

УДК 546.655: 615.281.8

В. М. ОКСАМИТНИЙ, кандидат біологічних наук
Н. М. ЖОЛОБАК, кандидат біологічних наук
Н. О. ТИМОШОК, кандидат біологічних наук
А. Б. ЩЕРБАКОВ, кандидат хімічних наук
С. Л. РИБАЛКО, доктор медичних наук
В. А. СИНИЦИН, доктор ветеринарних наук,*
М. В. ВОЛКОВ, кандидат ветеринарних наук
М. Я. СПІВАК, доктор біологічних наук, член-кореспондент НАН України
В. О. ШЕВЧУК, аспірант*

*Державна наукова установа «Державний центр інноваційних біотехнологій»,
 * Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ*

ІНТЕРФЕРОН ТА НАНОЧАСТИНКИ ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ ЯК ОСНОВА СТВОРЕННЯ АНТИВІРУСНОГО ПРЕПАРАТУ

У статті наведені результати розробки препарату на основі синтезованих наночастинок діоксиду церію з позитивним дзета-потенціалом без стабілізатора та субстанції рекомбінатного інтерферону людини. Вивчено фармакокінетику препарату інтерферону в комплексі з наночастинками діоксиду церію. Найвищі титри інтерферону визначаються в крові піддослідних тварин на 2-5 день при уведенні комплексного препарату інтерферону з наночастинками діоксиду церію. Вивчено антигерпетичну активність наночастинок діоксиду церію на моделі генітального герпесу у мурчаків. Показано профілактичну та лікувальну ефективність застосування розчину наночастинок діоксиду церію в концентрації 1,25 мМ.

Ключові слова: інтерферон, наночастинки діоксиду церію, антивірусний препарат.

Одним з найважливіших завдань гуманної та ветеринарної медицини ХХІ століття залишається боротьба з інфекційними захворюваннями, значну частину яких становлять хвороби вірусної природи. Сьогодні причину багатьох соматичних захворювань та навіть психічних розладів пов'язують із присутністю в організмі збудника – найчастіше – вірусів. До таких захворювань, причиною виникнення яких є вірусна персистенція чи вірусний запуск проліферативного процесу, відносяться і онкологічні.

На даний момент в медицині використовується багато препаратів, що діють на різні стадії пухлинного процесу, проте практично всі їх ефекти знаходяться на межі токсичної побічної дії.

У 70-х роках після відкриття явища інтерференції великі надії поклалися на протипухлинні властивості препаратів інтерферону (ІФН). Беручи до уваги вірусну природу деяких видів онкологічних захворювань, інтерес до використання препаратів ІФН в онкології значно зріс після того, як була показана їх висока протівірусна активність.

* Науковий керівник - доктор біологічних наук, член-кореспондент НАН України М. Я. Співак

Але і тут довелося зіткнутися з рядом проблем: перш за все – виникнення реакцій аутопошкодження білкових препаратів, що пов'язано із завданням забезпечення стабільності самого препарату, запобігання формування аутоімунної, алергічної і анафілактичної відповіді на тлі забезпечення тривалого лікувального ефекту при введенні в організм [1].

Проблема низької ефективності введеного в організм ІФН пов'язана з його активною деструкцією протеазами і з окислювальним руйнуванням. У зв'язку з цим використання разом з ІФН препаратів, що мають антиокислювальні та/або стабілізуючі властивості, може збільшити ефективність застосування ІФН, або забезпечити той же ефект при використанні значно менших доз (за рахунок синергічної дії). Серед таких речовин особливий інтерес представляє нанокристалічний діоксид церію (НДЦ). Його властивості, а також перспективи біомедичного застосування докладно викладені в огляді [2]. Показано, що НДЦ проявляє низку цікавих властивостей, що дозволяють при його застосуванні забезпечити захист організму від окислювального стресу – зокрема, за рахунок притаманних йому антиоксидантної [3, 4, 5] і протирадикальної активностей [6].

Метою цієї роботи було створення комплексного препарату рекомбінантного інтерферону людини з наночастинками діоксиду церію та вивчення його фармакокінетики при введенні досліджуваних зразків до черевної порожнини мишей та антигерпетичної активності на моделі генітального герпесу у мурчаків.

Матеріали та методи досліджень. Синтезували два види золь НДЦ, що відрізняються розміром і способом стабілізації частинок в розчині. НДЦ розміром 5-6 нм без стабілізатора (золь А, «голі» НДЦ) отримували за методикою [7]. НДЦ розміром 2-5 нм, стабілізовані цитратом (золь Б), отримували за методикою, описаною в статті [8]. В результаті синтезу отримано добре закристалізовані частинки, що мають переважно гексагональну форму. Інтерферон одержували розробленим нами способом [9].

Композит на основі синтезованих наночастинок діоксиду церію створювали, поєднуючи компоненти у співвідношенні 1:1 за об'ємом.

Дослідження фармакокінетики проводили відповідно до методичних рекомендацій Міністерства охорони здоров'я України [10]. З цією метою використовували мишей чотирьохтижневого віку і масою 15-18 г. Миші утримувались в умовах віварію на постійному раціоні та при стаціонарному освітленні. Тварини були поділені на чотири групи: по 10 особин в групі – 5 самців та 5 самок. Перша група – контрольна, тваринам якої вводили нейтральне середовище 199 для культур клітин («Біотестлабораторія», Україна). Тварини другої групи отримували розведений препарат рекомбінантного ІФН людини в дозі 100 МО на тварину. Тварини третьої групи отримували золь наночастинок діоксиду церію в дозі 0,1 мМ на тварину. Тварини четвертої групи отримували нанобіокомпозит наночастинок діоксиду церію з інтерфероном, який містив по кількості введених компонентів: ІФН – 100 МО та НДЦ – 1 мМ на тварину. Досліджувані зразки вводили мишам у черевну порожнину одноразово. Кров відбирали з хвостової вени через три, дванадцять, двадцять чотири години, і далі – щодоби до п'ятої включно. Важливо відзначити, що ніяких побічних реакцій у тварин на введення зразків відмічено не було.

Активність ІФН в сироватці крові визначали, використовуючи перещеплювану лінію клітин тестикул поросяти (ПТП) та як індикатор вірус везикулярного

стоматиту (ВВС, штам Індіана), оцінюючи ступінь пригнічення цитопатичної дії тест-вірусу) (ЦПД) [11].

За титр інтерферону приймали величину обернену його розведенню, що затримувало деструкцію моношару клітин на 50 % (Од/мл). Для переведення Од/мл у МО/мл (міжнародні одиниці/мл) при кожному титруванні використовували пробу препарату референс-інтерферону з відомою активністю (МО/мл). Перерахунок Од/мл у МО/мл здійснювали за формулою:

$$A_0 = (A_p \times T_0) / T_p \quad (1),$$

де A_0 – активність досліджуваного зразка інтерферону у МО/мл,

A_p – активність референс-інтерферону у МО,

T_0 – титр досліджуваного зразка інтерферону у досліді (Од/мл),

T_p – титр референс-препарату інтерферону у досліді (Од/мл).

Дослідження антигерпетичної активності НДЦ на моделі генітального герпесу проводили на безпородних самцях-мурчаках масою 250-300 г, отриманих із розплідника «Глеваха» (Київ, Україна), яких утримувала в стандартних умовах віварію.

Модель генітальної герпетичної інфекції мурчаків створювали шляхом нанесення вірусмісної рідини на попередньо скарифіковану віспопрививальним пером шкіру пенісу. Розмір площі скарифікації складала 4-7 мм². Вірусмісну рідину наносили піпеткою відразу ж після скарифікації з наступним її втиранням у рану скляною паличкою. Клінічні симптоми експериментального герпесу відслідковували впродовж усього періоду хвороби. Критеріями ступеня перебігу інфекційного процесу були: площа і ступінь специфічних вражень, наявність набряку, гіперемії, орхіту, специфічних висипань, виразок. Вказані симптоми регулярно відтворювались у всіх інфікованих тварин, а специфічність вражень доведена виділенням у них вірусу, яким їх інфікували.

Максимальна інтенсивність кожної ознаки складала 4 бали. Ці ознаки дозволяють побудувати шкалу та відобразити хід хвороби кожної групи тварин графічно: від початку появи перших ознак хвороби до їх зникнення. Спостереження за тваринами проводили продовж трьох тижнів. Кожна група складалась із п'яти тварин.

Ефективність кожного препарату оцінювали на піку розвитку патологічного процесу: за зниженням прояву клінічних ознак, скороченню терміну захворювання, індексу лікувальної дії (ІЛД) в дослідних групах у порівнянні із контрольною:

$$ІЛД (\%) = \sum \text{досл.} / \sum \text{контр.},$$

де \sum досл. – кількість балів у дослідній групі тварин, де застосований препарат;

\sum контр. – кількість балів в контрольній групі тварин.

Антивірусну активність НДЦ (в концентрації 1,25 мМ) досліджували на моделі герпесу геніталій у мурчаків за лікувально-профілактичною та лікувальною схемами.

Лікувально-профілактична схема полягала в обробці поверхні статевого органу за 24 год до моделювання герпесу геніталій, а потім – кожну добу протягом п'яти днів після інфікування ВПГ-2.

У лікувальній схемі розчин НДЦ наносили на поверхню рани через 24 год після моделювання герпесу геніталій, а потім – кожну добу протягом п'яти днів після інфікування ВПГ-2.

У досліді було чотири групи тварин:

1 – тварини, яких інфікували тільки ВПГ-2;

2 – тварини, яких інфікували ВПГ-2 та лікували віролексом згідно рекомендаціям до застосування препарату;

3 – тварини, яким за 24 години до інфікування ВПГ-2 на досліджувану поверхню вносили розчин НДЦ та потім обробляли рану протягом п'яти днів (лікувально-профілактична схема);

4 – тварини, яким через 24 години після інфікування ВПГ-2 обробляли рану розчином НДЦ протягом п'яти днів (лікувальна схема).

Результати дослідження. Під час створення комплексного препарату на основі рекомбінантного інтерферону людини та наночастинок діоксиду церію були використані два види синтезованих золів НДЦ, що відрізнялися розміром і способом стабілізації частинок в розчині: НДЦ розміром 5-6 нм без стабілізатора (золь А, «голі» НДЦ) та НДЦ розміром 2-5 нм, стабілізовані цитратом (золь Б).

Золь А характеризується позитивним дзета-потенціалом і наявністю вільної поверхні частинок (відсутність органічних стабілізаторів). Як показано в роботі [12], такі параметри наночастинок CeO_2 сприятливі для специфічної адсорбції на макромолекулах протеїнів. Для золю наночастинок діоксиду церію, стабілізованих цитратом, характерний негативний дзета-потенціал, а присутній на поверхні частинок стабілізатор (цитрат) ускладнює безпосередній контакт наночастинок з білковими молекулами. У цьому випадку при змішуванні золю НДЦ і рекомбінантного інтерферону кожен з компонентів системи діяв як індивідуальна речовина, тоді як у випадку використання золю «голих» наночастинок - утворювався комплекс.

Таким чином, більш перспективним для створення комплексного препарату на основі рекомбінантного інтерферону людини та наночастинок діоксиду церію є використання золю «голих» наночастинок діоксиду церію (золь А).

Вивчення фармакокінетики застосовуваних препаратів показало, що після введення препарату ІФН людини до черевної порожнини мишей, перші титри ІФН визначались в сироватці крові тварин уже через три години (табл. 1). Більш високі титри ІФН (10 – 20 МО/мл) визначалися в сироватці крові мишей на другу – п'яту доби після введення препарату ІФН. Результати дослідження наведено у таблиці 1.

Таблиця 1.

Фармакокінетика ІФН при введенні досліджуваних зразків до черевної порожнини мишей

Групи тварин	Титр ІФН (МО/мл) в сироватці крові через різні проміжки часу – години – після введення зразків						
	33	112	224	448	772	996	120
Контрольна - Середовище 199	00	00	010	110	110	55	5
Середовище 199 + ІФН (100 МО/тварину)	55	00	00	110	220	220	20
Середовище 199 + НДЦ (1 мМ/тварину)	00	00	00	-0	00	00	0
Середовище 199 + нанобіоком-позит (100 МО ІФН та 1 мМ НДЦ на тварину)	00	-0	00	6640	6640	6640	640

Якщо введення середовища 199 для культивування клітин до черевної порожнини мишей супроводжувалось появою незначних титрів ІФН (5 – 10 МО/мл) на другу – п'яту доби, що може свідчити про певну реакцію організму на ін'єкцію препарату, то введення 1 мМ золю НДЦ, розведеного на середовищі 199, не супроводжувалось появою будь-яких титрів ІФН в сироватці крові мишей. Отримані результати є як підтвердженням того, що контрольна група тварин, що отримувала НДЦ, є адекватним негативним контролем, так і свідченням відсутності інтерференогенної активності НДЦ в організмі експериментальних тварин (відсутності імуногенної активності НДЦ), що є надзвичайно важливим фактом, оскільки саме активуючий вплив на імунну систему може бути фактором ризику при застосуванні наноматеріалів.

Застосування нанобіокомпозиту, що містив у своєму складі рекомбінантний ІФН людини, супроводжувалось реєстрацією значних титрів ІФН (640 МО/мл) на другу – п'яту доби після його однократного введення до черевної порожнини мишей. Отриманий результат свідчить, що введення ІФН у складі нанобіокомпозиту супроводжується тривалою (до п'яти діб) циркуляцією ІФН в сироватці експериментальних тварин та є позитивним фактом, який дозволяє розглядати створений нанобіокомпозит на основі НДЦ та ІФН людини, як перспективний засіб для формування тривалої ІФН відповіді організму. Значні титри ІФН та тривалість його циркуляції в сироватці крові дають позитивні підстави для вивчення перспективності застосування створеного нанобіокомпозиту за умов, коли організм потребує тривалої присутності ІФН в сироватці крові, насамперед, при хронічних вірусних гепатитах чи інших інфекціях, чутливих до інтерферонотерапії.

Вивчення антигерпетичної активності НДЦ проводили на моделі генітального герпесу у мурчаків. Отримані результати вивчення ефективності розчину НДЦ на моделі генітального герпесу мурчаків представлені у таблиці 2.

Таблиця 2.

Ефективність НДЦ на моделі генітального герпесу у мурчаків

Група тварин	Препарат	Тривалість хвороби (доби)	р	СІВХ*, бали	ІЛД*, %
1	Контроль інфікування	15,0 ± 3,2		80,0	–
2	Віролекс	9,75 ± 2,86	< 0,05	22,0	56,0
3	Розчин НДЦ (1,25 мМ) профілактично-лікувальна схема	10,0 ± 0,39	< 0,001	29,0	63,8
4	Розчин НДЦ (1,25 мМ) лікувальна схема	8,0 ± 1,3	< 0,05	31,0	61,3

Примітки: СІВХ – середня інтенсивність вираженості хвороби в балах, ІЛД – індекс лікувальної дії.

Показано, що профілактично-лікувальне застосування розчину НДЦ в концентрації 1,25 мМ ефективно знижувало симптоматику інфекції до 29,0 балів, що відповідає терапевтичній дії на рівні 63,8% ($P < 0,001$), і таким чином, статистично достовірно скорочувало тривалість інфекції.

Застосування препарату за лікувальною схемою забезпечувало зниження симптоматики інфекції до 31,0 балу, а терапевтичний ефект склав 61,3 %. Трива-

лість інфекції у тварин становила 8 днів, що статистично достовірно ($P < 0,05$) відрізняється від значень тривалості інфекції у групі контрольних тварин, інфікованих ВПГ-2. Отримані результати свідчать про ефективність НДЦ у дозі 1,25 мМ.

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про успішність розробки нових підходів для вивчення оригінальних хіміотерапевтичних засобів з антивірусною активністю на основі нанокристалічного діоксиду церію. Застосування розробленої експериментальної моделі генітального герпесу значно розширює можливості експериментальної хіміотерапії герпетичної інфекції. Використана модель – наглядна, добре відтворювана та зручна для кількісної оцінки ступеню інтенсивності патологічних симптомів генітального герпесу.

Отримані результати щодо профілактично-лікувального застосування розчину НДЦ за умови його аплікації на вражену поверхню органу свідчать про його виражену антивірусну активність. Ефект від застосування НДЦ перевищує такий, що отримано при використанні офіційно щирокозастосовуваного препарату віролекс, що відкриває перспективи використання НДЦ на практиці при герпетичних інфекціях різної локалізації.

Висновки і перспективи подальшого розвитку зазначеного напрямку.

1. Синтезовано два види золів НДЦ, що відрізняються розміром і способом стабілізації частинок в розчині. Показано, що НДЦ розміром 5-6 нм без стабілізатора («голі» НДЦ) утворюють комплекс з рекомбінантним інтерфероном людини, що дає перспективу для створення нових високоефективних препаратів для лікування захворювань вірусної та іншої етіології.

2. Вивчено фармакокінетику препаратів інтерферону, нанокристалічного діоксиду церію та комплексу інтерферону з наночастинками діоксиду церію. Показано, що найвищі титри інтерферону визначаються в крові піддослідних тварин на 2-5 день при уведенні комплексного препарату інтерферону з наночастинками діоксиду церію.

3. Вивчено антигерпетичну активність наночастинок діоксиду церію на моделі генітального герпесу у мурчаків. Показано профілактичну та лікувальну ефективність застосування розчину наночастинок діоксиду церію в концентрації 1,25 мМ.

Список використаної літератури

1. Шевель М. В. Вопросы стабильности белковых препаратов: молекулярные аутоповреждения и их функциональные следствия / М.В. Шевель, С. В. Верева // В кн. : Молекулярная патология белка. Под ред. Д.И.Заболотного. К. : Логос. – 2008. – С. 32-41.

2. Иванов В. К. Структурно-чувствительные свойства и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия / Иванов В. К., Усатенко А. В., Щербаков А. Б. // Успехи химии. – 2009. – Т. 78, – № 9. – 2009, – С. 924-941.

3. Иванов В. К. Антиоксидантная активность нанокристаллического диоксида церия по отношению к антоцианам / Иванов В. К., Усатенко А. В., Щербаков А. Б. // Журн. неорган. химии. – 2009. – Т. 54. – №10. – С. 1596-1601.

4. A. S. Karakoti, N. A. Monteiro-Riviere, R. Aggarwal, J. P. Davis, R. J. Narayan, W. T. Self. Nanoceria as antioxidant: Synthesis and biomedical applications // JOM Journal of the Minerals, Metals and Materials Society. – 2008, – Vol. 60, N 3, – P.33-37.

5. Sherbakov A.B., Zholobak N.M., Ivanov V.K., Ivanova O.S., Marchevsky A.V., Baranchikov A.E., Spivak M.Ya., Tretyakov Yu.D. Synthesis and Antioxidant activity of biocompatible maltodextrin-stabilized aqueous sols of nanocrystalline ceria // Russian Journal of inorganic chemistry. – 2012. – Vol. 57, N 11. – P. 1411-1418.

6. Иванов В. К. Инактивирование нитроксильного радикала наночастицами диоксида церия / Иванов В. К., Щербаков А. Б., Рябоконт И. Г. и др. // ДАН. – 2010. – Т. 430, № 5. – С. 639-642.

7. Иванов В. К. Гидротермально-микроволновой синтез стабильных золей нанокристаллического диоксида церия для биомедицинских применений / Иванов В. К., Полежаева О. С., Щербаков А. Б. и др. // Журнал неорганической химии. – 2010. – Т. 55, № 1. – С. 3-8.

8. Иванов В. К. Синтез и исследование термической устойчивости золей нанокристаллического диоксида церия, стабилизированных лимонной и полиакриловой кислотами / Иванов В. К., Полежаева О. С., Шапорев А. С. и др. // Журнал неорганической химии. – 2020. – Т. 55, № 3, – С. 368-373.

9. Мельник А.И. Получение очищенного рекомбинантного $\alpha 2b$ -интерферона человека / Мельник А.И., Орловская И.В., Жолобак Н.М., Спивак Н.Я. // Mikrobiologichny Zhurnal. – 2012. – V74., N3. – С.72-78.

10. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації: за ред. О.В. Стефанова / Міністерство охорони здоров'я України. Державний фармакологічний центр. – К. : 2001. – С. 390-392.

11. Спивак Н.Я. Интерферон и система мононуклеарных фагоцитов / Спивак Н.Я., Лазаренко Л.Н., Михайленко О.Н. – К. : Фитосоцицентр, 2002. – 164 с.

12. Patil S., Sandberg A., Heckert E., Self W. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential // Seal Biomaterials. – 2007. – Vol. 28, № 31. – P.4600–4607.

ИНТЕРФЕРОН И НАНОЧАСТИЦЫ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ КАК ОСНОВА СОЗДАНИЯ АНТИВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА / В. Н. Оксамитный, Н. М. Жолобак, Н. А. Тимошок, А. Б. Щербаков, С. Л. Рыбалко, В. А. Синицин, Н. Я. Спивак, В. О. Шевчук.

В статье приведены результаты разработки препарата на основе синтезированных наночастиц диоксида церия с положительным дзета - потенциалом без стабилизатора и субстанции рекомбинантного интерферона. Изучено фармакокинетику препарата интерферона в комплексе с наночастицами диоксида церия. Высокие титры интерферона определяются в крови подопытных животных на 2-5 день при вводе комплексного препарата интерферона с наночастицами диоксида церия. Изучены антигерпетическую активность наночастиц диоксида церия на модели генитального герпеса у морских свинок. Показано профилактическую и лечебную эффективность применения раствора наночастиц диоксида церия в концентрации 1,25 мМ.

Ключевые слова: интерферон, наночастицы диоксида церия, противовирусный препарат.

INTERFERON AND CERIM DIOXIDE NANOPARTICLES AS THE BASIS OF CREATION OF ANTIVIRAL DRUGS /V. M. Oksamytnyi, N. M. Zholobak, N. O. Tymoshok, O. B. Shcherbakov, S. L. Rybalko, V. A. Sinitsyn, M. Ya. Spivak, V. O. Shevhuk

The results of drug development based on ceria nanoparticles synthesized with a positive zeta - potential without stabilizer and substance recombinant interferon . Studied the drug pharmacokinetics of interferon in combination with nanoparticles of cerium dioxide. High titers of interferon determined in the blood of experimental animals on day 2-5 when entering the complex preparation of interferon with nanoparticles of cerium dioxide. Studied antiherpetic activity of ceria nanoparticles genital herpes model in guinea pigs. Displaying preventive and curative efficacy of ceria nanoparticles solution at a concentration of 1.25 mM

Keywords: interferon, cerium dioxide nanoparticles, an antiviral drug.

Рецензент – доктор ветеринарных наук В.Л. Коваленко.