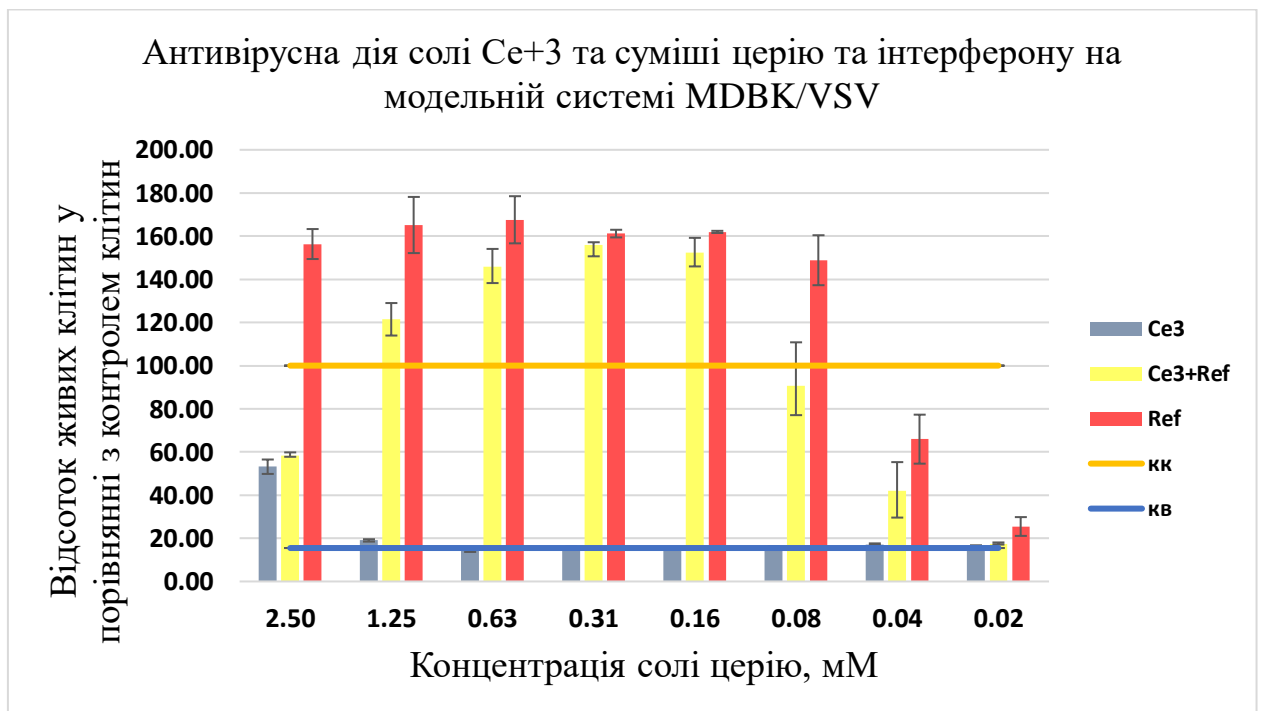


Рис. 3.5. Антивірусна дія солі  $\text{Ce}^{3+}$ , ІФН та їх суміші у модельній системі MDBK/вірус везикулярного стоматиту, штам Індіана. Профілактична схема.

Примітки: Ref – препарат стандарту ІФН, 25 МО/мл,  $\text{Ce}_3$  – сіль церію (III), кк – показники контролю клітин, кв – показники контролю вірусу.

Як видно з графіку, на культурі клітин MDBK, за профілактичної схеми додавання, сіль церію тривалентного не забезпечила антивірусного захисту. За додавання солі церію виживаність клітин становила 15 %, що співпадає з контролем вірусу везикулярного стоматиту, штам Індіана. Тобто, сіль церію не пригнічувала розмноження вірусу, не гальмувала розвиток характерної цитопатичної дії вірусу. Лише за найвищої досліджуваної концентрації солі церію – 2,5 мМ – виживаність клітин становила 53 %.

Суміш солі церію з ІФН забезпечувала антивірусний захист посередині діапазону досліджених концентрацій – від 0,08 мМ до 1,25 мМ. За додавання суміші ІФН та церію виживаність клітин становила 120-150 %, значно перевищивши виживаність контролю клітин.

Додавання окремо ІФН створило найбільш високий рівень захисту. Відсоток виживання клітин – 150 %.

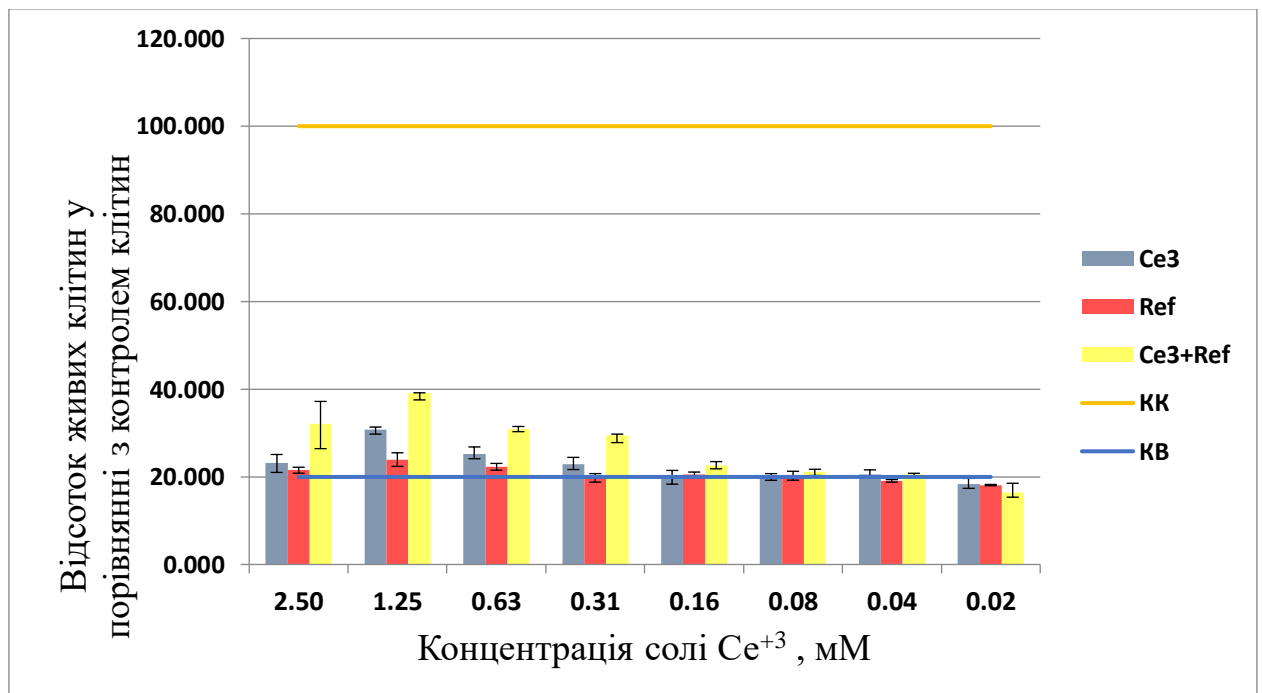


Рис. 3.6. Антивірусна дія суміші солі церію  $\text{Ce}^{+3}$  та ІФН на модельній системі Vero/вірус везикулярного стоматиту, шт. Індіана. Профілактична схема.

Примітки: Ref – препарат стандарту ІФН, 25 МО/мл,  $\text{Ce3}$  – сіль церію (III), кк – показники контролю клітин, кв – показники контролю вірусу.

Суміш ІФН та церію не забезпечувала антивірусної дії на культурі клітин Vero. У цьому дослідженні не спрацював і інтерферон. Додавання солі церію окремо також не захищало клітини у жодній із концентрацій. З рис. 3.5 та 3.6 можна побачити, що сіль церію  $\text{CeCl}_3 \times 7\text{H}_2\text{O}$  не мала антивірусних властивостей на культурах клітин Vero та MDBK проти вірусу везикулярного стоматиту, штам Індіана.

Необхідно відзначити цікаве явище, яке було виявлене в процесі дослідження. В лунках, що містили сіль церію тривалентного, ми виявили кристали. В лунках з найвищою концентрацією солі було найбільше кристалів (Рис. 3.7).

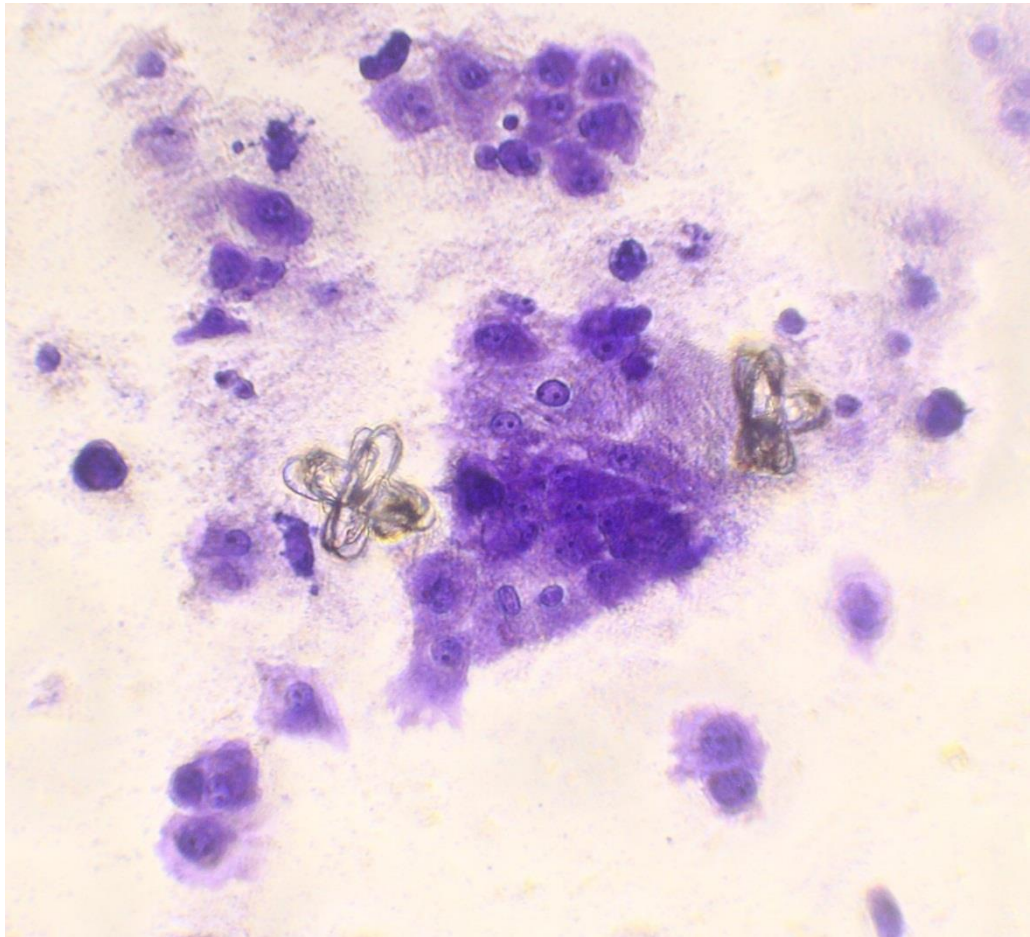


Рис. 3.7. Кристали у планшеті з клітинами MDBK після додавання 25 мМ солі церію  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Як видно з рисунку, кристали мали незвичний зовнішній вигляд. Спрощено їх можна порівняти з чотирьохпелюстковою квіткою. Однак, напевно, вони склалися з овальних субодиниць, які перетиналися. Таким чином, якщо ми спостерігали кристал вертикально – то бачили лише один овал.

Отже, за умови утворення кристалів, сіль церію тривалентного не захищала клітини проти вірусу. Цілком, імовірно, що одним із чинників утворення кристалів є високі концентрації солі у розчині. Окрім високих концентрацій солі, спричинити кристалоутворення міг склад середовища культивування, наприклад, рН середовища. Внаслідок вірусної інфекції рН середовища культивування може коливатися. Тому зміни метаболізму клітин під впливом вірусу теж можуть відігравати певну роль у кристалоутворенні.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Нами проведено серію експериментів із дослідження антивірусної дії солей церію проти вірусу везикулярного стоматиту, штам Індіана та показано, що солі церію мають антивірусні властивості у дуже малих концентраціях. Однак солі церію є дієвими лише за профілактичної схеми. Так, за профілактичної схеми додавання солі церію захищали клітини добре в наномолярних та мілімолярних концентраціях.

Солі церію тривалентного та чотиривалентного діють по-різному. Цікаво, що солі Ce(III) є дещо більш токсичними для клітини, ніж солі Ce(IV) [57]. Тому Ce(III) не захищає клітини проти вірусу за високих концентрацій, бо, найімовірніше, за цих концентрацій сіль токсично діє на клітину (Рис. 3.1).

Щодо механізмів захисту, то ми припустили, що солі церію є індукторами ІФН. Застосування солей церію супроводжувалось виділенням клітинами в середовище культивування біологічно активних речовин (імовірно, ІФН). Щоб це перевірити, до інтактних клітин вносили середовище, кондиціоноване клітинами L929, які контактували з солями церію. Інтактні клітини інфікували вірусом везикулярного стоматиту, штам Індіана, який є високочутливим до дії ІФН [11]. Оскільки було показане пригнічення розвитку цитопатичної дії вірусу, виявлений факт може свідчити про наявність у доданому середовищі ІФН. Варто підкреслити, що титр ІФН розраховували як від'ємний логарифм розведення, яке забезпечувало виживання 50 % клітин.

Як видно з рис. 3.1, концентрація тривалентної солі церію  $10^4$  мкМ є цитотоксичною для клітин. Тому сама сіль церію за концентрації  $10^4$  мкМ не забезпечувала антивірусного захисту саме через те, що така доза солі є цитотоксичною. Однак надосад від клітин, на котрі діяли сіллю Ce(III),

забезпечив пригнічення реплікації вірусу. Отже, можна припустити, що однією з реакцій клітин на цитотоксичні концентрації солей церію є виділення ІФН. Порівнюючи дію самої солі та дію середовища, кондиціонованого клітинами після контакту із солями церію (рис. 3.1 та рис. 3.4), можна сказати, що сіль церію тривалентного (яка є більш цитотоксичною за високих концентрацій) забезпечувала кращу індукцію ІФН за високих концентрацій, аніж сіль церію чотиривалентного. ІФН-індукуючий ефект солі  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  знижувався відповідно до зменшення концентрацій тривалентного церію. Проте, навіть за найнижчої концентрації, сіль церію (III) викликала виділення клітинами у культуральне середовище ІФН.

Сіль чотиривалентного церію  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  індукувала виділення ІФН слабше. Тоді як найвища концентрація солі  $\text{Ce}(\text{IV})$  забезпечувала високу виживаність клітин, середовище, отримане від цих клітин, не містило достатньо високих кількостей ІФН.

Як видно з рис. 3.2, наночастинки діоксиду церію теж забезпечують захист клітин від дії вірусу везикулярного стоматиту, штам Індіана. Однак, у порівнянні із солями, захист, що забезпечується наночастками слабкіший. Це може свідчити про те, що у біологічному середовищі наночастки діоксиду церію вступають у реакцію з певними аніонами ( $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ) з утворенням солей та здатні втрачати атоми церію, котрі при переході у середовище іонізуються [58]. Очевидно, церій, який втрачається наночасткою, знижує реплікацію вірусу. Однак цих вільних атомів недостатньо для високих рівнів захисту.

Попри те, що солі церію за певних умов (певні концентрації та час інкубації) є індукторами ІФН, атоми церію  $\text{Ce}(\text{III})$  не взаємодіють з ІФН і не підвищують його активності.

Як видно з рисунків 3.5, 3.6, солі церію спрацьовують не завжди. Так, сіль церію тривалентного не захистила клітини від дії вірусу на культурах клітин MDBK та Vero. Як видно з рис. 3.5, на MDBK суміш солі церію

тривалентного та ІФН спрацювала гірше, ніж сам ІФН. Щодо результатів, представлених на рис. 3.6, то на платі з клітинами Vero ІФН не спрацював (можливо, відсутність ефекту пов'язана із втратою активності ІФН). Принагідно варто зазначити, що культура клітин Vero є ІФН-дефіцитною. Тобто клітини Vero самі не можуть секретувати ІФН, однак на них є інтерферонові рецептори, і клітини можуть на нього реагувати. Тому незрозумілим залишається, чому контрольні лунки з ІФН виявилися незахищеними. Попри це, ми включили цю невдалу плату до роботи, тому що в лунках з клітинами, до яких додавали сіль церію, ми виявили кристали.

Щодо кристалів, які було описано, то їх можна порівняти з мінеральними включеннями в рослинній клітині. Солі кальцію в рослинних клітинах відкладаються у вигляді кристалів. Загальний термін для позначення включень кальцій карбонатів, оксалатів, саліцилатів у рослинній клітині – друзи. Кальцій оксалат має вигляд голчастих кристалів, які називаються рафіди (рис. 3.8.).

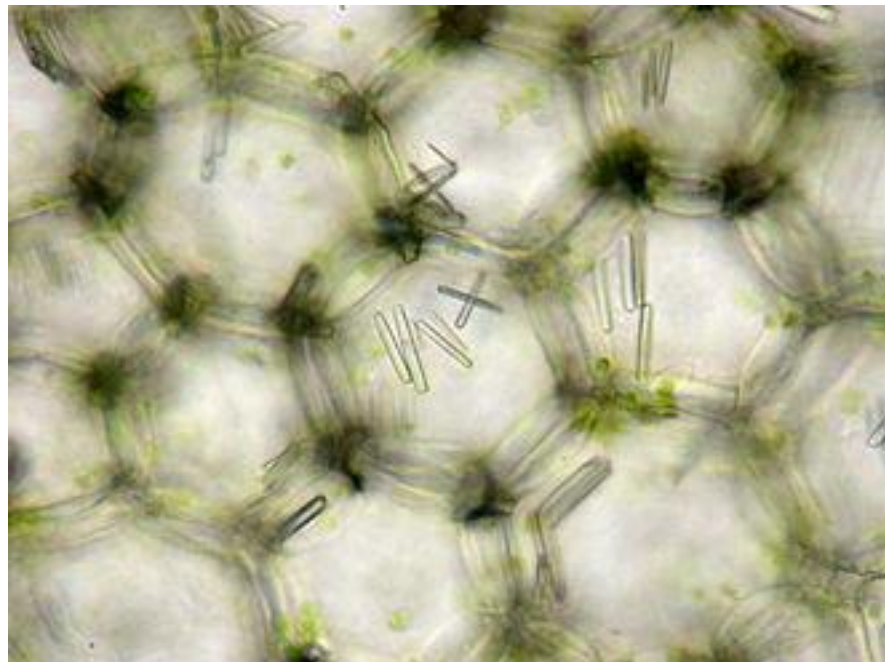


Рис. 3.8. Рафіди у клітинах *Hypoestes phylloshachia* [59].

Вважається, що дані включення з'являються у клітинах за збільшення вмісту кальцію в ґрунті. Тобто непотрібний кальцій може запасатися у формі кристалів. У деяких рослин кристали служать захистом від поїдання травоядними тваринами: вони дають їдкий смак та пошкоджують слизову. Так, слизова поверхня стає вразливою до дії рослинних токсинів, протеаз [59]. Що ж до нашого випадку, то додавання солей церію призвело до утворення кристалів у середовищі для культивування тваринних клітин. Дуже імовірно є те, що до складу описаних кристалів можуть входити солі церію та кальцію, оскільки випадання церій оксалату в осад є аналітичною реакцією.

Варто зазначити, що церій нагадує кальцій. Порядковий номер церію в періодичній таблиці Менделєєва – 58, і він є лантаноїдом. Порядковий номер кальцію – 20. Однак у церію та у кальцію співмірні значення атомного радіуса та подібна електронна конфігурація орбіталей: і у Церію ( $4f15d16s2$ ), і у Кальцію ( $4s2$ ) останній електронний рівень представлений s-орбіталлю. Атомний радіус катіона  $Ca^{+2}$  дорівнює 180 пм, а Ce 185 пм [60]. Однак, найважливішим є те, що йони лантаноїдів здатні заміщувати кальцій у біологічних молекулах. Лантаноїди мають вищий заряд, ніж кальцій, а тому сильніше зв'язуються з молекулами. Однак, вони не заміщують кальцій функціонально. Наприклад, Лантан пригнічує вхід Кальцію до клітини. У гриба *Neurospora crassa* додавання 1 мМ карбонату лантану пригнічувало потрапляння кальцію до клітини. У клітині опинялося лише 7%  $^{45}Ca^{+2}$  у порівнянні з контролем клітин. Деполяризація мембрани, викликана  $La^{+3}$ , була кальцій-залежною, оскільки зменшувалася зі збільшенням концентрації  $Ca^{+2}$  в зовнішньоклітинному середовищі.  $La^{+3}$  впливає на один із кальцієвих каналів, оскільки, на думку авторів дослідження, деполяризація такої амплітуди навряд чи могла бути викликана тільки йонами  $La^{+3}$  [61]. Також, Кальцій бере участь у великому числі клітинних процесів, і кальцій може неординарно взаємодіяти з церієм. Тому питання впливу церію на кальцій-залежні процеси у клітині вимагає детального вивчення.

Підсумовуючи розділ обговорень, хотілося б згадати ще один механізм, який є ймовірним для солей церію. У теоретичній частині було доведено, що реактивні форми кисню є дуже важливими для клітини. Вони беруть участь у сигналінгу, каскадах реакцій та безпосередньо необхідні для окиснення субстратів. У багатьох випадках РФО у клітині пов'язані саме з металами. Метали, які мають кілька ступенів окиснення, здатні “перемикатися” між ними та задіяні в окисно-відновних реакціях. Такі метали є кофакторами. Часто окисні сполуки генеруються з  $O_2$  та протонів саме на йоні металу чи пов'язані саме з металом. У Розділі I також, було доведено, що наночастинки діоксиду церію мають на поверхні атоми, ступінь окиснення яких змінюється між значеннями +3 та +4. Наночастинки є активними відносно вільних форм кисню: вони створюють їх, вступають з ними в реакцію та нейтралізують їх. Реакції, у яких беруть участь наночастинки діоксиду церію, не відбуваються без участі реактивних форм кисню.

Оскільки елемент церій здатний відносно легко “змінювати” ступінь окиснення, можна припустити, що солі церію впливають на функціонування реактивних форм кисню у клітині. Ці солі активно модифікують фізіологічні шляхи метаболізму РФО. Найімовірніше, що у механізм дії церію на клітину прямо пов'язаний з РФО у клітині. Імовірно, що в дійсності антивірусний захист також реалізується за участі РФО.

## ВИСНОВКИ

1. Солі церію  $\text{CeCl}_3 \times 7\text{H}_2\text{O}$  та  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  збільшують виживаність клітин L929 за інфікування вірусом везикулярного стоматиту, штам Індіана.

2. Захисний антивірусний ефект прослідковується для обох солей за дуже низьких концентрацій. Однак, солі церію, три- та чотиривалентна, діють по-різному. За інфікування вірусом везикулярного стоматиту тривалентна сіль церію забезпечує 100 % захист клітин від дії вірусу посередині діапазону досліджених концентрацій – від 10 нМ до 10 мМ, а сіль  $\text{Ce}(\text{IV})$  забезпечує 85 % виживаність клітин у всьому діапазоні досліджених концентрацій від 1 нМ до 10 мМ.

3. Клітини L929, оброблені солями церію у концентраціях 1-100 нМ, виділяють у середовище культивування біологічно активні речовини (імовірно – інтерферони), що забезпечують формування антивірусної резистентності у інтактних клітин. Зокрема, застосування такого кондиціонованого клітинами середовища формує стан резистентності у інтактних клітин, пригнічуючи розвиток вірус індукованої цитопатичної дії.

4. За додавання до клітин суміші солі церію  $\text{CeCl}_3 \times 7\text{H}_2\text{O}$  та стандартного зразку інтерферону, антивірусний захист є дещо меншим, ніж ефект, зумовлений застосуванням тільки інтерферону.

5. Було виявлено, що внесення високих концентрацій солі церію  $\text{CeCl}_3 \times 7\text{H}_2\text{O}$  у середовище культивування супроводжується появою кристалів. Імовірно, що у їх складі присутній церій. За умови утворення кристалів сіль церію не реалізувала антивірусної захисної дії.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Galdiero S, Falanga A, Vitiello M, Cantisani M, Marra V, Galdiero M. Silver nanoparticles as potential antiviral agents [Internet]. Vol. 16, *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2011 [cited 2021 Jan 18]. p. 8894–918. Available from: [/pmc/articles/PMC6264685/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22011111/)
2. Остапченко ЛІ, Андрійчук ТР, Бабенюк ЮД, Войціцький ВМ, Давиденко АВ та інші. Кофактори. Біохімія. Київ: Київський університет, 2012. ст. 394-399.
3. Indiana vesiculovirus - Wikipedia [Internet]. [cited 2021 Apr 23]. Available from: [https://en.wikipedia.org/wiki/Indiana\\_vesiculovirus](https://en.wikipedia.org/wiki/Indiana_vesiculovirus)
4. Yap ML, Rossmann MG. Structure and function of bacteriophage T4 [Internet]. Vol. 9, *Future Microbiology*. Future Medicine Ltd.; 2014 [cited 2021 Apr 23]. p. 1319–37. Available from: [/pmc/articles/PMC4275845/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25411111/)
5. Poliovirus - Wikipedia [Internet]. [cited 2021 May 22]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Poliovirus>
6. Más V, Melero JA. Entry of enveloped viruses into host cells: Membrane fusion. *Subcell Biochem* [Internet]. 2013 May 29 [cited 2021 May 22];68:467–87. Available from: [/pmc/articles/PMC7121288/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24111111/)
7. Baltimore classification ~ ViralZone [Internet]. [cited 2021 Apr 23]. Available from: <https://viralzone.expasy.org/254>
8. Transcription (biology) - Wikipedia [Internet]. [cited 2021 May 22]. Available from: [https://en.wikipedia.org/wiki/Transcription\\_\(biology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Transcription_(biology))
9. DNA Viruses in Eukaryotes | Boundless Microbiology [Internet]. [cited 2021 May 22]. Available from: <https://courses.lumenlearning.com/boundless-microbiology/chapter/dna-viruses-in-eukaryotes/>
10. Rheinemann L, Sundquist WI. Virus Budding. In: *Encyclopedia of Virology* [Internet]. Elsevier; 2021 [cited 2021 May 22]. p. 519–28. Available from: [/pmc/articles/PMC7413661/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34111111/)

11. Marcus PI, Rodriguez LL, Sekellick MJ. Interferon Induction as a Quasispecies Marker of Vesicular Stomatitis Virus Populations. *J Virol* [Internet]. 1998 Jan 1 [cited 2021 Apr 5];72(1):542–9. Available from: [/pmc/articles/PMC109406/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/109406/)
12. Гудзь СП, Перетятко ТБ, Галушка АА. Взаємодія вірусів з клітинами. Вірусологія. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2018. ст. 57-97.
13. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, et al. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* [Internet]. 2005 Jul 29 [cited 2020 Dec 9];122(2):221–33. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867405004563/fulltext>
14. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging [Internet]. Vol. 120, *Cell*. Cell Press; 2005 [cited 2020 Dec 11]. p. 483–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15734681/>
15. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* (80- ) [Internet]. 1995 [cited 2020 Dec 11];270(5234):296–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7569979/>
16. Fomenko DE, Xing W, Adair BM, Thomas DJ, Gladyshev VN. High-throughput identification of catalytic redox-active cystein residues. *Science* (80- ) [Internet]. 2007 Jan 19 [cited 2020 Dec 11];315(5810):387–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17234949/>
17. Bienert GP, Møller ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Jan 12 [cited 2020 Dec 11];282(2):1183–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17105724/>
18. Woo HA, Yim SH, Shin DH, Kang D, Yu DY, Rhee SG. Inactivation of Peroxiredoxin I by Phosphorylation Allows Localized H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Accumulation for Cell Signaling. *Cell* [Internet]. 2010 Feb 19 [cited 2020 Dec 11];140(4):517–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20178744/>

19. Singh S, Vrishni S, Singh BK, Rahman I, Kakkar P. Nrf2-ARE stress response mechanism: A control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases [Internet]. Vol. 44, Free Radical Research. Free Radic Res; 2010 [cited 2020 Dec 11]. p. 1267–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20815789/>
20. Zhang DD, Hannink M. Distinct Cysteine Residues in Keap1 Are Required for Keap1-Dependent Ubiquitination of Nrf2 and for Stabilization of Nrf2 by Chemopreventive Agents and Oxidative Stress. Mol Cell Biol [Internet]. 2003 Nov 15 [cited 2020 Dec 12];23(22):8137–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14585973/>
21. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, et al. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. Cell [Internet]. 2006 Oct 20 [cited 2020 Dec 12];127(2):397–408. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17055439/>
22. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. EMBO J [Internet]. 1998 May 1 [cited 2020 Dec 12];17(9):2596–606. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9564042/>
23. O’Neill JS, Reddy AB. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature*. 2011.
24. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. Nature [Internet]. 2006 Apr 13 [cited 2020 Dec 14];440(7086):944–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16612386/>
25. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseume E, Chauvin MA, Morio B, et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. J Clin Invest [Internet]. 2008 Feb 1 [cited 2020 Dec 14];118(2):789–800. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18188455/>
26. Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka TA,

Matsuhisa M, et al. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med* [Internet]. 2004 Oct [cited 2020 Dec 14];10(10):1128–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15448687/>

27. Leloup C, Tourel-Cuzin C, Magnan C, Karaca M, Castel J, Carneiro L, et al. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* [Internet]. 2009 Mar [cited 2020 Dec 14];58(3):673–81. Available from: </pmc/articles/PMC2646066/?report=abstract>

28. Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, et al. The NAD(P)H Oxidase Homolog Nox4 Modulates Insulin-Stimulated Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Plays an Integral Role in Insulin Signal Transduction. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2020 Dec 14];24(5):1844–54. Available from: </pmc/articles/PMC350558/?report=abstract>

29. Loh K, Deng H, Fukushima A, Cai X, Boivin B, Galic S, et al. Reactive Oxygen Species Enhance Insulin Sensitivity. *Cell Metab* [Internet]. 2009 Oct 7 [cited 2020 Dec 14];10(4):260–72. Available from: </pmc/articles/PMC2892288/?report=abstract>

30. HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* [Internet]. 1956 [cited 2020 Dec 15];11(3):298–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13332224/>

31. Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* [Internet]. 2004 Oct 21 [cited 2020 Dec 15];431(7011):997–1002. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15496926/>

32. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011;194(1):7–15.

33. Shahid M, Pourrut B, Dumat C, Nadeem M, Aslam M, Pinelli E. Heavy-metal-induced reactive oxygen species: Phytotoxicity and physicochemical changes in plants [Internet]. Vol. 232, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York LLC; 2014 [cited 2021 Apr 24]. p. 1–44.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24984833/>

34. Popov AL, Shcherbakov AB, Zholobak NM, Baranchikov AE, Ivanov VK. Cerium dioxide nanoparticles as third-generation enzymes (nanozymes). *Nanosyst Physics, Chem Math*. 2017;(December):760–81.

35. Korsvik C, Patil S, Seal S, Self WT. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem Commun [Internet]*. 2007 Mar 14 [cited 2019 Apr 29];(10):1056. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17325804>

36. Popov AL, Shcherbakov AB, Zholobak NM, Baranchikov AE, Ivanov VK. Cerium dioxide nanoparticles as third-generation enzymes (nanozymes). *Nanosyst Physics, Chem Math [Internet]*. 2017 Dec 26 [cited 2019 May 4];760–81. Available from: <http://nanojournal.ifmo.ru/en/articles-2/volume8/8-6/chemistry/paper09/>

37. Karakoti AS, Singh S, Kumar A, Malinska M, Kuchibhatla SVNT, Wozniak K, et al. PEGylated nanoceria as radical scavenger with tunable redox chemistry. *J Am Chem Soc [Internet]*. 2009 Oct 14 [cited 2021 Apr 26];131(40):14144–5. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja9051087>

38. Heckert EG, Karakoti AS, Seal S, Self WT. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials [Internet]*. 2008 Jun [cited 2019 Apr 29];29(18):2705–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395249>

39. Shcherbakov AB, Ivanov VK, Zholobak NM, Ivanova OS, Krysanov EY, Baranchikov AE, et al. Nanocrystalline ceria based materials-Perspectives for biomedical application. Vol. 56, *Biophysics*. 2011. p. 987–1004.

40. Nechifor M, Neagu T-M, Manda G. Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. *Curr Chem Biol [Internet]*. 2009 Jan 1 [cited 2019 May 4];3(1):22–46. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=2212-7968&volume=3&issue=1&spage=22>

41. Ivanov VK, Shcherbakov AB, Usatenko A V. Structure-sensitive properties and biomedical applications of nanodispersed cerium dioxide. *Russ Chem Rev* [Internet]. 2009 Sep 30 [cited 2019 May 4];78(9):855–71. Available from: <http://stacks.iop.org/0036-021X/78/i=9/a=R04?key=crossref.fbc8e678801818a490fc893759731866>
42. Xue Y, Luan Q, Yang D, Yao X, Zhou K. Direct evidence for hydroxyl radical scavenging activity of cerium oxide nanoparticles. *J Phys Chem C* [Internet]. 2011 Mar 24 [cited 2021 Apr 26];115(11):4433–8. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp109819u>
43. Ivanova OS, Shekunova TO, Ivanov VK, Shcherbakov AB, Popov AL, Davydova GA, et al. One-stage synthesis of ceria colloid solutions for biomedical use. *Dokl Chem* [Internet]. 2011 Apr 12 [cited 2019 May 4];437(2):103–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1134/S0012500811040070>
44. Asati A, Santra S, Kaittanis C, Nath S, Perez JM. Oxidase-Like Activity of Polymer-Coated Cerium Oxide Nanoparticles. *Angew Chemie Int Ed* [Internet]. 2009 Mar 16 [cited 2019 Apr 29];48(13):2308–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19130532>
45. Jiao X, Song H, Zhao H, Bai W, Zhang L, Lv Y. Well-redispersed ceria nanoparticles: Promising peroxidase mimetics for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose detection. *Anal Methods* [Internet]. 2012 Sep 26 [cited 2019 Apr 29];4(10):3261. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ay25511a>
46. Flint J, Racaniello VR, Rall GF, Skalka AM. The Early Host Response: Cell-Autonomous and Innate Immunity. *Principles of virology*. Volume 2. American Society for Microbiology, 2015. pp 53-96.
47. Marty RR, Knuchel MC, Morin TNA, Naim HY. An immune competent mouse model for the characterization of recombinant measles vaccines. *Hum Vaccines Immunother* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2021 Apr 5];11(1):83–90. Available from: </pmc/articles/PMC4514240/>
48. Дендритные клетки — Википедия [Internet]. [cited 2020 Dec 15].

Available from: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Дендритные\\_клетки](https://ru.wikipedia.org/wiki/Дендритные_клетки)

49. López de Padilla CM, Niewold TB. The type I interferons: Basic concepts and clinical relevance in immune-mediated inflammatory diseases [Internet]. Vol. 576, Gene. Elsevier B.V.; 2016 [cited 2021 Apr 5]. p. 14–21.

Available from: </pmc/articles/PMC4666791/>

50. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses [Internet]. Vol. 32, Annual Review of Immunology. Annual Reviews Inc.; 2014 [cited 2021 Apr 5]. p. 513–45. Available from: </pmc/articles/PMC4313732/>

51. Pindel A, Sadler A. The role of protein kinase R in the interferon response [Internet]. Vol. 31, Journal of Interferon and Cytokine Research. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA ; 2011 [cited 2021 May 21]. p. 59–70. Available from:

<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jir.2010.0099>

52. Infected cell protein 34.5 - Wikipedia [Internet]. [cited 2021 May 21]. Available from: [https://en.wikipedia.org/wiki/Infected\\_cell\\_protein\\_34.5](https://en.wikipedia.org/wiki/Infected_cell_protein_34.5)

53. Liang SL, Quirk D, Zhou A. RNase L: Its biological roles and regulation [Internet]. Vol. 58, IUBMB Life. 2006 [cited 2021 Apr 5]. p. 508–14. Available from: [https://engagedscholarship.csuohio.edu/scichem\\_facpub/407](https://engagedscholarship.csuohio.edu/scichem_facpub/407)

54. Verhelst J, Hulpiau P, Saelens X. Mx Proteins: Antiviral Gatekeepers That Restrain the Uninvited. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2021 Apr 5];77(4):551–66. Available from: </pmc/articles/PMC3973384/>

55. Lallemand-Breitenbach V, de Thé H. PML nuclear bodies. [Internet]. Vol. 2, Cold Spring Harbor perspectives in biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2010 [cited 2021 Apr 5]. Available from: </pmc/articles/PMC2857171/>

56. Crystal violet Assay Kit (ab232855) | Abcam [Internet]. [cited 2019 May 4]. Available from: <https://www.abcam.com/crystal-violet-assay-kit-cell-viability-ab232855.html>

57. (PDF) Determination of toxicity the cerium salts [Визначення

токсичності солей церію] [Internet]. [cited 2021 May 22]. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/290964939\\_Determination\\_of\\_toxicity\\_of\\_the\\_cerium\\_salts\\_Viznacenna\\_toksichnosti\\_solej\\_ceriu](https://www.researchgate.net/publication/290964939_Determination_of_toxicity_of_the_cerium_salts_Viznacenna_toksichnosti_solej_ceriu)

58. Peng Y, Xiaojun X, Yi G, Gao Z. Mechanism of the oxidation of organic dyes in the presence of nanoceria. Chem Commun [Internet]. 2011 Feb 21 [cited 2021 May 22];47(10):2916–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21264416/>

59. Raphide - Raphide - Wikipedia [Internet]. [cited 2021 Apr 5]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Raphide#/media/File:Raphide.jpg>

60. Радіус атома — Вікіпедія [Internet]. [cited 2021 May 22]. Available from: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Радіус\\_атома](https://ru.wikipedia.org/wiki/Радіус_атома)

61. Corzo A, Sanders D. Inhibition of Ca<sup>2+</sup> uptake in *Neurospora crassa* by La<sup>3+</sup>: a mechanistic study [Internet]. Vol. 138, Journal of General Microbiology. 1992 [cited 2019 Apr 26]. Available from: [www.microbiologyresearch.org](http://www.microbiologyresearch.org)

## ДОДАТКИ

## Додаток А1

Вигляд первинних даних, отриманих в експерименті щодо визначення антивірусної дії солей церію на моделі культура клітин L929/VSV. Профілактична схема. За первинними даними було побудовано графік (Рисунок 3.1)

Таблиця первинних даних 1

Показники оптичної густини лунок 96-лункового планшета.

Забарвлення клітин кристалічним фіолетовим. Довжина хвилі  $\lambda$  540 нм

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,407	0,38	0,366	0,367	0,354	0,581	1,284	1,083	0,957	1,087	1,068	1,242
B	0,451	0,438	0,157	0,823	0,879	0,824	1,088	1,037	0,763	0,911	0,766	1,082
C	1,052	0,965	0,934	1,136	0,3	0,351	1,094	1,016	0,948	0,879	1,002	0,545
D	1,172	1,133	1,172	1,136	0,803	0,921	0,654	0,782	1,158	0,966	0,64	1,146
E	1,192	0,334	1,028	1,237	0,706	1,212	0,913	0,976	1,002	1,008	0,952	1,137
F	1,109	1,164	0,262	1,062	1,046	0,683	0,892	0,853	0,919	0,85	0,916	1,095
G	1,08	0,89	1,265	1,093	0,499	0,443	0,778	0,991	0,946	1,102	1,079	0,641
H	0,124	0,187	0,375	0,458	1,127	0,705	0,92	0,209	0,887	1,009	0,793	0,869

Розшифровка планшета:

	Ce(III)				Ce(IV)							
10 мМ					К.в.		К.к.					
1,00 мМ												
100 мкМ												
10 мкМ					10 мМ	ндц						
1 мкМ					1.0 мМ							
0,1 мкМ					0.1 мМ							
100 нМ					10 мкМ							
10 нМ					1.0 мкМ							

Примітки: ■ - контроль вірусу, ■ - контроль клітин, ■ - сіль Се тривалентного, ■ - наночастинки  $\text{CeO}_2$ , ■ - сіль Се чотиривалентного, ■ - досліджувані концентрації солей та наночастинок.

## Додаток А2

## Таблиця первинних даних 2

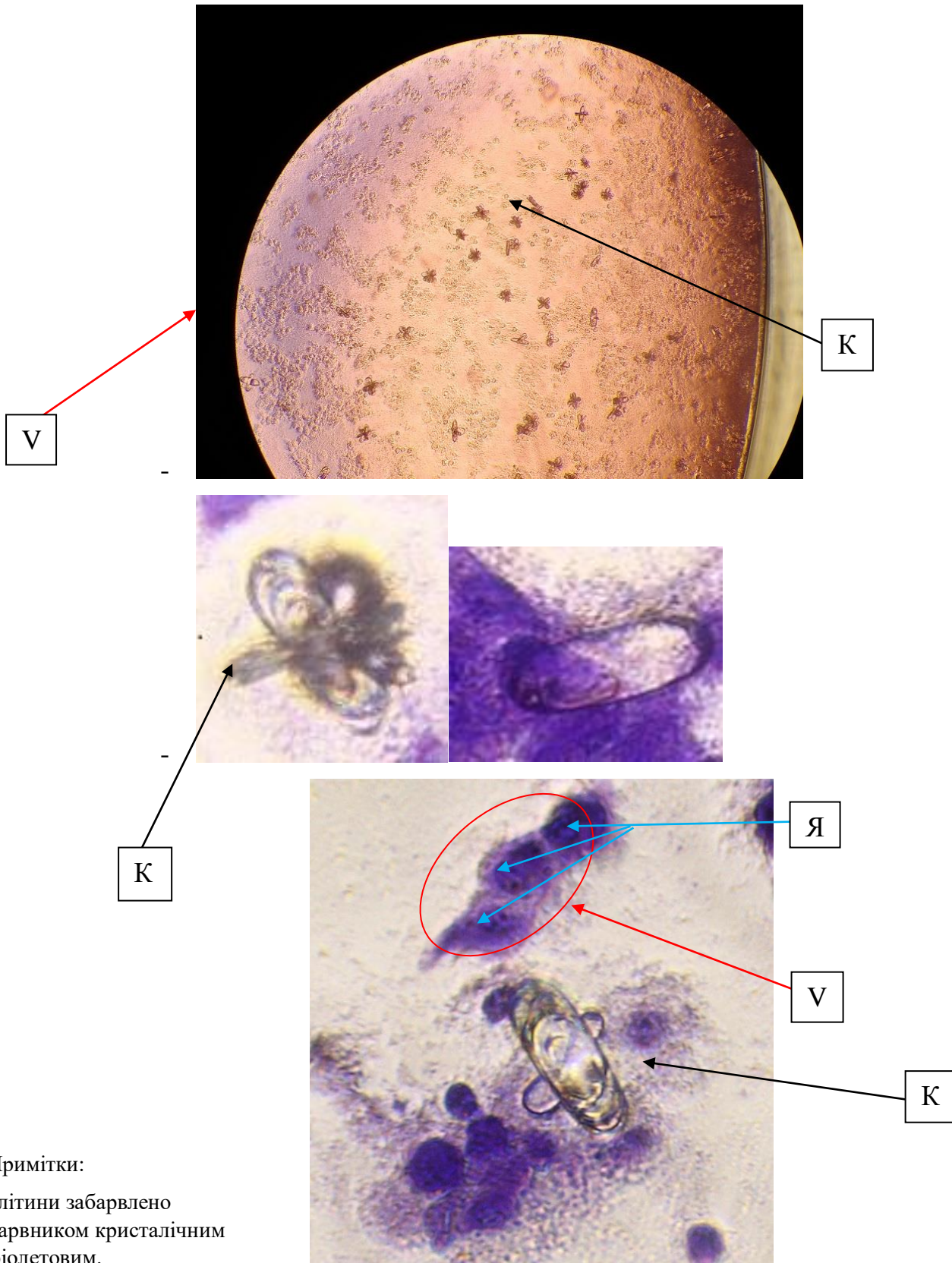
Відсоток живих клітин у кожній лунці 96-лункового планшета.

Значення оптичної густини з таблиці 3.1 переведено у відсоткові значення живих клітин у експериментальних лунках, розрахованих відносно показників у лунках, що містили контрольні інтактні клітини, прийняті за 100%.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	36,84	34,57	33,37	33,22	32,37	52,99	116,07	98,46	87,58	99,19	97,35	114,08
B	39,87	37,68	14,45	75,87	77,13	75,80	99,07	94,30	69,65	82,81	70,34	97,94
C	92,86	87,42	85,23	101,61	26,49	36,44	99,79	92,31	85,70	79,88	90,89	49,57
D	107,91	103,22	107,82	98,03	71,38	83,85	60,02	71,38	105,15	87,34	57,76	104,04
E	108,37	29,73	97,08	111,08	64,48	109,21	83,70	89,00	90,76	90,55	86,56	102,56
F	100,83	107,44	24,67	95,84	96,68	63,20	81,26	78,59	82,30	76,44	82,59	99,72
G	97,83	78,33	117,05	99,34	44,33	40,67	70,41	91,26	85,32	100,58	97,90	59,98
H	10,94	16,51	35,59	38,23	102,94	60,13	81,21	18,53	80,30	90,62	71,87	78,51

- Розшифровка планшета: збігається з розшифровкою вище.

- Зображення кристалів, які утворилися на платі з культурою клітин Vero після додавання до клітин зразків солі церію



Примітки:

клітини забарвлено барвником кристалічним фіолетовим.

V- клітини Vero,  
К- кристали, Я – клітинні ядра.