

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

РУДНИЦЬКА
Ольга Володимирівна

УДК 577.112.7:616

ДИСЕРТАЦІЯ

**ВПЛИВ КАРБОНОВИХ НАНОЧАСТИНОК НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ, ЯКІ
КОНТРОЛЮЮТЬ ПРОЛІФЕРАЦІЮ, У КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН**

091 – Біологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ / Ольга РУДНИЦЬКА/

Науковий керівник: **Олександр МІНЧЕНКО**, доктор біологічних наук,
професор, член-кореспондент НАН України

Київ – 2023

АНОТАЦІЯ

Рудницька О.В. Вплив карбонових наночастинок на експресію генів, які контролюють проліферацію, у клітинах людини та тварин. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2023.

Дисертація присвячена дослідженню механізмів дії малих доз карбонових наночастинок, а саме, одностінних карбонових нанотрубок (SWCNTs) і оксиду графену, на експресію ключових генів, які регулюють проліферацію та виживання клітин, і мікроРНК у нормальних астроцитах людини (лінія NHA/TS) та клітинах гліобластоми (лінія U87MG) для з'ясування ролі стресу ендоплазматичного ретикулума у механізмах їхньої дії.

Актуальність даної теми пов'язана з бурхливим розвитком нанотехнологій, які знаходять все ширше застосування у різних сферах, зокрема, біомедичній. Їх активно розглядають для впровадження в діагностику та лікування різноманітних захворювань, зокрема онкологічних. Серед найбільш перспективних виділяють наночастинок на основі карбону, зокрема, завдяки великій різноманітності їх структури та високій стабільності. Проте поряд з великою кількістю позитивних ефектів відмічаються також і негативні ефекти від їх використання, при цьому механізми їхньої дії залишаються ще не достатньо з'ясованими. Це є особливо важливим, оскільки користь від застосування карбонових наночастинок для лікування злоякісних новоутворень повинна бути більша, ніж потенційна шкода, яка може бути завдана здоровим клітинам.

Одним з найбільш можливих механізмів впливу карбонових наночастинок на клітини людини розглядають стрес ендоплазматичного ретикулума (ER). Він відіграє важливу роль у підтриманні життєдіяльності

клітини шляхом перебудови внутрішньоклітинних процесів направлених на виживання клітини, а у випадку довготривалих негативних ефектів призводить до запуску програми загибелі клітини.

Важливим завданням роботи було порівняти чутливість нормальних астроцитів людини і клітин гліобластоми до дії карбонових нанотрубок на експресію генів, враховуючи їх використання у біомедицині. Крім того, для дослідження можливого впливу карбонових наночастинок на розвиток нервової системи, оскільки однією із функцій астроцитів є регуляція процесів нейрогенезу, були здійснені експерименти на ембріонах *Danio rerio*, препарати РНК з яких були досліджені на наявність змін в експресії мікроРНК. Ці дані сприятимуть кращому розумінню механізмів розвитку різноманітних ускладнень за умов використання цих наночастинок як терапевтичних або діагностичних агентів, зокрема, при онкотерапії.

В ході виконання роботи були використанні сучасні методи біохімії та молекулярної біології: культивування клітин, виділення РНК, визначення спектральних характеристик РНК нано-спектрофотометричним методом, синтез комплементарних ДНК за допомогою зворотної транскрипції, методи кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, методи біоінформатики та статистичної обробки результатів.

Для з'ясування впливу одностінних карбонових нанотрубок на нормальні астроцити людини на молекулярно-генетичному рівні, нами було досліджено експресію поліфункціональних генів, що кодують протеїн 3 раку грудної (молочної) залози стійкого до антиестрогену (BCAR3), карбоангідразу 9 (CA9), кластерин (CLU), член В9 родини протеїнів теплового шоку DnaJ (DNAJB9), протеїн 5, що зв'язує жирні кислоти (FABP5), інгібітор альфа-субодиниці фактора 1, що індукується гіпоксією (HIF1AN), головний комплекс гістосумісності класу I G (HLA-G), член 9 родини А малих протеїнів теплового шоку (HSPA9), ізоцитрат дегідрогеназу 2 (IDH2), протеїн 3, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту (IGFBP3), протеїн 6, що зв'язує інсуліноподібний

фактор росту (IGFBP6), протеїн 1, подібний до протоонкогена MYB (MYBL1), протеїн 2, подібний до протоонкогена MYB (MYBL2), пептидилгліцин альфа-амідуючу монооксигеназу (PAM) та член 8 родини 6 розчинних транспортерів (SLC6A8), що контролюють проліферацію і виживання у цих клітинах за дії малих доз одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 мкг/мл). Більше того, деякі з цих генів тісно пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулума та розвитком канцерогенезу, що також є надзвичайно важливим з погляду дослідження генотоксичності впливу карбонових наночастинок на нормальні астроцити.

З метою вивчення молекулярних механізмів дії оксиду графену на нормальні астроцити людини (NHA/TS) і з'ясування його негативних ефектів нами були проведені дослідження впливу цих карбонових наночастинок на рівень експресії ключових генів, які кодують важливі регуляторні протеїни та ензими, що пов'язані з контролем метаболізму і проліферацією клітин. Головна увага була зосереджена на таких генах як *BCAR3* (протеїн 3 раку грудної залози, стійкий до антиестрогену), *BRCA1* (протеїн, чутливий до 1-го типу раку молочної залози), *IGFBP3* (протеїн 3, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту), *IGFBP6* (протеїн 6, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту), *MYBL1* (протеїн 1, подібний до протоонкогена MYB), *MYBL2* (протеїн 2, подібний до протоонкогена MYB), *NAMPT* (нікотинамід фосфорибозилтрансфераза) та *TSPAN13* (тетраспанін 13).

У зв'язку з тим, що зміна в експресії мікроРНК може впливати на пост-транскрипційну регуляцію рівня експресії тих мРНК, які мають відповідні сайти зв'язування з мікроРНК, нами були також проведені дослідження по з'ясуванню впливу SWCNTs на рівень експресії низки мікроРНК. У 3'-последовностях деяких із досліджених мРНК були виявлені сайти зв'язування з miR-19a-3p, miR-27a-3p, miR-144-3p, miR-145-5p і miR-182-5p та визначений рівень їхньої експресії у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії карбонових наночастинок. Крім того, були проведені дослідження впливу оксиду графену на

рівень експресії мікроРНК miR-96a-5p та miR-145-5p, які мали специфічні сайти зв'язування з мРНК NAMPT і TSPAN13.

Оскільки мікроРНК відіграють важливу роль у цереброваскулярному розвитку, для з'ясування впливу карбонових наночастинок на розвиток тканини головного мозку нами було здійснено дослідження впливу малих доз SWCNTs на рівень експресії мікроРНК miR-143-3p, miR-145-5p, miR-182-5p і miR-206-5p, які пов'язані з регулюванням метаболізму, проліферацією клітин та нейрогенезом, в ембріонах *Danio rerio*.

Оскільки численні дослідження свідчать про можливість залучення сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума до реалізації токсичної дії наночастинок, нами були проведені дослідження на клітинах гліобластоми з нативним і пригніченим ERN1 сигнальним шляхом стресу ендоплазматичного ретикулума. Для цього було обрано декілька генів, які кодують ключові регуляторні протеїни, пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулума, такі як протеїн чутливий до 1-го типу раку молочної залози (BRCA1), кластерин (CLU) і член B9 родини протеїнів теплового шоку DnaJ (DNAJB9), з метою з'ясування ролі стресу ендоплазматичного ретикулума в механізмі дії карбонових нанотрубок, а також порівняння чутливості експресії цих генів до дії малих доз цих наночастинок у нормальних астроцитах людини (NHA/TS) та у двох сублініях клітин гліобластоми U87: з нативним ERN1 сигнальним шляхом (трансфікованих вектором) і з пригніченим домінант-негативною конструкцією ERN1.

Новизною роботи є результати стосовно того, що одностінні карбонові нанотрубки і оксид графену мають виражений вплив на експресію низки важливих регуляторних генів, продукти яких приймають участь у контролі проліферації та виживання клітин, у нормальних астроцитах людини. Так, результати дослідження впливу карбонових наночастинок на нормальні астроцити людини вперше показали наявність геноспецифічного характеру дії малих доз одностінних карбонових нанотрубок і оксиду графену на експресію генів, пов'язаних з регуляцією проліферації та виживання клітин, у нормальних

астроцитах лінії NHA/TS, причому вплив оксиду графену був більш вираженим, у порівнянні з SWCNTs. Ці гени є поліфункціональними і пов'язані не лише з регуляцією проліферації та виживання клітин, а також з контролем різноманітних клітинних процесів, зокрема імунної відповіді. Слід зазначити, що зміни рівня експресії цих генів асоційовані з розвитком канцерогенезу, оскільки пригнічення експресії більшості із цих генів сприяє зниженню проліферації, інвазії та метастазування.

Встановлено, що за дії малих доз цих карбонових наночастинок суттєво змінюється рівень експресії мікроРНК, які мають специфічні сайти зв'язування з деякими із досліджених нами мРНК, а це свідчить про наявність і пост-транскрипційних механізмів регуляції експресії цих генів поліфункціональних протеїнів, які тісно пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулума, проліферацією і виживанням клітин, а також канцерогенезом.

Такі зміни в експресії мікроРНК та мРНК саме у нормальних астроцитах людини можуть стати передумовою для розвитку змін у нервовій тканині. Виявлені нами порушення в експресії мікроРНК у ембріонах *Danio rerio* за дії різних концентрацій карбонових нанотрубок добре узгоджуються з появою в них нейротоксичних ефектів, які проявляються на ранніх стадіях ембріонального розвитку центральної нервової системи і були дозозалежними.

Вперше показано, що нормальні астроцити на рівні експресії генів є більш чутливими до дії одностінних карбонових нанотрубок порівняно з клітинами гліобластоми. Так, під впливом одностінних карбонових нанотрубок рівень експресії генів *BRCA1* та *DNAJB9* змінюється у нормальних астроцитах більш виражено порівняно з клітинами гліобластоми лінії U87MG, а пригнічення ERN1 сигнального шляху ER стресу у клітинах гліобластоми майже повністю інгібує дію наночастинок на експресію цих генів. Знижена чутливість клітин гліобластоми до дії одностінних карбонових нанотрубок може бути обумовлена індукованою стресом ендоплазматичного ретикулума резистентністю пухлинних клітин. Таким чином, стрес ендоплазматичного ретикулума відіграє важливу роль у модулюванні SWCNTs на експресію генів.

Практичне значення отриманих результатів полягає у виявленні більш високої чутливості нормальних астроцитів порівняно з клітинами гліобластоми до дії одностінних карбонових нанотрубок на рівень експресії генів. Цей факт може бути використаним як важливе попередження до застосування карбонових наночастинок у медико-біологічних цілях, у тому числі при діагностиці та лікуванні онкологічних захворювань. Встановлені ефекти карбонових наночастинок на рівень експресії ключових регуляторних генів є підґрунтям для виявлення генетичних маркерів метаболічних порушень, що є вкрай важливим для ранньої діагностики розвитку вад головного мозку, лікування яких пов'язане з різними побічними ефектами, які становлять серйозні ризики для здоров'я та життя пацієнтів.

Отримані результати доводять важливість вивчення молекулярних механізмів дії карбонових наночастинок при оцінці біобезпеки їхнього застосування для різних біомедичних цілей, оскільки за дії одностінних карбонових нанотрубок і оксиду графену порушується експресія важливих регуляторних генів у результаті перепрограмування геному за участі стресу ендоплазматичного ретикулума. Виявлені порушення експресії мРНК і мікроРНК, які відповідають за регуляцію проліферації та виживання клітин, розглядаються як можливі молекулярні механізми розвитку різноманітних патологічних станів і можуть бути корисними для оцінки токсичних впливів наночастинок.

Ключові слова: карбонові наночастинок, ядро, експресія генів, РНК, BRCA1, DNAJB9, АСТВ, кПЛР, стрес ендоплазматичного ретикулума, нормальні астроцити людини, пухлинні клітини, гліобластома.

ANNOTATION

Rudnytska O.V. The impact of carbon nanoparticles on the expression of proliferation-related genes in human and animal cells.

Dissertation for a doctor of philosophy (Ph.D.) scientific degree, in specialty 091 “Biology” – Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2023.

The dissertation is devoted to the study of the mechanisms of action of low doses of carbon nanoparticles, namely, single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) and graphene oxide, on the expression of key genes that regulate cell proliferation and survival, and miRNAs in normal human astrocytes (NHA/TS cell line) and glioblastoma cells (U87MG cell line) for elucidation of the role of endoplasmic reticulum stress in the mechanisms of their action.

The relevance of this topic is related to the rapid development of nanotechnologies, which are increasingly used in various fields, in particular, biomedical. They are being actively considered for use in the diagnosis and treatment of various diseases, including oncology. Nanoparticles based on carbon are among the most promising, in particular, due to the wide variety of their structure and high stability. However, along with a large number of positive effects, there are also negative effects from their use, while the mechanisms of their action remain not yet sufficiently elucidated. This is particularly important because the benefit of using carbon nanoparticles for the treatment of malignant neoplasms should be greater than the potential harm that can be caused to healthy cells.

Endoplasmic reticulum (ER) stress is considered one of the most possible mechanisms of carbon nanoparticle impact on human cells. It plays an important role in maintaining cell vitality by restructuring intracellular processes aimed at cell survival, and in the case of long-term negative effects, it leads to the initiation of the cell death program.

An important task of the work was to compare the sensitivity of normal human astrocytes and glioblastoma cells to the effect of carbon nanotubes on gene expression,

considering their use in biomedicine. In addition, to investigate the possible influence of carbon nanoparticles on the development of the nervous system, since one of the functions of astrocytes is the regulation of neurogenesis processes, experiments were carried out on *Danio rerio* embryos, RNA preparations from which were examined for the presence of changes in miRNA expression. These data will contribute to a better understanding of development mechanisms of various complications under the conditions of using these nanoparticles as therapeutic or diagnostic agents, in particular, in oncology therapy.

In the course of the work, modern methods of biochemistry and molecular biology were used: cell cultivation, RNA isolation, determination of the spectral characteristics of RNA by the nano-spectrophotometric method, synthesis of complementary DNA using reverse transcription, methods of quantitative polymerase chain reaction in real-time, electrophoretic analysis of nucleic acids, methods of bioinformatics and statistical processing of results.

To find out the effect of single-walled carbon nanotubes on normal human astrocytes at the molecular genetic level, we studied the expression of multifunctional genes encoding anti-estrogen-resistant breast cancer protein 3 (BCAR3), carbonic anhydrase 9 (CA9), clusterin (CLU), heat shock protein family member B9 DnaJ (DNAJB9), fatty acid binding protein 5 (FABP5), inhibitor of hypoxia-inducible factor 1 alpha subunit (HIF1AN), major histocompatibility complex, class I, G (HLA-G), small heat shock protein family A member 9 (HSPA9), isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2), insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3), insulin-like growth factor-binding protein 6 (IGFBP6), MYB proto-oncogene-like protein 1 (MYBL1), MYB proto-oncogene-like protein 2 (MYBL2), peptidylglycine alpha amidating monooxygenase (PAM), and soluble transporter family 6 member 8 (SLC6A8), which control proliferation and survival, in these cells under the action of small doses of single-walled carbon nanotubes (2 and 8 $\mu\text{g/ml}$). Moreover, some of these genes are closely related to the endoplasmic reticulum stress and the development of carcinogenesis, which is also extremely important from the point of view of studying the genotoxicity of carbon nanoparticle effects on normal astrocytes.

To study the molecular mechanisms of the action of graphene oxide on normal human astrocytes (NHA/TS) and to clarify its negative effects, we conducted studies of the effect of these carbon nanoparticles on the expression level of key genes that encode important regulatory proteins and enzymes associated with control of metabolism and cell proliferation. The focus was on genes such as *BCAR3* (breast cancer antiestrogen resistant protein 3), *BRCA1* (breast cancer type 1 susceptibility protein), *IGFBP3* (insulin-like growth factor binding protein 3), *IGFBP6* (insulin-like growth factor-binding protein 6), *MYBL1* (MYB proto-oncogene-like protein 1), *MYBL2* (MYB proto-oncogene-like protein 2), *NAMPT* (nicotinamide phosphoribosyltransferase) and *TSPAN13* (tetraspanin 13).

Because a change in miRNA expression can affect post-transcriptional regulation of the expression level of those mRNAs that have the corresponding miRNA binding sites, we also conducted studies to find out the effect of SWCNTs on the expression level of several miRNAs. Binding sites with miR-19a-3p, miR-27a-3p, miR-144-3p, miR-145-5p and miR-182-5p were detected in the 3'-sequences of some of the mRNAs we studied, and their expression level was determined in normal human astrocytes (NHA/TS) under the influence of carbon nanoparticles. In addition, studies of the effect of graphene oxide on the expression level of miR-96a-5p and miR-145-5p microRNAs, which had specific binding sites with NAMPT and TSPAN13 mRNA, were conducted.

Since microRNAs play an important role in cerebrovascular development, to find out the effect of carbon nanoparticles on the development of brain tissue, we conducted a study of the effect of small doses of SWCNTs on the expression level of microRNAs miR-143-3p, miR-145-5p, miR-182-5p and miR-206-5p, which are associated with regulation of metabolism, cell proliferation and neurogenesis, in *Danio rerio* embryos.

Since numerous studies indicate the possibility of involvement of endoplasmic reticulum stress signaling pathways in the realization of the toxic effect of nanoparticles, we conducted studies on glioblastoma cells with native and suppressed ERN1 signaling pathways of endoplasmic reticulum stress. For this, several genes

encoding key regulatory proteins associated with endoplasmic reticulum stress, such as breast cancer-sensitive protein type 1 (BRCA1), clusterin (CLU), and member B9 of the heat shock protein family DnaJ (DNAJB9) were selected in order to clarify the role of endoplasmic reticulum stress in the mechanism of action of carbon nanotubes, as well as to compare the sensitivity of the expression of these genes to the action of small doses of these nanoparticles in normal human astrocytes (NHA/TS) and in two sublines of glioblastoma cells U87: with native ERN1 signaling pathway (transfected with a vector) and with a suppressed dominant-negative ERN1 construct.

The novelty of the work is the results that single-walled carbon nanotubes and graphene oxide have a pronounced effect on the expression of several important regulatory genes, the products of which are involved in the control of cell proliferation and survival, in normal human astrocytes. Thus, the investigation results of the effect of carbon nanoparticles on normal human astrocytes showed for the first time the presence of a gene-specific effect of small doses of SWCNTs and graphene oxide on the expression of genes related to the regulation of cell proliferation and survival in normal astrocytes (NHA/TS), and the effect of graphene oxide was more pronounced compared to SWCNTs. These genes are polyfunctional and related not only to the regulation of cell proliferation and survival but also to the control of various cellular processes, including the immune response. It should be noted that changes in the level of expression of these genes are associated with the development of carcinogenesis since suppression of the expression of most of these genes contributes to the reduction of proliferation, invasion and metastasis.

It was found that under the action of small doses of these carbon nanoparticles, the expression level of microRNAs, which have specific binding sites with some of the mRNAs we have studied, significantly changes, and this indicates the presence of post-transcriptional regulation of expression of these genes of polyfunctional proteins, which are closely related associated with endoplasmic reticulum stress, cell proliferation and survival, as well as carcinogenesis.

Such changes in miRNA and mRNA expression in normal human astrocytes can become a prerequisite for the development of changes in nervous tissue. We detected

violations in the expression of miRNA in *Danio rerio* embryos under the influence of different concentrations of carbon nanotubes are well consistent with the appearance of neurotoxic effects in them, which are manifested in the early stages of embryonic development of the central nervous system and were dose-dependent.

For the first time, it was shown that normal astrocytes are more sensitive to the action of single-walled carbon nanotubes compared to glioblastoma cells at the level of gene expression. Thus, under the influence of single-walled carbon nanotubes, the expression level of *BRCA1* and *DNAJB9* genes changes in normal astrocytes more pronounced compared to glioblastoma cells of the U87MG line, and inhibition of ERN1 of the ER stress-signaling pathway in glioblastoma cells almost completely inhibits the effect of nanoparticles on the expression of these genes. Reduced sensitivity of glioblastoma cells to single-walled carbon nanotubes may be due to endoplasmic reticulum stress-induced resistance of tumor cells. Thus, endoplasmic reticulum stress plays an important role in the modulation of gene expression by SWCNTs.

The practical significance of the obtained results consists in detection of a higher sensitivity of normal astrocytes compared to glioblastoma cells to the effect of single-walled carbon nanotubes on the level of gene expression. This fact can be used as an important warning before the use of carbon nanoparticles for medical and biological purposes, including in the diagnosis and treatment of oncological diseases. The established effects of carbon nanoparticles on the expression level of key regulatory genes are the basis for the detection of genetic markers of metabolic disorders, which is extremely important for the early diagnosis of the development of brain defects, the treatment of which is associated with various side effects that pose serious risks to health and patients' lives.

The obtained results prove the importance of studying the molecular mechanisms of action of carbon nanoparticles in assessing the biosafety of their use for various biomedical purposes, since under the action of single-walled carbon nanotubes and graphene oxide, the expression of important regulatory genes is disrupted as a result of genome reprogramming with the participation of endoplasmic reticulum

stress. Identified abnormalities in the expression of mRNA and miRNA, which are responsible for the regulation of cell proliferation and survival, are considered possible molecular mechanisms for the development of various pathological conditions and may be useful for assessing the toxic effects of nanoparticles.

Keywords: carbon nanoparticles, nucleus, gene expression, RNA, BRCA1, DNAJB9, ACTB, qPCR, endoplasmic reticulum stress, normal human astrocytes, tumor cells, glioblastoma.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. **Rudnytska O.V.**, Khita O.O., Minchenko D.O., Tsymbal D.O., Yefimova Y.V., Sliusar M.Y., Minchenko O.H. The low doses of SWCNTs affect the expression of proliferation and apoptosis related genes in normal human astrocytes. *Current Research in Toxicology*, 2021, 2: 64–71. doi: 10.1016/j.crtox.2021.02.001 (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів CLU, DNAJB9, IGFBP3, IGFBP6 і мікроРНК miR-19-3p, miR-27-3p, miR-145-5p, обробка даних та участь у написанні статті*). **Scopus i PubMed**
2. Minchenko OH, Khita OO, **Rudnytska OV**, Yefimova YV, Tsymbal DO, Minchenko DO, Sliusar MY, He Q, Liu K. The impact of single walled carbon nanotubes on the expression of microRNA in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Endocr. Regul.*, 2022 Apr 30; 56(2): 115-125. doi: 10.2478/enr-2022-0013. PMID: 35489050. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії мікроРНК miR-143-3p, miR-145-5p, miR-182-5p і miR-206-5p, обробка даних та участь у написанні статті*). **Scopus i PubMed**
3. **Rudnytska OV**, Kulish YV, Khita OO, Minchenko DO, Tsymbal DO, Viletska YM, Sliusar MY, Trufanova DD, Minchenko OH. Exposure to nanographene oxide induces gene expression dysregulation in normal human astrocytes. *Endocr. Regul.*, 2022 Jul 13; 56(3): 216-226. doi: 10.2478/enr-2022-0023. PMID: 35843713. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів BCAR3, BRCA1,*

NAMPT, TSPAN13 і мікроРНК miR-96-5p, miR-145-5p, обробка даних та участь у написанні статті). **Scopus і PubMed**

4. Minchenko D.O., **Rudnytska O.V.**, Khita O.O., Kulish Y.V., Viletska Y.M., Halkin O.V., Danilovskyi S.V., Ratushna O.O., Minchenko O.H. Expression of *DNAJB9* and some other genes is more sensitive to SWCNTs in normal human astrocytes than glioblastoma cells. *Endocr. Regul.*, 2023, 57 (3): 162-172. doi:10.2478/enr-2023-0020 (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів BRCA1, CLU і DNAJB8, обробка даних та участь у написанні статті*)

Scopus і PubMed

5. **Рудницька О.В.**, Цимбал Д.О., Мінченко Д.О., Некрасова В.Ю., Мінченко О.Г. Генотоксичність карбонових наночастинок. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, Тернопіль, 30.9-4.10, 2019. Медична та клінічна хімія, 2019, 21, 3 (80; додаток): 283-284.

6. **Рудницька О.В.**, Мінченко Д.О., Цимбал Д.О., Мінченко О.Г. Генотоксична дія одностінних карбонових нанотрубок. 5-а Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 1-2.10, 2020: 37-38.

7. Єфімова Ю.В., **Рудницька О.В.**, Цимбал Д.О., Мінченко О.Г. Експресія мікроРНК в ембріонах *Danio rerio* за дії одностінних карбонових нанотрубок. 5-а Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 1-2.10, 2020: 41-42.

8. Sliusar M.Y., **Rudnytska O.V.**, Khita O.O., Minchenko D.O., Yefimova Y.V., Minchenko O.H. Effect of single-walled carbon nanotubes on the expression of proliferation and apoptosis related genes in normal human astrocytes. Физико-химическая биология как основа современной медицины: тезисы докладов участников Международной научной конференции, посвященной 75-летию со дня рождения профессора Е. В. Барковского, г. Минск, 21 мая 2021 г., БГМУ: 259-260.

9. **Rudnytska O.**, Yefimova Y., Minchenko O. Single walled carbon nanotubes affect the expression of microRNA and brain development in *Danio rerio*

embryos. *Modern Science: Innovations and Prospects, Proc. V Int. Sci. Pract. Conf.*, Feb. 6-8, 2022, Stockholm, Sweden: 64-66.

10. Yefimova Y., **Rudnytska O.**, Tsymbal D., Minchenko O. Single walled carbon nanotubes affect the expression of microRNAs and brain development in *Danio rerio* embryos. 4th RECOOP Int. Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sci. Conf., April 7-8, 2022, Prague, Czech Republic: 143.

11. **Rudnytska O.**, Kulish Y., Trufanova D., Minchenko O. Graphene oxide affect the expression of proliferation related genes *Biotechnologia Acta*, 2022, Vol.15, № 2, 68-69 (Наукова конференція молодих науковців ІБХ «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2022»)

12. **Рудницька О.** Порушення експресії генів у нормальних астроцитах людини під впливом наночастинок оксиду графену. 6-та Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро 6-7. 10, 2022. Дніпро, вид. “Ліра” 2022: 34-35

13. Куліш Ю, Хіта О., **Рудницька О.**, Мінченко О. Роль стресу ендоплазматичного ретикулума в механізмі дії наночастинок, 6-та Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро 6-7. 10, 2022. Дніпро, вид. “Ліра” 2022: 31-32

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	18
ВСТУП.....	22
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1. Наночастинки та їх застосування у біомедичних цілях	29
1.2. Вплив наноматеріалів на метаболічні процеси	35
1.3. Генотоксичні ефекти наночастинок	39
1.4. Молекулярні механізми впливу наночастинок на геном	41
1.5. Роль стресу ендоплазматичного ретикулума в генотоксичних ефектах наночастинок	42
1.6. Стрес-залежні гени та їх роль у механізмах дії наночастинок	46
1.7. Особливості дії карбонових наночастинок на геном.....	48
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	51
2.1. Матеріали та умови проведення експериментів	51
2.1.1. Характеристики карбонових наночастинок	51
2.1.2. Характеристика культури іморталізованих нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS та умови їх культивування	52
2.1.3. Характеристика культур клітин гліобластоми U87 та умови їх культивування	53
2.2. Методи дослідження.....	54
2.2.1. Виділення РНК з культури клітин, вимірювання її кількості та спектральних характеристик.....	54
2.2.2. Синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції мРНК та мікроРНК.....	55
2.2.3. Ампліфікація кДНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції.....	56

2.2.4. Визначення рівня мікроРНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції	59
2.2.5. Електрофорез ампліфікованих фрагментів ДНК в агарозному гелі....	60
2.2.6. Біоінформаційний аналіз сайтів зв'язування мікроРНК.....	61
2.2.7. Статистична обробка отриманих результатів	61
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	62
3.1. Вплив карбонових нанотрубок на рівень експресії генів, що контролюють проліферацію та виживання клітин.....	62
3.2. Дія карбонових нанотрубок на рівень експресії мікроРНК.....	72
3.3. Порівняння впливу карбонових нанотрубок на рівень експресії генів у нормальних астроцитах людини та клітинах гліобластоми U87MG.....	78
3.4. Дія карбонових нанотрубок на рівень мікроРНК в ембріонах <i>Danio rerio</i>	83
3.5. Вплив оксиду графену на рівень експресії генів, що контролюють проліферацію та виживання в клітині.....	91
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	98
4.1. Карбонові наночастинки порушують експресію низки поліфункціональних генів у нормальних астроцитах людини.....	98
4.2. Роль мікроРНК у регуляції експресії генів за дії карбонових наночастинок	111
4.3. Можлива роль стресу ендоплазматичного ретикулума у дії карбонових наночастинок на геном	115
ВИСНОВКИ.....	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	121
Додаток 1.....	154

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ATF6	– activation transcription factor 6 (активуючий транскрипційний фактор 6)
BCAR3/ SH2D3B	– BCAR3 adaptor protein, NSP family member/Breast Cancer Anti-Estrogen Resistance Protein 3/ SH2 Domain-Containing Protein 3B (адапторний протеїн BCAR3, член родини NSP/ протеїн 3 раку грудної залози стійкий до антиестрогену/3B протеїн, який містить SH2 домен)
BRCA1	– BRCA1 DNA repair associated / breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1 асоційований з репарацією ДНК/ протеїн чутливий до 1-го типу раку грудної залози)
CA9	– carbonic anhydrase 9/carbonic anhydrase IX (карбоангідраза 9)
CHOP/ DDIT3	– CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein/ DNA damage inducible transcript 3 (протеїн гомологічний CCAAT /енхансер-зв'язуючому протеїну (C/EBP) / транскрипційний фактор 3, який індукує пошкодження ДНК)
CLU/APOJ	– clusterin/apolipoprotein J (кластерин/аполіпопротеїн J)
CNT	– carbon nanotubes (карбонові нанотрубки)
DLS	– dynamic light scattering (метод динамічного розсіювання світла)
DMEM	– Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (модифіковане Дульбекко мінімальне есенціальне середовище Ігла)
DNAJB9	– DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B9 (член B9 родини протеїнів теплового шоку DnaJ)
E2F8	– E2F transcription factor 8 (E2F транскрипційний фактор 8)
EGF	– epidermal grown factor (епідермальний фактор росту)

eIF2 α / EIF2S1	– alpha subunit of the eIF2 translation initiation complex/ eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 (α - субодиниця комплексу ініціації трансляції eIF2/ субодиниця 1 еукаріотичного фактору ініціації трансляції 2)
EMT	– epithelial–mesenchymal transition (епітелійно-мезенхімний перехід)
ERAD	– endoplasmic-reticulum-associated protein degradation (асоційована з ендоплазматичним ретикулолом деградація протеїнів)
FABP5	– fatty acid binding protein 5 (протеїн 5, що зв'язує жирні кислоти)
GADD34/ PPP1R15A	– growth arrest and DNA-damage-inducible protein 34/ protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A (протеїн-34, що індукується за пошкодження ДНК і зупиняє ріст)/ регуляторна субодиниця 15А протеїнової фосфатази 1)
GO	– graphene oxide (оксид графену)
qPCR	– quantitative real-time PCR (polymerase chain reaction) (кількісна ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) у реальному часі)
GRM	– graphene and its related materials (графен та пов'язані з ним матеріали)
HIF1AN	– hypoxia inducible factor 1 subunit alpha inhibitor (інгібітор альфа-субодиниці фактора 1, що індукується гіпоксією)
HLA-DRA	– major histocompatibility complex, class II, DR alpha (головний комплекс гістосумісності, клас II, DR альфа)
HLA-DRB1	– major histocompatibility complex, class II, DR beta 1 (головний комплекс гістосумісності, клас II, DR бета 1)
HLA-G	– major histocompatibility complex, class I, G (головний комплекс гістосумісності, клас I, G)

HSPA5/ GRP78/BiP	– heat shock protein family A (small) member 5 / 78-kDa glucose-regulated protein / binding-immunoglobulin protein (член 5 родини А малих протеїнів теплового шоку / 78 кДа протеїн, що регулюється глюкозою / протеїн, що зв'язує імуноглобулін)
HSPA9/ GRP75	– heat shock protein family A (small) member 9/75-kDa glucose-regulated protein (член 9 родини А малих протеїнів теплового шоку/75 кДа протеїн, що регулюється глюкозою)
IDH2	– isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+) (ізоцитрат дегідрогеназа 2 (NADP+))
IGFBP3	– insulin like growth factor binding protein 3 (протеїн 3, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту)
IGFBP6	– insulin like growth factor binding protein 6 (протеїн 6, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту)
IRE1/ERN1	– inositol-requiring enzyme 1/endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 (ензим, залежний від інозитулу 1/сигнальний шлях від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1)
MYBL1/ A- Myb	– MYB proto-oncogene like 1/ Myb-related protein A (протеїн 1, подібний до протоонкогена MYB/ протеїн А, пов'язаний з Myb)
MYBL2/ B- Myb	– MYB proto-oncogene like 2/ Myb-related protein B (протеїн 2, подібний до протоонкогена MYB / протеїн В, пов'язаний з Myb)
MWCNT	– multi-walled carbon nanotubes (багатостінні карбонові нанотрубки)
NAD	– nicotinamide adenine dinucleotide (нікотинамідаденіндинуклентид)
NADPH	– nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат)

NAMPT	– nicotinamide phosphoribosyltransferase (нікотинамід фосфорибозилтрансфераза)
NHA	– normal human astrocyte (нормальні астроцити людини)
NK cells	– natural killer cells (NK-клітини або природні кілери)
PAM	– peptidylglycine alpha-amidating monoxygenase (пептидилгліцин альфа-амідуєча монооксигеназа)
PERK\ EIF2AK3	– PKR-like endoplasmic reticulum kinase/eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3 (подібна до PRK кіназа ендоплазматичного ретикулума/ альфа-кіназа 3 еукаріотичного фактору ініціації трансляції 2)
rGO	– reduced graphene oxide (відновлений оксид графену)
ROS	– reactive oxygen species (активні форми кисню)
SEM	– the standard error of the mean (стандартна помилка середнього)
siRNA	– small interfering RNA (мала інтерферуюча РНК)
SLC6A8	– Solute Carrier Family 6 Member 8 (член 8 родини 6 розчинних транспортерів)
SWCNTs	– single-walled carbon nanotubes (одностінні карбонові нанотрубки)
TSPAN13	– tetraspanin 13 (тетраспанін 13)
UPR	– unfolded protein response (відповідь на незгорнуті протеїни)
XBP-1	– X-box binding protein 1 (протеїн 1, що зв'язується з X-боксом)
ER	– ендоплазматичний ретикулум
мкг / μg	– мікрограм (1×10^{-6} грама)
мкм / μm	– мікрометр (1×10^{-6} метра)
нм / nm	– нанометр (1×10^{-9} метра)

ВСТУП

Актуальність теми. З'ясування молекулярних механізмів генотоксичності карбонових наночастинок є надзвичайно важливим напрямом біохімічних досліджень. Вивчення експресії генів є одним з перспективних підходів для виявлення чутливих маркерів порушень, що виникають за дії наночастинок на клітини та можуть бути використані для виявлення механізмів розвитку метаболічних ускладнень і захворювань. Особливо цінними ці результати можуть бути для ранньої діагностики онкологічних захворювань, оскільки рак на сьогодні залишається однією з провідних причин високого рівня захворюваності та смертності. Окрім цього, виявлені маркери можуть бути використані і для покращення існуючих чи при розробці нових методів лікування, зокрема скринінгу новосинтезованих агентів.

До найбільш агресивних та тяжких для лікування злоякісних новоутворень відносять гліобластому. Середня виживаність пацієнтів, у яких була виявлена гліобластома, складає менше 20 місяців, за наявних методів лікування. Її висока стійкість пояснюється впливом мікрооточення пухлин. Так, пухлино-асоційовані астроцити, які є основним компонентом ближнього оточення гліобластом, здатні пригнічувати імунні реакції, підвищувати проліферацію та інвазію пухлинних клітин, а також їх стійкість до терапії (Brandao et al., 2019), (Zhang H. et al., 2020).

Основними причинами незадовільного результату від лікування онкологічних захворювань традиційними методами, таких як хіміотерапія, імунотерапія, а також променева та таргетна терапії є велика кількість обмежень щодо їх використання. Серед таких обмежень виділяють відсутність специфічності, множинна резистентність до лікарських препаратів, а також наявність цитотоксичних впливів на здорові клітини.

Деякі вчені впевнені, що наночастинок, як нові перспективні агенти для лікування і діагностики захворювань, здатні подолати всі ці обмеження. У силу своїх специфічних фізико-хімічних властивостей вони володіють більшою

стійкістю, «біосумісністю», підвищеною проникністю та ефектом утримання, а також здатністю до точнішого націлювання, що дозволяє суттєво знизити загальну токсичність (Gavas et al., 2021).

Проте, як і будь-які нові матеріали, наночастинки потребують ретельного дослідження перед їх активним впровадженням у різні сфери. Дуже гостро це питання стоїть у біомедичній сфері, адже недостатнє з'ясування можливих негативних ефектів від використання наноматеріалів, у тому числі карбонових наночастинок, суттєво підвищує ризики для здоров'я та життя людини.

Ті самі властивості, які надають переваги для використання наноматеріалів у біомедицині, можуть нести і потенційні ризики за умов їх використання. Варто відмітити, що ступінь токсичності наночастинок залежить від їхньої природи і розмірів, площі поверхні, форми, співвідношення сторін, поверхневого покриття, кристалічності, здатності утворювати агломерати та розчинності. Водночас, загальна токсичність оцінюється в залежності від здатності наночастинок ініціювати утворення реактивних форм речовин і викликати цитотоксичні, генотоксичні або нейротоксичні ефекти (Egbuna et al., 2021).

Саме для з'ясування прогалин у знаннях про наноматеріали та наступного усунення конкретних несприятливих наслідків їх дії на здоров'я людини була запропонована нова галузь науки – нанотоксикологія (Donaldson et al., 2004). Вона вивчає фізико-хімічні властивості, шляхи впливу, біорозподіл, молекулярні механізми дії, генотоксичність наночастинок та інші аспекти їхнього впливу на клітини та живі істоти в цілому.

Дослідження цитотоксичності наноматеріалів на основі карбону, зокрема карбонових нанотрубок та графену, показали, що вони здатні знижувати життєздатність клітин, а також викликати конденсацію хроматину та ДНК. Крім того, їх дія викликала порушення в експресії генів пов'язаних з клітинним циклом та апоптозом (Periasamy et al., 2016).

Проте, попри наявність схожих властивостей, токсичні ефекти різних карбонових наночастинок на клітинні компоненти можуть відрізнятися. Це зумовлено наявністю відмінностей у структурі карбонових наночастинок, що

впливає на площу поверхні і відповідно реакційну здатність, а також їх дисперсності в органічних розчинниках (Uo, 2011) (Georgakilas, 2015). З цього випливає, що токсичність кожного виду наноматеріалів на основі карбону має досить індивідуальний характер та потребує окремого та детального вивчення.

Однак для оптимізації виявлення викликаних порушень, при впровадженні наночастинок у практику, вкрай необхідно ідентифікувати найбільш ранні та чутливі маркери їх негативного впливу, а особливо на генетичному рівні. За цих умов вплив карбонових наночастинок на функціонування геному є одним з найбільш важливих та перспективних напрямів.

Зокрема, для оцінки впливу на геном, можна використати підхід, який полягає у виявленні маркерів різноманітних порушень шляхом порівняння рівня експресії різних генів у нормальних та патологічних клітинах, у здорових і хворих людей або на експериментальних моделях у лабораторних тварин. Такий підхід дозволяє ідентифікувати гени, зміни в експресії яких можуть бути причиною чи наслідком певних порушень або просто корелювати з ними (Porcu et al., 2021). Таким чином, дослідження експресії генів, що кодують важливі регуляторні фактори, у нормальних клітинах за дії карбонових наночастинок можуть дозволити виявити негативні ефекти наночастинок та сприяти розробці підходів до їх зниження.

Саме тому, виявлення можливих негативних ефектів використання карбонових наночастинок на молекулярно-генетичному рівні саме перед їх впровадженням у різних сферах біології та медицини є досить актуальним напрямом наукових досліджень.

Мета і завдання роботи

Мета роботи: дослідити вплив малих доз карбонових наночастинок на експресію генів, що кодують протеїни пов'язані з процесами проліферації і виживанням клітин, стресом ендоплазматичного ретикулума та канцерогенезом, а також на експресію мікроРНК, у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS та клітинах гліобластоми U87MG.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні завдання:

1. Дослідити вплив оксиду графену на рівень експресії генів, що приймають участь у контролі процесів проліферації та виживання клітин, у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS.
2. Вивчити ефект карбонових нанотрубок на рівень експресії генів, які задіяні в регуляції процесів проліферації, у нормальних астроцитах людини.
3. Дослідити вплив карбонових нанотрубок на рівень експресії генів, які регулюють виживання клітин, у нормальних астроцитах людини.
4. Порівняти дію карбонових нанотрубок на рівень експресії генів у нормальних астроцитах людини та клітинах гліобластоми і з'ясувати можливу роль стресу ендоплазматичного ретикулума в їх дії.
5. З'ясувати вплив різних доз карбонових наночастинок на рівень експресії мікроРНК в ембріонах *Danio rerio*.

Об'єкт дослідження: молекулярні механізми дії карбонових наночастинок на експресію генів *BCAR3*, *BRCA1*, *CA9*, *CLU*, *DNAJB9*, *FABP5*, *HIF1AN*, *HLA-G*, *HSPA9*, *IDH2*, *IGFBP3*, *IGFBP6*, *MYBL1*, *MYBL2*, *NAMPT*, *PAM*, *SLC6A8* і *TSPAN13* та деяких мікроРНК, а також роль стресу ендоплазматичного ретикулума в цих механізмах.

Предмет дослідження: рівень експресії генів, які регулюють проліферацію і виживання клітин та мікроРНК у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS, сублініях клітин гліобластоми U87MG і препаратах РНК ембріонів *Danio rerio* за дії малих доз карбонових наночастинок.

Методи дослідження. У ході виконання роботи були використанні сучасні методи біохімії та молекулярної біології: культивування клітин, виділення РНК, визначення кількості та спектральних показників РНК спектрометричним методом, синтез комплементарних ДНК за допомогою зворотної транскрипції, методи кількісної полімеразної ланцюгової реакції, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, методи біоінформатики та статистичної обробки результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше було встановлено, що в культурі нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS за умов дії на них дуже малих доз одностінних карбонових нанотрубок (single-walled carbon nanoparticles – SWCNTs) спостерігаються виражені зміни рівня експресії різних за своїм функціональним значенням генів. Виявлені зміни в експресії генів були різними для різних генів і залежали від дози наночастинок, що вказує на обумовлене дією нанотрубок перепрограмування геному за активації стресу ендоплазматичного ретикулума. Показано також, що під впливом малих доз SWCNTs змінюється і рівень мікроРНК, а це свідчить про можливість пост-транскрипційної регуляції експресії генів через локалізовані в 3'-нетранслюючих послідовностях мРНК специфічні сайти зв'язування мікроРНК.

При дослідженні дії наночастинок оксиду графену на нормальні астроцити людини лінії NHA/TS було виявлено різнонаправлені зміни в експресії різних генів. Більше того, виявлені зміни в експресії генів за дії наночастинок оксиду графену на культуру нормальних астроцитів людини залежали від їх дози.

Показано також, що експресія мРНК важливих регуляторних факторів у нормальних астроцитах є більш чутливою до дії на них SWCNTs у порівнянні з клітинами гліобластоми U87MG. Так, рівень експресії мРНК цих важливих регуляторних факторів, як у нормальних астроцитах людини NHA/TS, так і у клітинах гліобластоми U87MG за дії дуже низьких концентрацій карбонових наночастинок, проте ефекти від їх впливу на нормальні астроцити були більш вираженими. Крім того, повне пригнічення ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума у клітинах гліобластоми здатне майже повністю усунути вплив SWCNTs на експресію більшості з досліджених нами генів.

Встановлено, що тривала експозиція ембріонів *Danio rerio* за присутності одностінних карбонових нанотрубок порушує експресію мікроРНК miR-143, miR-145, miR-182 і miR-206, які контролюють проліферацію та нейрогенез, що може сприяти розвитку мальформацій у мозку ембріонів.

Практичне значення отриманих результатів полягає у виявленні дії карбонових наночастинок, зокрема SWCNTs та оксиду графену на геном нормальних астроцитів людини, на рівень експресії мРНК та мікроРНК, які приймають участь у регуляції процесів проліферації та виживання клітин шляхом індукції стресу ендоплазматичного ретикулума і перепрограмування геному. Виявлені зміни в експресії ключових регуляторних генів можуть бути підґрунтям для розвитку різноманітних патологій, у тому числі й порушень розвитку головного мозку та вказують на можливі негативні наслідки застосування карбонових наночастинок для медико-біологічних цілей.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота – завершене дослідження, яке було здійснене автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2018–2022 рр. Дисертантом було самостійно здійснено аналіз даних літератури за темою роботи, виконано експериментальні дослідження по вивченню дії низьких доз одностінних карбонових нанотрубок та оксиду графену на експресію генів, що приймають участь у регуляції процесів проліферації та виживання клітин, а також експресію мікроРНК у нормальних астроцитах людини та ембріонах *Danio rerio*. Автором було проведено дослідження по виявленню можливої ролі стресу ендоплазматичного ретикулума у дії наночастинок на експресію деяких генів, а також здійснено статистичну обробку отриманих результатів та їх узагальнення. Окремі дослідження по визначенню рівня експресії певних генів проводилися за участі інж. 1-ї кат. Мирослави Слюсар та інж. 1-ї кат. Юлії Куліш, доктора філософії, н.с. Олени Хіти. Планування роботи, розробка методології, аналіз та обговорення результатів проведено за участі наукового керівника, д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України Олександра Мінченка.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано протягом 2018–2022 рр. у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: «Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у функціональній перебудові геному і пошук генів-мішеней для

пригнічення росту гліом», № ДР 0116U001027 (2016–2020 рр.), «Молекулярні механізми взаємодії сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума та гіпоксії в репрограмуванні геному клітин гліоми», № ДР 0121U100662 (2021–2025 рр.) та «Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів», № ДР 0117U002624 (2017–2021 рр.).

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на міжнародних та вітчизняних конференціях та конгресі: 12-ий Український біохімічний конгрес, Тернопіль, 2019; 5-та та 6-та Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 2020, 2022; V International scientific and practical conference “Modern Science: Innovations and Prospects”, 2022, Stockholm, Sweden, 2022; 4th RECOOP International Student Conference and 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conference, 2022, Prague, Czech Republic; Науковій конференції молодих науковців ІБХ “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2022”, Київ, 2022.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 робіт, з них 4 статті в іноземних фахових наукових виданнях, які представлені в базах Scopus і PubMed, та 9 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій та конгресу.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 157 сторінках друкованого тексту, складається зі анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів досліджень, їх обговорення, висновків та списку використаних літературних джерел, що включає 248 посилань. Робота містить 29 рисунків та 6 таблиць.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У зв'язку з бурхливим розвитком науки і технологій стало можливим не тільки створення якісно нових наноматеріалів, а й дослідження їх впливу на живих істот на рівні геному.

Сьогодні наноматеріали знайшли активне застосування в різних галузях виробництва, зокрема електроніці, а також у енергетиці, медицині, охороні здоров'я, захисту довкілля (Pitkethly, 2004). У майбутньому їх застосування ймовірно буде розширюватися. Особлива увага приділяється застосуванню наноматеріалів у біомедичній сфері для діагностики, лікування, контролю та відновлення біологічних систем на молекулярному рівні (Minchenko et al., 2017).

Проте, екстенсивний розвиток нанотехнологій має свої недоліки і головний з них полягає в тому, що він відбувається на тлі неповного знання про ефекти наночастинок на живі організми та навколишнє середовище загалом. Результати одних із перших досліджень показали, що деякі речовини в наноформі володіють якісно новими властивостями та біологічними ефектами, не притаманними для них у мікро- та макроскопічних масштабах, зокрема мають підвищену біодоступність, здатні викликати оксидативний стрес і запалення, проникати як у клітину, так і в ядра клітин (Oberdörster et al., 2005) (Hubbs et al., 2011).

1.1. Наночастинки та їх застосування у біомедичних цілях

Швидкий розвиток наукових напрямів дослідження нанорозмірних часток і їх стрімке застосування у виробництві новітніх матеріалів (нанотехнології) стали основою для розширення сфер застосування цих техногенних наноматеріалів у різноманітних біомедичних областях.

Сьогодні нанотехнології дозволяють створити пристрої у масштабах клітини чи біомолекули, що відкриває можливості до унікального підходу у

зображенні, зондуванні, доставці ліків та характеристиці біологічних процесів. Використання методів на основі наночастинок у біологічних дослідженнях дає можливість нового, більш повного, розуміння функцій клітин та молекулярних процесів, зокрема роботу сигнальних мереж та їх складних шляхів передачі сигналів. Методи моніторингу певних життєвих процесів та виявлення їх порушень з використанням наночастинок мають велику перспективу застосування у дослідженнях основних біохімічних шляхів у нормі і за патологічних станів, пов'язаних із різного роду травмами та іншими захворюваннями. Нанорозмірні сенсори дозволяють ідентифікувати біомолекули, біологічна роль яких на сьогодні не може бути з'ясована поточними методами, а ціленаправлені системи наночастинок зможуть зв'язуватися або реагувати на присутність молекул з високою спорідненістю та селективністю, посилюючи їх сигнал для виявлення та молекулярного зображення.

На даний час вже існують різні комерційні наночастинок, які доступні для використання в якості контрастних речовин у методах візуалізації, таких як флуоресцентна та магнітно-резонансна томографія, а також для виявлення низьких концентрацій аналітів (Wang E. et al., 2014). Також, окрім класичного використання наночастинок, у вигляді нанопокриттів (наночастинок срібла, платини, титану і т.п.) різноманітних медичних засобів (хірургічні інструменти, імплантати) для підвищення стійкості або надання магнітних чи антибактеріальних властивостей, їх також використовують як самостійні наноагенти для діагностики та лікування захворювань. Досить часто поєднання терапевтичних та діагностичних цілей при створенні засобу для цільової доставки ліків відкривають унікальні можливості, оскільки отримані наноагенти сприяють не тільки діагностиці та лікуванню захворювань, а й дозволяють використовувати механізми зворотного зв'язку для визначення локалізації, точної доставки і вивільнення ліків, а також для аналізу терапевтичної ефективності лікування (Shrivastava et al., 2019). Крім того, створення таких керованих систем доставки ліків на основі наночастинок дозволяє уникнути певних негативних ефектів, які виникають внаслідок традиційних форм

застосування лікарських препаратів. Так транспортування препарату безпосередньо до місця дії дозволяє мінімізувати побічні ефекти та суттєво зменшити його вплив на життєво важливі тканини. Це досягається шляхом значного зменшення необхідної дози препарату, оскільки такий вид доставки дозволяє накопичувати лікарську речовину у цільовому місці (Wilczewska et al., 2012).

Досить часто для покращення цільової доставки наночастинок застосовують модифікацію та функціоналізацію, оскільки роль хімії поверхні є дуже важливою. Встановлено, що внутрішній хімічний склад та кристалічна структура наночастинок зумовлюють різні властивості поверхні, такі як заряд, гідрофобність чи гідрофільність, можливе розчинення, каталітичну активність та інші (Nel et al., 2009). Це сприяє взаємодії наночастинок з навколишнім середовищем, а особливо абсорбції протеїнів (формуванню корони). Проте, таке оздоблення поверхні будь-якої наночастинок може також змінити властивості її поверхні та викликати зовсім іншу біологічну поведінку, що суттєво вплине на біорозподіл наночастинок в організмі (Aggarwal et al., 2009).

Одними з найбільш перспективних у біомедицині полі є карбонові наночастинок, оскільки для них характерне унікальне поєднанням механічних, оптичних та електричних властивостей, що сприяло дослідженню можливостей їх використання у багатьох сферах біології та медицини.

Карбонові наноматеріали мають дуже високу хімічну стійкість (нерозчинні навіть у агресивному середовищі), чудові механічні властивості та малу вагу. Вони також показують широкий спектр морфології від нульвимірних наноалмазів – до одновимірних карбонових нанотрубок та двовимірних нанопластин графенових наноматеріалів. Серед них найбільше використовують наноалмази (nanodiamonds - ND), карбонові нанотрубки (carbon nanotubes - CNT) та графен і пов'язані з ним матеріали (graphene and its related materials - GRM), такі як: малошаровий графен (few layer graphene - FLG), оксид графену (graphene oxide - GO), відновлений оксид графену (reduced graphene oxide - rGO) (Wick P. et al. 2014).

Карбонові нанотрубки, як досить нещодавно ідентифікована алотропна форма вуглецю, наразі набули широке коло застосування, зокрема, їх використовують для армування матеріалів та як електродні матеріали, компоненти для наноелектроніки (у виготовленні біосенсорів) або навіть як носії для ліків, які в деяких випадках можуть бути віддалено активовані (Simon et al., 2019). Вони представляють собою трубку утворену із згорнутого шару графену, іноді закриту на кінцях фулереновими ковпачками. Дані утворення можуть мати як одну, так і декілька стінок, при чому кількість концентричних стінок, якщо їх більше однієї, є важливим параметром, який безпосередньо визначає багато властивостей. Діаметр одностінних карбонових нанотрубок (SWCNTs) варіюється в межах від 1 до 2 нм, в той час як зовнішній діаметр багатостінних карбонових нанотрубок (MWCNT) може сягати до 100 нм.

Разом зі збільшенням кількості шарів також збільшується і кількість дефектів у їхній структурі, що полегшує їх модифікацію та функціоналізацію, проте у багатьох випадках призводить до погіршення фізичних властивостей цих наноструктур.

Найчастіше карбонові нанотрубки ковалентно функціоналізують шляхом окислення чистою HNO_3 або її сумішшю з H_2SO_4 , що викликає приєднання оксигеновмісних функціональних груп (гідроксильна, карбоксильна) до поверхні зовнішньої стінки або, так само добре, до відкритої карбонової нанотрубки (Bortolamiol et al., 2014). У інших випадках функціоналізація є нековалентною, шляхом адсорбції різних видів молекул, у тому числі полімерів, ДНК, вуглеводів (карбонгідратів) та їх похідних (Zhou et al., 2019), (Oliveira et al., 2015), (Sajid et al., 2016).

Наразі вченими досліджується можливість використання карбонових нанотрубок у досить різноманітних біомедичних сферах:

- виготовленні біосенсорів, у якості головного елемента електрохімічних датчиків для виявлення та моніторингу різних хвороб, особливо таких як цукровий діабет та бактеріальні інфекції, без використання міченого атома (Punbusayakul et al., 2013) (Ojeda et al., 2015) (Zhang X. et al., 2018).

- біовізуалізація, як контрастні речовини, оскільки функціоналізовані та кон'юговані з різними біомаркерами наночастинки можуть із високою роздільною здатністю вказувати на наявність та локалізацію цільових клітин (Gong et al., 2013). Крім того, у сфері візуалізації також використовуються різні аспекти карбонових нанотрубок, зокрема, флуоресценція збуджених наночастинок, фотоакустичний ефект, радіозонди у магнітно-резонансній томографії (Simon et al., 2019).
- у базових матеріалах у тканинній інженерії, завдяки здатності формувати 3D-архітектуру (Correa-Duarte et al., 2004). Зокрема нанотрубки є дуже перспективним у вирощуванні нервових тканин, оскільки слугують хорошою поверхнею для росту клітин та стимулюють передачу нейронних сигналів (Lovat et al., 2005). Також MWCNT успішно підтримують ріст і проліферацію ракових клітин та можуть слугувати платформами для вивчення онкологічних захворювань (Matta-Domjan et al., 2018).
- для цільової терапії як наноносії для доставки ліків, генів та протеїнів. До переваг даних агентів доставки належать маленькі розміри та біосумісність. Завдяки ефекту підвищеної проникності та утримання, нанотрубки мають виняткове значення в онкотерапії. Здатність же проникати в клітини незалежно від функціональних груп, що знаходяться на їх поверхні представляє великий інтерес для розвитку терапії заглушення генів (gene silencing therapy) та унікальної можливості трансфекції клітин (Simon et al., 2019). Крім того, використання карбонових нанотрубок відкриває можливість поєднати такий вид лікування з візуалізацією – так званий тераностичний підхід (одночасні терапія та діагностика) (Wu et al., 2009).
- для прямого лікування раку, завдяки використанню фототермічних властивостей карбонових нанотрубок. Досліджено, що застосування внутрішньопухлинних ін'єкцій суспензій CNT з подальшим короткочасним збудженням лазером спричиняло абляцію пухлини та

сприяло збільшенню виживаності, а внутрішньовенна ін'єкція нанотрубок з протираковим препаратом, викликала імунну реакцію та збільшувала цитотоксичну активність додатково до фототермічної терапії (ФТТ), що призводило до руйнування решти метастазів (Burke et al., 2009) (Wang E. et al., 2014).

- при виготовленні гідрогелів на полімерній основі, які через їх біосумісність, низьку запальну реакцію, пористість і гідрофільність широко використовуються для біосенсорних цілей або контрольованої доставки ліків, інколи навіть з можливістю дистанційного керування та доставки через шкіру (Vashist et al., 2018) (Lin et al., 2006) (Simon et al., 2019). Механічні властивості гідрогелів роблять їх придатними також для застосування у тканинній інженерії (Drury et al., 2003).

Як ми бачимо, існує безліч напрямків, де наноматеріали (різноманітні за хімічним складом, формою, розміром та модифікацією поверхні) можуть знайти своє застосування, проте існує не менше важливих питань біобезпеки, які потрібно дослідити до їх активного впровадження у різних сферах, зокрема біомедичній.

Наномедицина це досить молода дисципліна мета якої полягає у дослідженні можливості застосувань нанотехнологій у медицині та спрямована на розробки, тестування і оптимізації цих застосувань, щоб зрештою вони могли регулярно використовуватися у медичній практиці (Freitas Robert A, 1999). Проте у порівнянні з багатьма зусиллями, спрямованими на використання бажаних властивостей наночастинок для поліпшення здоров'я людини, є досить мала кількість спроб оцінити потенційні небажані ефекти, спричинені прямим використанням наночастинок у медичних цілях та їхнім опосередкованим впливом під час виробництва або обробки для промислового застосування. Ті самі властивості, які роблять наночастинок настільки привабливими для впровадження в наномедицині та для конкретних промислових процесів, також можуть виявитися шкідливими, коли вони взаємодіють з клітинами. Таким чином, оцінка безпеки наночастинок має бути першочерговою, враховуючи їх

очікуване поширення в усьому світі для промислового застосування та ймовірність впливу на людину, безпосередньо або через викиди в навколишнє середовище (повітря, воду, ґрунт) (Oberdörster et al., 2005).

1.2. Вплив наноматеріалів на метаболічні процеси

Поряд з розширенням сфер перспективного використання наноматеріалів, з'явилася гостра необхідність всебічного дослідження впливу цих матеріалів на біологічні системи. Зокрема, в'яснити яким чином наноматеріали впливають на клітини, на метаболічні процеси в них і чи мають токсичний вплив, як на рівні метаболічних процесів, так і на рівні геному, в залежності від їх розміру, форми, наявності різноманітних функціональних груп та поверхневого заряду. Для кращого розуміння можливого масштабу впливу штучних наночастинок на біологічні системи слід нагадати, що вони не є біологічними структурами, а штучно створеними і чужорідними для клітин, а тому можуть лише порушувати різноманітні процеси функціонування клітин та їх життєдіяльності. А отже, результати таких досліджень надалі дозволять всебічно оцінити нано-біо-взаємодії та окреслять напрямки подальшого вдосконалення наночастинок для зменшення негативних ефектів наноматеріалів у складних біологічних системах (Albanase et al, 2012).

Слід відмітити, що ранні дослідження наноматеріалів були здебільшого орієнтовані на дослідження корисних фізико-хімічних властивостей. Так, наприклад, під час розробки наноструктур для застосування у діагностичних цілях, зокрема при онкологічних захворюваннях, дослідники більше враховували оптичні та магнітні властивості в поліпшенні чутливості зондів, хоча пізніше виявилось, що домінуючу роль у визначенні інтенсивності сигналу відіграла ефективність їх цільової доставки. Таким чином, пріоритетним напрямком стала модифікація наноматеріалів для максимізації їх накопичення саме в пухлинах (Albanase, 2012). Проте у цьому підході також є суттєвий недолік, адже окрім підвищення ефективності доставки та оптимізації сили

сигналу у пухлинних клітинах, потрібно враховувати їх загальний вплив на нормальні клітини, щоб позитивний ефект від їхнього використання не нівелювався множинними негативними ефектами, які впливали б на нормальне проходження різноманітних метаболічних процесів та не стали причиною розвитку ускладнень.

Саме тому, особливу увагу слід приділити дослідженням фармакокінетичного профілю наноматеріалів, а саме їх адсорбції, розподілу, метаболізму та виведення *in vivo*. Адже кількість факторів, які впливають на поведінку наночастинок у живому організмі суттєво зростає. Так шляхи надходження наночастинок до організму можуть впливати на напрямки їх розподілу, а також на склад біокорони, що формується навколо наночастинок в процесі їхнього руху організмом, яка може зменшувати цитотоксичні ефекти, проте також послаблює здатність зв'язуватися з рецепторами клітин специфічним лігандам наночастинок та сприяє їх розпізнаванню як патогенів імунними клітинами (Bhattacharya et al., 2016). Окрім того, важливими та інформативними можуть бути результати дослідження впливу наночастинок *in vitro* на культурах клітин, оскільки вони дозволяють більш точно з'ясувати особливості та масштаби їх взаємодії на клітинному, молекулярному і генетичному рівнях.

Численні дослідження *in vitro* показали, що взаємодія наночастинок з протеїнами сироватки крові та рецепторами клітинних мембран залежить від їх конструкції, а це в свою чергу визначає їхню здатність до поглинання, вплив на експресію генів та токсичність. Слід відзначити, що окрім розміру, форми та заряду наночастинок, на їх взаємодію з клітинною мембраною впливають такі фактори, як щільність лігандів на поверхні частинок, рівень експресії рецептора, механізми інтерналізації та властивості клітини (фенотип, локалізація). Враховуючи це, виділяють декілька шляхів взаємодії:

- наночастинок діють на клітину ззовні, зв'язуючись своїми лігандами з рецепторами на мембрані, вони можуть індукувати певний сигнальний каскад;

- покриті лігандами наночастинки можуть інтерналізуватися, а потім виводитись шляхом екзоцитозу та зв'язуватися з мембранними рецепторами, ніколи не покидаючи везикули;
- після зв'язування з мембранними рецепторами наночастинки інтерналізуються у клітину, а потім виходять з везикули та націлюються на субклітинні структури, починаючи взаємодію з різними органелами;
- неспецифічно зв'язуються з поверхнею плазматичної мембрани клітини та згодом інтерналізуються (Albanase et al., 2012).

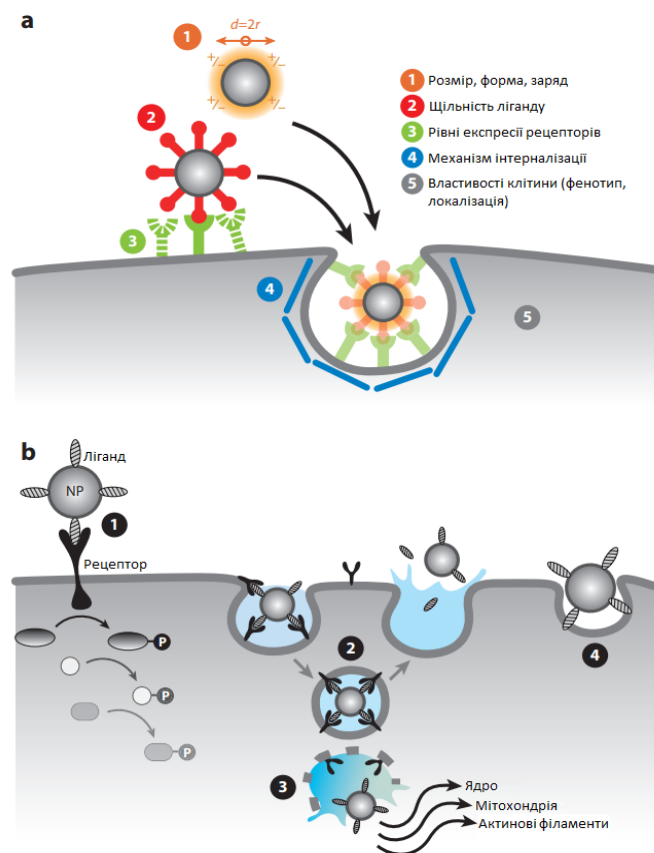


Рис. 1.1. Взаємодія наночастинок і клітин. (а) Фактори, які можуть впливати на взаємодію наночастинок і клітин у нано-біо інтерфейсі. (б) Покриті лігандом наночастинки, що взаємодіють з клітинами (Albanase et al., 2012).

Попри велику кількість проведених досліджень щодо оцінки впливу наночастинок на різноманітні метаболічні процеси, досить незначна їх кількість була присвячена вивченню токсичності наночастинок *in vitro* (Federici et al. 2007), (Lai et al. 2008), (Li et al. 2015), (Zoroddu et al. 2014).

Токсичність наночастинок суттєво залежить від їх розміру, форми, площі поверхні, співвідношення сторін, поверхневого покриття, особливостей кристалічної будови, а також їх розчинності та здатності утворювати агломерати. Загальний механізм токсичності наноматеріалів зумовлюється спільним впливом всіх властивостей наночастинок та зумовлюється їхньою здатністю викликати порушення у клітинах, генах та нейронах, зокрема через індукцію активних форм кисню та азоту (Egbuna et al., 2021).

За токсичного впливу наночастинок спостерігається посилення експресії прозапальних цитокінів та активація клітин задіяних у запальних процесах, таких як макрофаги, які також збільшують генерацію активних форм кисню (Yu et al., 2020).

Завдяки високим фотокаталітичним та надгідрофільним властивостям наночастинок діоксиду титану знаходять досить широкий спектр застосувань від косметичних і гігієнічних засобів до продуктів харчування та лікарських препаратів (Chen and Mao 2007), (Kaegi et al. 2008), (Lee et al. 2010), (Sadrieh et al. 2010). Вже зараз активно розроблюються можливості впровадження наночастинок TiO_2 у таких сферах як систем доставки лікарських засобів, терапія онкологічних захворювань, візуалізація клітин, гена інженерія та біосенсорика (Yin et al. 2013).

Довгий час діоксид титану вважали біологічно інертним, але тепер є дані про його певний токсичний потенціал, механізми якого на даний час здебільшого є незрозумілими (Kahru and Dubourguier, 2010), (Jovanovic, 2015), (Yu et al. 2015b). Ці обставини, у разі використання наночастинок у терапії, дають велику кількість викликів, а саме: виявлення, відстеження та кількісне визначення наночастинок у біологічних зразках і живих об'єктах, а також кореляція цих параметрів з ефектами токсичності (Simon et al., 2017).

Як і багато інших наночастинок, наночастинок діоксиду титану добре інтерналізуються в середину клітин (Osano et al., 2003), (Geiser et al., 2005), (Simon et al., 2011). Проникаючи у клітини наночастинок діоксиду титану здатні генерувати вільні радикали та активні форми кисню (ROS), індукуючи

оксидативний стрес, у фібробластах легень людини (IMR-90), а також формування ДНК-аддуктів у клітинах мікроглії (Long et al., 2006), (Bhattacharya et al., 2009). У клітинах A549 наночастинки діоксиду титану підвищують рівень ROS, що призводить до ураження мітохондрій (Tang et al., 2013). Було показано, що наносмужки (nanobelts) індукують вищу токсичність, у порівнянні зі коротшими наночастинками сферичної форми, як у клітинах альвеолярних макрофагів, так і в організмі мишей, за таких умов їх токсичний вплив подібний до азбесту чи кремнію. (Hamilton et al. 2009). Специфіка впливу наночастинок діоксиду титану зумовлена також відмінностями структури, які полягають у зміні їх довжини у порівнянні з іншими добре кристалізованими (Gao et al. 2009).

Ступінь інтерналізації наночастинок діоксиду титану та їх токсичний вплив залежить від вмісту титану і форми частинок, що впливає на внутрішньоклітинний гомеостаз кальцію, який у свою чергу призводить до стресу ендоплазматичного ретикулума (Jacobson and Duchon 2002), (Djurišić et al., 2015), (Simon et al., 2017).

Поєднуючи унікальні корисні оптичні та механічні властивості карбонові наноматеріали водночас викликають стурбованість їх поверхнею та реакційною здатністю, а фізична схожість карбонових нанотрубок з азбестом призвела до підвищеного інтересу оцінки їх токсичності (Uo M, 2011). Потрібно також розуміти, що окрім з'ясування масштабу можливого впливу наночастинок на ключові ланки різноманітних метаболічних процесів, важливим та особливо критичним є розгляд їх впливу на стабільність генетичного апарату клітини. Зміни, які вони можуть викликати на генетичному рівні, можуть стати критичними для продовження нормальної життєдіяльності та виживання клітин.

1.3. Генотоксичні ефекти наночастинок

Поглинання наночастинок клітиною створює умови для їх взаємодії з ДНК та до структурної і функціональної модифікації геному, порушення процесів реплікації та транскрипції ДНК (Shukla et al., 2021). Генотоксичність

наночастинок обумовлена їх здатністю пошкоджувати генетичний матеріал (Schins et al., 2006). Серед агентів, які здатні пошкоджувати ДНК, виділяють активні форми кисню та азоту (ROS та RSN), ароматичні сполуки (бензопірен), а також деякі типи частинок і волокон, як кварц та азбест (Schins et al., 2007). До найбільш поширених пошкоджень ДНК включають одно- та дволанцюгові розриви, окисне пошкодження ДНК та утворення об'ємних аддуктів.

Прямі первинні ефекти наночастинок проявляються за умов їх надходження до клітини та в ядро, де вони прямо взаємодіють з ДНК та пов'язаними з нею протеїнами (Shukla et al., 2021), (Gonzalez et al., 2008). Проте генотоксичність може виникати не тільки в результаті прямої фізичної взаємодії наночастинок з ДНК. Може відбуватися і непрямий вплив шляхом взаємодії наночастинок з іншими клітинними компонентами, наприклад мітохондріями та клітинною мембраною, що приводить до вироблення вільних радикалів цими структурами. У цьому випадку пошкоджувати ДНК можуть АФК, які накопичуються внаслідок нормальних фізіологічних процесів у клітині, наприклад клітинного дихання (van Berto et al., 2012).

У пухлинних клітинах є система антиоксидантного захиту, яка необхідна для запобігання надмірному окислювальному стресу та підтримання окислювально-відновного гомеостазу (Ju et al., 2020). Тому пухлинними клітинами зазвичай підтримується високий рівень NADPH як для окислювально-відновного захисту, так і для біосинтетичних процесів та підтримання посиленого росту (Xiao et al., 2018).

Наночастинок також здатні впливати на механізми регуляції експресії генів, що не залежать від змін у основній послідовності ДНК (Shukla et al., 2021). Ці механізми лежать у основі епігенетичного програмування, що забезпечує більш точне налаштування для зміни експресії генів у відповідь на впливи навколишнього середовища та є фундаментальним для нормального розвитку ссавців. Порушення у роботі епігеному, можуть викликати розвиток різноманітних захворювань, особливо онкологічних (Marczylo et al., 2016).

Наночастинки можуть також порушувати процеси репарації ДНК. Так, за дії на клітини наночастинок оксиду цинку було виявлено зміни кінетики репарації ДНК, а при експозиції клітин з наночастинками срібла спостерігалось пряме порушення процесів відновлення ДНК (Demir et al., 2014) (Kruszewski et al., 2013).

1.4. Молекулярні механізми впливу наночастинок на геном

Зміни структури та функції ДНК є важливим індикатором потенційної небезпеки спричиненої наночастинками. Загалом геномні порушення можуть викликати досить широкий спектр небажаних змін, зокрема ініціювати процеси мутагенезу, що в свою чергу можуть завдати серйозного впливу на ключові процеси пов'язані з виживанням клітин (Asare et al., 2016). Більше того, генотоксичність розглядають як важливий аспект канцерогенезу. Найбільш поширеним механізмом генотоксичності виділяють окислювальне пошкодження генетичного матеріалу активними формами кисню та азоту (Wan et al., 2012).

Водночас виникає необхідність більш повного розуміння молекулярних механізмів, що лежать за біологічними ефектами спричиненими генотоксичною дією наноматеріалів (Shukla et al., 2021). Пошкодження ДНК може супроводжуватися утворенням 8-гідрокси-2'-дезоксигуанозину, однієї з переважаючих форм окисних уражень, індукованих вільними радикалами, яка широко використовується як біомаркер для вимірювання ендogenous окисного пошкодження ДНК та як фактор ініціації та сприяння канцерогенезу (Valavanidis et al., 2009). Але про канцерогенні наслідки, у цих випадках, можна говорити тільки тоді, коли мутації, які виникають внаслідок окисного пошкодження ДНК мають вплив чи призводять до активації онкогенів або інактивації гена супресора пухлин (Shukla et al., 2021).

За дії наночастинок спостерігаються також одноланцюгові та дволанцюгові розриви ДНК, а також утворення екзоциклічних аддуктів ДНК, які можуть ініціювати процеси виживання клітин або їх загибелі шляхом змін в

експресії генів (Fenech et al., 2020), (Shukla et al., 2021), (Ayala et al., 2014). Генотоксичність може проявлятися і на рівні протеїнів мітотичного апарату внаслідок їх нітротирозування чи окислення, що супроводжується порушенням різних етапів мітозу (Shukla et al., 2021), (Parry et al., 2002).

Наразі існує багато даних щодо здатності різних наночастинок викликати геномні пошкодження як *in vivo*, так і *in vitro* (Boran et al., 2016), (Liu Q. et al., 2016), (Karlsson et al., 2008), (Ng et al., 2010), (George et al., 2017), (Balasubramanian et al., 2010), (Yang et al., 2017), (Lebedová et al., 2018), (Kohl et al., 2020).

Численними дослідженнями було показано вплив різноманітних наночастинок на експресію важливих регуляторних факторів, у тому числі і транскрипційних факторів, онкогенів та пухлинних супресорів, більшість із яких є залежними від стресу ЕР, що відображає їх генотоксичність (Magdolenova et al., 2014), (Minchenko et al., 2010), (Minchenko et al., 2012), (Minchenko et al., 2013a), (Minchenko et al., 2013b), (Minchenko et al., 2016a), (Yavorovsky et al., 2017), (Minchenko et al., 2017a), (Minchenko et al., 2017b), (Minchenko et al., 2018). Так, під впливом наночастинок дисиліциду хрому знижувався рівень експресії генів *IGFBP2* (протеїн 2, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту), *IGFBP5* (протеїн 5, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту), *PECAM1* (молекула 1 адгезії тромбоцитів і ендотеліальних клітин) та *SNARK* (SNF1/АМПК-залежна кіказа), а генів – *FABP4* (протеїн 4, що зв'язує жирні кислоти), *IGFBP3* (протеїн 3, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту) і *CD36* (кластер детермінант 36) підвищувався. Дія ж нітриду титану призводила пригнічення експресії *IGFBP2* та *SNARK*, у той час як експресія *IGFBP3*, *IGFBP4* та *CD36* – посилювалася.

1.5. Роль стресу ендоплазматичного ретикулума в генотоксичних ефектах наночастинок

Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) є динамічною та поліфункціональною органелою, яка відіграє ключову роль у підтриманні гомеостазу клітин. Він є

основним місцем синтезу протеїнів, їх пост-трансляційної модифікації і формування вторинної структури, а також транспорту протеїнів, синтезу ліпідів та стероїдів, регулюванні балансу внутрішньоклітинного гомеостазу кальцію. Така багатофункціональна природа органели вимагає чіткої узгодженості процесів, а отже безліч протеїнів, унікальних фізичних структур, координації і реагування на зміни внутрішньоклітинного середовища (Simon et al, 2017).

Крім того, ендоплазматичний ретикулум відіграє важливу роль у захисті клітини від дії різноманітних чинників. Так за їх дії індукується стрес ER, який активує сигнальні каскади відповіді на незгорнуті протеїни або UPR (Unfolded protein response), внаслідок чого відбуваються зміни у внутрішньоклітинному та позаклітинному середовищі, направлені на підтримання гомеостазу (Sicari et al., 2019). Окрім того, стрес ER може розвиватися при зміні гомеостазу кальцію або окисно-відновного потенціалу, порушенні синтезу протеїнів, їх пост-трансляційної модифікації і формування вторинної структури (Chakrabarti et al., 2011), (Park et al., 2010), (Schröder, 2008). Стрес ER є характерним для деяких спеціалізованих клітин (β -клітини, гепатоцити та остеобласти) за умов синтезу секреторних протеїнів. Таким чином, він є необхідним для забезпечення протікання широкого спектру фізіологічних процесів метаболізму за нормальних умов (Мінченко та ін., 2013).

Молекулярні механізми впливу наночастинок на клітину тісно пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулума, оскільки він відіграє ключову роль у клітинній відповіді на гіпоксію, ішемію, надходження різних хімічних речовин, штучних та токсичних агентів (Hetz et al., 2009), (Moenner et al., 2007).

Надходження до клітин наночастинок змінює протікання різноманітних процесів, у тому числі і в ендоплазматичному ретикулумі, а це призводить до накопичення неправильно згорнутих протеїнів у цій органелі. Це, у свою чергу, ініціює специфічну відповідь на незгорнуті протеїни (unfolded protein response – UPR). Відмінною рисою цієї відповіді є посилення транскрипції шаперонів ER та фолдингових ензимів, збільшення яких направлено на повернення до нормальних фізіологічних умов. Проте, окрім звичного запобігання агрегації

незгорнутих і неповністю згорнутих протеїнів, сприяння правильному згортанню та складанню протеїнів, в умовах стресу ER функції шаперонів розширюються. Зокрема, деякі шаперони також беруть участь у сигналінгу стрес-відповіді ER, націлюючи на деградацію неправильно згорнутих протеїнів шляхом пов'язаним з ендоплазматичним ретикуломом ERAD (ER-асоційована деградація) (Ma et al., 2004).

Загальне регулювання процесом протидії накопиченню в ER незгорнутих протеїнів у клітинах еукаріот здійснюється комплексом сенсорно-сигнальних шляхів від ендоплазматичного ретикулума до ядра. Виділяють три основні сенсорно-сигнальні системи стресу ER: трансмембранний протеїн ERN1 (від ендоплазматичного ретикулума до ядра; endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1), який часто називають IRE1 (залежний від інозитулу ензим-1; inositol requiring enzyme-1), PERK (подібна до PRK кіназа ендоплазматичного ретикулума; PRK-like ER kinase) та ATF6 (активуючий транскрипційний фактор 6; activating transcription factor 6) (Hetz et al. 2009), (Luo et al. 2008), (Saito et al. 2011), (Korennykh et al. 2009). Ці системи задіяні у розпізнаванні незгорнутих та неправильно згорнутих протеїнів, що накопичуються в ER, і в активації підпорядкованих їм механізмів для виходу із стресового стану та нормалізації гомеостазу. За умов стресу ER призупиняється надходження новосинтезованих протеїнів до ER, знижується загальна ініціація трансляції на фоні вибіркової трансляції мРНК, необхідних для синтезу залежних від стресу протеїнів, нормалізується пост-трансляційна модифікація протеїнів або запускається система мітохондріального (стрес-індукованого) шляху апоптозу (Badiola et al. 2011), (Woehlbier et al. 2011), (Chakrabarti et al. 2011).

Отже, реорганізація метаболічних процесів у клітині для відновлення гомеостазу, підтримання її життєдіяльності, забезпечення виживання або загибелі шляхом апоптозу, у разі незворотних змін, є одними з основних завдань стресу ER (Aragón et al., 2009), (Liu C. et al., 2003). Крім того, відповідь на незгорнуті протеїни є вкрай важливою і для збереження функціональної цілісності ендоплазматичного ретикулума та попереджає розвиток

оксидативного стресу (Kaufman et al., 2010). Кожен із сенсорно-сигнальних шляхів стресу ER відіграє унікальну та спеціалізовану роль у різних процесах метаболізму та розвитку, що охоплює від процесів диференціації клітин до індукції апоптозу, проте вони також тісно взаємодіють між собою на різних рівнях (Wu et al., 2006).

Активація стресу ендоплазматичного ретикулума, як загальної відповіді на токсичність, спостерігається під дією наночастинок срібла, оксиду цинку та діоксиду титану. За таких умов сильного та довготривалого стресу у клітинах також запускаються різні механізми клітинної смерті пов'язані зі стресом ER, такі як апоптоз та аутофагія. (Zhang R. et al. 2012), (Chen R. et al. 2014), (Yu et al. 2015a).

Зокрема, дослідження на бронхіальних епітеліальних клітинах людини показали, що інгібування сенсорно-сигнальних шляхів стресу ER, тауроурсодезоксихолевою кислотою (TUDCA) пом'якшує токсичну відповідь внаслідок надходження у клітини наночастинок діоксиду титану, що свідчить про опосередкованість їх токсичності стресом ER (Yu et al. 2015a). У той же час з'ясування можливих молекулярних механізмів, що спричинюють гострий токсичний вплив на різні типи клітин наночастинок срібла, показали тісний взаємозв'язок між пошкодженнями індукованими окислювальним стресом та модуляцією стресу ER (Zhang R. et al. 2012). Всі ці дані демонструють виняткову чутливість механізмів підтримання гомеостазу ER за дії різних наночастинок шляхом активації стресу ER, а отже відповідь на незгорнуті протеїни (UPR) може бути використана як чутливий показник у нанотоксикологічних дослідженнях (Chen R. et al. 2014).

Оскільки кожен із сенсорно-сигнальних шляхів стресу ER відіграє унікальну та спеціалізовану роль у різних процесах метаболізму, зміна в експресії генів задіяних у відповіді на незгорнуті протеїни може спричинити зміни у нормальному проходженні метаболічних процесів, а за умов посиленого і тривалого стресу до виникнення патологій та захворювань. Водночас, сфера впливу стресу ER на експресію генів не обмежується лише контролем роботи

генів, задіяних безпосередньо у сенсорно-сигнальну систему стресу ER. Цей вплив також поширюється і на гени, які опосередковано пов'язані з ним. Дана взаємодія з'ясовується шляхом застосування методів біоінформаційного аналізу, тобто пошуком спільних регуляторних сайтів у промоторній послідовності досліджуваного гена з генами, які кодують протеїни задіяні у реакції на неправильно згорнуті протеїни, так і експериментально, з'ясуванням наявності змін у експресії гена, порівнюючи дані його експресії у клітинах з пригніченою функцією ERN1 (Minchenko et al., 2015) (Minchenko et al., 2016b) (Riabovol et al., 2019). Аналіз цих даних дозволяє виділити, так звані стрес-залежні гени, які очевидно розширяють уявлення про молекулярні механізми дії різних наночастинок на геном.

1.6. Стрес-залежні гени та їх роль у механізмах дії наночастинок

На сьогодні відомо, що індукція стресу ER спричинює зміни профілю експресії кількох сотень генів (Acosta-Alvear et al., 2007). Як постійний трансмембранний протеїн ER, сигнальний ензим від ендоплазматичного ретикулума до ядра (ERN1) виконує роль основного проксимального сенсора UPR та сприяє як згортанню, так і деградації протеїнів ER, пристосовуючи процеси для виживання клітин чи запуску програми загибелі клітини пов'язані зі апаратом ER (Hetz et al., 2009).

Попередніми дослідженнями показано, що наночастинок срібла здатні впливати на експресію генів, які входять до системи ERN1 і кодують важливі регуляторні фактори та ензими (Minchenko et al., 2011), (Minchenko et al., 2012). До них зокрема відносяться протеїнкінази, фосфатази та транскрипційні фактори, що контролюють метаболічні процеси за норми і патологій та регулюють циркадіальні ритми (Mizoguchi et al., 2006), (Walton et al., 2009), (Meng Q. et al., 2010), (Huang W. et al., 2011), (Kovac et al., 2009).

Наночастинок срібла здатні також викликати посилення стресу ER через індукцію низки характерних маркерів стресу, а саме фосфорилування PERK та

еукаріотичного фактору ініціації трансляції 2α (eIF2 α), фосфорилування ERN1, альтернативний сплайсинг транскрипційного фактора (XBP1), розщеплення ATF6, активація протеїну A5 теплового шоку HSPA5/GRP78/BiP та енхансер-зв'язуючого протеїну DDIT3/CHOP. Було показано, що пригнічення експресії генів *ERN1*, *PERK* і *ATF6* допомогою siRNA-технологій значно зменшувало стрес ER за дії наночастинок срібла, а пригнічення експресії CHOP – послаблювало апоптоз (Zhang R. et al. 2012). Вивчення ж впливу наночастинок оксиду цинку на ендотеліальні клітини пупкової вени людини (HUVEC) показали, що навіть нецитотоксичні концентрації можуть індукувати стрес ER із збільшенням експресії сплайс-варіанту XBP1s, DDIT3 і каспази-12, а також маркерних протеїнів ER, таких як HSPA5/BiP, DDIT3, PPP1R15A/GADD34 (протеїн-фосфатаза 1, регуляторна субодиниця 15A), p-PERK (фосфорильована форма PERK), p-eIF2 α , та розщепленої каспази-12 (Chen R. et al. 2014).

Дослідження на нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS показали, що фулерен C60 змінює експресію генів, які є залежними від стресу ER та задіяні у регуляції процесів проліферації клітин. Серед них транскрипційний фактор E2F8 (E2F транскрипційний фактор 8), IGFBP2, SMAD5 (член 5 родини SMAD), HSD17B2 (гідроксистероїд 17-бета-дегідрогеназа 2), CCNG1 (циклін G1) та HSPB8 (Minchenko et al., 2013a).

В залежності від типу клітин фулерен C60 здатен як збільшувати проліферацію клітин (нормальні астроцити людини лінії NHA/TS), так і знижувати проліферативний потенціал (пухлинні клітини), але за суттєво вищих доз (Minchenko et al., 2013a) (Prylutska et al., 2011). У першому випадку це узгоджується з підвищеною експресією про-проліферативних факторів IGFBP2 та E2F8, які відіграють важливу роль у оркеструванні експресії генів, необхідних для проліферації і прогресії клітинного циклу, та сприяють онкогенезу (Christensen et al., 2005). Разом з тим, була виявлена і відмінність у дії наночастинок фулерену C60 на рівень експресії генів *IGFBP2* та *E2F8*. Так, рівень мРНК IGFBP2 був значно більшим на першу добу та значно меншим на третю, а підвищення експресії мРНК E2F8 спостерігалось на третій день. У

випадку з мРНК пухлинного супресора SMAD5 максимальне підвищення рівня його експресії відносно контролю було за першу добу і поверталось до рівня контролю на третю добу дії цих наночастинок (Minchenko et al., 2013a). Фулерен C60 суттєво збільшував також рівень експресії гена цикліну G1, але це підвищення спостерігалось на третій день після незначного зниження за першу добу. Разом з тим, дія фулерену C60 на нормальні астроцити людини викликала і різке зниження (більш ніж у 20-разів) рівня експресії гена *HSD17B2* на перший день та трохи менше – на третій. Фулерен C60 сильно пригнічував також рівень експресії протеїну теплового шоку B8 (HSPB8) у культурі нормальних астроцитів людини, причому значне зниження спостерігалось як через один, так і через три дні (Minchenko et al., 2013a).

Ці дані вказують на багатогранний вплив наночастинок фулерену C60 на експресію генів у культурі нормальних астроцитів людини, який суттєво залежав від часу дії цих наночастинок, що вказує на перепрограмування геному можливо шляхом індукції стресу ER цими карбоновими наночастинками (Minchenko et al., 2013a).

1.7. Особливості дії карбонових наночастинок на геном

Атоми карбону, на відміну від інших елементів, мають унікальну здатність утворювати міцні ковалентні зв'язки як з іншими атомами карбону, так і з атомами неметалічних елементів, що дозволяє їм утворювати широкий спектр структур. Більшість важливих біологічних молекул мають карбонову основу, зокрема ДНК, РНК, протеїни, вуглеводи та ліпіди, що свідчить про природно високу спорідненість клітин до карбону (Toyokuni, 2013). З поміж усіх елементів, карбон має найбільше алотропних модифікацій, значну частину з яких складають саме наноалотропи.

Виявлені в останні десятиліття, карбонові нанорозмірні алотропи зайняли раніше вакантний простір між природними вуглецевими матеріалами та біомолекулами, а завдяки дивовижним властивостям мають досить значний

потенціал для застосування у різноманітних сферах, зокрема і біомедичній. Зокрема, широкому використанню карбонових нанотрубок (одностінних і багатостінних) та нанографену сприяє наявність у них таких властивостей, як адсорбція світла ближнього інфрачервоного спектру та виробництво тепла, мала вага та висока хімічна стабільність, здатність добре проникати через клітинну мембрану (Madani et al., 2013). Всі ці властивості дозволяють розглядати їх у якості чудових зондів для візуалізації і перспективних носіїв лікарських препаратів при діагностиці та лікуванні онкологічних захворювань (Meng L. et al., 2012).

Однак ті ж самі унікальні фізико-хімічні властивості карбонових наноматеріалів, що зробили їх перспективними для різноманітного використання, стали також джерелом небезпек для здоров'я людини (Samadian et al., 2020). Чисельні дослідження токсичності карбонових нанотрубок *in vivo* показали, що їх дія на живі організми може призводити до розвитку різноманітних патологій, але вона залежить від способу їхнього потрапляння в організм. У той же час, дослідження *in vitro* дають можливість поглибити розуміння молекулярних механізмів токсичності як карбонових, так і наночастинок іншої природи. Дослідження дії наночастинок продемонстрували, що їх токсичність значною мірою залежить від форми, діаметру, довжини, хімії поверхні, наявності функціональних груп, а також від чистоти наноматеріалу, зокрема присутності залишків каталізатора (металічних часток) (Jain et al., 2012) (Madani et al., 2013). Але особливу увагу слід приділяти виявленню генотоксичності наночастинок, оскільки порушення структури та нормального функціонування геному може призвести до цілого каскаду непередбачуваних ефектів, які можуть стати причиною розвитку метаболічних порушень та численних захворювань.

Інтенсивному дослідженню генотоксичності різних наночастинок сприяє також і їх велика роль в ініціації різноманітних мутацій, у тому числі і спадкових. Особливість ситуації з карбоновими наноматеріалами полягає у тому, що вони мають високу реакційну здатність, тенденцію до агломерації та високе

співвідношення поверхні до об'єму, а це сприяє формуванню багатофакторної взаємодії наночастинок з біологічними структурами, більшість аспектів якої є ще невідомою. Саме тому, генотоксичні ефекти кожного окремого виду карбонових наноматеріалів повинні розглядатися поряд з іншими параметрами. Окрім того, важливо проводити більш детальну оцінку генотоксичності карбонових наночастинок, оскільки вони також можуть посилювати або сприяти прогресії пухлин (Samadian et al., 2020).

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та умови проведення експериментів

Для дослідження впливу карбонових наночастинок на експресію генів, які контролюють проліферацію і виживання клітин та мікроРНК були обрані одностінні карбонові нанотрубки (SWCNTs) та оксид графену.

Експерименти проводилися на культурах нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS, а також клітин гліобластоми лінії U87 трансфікованих вектором (U87-Vector) або домінант-негативною конструкцією ERN1 (U87-dnERN1). Дослідження експресії мікроРНК проведені також на препаратах РНК із ембріонів зебристих рибок *Danio rerio* після дії на них різних доз карбонових наночастинок.

2.1.1. Характеристики карбонових наночастинок

Функціоналізовані одностінні карбонові нанотрубки були отримані від професора Уве Ріттера з Інституту хімії та біотехніки Технічного університету Ільменау (Ільменау, Німеччина) (Minchenko et al., 2016a). Вони були суспендовані у дистильованій воді та дезагреговані ультразвуком 15 хвилин на льоду, а потім відфільтровані через мембранний фільтр з діаметром пор 220 нм. За даними атомно-силової мікроскопії діаметр нанотрубок становив 1-2 нм, довжина визначалася за розміром пор мембранного фільтра та була до 210 нм. Характеристики цих нанотрубок частково були описані раніше (Minchenko et al., 2018). За даними атомно-силової мікроскопії діаметр нанотрубок становив 1-2 нм, а їх довжина до 210 нм, причому найбільша кількість нанотрубок була максимум 160 нм за даними DMA (differential mobility analysis). Основна маса водної суспензії SWCNTs (5 мкг/мл) за даними методу динамічного розсіювання світла DSL (dynamic light scattering) мала гідродинамічний діаметр біля 183 нм і

дзета-потенціалу (електро-кінетичний потенціал) -26 mV , а індекс полідисперсності PDI (polydispersity index) цих наночастинок становив 0,273 (Ritter et al., 2014), (Korolovych et al., 2014), (Minchenko et al., 2018), (Shapoval et al., 2020), (Minchenko et al., 2022). Значення дзета-потенціалу характеризує стабільність суспензії, якщо воно менше за -15 mV , це означає початок агрегації частинок.

Оксид графену (нанографен оксид) у вигляді водної дисперсії (2 мг/мл, $d=1\text{ нм}$) отримували від Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Німеччина.

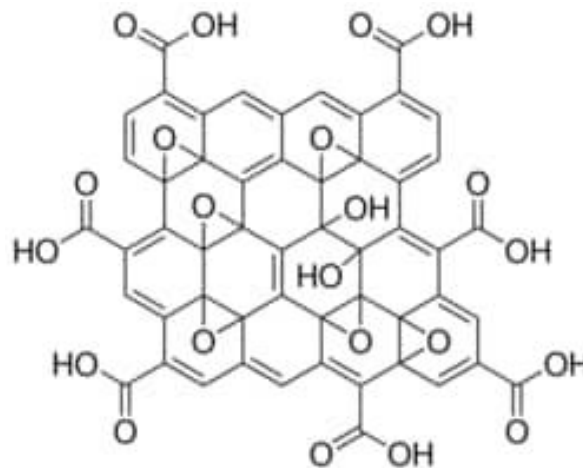


Рис. 2.1. Структурна формула оксиду графену

2.1.2. Характеристика культури іморталізованих нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS та умови їх культивування

Нормальні астроцити людини лінії NHA/TS були надані для наших досліджень доктором Сасаї спільно з доктором Танака (Лабораторія молекулярної та клітинної патології, Медична школа університету Хоккайдо, Японія). Ці клітини вирощувалися згідно із зазначеними у статті вимогами (Sasai et al., 2007).

При дослідженні впливу SWCNTs на нормальні астроцити людини лінії NHA/TS, клітини були розділені на три групи: контрольну та дві групи до поживного середовища яких додавали суспензію нанотрубок до кінцевої концентрації 2 нг/мл та 8 нг/мл і клітини росли ще протягом 24 годин.

У дослідях з оксидом графену, нормальні астроцити людини NHA/TS також були розділені на три групи: одну контрольну і дві групи з оксидом графену (1 нг/мл і 4 нг/мл у середовищі вирощування клітин) та інкубували протягом 24 годин (Rudnytska, 2022).

2.1.3. Характеристика культур клітин гліобластоми U87 та умови їх культивування

Культура клітин гліобластоми мозку людини лінії U87MG з вектором pcDNA3.1 і домінант-негативною конструкцією на основі цього вектора, що містила кДНК протеїну ERN1 без кіназного та ендорибонуклеазного доменів (dnER1) були надані професором М. Moenner (INSERM U1029 Лабораторія молекулярних механізмів ангіогенезу, Університет Бордо 1, Франція).

Клітини гліобластоми людини лінії U87 з порожнім вектором та домінант-негативною конструкцією ERN1 (U87-dnER1), вирощували у модифікованому Дульбекко мінімальному есенціальному середовищі Ігла (DMEM; *Gibco, Invitrogen*, США) з високим вмістом глюкози (4,5 г/л), доповненому глютаміном (2 мМ), 10 % ембріональної сироватки телят (*Equitech-Bio, Inc.*, США), пеніциліном (100 од./мл; *Gibco*, США) та стрептоміцином (0,1 мг / мл; *Gibco*, США) при 37°C у зволоженій атмосфері повітря (95 %) та 5 % CO₂, як описано раніше (Minchenko et al., 2016a).

Клітини гліобластоми лінії U87, трансфікованої вектором (U87-Vector) і з домінант-негативною конструкцією ERN1 (U87-dnER1), розділяли на три групи, до яких входили контроль та дві групи, які оброблялися SWCNTs концентрацією 2 і 8 нг/мл, відповідно, протягом 24 годин.

Експерименти з ембріонами *Danio rerio* були проведені моїм науковим керівником, який надав мені для аналізу експресії мікроРНК отримані ним препарати РНК з ембріонів. Через 72 години після запліднення до води, в якій знаходилися ембріони додавали SWCNTs до кінцевої концентрації 2 і 8 нг/мл на період 24 та 72 години. Після цього було проведено виділення РНК із личинок.

Розвиток личинок *Danio rerio* було охарактеризовано за допомогою інверсного мікроскопа, оснащеного цифровою камерою, і задокументовано фотографіями (Minchenko et al., 2022).

2.2. Методи дослідження

У ході виконання роботи були використанні сучасні методи біохімії та молекулярної біології: виділення РНК, визначення кількісних та спектральних показників РНК спектрометричним методом, синтез комплементарних ДНК за допомогою методу зворотної транскрипції, методи кількісної полімеразної ланцюгової реакції, електрофоретичні методи аналізу нуклеїнових кислот, методи біоінформатики та статистичної обробки отриманих результатів.

2.2.1. Виділення РНК з культури клітин, вимірювання її кількості та спектральних характеристик

Виділення тотальної РНК з нормальних астроцитів людини NHA/TS і клітин гліобластоми лінії U87 здійснювали за допомогою реагенту Trisol згідно протоколу виробника (*Invitrogen*, США) як описано раніше (Minchenko et al., 2018), (Auf G. et al., 2010).

Культуральні чашки (d = 10 см) з культурами клітин промивали фосфатно-сольовим буфером DPBS (*Thermo Fisher Scientific*, США). Після промивання додавали 1 мл реагенту Trisol та залишали на 5 хв. Отриманий лізат клітин переносили у центрифужні мікропробірки і додавали 200 мкл хлороформу, перемішували, залишали на 5 хвилин на льоду, а потім центрифугували у центрифугі (Centrifuge 5415 R, *Eppendorf*, Німеччина) протягом 10 хвилин при 15000 g та 4 °C до повного розділення водної та фенольної фаз. Верхню водну фазу відбирали і переносили у нові мікропробірки, додавали ізопропанол у співвідношенні 1:1 та витримували у морозильній камері при -20 °C протягом 2 годин. Після цього пробірки знову центрифугували протягом 15 хвилин при

15000 g та 4 °C для осадження РНК. Осади РНК промивали 75 % етанолом і розчиняли у воді без рибонуклеаз. Для додаткового очищення від можливих залишків фенолу отримані РНК повторно осаджували 95 % етанолом, що містив 0,1 М ацетату натрію, при -20 °C протягом 1 години і центрифугували 10 хвилин при 15000 g та 4 °C. Осад знову розчиняли у воді, вільній від нуклеаз. Отриману РНК використовували для синтезу комплементарної ДНК. Концентрацію РНК, а також спектральні характеристики вимірювали за допомогою спектрофотометру NanoDrop ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*, США).

2.2.2. Синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції мРНК та мікроРНК

Як матрицю для синтезу комплементарної ДНК брали попередньо отримані зразки тотальної РНК з нормальних астроцитів людини NHA/TS, субліній клітин гліобластоми лінії U87MG та ембріонів рибки *Danio rerio*. Для зворотної транскрипції був використаний набір Thermo Scientific Verso cDNA Synthesis Kit (*Thermo Fisher Scientific*, США). Для синтезу кДНК брали 1 мкг РНК і додавали воду до 10 мкл. Потім додавали 10 мкл підготовленої завчасно суміші реагентів з набору для синтезу кДНК, який включав у себе себе 4 мкл 5× реакційного буферу для зворотної транскрипції, 1 мкл суміші дезоксирибонуклеотидтрифосфатів (dNTP mix), 0,5 мкл праймера для зворотної транскрипції (RNA Primer), 0,5 мкл Verso Enzyme mix (містить зворотну транскриптазу і інгібітор РНКаз для захисту РНК) та вільну від нуклеаз воду. Проби інкубували протягом 30 хвилин при 42 °C. Для зупинення реакції реакційну суміш прогрівали протягом 2 хвилин при 95 °C, а потім переміщали на лід для охолодження. Отриману кДНК розводили у 50 разів і використовували для дослідження рівня експресії генів за допомогою методу кількісної ПЛР.

Для поліаденілювання та зворотної транскрипції мікроРНК використовували комплект Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (Takara, Японія).

2.2.3. Ампліфікація кДНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції

Рівень експресії досліджуваних генів, що відіграють важливу роль у процесах виживання та проліферації, визначали за допомогою методу кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Вимірювання здійснювалося на ампліфікаторі „QuantStudio 5 Real-Time PCR System” (*Applied Biosystems*, США).

Для ампліфікації до 3 мкл розчину кДНК додавали 2× реакційну суміш Absolute QPCR SYBR-Green Mix (*Thermo Scientific*, Великобританія) та суміш олігонуклеотидних праймерів (*Sigma-Aldrich*, США), специфічних для кожного гена, та вільну від нуклеаз воду до 20 мкл. Використані для ампліфікації праймери представлені у таблиці 2.1. (А, В та С)

Таблиця 2.1.А

Характеристики праймерів, що використовувалися для кількісної ПЛР у реальному часі

Символ гена	Назва гена	Послідовності праймера	Номери нуклеотидів у відповідній послідовності	Номер у GenBank
BCAR3	BCAR3 adaptor protein, NSP family member	F: 5'- cctcccataaggtcctgtga R: 5'- gtccatgatgtgcctctcct	426–445 635–616	NM_003567.4
BRCA1	BRCA1 DNA Repair Associated	F: 5'- tgaagaagaggaacgggct R: 5'- tggctcccctgctgttctaa	4145–4164 4384–4365	NM_007294.4
CA9	Carbonic anhydrase IX	F: 5'-gtgacatcctagccctggtt R: 5'-agcaggacaggacagttacc	1280-1299 1496-1477	NM_001216
CLU	Clusterin	F: 5'-tcaaaatgctgtcaacgggg R: 5'-tggtctcattgcacactcct	213–232 391–372	NM_001831

Таблиця 2.1.В

Характеристики праймерів, що використовувалися для кількісної ПЛР у реальному часі

Символ гена	Назва гена	Послідовності праймера	Номери нуклеотидів у відповідній послідовності	Номер у GenBank
DNAJB9	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B9	F: 5'-gtcggagggtgcaggatatt R: 5'-tcagggtggtacttcatggc	346–365 536–517	NM_012328
FABP5	Fatty acid binding protein 5	F: 5'- tcagcagctggaaggaagat R: 5'- gccatcagctgtggttctt	72-91 300-281	NM_001444
HIF1AN	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha Inhibitor	F: 5'-gtgggcaggaagattgcat R: 5'-gggtgatgaacagggtatgg	535-554 779-760	NM_017902
HLA-G	Homo sapiens major histocompatibility complex, class I, G	F: 5'-gcagagatacacgtgccatg R: 5'-agggcagctgtttcacattg	1024-1043 1252-1233	NM_002127.6
HSPA9	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 9	F: 5'-gtgggtggcatgactaggat R: 5'-acaggggagtgacatcaagg	1239-1258 1413-1394	NM_004134
IDH2	Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 2, Mitochondrial	F: 5'-atctcaggttttgcgcacag R: 5'-aagacttgaggacctgagcc	760-779 979-960	NM_002168

Таблиця 2.1.С

Характеристики праймерів, що використовувалися для кількісної ПЛР у реальному часі

Символ гена	Назва гена	Послідовності праймера	Номери нуклеотидів у відповідній послідовності	Номер у GenBank
IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3	F: 5'-tctgatcccaagttccacc R: 5'-tccatttctctacggcaggg	613–632 785–766	NM_000598
IGFBP6	Insulin-like growth factor binding protein 6	F: 5'-gctgtgcagaggagaatcc R: 5'-ttgggcacgtagagtgttg	397–416 632–613	NM_002178
MYBL1	MYB proto-oncogene like 1	F: 5'-ttgaaggatggcgaagaggt R: 5'-catcgatgctggcactgaaa	374-393 610-591	NM_001080416
MYBL2	V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2	F: 5'-ctgcactaccaggacacaga R: 5'-gtactggcattgctggtcag	207-226 383-364	NM_002466
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyl-transferase	F: 5'- gttacaagttgctgccacct R: 5'- agacgttaatcccaaggcca	1118–1137 1339–1320	NM_005746.3
PAM	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	F: 5'-ggactcggaccaattgaaga R: 5'-catgctcctcccaggatta	2021-2040 2236-2217	NM_000919
SLC6A8	Solute carrier family 6 member 8	F: 5'-gagatctctgtggccctctg R: 5'-aggaccagcaccatttcac	1979-1998 2222-2203	NM_005629
TSPAN13	Tetraspanin 13	F: 5'- gcaaccacaggtccaagat R: 5'- ctcggagactggaaatcagc	196–215 346–327	NM_014399.3
ACTB	Beta-actin	F: 5'-gacttcgagcaagagatgg R: 5'-gcactgtgttggcgtacag	747–766 980–961	NM_001101

Ампліфікацію усіх обраних генів проводили протягом 40 циклів за наступними параметрами: 30 сек. при 95 °С – денатурація; 30 сек. при 55 °С – «відпал» олігонуклеотидних праймерів; 30 сек. при 72 °С для синтезу продукту ампліфікації. Дослідження експресії кожного гена здійснювали у трьох повторах у кожному із чотирьох незалежних експериментів.

Якість продуктів ампліфікації аналізували за допомогою кривих плавлення та електрофорезу з використанням 3 % агарозного гелю. Аналіз кількісної ПЛР проводили за допомогою спеціальної комп'ютерної програми “Differential Expression Calculator”. Значення рівня експресії мРНК досліджених генів були нормалізовані по рівню мРНК бета-актину та представлені у відсотках від контролю (100 %).

2.2.4. Визначення рівня мікроРНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції

Рівень експресії мікроРНК у різних експериментах (miR-19a-3p, miR-27a-3p, miR-96-5p, miR-143-3p, miR-144-3p, miR-145-5p, miR-182-5p та miR-206-5p) вимірювали за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі за допомогою приладу «QuantStudio 5 Real-Time PCR» System» (*Applied Biosystems*, США) та Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR Kit (*Takara*, Японія). Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в трьох повторах. Для аналізу експресії мікроРНК використовували універсальний зворотний праймер qPCR і специфічні для кожної мікроРНК прямі праймери (табл. 2.2).

Якість продуктів ампліфікації аналізували за кривими плавлення. Аналіз кількісної ПЛР проводили за допомогою спеціальної комп'ютерної програми “Differential Expression Calculator”. Значення експресії мікроРНК були нормалізовані до рівня РНК U6 і представлені у відсотках від контролю (100 %).

Таблиця 2.2.

Прямі праймери мікроРНК для кількісної ПЛР у реальному часі

Символ мікроРНК	Специфікація	Праймер
miR-19	microRNA-19a-3p	5'- tgtgcaaatctatgcaaaaactga
miR-27	microRNA-27a-3p	5'-ttcacagtggctaagtccgc
miR-96	microRNA-96-5p	5'- tttggcactagcacatTTTTGCT
miR-144	microRNA-144-5p	5'-ggatatcatcatatactgtaag
miR-145	microRNA-145-5p	5'- gtccagtttcccaggaatccct
miR-182	microRNA-182-5p	5'- tttggcaatggtagaactcaca
miR-206	microRNA-206-5p	5'- tggaatgtaaggaagtgtgtgg
U6F	U6	F 5'- cttgcttggggaggacatatac
U6R	U6	R 5'- aacgcttcacgaattgcgtg

2.2.5. Електрофорез ампліфікованих фрагментів ДНК в агарозному гелі

Продукти ампліфікації аналізували методом електрофорезу у 3 % агарозному гелі. Агарозу розчиняли у однократному TRIS-ацетатному буфері з ЕДТА (буфер ТАЕ) шляхом нагрівання до 100 °С. Потім цей розчин охолоджували приблизно до 50 °С, заливали у камери для формування гелю та залишали на 35-40 хв застигати за кімнатної температури. Попередньо пофарбовану спеціальним буфером кДНК поміщали у лунки для зразків. Для визначення молекулярної маси зразків використовували маркер GeneRuler 100-bp DNA ladder (*Thermo Fisher Scientific*, США) який вносили в окрему лунку. Горизонтальний електрофорез здійснювали за напруги 10 В/см протягом 1 години. Після завершення електрофорезу гель витримували у спеціальному флуоресцентному фарбнику для забарвлення ДНК SYBR* Safe DNA Gel Stain (*Life Technologies*, США). Візуалізацію результатів здійснювали в ультрафіолетовому світлі при довжині хвилі 310 нм у спеціальній камері.

2.2.6. Біоінформаційний аналіз сайтів зв'язування мікроРНК

Пошук сайтів зв'язування мікроРНК з мРНК відповідних генів здійснювали за допомогою програми [TargetScanHuman 8.0](#), яка дозволяє виявити мікроРНК, що може зв'язуватися з вибраною нами мРНК і вказує місця їх взаємодії.

2.2.7. Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку даних по рівню експресії мРНК генів, отриманих в результаті проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, проводили за допомогою програмного пакету “Differential expression calculator”. Усі значення Δ , ΔC_t від трьох повторів вимірювання були виражені як середнє і ці середні дані чотирьох незалежних експериментів опрацьовували статистично та виражали як $M \pm SEM$ (стандартна помилка середнього). Всі ці дані були проаналізовані на нормальність розподілу за допомогою графічного інструменту (діаграма нормальної ймовірності) та гістограми, причому для всіх наборів даних було показано нормальний розподіл.

Статистичний аналіз даних проводився у програмі Excel, зокрема здійснювалася оцінка показника статистичної достовірності відмінностей p за t -критерієм Стьюдента. Також були застосовані тест Д'Агостіно-Пірсона (p був близький до 1,00) та тест Шапіро – Вілка ($W > 0,9$; $p > 0,9$) для аналізу деяких наборів даних (Rudnytska et al. 2021). Різницю між середніми значеннями контролю та середніми значеннями експресії під впливом карбонових наночастинок (нанотрубок і оксиду графену) вважали достовірною та статистично значимою при значенні похибки $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Вплив карбонових нанотрубок на рівень експресії генів, що контролюють проліферацію та виживання клітин

Для в'ясування механізмів дії одностінних карбонових нанотрубок на геном у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS, нами було досліджено експресію поліфункціональних генів, що кодують: протеїн 3 раку грудної залози стійкий до антиестрогену (*BCAR3*), карбоангідразу 9 (*CA9*), кластерин (*CLU*), член B9 родини протеїнів теплового шоку DnaJ (*DNAJB9*), протеїн 5, що зв'язує жирні кислоти (*FABP5*), інгібітор альфа-субодиниці фактора 1, що індукується гіпоксією (*HIF1AN*), головний комплекс гістосумісності класу I G (*HLA-G*), член 9 родини A малих протеїнів теплового шоку (*HSPA9*), ізоцитрат дегідрогеназу 2 (*IDH2*), протеїн 3, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту (*IGFBP3*), протеїн 6, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту (*IGFBP6*), протеїн 1, подібний до протоонкогена MYB (*MYBL1*), протеїн 2, подібний до протоонкогена MYB (*MYBL2*), пептидилгліцин альфа-амідууючу монооксигеназу (*PAM*) та член 8 родини 6 розчинних транспортерів (*SLC6A8*), що контролюють проліферацію і виживання у нормальних астроцитах людини. Крім того, деякі з цих генів тісно пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулула та розвитком процесів канцерогенезу, що також є надзвичайно важливим з погляду дослідження впливу карбонових наночастинок на геном.

Згідно отриманих після проведення кількісної ПЛР даних про рівень експресії досліджених генів, вплив SWCNTs діаметром 1-2 нм у двох концентраціях протягом 24 годин на нормальні астроцити людини мав наступний характер.

Дослідження експресії генів за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі показало, що у нормальних астроцитах людини за дії SWCNTs суттєво порушується рівень експресії майже всіх досліджених генів уже через 24 години,

причому ці зміни переважно залежали від дози цих наночастинок. Найбільше підвищення рівня експресії спостерігається для генів пов'язаних із стресом ендоплазматичного ретикулула. Так, за дії SWCNTs спостерігалось значне, залежне від дози, посилення експресії генів, таких як кластерину (CLU), члена В9 родини протеїнів теплового шоку DnaJ (Hsp40) (DNAJB9), які кодують шаперони, відповідальні за згортання протеїнів при стресі ендоплазматичного ретикулула. Як видно на рисунку 3.1. (А), внаслідок дії SWCNTs майже вдвічі збільшився рівень експресії мРНК CLU, на +94 % при дії SWCNTs за дози 8 нг/мл, та близько у півтора рази (+45 %) під впливом значно меншої дози нанотрубок (2 нг/мл). Також збільшився більше ніж у два рази рівень експресії мРНК шаперона *DNAJB9* (+102 % і +160 %) порівняно з контролем (рис. 3.1 В), за концентрації 2 і 8 нг/мл середовища відповідно.

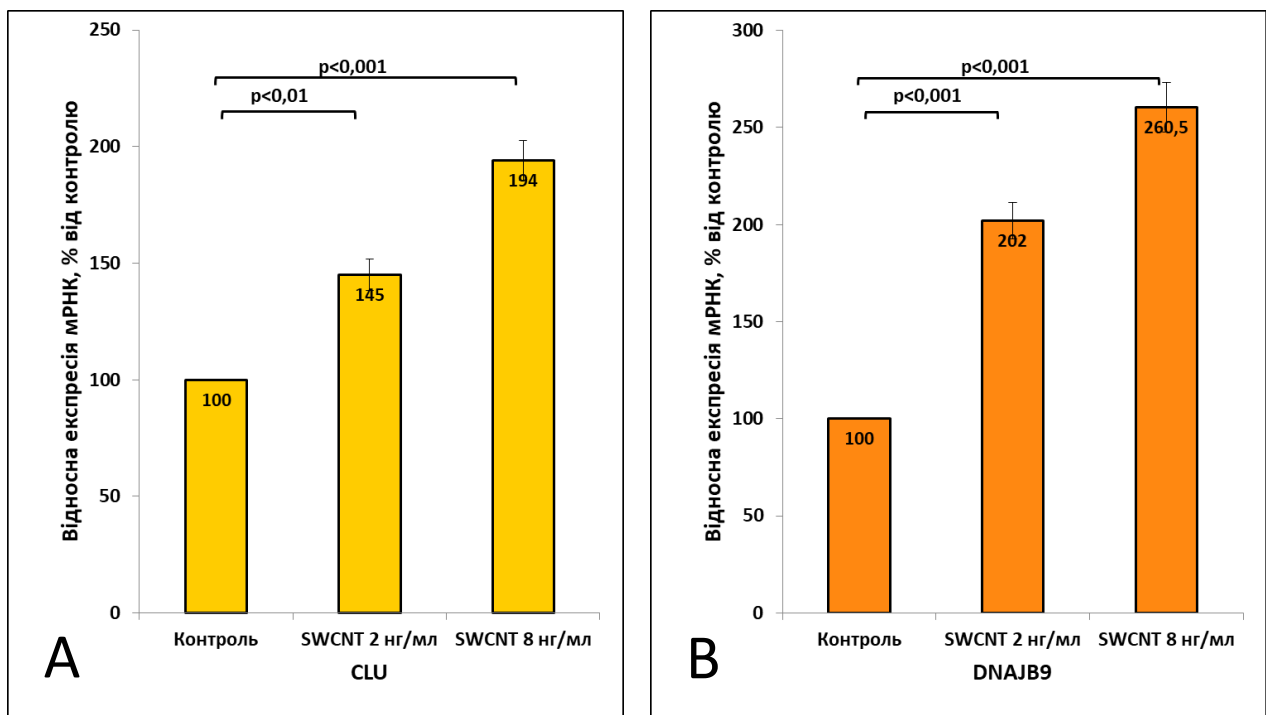


Рис. 3.1. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК CLU (А) та *DNAJB9* (В) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину і виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Трохи слабший вплив SWCNTs був виявлений при дослідженні рівня експресії мРНК IGFBP3, яка кодує мітогенний пептид, що стимулює ріст та поділ клітин. Як і у випадку з експресією мРНК двох попередніх генів, більший був вплив нанотрубок за концентрації 8 нг/мл та (+87 %), у той час як за умов меншої концентрації цих наночастинок (2 нг/мл) підвищення було лише +53 % у порівнянні з контролем (рис. 3.2 А).

Досить цікавий ефект справляє дія SWCNTs на рівень експресії мРНК CA9 у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS, оскільки концентрація 2 нг/мл спричиняє сильніше підвищення (+135 %), в той час коли 8 нг/мл – лише +76 % вище контролю, що є досить значним, проте удвічі меншим, ніж за нижчої концентрації цих наночастинок (рис. 3.2 В).

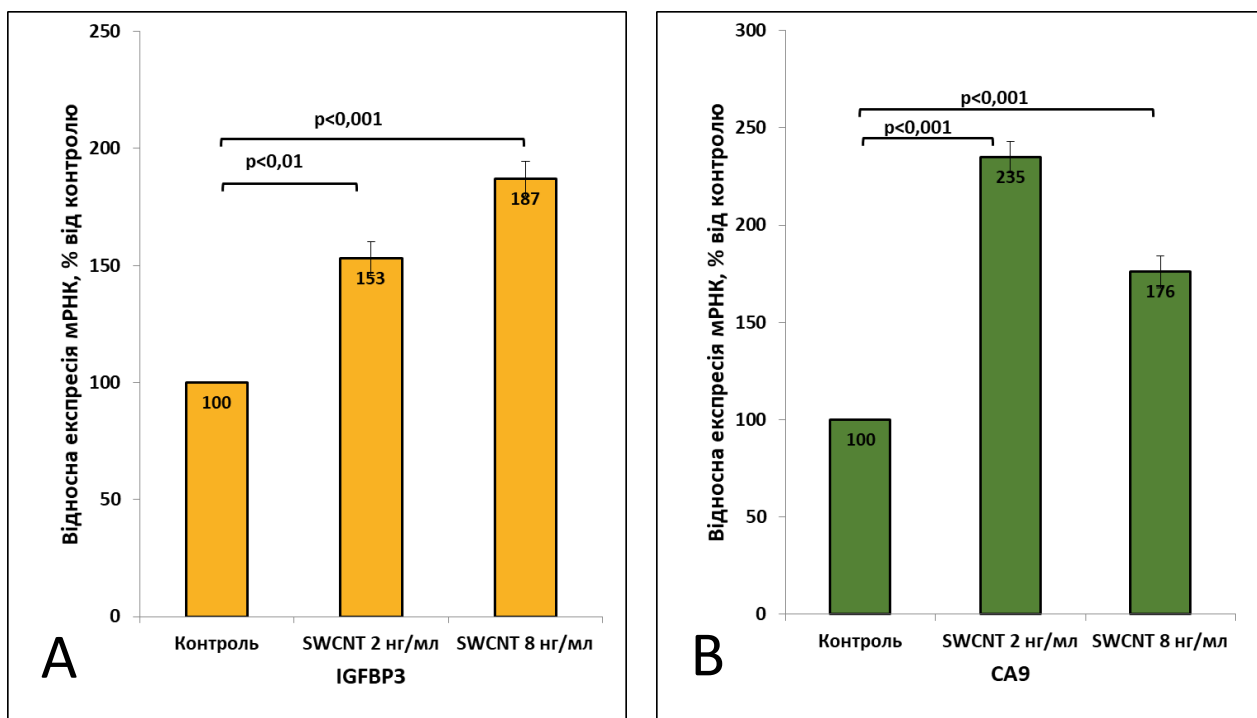


Рис. 3.2. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК IGFBP3 (А) та CA9 (В) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину і виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Крім того, підвищення рівня мРНК, зі збільшеним дозозалежним ефектом спостерігалось і для *MYBL2* та *HSPA9*, проте максимум за концентрації SWCNTs 8 нг/мл для *MYBL2* складав лише +40,5 %, а для *HSPA9* він ледве досягав півтора раза – +53 % за такої ж концентрації, у порівнянні з контролем. За концентрації ж 2 нг/мл середовища, підвищення рівня експресії мРНК не досягало і +30 % у обох випадках (рис. 3.3 А і В).

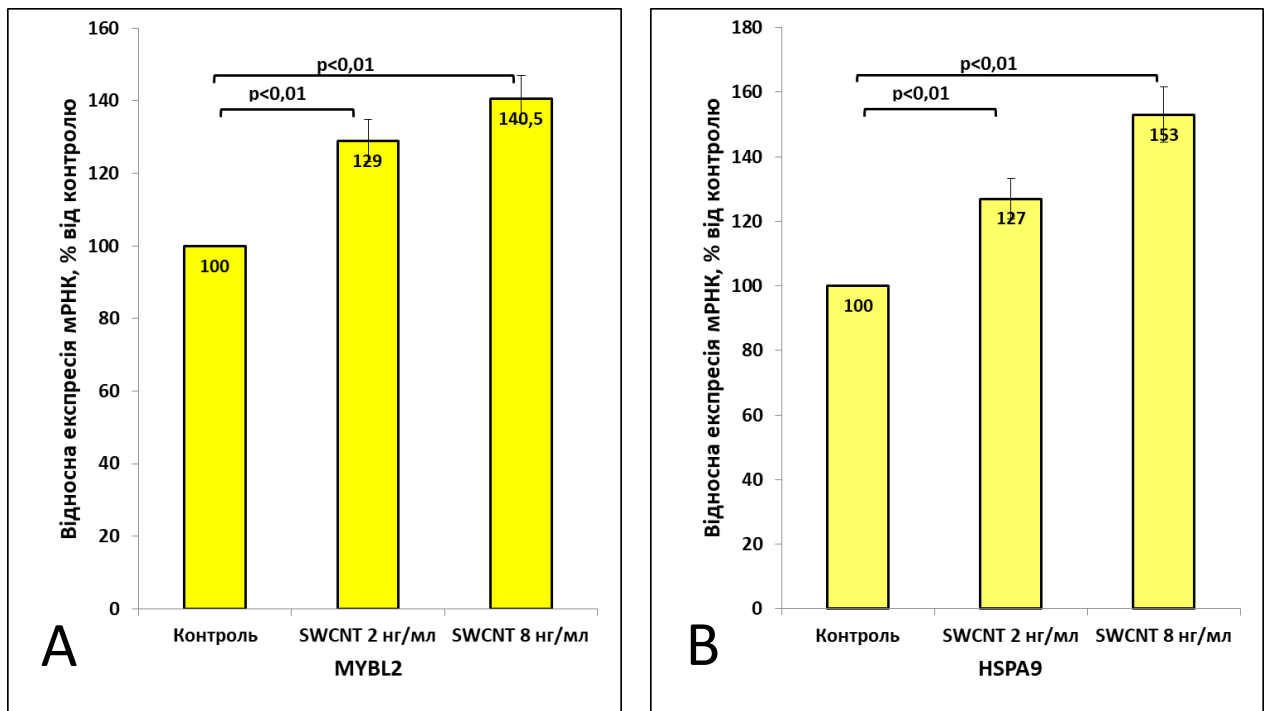


Рис. 3.3. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК *MYBL2* (А) та *HSPA9* (В) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину і виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Слід відмітити, що найбільша різниця між впливом двох різних концентрацій нанотрубок на рівень експресії мРНК були характерні для *CLU*, *DNAJB9*, *IGFBP3*, а також *CA9*, в той час як для *MYBL2* і *HSPA9* різниця коливалася в межах 10-25 % (рис. 3.1, 3.2 та 3.3). Ці дані вказують на те, що експозиція нормальних астроцитів людини навіть з дуже малими дозами

SWCNTs здатна помітно посилювати експресію генів, які кодуєть протеїни пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулума, такі як *CLU*, *DNAJB9*, а також *IGFBP3*, *MYBL2*, *HSPA9* та *CA9*, які контролюють проліферацію та виживання.

Окрім посилення експресії, спостерігалось також значне та часто і дозозалежне зниження рівня експресії мРНК *MYBL1*, *PAM*, *IDH2*, *HIF1AN*, *HLA-G*, *IGFBP6*, *SLC6A8*, *BCAR3* та *FABP5* у нормальних астроцитах людини за дії SWCNTs за концентрації 2 нг та 8 нг на 1 мл середовища (рис. 3.4 – 3.7).

Було встановлено, що за дії SWCNTs у дозі 2 і 8 нг/мл рівень експресії мРНК *MYBL1* значно знижувалися (-38 % та -46 %) від контролю, відповідно. Як і *MYBL2*, *MYBL1* належить до родини транскрипційних факторів, що контролюють прогресію клітинного циклу, диференціацію та виживання клітин, проте для *MYBL2* спостерігалось посилення експресії в межах +30 - +40 %. За цих умов статистична різниця між дією двох доз, в обох випадках майже не є значною (рис. 3.3 А та рис. 3.4 А).

Дещо більше зниження рівня експресії мРНК було встановлено для гена, що кодує багатофункціональний протеїн *PAM*, що задіяний у гомеостатичному контролі та який бере участь у розвитку процесів канцерогенезу. За дії SWCNTs у дозі 2 нг/мл спостерігалось зниження експресії мРНК *PAM* на 68 % у порівнянні з нормальними клітинами, а за концентрації нанотрубок 8 нг/мл зниження було більшим (-78 % від контролю) (рис. 3.4 В).

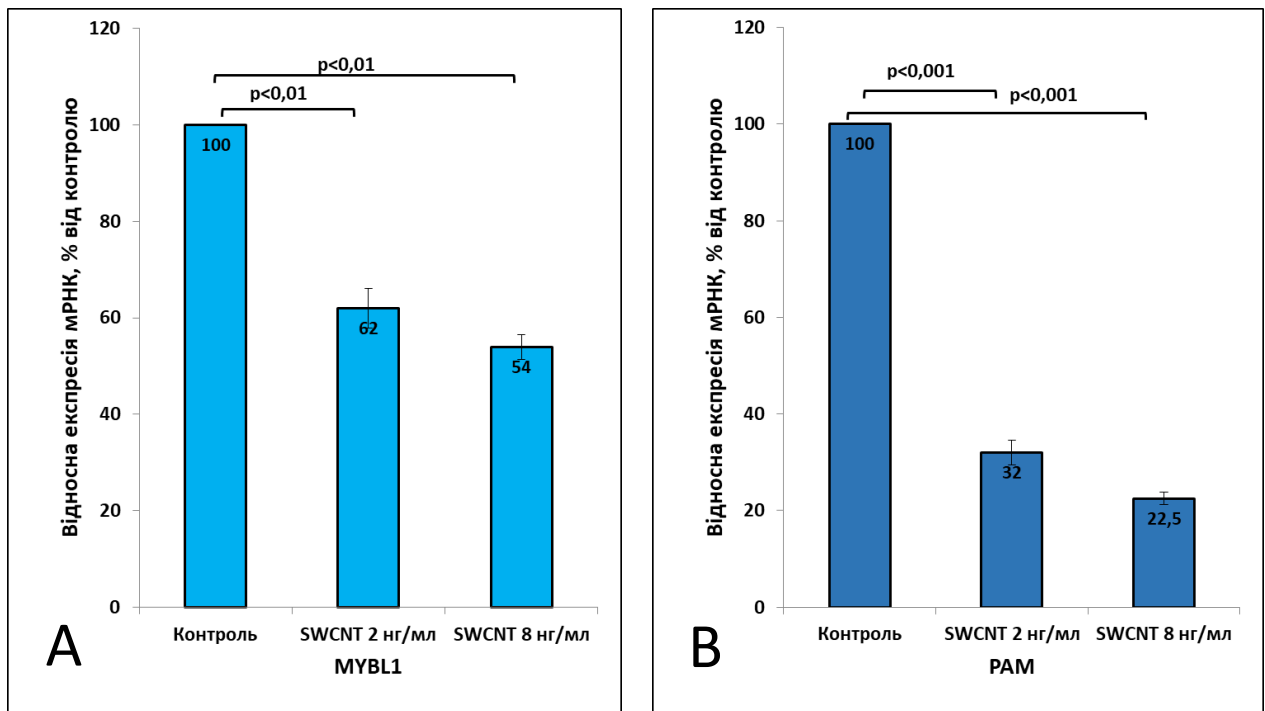


Рис. 3.4. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК MYBL1 (A) та PAM (B) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину і виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Також було виявлено суттєве зменшення рівня експресії мРНК IDH2 (-49 і -75 %), а також HIF1AN (-48 % та -73 %) за концентрацій SWCNTs 2 нг та 8 нг на 1 мл середовища відповідно. Як видно з даних наведених на рисунку 3.5 (A і B) рівень експресії мРНК обох генів, що кодують протеїни задіяні у контролі процесів виживання клітин, змінювався під впливом нанотрубок подібним чином як за дози 2 нг/мл, так і 8 нг/мл.

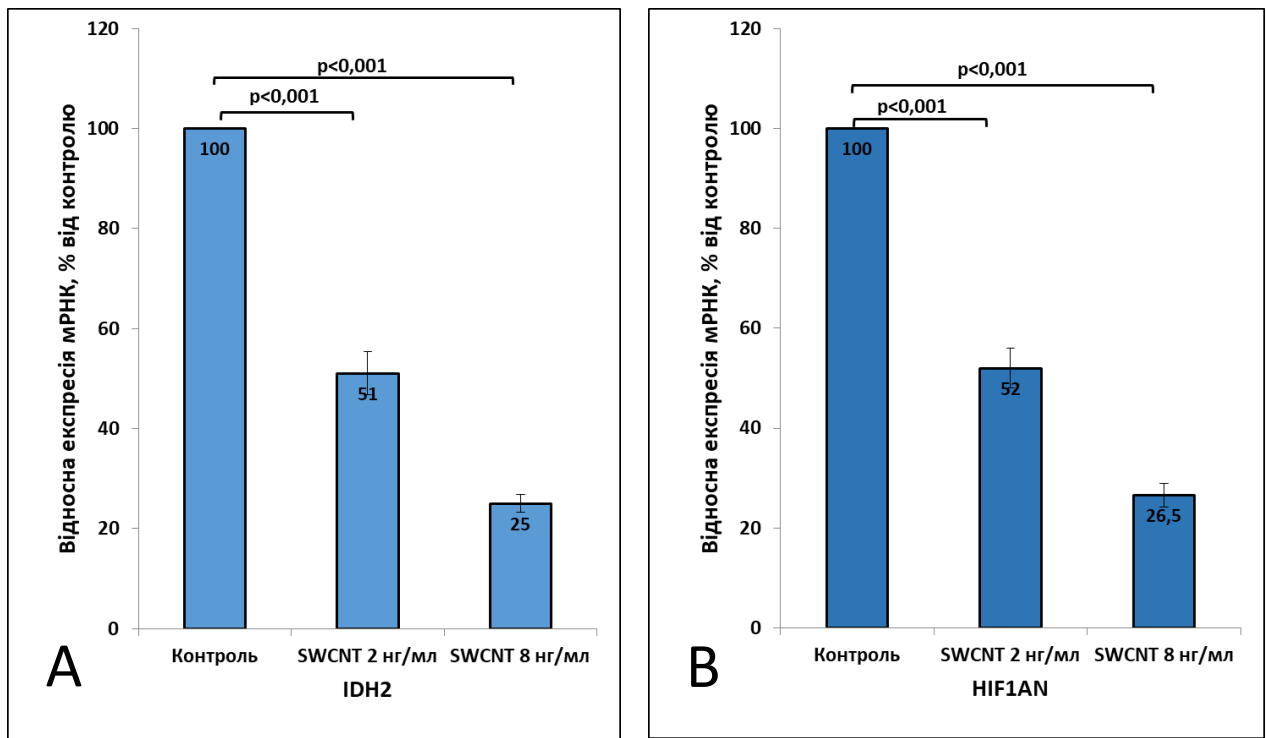


Рис. 3.5. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК IDH2 (А) та HIF1AN (В) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину і виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Зниження рівня експресії мРНК у відповідь на дію одностінних карбонових нанотрубок було продемонстровано також і для генів HLA-G, IGFBP6 та SLC6A8. Ці гени кодують протеїни, що пов'язані з імунною відповіддю, проте пригнічення було більш сильно виражене, зокрема, верхня межа була близько -70 %, а нижня досягала більше -95 % у порівнянні з контролем (рис. 3.6 та рис. 3.7 А і В).

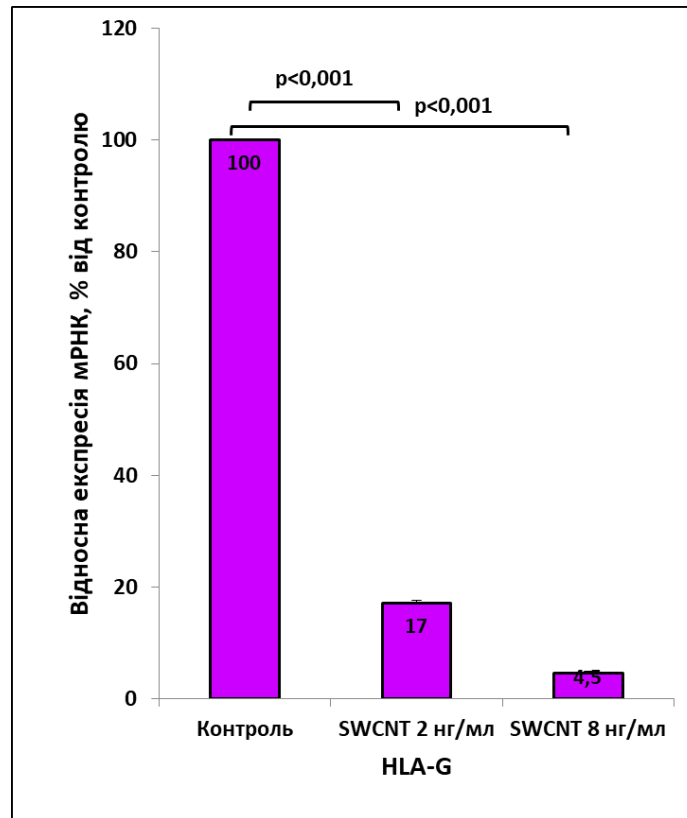


Рис. 3.6. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК HLA-G у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину і виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Так, найбільш гостро проявлявся ефект від дії SWCNTs на рівень експресії мРНК HLA-G уже за концентрації в 2 нг/мл (-83 %), а за більшої дози (8 нг/мл) цей ефект був ще більшим (-95 % від контролю) (рис. 3.6). Рівень експресії мРНК IGFBR6 знижувався на 75 % і 87 %, а для SLC6A8 на 69 % і 78 %, у нормальних астроцитах людини за концентрацій SWCNTs у 2 і 8 нг/мл протягом 24 год відповідно, у порівнянні з контролем (рис. 3.7 А і В).

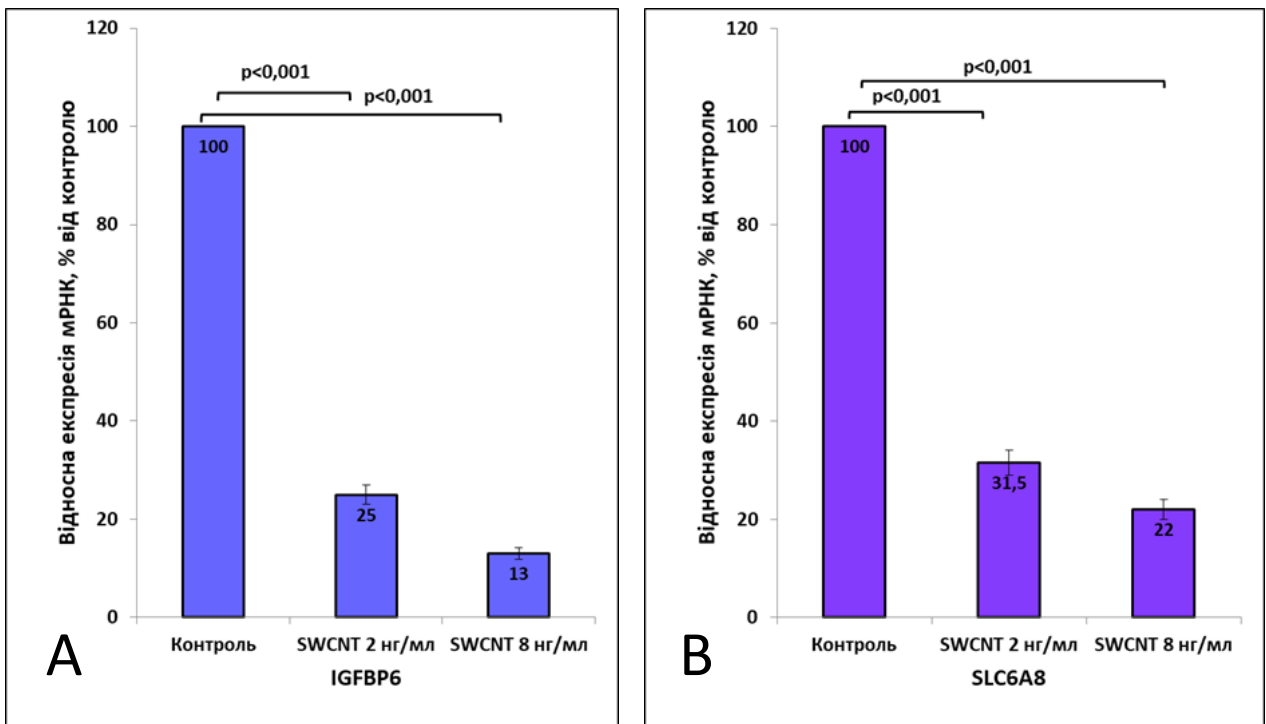


Рис. 3.7. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК IGFBP6 (А) та SLC6A8 (В) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину і виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Виражений пригнічувальний вплив нанотрубок на рівень експресії мРНК був показаний для BCAR3 та FABP5, які окрім контролю за процесами проліферації у клітинах, також беруть участь у розвитку канцерогенезу. Так, за дії SWCNTs у дозі 2 нг/мл середовища у нормальних астроцитах людини спостерігається зниження експресії мРНК BCAR3 на 80 %, а мРНК FABP5 – на 83 %, у порівнянні із значеннями рівня експресії у контрольних клітинах. За дії більшої дози SWCNTs (8 нг/мл) на культуру клітин NHA/TS пригнічення експресії сягало -88 % для FABP5, а для BCAR3 – -93 %, від контрольних значень (рис. 3.8 А і В).

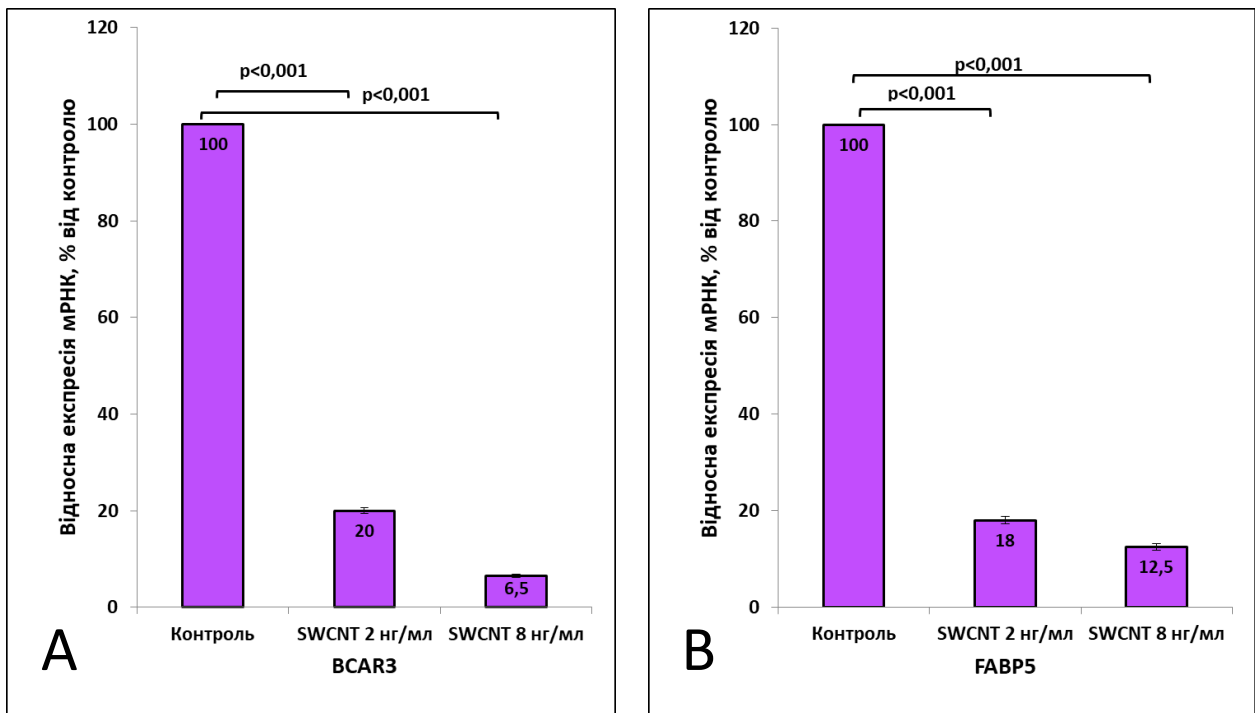


Рис. 3.8. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК BCAR3 та FABP5 у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину і виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Отримані нами дані вказують на те, що експозиція нормальних астроцитів людини навіть з дуже малими дозами SWCNTs здатна помітно пригнічувати експресію генів, які задіяні у регуляції процесів проліферації та виживання клітин, а також імунної відповіді та канцерогенезу (Rudnytska, 2021).

Таким чином, дія малих доз одностінних карбонових нанотрубок на клітини нормальних астроцитів людини призводить до зміни експресії цілої низки генів. Зокрема, за цих умов спостерігається посилення експресії генів, що кодують протеїни, пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулума, пригнічення експресії мРНК протеїнів, що контролюють імунну відповідь і різнонаправлений вплив на гени факторів, які регулюють проліферацію та виживання в клітинах, а надекспресія яких сприяє канцерогенезу. Варто відмітити, що серед досліджених нами генів були і такі, рівень експресії яких

істотно не змінювався за дії одностінних карбонових нанотрубок. Це гени *TRP1*, *AP1S1*, *STXBP6*, *RPL16*, *STXBP6* та *TUBA*, але ми на них не зупиняємося, оскільки істотних змін в їх експресії не було виявлено.

3.2. Дія карбонових нанотрубок на рівень експресії мікроРНК

МікроРНК належать до класу малих ендогенних РНК довжиною 21-25 нуклеотидів (Wahid et al., 2010). Вони відіграють важливу роль у регуляції експресії генів, яка у більшості випадків відбувається в наслідок їх взаємодії з 3'-нетранслюючою областю (3' UTR) цільових мРНК, що викликає деградацію мРНК і репресію трансляції. Крім того, є дані, що вони можуть також взаємодіяти з іншими ділянками, такими як 5'-нетранслююча ділянка (5'-UTR), кодуєча послідовність та промотори генів. Також відомо, що за певних умов мікроРНК можуть активувати трансляцію або регулювати транскрипцію (O'Brien, et al. 2018).

Дані численних досліджень показують, що мікроРНК мають здатність регулювати різні біологічні процеси, включаючи клітинну проліферацію, диференціацію та апоптоз. Крім того, вони відіграють важливу роль у нейрогенезі і розвитку мозку (Yarujakis, 2020).

У попередніх дослідженнях було показано, що у нормальних астроцитах людини одностінні карбонові нанотрубки здійснюють вплив на рівень експресії мікроРНК, які мають сайти зв'язування з мРНК протеїнів, пов'язаних з імунною відповіддю. Під дією SWCNTs у концентрації 10 нг/мл середовища у нормальних астроцитах людини спостерігалось зростання рівня експресії мікроРНК miR-190 та miR-7, що також сприяло зниженню експресії мРНК головного комплексу гістосумісності, клас II, DR альфа (HLA-DRA) та головного комплексу гістосумісності, клас II, DR бета 1 (HLA-DRB1), відповідно (Minchenko et al., 2018).

Це вказує на багатосторонній ефект дії SWCNTs і свідчить про існування різних шляхів впливу карбонових нанотрубок на функціонування геному, окрім

безпосереднього впливу на експресію генів. Зміна в експресії мікроРНК може впливати на пост-транскрипційну регуляцію експресії мРНК, які мають відповідні сайти зв'язування з цими мікроРНК.

У зв'язку з цим, нами були проведені дослідження на нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS по вивченню впливу SWCNTs на рівень експресії мікроРНК miR-19a-3p, miR-27a-3p, miR-144-3p, miR-145-5p та miR-182-5p, які мають сайти зв'язування з послідовностями деяких досліджених нами мРНК.

Дані біоінформаційного аналізу, здійсненого у програмі [TargetScanHuman 8.0](#), яка дозволяє виявити мікроРНК, які можуть зв'язуватися 3'-кінцевими нетранслюючими послідовностями мРНК, показали, що мікроРНК miR-19a-3p має сайти зв'язування з 3'-кінцевими нетранслюючими послідовностями мРНК CLU та IGFBP3, miR-27a-3p з мРНК DNAJB9 і MYBL2, miR-144-3p з мРНК FABP5, IDH2 та MYBL1, miR-145-5p з мРНК IGFBP6, а miR-182-5p з мРНК HIF1AN. Із цих даних видно, що одна мікроРНК може мати спільні сайти зв'язування з більш ніж однією мРНК і таким чином здатна впливати на регуляцію експресії відразу декількох генів (табл. 3.1. А і В).

Таблиця 3.1.А

Сайти зв'язування мікроРНК з мРНК відповідних генів з 3' UTR кінця

Назва мікроРНК	Назва гена	Позиція сайту зв'язування з мРНК від початку 3'-UTR	Передбачуване послідовне сполучення цільової області мРНК (верхня лінія) і мікроРНК (нижня лінія)
miR-19a-3p	CLU	Position 16-22 of CLU 3' UTR hsa-miR-19a-3p	5' ...GAUGUGGAUGUUGCUUUUGCACC... 3' AGUCAAAACGUAUCUAAACGUGU
	IGFBP3	Position 43-50 of IGFBP3 3' UTR hsa-miR-19a-3p	5' ...UCAAAUAUGCCUUAUUUUUGCACA... 3' AGUCAAAACGUAUCUAAACGUGU

Примітки: білим кольором на блакитному тлі безпосередньо виділені сайти зв'язування відповідних мікроРНК з цільовою областю мРНК

Таблиця 3.1.В

Сайти зв'язування мікроРНК з мРНК відповідних генів з 3' UTR кінця

Назва мікроРНК	Назва гена	Позиція сайту зв'язування з мРНК від початку 3'-UTR	Передбачуване послідовне сполучення цільової області мРНК (верхня лінія) і мікроРНК (нижня лінія)
miR-27a-3p	DNAJB9	Position 70-76 of DNAJB9 3' UTR hsa-miR-27a-3p	5' ...AUGC AAACA AUUUUUCUGUGA AAC ... 3' CGCCUUGAAUCGGUGACACUU
	MYBL2	Position 62-68 of MYBL2 3' UTR hsa-miR-27a-3p	5' ...GGGGCAGAGGGGG UCUGUGAAU ... 3' CGCCUUGAAUCGGUGACACUU
miR-96-5p	NAMPT	Position 717-723 of NAMPT 3' UTR hsa-miR-96-5p	5' ...AUUGUACCAGUGAAA UGCCAAA U... 3' UCGUUUUUACACGAUCACGGUUU
miR-144-3p	FABP5	Position 356-363 of FABP5 3' UTR hsa-miR-144-3p	5' ...CUACUCUUACAGGAA-- AUACUGUA ... 3' UCAUGUAGUAGUA UAUGACAU
	IDH2	Position 220-227 of IDH2 3' UTR hsa-miR-144-3p	5' ...GUCAGUAUGUUU UGCAUACUGUA ... 3' UCAUGUAGUAGUA UAUGACAU
	MYBL1	Position 889-896 of MYBL1 3' UTR hsa-miR-144-3p	5' ...AAGAAUACAUAUCU AUACUGUA ... 3' UCAUGUAGUAGUA UAUGACAU
miR-145-5p	IGFBP6	Position 29-35 of IGFBP6 3' UTR hsa-miR-145-5p	5' ...AGGGGCUGCAGGGCC ACUGGAAG ... 3' UCCCUAAGGACCCUUU-- UGACCUG
	TSPAN13	Position 389-395 of TSPAN13 3' UTR hsa-miR-145-5p	5' ...GUGUAGAUAGU UCCUACUGGAAA ... 3' UCCCUAAGGACCCUUU UGACCUG
miR-182-5p	HIF1AN	Position 1630-1637 of HIF1AN 3' UTR hsa-miR-182-5p	5' ...UCUUUUUUUUUUUU UUUGCCAAA ... 3' UCACACUCAAGAUGGUA AACGGUUU

Примітки: білим кольором на блакитному тлі безпосередньо виділені сайти зв'язування відповідних мікроРНК з цільовою областю мРНК

Оцінка впливу SWCNTs на мікроРНК була здійснена лише за їх вищої концентрації. Так, рівень експресії мікроРНК вимірювали за впливу SWCNTs у концентрації 8 нг/мл середовища вирощування нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS протягом 24 годин. Дані кількісної ПЛР показали, що за дії одностінних карбонових нанотрубок спостерігалось суттєве зменшення рівня експресії мікроРНК miR-19a-3p на 35 % і miR-27a-3p на 55 % у нормальних астроцитах людини, відносно контролю (рис. 3.9 А і В). Водночас, рівень експресії мРНК, які мали відповідні сайти зв'язування з цими мікроРНК, а саме *CLU* і *IGFBP3* з miR-19a-3p та *DNAJB9* і *MYBL2* з miR-27a-3p, зростали за цих умов експерименту.

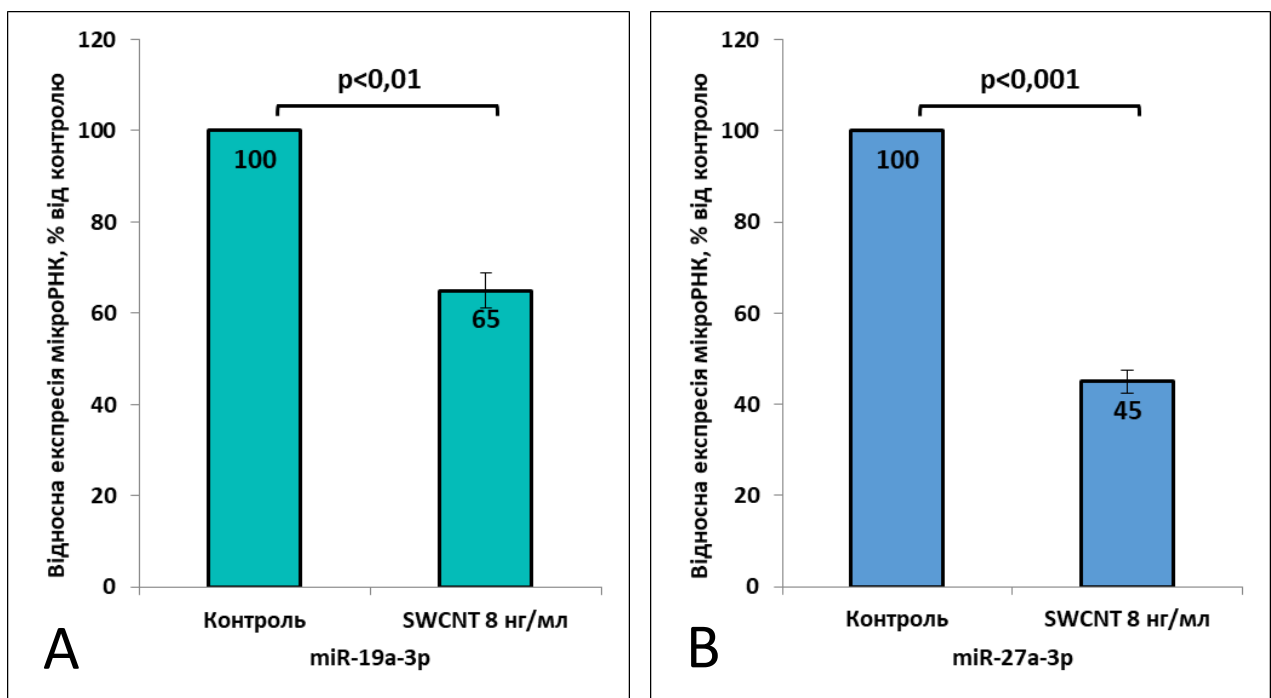


Рис. 3.9. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (8 нг/мл середовища протягом 24 год) на рівень експресії мікроРНК miR-19a-3p (А) та miR-27a-3p (В) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мікроРНК був нормалізований по рівню експресії РНК U6 та виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Водночас, рівень експресії мікроРНК miR-144-3p, miR-145-5p і miR-182-5p підвищувався під впливом SWCNTs при кінцевій їх концентрації у 8 нг/мл середовища у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Так для miR-144-3p зміни експресії склали +38 % відносно контролю, в той час як посилення експресії інших двох мікроРНК було у декілька разів вище контролю і складало +685 % для miR-145-5p та +723 % для miR-182-5p (рис. 3.10 А і В та рис. 3.11). А проте, як і у випадку з мікроРНК miR-19a-3p і miR-27a-3p, для мРНК, які мали відповідні сайти зв'язування з miR-144-3p, miR-145-5p та miR-182-5p, спостерігали протилежний ефект від впливу SWCNTs, а саме пониження рівня експресії їхньої мРНК.

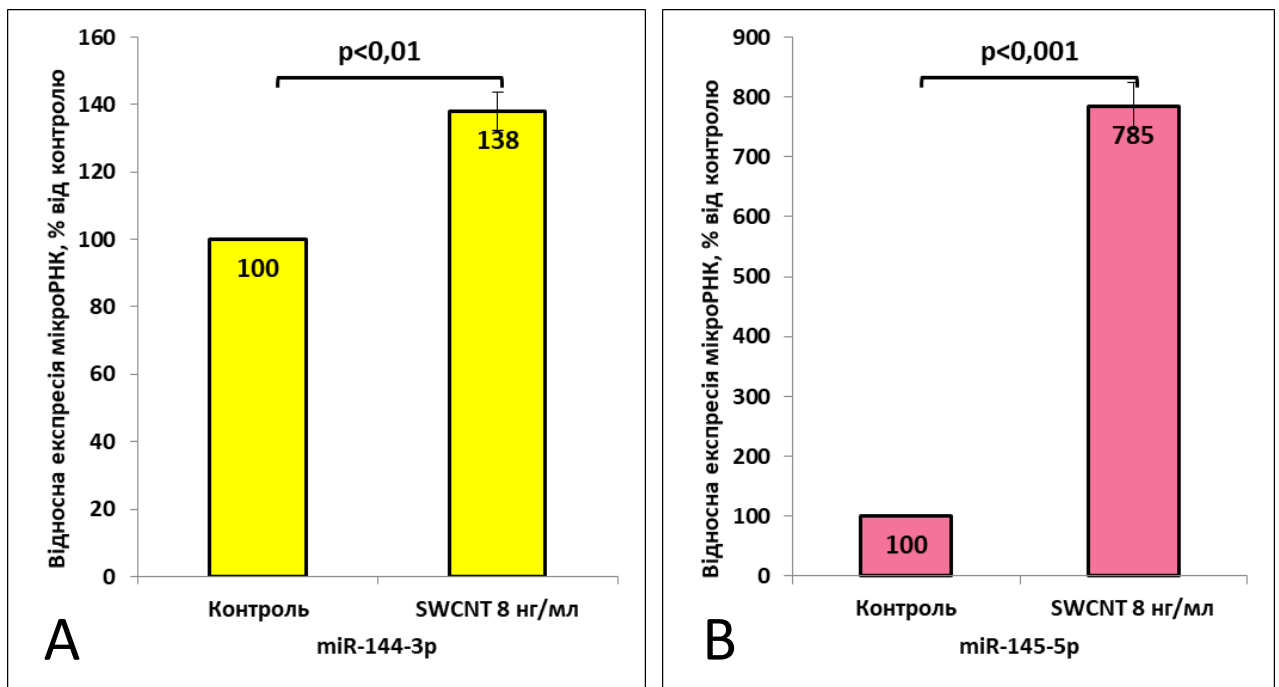


Рис. 3.10. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (8 нг/мл середовища протягом 24 год) на рівень експресії мікроРНК miR-144-3p (А) та miR-145-5p (В) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мікроРНК був нормалізований по рівню експресії РНК U6 виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Ці дані вказують на можливість опосередкованих мікроРНК пост-транскрипційних механізмів регуляції експресії досліджених генів, оскільки

виявлені зміни рівня мікроРНК, негативно корелюють з рівнем експресії відповідних мРНК, що містять специфічні сайти зв'язування для обраних мікроРНК на своїй 3'-UTR послідовності (Rudnytska, 2021).

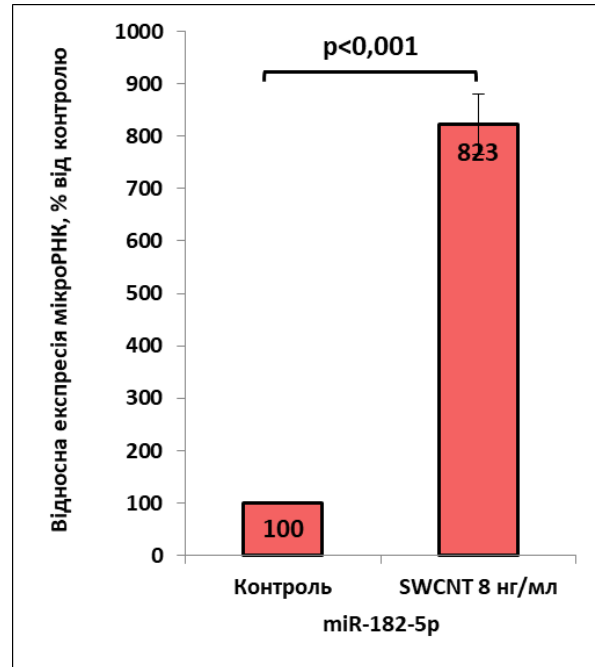


Рис. 3.11. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (8 нг/мл середовища протягом 24 год) на рівень експресії мікроРНК miR-182-5p у клітинах нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мікроРНК був нормалізований по рівню експресії РНК U6 виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Так відмічається зниження рівня мікроРНК, які пов'язані з генами *CLU* і *DNAJB9*, що кодують шаперони, які задіяні в регуляції процесів стресу ER та проліферативними генами *IGFBP3* і *MYBL2*. У той же час, відмічається збільшення рівня експресії мікроРНК, які мають сайти зв'язування мРНК *FABP5*, *IDH2* та *MYBL1*, задіяними у контролі процесів проліферації та виживання клітин. Було виявлено особливо високе зростання рівня експресії мікроРНК, що можуть взаємодіяти з мРНК тих протеїнів, які причетні до регуляції імунної відповіді (*IGFBP6*) і процесів канцерогенезу (*HIF1AN*).

3.3. Порівняння впливу карбонових нанотрубок на рівень експресії генів у нормальних аastroцитах людини та клітинах гліобластоми U87MG

Оскільки, SWCNTs часто розглядають як перспективний агент для застосування у діагностичних і терапевтичних цілях при лікуванні онкологічних захворювань, важливим є дослідження їх можливого впливу не лише на клітини пухлин, так і на здорові клітини.

Як вже було показано раніше, одностінні карбонові нанотрубки здатні проявляти генотоксичний ефект, порушуючи регуляцію експресії багатьох генів, як у нормальних аastroцитах людини, так і клітинах гліоми (Minchenko et al., 2016a), (Minchenko et al., 2018), (Rudnytska et al., 2021). Наразі, точні механізми токсичності карбонових наночастинок залишаються недостатньо вивченими, однак численні дослідження свідчать про можливість залучення сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулула у формування токсичного ефекту цих наночастинок (Boran et al., 2016), (Chen L. et al., 2020), (Simon et al., 2017). Крім того, деякі дослідники відмічають зміну токсичного впливу наночастинок за умов модуляції стресу ендоплазматичного ретикулула певними хімічними речовинами (Simon et al., 2017).

Саме тому нами було обрано декілька генів, які кодують ключові регуляторні протеїни пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулула, такі як протеїн чутливий до 1-го типу раку грудної залози (BRCA1), кластерин (CLU) і член В9 родини протеїнів теплового шоку DnaJ (DNAJB9), з метою з'ясування та порівняння їх чутливості до дії малих доз SWCNTs у нормальних аastroцитах людини лінії NHA/TS, а також у клітинах двох субліній гліобластоми U87 – трансфікованих вектором і домінант-негативною конструкцією ERN1.

Відповідно до даних отриманих за допомогою кількісної ПЛР, рівень експресії мРНК пухлинного супресора BRCA1 у нормальних аastroцитах людини лінії NHA/TS за дії SWCNTs (2 нг/мл та 8 нг/мл середовища вирощування клітин протягом 24 годин) збільшується на 73 % за 2 нг/мл і на 92 % за 8 нг/мл у порівнянні з контролем. У той же час, у трансфікованих порожнім вектором

клітинах гліобластоми лінії U87 (U87-Vector) рівень мРНК BRCA1 підвищується лише на 54 % за концентрації нанотрубок у 8 нг/мл, тоді як доза SWCNTs у 2 нг/мл викликала зовсім невелике підвищення (+16 %) відносно контролю. У клітинах гліоми U87 пригніченою функцією сигнального протеїну ERN1 рівень експресії мРНК BRCA1 істотно не змінювався як за дії 2 нг/мл SWCNTs, так і за більшої їх дози (8 нг/мл) (рис. 3.12).

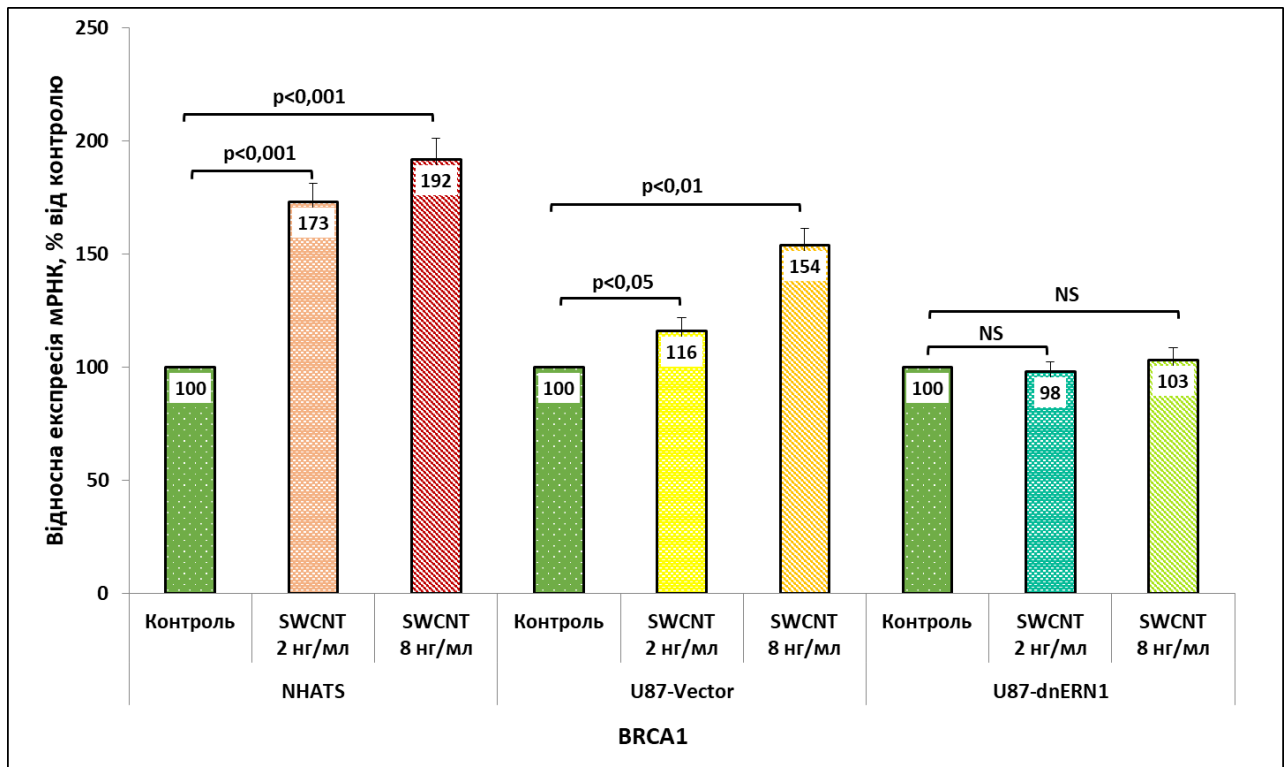


Рис. 3.12. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК BRCA1 у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS, клітинах гліобластоми U87 трансфікованих вектором (U87-Vector) і з домінант-негативною конструкцією ERN1 (U87-dnERN1). Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину та виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Таким чином, значне підвищення рівня експресії мРНК BRCA1 за дії SWCNTs спостерігалось у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за обох доз цих наночастинок, але зі збільшенням дози ефект від дії був більш виражений. У той же час, у клітинах гліобластоми лінії U87 трансфікованих

вектором підвищення рівня експресії мРНК *BRCA1* також було виявлено, але воно було значно меншим за дії як меншої, так і більшої дози SWCNTs, що мабуть обумовлено наявністю полі-резистентності у клітинах гліобластоми обумовленої стресом EP (Minchenko et al., 2021). Пригнічення функції ERN1 у клітинах гліобластоми U87 з домінант-негативною конструкцією ERN1, повністю нівелювало вплив обох доз SWCNTs, що вказує на причетність ERN1 сигнального шляху стресу EP у регуляції експресії гена *BRCA1* у клітинах гліобластоми.

На відміну від рівня експресії мРНК *BRCA1*, зміни в експресії мРНК *CLU* у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS, за дії на них одностінних карбонових нанотрубок, мали дещо інший характер. Так, найбільш суттєве підвищення рівня експресії мРНК *CLU* було виявлено за дії цих наночастинок у концентрації 8 нг/мл середовища (+94 %), в той час, як менша доза (2 нг/мл) викликала значно менше підвищення (+45 %) відносно контролю. Водночас, у клітинах гліобластоми лінії U87 за дії на них карбонових нанотрубок відмічалось пригнічення експресії цієї мРНК як за меншої, так і більшої їх концентрації: -28 % за дії 2 нг/мл та на -41 % за дії 8 нг/мл відносно контролю. Більше того, у клітинах гліобластоми U87 з домінант-негативною конструкцією ERN1, за дії на них одностінних карбонових нанотрубок як у меншій (2 нг/мл), так і більшій дозі (8 нг/мл) спостерігалось суттєве зниження рівня експресії мРНК кластерину відповідно на 37 % та 40 % у порівнянні з контрольними клітинами (рис. 3.13). Можна припустити, що у даному випадку зниження рівня експресії мРНК кластерину у клітинах гліобластоми у порівнянні з нормальними клітинами є результатом перепрограмування геному опосередкованого стресом EP, причому переважно іншими сигнальними шляхами цього стресу.

Отже, підвищення рівня експресії мРНК *CLU* за дії SWCNTs відмічалось тільки у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS, водночас істотно залежало від дози цих наночастинок. Воно було майже у два рази більшим за концентрації у 8 нг/мл порівняно з нижчою концентрацією (2 нг/мл).

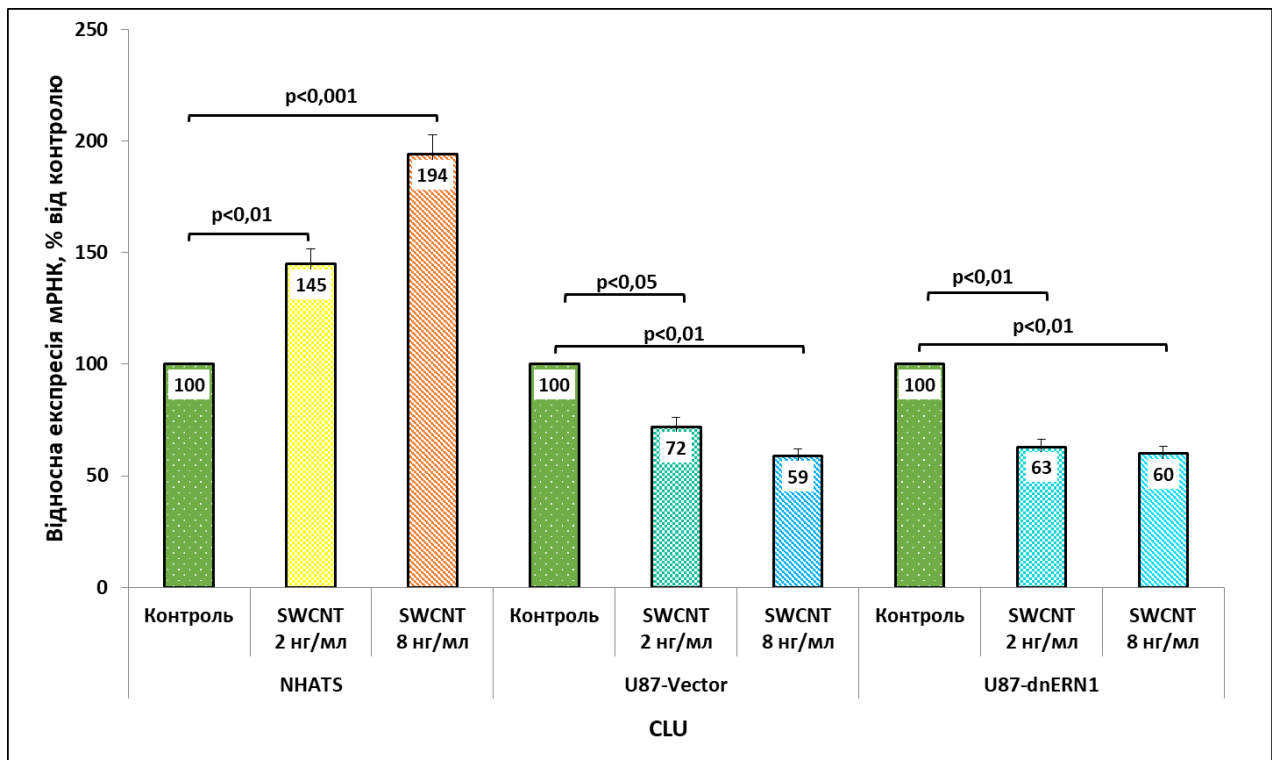


Рис. 3.13. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК CLU у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS, клітинах гліобластоми U87 трансфікованих вектором (U87-Vector) і з домінант-негативною конструкцією ERN1 (U87-dnERN1). Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину та виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Вплив SWCNTs на рівень експресії мРНК шаперону DNAJB9 був схожий до їх впливу рівень експресії мРНК BRCA1. Рівень експресії мРНК DNAJB9 у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS виражено збільшувався як за дії одностінних карбонових нанотрубок у концентрації 2 нг/мл (+102 %), так і за більшої дози цих наночастинок (8 нг/мл; +160 %) відносно контролю (рис. 3.14).

У той же час, у клітинах гліобластоми U87-Vector за дії на них одностінних карбонових нанотрубок рівень експресії мРНК DNAJB9 зростає меншою мірою. Так під впливом меншої дози цих карбонових нанотрубок (2 нг/мл) рівень експресії мРНК DNAJB9 збільшується лише на 55 %, а за більшої дози (8 нг/мл) – на 96 %. Значно менші, проте статистично достовірні зміни рівня експресії мРНК DNAJB9 були виявлені у клітинах гліобластоми із пригніченою функцією

ERN1 лише за дії одностінних карбонових нанотрубок у концентрації 8 нг/мл (-17 %; рис. 3.14). Водночас, одностінні карбонові нанотрубки у меншій дозі (2 нг/мл) істотно не впливали на експресію гена *DNAJB9* у клітинах гліобластоми із пригніченою функцією ERN1.

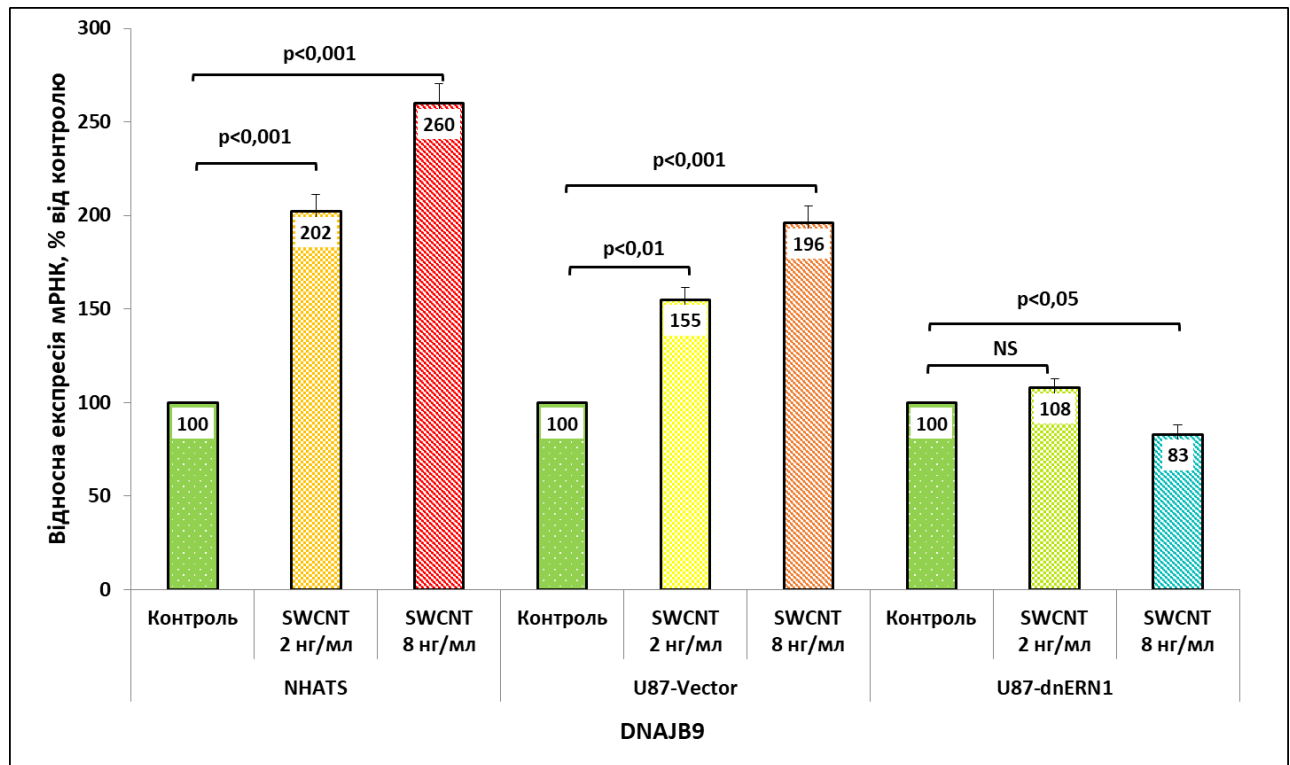


Рис. 3.14. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК *DNAJB9* у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS, клітинах гліобластоми U87 трансфікованих вектором (U87-Vector) і з домінант-негативною конструкцією ERN1 (U87-dnERN1). Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину та виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Таким чином підвищення рівня експресії мРНК *DNAJB9* за дії SWCNTs спостерігалось у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS, так і у клітинах гліобластоми лінії U87, але реакція клітин гліобластоми була істотно меншою порівняно з нормальними клітинами людини, що ймовірно обумовлено полірезистентністю клітин гліоми. У той же час, у клітинах гліобластоми лінії U87 з пригніченою функцією ERN1 індуктивний ефект SWCNTs майже повністю

знімався, що вказує на причетність ERN1 сигнального шляху стресу ER на регуляцію експресії гена *DNAJB9*.

Отже, найбільш схожі картини впливу одностінних карбонових нанотрубок відмічаються для рівня експресії мРНК фосфопротеїну BRCA1, що відіграє важливу роль у підтриманні стабільності геному і діє як пухлинний супресор та шаперону DNAJB9, що індукується стресом ендоплазматичного ретикулума. В обох випадках пригнічення функції ERN1 знімає ефект від дії SWCNTs на експресію генів *BRCA1* та *DNAJB9* у клітинах гліобластоми, як за концентрації 2 нг/мл, так і 8 нг/мл. В клітинах же астроцитів спостерігаються підвищення рівня експресії мРНК майже вдвічі та у понад 2 рази для *BRCA1* та *DNAJB9* відповідно. Дані ПЛР аналізу експресії гена кластерину показують, що у клітинах обох субліній гліобластоми за дії SWCNTs спостерігається значне зниження рівня експресії мРНК, у той час як у нормальних астроцитах людини, так само як і для інших генів, спостерігали дозозалежне посилення експресії даного гена.

3.4. Дія карбонових нанотрубок на рівень мікроРНК в ембріонах *Danio rerio*

Рибка *Danio rerio* розглядається сьогодні як одна з найбільш потужних моделей для вивчення процесів розвитку, нейробіології та генетики людини, а також для поглиблення розуміння молекулярних основ хвороб людини у різноманітних біомедичних дослідженнях (Sullivan et al., 2008) (Bradford et al., 2017). Зокрема, *Danio rerio* активно використовують для дослідження різноманітних порушень нейророзвитку (D'Amora et al., 2023), (Tayanloo-Beik et al., 2022), (Otsuka, et al., 2023).

Слід зазначити, що вивчення різноманітних захворювань стає можливим завдяки аналізу великомасштабних генетичних скринінгів, що дають змогу виявляти сотні мутантних фенотипів, багато з яких є схожими до тих, що виявляються при дослідженні клінічних розладів людини. Одними з очевидних переваг використання *Danio rerio* як модельного об'єкта, окрім економічності, є

зовнішній розвиток та оптична чіткість під час ембріогенезу, що дозволяють проводити візуальних аналіз процесів раннього розвитку, а також висока плодючість і короткий час до народження наступних поколінь, які суттєво полегшують і пришвидшують генетичний аналіз (Dooley et al., 2000). Рибку *Danio rerio* також розглядають як успішний об'єкт для використання з метою ідентифікації нових генів та визначення функцій генів, що стануть корисними для пізнання патофізіології людини (Ward et al., 2002).

МікроРНК відіграють важливу роль у цереброваскулярному розвитку, діючи як універсальні регулятори розвитку мозку та його функцій, зокрема беруть участь у розвитку нейронних ліній і детермінації субтипів, нейрогенезі, утворенні та пластичності синапсів, регуляції проліферації і диференціації нейронних стовбурових клітин, а також залучені у нейропротекцію, відновлення та виживання нейронів за церебральної ішемії/реперфузії, ішемічних інсультів і внутрішньомозкових виливів (Ma Q. et al., 2019), (Ma Z. et al., 2023). Дані досліджень показують, що порушення регуляції мікроРНК у нервовій тканині здатні викликати вади розвитку мозку, а також можуть призводити до нейродегенеративних захворювань (Feng, et al., 2011), (Gizak, 2020).

Дані *in silico* показали, що висококонсервативні мікроРНК можна розглядати як потенційні регуляторні фактори у реакціях організму на наночастинки, а також в якості нанотоксичних біомаркерів в дослідженнях з використанням *Danio rerio* як модельного організму (Hu et al., 2019).

Саме тому, для з'ясування впливу карбонових наночастинок, зокрема внеску часу їх експозиції, на цереброваскулярний розвиток нами було здійснено дослідження впливу малих доз SWCNTs на рівень експресії мікроРНК пов'язаних з метаболізмом, проліферацією клітин і нейрогенезом у ембріонах *Danio rerio*. Для цього були відібрані мікроРНК, які відіграють важливу роль у контролі клітинної проліферації та нейрогенезі: miR-143-3p, miR-145-5p, miR-182-5p і miR-206-5p (Minchenko et al., 2022).

Дані кількісної ПЛР показали, що за малих доз SWCNTs (діаметр 1-2 нм) у 2 і 8 нг/мл середовища, в якому вирощувалися ембріони *Danio rerio*, як протягом

24 годин, так і 72 годин спостерігається пригнічення експресії всіх досліджених мікроРНК.

Зокрема, рівень експресії мікроРНК miR-143-3p за дії 2 нг/мл знижуються на 31,5 %, а за дії 8 нг/мл на 75 % протягом 24 годин, відносно контролю. В той же час, через 72 години інкубування ембріонів *Danio rerio* з нанотрубками відбувалося майже повне пригнічення експресії miR-143-3p за обох концентрацій нанотрубок. Так спостерігалось зниження на 98 % та 99,2 %, відповідно, під впливом SWCNTs за концентрації 2 нг/мл і 8 нг/мл у поживному середовищі, у порівнянні зі значеннями експресії цієї мікроРНК у групі контрольних ембріонів. Як бачимо чіткий дозозалежний ефект проявлявся лише на першу добу інкубації, тоді як на третю добу він відійшов на задній план, поступившись ефекту залежного від часу (тривалості дії) (рис. 3.15).

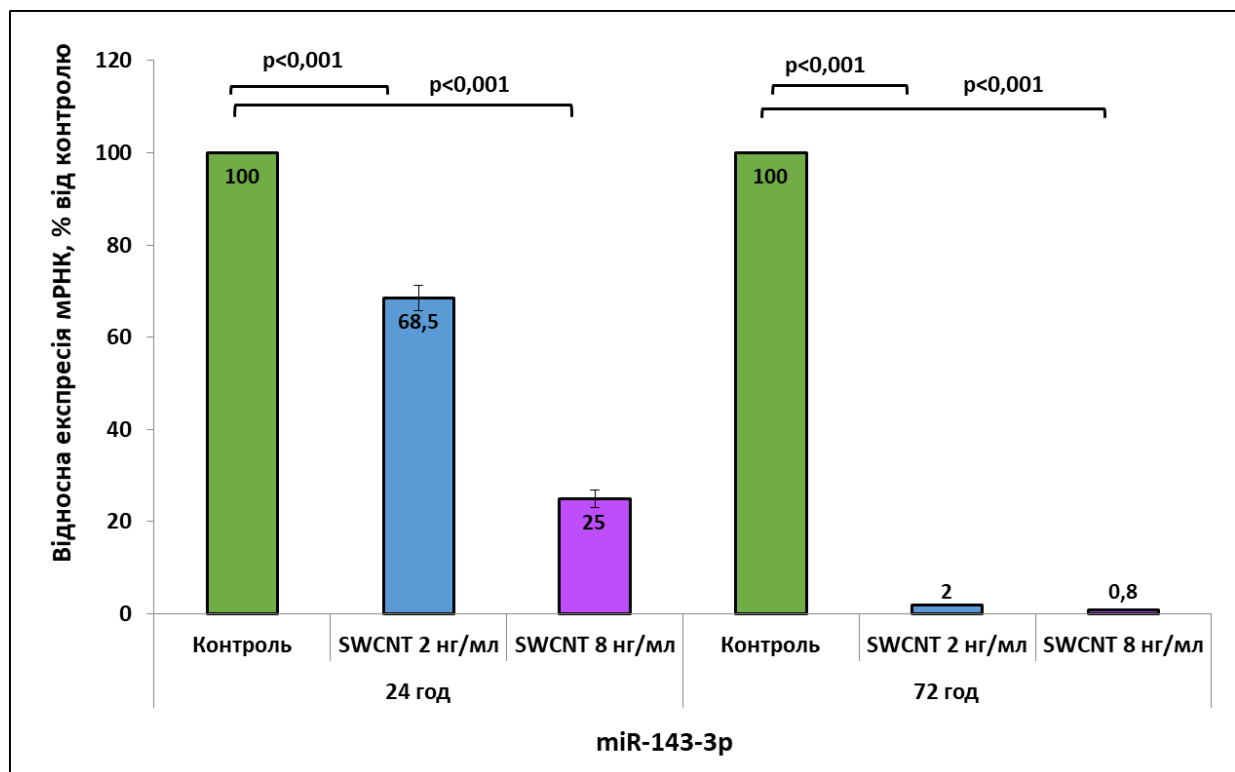


Рис. 3.15. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл) на рівень експресії мікроРНК miR-143-3p протягом 24 та 72 годин в ембріонах риби *Danio rerio* у порівнянні з контролем. Рівень експресії досліджених мікроРНК був нормалізований по рівню експресії РНК U6 виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=3$.

Протилежний ефект від дії SWCNTs був виявлений протягом 24 і 72 годин та відмічається на рівень експресії мікроРНК miR-145-5p у ембріонах риби *Danio rerio*. Так, після 24 годин спостерігалось дозозалежне зниження рівня експресії мікроРНК miR-145-5p на 13 % за концентрації 2 нг/мл і на 73 % за 8 нг/мл у клітинах ембріонів рибок *Danio rerio*, порівнянні з контролем. В той же час, тривалість дії наночастинок практично не впливала на рівень експресії мікроРНК у клітинах *Danio rerio*. Як видно на рисунку 3.16, через 72 години за концентрації SWCNTs 2 нг/мл зниження рівня експресії мікроРНК miR-145-5p складає 18 %, а за 8 нг/мл – 80 %, у порівнянні з контролем. Ефект пригнічення експресії miR-145-5p у клітинах ембріонів риби *Danio rerio* за дії 2 нг/мл SWCNTs протягом 24 і 72 годин є найменшим серед усіх досліджених мікроРНК, а різниця між значеннями рівня експресії мікроРНК знаходяться в межах статистичної похибки. Що ж стосовно ефекту пригнічення експресії мікроРНК miR-145-5p від дії одностінних карбонових нанотрубок у концентрації 8 нг/мл, то він хоч і є суттєво більшим, в середньому на 60 % порівняно із значеннями експресії даної мікроРНК у клітинах ембріонів за впливу меншої дози, але різниця між значеннями рівня експресії miR-145 через 24 та 72 години також є незначною – всього 7 % (рис. 3.16).

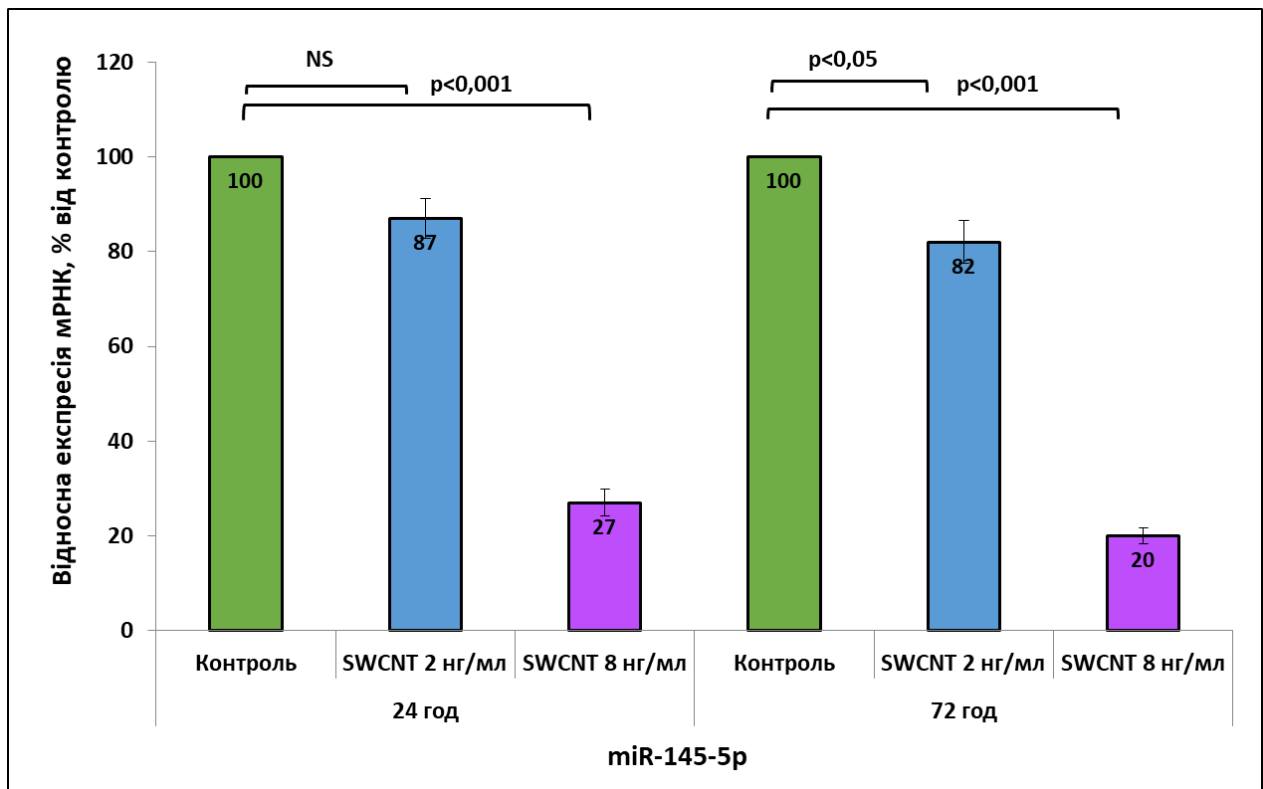


Рис. 3.16. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл) на рівень експресії мікроРНК miR-145-5p протягом 24 та 72 годин в ембріонах рибки *Danio rerio* у порівнянні з контролем. Рівень експресії досліджених мікроРНК був нормалізований по рівню експресії РНК U6 і виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=3$.

За дії SWCNTs на ембріони рибки *Danio rerio* зміни в експресії мікроРНК miR-182-5p істотно змінювалися залежно від дози наночастинок і тривалості їх дії. Через 24 години після додавання нанотрубок до кінцевої концентрації 2 нг/мл у середовище з ембріонами рівень експресії miR-182-5p знижувався на 15 %, а за більшої дози (8 нг/мл) – на 51 % від контролю. Через 72 години рівень експресії miR-182-5p знижувався на 70 % за дії SWCNTs у дозі 2 нг/мл, а за більшої дози (8 нг/мл) рівень експресії знижувався ще більше (-95 %; рис. 3.17).

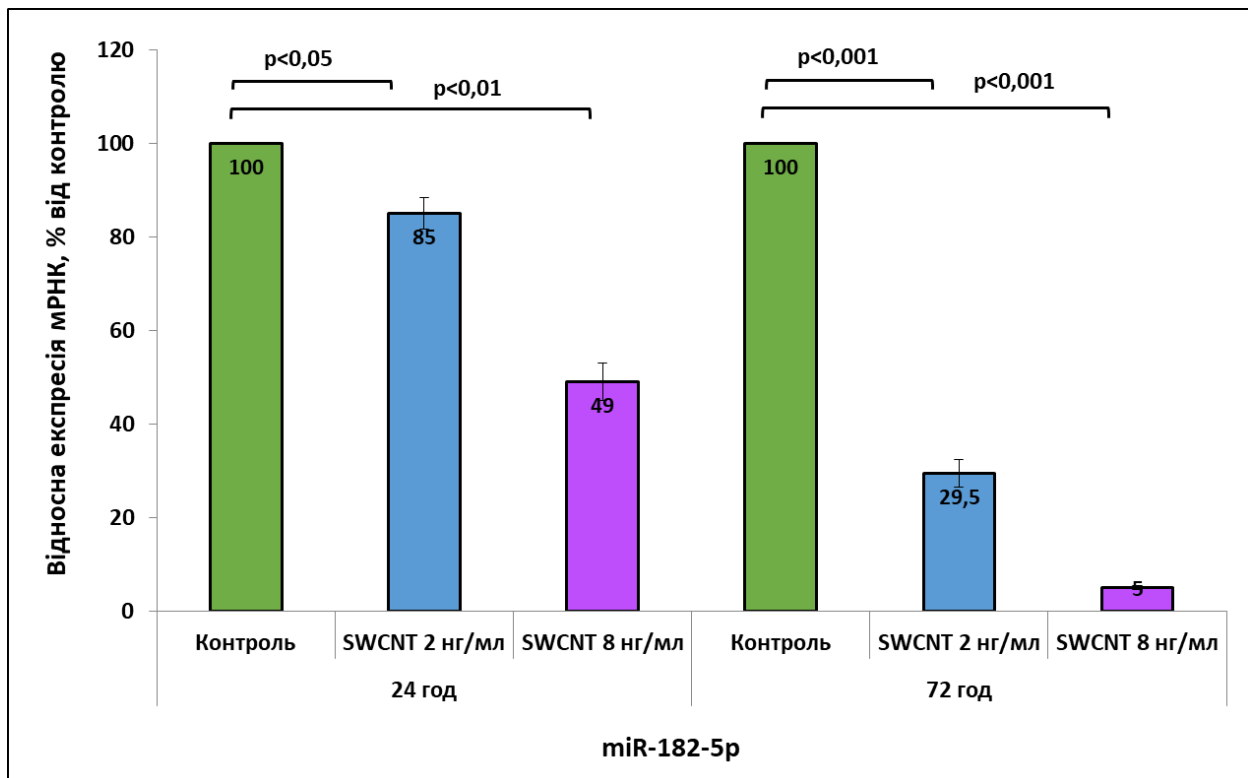


Рис. 3.17. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл) на рівень експресії мікроРНК miR-182-5p протягом 24 та 72 годин в ембріонах риби *Danio rerio* у порівнянні з контролем. Рівень експресії досліджених мікроРНК був нормалізований по рівню експресії РНК U6 та виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=3$.

Рівень експресії мікроРНК miR-206-5p за дії SWCNTs на ембріони риби *Danio rerio* також знижувався в залежності від концентрації наночастинок та часу їх дії. За дії наночастинок на ембріони риби протягом 24 годин у концентрації в 2 нг/мл спостерігалось зниження рівня miR-206 на 33 %, а в концентрації 8 нг/мл на 62 % у порівнянні з контролем. Суттєво більший ефект на рівень експресії мікроРНК miR-206-5p спостерігався після 72-годинної дії карбонових нанотрубок на ембріони: за дії 2 нг/мл нанотрубок рівень експресії цієї мікроРНК знижувався на 66 %, а за дії більшої дози (8 нг/мл) на 79 % у порівнянні з контролем (рис. 3.18). Як і у випадку з іншими мікроРНК, найбільший ефект пригнічення експресії проявляється через 3 доби впливу SWCNTs на ембріони риби *Danio rerio* і за більшої концентрації нанотрубок.

Рівень експресії мікроРНК miR-206-5p у клітинах ембріонів рибок за дії карбонових нанотрубок у дозі 2 нг/мл знижувався через 24 години на 33 %, а через 72 години на 66 %. Більша доза карбонових нанотрубок (8 нг/мл) викликала і більш виражені зміни в експресії мікроРНК miR-206-5p: рівень експресії цієї мікроРНК знижувався через 24 години на 62 %, а через 72 години на 79 %.

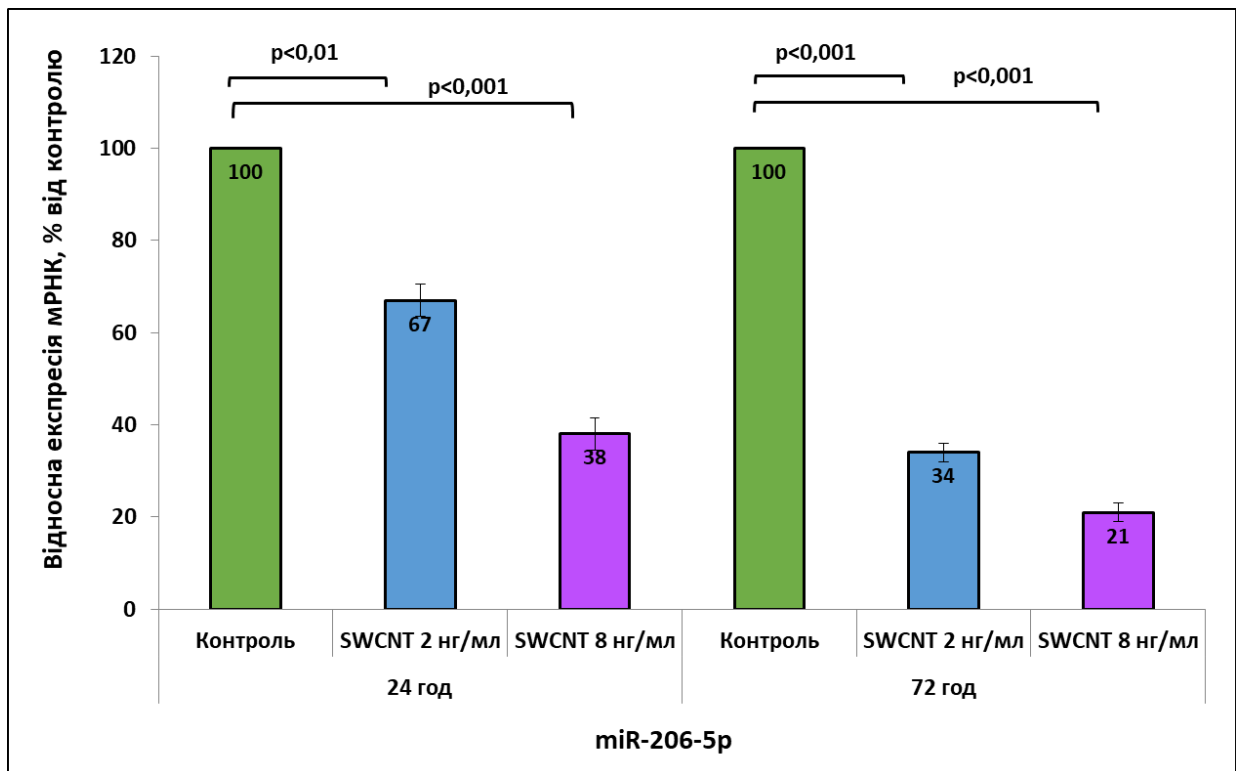


Рис. 3.18. Вплив одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл) на рівень експресії мікроРНК miR-206-5p протягом 24 та 72 годин в ембріонах рибки *Danio rerio* у порівнянні з контролем. Рівень експресії досліджених мікроРНК був нормалізований по рівню експресії РНК U6 виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=3$.

Отже, за дії на ембріони *Danio rerio* одностінних карбонових нанотрубок діаметром 1-2 нм спостерігається суттєве зниження рівня експресії всіх досліджених нами мікроРНК, які пов'язані з метаболізмом, проліферацією клітин і нейрогенезом. Ефект цих карбонових нанотрубок на експресію мікроРНК залежав від їх дози та тривалості дії.

Зниження рівня експресії життєво важливих мікроРНК під впливом одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 нг/мл води) співпадає з порушенням ембріонального розвитку рибок *Danio rerio*, що було зроблено і задокументовано на мікрофотографіях за допомогою інверсійного мікроскопа, обладнаного цифровою камерою. Із даних, наведених на рисунку 3.19, видно, що після 72-годинної дії карбонових нанотрубок на ембріони виявляються значні та дозозалежні вади розвитку мозку.

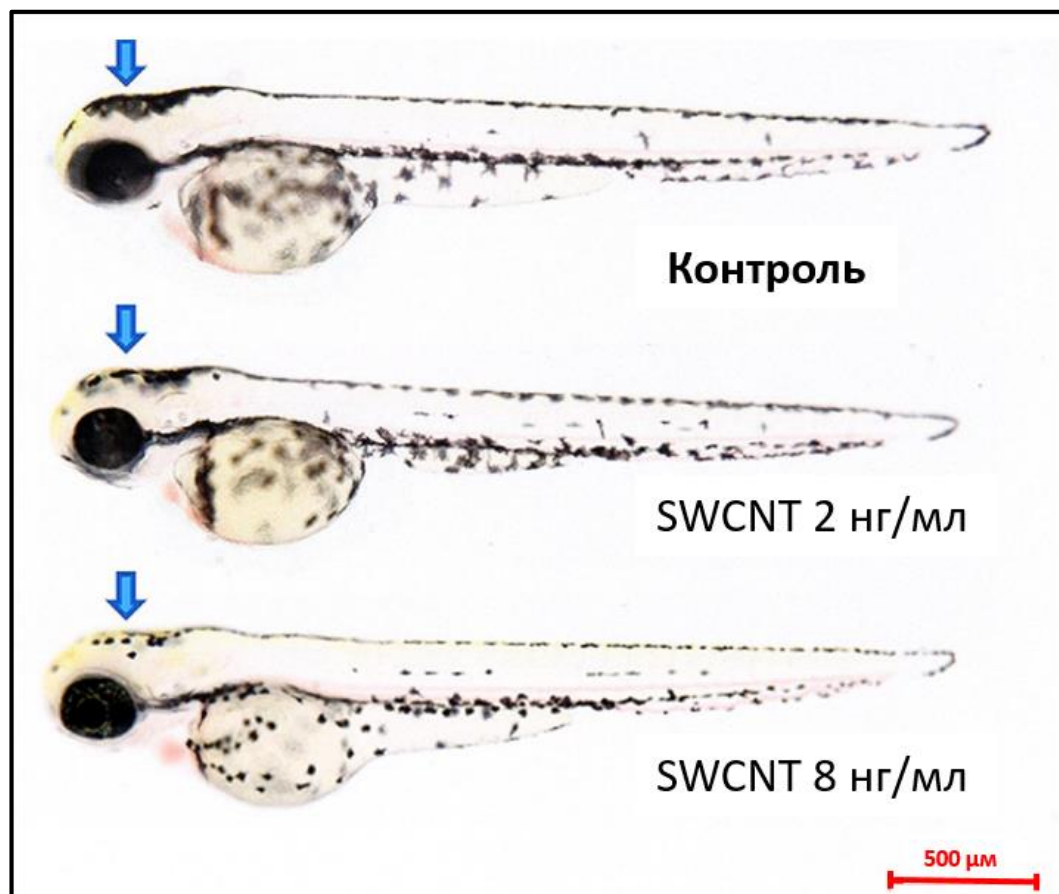


Рис. 3.19. Дозозалежний вплив карбонових нанотрубок (SWCNTs, 2 і 8 нг/мг середовища протягом 72 годин) на формування центральної нервової системи, у порівнянні з контролем в ембріонах *Danio rerio*. Стрілками показані мальформації у розвитку мозку, викликані дією цих одностінних нанотрубок у порівнянні з контролем.

Так, негативний вплив одностінних карбонових нанотрубок проявлявся не лише на експресії важливих регуляторних мікроРНК, а і на ембріональному

розвитку, зокрема на формуванні нервової системи, що чітко підтверджується наявністю мальформацій – дефектів розвитку, які візуально спостерігалися при аналізі мікрофотографій ембріонів рибок *Danio rerio* після вирощування їх за різних концентрацій наночастинок у середовищі протягом 72 годин. Даний ефект залежав від отриманої дози нанотрубок, оскільки більші порушення розвитку мозку були виявлені при їх концентрації 8 нг/мл, у той час за 2 нг/мл менш вираженими. Ці зміни свідчать, що нейротоксичний ефект SWCNTs проявляється вже на ранніх стадіях ембріонального розвитку центральної нервової системи.

3.5. Вплив оксиду графену на рівень експресії генів, що контролюють проліферацію та виживання в клітині

Оксид графену, як окислена похідна графену, завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям вважається одним з перспективних наноматеріалів для застосування у біомедичній сфері. Він розглядається як потенційний агент для доставки ліків, діагностики та лікуванні онкологічних захворювань (Cellot et al., 2022), (Cui et al., 2021), (Dash et al., 2021), (Ozkan-Ariksoysal D, 2022). Однак використання оксиду графену, як і одностінних карбонових нанотрубок, потребує розуміння молекулярних механізмів їх впливу на нормальні клітини, а особливо генотоксичність даних наночастинок.

З метою вивчення молекулярних механізмів дії оксиду графену на геном і з'ясування його негативних ефектів нами були проведені дослідження впливу цих карбонових наночастинок на рівень експресії ключових генів, які кодують важливі регуляторні протеїни та ензими, що пов'язані з контролем метаболізму і проліферацією клітин у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Наша увага була зосереджена на таких генах: *BCAR3* (протеїн 3 раку грудної залози, стійкий до антиестрогену), *BRCA1* (протеїн, чутливий до 1-го типу раку грудної залози), *IGFBP3* (протеїн 3, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту), *IGFBP6* (протеїн 6, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту), *MYBL1* (протеїн 1,

подібний до протоонкогена MYB), *MYBL2* (протеїн 2, подібний до протоонкогена MYB), *NAMPT* (нікотинамід фосфорибозилтрансфераза) і *TSPAN13* (тетраспанін 13).

Проведені дослідження показали, що під впливом малих доз оксиду графену уже через 24 години істотно порушується експресія всіх обраних нами генів у нормальних астроцитах людини. Так, 24-годинна експозиція нормальних астроцитів людини з оксидом графену за концентрації 1 нг/мл середовища викликає суттєве зниження (-49 %) рівня експресії мРНК адапторного протеїну BCAR3, що регулює проліферацію та міграцію пухлинних клітин (рис. 3.20 А і В).

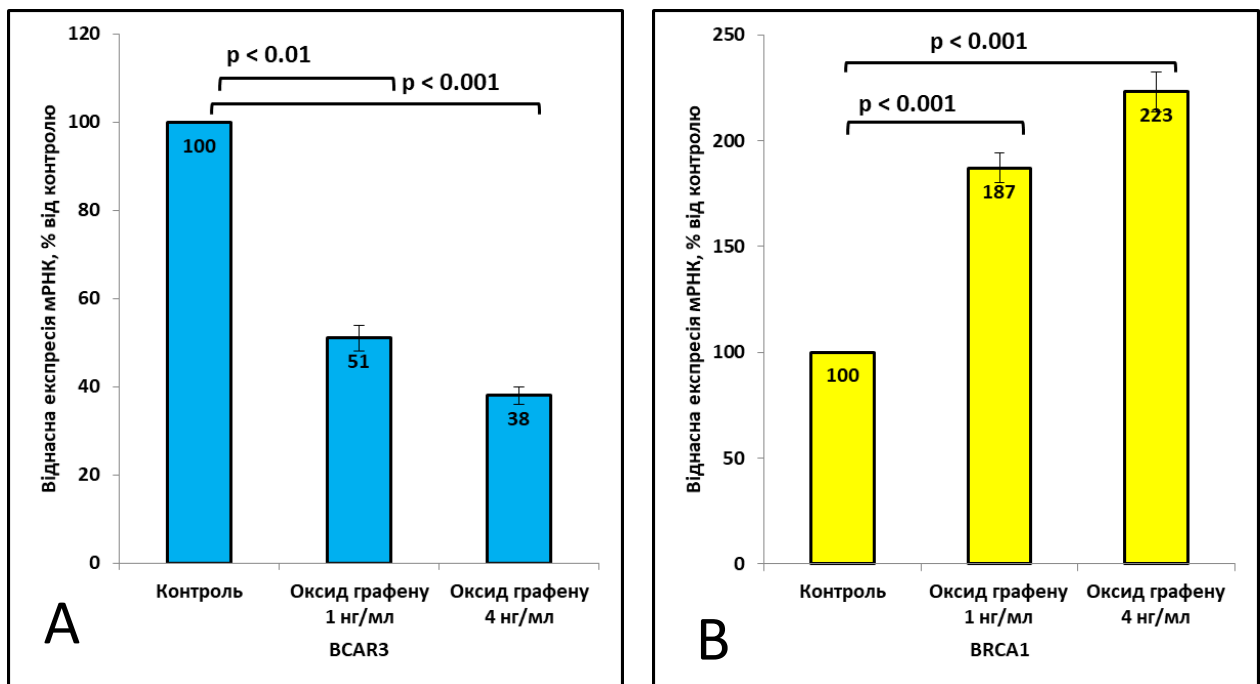


Рис. 3.20. Вплив оксиду графену (1 і 4 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК BCAR3 (А) та BRCA1 (В) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину та виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Більша доза цих карбонових наночастинок (4 нг/мл) за цей же проміжок часу ще більше знижувала (-62 %) рівень експресії цього гена у порівнянні з

контролем. У той же час, такі ж самі концентрації оксиду графену викликають суттєве підвищення рівня експресії мРНК пухлинного супресора BRCA1, залученого у підтримання стабільності геному, у клітинах лінії NHA/TS. Так, за концентрації оксиду графену в 1 нг/мл рівень експресії мРНК BRCA1 збільшувався на 87 %, а за вищої концентрації (4 нг/мл) – більш, ніж удвічі, у порівнянні з контролем (+123 %) (рис. 3.20 А і В).

За дії оксиду графену на нормальні астроцити людини було виявлено різнонаправлений вплив на експресію генів, що кодують інсуліноподібні фактори росту IGFBR3 та IGFBR6. У випадку з геном *IGFBR3* оксид графену в дозі 1 нг/мл підвищував рівень експресії мРНК на 54 %, а більша доза (4 нг/мл) спричиняла і більш виражені зміни (+89 %) в експресії цього гена. Разом з тим, рівень експресії гена IGFBR6, навпаки, знижувався за дії на нормальні астроцити людини оксиду графену як у дозі 1 нг/мл (-64 %), так і за більшої його дози (4 нг/мл) (-86 %) відносно контролю (рис. 3.21 А і В).

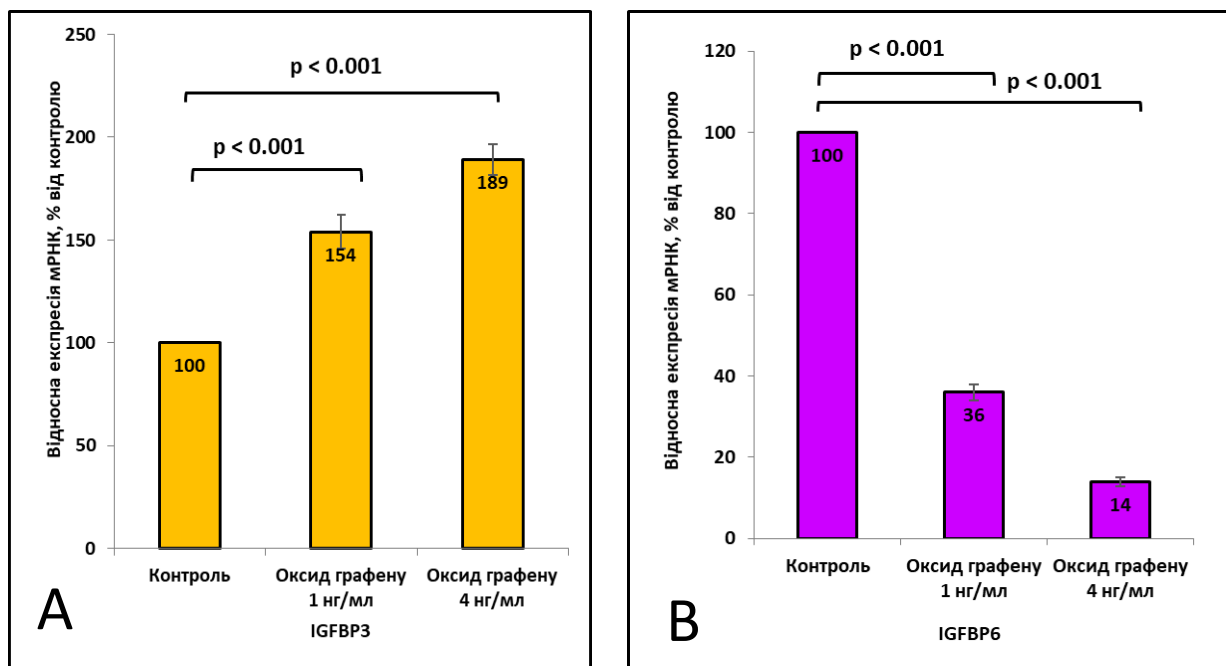


Рис. 3.21. Вплив оксиду графену (1 і 4 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК IGFBR3 (А) та IGFBR6 (В) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину та виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Суттєвий вплив оксиду графену був виявлений при дослідженні рівня експресії мРНК MYBL1 і MYBL2, що належать до родини транскрипційних факторів та контролюють прогресію клітинного циклу, диференціацію і виживання клітин. Встановлено, що у нормальних астроцитах людини лінії ННА/TS суттєво підвищується рівень експресії мРНК обох цих генів. Так, за дії 1 нг/мл оксиду графену рівень експресії мРНК MYBL1 зростав на 58 %, а за дози в 4 нг/мл зміни в експресії цього гена були ще більші (+74 %), порівняно з контролем. Посилення експресії MYBL2 у клітинах лінії ННА/TS за дії оксиду графену є більшим у порівнянні з MYBL1: концентрація в 1 нг/мл цих карбонових наночастинок збільшувала рівень мРНК MYBL2 на 90 %, а у 4 нг/мл – на 115 % у порівнянні з контролем (рис. 3.22).

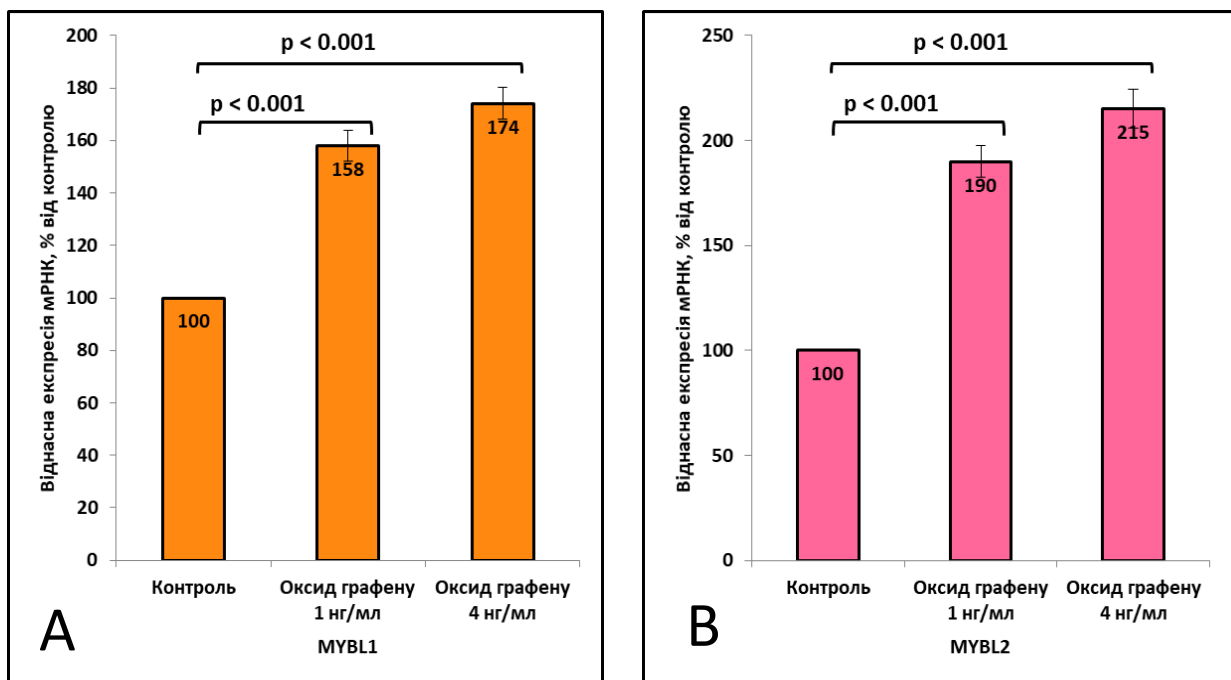


Рис. 3.22. Вплив оксиду графену (1 і 4 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК MYBL1 (A) та MYBL2 (B) у нормальних астроцитах людини лінії ННА/TS. Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину та виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

У той же час, дія оксиду графену на нормальні астроцити людини протягом 24 годин спричинює зниження рівня експресії мРНК *NAMPT* та *TSPAN13*. Більш сильне пригнічення показано для *NAMPT*, 1 нг/мл оксид графену знижує рівень експресії цієї мРНК на 58 %, а 4 нг/мл – на 71 % у порівнянні з контролем (рис. 3.23 А). Зміни в експресії гена *TSPAN13* є дещо меншими, але також залежали від дози цих карбонових наночастинок: за їх дії в дозі 1 нг/мл рівень експресії мРНК *TSPAN13* знижуються на 37 %, а за дії більшої дози в 4 нг/мл – на 53 % відносно контролю (рис. 3.23 В).

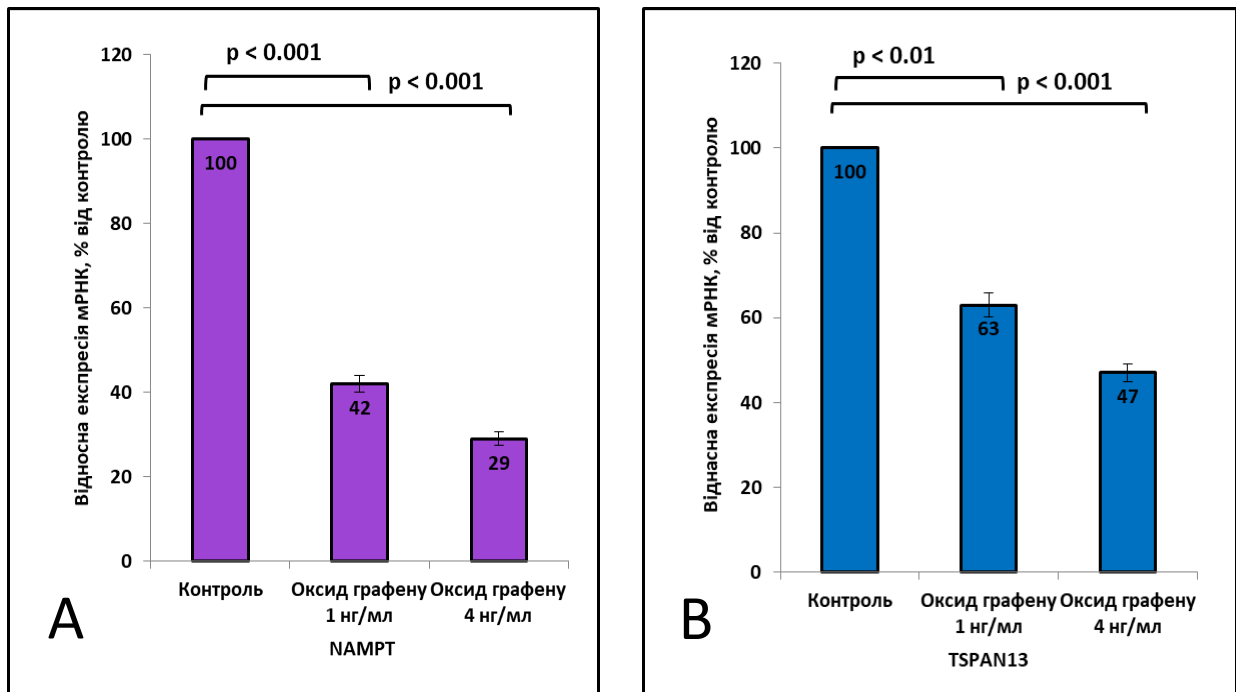


Рис. 3.23. Вплив оксиду графену (1 і 4 нг/мл протягом 24 год) на рівень експресії мРНК *NAMPT* (А) та *TSPAN13* (В) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мРНК був нормалізований по рівню експресії мРНК бета-актину та виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Виявлені нами зміни в експресії генів *NAMPT* та *TSPAN13*, можливо зумовлені як транскрипційними, так і пост-транскрипційними механізмами,

оскільки під впливом оксиду графену змінюється експресія і мікроРНК, які мають відповідні сайти зв'язування з мРНК NAMPT та TSPAN13, що було виявлено за допомогою біоінформаційного аналізу. Встановлено, що мРНК NAMPT має на своєму 3'-UTR кінці цільову ділянку для miR-96a-5p, а мРНК TSPAN13 – для miR-145-5p (табл. 3.1). Аналіз експресії цих мікроРНК у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS показав, що за впливу низьких концентрацій оксиду графену протягом 24 годин має місце значне і дозозалежне посилення експресії обох цих мікроРНК: miR-96a-5p та miR-145-5p. Так, рівень експресії мікроРНК miR-96a-5p підвищувався на 45 і 98 %, відповідно для меншої та більшої дози оксиду графену (рис. 3.24 А і В). Більш виражені зміни були виявлені для мікроРНК miR-145-5p: під впливом 1 нг/мл цих карбонових наночастинок рівень експресії цієї мікроРНК підвищувався на +56 %, а за дії 4 нг/мл аж на +161 % у порівнянні з контрольними клітинами.

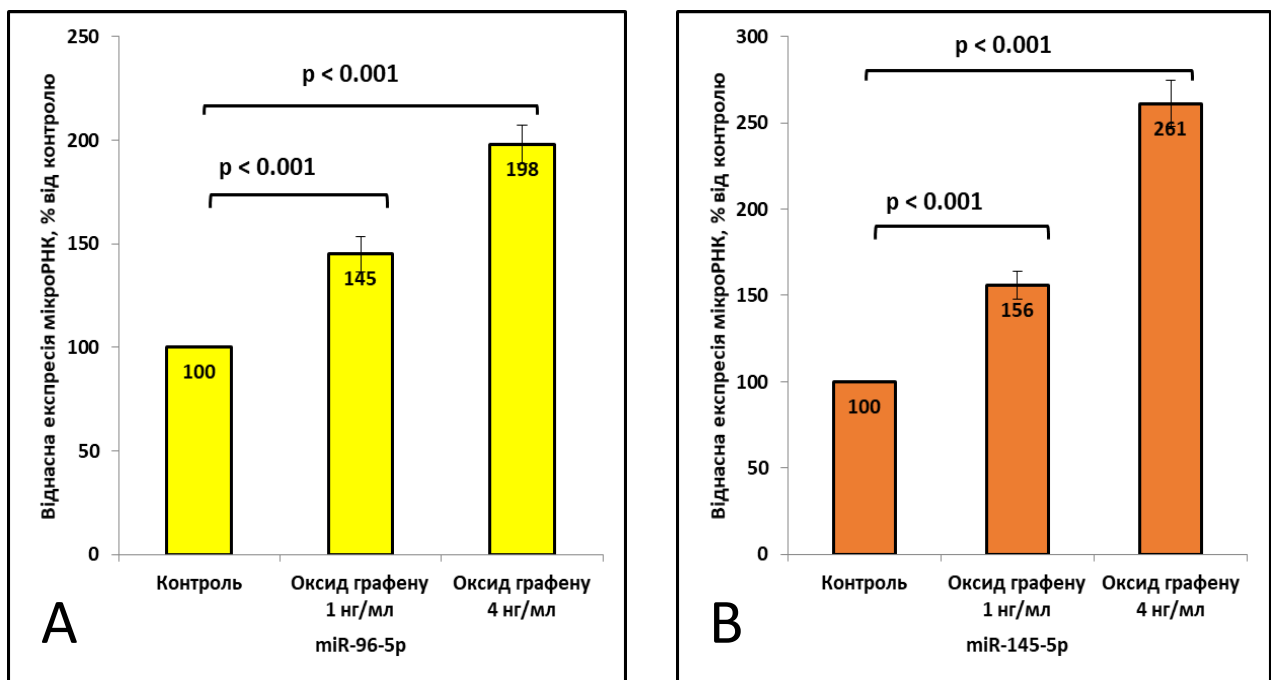


Рис. 3.24. Вплив оксиду графену (1 нг/мл і 4 нг/мл середовища) протягом 24 год на рівень експресії мікроРНК miR-96a-5p (А) та miR-145-5p (В) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Рівень експресії досліджених мікроРНК був нормалізований по рівню експресії РНК U6 і виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n=4$.

Таким чином, зміни в експресії мікроРНК miR-96a-5p і miR-145-5p негативно корелюють зі змінами в експресії цільових мРНК NAMPT та TSPAN13, відповідно. Це вказує на можливість і пост-транскрипційного механізму регуляції експресії даних генів. Отже, окрім безпосереднього впливу оксиду графену на рівень експресії досліджених генів, може мати місце і його опосередкований вплив на них через зміну експресії відповідних регуляторних мікроРНК.

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

4.1. Карбонові наночастинки порушують експресію низки поліфункціональних генів у нормальних астроцитах людини

Проліферація і клітинна загибель є протилежними та взаємозалежними процесами, адже координація і баланс між ними мають вирішальне значення для підтримання нормального розвитку та гомеостазу в організмі людини. Перехресний зв'язок між ними не тільки сприяє гармонізації цих процесів, а й дозволяє обмежувати ріст та виживання клітин з онкогенними мутаціями (Guo M. et al., 1999). Деякі з цих мутацій можуть порушувати програму запрограмованої загибелі клітин, оскільки, як і будь-яка метаболічна програма або програма розвитку, апоптоз має генетичну основу. Апоптоз є важливим інструментом для підтримання нормального розвитку та гомеостазу організму, шляхом ціленаправленого вибраковування пошкоджених або зайвих клітин (Singh et al., 2019). А отже, це означає, що кількість клітин може регулюватися як факторами, які впливають на виживання, так і тими, які контролюють проліферацію та диференціацію клітин (Lowe, 2000).

Крім того, на сьогодні вважають, що дефекти апоптичних шляхів сприяють розвитку злоякісних новоутворень і етіології множинних захворювань, що включають серцево-судинні, печінкові, ниркові, запальні та неврологічні стани (Thompson, 1995) (Vitale et al., 2023). І хоча аналіз активності генів показує, прямо протилежні картини регуляції тих самих генів за онкологічних захворювань і нейродегенеративних розладів, ці дані вказують на те, що ці неспоріднені порушення поділяють функціональні шляхи та мають зв'язок між етіопатогенезом і властивостями залучених молекул (Klus et al., 2015).

Серед найбільш агресивних і важкодоступних для лікування злоякісних новоутворень можна виділити гліобластому, «успішність» якої багато в чому пояснюється її мікрооточенням. Під час розвитку пухлини клітини гліобластоми

активують астроцити, які безпосередньо контактують з ними та сприяють формуванню їх більш реактивних форм, що називаються пухлино-асоційованими астроцитами. Вони, в свою чергу, полегшують прогресування пухлини, сприяючи проліферації і міграції пухлинних клітин через певні сигнальні шляхи. Окрім того, пухлинно-асоційовані астроцити також пригнічують імунні реакції та підвищують стійкість клітин гліобластоми до хіміопроменевої терапії (Zhang H. et al., 2020). Однією з основних причин цього є нездатність більшості з речовин, які застосовуються в онкотерапії, перетинати гематоенцефалічний бар'єр, який підтримується гліальними клітинами, такими як астроцити (Dubois et al., 2014).

Застосування наночастинок, зокрема на основі карбону, як нових агентів при діагностиці і лікуванні онкозахворювань дозволяє вирішити це питання. Розмір та інші фізико-хімічні властивості наночастинок дозволяють їм не тільки проникати через гематоенцефалічний бар'єр, адресно доставляючи необхідні речовини, їх застосування може також допомогти обійти інші обмеження характерні для традиційних методів лікування, такі як відсутність специфічності, цитотоксичність і множинна резистентність. Це багато в чому досягається за рахунок їхньої біосумісності, підвищенням проникності та ефекту утримання, а також більшій стабільності. Крім того, функціоналізація карбонових наночастинок сприяє більш точному націлюванню, що дозволить суттєво знизити токсичні ефекти (Gavas et al., 2021). Разом з тим, перелічені вище якості, також можуть стати джерелами занепокоєння щодо їх можливої хронічної токсичності та генотоксичності (Ahmadi et al., 2017), (Uo et al., 2011), (Yang et al., 2019).

На сьогодні, ще не встановлено остаточних механізмів токсичної дії карбонових наночастинок, однак нездатність до біологічного розкладання та здатність проникати через гематоенцефалічний бар'єр і накопичуватися у ядрі напевно є одними з основних причин перестороги щодо їх використання. Так у деяких дослідженнях було показано, що ядро є основним місцем цільового надходження одностінних карбонових нанотрубок, а механічне збурення як

ймовірна причина пошкодження ДНК, може бути пов'язане з деградацією структури подвійної спіралі ДНК (Jiang T. et al., 2020).

Пошкодження ДНК, а також вплив від окислювального стресу, що є домінуючими механізмами токсичної дії наночастинок, досить мало можуть розказати про викликані ними порушення функціональної цілісності внутрішньоклітинних процесів. Тож для поглиблення розуміння молекулярних механізмів дії наночастинок, деякі дослідники аналізують зміни експресії генів, які беруть участь у регуляції тих чи інших процесів (Alaraby et al., 2020).

Більшість з обраних нами для дослідження генів задіяні в контролі різних клітинних та позаклітинних процесів. Спільною рисою всіх цих генів є те, що вони кодують регуляторні фактори, що пов'язані з клітинною проліферацією, апоптозом, а також стресом ендоплазматичного ретикулула та канцерогенезом (Rudnytska et al., 2021).

Попередні дослідження вже показали, що одностінні карбонові нанотрубки (SWCNTs) можуть впливати на експресію важливих регуляторних факторів і ензимів, що пов'язані з проліферацією та апоптозом, такі як циклін D2, парвін бета, дистробревін альфа (DTNA), 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза-3 (PFKFB3) та PFKFB4 в клітинах гліоми людини лінії U87 (Minchenko et al., 2016a). Крім того, було показано, що SWCNTs впливають і на імунну відповідь, адже під їх дією спостерігається сильне пригнічення експресії генів, що кодують поверхневі клітинні глікопротеїни HLA-DRA (головний комплекс гістосумісності, клас II, DR альфа) і HLA-DRB1 (головний комплекс гістосумісності, клас II, DR бета 1) (Minchenko et al., 2018).

Нами ж було показано, що навіть дуже низькі концентрації одностінних карбонових нанотрубок здатні викликати суттєві зміни в експресії великої групи генів, що кодують протеїни та фактори, які контролюють різноманітні клітинні процеси, і пов'язані з регуляцією процесів проліферації та виживання клітин за канцерогенезу, а також порушують експресію низки мікроРНК, що ймовірно, беруть участь у пригніченні експресії мРНК досліджуваних генів (Rudnytska, 2021) (табл. 4.1 А і В)

Таблиця 4.1. А

Рівень експресії генів поліфункціональних протеїнів за умов дії малих доз одностінних карбонових нанотрубок (SWCNTs) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS

Гени	Контроль	SWCNTs 2 нг/мл	SWCNTs 8 нг/мл	Процеси, в які задіяні протеїни, що кодуються цими генами
<i>BCAR3</i>	100 %	↓(-80 %)	↓ (-94,5 %)	проліферація та міграція клітин, канцерогенез
<i>CA9</i>	100 %	↑(+135 %)	↑(+76 %)	міграція та інвазія клітин, пухлиногенез
<i>CLU</i>	100 %	↑(+45 %)	↑(+94 %)	стрес ЕР, проліферація, апоптоз і інвазія клітин, метастазування, канцерогенез
<i>DNAJB9</i>	100 %	↑(+101 %)	↑(+160,5 %)	протеостаз, стрес ЕР, міграція та інвазія клітин, канцерогенез
<i>FABP5</i>	100 %	↓(-82 %)	↓(-87,5 %)	проліферація, канцерогенез
<i>HIF1AN</i>	100 %	↓(-48 %)	↓(-73,5 %)	виживання (сприяння проліферації та протидія апоптозу)
<i>HLA-G</i>	100 %	↓(-83 %)	↓(-95,5 %)	клітинний цикл, імунна відповідь, канцерогенез

Примітки: SWCNTs 2 нг/мл та SWCNTs 8 нг/мл – концентрації суспензії одностінних карбонових нанотрубок (SWCNTs) на одиницю об'єму середовища, в якому вирощувалися нормальні астроцити людини лінії NHA/TS протягом 24 годин; Контроль – клітини, які вирощувалися без додавання SWCNTs, прийнято за 100 %; ↓ - рівень експресії мРНК знижується; ↑ - рівень експресії мРНК підвищується; $p < 0,05$ для всіх значень.

Таблиця 4.1. В

Рівень експресії генів поліфункціональних протеїнів за умов дії малих доз одностінних карбонових нанотрубок (SWCNTs) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS

Гени	Контроль	SWCNTs 2 нг/мл	SWCNTs 8 нг/мл	Процеси, в які задіяні протеїни, що кодуються цими генами
<i>HSPA9</i>	100 %	↑(+27 %)	↑(+53 %)	стрес ЕР, протеостаз, гомеостаз мітохондрій, проліферація клітин, канцерогенез
<i>IDH2</i>	100 %	↓(-49 %)	↓(-75 %)	апоптоз, диференціація клітин, енергетичний метаболізм, антиоксидативний захист, канцерогенез
<i>IGFBP3</i>	100 %	↑(+53 %)	↑(+87 %)	проліферація, диференціація та міграція клітин, пригнічення пухлиногенезу
<i>IGFBP6</i>	100 %	↓(-75 %)	↓(-87 %)	проліферація, диференціація, міграція і виживання клітин, імунна відповідь на пухлини
<i>MYBL1</i>	100 %	↓(-38 %)	↓(-46 %)	клітинний цикл, диференціація та виживання клітин, канцерогенез
<i>MYBL2</i>	100 %	↑(+29 %)	↑(+40,5 %)	клітинний цикл, диференціація і виживання клітин, канцерогенез
<i>PAM</i>	100 %	↓(-68 %)	↓(-77,5 %)	гомеостатичний контроль, канцерогенез
<i>SLC6A8</i>	100 %	↓(-68,5 %)	↓(-78 %)	передача електричного імпульсу, імунна відповідь, проліферація, міграція та інвазія клітин

Примітки: SWCNTs 2 нг/мл та SWCNTs 8 нг/мл – концентрації суспензії одностінних карбонових нанотрубок (SWCNTs) на одиницю об'єму середовища, в якому вирощувалися нормальні астроцити людини лінії NHA/TS протягом 24 годин; Контроль – клітини, які вирощувалися без додавання SWCNTs, прийнято за 100 %; ↓ - рівень експресії мРНК знижується; ↑ - рівень експресії мРНК підвищується; $p < 0,05$ для всіх значень.

Так, за дії малих доз SWCNTs спостерігалось значне додозалежне посилення експресії мРНК *CLU* і *DNAJB9*, що кодують протеїни-шаперони, які активуються за стресу ендоплазматичного ретикулума. Рівень експресії цих генів підвищується за різних форм онкологічних захворювань, що вказує на їх причетність до канцерогенезу (Liu Y. et al., 2018; Lee et al., 2015). Зокрема, глікопротеїн *CLU* відіграє важливу роль у таких важливих фізіологічних процесах, як запрограмована загибель клітини, метастазування, інвазія, проліферація та ріст клітин, здійснюючи їх регуляцію через різноманітні сигнальні шляхи, і, таким чином, непрямо сприяючи канцерогенезу (Shiota et al., 2012), (Zhang Y. et al., 2022). В той же час, багатофункціональний протеїн *DNAJB9*, який задіяний у підтримці протеостазу і загального гомеостазу у клітині, здатен пригнічувати міграцію та інвазію клітин шляхом інгібування епітелійно-мезенхімного переходу (EMT, epithelial-mesenchymal transition) і метастазування (Kim et al., 2021).

Дещо менше збільшення рівня експресії мРНК за впливу карбонових нанотрубок спостерігали для мітохондріального шаперона *HSPA9*, також відомого як морталін та протеїн 75 кДа, що регулюється глюкозою (*GRP75*). Він належить до родини протеїнів теплового шоку 70кДа, які є головними у підтриманні протеїнового гомеостазу (протеостазу), причому відіграють ключову роль у функціонуванні мітохондрій (Liu Q. et al., 2020). Крім того, *HSPA9* негативно пов'язаний з активністю дихального ланцюга і має важливе значення для збирання та стабілізації високомолекулярного мітохондріального суперкомплексу - респірасоми. Повне виключення цього гена у нокдаун-клітинах призводило до мітохондріальної дисфункції і посилювало фрагментацію мітохондрій та продукцію активних форм кисню (Zhao et al., 2022). Надмірна ж експресія *HSPA9* стимулювала ріст або проліферацію, а також подовжувала тривалість життя клітин. Відомо, що експресія морталіну зазвичай посилюється за канцерогенезу і пов'язана з функціональною підтримкою клітин у відповідь на стрес (Peng et al., 2013) (Wadhwa et al., 2006).

Досить цікавий ефект справляє дія SWCNTs на рівень експресії мРНК карбоангідрази, оскільки їх доза у 2 нг/мл спричиняє удвічі сильніше підвищення, ніж доза у 8 нг/мл, у порівнянні з контрольними клітинами. CA9 кодує металопротеїн клітинної поверхні, який здебільшого експресується у пухлинах та досить рідко у нормальних тканинах, а надекспресія цього гена викликає посилення клітинної міграції, що сприяє пухлиногенезу (Svastova et al., 2012) (Pastorekova et al., 2019) (Shin et al., 2011).

Слід зазначити, що хоча рівень експресії цих генів підвищуються за різних онкологічних захворюваннях, певні продукти, що докуються цими генами виступають антагоністами у деяких процесах канцерогенезу. Наприклад, CA9, сприяє клітинній міграції та інвазії, тоді як шаперон DNAJB9, навпаки, їх пригнічує (Shin et al., 2011), (Kim et al., 2021).

Рівень експресії мРНК двох транскрипційних факторів родини MYB, фізіологічною роллю яких є регуляція прогресії клітинного циклу, диференціації та виживання клітини, змінювалися по-різному, у відповідь на дію малих доз SWCNTs. Це може пояснюватися тим, що хоча структури *MYBL1* та *MYBL2* є подібними, протеїни, які кодуються цими генами, взаємодіють з унікальними кофакторами, їх експресії часто не перекриваються, що може свідчити про деяку розрізненість їх біологічних ролей (Cicirò et al., 2021). Так за дії SWCNTs спостерігається збільшення експресії *MYBL2*, дерегуляція якого спричинює порушення регуляції перелічених вище процесів, а його надекспресія відмічається при багатьох онкологічних захворюваннях (Musa et al., 2017). Водночас, за тих самих концентрацій нанотрубок, рівень експресії мРНК *MYBL1* помітно знижуються. Роль *MYBL1* полягає у контролі проліферації та диференціації зрілих В-лімфоцитів, а зниження його експресії спостерігається за диференціації В-клітин зародкового центру в бік клітин пам'яті або плазматичних клітин (Golay et al., 1998).

У випадку інсуліноподібних факторів росту *IGFBP3* та *IGFBP6*, відповіді на вплив малих доз SWCNTs також суттєво відрізняється. Так, за дії наночастинок спостерігається підвищення рівня експресії мРНК *IGFBP3* і

пониження IGFBR6. Загальними функціями цих генів є регуляція клітинної проліферації, росту, диференціювання, міграції та розвитку (Varma Shrivastav et al., 2020). Як зазначається у дослідженнях, надмірна експресія *IGFBP3* призводить до зупинки переходу клітин з фази G1 до фази S, що спричинює зниження проліферації клітин (Fanayan et al., 2002). Слід також зазначити, що *IGFBP3* через взаємодію з відповідним рецептором (IGFBP-3R) опосередковано задіяний у індукції апоптичного шляху каспази-8 та антипухлинних ефектах в клітинах раку грудної залози і раку простати (Ingermann et al., 2010). Основна ж роль *IGFBP6* полягає в тому, що він є важливим фактором імунної відповіді, особливо в дендритних клітинах людини, а також відіграє важливу роль, як інгібітор дії фактора росту IGF- II, у пригніченні виживання та міграції пухлин. Було показано, що його надекспресія пригнічувала міграцію клітин гліоми, в той час як нокдаун *IGFBP6* викликав протилежний ефект (Liso et al., 2022), (Bei et al., 2017).

Трохи менше зниження рівня мРНК за дії SWCNTs було виявлено для SLC6A8, іншого фактора задіяного в імунній відповіді, опосередкованій макрофагами, шляхом контролю їх поляризації (Ji et al., 2019). Він належить до підродини транспортерів γ -аміномасляної кислоти (ГАМК) та є членом суперродини натрій-хлорид котранспортерів нейромедіаторів, що експресується в різних тканинах (Fezai et al., 2016). Зниження експресії чи нокдаун SLC6A8 здатні пригнічувати проліферацію, міграцію та інвазію клітин ракового типу (Feng et al., 2021).

У той же час, найбільше зниження рівня експресії мРНК серед факторів імунної відповіді, за дії SWCNTs, було продемонстровано для *HLA-G*: на понад 80 % за дії 2 нг/мл та більше 95 % за дії 8 нг/мл, у порівнянні з контрольними клітинами. Слід відмітити, що HLA-G бере участь у регуляції Т-клітинної відповіді і здатен інгібувати проліферацію Т-клітин шляхом пригнічення прогресування клітинного циклу. Відомо, що пригнічення експресії гена *HLA-G* посилює імунну відповідь, в той час як його надекспресія, яка часто спостерігається у пухлинних клітинах людини різного походження, дозволяє

раковим клітинам уникати імунної відповіді, опосередкованої Т-лімфоцитами та природними кілерами (NK cells) (Bahri et al., 2006), (Seliger, 2016).

Серед генів, для яких спостерігалось помірне зниження рівня експресії мРНК за дії низьких доз одностінних карбонових нанотрубок, слід відзначити *IDH2* та *HIF1AN*. Ці зміни можуть вказувати на дозозалежне, опосередковане дією карбонових нанотрубок, посилення апоптозу, оскільки відомо, що підвищення експресії *HIF1AN* інгібувало апоптоз і сприяло проліферації, а зниження експресії *IDH2* призводило до активації апоптозу (Li N. et al., 2023), (Kim S. et al., 2019).

Дещо сильніше підвищення рівня експресії мРНК під впливом SWCNTs, у порівнянні з контролем, відмічалось для *PAM*, що кодує єдиний ензим, відповідальний за біосинтез амідованих пептидів. Зниження експресії мРНК пептидилгліцин α -амідуючої монооксигенази може викликати масштабні порушення гомеостазу, у підтримку якого залучено багато пептидів, що синтезуються за участі цього ензиму. Також амідовані пептиди є стимуляторами росту пухлин, що вказує на важливу роль *PAM* у розвитку процесів канцерогенезу (Merkler et al., 2022). Крім того, посилення експресії *PAM* може викликати зниження експресії генів, що активуються у відповідь на гіпоксію (Rao et al., 2021).

Найбільше пригнічення експресії мРНК у нормальних астроцитів за дії SWCNTs, окрім *HLA-G*, відмічалось також для генів *BCAR3* і *FABP5* і складало понад 80 % за дії обох доз одностінних карбонових нанотрубок. Дослідження групи вчених продемонстрували, що зниження експресії *FABP5* викликає пригнічення клітинної проліферації, міграції та інвазії клітин, а також індукує апоптоз (Wang W. et al., 2021). Крім того, було показано, що відносно низький рівень експресії *BCAR3* у клітинах первинних пухлин грудної залози корелює з погіршенням їх виживаності без утворення віддалених метастазів та рецидивів. *BCAR3* також здатен діяти як пухлинний супресор, шляхом інгібування TGF β /Smad сигнального шляху в інвазивних пухлинах раку грудної залози (Guo J. et al., 2014).

Ці дані вказують на те, що експозиція нормальних астроцитів людини навіть з дуже малими дозами SWCNTs здатна помітно пригнічувати експресію генів, які задіяні у регуляції процесів проліферації та виживання клітин, а також імунній відповіді і канцерогенезу. Дослідження експресії даних генів у клітинних лініях ракового типу показали, що пригнічення експресії більшості із генів сприяє пригніченню проліферації, метастазування та клітинної інвазії, проте залишається не відомим ефект від їх пригнічення у нормальних клітинах.

Отже, під дією карбонових нанотрубок спостерігається посилена експресія генів, які пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулула, пригнічення експресії генів, що контролюють імунну відповідь і різнонаправлений вплив на гени, які регулюють процеси проліферації та виживання в клітинах, надекспресія яких сприяє канцерогенезу.

Порівняно з дією одностінних карбонових нанотрубок, дослідження впливу малих доз оксиду графену на рівні мРНК поліфункціональних протеїнів показали, дещо відмінні ефекти на експресію досліджуваних генів (табл. 4.2 А і В).

Так, було показано, що дія 1 нг/мл та 4 нг/мл оксиду графену на нормальні астроцити людини протягом 24 годин змінює експресію інсуліноподібних факторів росту *IGFBP3* та *IGFBP6*, подібно до дії концентрацій 2 і 8 нг/мл SWCNTs на ці клітини. Значення експресії мРНК *IGFBP3* та *IGFBP6* знаходяться в одному діапазоні як за вищої, так і за нижчої концентрацій наночастинок відносно контролю.

Для транскрипційних факторів родини MYB – *MYBL1* та *MYBL2*, за дії оксиду графену спостерігалось більш помірне посилення експресії мРНК *MYBL2*, а рівень експресії мРНК *MYBL1* навпаки підвищувався, тобто ефект мав зворотній напрямок впливу, порівняно з впливом карбонових нанотрубок (табл. 4.2. А).

Таблиця 4.2. А

Рівень експресії генів поліфункціональних протеїнів за умов дії малих доз оксиду графену (GO) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS

Гени	Контроль	GO 1 нг/мл	GO 4 нг/мл	Процеси, в які задіяні протеїни, що кодуються цими генами
<i>IGFBP3</i>	100 %	↑(+54 %)	↑(+89 %)	проліферація клітин, ріст, диференціація, міграція і розвиток, пригнічення пухлиногенезу
<i>IGFBP6</i>	100 %	↓(-64 %)	↓(-86 %)	проліферація клітин, ріст, диференціація, міграція та розвиток, імунна відповідь, пригнічення виживання і міграції пухлин
<i>MYBL1</i>	100 %	↑(+58 %)	↑(+74 %)	клітинний цикл, диференціація та виживання клітин, канцерогенез
<i>MYBL2</i>	100 %	↑(+90 %)	↑(+115 %)	клітинний цикл, диференціація і виживання клітин, канцерогенез

Примітки: GO 1 нг/мл та GO 4 нг/мл – концентрації суспензії оксиду графену (GO) на одиницю об'єму середовища, в якому вирощувалися нормальні астроцити людини лінії NHA/TS протягом 24 годин; Контроль – клітини, які вирощувалися без додавання GO, прийнято за 100 %; ↓ - рівень експресії мРНК знижується; ↑ - рівень експресії мРНК підвищується; $p < 0,05$ для всіх значень.

Також було виявлено, що дія оксиду графену на астроцити людини викликала посилення експресії гену *BRCA1*, який відповідає за репарацію ДНК,

регуляцію клітинного циклу, підтримку стабільності геному, а також працює як пухлинний супресор завдяки убіквітин-протеїнлігазній активності (Fu X. et al., 2022), (Такаока et al., 2018), (Tahir et al., 2020).

В той же час, помірного пригнічення зазнала експресія генів *NAMPT*, *TSPAN13* і *BCAR3*, які кодуєть протеїни пов'язані з проліферацією (Oh et al. 2013), (Xu et al. 2017), (Jiang L. et al. 2019), (Li P. et al., 2019), (Pan et al. 2019), (Zhang Z. et al. 2021), (Gasparrini et al. 2022). А проте, низькі концентрації оксиду графену викликали менше пригнічення експресії *BCAR3*, у порівнянні з вищими концентраціями SWCNTs, водночас для деяких генів ефекти були дещо схожі (табл. 4.2. В) (Rudnytska et. al., 2021) (Rudnytska et. al., 2022).

Слід зазначити, що *BCAR3* є адаптерним протеїном, що сприяє проліферації та міграції клітин, бере участь у сигнальному шляху інсуліну та пухлиногенезі, зокрема розвитку гліоми (Oh et al. 2013), (Pan et al. 2019), (Zhang Z. et al. 2021). *NAMPT*, у свою чергу, здійснює контроль швидкості біосинтезу нікотинамідаденіндинуклентиду (*NAD*), який бере участь у регуляції метаболізму, реакції на стрес і циркадних ритмів. Він також може взаємодіяти з багатьма іншими протеїнами, зокрема, з протеїном *TLR4* родини Toll-подібних рецепторів (*TLR*, toll-like receptors), які грають важливу роль у розпізнаванні патогенів та активації вродженого імунітету (Xu et al. 2017), (Tsybal et al., 2020), (Gasparrini et al. 2022). Також *NAMPT* пов'язаний із системною резистентністю до інсуліну, оскільки він є прозапальним маркером жирової тканини (Chang et al. 2010). Ген *TSPAN13* кодує протеїн, який бере участь у трансдукції сигналів, що задіяні в регуляції розвитку, росту і рухливості клітин, а також пов'язаний з канцерогенезом (Jiang L. et al. 2019; Li P. et al. 2019; Qi et al. 2020).

Таблиця 4.2. В

Рівень експресії генів поліфункціональних протеїнів за умов дії малих доз оксиду графену (GO) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS

Гени	Контроль	GO 1 нг/мл	GO 4 нг/мл	Процеси, в які задіяні протеїни, що кодуються цими генами
<i>BCAR3</i>	100 %	↓(-49 %)	↓(-62 %)	проліферація та міграції клітин, канцерогенез
<i>BRCA1</i>	100 %	↑(+87 %)	↑(+123 %)	репарація ДНК, регуляція клітинного циклу, підтримка стабільності геному, пухлинний супресор
<i>NAMPT</i>	100 %	↓(-58 %)	↓(-71 %)	регуляція метаболізму, реакція на стрес, робота добових ритмів
<i>TSPAN13</i>	100 %	↓(-47 %)	↓(-53 %)	регуляція розвитку, рухливості клітин, канцерогенез

Примітки: GO 1 нг/мл та GO 4 нг/мл – концентрації суспензії оксиду графену (GO) на одиницю об'єму середовища, в якому вирощувалися нормальні астроцити людини лінії NHA/TS протягом 24 годин; Контроль – клітини, які вирощувалися без додавання GO, прийнято за 100 %; ↓ - рівень експресії мРНК знижується; ↑ - рівень експресії мРНК підвищується; $p < 0,05$ для всіх значень.

Отже, виявлені зміни в експресії генів внаслідок впливу на клітини малих доз оксиду графену можуть бути причетними до порушення гомеостазу, оскільки вони здійснюють регуляцію багатьох важливих біологічних процесів.

4.2. Роль мікроРНК у регуляції експресії генів за дії карбонових наночастинок

МікроРНК – це клас малих некодуючих РНК, що функціонують як критичні пост-транскрипційні регулятори експресії генів, сприяючи вибірковій деградації мРНК та гальмуванню трансляції. Пост-транскрипційна регуляція експресії генів за допомогою мікроРНК, відіграє важливу роль у багатьох клітинних процесах, зокрема таких як диференціація, проліферація, апоптоз, інвазія, міграція, ангіогенез, а також впливає на розвиток та ріст м'язів, розвиток плаценти, нейрогенез і розвиток мозку (Fu, et al., 2013), (McDanel, 2009), (Yaridakis, 2020). Беручи участь у багатьох біологічних процесах мікроРНК мають дуже важливе значення для нормального розвитку організму, а їх дисрегуляція є причиною розвитку широкого спектру хвороб, до якого входять діабет, серцево-судинні захворювання, захворювання нирок та онкологічні захворювання (Paul, et al., 2013). Це робить мікроРНК об'єктом багатьох досліджень, метою яких є розробка підходів для їх застосування у терапевтичних цілях за патологічних станів, а також в якості біомаркерів для діагностики захворювань (Tüfekci, et al., 2014), (Maqbool, et al., 2014).

Встановлено, що одностінні карбонові нанотрубки здатні впливати на експресію генів, задіяних у процесах проліферації та виживання клітин, а також імунну відповідь, як у клітинах гліоми людини лінії U87, так і в нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS (Minchenko et al., 2016a), (Minchenko et al., 2018). Крім того, було показано, що за дії SWCNTs змінюється також рівень експресії мікроРНК, які мають сайти зв'язування з деякими з досліджених раніше генів (Minchenko et al., 2018).

В ході наших досліджень, також були виявлені зміни рівня експресії мРНК полі-функціональних протеїнів, пов'язаних зі стресом ендоплазматичного ретикулума, проліферацією і виживанням клітин та канцерогенезом у нормальних астроцитах людини за дії на них малих доз SWCNTs (Rudnytska et al., 2021). Зміни виявлені у профілі експресії цих генів, можливо реалізувалися

через транскрипційні та пост-транскрипційні механізми регуляції, що підтверджується змінами в експресії мікроРНК, які мають сайти зв'язування на 3'-кінці мРНК відповідної мРНК (рис. 4.1).

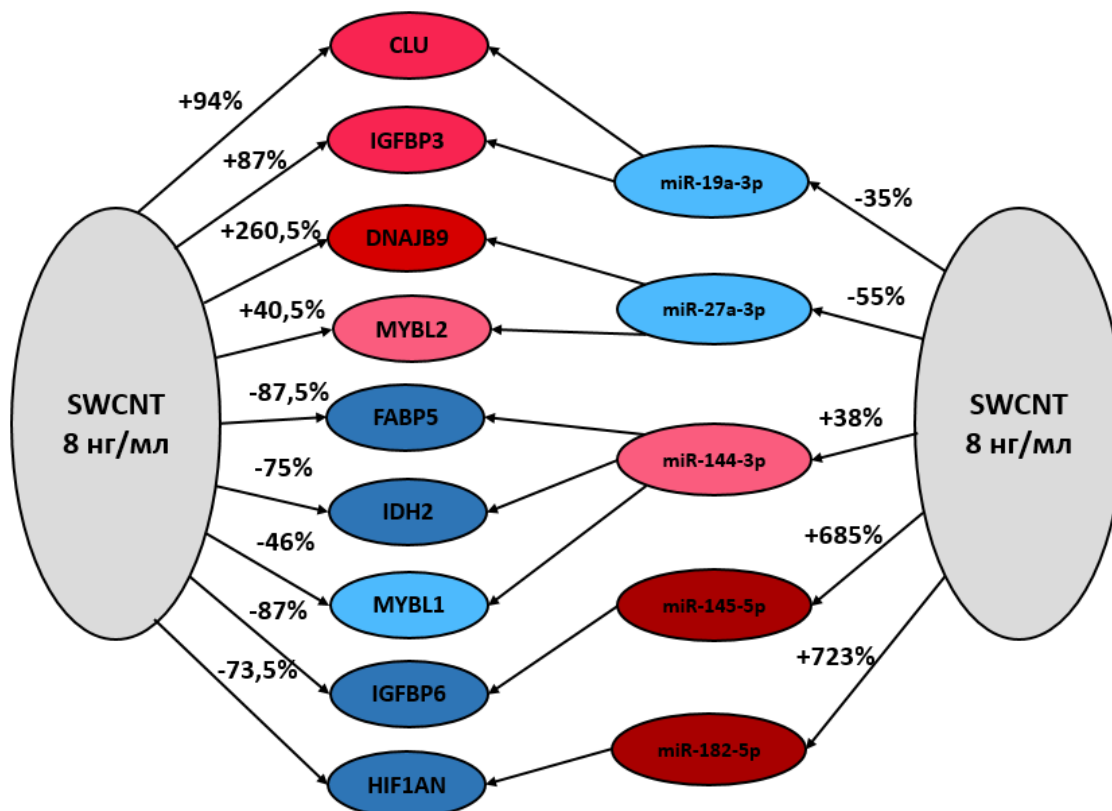


Рис. 4.1. Вплив одностінних карбонових нанотрубок у концентрації 8 нг/мл на рівень експресії мікроРНК та відповідних мРНК у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Зміни в експресії мРНК і відповідних мікроРНК виражені у відсотках від контролю (100 %).

Подібні зміни відбувалися і внаслідок дії оксиду графену на нормальні астроцити людини, де також спостерігався зворотній зв'язок між підвищенням експресії мікроРНК та зниженням рівня експресії цільових мРНК, що кодують важливі регуляторні протеїни NAMPT та TSPAN13 (рис. 4.2) (Rudnytska et al., 2022). Вище зазначені зміни в експресії мікроРНК і мРНК у нормальних астроцитах людини свідчать про можливість виникнення змін у розвитку нервової тканини, оскільки відомо, що однією із функцій астроцитів є регуляція процесів нейрогенезу (Schneider et al., 2019).

Крім того, проведені нами дослідження впливу низьких доз карбонових нанотрубок також на рівень експресії мікроРНК в них, що узгоджується з появою нейротоксичних ефектів у ембріонах *Danio rerio* (Rudnytska et al., 2022).

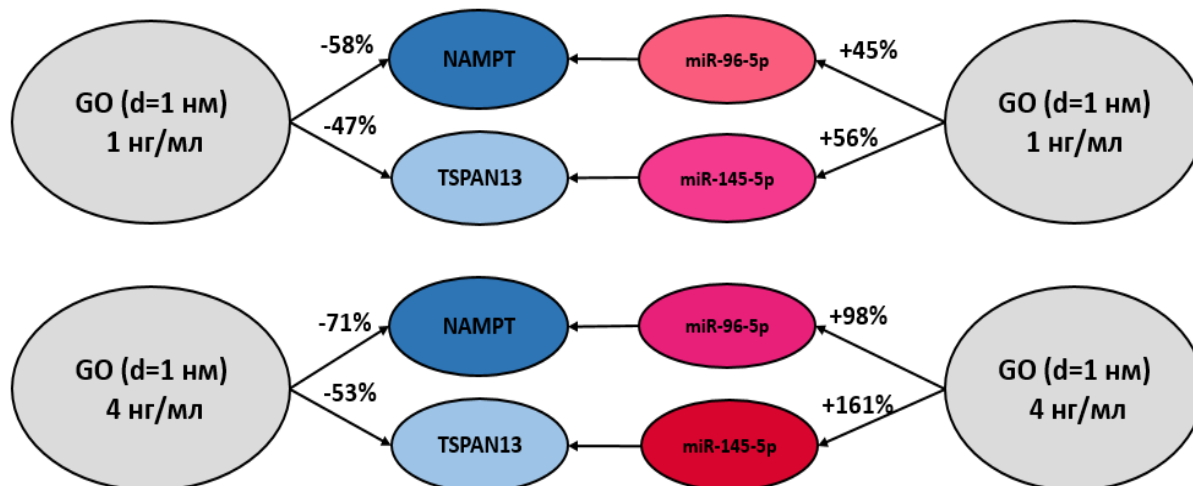


Рис. 4.2. Вплив оксиду графену у концентраціях 1 та 4 нг/мл на рівень експресії мікроРНК та відповідних мРНК у нормальних астроцитах людини лінії ННА/TS у відсотках від контролю (100 %).

Вирощування ембріонів *Danio rerio* за низьких концентрацій SWCNTs у середовищі протягом 24 та 72 годин призводили до зміни в них рівня експресії мікроРНК miR-143-3p, miR-145-5p, miR-182-5p і miR-206-5p. Водночас, зміни, викликані дією SWCNTs, мали залежний від часу та дози характер (рис. 4.3).

Так на рисунку 4.3 А і В видно, що за дії SWCNTs на ембріони *Danio rerio* протягом 24 і 72 годин більше виражене пригнічення експресії мікроРНК спостерігали за дії 8 нг/мл у порівнянні з меншою дозою (2 нг/мл). Як показано на рисунку 4.3 С та D, пригнічення експресії цих мікроРНК за обох концентрацій нанотрубок було більшим через 72 години дії нанотрубок.

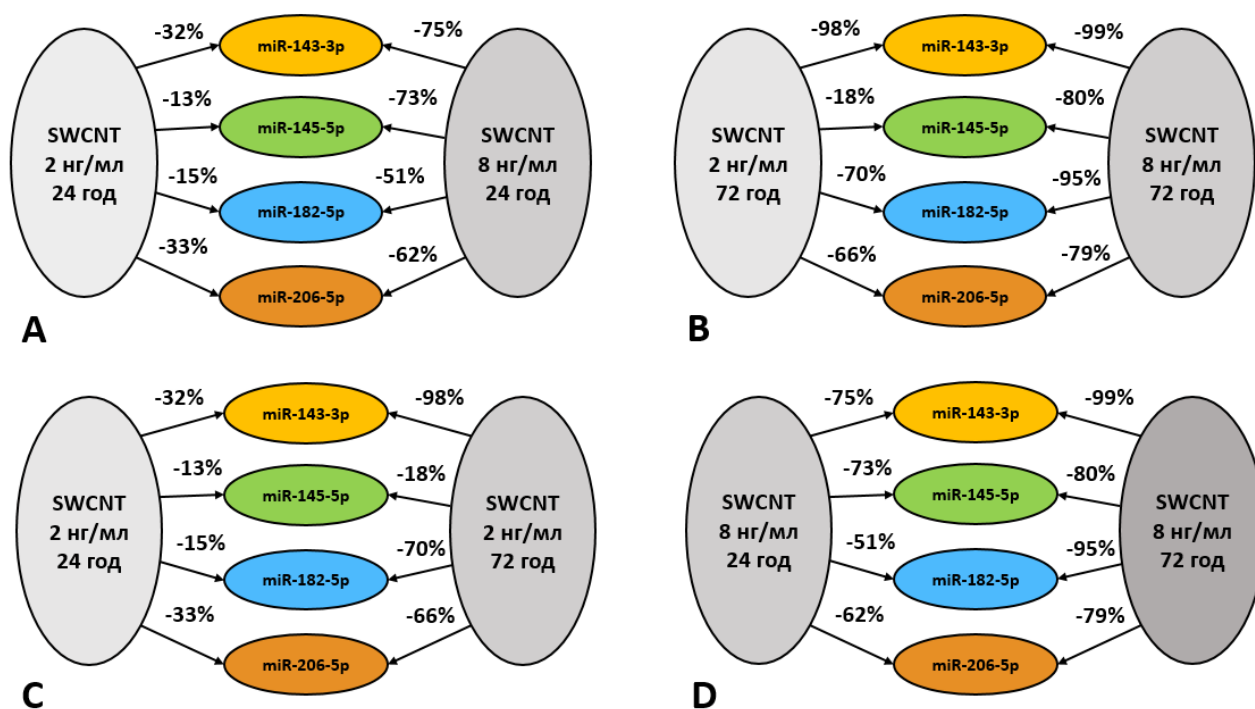


Рис. 4.3. Дозозалежний (А і В) та залежний від часу (С і D) ефекти від впливу одностінних карбонових нанотрубок (SWCNTs, 2 і 8 нг/мл середовища, протягом 24 та 72 год) на рівень експресії мікроРНК у ембріонах *Danio rerio* у відсотках від контролю (100 %).

Відомо, що всі вивчені нами мікроРНК (miR-143-3p, miR-145-5p, miR-182-5p і miR-206-5p) відіграють важливу роль у контролі клітинної проліферації, нейрогенезу та метаболічних процесів, а також у розвитку рибок *Danio rerio*, (Mishima, 2012), (Wang Y. et al., 2018), (Cho et al., 2019), (Wang H. et al., 2020), (Soto et al., 2022), (Wang R. et al., 2012). Отримані результати добре узгоджуються з дослідженнями інших вчених стосовно важливості ролі мікроРНК у розвитку мозку та цереброваскулярної патофізіології (Krichevsky et al., 2003), (Ma et al., 2019), (Cho et al., 2019).

Таким чином, можна зробити висновок, що зміни в експресії мікроРНК, викликані дією SWCNTs на ембріони *Danio rerio*, ймовірно індукують виникнення вад розвитку мозку, що мають дозозалежний характер та відображають як генотоксичний, так і нейротоксичний вплив одностінних карбонових нанотрубок на ранні стадії ембріонального розвитку рибок *Danio*

rerio. Зміна у пігментації голови або її нерегулярний малюнок, що спостерігався на отриманих мікрофотографіях ембріонів, є однією з характеристик, за якою здійснюють оцінку мальформацій, що свідчать про наявність тератогенного ефекту (Raghunath et al., 2018).

4.3. Можлива роль стресу ендоплазматичного ретикулума у дії карбонових наночастинок на геном

Дослідження токсичності карбонових нанотрубок показали, що внаслідок їх дії на клітини спостерігаються різноманітні порушення, до яких входять пошкодження мембран та ДНК, окиснювальний стрес, зміни активності мітохондрій та внутрішньоклітинного метаболізму, які включають дисрегуляцію експресії численних генів та викликають порушення функціонування геному (Kobayashi et al., 2017), (Francis et al., 2018), (Jiang T. et al., 2020), (Minchenko et al., 2016a), (Minchenko et al., 2018). Хоча точних механізмів токсичного впливу SWCNTs наразі ще не встановлено, проте вони можуть включати сигнальні шляхи стресу ендоплазматичного ретикулума, що було показано за дії інших наночастинок (Chen, R. et al., 2014) (Chen, B. et al., 2020) (Boran et al., 2016) (Simon et al., 2017).

Зокрема, дослідження впливу низьких доз SWCNTs на нормальні астроцити людини лінії NHA/TS та сублінії клітин гліобластоми U87 показали підвищену чутливість нормальних клітин до дії карбонових наночастинок. Так, за дії нанотрубок, у концентрації 2 нг/мл середовища вирощування клітин, підвищується рівень експресії мРНК, що кодують синтез протеїнів, пов'язаних з проліферацією та виживанням клітин, а також канцерогенезом, у приблизно 1,5-2 рази, а у більшій дозі (8 нг/мл) – приблизно у 2,5 рази. За дії SWCNTs на нормальні астроцити людини найбільш виражені зміни рівня експресії були виявлені у нормальних астроцитах людини для гена *DNAJB9*, трохи менші для гена *BRCA1* і ще менші для гена *CLU*, причому величина змін в експресії цих генів залежала від дози цих наночастинок (табл. 4.3).

Таблиця 4.3.

Вплив малих доз одностінних карбонових нанотрубок (SWCNT) на рівень експресії генів, що кодують важливі регуляторні протеїни, пов'язані з контролем метаболізму, клітинної проліферації та канцерогенезу у нормальних астроцитах та клітинах гліобластоми

		NHA/TS	U87-v	U87-dnERN1
Гени	Контроль	SWCNT 2 нг/мл		
<i>BRCA1</i>	100 %	↑(+73 %)	↑(+16 %)	↓(-2 %)
<i>CLU</i>	100 %	↑(+45 %)	↓(-28 %)	↓(-37 %)
<i>DNAJB9</i>	100 %	↑(+102 %)	↑(+55 %)	↓(-8 %)
Гени	Контроль	SWCNT 8 нг/мл		
<i>BRCA1</i>	100 %	↑(+92 %)	↑(+54 %)	↑(+3 %)
<i>CLU</i>	100 %	↑(+94 %)	↓(-41 %)	↓(-40 %)
<i>DNAJB9</i>	100 %	↑(+160 %)	↑(+96 %)	↓(-17 %)

Примітки: NHA/TS –іморталізовані нормальні астроцити людини лінії NHA/TS; U87-v – клітини гліобластоми U87, трансфікованих вектором (U87-Vector); U87-dnERN1 - клітини гліобластоми U87 з домінант-негативною конструкцією ERN1; Контроль – клітини, які вирощувалися без додавання SWCNT, прийнято за 100 %; ↓ - рівень експресії мРНК знижується; ↑ - рівень експресії мРНК підвищується; $p < 0,05$ для всіх значень.

У клітинах гліобластоми U87, трансфікованих порожнім вектором, зміни в експресії генів *DNAJB9* та *BRCA1* зміни були значно меншими, а у випадку з геном *CLU* взагалі спостерігалось суттєве зниження рівня його експресії, причому і у цьому випадку ефект цих карбонових нанотрубок також залежав від їх дози. Зниження рівня експресії цих генів у клітинах гліобластоми, порівняно до нормальних астроцитів людини, можливо обумовлено полі-резистентністю пухлинних клітин до дії не лише анти-пухлинних препаратів, а і до інших

чинників, зумовленої перепрограмуванням геному під впливом стресу ER (Minchenko et al., 2021). Пригнічення ж ERN1-залежного шляху стресу ендоплазматичного ретикулула у клітинах гліобластоми за допомогою домінант-негативної конструкції dnER1, майже повністю усувало вплив одностінних карбонових нанотрубок на експресію генів *DNAJB9* та *BRCA1*, а у випадку гена *CLU* суттєво не впливало на ефект нанотрубок на рівень його експресії (Minchenko et al., 2023).

Ці дані вказують на те, що дія одностінних карбонових наночастинок на нормальні астроцити людини лінії NHA/TS та клітини гліобластоми U87 контролюється стресом ER, але механізми контролю є різними. У клітинах гліобластоми стрес ER постійний і геном у цих клітинах перепрограмований на їх резистентність, як пухлинних клітин, до дії різноманітних чинників, у тому числі і до карбонових наночастинок, а у нормальних астроцитах людини стрес ендоплазматичного ретикулула також розвивається, але він тимчасовий і не перепрограмований на резистентність. (Minchenko et al., 2021).

Підвищена чутливість до карбонових наночастинок можливо також обумовлена стресом ER, функція якого у нормальних клітинах істотно відрізняється від пухлинних, і блокада стресу ER здатна змінювати токсичний вплив наночастинок (Сао et al. 2017). Таким чином, зміна експресії генів може бути не тільки безпосередньою дією карбонових наночастинок може бути зумовлена також індукцією стресу ER.

Слід відзначити, що протеїни кодовані цими генами задіяні у регуляції стресу ER. Оскільки *BRCA1* відповідає за підтримання геномної цілісності, то нокдаун або мутація *BRCA1* призводить до конститутивної активації UPR через підвищення рівня обох протеїнів, як PERK, так і ERN1 (Hromas et al. 2022). *BRCA1* є лігазою E3, що знаходиться в ER та націлена на сенсори стресу ER, такі як еукаріотичний фактор ініціації трансляції 2 та протеїн ERN1, для убіквітинування і подальшої протеосомно-опосередкованої деградації незгорнутих протеїнів. Кластерин *CLU* – це шаперон, який активується стресом та відіграє важливу роль у прогресуванні раку шляхом сприяння виживання

клітин. Захисна роль CLU за умов стресу пов'язана з його здатністю інгібувати апоптоз, індукований стресом ER у клітинах ракового типу (Wang C. et al. 2013). Протеїн DNAJB9 – кошаперон, що локалізований в ендоплазматичному ретикулумі та індукується за стресу ER та локалізований в ендоплазматичному ретикулумі. Він задіяний в опосередкованій ендоплазматичним ретикулумом деградації (ERAD) неправильно згорнутих протеїнів. Його функція поєднує зв'язування субстрату та асоціацію з машинерією ERAD, незалежним від BiP способом (Huang Y. et al. 2019).

Таким чином, беручи до уваги всі результати проведених нами досліджень, щодо впливу карбонових наночастинок на експресію генів полі-функціональних протеїнів, задіяних у регуляції процесів проліферації та виживання клітин, а також пов'язаних зі стресом ER і канцерогенезом, можна припустити, що більшість змін, викликаних дією SWCNTs та оксиду графену, є наслідком перепрограмування геному, індукованого стресом ендоплазматичного ретикулума, а також змінами в експресії мікроРНК, які є важливими регуляторами гомеостазу ER та ключовими гравцями в передачі сигналів UPR (Maurel et al., 2013). Більш того, стрес ER задіяний у регуляції механізмів експресії мікроРНК, що також підтверджує думку про його ключову роль у формуванні впливу карбонових наночастинок на експресію генів, подібно до інших наночастинок (Maurel et al., 2013), (Chen R. et al., 2014), (Chen B. et al., 2020), (Simon et al., 2017).

Не слід також виключати і можливі механізми впливу карбонових наночастинок через їх пряму дію на мембрани субклітинних органел, що може викликати індукцію стресу ендоплазматичного ретикулума з наступною активацією його сигнальних шляхів (ERN1/IRE1, PERK та ATF6). Встановлено, що конформаційні зміни у вторинних структурах протеїнів часто відбуваються у відповідь на різноманітні фізико-хімічні подразники (Porter et al., 2018). Діючи як каталізатор, наночастинок, завдяки реакціям поверхні, можуть сприяти конформаційним змінам протеїнів, індукуючи втрату α -спіралі та утворення β -площинних структур внутрішньо- і позаклітинних протеїнів (Linse et al. 2007),

(Khanal et al., 2016). Як наслідок неправильно згорнуті протеїни на наночастинках також можуть викликати подальше неправильне згортання протеїнів або індукувати запалення та стрес ER. Такі порушення у мозку можуть викликати нейрозапалення і стати причиною розвитку нейродегенеративних захворювань (Gandhi et al., 2019), (Onoda et al., 2020).

На молекулярному рівні ці зміни проявляються у перепрограмуванні геному, викликаному активацією сигнальних шляхів стресу ER, що значно модифікує протеостаз і призводить до зниження імунної відповіді та апоптозу клітин, а також впливає на виживання і проліферацію клітин (Minchenko et al., 2021), (Minchenko et al., 2023).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичний аналіз та експериментальні дані, спрямовані на вирішення актуальної наукової проблеми щодо впливу карбонових наночастинок, зокрема, одностінних карбонових нанотрубок та оксиду графену, на експресію ключових регуляторних генів у нормальних астроцитах людини та клітинах гліобластоми, а також в ембріонах *Danio rerio*. Встановлено, що нормальні астроцити людини є більш чутливими до дії карбонових нанотрубок порівняно з клітинами гліобластоми. Отримані результати розкривають механізми дії карбонових наночастинок на нормальні астроцити і клітини гліоми та вказують на потенційні ризики за умови їхнього використання у біомедичних цілях.

1. Встановлено, що під впливом малих доз одностінних карбонових нанотрубок у нормальних астроцитах людини підвищується рівень експресії генів, залежних від стресу ендоплазматичного ретикулума та знижується рівень експресії генів, які задіяні у регуляції проліферації і виживання клітин.

2. Виявлено, що за дії малих доз карбонових нанотрубок у нормальних астроцитах людини змінюється рівень експресії мікроРНК, задіяних у регуляції проліферації клітин.

3. Показано, що в ембріонах *Danio rerio* одностінні карбонові нанотрубки викликають зниження рівня експресії мікроРНК, які відіграють важливу роль у контролі проліферації клітин, різних метаболічних процесів та нейрогенезу.

4. З'ясовано, що малі дози оксиду графену порушують експресію багатьох регуляторних генів у нормальних астроцитах людини.

5. Виявлена більша чутливість експресії генів *BRCA1* і *DNAJB9*, які пов'язані зі підтриманням геномної цілісності та стресом ендоплазматичного ретикулума, до дії малих доз одностінних карбонових нанотрубок у нормальних астроцитах людини у порівнянні з клітинами гліобластоми.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N. H., Arias, C., Lennon, C. J., Kluger, Y., & Dynlacht, B. D. (2007). XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Molecular cell*, 27(1), 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.011>
2. Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A., & McNeil, S. E. (2009). Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced drug delivery reviews*, 61(6), 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.009>
3. Ahmadi, H., Ramezani, M., Yazdian-Robati, R., Behnam, B., Razavi Azarkhiavi, K., Hashem Nia, A., Mokhtarzadeh, A., Matbou Riahi, M., Razavi, B. M., & Abnous, K. (2017). Acute toxicity of functionalized single wall carbon nanotubes: A biochemical, histopathologic and proteomics approach. *Chemico-biological interactions*, 275, 196–209. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.08.004>
4. Alaraby, M., Demir, E., Domenech, J., Velázquez, A., Hernández, A., & Marcos, R. (2020). In vivo evaluation of the toxic and genotoxic effects of exposure to cobalt nanoparticles using *Drosophila melanogaster*. *Environmental science. Nano*, 7, 610-622. <https://doi.org/10.1039/C9EN00690G>
5. Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*, 14, 1–16. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124>
6. Aragón, T., van Anken, E., Pincus, D. et al. (2009) Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. *Nature* 457, 736–740. <https://doi.org/10.1038/nature07641>
7. Asare, N., Duale, N., Slagsvold, H. H., Lindeman, B., Olsen, A. K., Gromadzka-Ostrowska, J., Meczynska-Wielgosz, S., Kruszewski, M., Brunborg, G., & Instanes, C. (2016). Genotoxicity and gene expression modulation of silver and titanium

- dioxide nanoparticles in mice. *Nanotoxicology*, 10(3), 312–321.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1071443>
8. Auf, G., Jabouille, A., Guérit, S., Pineau, R., Delugin, M., Bouchecareilh, M., Magnin, N., Favereaux, A., Maitre, M., Gaiser, T., von Deimling, A., Czabanka, M., Vajkoczy, P., Chevet, E., Bikfalvi, A., & Moenner, M. (2010). Inositol-requiring enzyme 1 α is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15553–15558.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0914072107> (This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.0914072107/-/DCSupplemental)
 9. Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 360438.
<https://doi.org/10.1155/2014/360438>
 10. Badiola, N., Penas, C., Miñano-Molina, A., Barneda-Zahonero, B., Fadó, R., Sánchez-Opazo, G., Comella, J. X., Sabriá, J., Zhu, C., Blomgren, K., Casas, C., & Rodríguez-Alvarez, J. (2011). Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12. *Cell death & disease*, 2(4), e149.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2011.31>
 11. Bahri, R., Hirsch, F., Josse, A., Rouas-Freiss, N., Bidere, N., Vasquez, A., Carosella, E. D., Charpentier, B., & Durrbach, A. (2006). Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 176(3), 1331–1339.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1331>
 12. Balasubramanian, S. K., Jittiwat, J., Manikandan, J., Ong, C. N., Yu, L. E., & Ong, W. Y. (2010). Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials*, 31(8), 2034–2042. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.079>

13. Bei, Y., Huang, Q., Shen, J., Shi, J., Shen, C., Xu, P., Chang, H., Xia, X., Xu, L., Ji, B., & Chen, J. (2017). IGFBP6 Regulates Cell Apoptosis and Migration in Glioma. *Cellular and molecular neurobiology*, 37(5), 889–898. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0426-4>
14. Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R. P., Hoffmann, E., & Dopp, E. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Particle and fibre toxicology*, 6, 17. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-17>
15. Bhattacharya, K., Mukherjee, S. P., Gallud, A., Burkert, S. C., Bistarelli, S., Bellucci, S., Bottini, M., Star, A., & Fadeel, B. (2016). Biological interactions of carbon-based nanomaterials: From coronation to degradation. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 12(2), 333–351. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.011>
16. Boran, H., & Ulutas, G. (2016). Genotoxic effects and gene expression changes in larval zebrafish after exposure to ZnCl₂ and ZnO nanoparticles. *Diseases of aquatic organisms*, 117(3), 205–214. <https://doi.org/10.3354/dao02943>
17. Bortolamiol, T., Lukanov, P., Galibert, A.M., Soula, B., Lonchambon, P., Datas, L., & Flahaut, E. (2014). Double-walled carbon nanotubes: Quantitative purification assessment, balance between purification and degradation and solution filling as an evidence of opening. *Carbon*, 78, 79-90. <https://doi.org/10.1016/J.CARBON.2014.06.051>
18. Bradford, Y. M., Toro, S., Ramachandran, S., Ruzicka, L., Howe, D. G., Eagle, A., Kalita, P., Martin, R., Taylor Moxon, S. A., Schaper, K., & Westerfield, M. (2017). Zebrafish Models of Human Disease: Gaining Insight into Human Disease at ZFIN. *ILAR journal*, 58(1), 4–16. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilw040>
19. Brandao, M., Simon, T., Critchley, G., & Giamas, G. (2019). Astrocytes, the rising stars of the glioblastoma microenvironment. *Glia*, 67(5), 779–790. <https://doi.org/10.1002/glia.23520>
20. Burke, A., Ding, X., Singh, R., Kraft, R. A., Levi-Polyachenko, N., Rylander, M. N., Szot, C., Buchanan, C., Whitney, J., Fisher, J., Hatcher, H. C., D'Agostino, R.,

- Jr, Kock, N. D., Ajayan, P. M., Carroll, D. L., Akman, S., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2009). Long-term survival following a single treatment of kidney tumors with multiwalled carbon nanotubes and near-infrared radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12897–12902. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905195106>
21. Cao, Y., Long, J., Liu, L., He, T., Jiang, L., Zhao, C., & Li, Z. (2017). A review of endoplasmic reticulum (ER) stress and nanoparticle (NP) exposure. *Life sciences*, 186, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.003>
22. Cellot, G., Franceschi Biagioni, A., & Ballerini, L. (2022). Nanomedicine and graphene-based materials: advanced technologies for potential treatments of diseases in the developing nervous system. *Pediatric research*, 92(1), 71–79. <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01681-6>
23. Chakrabarti, A., Chen, A. W., & Varner, J. D. (2011). A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnology and bioengineering*, 108(12), 2777–2793. <https://doi.org/10.1002/bit.23282>
24. Chang, Y. C., Chang, T. J., Lee, W. J., & Chuang, L. M. (2010). The relationship of visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor/nicotinamide phosphoribosyl-transferase in adipose tissue with inflammation, insulin resistance, and plasma lipids. *Metabolism: clinical and experimental*, 59(1), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.07.011>
25. Chen, B., Hong, W., Yang, P., Tang, Y., Zhao, Y., Aguilar, Z. P., & Xu, H. (2020). Nano Zinc Oxide Induced Fetal Mice Growth Restriction, Based on Oxide Stress and Endoplasmic Reticulum Stress. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 10(2), 259. <https://doi.org/10.3390/nano10020259>
26. Chen, L., Li, J., Chen, Z., Gu, Z., Yan, L., Zhao, F., & Zhang, A. (2020). Toxicological Evaluation of Graphene-Family Nanomaterials. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 20(4), 1993–2006. <https://doi.org/10.1166/jnn.2020.17364>
27. Chen, R., Huo, L., Shi, X., Bai, R., Zhang, Z., Zhao, Y., Chang, Y., & Chen, C. (2014). Endoplasmic reticulum stress induced by zinc oxide nanoparticles is an

- earlier biomarker for nanotoxicological evaluation. *ACS nano*, 8(3), 2562–2574. <https://doi.org/10.1021/nn406184r>
28. Chen, X., & Mao, S. S. (2007). Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chemical reviews*, 107(7), 2891–2959. <https://doi.org/10.1021/cr0500535>
29. Cho, K. H. T., Xu, B., Blenkiron, C., & Fraser, M. (2019). Emerging Roles of miRNAs in Brain Development and Perinatal Brain Injury. *Frontiers in physiology*, 10, 227. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00227>
30. Christensen, J., Cloos, P., Toftegaard, U., Klinkenberg, D., Bracken, A. P., Trinh, E., Heeran, M., Di Stefano, L., & Helin, K. (2005). Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic acids research*, 33(17), 5458–5470. <https://doi.org/10.1093/nar/gki855>
31. Cicerò, Y., Sala, A. (2021) MYB oncoproteins: emerging players and potential therapeutic targets in human cancer. *Oncogenesis* 10, 19. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00309-y>
32. Correa-Duarte, M.A., Wagner, N., Rojas-Chapana, J.A., Morscheck, C., Thie, A., & Giersig, M. (2004). Fabrication and Biocompatibility of Carbon Nanotube-Based 3D Networks as Scaffolds for Cell Seeding and Growth. *Nano Letters*, 4, 2233–2236. <https://doi.org/10.1021/NL048574F>
33. Cui, G., Wu, J., Lin, J., Liu, W., Chen, P., Yu, M., Zhou, D., & Yao, G. (2021). Graphene-based nanomaterials for breast cancer treatment: promising therapeutic strategies. *Journal of nanobiotechnology*, 19(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00902-8>
34. D'Amora, M., Galgani, A., Marchese, M., Tantussi, F., Faraguna, U., De Angelis, F., & Giorgi, F. S. (2023). Zebrafish as an Innovative Tool for Epilepsy Modeling: State of the Art and Potential Future Directions. *International journal of molecular sciences*, 24(9), 7702. <https://doi.org/10.3390/ijms24097702>
35. Dash, B. S., Jose, G., Lu, Y. J., & Chen, J. P. (2021). Functionalized Reduced Graphene Oxide as a Versatile Tool for Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 2989. <https://doi.org/10.3390/ijms22062989>

36. Demir, E., Creus, A., & Marcos, R. (2014). Genotoxicity and DNA repair processes of zinc oxide nanoparticles. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 77(21), 1292–1303. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.935540>
37. Djurišić, A. B., Leung, Y. H., Ng, A. M., Xu, X. Y., Lee, P. K., Degger, N., & Wu, R. S. (2015). Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 11(1), 26–44. <https://doi.org/10.1002/sml.201303947>
38. Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W., & Borm, P. J. (2004). Nanotoxicology. *Occupational and environmental medicine*, 61(9), 727–728. <https://doi.org/10.1136/oem.2004.013243>
39. Dooley, K., & Zon, L. I. (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current opinion in genetics & development*, 10(3), 252–256. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(00\)00074-5](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(00)00074-5)
40. Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), 4337–4351. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00340-5](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00340-5)
41. Dubois, L. G., Campanati, L., Righy, C., D'Andrea-Meira, I., Spohr, T. C., Porto-Carreiro, I., Pereira, C. M., Balça-Silva, J., Kahn, S. A., DosSantos, M. F., Oliveira, M. de A., Ximenes-da-Silva, A., Lopes, M. C., Faveret, E., Gasparetto, E. L., & Moura-Neto, V. (2014). Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 418. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00418>
42. Egbuna, C., Parmar, V. K., Jeevanandam, J., Ezzat, S. M., Patrick-Iwuanyanwu, K. C., Adetunji, C. O., Khan, J., Onyeike, E. N., Uche, C. Z., Akram, M., Ibrahim, M. S., El Mahdy, N. M., Awuchi, C. G., Saravanan, K., Tijjani, H., Odoh, U. E., Messaoudi, M., Ifemeje, J. C., Olisah, M. C., Ezeofor, N. J., Ibeabuchi, C. G. (2021). Toxicity of Nanoparticles in Biomedical Application: Nanotoxicology. *Journal of toxicology*, 2021, 9954443. <https://doi.org/10.1155/2021/9954443>
43. Fanayan, S., Firth, S.M., & Baxter, R.C. (2002). Signaling through the Smad Pathway by Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 in Breast Cancer Cells.

The Journal of Biological Chemistry, 277, 7255 - 7261.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M108038200>

44. Federici, G., Shaw, B. J., & Handy, R. D. (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 84(4), 415–430. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>
45. Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Holland, N., Bonassi, S., & Kirsch-Volders, M. (2020). Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 786, 108342. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108342>
46. Feng, W., & Feng, Y. (2011). MicroRNAs in neural cell development and brain diseases. *Science China. Life sciences*, 54(12), 1103–1112. <https://doi.org/10.1007/s11427-011-4249-8>
47. Feng, Y., Guo, X., & Tang, H. (2021). SLC6A8 is involved in the progression of non-small cell lung cancer through the Notch signaling pathway. *Annals of translational medicine*, 9(3), 264. <https://doi.org/10.21037/atm-20-5984>
48. Fezai, M., Jemaà, M., Fakhri, H., Chen, H., Elsir, B., Pelzl, L., & Lang, F. (2016). Down-Regulation of the Na⁺, Cl⁻ Coupled Creatine Transporter CreaT (SLC6A8) by Glycogen Synthase Kinase GSK3β. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 40(5), 1231–1238. <https://doi.org/10.1159/000453177>
49. Francis, A. P., & Devasena, T. (2018). Toxicity of carbon nanotubes: A review. *Toxicology and industrial health*, 34(3), 200–210. <https://doi.org/10.1177/0748233717747472>
50. Freitas Robert A. (1999) *Nanomedicine, Volume I: Basic capabilities*, Georgetown, TX: Landes Bioscience, 210-219.
51. Fu, G., Brkić, J., Hayder, H., & Peng, C. (2013). MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 5519–5544. <https://doi.org/10.3390/ijms14035519>

52. Fu, X., Tan, W., Song, Q., Pei, H., & Li, J. (2022). BRCA1 and Breast Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 813457. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.813457>
53. Gandhi, J., Antonelli, A. C., Afridi, A., Vatsia, S., Joshi, G., Romanov, V., Murray, I. V. J., & Khan, S. A. (2019). Protein misfolding and aggregation in neurodegenerative diseases: a review of pathogeneses, novel detection strategies, and potential therapeutics. *Reviews in the neurosciences*, 30(4), 339–358. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0035>
54. Gao, T., Fjellvåg, H., & Norby, P. (2009). Crystal structures of titanate nanotubes: a Raman scattering study. *Inorganic chemistry*, 48(4), 1423–1432. <https://doi.org/10.1021/ic801508k>
55. Gasparrini, M., Mazzola, F., Cuccioloni, M., Sorci, L., Audrito, V., Zamporlini, F., Fortunato, C., Amici, A., Cianci, M., Deaglio, S., Angeletti, M., & Raffaelli, N. (2022). Molecular insights into the interaction between human nicotinamide phosphoribosyltransferase and Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry*, 298(3), 101669. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101669>
56. Gavas, S., Quazi, S., & Karpiński, T. M. (2021). Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges. *Nanoscale research letters*, 16(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03628-6>
57. Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schürch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im Hof, V., Heyder, J., & Gehr, P. (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environmental health perspectives*, 113(11), 1555–1560. <https://doi.org/10.1289/ehp.8006>
58. Georgakilas, V., Perman, J. A., Tucek, J., & Zboril, R. (2015). Broad family of carbon nanoallotropes: classification, chemistry, and applications of fullerenes, carbon dots, nanotubes, graphene, nanodiamonds, and combined superstructures. *Chemical reviews*, 115(11), 4744–4822. <https://doi.org/10.1021/cr500304f>
59. George, J. M., Magogotya, M., Vetten, M. A., Buys, A. V., & Gulumian, M. (2017). From the Cover: An Investigation of the Genotoxicity and Interference of Gold

- Nanoparticles in Commonly Used In Vitro Mutagenicity and Genotoxicity Assays. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 156(1), 149–166. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw247>
60. Gizak, A., Duda, P., Pielka, E., McCubrey, J. A., & Rakus, D. (2020). GSK3 and miRNA in neural tissue: From brain development to neurodegenerative diseases. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1867(7), 118696. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118696>
61. Golay, J., Broccoli, V., Lamorte, G., Bifulco, C., Parravicini, C., Pizzey, A., Thomas, N. S., Delia, D., Ferrauti, P., Vitolo, D., & Introna, M. (1998). The A-Myb transcription factor is a marker of centroblasts in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 160 (6), 2786–2793. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.160.6.2786>
62. Gong H., Peng R., Liu Z. (2013). Carbon Nanotubes for Biomedical Imaging: The Recent Advances. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 1951–1963. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.10.002>
63. Gonzalez, L., Lison, D., and Kirsch-Volders, M. (2008). Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. *Nanotoxicology* 2 (4), 252–273. <https://doi.org/10.1080/17435390802464986>
64. Guo, J., Canaff, L., Rajadurai, C.V. et al. (2014). Breast cancer anti-estrogen resistance 3 inhibits transforming growth factor β /Smad signaling and associates with favorable breast cancer disease outcomes. *Breast Cancer Res* 16, 476 <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0476-9>
65. Guo, M., & Hay, B. A. (1999). Cell proliferation and apoptosis. *Current opinion in cell biology*, 11(6), 745–752. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(99\)00046-0](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)00046-0)
66. Hamilton, R.F., Wu, N., Porter, D., Buford, M., Wolfarth, M., and Holian, A., (2009). Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Particle and fibre toxicology*, 6, 35. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-35>

67. Hetz, C., & Glimcher, L. H. (2009). Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome. *Molecular cell*, 35(5), 551–561. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.08.021>
68. Hromas, R., Srinivasan, G., Yang, M., Jaiswal, A., Totterdale, T. A., Phillips, L., Kirby, A., Khodayari, N., Brantley, M., Williamson, E. A., & Kong, K. Y. (2022). BRCA1 mediates protein homeostasis through the ubiquitination of PERK and IRE1. *iScience*, 25(12), 105626. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105626>
69. Hu, M., Jovanović, B., & Palić, D. (2019). In silico prediction of MicroRNA role in regulation of Zebrafish (*Danio rerio*) responses to nanoparticle exposure. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 60, 187–202. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.05.014>
70. Huang, W., Ramsey, K. M., Marcheva, B., & Bass, J. (2011). Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *The Journal of clinical investigation*, 121(6), 2133–2141. <https://doi.org/10.1172/JCI46043>
71. Huang, Y., Arora, K., Mun, K. S., Yang, F., Moon, C., Yarlagadda, S., Jegga, A., Weaver, T., & Naren, A. P. (2019). Targeting DNAJB9, a novel ER luminal co-chaperone, to rescue $\Delta F508$ -CFTR. *Scientific reports*, 9(1), 9808. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46161-4>
72. Hubbs, A. F., Mercer, R. R., Benkovic, S. A., Harkema, J., Sriram, K., Schwegler-Berry, D., Goravanahally, M. P., Nurkiewicz, T. R., Castranova, V., & Sargent, L. M. (2011). Nanotoxicology--a pathologist's perspective. *Toxicologic pathology*, 39(2), 301–324. <https://doi.org/10.1177/0192623310390705>
73. Ingermann, A. R., Yang, Y. F., Han, J., Mikami, A., Garza, A. E., Mohanraj, L., Fan, L., Idowu, M., Ware, J. L., Kim, H. S., Lee, D. Y., & Oh, Y. (2010). Identification of a novel cell death receptor mediating IGF1P-3-induced anti-tumor effects in breast and prostate cancer. *The Journal of biological chemistry*, 285(39), 30233–30246. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.122226>
74. Jacobson, J., & Duchon, M. R. (2002). Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes--requirement for stored Ca^{2+} and sustained opening of the

- permeability transition pore. *Journal of cell science*, 115(Pt 6), 1175–1188.
<https://doi.org/10.1242/jcs.115.6.1175>
75. Jain, S., Singh, S.R. and Pillai, S. (2012) Toxicity Issues Related to Biomedical Applications of Carbon Nanotubes: *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 3(5), <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7439.1000140>
76. Ji, L., Zhao, X., Zhang, B., Kang, L., Song, W., Zhao, B., Xie, W., Chen, L., & Hu, X. (2019). Slc6a8-Mediated Creatine Uptake and Accumulation Reprogram Macrophage Polarization via Regulating Cytokine Responses. *Immunity*, 51(2), 272–284.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.007>
77. Jiang, L., Zhang, X., Geradts, J. et al. (2019). Expression of tetraspanins NET-6 and CD151 in breast cancer as a potential tumor biomarker. *Clin Exp Med* 19, 377–384. <https://doi.org/10.1007/s10238-019-00554-x>
78. Jiang, T., Amadei, C. A., Gou, N., Lin, Y., Lan, J., Vecitis, C. D., & Gu, A. Z. (2020). Toxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes (SWCNTs): Effect of Lengths, Functional Groups and Electronic Structures Revealed by a Quantitative Toxicogenomics Assay. *Environmental science. Nano*, 7(5), 1348–1364. <https://doi.org/10.1039/d0en00230e>
79. Jovanović B. (2015). Review of titanium dioxide nanoparticle phototoxicity: Developing a phototoxicity ratio to correct the endpoint values of toxicity tests. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(5), 1070–1077. <https://doi.org/10.1002/etc.2891>
80. Ju, H. Q., Lin, J. F., Tian, T., Xie, D., & Xu, R. H. (2020). NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 231. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00326-0>
81. Kaegi, R., Ulrich, A., Sinnet, B., Vonbank, R., Wichser, A., Zuleeg, S., Simmler, H., Brunner, S., Vonmont, H., Burkhardt, M., & Boller, M. (2008). Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental pollution*, 156 2, 233-9. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.08.004>

82. Kahru, A., & Dubourguier, H. C. (2010). From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, 269(2-3), 105–119. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.08.016>
83. Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., & Möller, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical research in toxicology*, 21(9), 1726–1732. <https://doi.org/10.1021/tx800064j>
84. Kaufman, R. J., Back, S. H., Song, B., Han, J., & Hassler, J. (2010). The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in β -cells. *Diabetes, obesity & metabolism*, 12 (Suppl. 2), 99–107. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01281.x>
85. Khanal, D., Kondyurin, A., Hau, H., Knowles, J. C., Levinson, O., Ramzan, I., Fu, D., Marcott, C., & Chrzanowski, W. (2016). Biospectroscopy of Nanodiamond-Induced Alterations in Conformation of Intra- and Extracellular Proteins: A Nanoscale IR Study. *Analytical chemistry*, 88(15), 7530–7538. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00665>
86. Kim, H. Y., Kim, Y. M., & Hong, S. (2021). DNAJB9 suppresses the metastasis of triple-negative breast cancer by promoting FBXO45-mediated degradation of ZEB1. *Cell death & disease*, 12(5), 461. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03757-x>
87. Kim, S. H., & Park, J. W. (2019). IDH2 deficiency impairs cutaneous wound healing via ROS-dependent apoptosis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1865(11), 165523. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.07.017>
88. Klus, P., Cirillo, D., Botta Orfila, T., & Gaetano Tartaglia, G. (2015). Neurodegeneration and Cancer: Where the Disorder Prevails. *Scientific reports*, 5, 15390. <https://doi.org/10.1038/srep15390>
89. Kobayashi, N., Izumi, H., & Morimoto, Y. (2017). Review of toxicity studies of carbon nanotubes. *Journal of occupational health*, 59(5), 394–407. <https://doi.org/10.1539/joh.17-0089-RA>

90. Kohl, Y., Rundén-Pran, E., Mariussen, E., Hesler, M., El Yamani, N., Longhin, E. M., & Dusinska, M. (2020). Genotoxicity of Nanomaterials: Advanced In Vitro Models and High Throughput Methods for Human Hazard Assessment-A Review. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 10(10), 1911. <https://doi.org/10.3390/nano10101911>
91. Korennykh, A. V., Egea, P. F., Korostelev, A. A., Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K. M., Stroud, R. M., & Walter, P. (2009). The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature*, 457(7230), 687–693. <https://doi.org/10.1038/nature07661>
92. Korolovych, V.F., Bulavin, L.A., Prylutsky, Y.I. et al. (2014) Influence of Single-Walled Carbon Nanotubes on Thermal Expansion of Water. *Int J Thermophys* 35, 19–31. <https://doi.org/10.1007/s10765-013-1552-6>
93. Kovac, J., Husse, J. & Oster, H. A time to fast, a time to feast: The crosstalk between metabolism and the circadian clock. *Mol Cells* 28, 75–80 (2009). <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0113-0>
94. Krichevsky, A. M., King, K. S., Donahue, C. P., Khrapko, K., & Kosik, K. S. (2003). A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* (New York, N.Y.), 9(10), 1274–1281. <https://doi.org/10.1261/rna.5980303>
95. Kruszewski, M., Grądzka, I., Bartłomiejczyk, T., Chwastowska, J., Sommer, S., Grzelak, A., Zuberek, M., Lankoff, A., Dusinska, M., & Wojewódzka, M. (2013). Oxidative DNA damage corresponds to the long term survival of human cells treated with silver nanoparticles. *Toxicology letters*, 219(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.03.006>
96. Lai, J. C., Lai, M. B., Jandhyam, S., Dukhande, V. V., Bhushan, A., Daniels, C. K., & Leung, S. W. (2008). Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts. *International journal of nanomedicine*, 3(4), 533–545. <https://doi.org/10.2147/ijn.s3234>

97. Lebedová, J., Hedberg, Y. S., Odnevall Wallinder, I., & Karlsson, H. L. (2018). Size-dependent genotoxicity of silver, gold and platinum nanoparticles studied using the mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. *Mutagenesis*, 33(1), 77–85. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex027>
98. Lee, H. J., Kim, J. M., Kim, K. H., Heo, J. I., Kwak, S. J., & Han, J. A. (2015). Genotoxic stress/p53-induced DNAJB9 inhibits the pro-apoptotic function of p53. *Cell death and differentiation*, 22(1), 86–95. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.116>
99. Lee, J., Mahendra, S., & Alvarez, P. J. (2010). Nanomaterials in the construction industry: a review of their applications and environmental health and safety considerations. *ACS nano*, 4(7), 3580–3590. <https://doi.org/10.1021/nn100866w>
100. Li, L., Liu, T., Fu, C., Tan, L., Meng, X., & Liu, H. (2015). Biodistribution, excretion, and toxicity of mesoporous silica nanoparticles after oral administration depend on their shape. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 11(8), 1915–1924. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.07.004>
101. Li, N., Zhou, Q., Yi, Z., Zhang, H., & Zhou, D. (2023). Ubiquitin protein E3 ligase ASB9 suppresses proliferation and promotes apoptosis in human spermatogonial stem cell line by inducing HIF1AN degradation. *Biological research*, 56(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40659-023-00413-w>
102. Li, P., Dong, M., & Wang, Z. (2019). Downregulation of TSPAN13 by miR-369-3p inhibits cell proliferation in papillary thyroid cancer (PTC). *Biomolecules and Biomedicine*, 19(2), 146–154. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2018.2865>
103. Lin, C. C., & Metters, A. T. (2006). Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Advanced drug delivery reviews*, 58(12-13), 1379–1408. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.004>
104. Linse S, Cabaleiro-Lago C, Xue WF, et al. (2007). Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (21), 8691-8696. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701250104>
105. Liso, A., Venuto, S., Coda, A. R. D., Giallongo, C., Palumbo, G. A., & Tibullo, D. (2022). IGFBP-6: At the Crossroads of Immunity, Tissue Repair and Fibrosis.

- International journal of molecular sciences, 23(8), 4358.
<https://doi.org/10.3390/ijms23084358>
106. Liu, C. Y., & Kaufman, R. J. (2003). The unfolded protein response. *Journal of cell science*, 116(Pt 10), 1861–1862. <https://doi.org/10.1242/jcs.00408>
107. Liu, Q., Liang, C., & Zhou, L. (2020). Structural and functional analysis of the Hsp70/Hsp40 chaperone system. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 29(2), 378–390. <https://doi.org/10.1002/pro.3725>
108. Liu, Q., Xu, C., Ji, G., Liu, H., Mo, Y., Tollerud, D.J., Gu, A., & Zhang, Q. (2016). Sublethal effects of zinc oxide nanoparticles on male reproductive cells. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 35, 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.05.017>
109. Liu, Y., Men, C., Xu, Y., Zhao, K., Luo, L., Dong, D., & Yu, Q. (2018). Clusterin promotes growth and invasion of clear cell renal carcinoma cell by upregulation of S100A4 expression. *Cancer biomarkers: section A of Disease markers*, 21(4), 915–923. <https://doi.org/10.3233/CBM-171018>
110. Long, T. C., Saleh, N., Tilton, R. D., Lowry, G. V., & Veronesi, B. (2006). Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environmental science & technology*, 40(14), 4346–4352. <https://doi.org/10.1021/es060589n>
111. Lovat, V., Pantarotto, D., Lagostena, L., Cacciari, B., Grandolfo, M., Righi, M., Spalluto, G., Prato, M., & Ballerini, L. (2005). Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling. *Nano letters*, 5(6), 1107–1110. <https://doi.org/10.1021/nl050637m>
112. Lowe, S. W., & Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 485–495. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.485> Thompson C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5203), 1456–1462. <https://doi.org/10.1126/science.7878464>
113. Luo, D., He, Y., Zhang, H., Yu, L., Chen, H., Xu, Z., Tang, S., Urano, F., & Min, W. (2008). AIP1 is critical in transducing IRE1-mediated endoplasmic reticulum

- stress response. *The Journal of biological chemistry*, 283(18), 11905–11912.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M710557200>
114. Ma, Q., Zhang, L., & Pearce, W. J. (2019). MicroRNAs in brain development and cerebrovascular pathophysiology. *American journal of physiology. Cell physiology*, 317(1), C3–C19. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00022.2019>
115. Ma, Y., & Hendershot, L. M. (2004). ER chaperone functions during normal and stress conditions. *Journal of chemical neuroanatomy*, 28(1-2), 51–65.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2003.08.007>
116. Ma, Z. X., Liu, Z., Xiong, H. H., Zhou, Z. P., Ouyang, L. S., Xie, F. K., Tang, Y. M., Wu, Z. D., & Feng, Y. (2023). MicroRNAs: protective regulators for neuron growth and development. *Neural regeneration research*, 18(4), 734–745.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.353481>
117. Madani, S. Y., Mandel, A., & Seifalian, A. M. (2013). A concise review of carbon nanotube's toxicology. *Nano reviews*, 4.
<https://doi.org/10.3402/nano.v4i0.21521>
118. Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., & Dusinska, M. (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(3), 233–278.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2013.773464>
119. Maqbool, R., & Ul Hussain, M. (2014). MicroRNAs and human diseases: diagnostic and therapeutic potential. *Cell and tissue research*, 358(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1007/s00441-013-1787-3>
120. Marczylo, E. L., Jacobs, M. N., & Gant, T. W. (2016). Environmentally induced epigenetic toxicity: potential public health concerns. *Critical reviews in toxicology*, 46(8), 676–700. <https://doi.org/10.1080/10408444.2016.1175417>
121. Matta-Domjan, B., King, A., Totti, S., Matta, C., Dover, G., Martinez, P., Zakhidov, A., La Ragione, R., Macedo, H., Jurewicz, I., Dalton, A., & Velliou, E. G. (2018). Biophysical interactions between pancreatic cancer cells and pristine carbon nanotube substrates: Potential application for pancreatic cancer tissue

- engineering. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 106(5), 1637–1644. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34012>
122. Maurel, M., & Chevet, E. (2013). Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection. *American journal of physiology. Cell physiology*, 304(12), C1117–C1126. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00061.2013>
123. McDanel, T.G. (2009). MicroRNA: mechanism of gene regulation and application to livestock. *Journal of animal science*, 87, 14 Suppl, E21-28. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1303>
124. Mendonça, M. C., Soares, E. S., de Jesus, M. B., Ceragioli, H. J., Ferreira, M. S., Catharino, R. R., & da Cruz-Höfling, M. A. (2015). Reduced graphene oxide induces transient blood-brain barrier opening: an in vivo study. *Journal of nanobiotechnology*, 13, 78. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0143-z>
125. Meng, L., Zhang, X., Lu, Q., Fei, Z., & Dyson, P.J. (2012). Single walled carbon nanotubes as drug delivery vehicles: targeting doxorubicin to tumors. *Biomaterials*, 33 6, 1689-98. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.004>
126. Meng, Q. J., Maywood, E. S., Bechtold, D. A., Lu, W. Q., Li, J., Gibbs, J. E., Dupré, S. M., Chesham, J. E., Rajamohan, F., Knafels, J., Sneed, B., Zawadzke, L. E., Ohren, J. F., Walton, K. M., Wager, T. T., Hastings, M. H., & Loudon, A. S. (2010). Entrainment of disrupted circadian behavior through inhibition of casein kinase 1 (CK1) enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), 15240–15245. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005101107>
127. Merkler, D. J., Hawley, A. J., Eipper, B. A., & Mains, R. E. (2022). Peptidylglycine α -amidating monooxygenase as a therapeutic target or biomarker for human diseases. *British journal of pharmacology*, 179(13), 3306–3324. <https://doi.org/10.1111/bph.15815>
128. Minchenko D. O, Tsymbal D. O, Yavorovsky O. P, Solokha N. V, Minchenko O. H. (2017a). Expression of genes encoding IGFbps, SNARK, CD36, and PECAM1 in the liver of mice treated with chromium disilicide and titanium nitride

- nanoparticles. *Endocrine regulation*, 51(2), 84-95 <https://doi.org/10.1515/enr-2017-0008>
129. Minchenko D. O., Bozhko I. V., Zinchenko T. O., Mykhalchenko V. G., Yavorovsky O. P., Minchenko O. G. (2010) Effect of silver nanoparticles on the expression of circadian genes and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in rat brain. *Biotechnology*, 3 (3), 42-49 PMID: 21674963
130. Minchenko D. O., Prylutska S. V., Moenner M., Minchenko O. H., Prylutsky Y. I., Schütze C., Ritter U. (2013a) Effect of C60 Fullerene on the expression of ERN1 signaling related genes in human astrocytes. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*. 44 (2-3), 150-155 <https://doi.org/10.1002/mawe.201300084>
131. Minchenko D. O., Spivak M. Y., Herasymenko R. M., Ivanov V. K., Tretyakov Y. D., Minchenko O.H. (2013b). Effect of cerium dioxide nanoparticles on the expression of selected growth and transcription factors in human astrocytes. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*. 44 (2-3), 156-160 <https://doi.org/10.1002/mawe.201300091>
132. Minchenko O. H., Tsymbal D. O., Minchenko D. O., Prylutska S. V., Cherepanov V. V., Prylutsky Y. I., Tsierkezos N. G. (2016a) Single-walled carbon nanotubes affect the expression of the CCND2 gene in human U87 glioma cells. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*. 47 (2-3), 180-188 <https://doi.org/10.1002/mawe.201600462>
133. Minchenko O. H., Yavorovsky O. P., Solokha N. V., Minchenko D. O., Kuznetsova A. Y. (2017b) Effect of chromium disilicide and titanium nitride nanoparticles on the expression of NAMPT, E2F8, FAS, TBX3, IL13RA2, and UPS7 genes in mouse liver. *Ukr.Biochem.J.*, 89 (2), 31-42 <https://doi.org/10.15407/ubj89.02.031>
134. Minchenko O.H., Tsymbal D.O., Khita O.O., Minchenko D.O. (2021) Inhibition of ERN1 signaling is important for the suppression of tumor growth. *Clin. Cancer Drugs*, 8(1), 27-38. <http://dx.doi.org/10.2174/2212697X08666211006100250>
135. Minchenko, D. O., Rudnytska, O. V., Khita, O. O., Kulish, Y. V., Viletska, Y. M., Halkin, O. V., Danilovskyi, S. V., Ratushna, O. O., & Minchenko, O. H. (2023).

- Expression of DNAJB9 and some other genes is more sensitive to SWCNTs in normal human astrocytes than glioblastoma cells. *Endocrine regulations*, 57(1), 162–172. <https://doi.org/10.2478/enr-2023-0020>
136. Minchenko, D. O., Yavorovsky, O. P., Zinchenko, T. O., Komisarenko, S. V., Minchenko, O. H. (2012) Expression of circadian genes in different rat tissues is sensitive marker of in vivo silver nanoparticles action. *IOP Conf. Ser.: Materials Science and Engineering* 40, 012016 <https://doi.org/10.1088/1757-899X/40/1/012016>
137. Minchenko, D. O., & Minchenko, O. H. (2012). SNF1/AMP-Activated Protein Kinases: Genes, Expression and Biological Role. <https://doi.org/10.5772/37820>
138. Minchenko, D. O., Bozhko, I. V., Zinchenko, T., Yavorovsky, O., & Minchenko, O.H. (2011). Expression of SNF1/AMP-activated protein kinase and casein kinase-1 ϵ in different rat tissues are sensitive markers of in vivo silver nanoparticles action. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 42. <https://doi.org/10.1002/mawe.201100742>
139. Minchenko, O. H., Kharkova, A. P., Minchenko, D. O., & Karbovskyi, L. L. (2015). Effect of hypoxia on the expression of genes that encode some IGFBP and CCN proteins in U87 glioma cells depends on IRE1 signaling. *Ukrainian biochemical journal*, 87(6), 52–63. <https://doi.org/10.15407/ubj87.06.052>
140. Minchenko, O. H., Kharkova, A. P., Minchenko, D. O., & Karbovskyi, L. L. (2016b). Expression of IGFBP6, IGFBP7, NOV, CYR61, WISP1 and WISP2 genes in U87 glioma cells in glutamine deprivation condition. *Ukrainian biochemical journal*, 88(3), 66–77. <https://doi.org/10.15407/ubj88.03.066>
141. Minchenko, O. H., Khita, O. O., Rudnytska, O. V., Yefimova, Y. V., Tsymbal, D. O., Minchenko, D. O., Sliusar, M. Y., He, Q., & Liu, K. (2022). The impact of single walled carbon nanotubes on the expression of microRNA in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Endocrine regulations*, 56(2), 115–125. <https://doi.org/10.2478/enr-2022-0013>
142. Minchenko, O. H., Tsymbal, D. O., Minchenko, D. O., Prylutska, S. V., Hnatiuk, O. S., Prylutsky, Y. I., Tsierkezos, N. G., & Ritter, U. (2018). Single-

- walled carbon nanotubes affect the expression of genes associated with immune response in normal human astrocytes. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 52, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.06.011>
143. Mishima Y. (2012). Widespread roles of microRNAs during zebrafish development and beyond. *Development, growth & differentiation*, 54(1), 55–65. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2011.01306.x>
144. Mizoguchi, T., Putterill, J., & Ohkoshi, Y. (2006). Kinase and phosphatase: the cog and spring of the circadian clock. *International review of cytology*, 250, 47–72. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)50002-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)50002-6)
145. Moenner, M., Pluquet, O., Bouchecareilh, M. and Chevet, E. (2007) Integrated Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Cancer. *Cancer Research*, 67, 10631-10634. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1705>
146. Musa, J., Aynaud, MM., Mirabeau, O. et al. (2017) MYBL2 (B-Myb): a central regulator of cell proliferation, cell survival and differentiation involved in tumorigenesis. *Cell Death Dis* 8, e2895. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.244>
147. Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., & Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials*, 8(7), 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>
148. Ng, C. T., Li, J. J., Bay, B. H., & Yung, L. Y. (2010). Current studies into the genotoxic effects of nanomaterials. *Journal of nucleic acids*, 2010, 947859. <https://doi.org/10.4061/2010/947859>
149. Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*, 113(7), 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
150. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>

151. Oh, M., Yi, S., Kim, H.S., Kim, J., Jeong, Y., van Agthoven, T., & Jhun, B.H. (2013). Functional roles of BCAR3 in the signaling pathways of insulin leading to DNA synthesis, membrane ruffling and GLUT4 translocation. *Biochemical and biophysical research communications*, 441 4, 911-6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.161>
152. Ojeda, I., Barrejón, M., Arellano, L. M., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Langa, F., & Pingarrón, J. M. (2015). Grafted-double walled carbon nanotubes as electrochemical platforms for immobilization of antibodies using a metallic-complex chelating polymer: Application to the determination of adiponectin cytokine in serum. *Biosensors & bioelectronics*, 74, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.001>
153. Oliveira S.F., Bisker G., Bakh, N.A. et al. (2015). Protein Functionalized Carbon Nanomaterials for Biomedical Applications. *Carbon* 95, 767–779. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.08.076>
154. Onoda, A., Kawasaki, T., Tsukiyama, K., Takeda, K., & Umezawa, M. (2020). Carbon nanoparticles induce endoplasmic reticulum stress around blood vessels with accumulation of misfolded proteins in the developing brain of offspring. *Scientific reports*, 10(1), 10028. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66744-w>
155. Osano, E., Kishi, J., & Takahashi, Y. (2003). Phagocytosis of titanium particles and necrosis in TNF-alpha-resistant mouse sarcoma L929 cells. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 17(1), 41–47. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(02\)00127-3](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(02)00127-3)
156. Otsuka, T., & Matsui, H. (2023). Fish Models for Exploring Mitochondrial Dysfunction Affecting Neurodegenerative Disorders. *International journal of molecular sciences*, 24(8), 7079. <https://doi.org/10.3390/ijms24087079>
157. Ozkan-Ariksoysal D. (2022). Current Perspectives in Graphene Oxide-Based Electrochemical Biosensors for Cancer Diagnostics. *Biosensors*, 12(8), 607. <https://doi.org/10.3390/bios12080607>
158. Pan, Z., Zhu, Q., You, W., Shen, C., Hu, W., Chen, X. (2019). Silencing of Mig-7 expression inhibits in-vitro invasiveness and vasculogenic mimicry of human

- glioma U87 Cells. *Neuroreport* 30 (17), 1135-1142.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001317>
159. Park, S. W., Zhou, Y., Lee, J., Lee, J., & Ozcan, U. (2010). Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), 19320–19325.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1012044107>
160. Parry, E. M., Parry, J. M., Corso, C., Doherty, A., Haddad, F., Hermine, T. F., Johnson, G., Kayani, M., Quick, E., Warr, T., & Williamson, J. (2002). Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals. *Mutagenesis*, 17(6), 509–521. <https://doi.org/10.1093/mutage/17.6.509>
161. Pastorekova, S., Gillies, R.J. (2019) The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 38, 65–77. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09799-0>
162. Paul, P., Chakraborty, A., Sarkar, D., Langthasa, M., Rahman, M., Bari, M., Singha, R. S., Malakar, A. K., & Chakraborty, S. (2018). Interplay between miRNAs and human diseases. *Journal of cellular physiology*, 233(3), 2007–2018.
<https://doi.org/10.1002/jcp.25854>
163. Peng, C., Yang, P., Cui, Y., He, M., Liang, L., & Di, Y. (2013). HSPA9 overexpression inhibits apoptin-induced apoptosis in the HepG2 cell line. *Oncology Reports*, 29, 2431-2437. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2399>
164. Periasamy, V. S., Athinarayanan, J., Alfawaz, M. A., & Alshatwi, A. A. (2016). Carbon nanoparticle induced cytotoxicity in human mesenchymal stem cells through upregulation of TNF3, NFKBIA and BCL2L1 genes. *Chemosphere*, 144, 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.018>
165. Pitkethly M.J. (2004). Nanomaterials - the driving force. *Materials today*, 7(12), 20-29. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00627-3](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00627-3)
166. Porcu, E., Sadler, M. C., Lepik, K., Auwerx, C., Wood, A. R., Weihs, A., Sleiman, M. S. B., Ribeiro, D. M., Bandinelli, S., Tanaka, T., Nauck, M., Völker, U., Delaneau, O., Metspalu, A., Teumer, A., Frayling, T., Santoni, F. A., Reymond,

- A., & Kutalik, Z. (2021). Differentially expressed genes reflect disease-induced rather than disease-causing changes in the transcriptome. *Nature communications*, 12(1), 5647. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25805-y>
167. Porter, L. L., & Looger, L. L. (2018). Extant fold-switching proteins are widespread. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(23), 5968–5973. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800168115>
168. Prylutska, S. V., Burlaka, A. P., Klymenko, P. P., Grynyuk, I. I., Prylutsky, Y. I., Schütze, C., & Ritter, U. (2011). Using water-soluble C60 fullerenes in anticancer therapy. *Cancer nanotechnology*, 2(1-6), 105–110. <https://doi.org/10.1007/s12645-011-0020-x>
169. Punbusayakul, N., Talapatra, S., Ajayan, P. M., & Surareungchai, W. (2013). Label-free as-grown double wall carbon nanotubes bundles for *Salmonella typhimurium* immunoassay. *Chemistry Central journal*, 7, 102. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-102>
170. Qi, Y., Li, H., Lv, J., Qi, W., Shen, L., Liu, S., Ding, A., Wang, G., Sun, L., & Qiu, W. (2020). Expression and function of transmembrane 4 superfamily proteins in digestive system cancers. *Cancer cell international*, 20, 314. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01353-1>
171. Raghunath, A., & Perumal, E. (2018). Analysis of Lethality and Malformations During Zebrafish (*Danio rerio*) Development. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1797, 337–363. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7883-0_18
172. Rao, V. K. S., Eipper, B. A., & Mains, R. E. (2021). Multiple roles for peptidylglycine α -amidating monooxygenase in the response to hypoxia. *Journal of cellular physiology*, 236(11), 7745–7758. <https://doi.org/10.1002/jcp.30457>
173. Riabovol, O. O., Tsybal, D. O., Minchenko, D. O., Lebid-Biletska, K. M., Sliusar, M. Y., Rudnytska, O. V., & Minchenko, O. H. (2019). Effect of glucose deprivation on the expression of genes encoding glucocorticoid receptor and some related factors in ERN1-knockdown U87 glioma cells. *Endocrine regulations*, 53(4), 237–249. <https://doi.org/10.2478/enr-2019-0024>

174. Ritter, U., et al., (2014). Structure and electrochemical properties of aqueous suspensions of functionalized single- and multi-walled carbon nanotubes. *Ukr. J. Phys.* 59, 433–438. <https://doi.org/10.15407/ujpe59.04.0433>
175. Rudnytska, O. V., Khita, O. O., Minchenko, D. O., Tsymbal, D. O., Yefimova, Y. V., Sliusar, M. Y., & Minchenko, O. (2021). The low doses of SWCNTs affect the expression of proliferation and apoptosis related genes in normal human astrocytes. *Current research in toxicology*, 2, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.crtox.2021.02.001>
176. Rudnytska, O. V., Kulish, Y. V., Khita, O. O., Minchenko, D. O., Tsymbal, D. O., Viletska, Y. M., Sliusar, M. Y., Trufanova, D. D., & Minchenko, O. H. (2022). Exposure to nanographene oxide induces gene expression dysregulation in normal human astrocytes. *Endocrine regulations*, 56(3), 216–226. <https://doi.org/10.2478/enr-2022-0023>
177. Sadrieh, N., Wokovich, A. M., Gopee, N. V., Zheng, J., Haines, D., Parmiter, D., Siitonen, P. H., Cozart, C. R., Patri, A. K., McNeil, S. E., Howard, P. C., Doub, W. H., & Buhse, L. F. (2010). Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 115(1), 156–166. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq041>
178. Saito, A., Ochiai, K., Kondo, S., Tsumagari, K., Murakami, T., Cavener, D. R., & Imaizumi, K. (2011). Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2(α)-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *The Journal of biological chemistry*, 286(6), 4809–4818. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.152900>
179. Sajid, M.I., Jamshaid, U., Jamshaid, T., Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2016). Carbon nanotubes from synthesis to in vivo biomedical applications. *International journal of pharmaceutics*, 501 1-2, 278-99. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.064>
180. Samadian, H., Salami, M. S., Jaymand, M., Azarnezhad, A., Najafi, M., Barabadi, H., & Ahmadi, A. (2020). Genotoxicity assessment of carbon-based

- nanomaterials; Have their unique physicochemical properties made them double-edged swords? *Mutation research. Reviews in mutation research*, 783, 108296. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108296>
181. Sasai, K., Akagi, T., Aoyanagi, E., Tabu, K., Kaneko, S., & Tanaka, S. (2007). O6-methylguanine-DNA methyltransferase is downregulated in transformed astrocyte cells: implications for anti-glioma therapies. *Molecular cancer*, 6, 36. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-36>
182. Schins R.P., Hei. T.K. (2006). Genotoxic Effects of Particles. In B. P. Donaldson K., *Particles Toxicology* (1st ed.) (pp. 285-298). Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1201/9781420003147>
183. Schins, R.P., & Knaapen, A.M. (2007). Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhalation toxicology*, 19 Suppl 1, 189–198. <https://doi.org/10.1080/08958370701496202>
184. Schneider, J., Karpf, J., & Beckervordersandforth, R. (2019). Role of Astrocytes in the Neurogenic Niches. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1938, 19–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9068-9_2
185. Schröder M. (2008). Endoplasmic reticulum stress responses. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 65(6), 862–894. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7383-5>
186. Seliger B. (2016). Role of microRNAs on HLA-G expression in human tumors. *Human immunology*, 77(9), 760–763. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2016.04.006>
187. Shapoval, L.M., Dmytrenko, O.V., Sagach, V.F. et al. (2020). Systemic Administrations of Water-Dispersible Single-Walled Carbon Nanotubes: Activation of NOS in Spontaneously Hypertensive Rats. *Neurophysiology* 52, 101–109 <https://doi.org/10.1007/s11062-020-09858-1>
188. Shin, H. J., Rho, S. B., Jung, D. C., Han, I. O., Oh, E. S., & Kim, J. Y. (2011). Carbonic anhydrase IX (CA9) modulates tumor-associated cell migration and invasion. *Journal of cell science*, 124(Pt 7), 1077–1087. <https://doi.org/10.1242/jcs.072207>

189. Shiota, M., Zardan, A., Takeuchi, A., Kumano, M., Beraldi, E., Naito, S., Zoubeidi, A., & Gleave, M. E. (2012). Clusterin mediates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis via Twist1 in prostate cancer cells. *Cancer research*, 72(20), 5261–5272. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0254>
190. Shrivastava, S., Jain, S.R., Kumar, D., Soni, S.L., & Sharma, M. (2019). A Review on Theranostics: An Approach to Targeted Diagnosis and Therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 7 (2), 63-69 <http://dx.doi.org/10.22270/ajprd.v7i2.463>
191. Shukla, R. K., Badiye, A., Vajpayee, K., & Kapoor, N. (2021). Genotoxic Potential of Nanoparticles: Structural and Functional Modifications in DNA. *Frontiers in genetics*, 12, 728250. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.728250>
192. Sicari, D., Delaunay-Moisan, A., Combettes, L., Chevet, É., & Igarria, A. (2019). A guide to assessing endoplasmic reticulum homeostasis and stress in mammalian systems. *The FEBS Journal*, 287, 27-42. <https://doi.org/10.1111/febs.15107>
193. Simon, J., Flahaut, E., & Golzio, M. (2019). Overview of Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(4), 624. <https://doi.org/10.3390/ma12040624>
194. Simon, M., Barberet, P., Delville, M. H., Moretto, P., & Sez nec, H. (2011). Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity. *Nanotoxicology*, 5(2), 125–139. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.502979>
195. Simon, M., Saez, G., Muggioli, G., Lavenas, M., Le Trequesser, Q., Michelet, C., Devès, G., Barberet, P., Chevet, E., Dupuy, D., Delville, M. H., & Sez nec, H. (2017). In situ quantification of diverse titanium dioxide nanoparticles unveils selective endoplasmic reticulum stress-dependent toxicity. *Nanotoxicology*, 11(1), 134–145. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1278803>

196. Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(3), 175–193. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
197. Soto, A., Nieto-Díaz, M., Reigada, D., Barreda-Manso, M. A., Muñoz-Galdeano, T., & Maza, R. M. (2022). miR-182-5p Regulates Nogo-A Expression and Promotes Neurite Outgrowth of Hippocampal Neurons In Vitro. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 15(5), 529. <https://doi.org/10.3390/ph15050529>
198. Sullivan, C., & Kim, C. H. (2008). Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish & shellfish immunology*, 25(4), 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.05.005>
199. Svastova, E., Witariski, W., Csaderova, L., Kosik, I., Skvarkova, L., Hulikova, A., Zatovicova, M., Barathova, M., Kopacek, J., Pastorek, J., & Pastorekova, S. (2012). Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain. *The Journal of biological chemistry*, 287(5), 3392–3402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.286062>
200. Tahir, D. E., Rehman, M. S., & Rehman, M. U. (2020). An overview of cancer genetics with focus on involvement of BRCA1/2 genes in breast carcinomas. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 70(7), 1240–1247. <https://doi.org/10.5455/JPMA.20351>
201. Takaoka, M., & Miki, Y. (2018). BRCA1 gene: function and deficiency. *International journal of clinical oncology*, 23(1), 36–44. <https://doi.org/10.1007/s10147-017-1182-2>
202. Tang, Y., Wang, F., Jin, C., Liang, H., Zhong, X., & Yang, Y. (2013). Mitochondrial injury induced by nanosized titanium dioxide in A549 cells and rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.03.006>
203. Tayanloo-Beik, A., Hamidpour, S. K., Abedi, M., Shojaei, H., Tavirani, M. R., Namazi, N., Larijani, B., & Arjmand, B. (2022). Zebrafish Modeling of Autism

- Spectrum Disorders, Current Status and Future Prospective. *Frontiers in psychiatry*, 13, 911770. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2022.911770>
204. Thompson C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* (New York, N.Y.), 267 (5203), 1456–1462. <https://doi.org/10.1126/science.7878464>
205. Toyokuni S. (2013). Genotoxicity and carcinogenicity risk of carbon nanotubes. *Advanced drug delivery reviews*, 65(15), 2098–2110. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.011>
206. Tsymbal, D. O., Minchenko, D. O., Luzina, O. Y., Riabovol, O. O., Danilovskyi, S. V., & Minchenko, O. H. (2020). Silencing of NAMPT leads to up-regulation of insulin receptor substrate 1 gene expression in U87 glioma cells. *Endocrine regulations*, 54(1), 31–42. <https://doi.org/10.2478/enr-2020-0005>
207. Tüfekci, K. U., Oner, M. G., Meuwissen, R. L., & Genç, S. (2014). The role of microRNAs in human diseases. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1107, 33–50. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-748-8_3
208. Uo, M., Akasaka, T., Watari, F., Sato, Y., & Tohji, K. (2011). Toxicity evaluations of various carbon nanomaterials. *Dental materials journal*, 30(3), 245–263. <https://doi.org/10.4012/dmj.2010-039>
209. Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*, 27(2), 120–139. <https://doi.org/10.1080/10590500902885684>
210. van Berlo, D., Clift, M. J., Albrecht, C., & Schins, R. P. (2012). Carbon nanotubes: an insight into the mechanisms of their potential genotoxicity. *Swiss medical weekly*, 142, w13698. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13698>
211. Varma Shrivastav, S., Bhardwaj, A., Pathak, K. A., & Shrivastav, A. (2020). Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3): Unraveling the Role in Mediating IGF-Independent Effects Within the Cell. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 286. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00286>

212. Vashist, A., Kaushik, A., Vashist, A., Sagar, V., Ghosal, A., Gupta, Y. K., Ahmad, S., & Nair, M. (2018). Advances in Carbon Nanotubes-Hydrogel Hybrids in Nanomedicine for Therapeutics. *Advanced healthcare materials*, 7(9), e1701213. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701213>
213. Vitale, I., Pietrocola, F., Guilbaud, E., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostini, M., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Aqeilan, R. I., Arama, E., Baehrecke, E. H., Balachandran, S., Bano, D., Barlev, N. A., Bartek, J., Bazan, N. G., ... Galluzzi, L. (2023). Apoptotic cell death in disease - Current understanding of the NCCD 2023. *Cell death and differentiation*, 30(5), 1097–1154. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01153-w>
214. Wadhwa, R., Takano, S., Kaur, K., Deocaris, C. C., Pereira-Smith, O. M., Reddel, R. R., & Kaul, S. C. (2006). Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis. *International journal of cancer*, 118(12), 2973–2980. <https://doi.org/10.1002/ijc.21773>
215. Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., & Kim, Y. Y. (2010). MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et biophysica acta*, 1803(11), 1231–1243. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.06.013>
216. Walton, K.M., Fisher, K.H., Rubitski, D.M., Marconi, M.A., Meng, Q., Sládek, M., Adams, J., Bass, M., Chandrasekaran, R., Butler, T.W., Matt, Griffor, Rajamohan, F., Serpa, M., Chen, Y.L., Claffey, M.C., Michael, Hastings, Loudon, A.S., Maywood, E.S., Ohren, J.F., & Doran, A.C. (2009). Selective Inhibition of Casein Kinase 1 Epsilon Minimally Alters Circadian Clock Period. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.151415>
217. Wan, R., Mo, Y., Feng, L., Chien, S., Tollerud, D. J., & Zhang, Q. (2012). DNA damage caused by metal nanoparticles: involvement of oxidative stress and activation of ATM. *Chemical research in toxicology*, 25(7), 1402–1411. <https://doi.org/10.1021/tx200513t>
218. Wang, C., Jiang, K., Gao, D., Kang, X., Sun, C., Zhang, Q., Li, Y., Sun, L., Zhang, S., Guo, K., & Liu, Y. (2013). Clusterin protects hepatocellular carcinoma

- cells from endoplasmic reticulum stress induced apoptosis through GRP78. *PloS one*, 8(2), e55981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055981>
219. Wang, E. C., & Wang, A. Z. (2014). Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro*, 6(1), 9–26. <https://doi.org/10.1039/c3ib40165k>
220. Wang, H., Zheng, X., Jin, J., Zheng, L., Guan, T., Huo, Y., Xie, S., Wu, Y., & Chen, W. (2020). LncRNA MALAT1 silencing protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through miR-145 to regulate AQP4. *Journal of biomedical science*, 27(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00635-0>
221. Wang, R., Hu, Y., Song, G., Hao, C. J., Cui, Y., Xia, H. F., & Ma, X. (2012). MiR-206 regulates neural cells proliferation and apoptosis via Otx2. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 29(3-4), 381–390. <https://doi.org/10.1159/000338493>
222. Wang, W., Liu, Z., Chen, X., Lu, Y., Wang, B., Li, F., Lu, S., & Zhou, X. (2021). Downregulation of FABP5 Suppresses the Proliferation and Induces the Apoptosis of Gastric Cancer Cells Through the Hippo Signaling Pathway. *DNA and cell biology*, 40(8), 1076–1086. <https://doi.org/10.1089/dna.2021.0370>
223. Wang, Y., Li, G., Zhao, L., & Lv, J. (2018). Long noncoding RNA HOTTIP alleviates oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury via modulating miR-143/hexokinase 2 pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 119(12), 10107–10117. <https://doi.org/10.1002/jcb.27348>
224. Ward, A. C., & Lieschke, G. J. (2002). The zebrafish as a model system for human disease. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 7, d827–d833. <https://doi.org/10.2741/A814>
225. Wick, P., Louw-Gaume, A. E., Kucki, M., Krug, H. F., Kostarelos, K., Fadeel, B., Dawson, K. A., Salvati, A., Vázquez, E., Ballerini, L., Tretiach, M., Benfenati, F., Flahaut, E., Gauthier, L., Prato, M., & Bianco, A. (2014). Classification framework for graphene-based materials. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 53(30), 7714–7718. <https://doi.org/10.1002/anie.201403335>

226. Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., & Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological reports: PR*, 64(5), 1020–1037. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(12)70901-5)
227. Woehlbier, U., & Hetz, C. (2011). Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. *Trends in biochemical sciences*, 36(6), 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.001>
228. Wu, J., Kaufman, R. (2006) From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ* 13, 374–384. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401840>
229. Wu, W., Li, R., Bian, X., Zhu, Z., Ding, D., Li, X., Jia, Z., Jiang, X., & Hu, Y. (2009). Covalently combining carbon nanotubes with anticancer agent: preparation and antitumor activity. *ACS nano*, 3(9), 2740–2750. <https://doi.org/10.1021/nn9005686>
230. Xiao, W., Wang, R. S., Handy, D. E., & Loscalzo, J. (2018). NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. *Antioxidants & redox signaling*, 28(3), 251–272. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7216>
231. Xu, R., Yuan, Z., Yang, L., Li, L., Li, D., & Lv, C. (2017). Inhibition of NAMPT decreases cell growth and enhances susceptibility to oxidative stress. *Oncology reports*, 38(3), 1767–1773. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5793>
232. Yang, L., Kuang, H., Zhang, W., Aguilar, Z. P., Wei, H., & Xu, H. (2017). Comparisons of the biodistribution and toxicological examinations after repeated intravenous administration of silver and gold nanoparticles in mice. *Scientific reports*, 7(1), 3303. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03015-1>
233. Yang, M., & Zhang, M. (2019). Biodegradation of Carbon Nanotubes by Macrophages. *Frontiers in Materials* 6, 225. <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00225>
234. Yapijakis C. (2020). Regulatory Role of MicroRNAs in Brain Development and Function. *Advances in experimental medicine and biology*, 1195, 237–247. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32633-3_32

235. Yavorovsky, A. P., Minchenko, D. O., Solokha, N. V., Shish, A. M., & Minchenko, O. H. (2017). Genotoxic and cytotoxic effects of titanium nitride and chromium disilicide nanoparticles as a criterion for the effect on the body. *Likars'ka Sprava*, (8), 3-8. <https://doi.org/10.31640/LS-2017-8-01>
236. Yin, Z. F., Wu, L., Yang, H. G., & Su, Y. H. (2013). Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide. *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, 15(14), 4844–4858. <https://doi.org/10.1039/c3cp43938k>
237. Yu, K. N., Chang, S. H., Park, S. J., Lim, J., Lee, J., Yoon, T. J., Kim, J. S., & Cho, M. H. (2015a). Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagic Cell Death via Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane Disruption in Normal Lung Cells. *PloS one*, 10(6), e0131208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131208>
238. Yu, Z., Li, Q., Wang, J., Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q., & Li, P. (2020). Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field. *Nanoscale research letters*, 15(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03344-7>
239. Yu, Z., Sun, Q., Pan, W., Li, N., & Tang, B. (2015b). A Near-Infrared Triggered Nanophotosensitizer Inducing Domino Effect on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Burst for Cancer Therapy. *ACS nano*, 9(11), 11064–11074. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b04501>
240. Zhang, H., Zhou, Y., Cui, B., Liu, Z., & Shen, H. (2020). Novel insights into astrocyte-mediated signaling of proliferation, invasion and tumor immune microenvironment in glioblastoma. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 126, 110086. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110086>
241. Zhang, R., Piao, M. J., Kim, K. C., Kim, A. D., Choi, J. Y., Choi, J., & Hyun, J. W. (2012). Endoplasmic reticulum stress signaling is involved in silver nanoparticles-induced apoptosis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(1), 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.019>
242. Zhang, X., Xu, Y., & Ye, B. (2018). An efficient electrochemical glucose sensor based on porous nickel-based metal organic framework/carbon nanotubes

- composite (Ni-MOF/CNTs). *Journal of Alloys and Compounds*.
<https://doi.org/10.1016/J.JALLCOM.2018.07.175>
243. Zhang, Y., Lv, X., Chen, L., & Liu, Y. (2022). The role and function of CLU in cancer biology and therapy. *Clinical and experimental medicine*, 10.1007/s10238-022-00885-2. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00885-2>
244. Zhang, Z., Wang, Y., Wang, Y., Wang, C., Shuai, Y., Luo, J., Liu, R. (2021) BCAR3 promotes head and neck cancer growth and is associated with poor prognosis. *Cell Death Discov.* 7, 316. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00714-7>
245. Zhao, Q., Luo, T., Gao, F., Fu, Y., Li, B., Shao, X., Chen, H., Zhou, Z., Guo, S., Shen, L., Jin, L., Cen, D., Zhou, H., Lyu, J., & Fang, H. (2022). GRP75 Regulates Mitochondrial-Supercomplex Turnover to Modulate Insulin Sensitivity. *Diabetes*, 71(2), 233–248. <https://doi.org/10.2337/db21-0173>
246. Zhou, Y., Fang, Y., & Ramasamy, R. P. (2019). Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes for Electrochemical Biosensor Development. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 19(2), 392. <https://doi.org/10.3390/s19020392>
247. Zoroddu, M. A., Medici, S., Ledda, A., Nurchi, V. M., Lachowicz, J. I., & Peana, M. (2014). Toxicity of nanoparticles. *Current medicinal chemistry*, 21(33), 3837–3853. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140601162314>
248. Мінченко Д.О., Кубайчук К.І., Губеня О.В., Кривдюк І.В., Хоменко Є.В., Герасименко Р.М., Сулік Р.В., Мурашко Н.К., Мінченко О.Г. (2013) Стрес ендоплазматичного ретикулума та ангиогенез. *Фізіол. журн.*, Т. 59, № 4

Додаток 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Rudnytska O.V., Khita O.O., Minchenko D.O., Tsymbal D.O., Yefimova Y.V., Sliusar M.Y., Minchenko O.H. The low doses of SWCNTs affect the expression of proliferation and apoptosis related genes in normal human astrocytes. *Current Research in Toxicology*, 2021, 2: 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.crttox.2021.02.001> (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів CLU, DNAJB9, IGFBP3, IGFBP6 і мікроРНК miR-19-3p, miR-27-3p, miR-145-5p, обробка даних та участь у написанні статті*) (Scopus і PubMed, Q3)
2. Minchenko OH, Khita OO, Rudnytska OV, Yefimova YV, Tsymbal DO, Minchenko DO, Sliusar MY, He Q, Liu K. The impact of single walled carbon nanotubes on the expression of microRNA in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Endocr. Regul.* 2022 Apr 30; 56(2): 115-125. <https://doi.org/10.2478/enr-2022-0013> (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії мікроРНК miR-143-3p, miR-145-5p, miR-182-5p і miR-206-5p, обробка даних та участь у написанні статті*) (Scopus і PubMed, Q3)
3. Rudnytska OV, Kulish YV, Khita OO, Minchenko DO, Tsymbal DO, Viletska YM, Sliusar MY, Trufanova DD, Minchenko OH. Exposure to nanographene oxide induces gene expression dysregulation in normal human astrocytes. *Endocr. Regul.* 2022 Jul 13; 56(3): 216-226. <https://doi.org/10.2478/enr-2022-0023> (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів BCAR3, BRCA1, NAMPT, TSPAN13 і мікроРНК miR-96-5p, miR-145-5p, обробка даних та участь у написанні статті*) (Scopus і PubMed, Q3)
4. Minchenko D.O., Rudnytska O.V., Khita O.O., Kulish Y.V., Viletska Y.M., Halkin O.V., Danilovskyi S.V., Ratushna O.O., Minchenko O.H. Expression of DNAJB9 and some other genes is more sensitive to SWCNTs in normal human astrocytes than glioblastoma cells. *Endocr. Regul.*, 2023, 57 (3): 162-172. <https://doi.org/10.2478/enr-2023-0020> (*Особистий внесок здобувача –*

дослідження експресії генів *BRCA1*, *CLU* і *DNAJB8*, обробка даних та участь у написанні статті) (Scopus і PubMed, Q3)

5. Рудницька О.В., Цимбал Д.О., Мінченко Д.О., Некрасова В.Ю., Мінченко О.Г. Генотоксичність карбонових наночастинок. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, Тернопіль, 30.9-4.10, 2019. Медична та клінічна хімія, 2019, 21, 3 (80; додаток): 283-284.

6. Рудницька О.В., Мінченко Д.О., Цимбал Д.О., Мінченко О.Г. Генотоксична дія одностінних карбонових нанотрубок. 5-а Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 1-2.10, 2020: 37-38.

7. Єфімова Ю.В., Рудницька О.В., Цимбал Д.О., Мінченко О.Г. Експресія мікроРНК в ембріонах *Danio rerio* за дії одностінних карбонових нанотрубок. 5-а Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 1-2.10, 2020: 41-42.

8. Sliusar M.Y., Rudnytska O.V., Khita O.O., Minchenko D.O., Yefimova Y.V., Minchenko O.H. Effect of single-walled carbon nanotubes on the expression of proliferation and apoptosis related genes in normal human astrocytes. Физико-химическая биология как основа современной медицины: тезисы докладов участников Международной научной конференции, посвященной 75-летию со дня рождения профессора Е. В. Барковского, г. Минск, 21 мая 2021 г., БГМУ: 259-260.

9. Rudnytska O., Yefimova Y., Minchenko O. Single walled carbon nanotubes affect the expression of microRNA and brain development in *Danio rerio* embryos. Modern Science: Innovations and Prospects, Proc. V Int. Sci. Pract. Conf., Feb. 6-8, 2022, Stockholm, Sweden: 64-66.

10. Yefimova Y., Rudnytska O., Tsymbal D., Minchenko O. Single walled carbon nanotubes affect the expression of microRNAs and brain development in *Danio rerio* embryos. 4th RECOOP Int. Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sci. Conf., April 7-8, 2022, Prague, Czech Republic: 143.

11. Rudnytska O., Kulish Y., Trufanova D., Minchenko O. Graphene oxide affect the expression of proliferation related genes *Biotechnologia Acta*, 2022, Vol.15, № 2, 68-69 (Наукова конференція молодих науковців IBX «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2022»)

12. Рудницька О. Порухення експресії генів у нормальних астроцитах людини під впливом наночастинок оксиду графену. 6-та Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро 6-7. 10, 2022. Дніпро, вид. “Ліра” 2022: 34-35

13. Куліш Ю, Хіта О., Рудницька О., Мінченко О. Роль стресу ендоплазматичного ретикулума в механізмі дії наночастинок, 6-та Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро 6-7. 10, 2022. Дніпро, вид. “Ліра” 2022: 31-32

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Результати досліджень були представлені на вітчизняних та міжнародних конгресах та конференціях:

- XII Український біохімічний конгрес, м. Тернопіль 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. (стендова доповідь);
- 5-та Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, м. Дніпро, 1-2 жовтня 2020 р. (усна доповідь онлайн);
- Физико-химическая биология как основа современной медицины: Международная научная конференция, посвященная 75-летию со дня рождения профессора Е. В. Барковского, г. Минск, 21 мая 2021 г., БГМУ (тезисы).
- 6-та Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, м. Дніпро, 6-7 жовтня 2022 р. (усна доповідь онлайн);
- V International scientific and practical conference “Modern Science: Innovations and Prospects”, Stockholm, Sweden, February 6-8 2022 (abstract);

- 4th RECOOP International Student Conference and 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conference, April 7-8, 2022, Prague, Czech Republic (abstract);
- Наукова конференція-конкурс для молодих науковців ІБХ “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2022”, м. Київ, 31 травня 2022 р. (усна доповідь).