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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КУЛІШ
Юлія Володимирівна

УДК 577.112.7:616

ДИСЕРТАЦІЯ

ВПЛИВ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОЧАСТИНОК НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ ТА мікроРНК

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.
_____/ Юлія КУЛІШ/

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

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Юлія КУЛІШ. Вплив вуглецевих наночастинок на експресію генів транскрипційних факторів та мікроРНК. – 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, 2025.

Дисертація присвячена вивченню молекулярних механізмів дії вуглецевих наночастинок, таких як оксид графену (GrO) та одностінні вуглецеві нанотрубки (SWCNTs), на експресію генів важливих транскрипційних та регуляторних факторів і мікроРНК у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS, а також у клітинах гліобластоми лінії U87MG для вияснення чутливості нормальних і пухлинних клітин до дії цих наночастинок і з'ясування значення стресу ендоплазматичного ретикулума (ЕР) у молекулярних механізмах їх дії.

Актуальність теми пов'язана з постійно зростаючим застосуванням різних за природою і структурою наночастинок у різноманітних галузях, у тому числі у біології та медицині, зокрема для діагностики і лікування онкологічних захворювань, а також багатьох інших патологій. Вуглецеві наночастинки вважаються найбільш перспективними завдяки високій стабільності та великій різноманітності їх структури. Разом з тим, молекулярні механізми їх впливу на клітини злоякісних пухлин і функціонування геному в них залишаються ще недостатньо з'ясованими, а ще менше відомо про можливий вплив вуглецевих наночастинок, як і наночастинок іншої природи, на нормальні клітини організму, тим паче на клітини головного мозку. На даний момент уже є дані про численні негативні наслідки застосування вуглецевих наночастинок, таких як оксид графену та SWCNTs. Це є особливо важливим попередженням до застосування вуглецевих наночастинок для лікування злоякісних

новоутворень, оскільки користь від такого лікування повинна перевищувати можливу потенційну шкоду, яка може бути завдана здоровим клітинам організму. І саме тому, на першому плані має стояти поглиблене і всебічне вивчення молекулярних механізмів дії не лише вуглецевих, а й інших, різних за природою, наночастинок на нормальні клітини всіх органів та тканин організму. І лише за умов відсутності негативних ефектів, можна розглядати можливість їх використання у біології і медицині.

Вірогідним молекулярним механізмом дії на клітини наночастинок різної природи та структури є стрес ЕР. Він підтримує гомеостаз, а за умов дії різних токсичних речовин, підтримує життєдіяльність клітин змінюючи метаболічні процеси і збільшуючи життєздатність клітин, їх адаптацію до нових умов існування. У випадку довготривалих і тяжких негативних впливів – призводить до запуску спеціальної, специфічної для ЕР, програми загибелі клітин або утворення та росту злоякісних пухлин.

Важливим завданням цієї роботи було дослідити вплив вуглецевих наночастинок, таких як оксид графену та одностінні вуглецеві нанотрубки на експресію генів залежних від стресу ЕР транскрипційних та інших факторів у нормальних астроцитах людини (NHA/TS) та клітинах гліобластоми, з метою порівняти чутливість експресії досліджених генів до впливу вуглецевих наночастинок у звичайних та пухлинних клітинах. Для вияснення механізмів впливу вуглецевих наночастинок на клітини головного мозку були проведені досліди по виявленню змін в експресії мікроРНК у астроцитах та ембріонах рибок *Danio rerio,* використовуючи наявні у відділі препарати РНК із цих ембріонів. Отримані результати сприяють розшифровці механізмів появи різних порушень за умов використання цих наночастинок як для діагностичних, так і терапевтичних цілей, зокрема, для терапії онкологічних захворювань.

Для виконання дисертаційної роботи були задіяні новітні біохімічні та молекулярно-біологічні методи: вирощування клітин, отримання РНК, визначення спектрів поглинання РНК на спектрофотометрі, синтез кДНК з

використанням зворотної транскриптази, методи кількісної ПЛР у реальному часі, зворотної транскрипції мікроРНК, аналіз ампліфікатів електрофорезом у агарозному гелі, методи біоінформатики і статистики отриманих результатів.

Для з'ясування впливу наночастинок оксиду графену та SWCNTs на NHA/TS і клітини гліобластоми на рівні ми провели дослідження рівня експресії генів, що кодують ключові транскрипційні фактори: **DDIT3** (DNA Damage Inducible Transcript 3), відомий ще як CHOP або GADD153, **ATF3** (Activating Transcription Factor 3), **ATF4** *(*Activating Transcription Factor 4)*,* **E2F1** (E2F Transcription Factor 1), **TP53** (Tumor Protein 53), **TFPI2** (Tissue Factor Pathway Inhibitor 2) та **ZNF395** (Zinc Finger Protein 395), а також важливі, залежні від стресу ЕР, регуляторні фактори та ензими: **HBEGF** (Heparin binding epidermal growth factor like growth factor), також відомий як рецептор дифтерійного токсину, **TOB1** (Transducer of ERBB2, 1), **DNAJB9** (DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B9), **HSPA5** (Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5), **EDEM1** (ER Degradation-Enhancing Alpha-Mannosidase-Like Protein 1), **P4HA1** (Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 1), **P4HA2** (Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 2), **IDH2** (Isocitrate Dehydrogenase), **AK3** (Adenylate kinase 3), **PTGS2** (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2), **GJA1** (Gap Junction Protein Alpha 1), **KRT18** (Keratin 18) і **MEST** (Mesoderm Specific Transcript). Для цього були вибрані відносно малі дози як оксиду графену (1 та 4 нг/мл), так і одностінних вуглецевих нанотрубок (2 та 8 нг/мл). Варто відмітити, що більшість із досліджених генів є поліфункціональними та тісно пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулума та розвитком канцерогенезу, а це є важливим для вияснення генотоксичної дії вуглецевих наночастинок на нормальні астроцити у порівнянні з клітинами гліобластоми. Для вирішення проблеми про роль стресу ЕР у механізмах дії вуглецевих наночастинок на функціональну активність геному були також використані клітини гліобластоми з пригніченим ERN1, основним сигнальним протеїном стресу

ЕР, який контролює експресію сотень генів, у тому числі й генів транскрипційних факторів.

У зв’язку з тим, що мікроРНК є важливими регуляторами експресії численних мРНК на пост-транскрипційному рівні і задіяні у нейрогенезі, причому зміни в їх експресії можуть впливати на рівень експресії обраних нами мРНК транскрипційних факторів, а також інших регуляторних факторів та ензимів, були також проведені біоінформаційні дослідження по виявленню сайтів зв'язування мікроРНК з 3’-нетранслюємими ділянками мРНК і з'ясуванню впливу оксиду графену та одностінних вуглецевих нанотрубок на рівень експресії деяких мікроРНК.

МікроРНК є важливими регуляторами розвитку головного мозку, а тому для вияснення можливої дії вуглецевих нанотрубок на клітини мозку ми провели вивчення впливу малих доз цих вуглецевих наночастинок на рівень експресії мікроРНК miR-19a-3p, miR-21-5p і miR-96-5p, які тісно пов'язані з контролем метаболізму, нейрогенезом та проліферацією клітин, у ембріонах рибок *Danio rerio*.

Проведеними дослідженнями встановлено, що рівень експресії таких транскрипційних факторів як DDIT3, ATF3 і TP53 у нормальних астроцитах людини є дуже чутливим до дії на них наночастинок оксиду графену у дозі як 1, так і 4 мкг/мл, причому експресія *DDIT3* та *ATF3* посилювалася, а *TP53* – знижувалася. Рівень експресії інших досліджених транскрипційних факторів у нормальних астроцитах також підвищувався, але у меншій мірі і дозо-залежно. У той же час, рівень експресії усіх досліджених генів транскрипційних факторів у клітинах гліобластоми за дії на них тих же доз наночастинок оксиду графену був значно меншим порівняно з нормальними астроцитами, хоча направленість змін була подібною. Ці результати є принципово новими і важливими, оскільки демонструють значно більшу чутливість нормальних клітин порівняно з пухлинними клітинами до дії наночастинок оксиду графену, що може бути обумовлено полі-резистентністю клітин гліобластоми.

Результати досліджень багатьох авторів вказують на причетність сенсорно-сигнальних шляхів стресу ЕР, як відповіді на неправильно згорнуті протеїни, до прояву токсичної дії наночастинок. Саме тому ми проведели досліди на пухлинних клітинах, а саме гліобластоми, із пригніченими протеїнкіназною і ендорибонуклеазною активностями протеїну ERN1, що опосередковує реакцію на стрес ЕР. Було показано, що у таких клітинах гліобластоми чутливість експресії усіх досліджених нами генів транскрипційних факторів до дії оксиду графену різко зменшується порівняно з тими клітинами гліобластоми, які мали нативний протеїн ERN1. Це вказує на опосередкованість впливу наночастинок оксиду графену на експресію генів транскрипційних факторів стресом ЕР, зокрема ERN1.

Аналогічні результати були отримані при дослідженні впливу оксиду графену на рівень експресії генів низки регуляторних факторів та ензимів, які продемонстрували значно більшу чутливість експресії цих генів у нормальних астроцитах порівняно до клітин гліобластоми, а також опосередкованість ERN1 ефектів оксиду графену на експресію генів.

Методами біоінформатики було виявлено сайти зв’язування мікроРНК miR-182-5p з мРНК *HBEGF* та *TOB1* і проведено дослідження рівня експресії цієї мікроРНК за дії наночастинок оксиду графену на нормальні астроцити і клітини гліобластоми. Встановлено, що рівень miR-182-5p знижується за дії оксиду графену дозо-залежно як у нормальних астроцитах, так і клітинах гліобластоми, але у нормальних клітинах більш виражено. Оскільки мікроРНК miR-182-5p має сайти зв’язування на 3’-послідовностях мРНК *HBEGF* та *TOB1*, то важливо відмітити, що зниження рівня експресії цієї мікроРНК асоціюється з підвищеною експресією як мРНК *TOB1*, так і мРНК *HBEGF*. Ці результати вказують на можливість і пост-транскрипційної регуляції експресії мРНК *HBEGF* та *TOB1* під впливом оксиду графену на NHA/TS і клітини гліобластоми.

Окрім того, вперше було показано, що вуглецеві нанотрубки також проявляють виражений вплив на рівень експресії низки транскрипційних та

інших регуляторних факторів, які задіяні у регуляції проліферації клітин, як у нормальних клітинах, так і у клітинах гліобластоми, причому пухлинні клітини були менш чутливими до дії цих вуглецевих наночастинок. Можна припустити, що це обумовлено полі-резистентністю клітин гліобластоми, яка детермінується саме стресом ЕР. Виявлена залежність впливу цих наночастинок на експресію досліджених генів від протеїну ERN1.

Так, результати дослідження впливу вуглецевих наночастинок на нормальні астроцити та клітини гліобластоми вперше продемонстрували їх гено-специфічний характер дії на експресію низки генів, асоційованих з контролем процесів метаболізму та проліферації клітин. Важливо відмітити, що дія наночастинок графену була більшою у порівнянні з дією вуглецевих нанотрубок. Більшість із досліджених нами генів є полі-функціональними і асоційовані з ростом злоякісних пухлин. Відомо також, що зниження рівня експресії деяких із цих генів сприяє пригніченню не лише проліферації клітин, а і їх метастазування.

Таким чином, зміни в експресії мРНК та мікроРНК саме у нормальних астроцитах можуть започаткувати розвиток змін у нервовій системі. Проведені нами дослідження рівня експресії мікроРНК у ембріонах рибок *Danio rerio* за дії різних концентрацій вуглецевих нанотрубок показали, що уже через 24 години спостерігається дозо-залежне зниження експресії мікроРНК miR-19a-3p та miR-21-5p, а через 72 години – різке пригнічення експресії не лише цих мікроРНК, а і miR-96-5p, причому ці результати добре узгоджуються з появою у головному мозку ембріонів виражених токсичних проявів й істотно залежали від дози нанотрубок.

Наукова новизна дисертаційної роботи полягає у виявлені істотних змін рівня експресії генів важливих транскрипційних і регуляторних факторів, що контролюють процеси метаболізму та проліферації клітин, у нормальних і пухлинних клітинах за дії на них наночастинок оксиду графену і SWCNTs, причому їх ефект був значно сильнішим у нормальних астроцитах в порівнянні з клітинами гліобластоми лінії U87MG. Також

вперше було показано, що дія цих вуглецевих наночастинок на експресію різних генів переважно опосередковується стресом ендоплазматичного ретикулума, оскільки за умов пригнічення ERN1, головного сигнального шляху цього стресу, ефект як наночастинок GrO, так і SWCNTs, істотно зменшувався. Отримані результати продемонстрували вагому роль ензиматичної активності ERN1 у контролі експресії стрес-залежних транскрипційних факторів (DDIT3, ATF3, ATF4, E2F1 та TP53), так і важливих регуляторних факторів та ензимів (DNAJB9, HBEGF, TOB1, EDEM1, DDX58, P4HA2, TFPI2 і IDH2). Вперше показано, що наночастинки оксиду графену впливають на рівень експресії мікроРНК, які є важливими регуляторами експресії генів *HBEGF, TOB1* та *TP53* на пост-транскрипційному рівні за рахунок наявності в їх мРНК специфічних сайтів зв'язування, оскільки збільшення рівня мРНК HBEGF і TOB1 узгоджувалося зі зниженням рівня специфічної до них мікроРНК miR-182-5p, а зменшення рівня експресії мРНК TP53 – із підвищенням miR-96-5p.

Вперше встановлено, що NHA/TS проявляють більшу чутливість до дії наночастинок оксиду графену та одностінних вуглецевих нанотрубок на рівні експресії генів ключових транскрипційних факторів і стрес-залежних протеїнів, якщо порівнювати з клітинами гліоми. Так, під впливом наночастинок оксиду графену і одностінних вуглецевих нанотрубок рівень експресії генів *DDIT3, ATF3* та *DNAJB9* змінюється у нормальних астроцитах більш виражено порівняно з клітинами гліобластоми як за дії менших, так і більших доз цих вуглецевих наночастинок, причому знижена чутливість клітин гліобластоми до їх дії може бути обумовлена полі-резистентністю пухлинних клітин, обумовлених стресом ЕР.

Практичне значення отриманих нами результатів визначається тим, що клітини гліобластоми менш чутливі до впливу наночастинок оксиду графену та SWCNT порівняно з NHA/TS, що оцінювалося за рівнем експресії генів ключових транскрипційних і регуляторних факторів. Цей результат є дуже важливим попередженням до використання досліджених

нами вуглецевих наночастинок у біомедицині без детального вивчення їх можливого впливу на різні нормальні клітини організму, на функціональну активність геному в них. Варто відмітити, що зміни в експресії важливих транскрипційних і регуляторних факторів, які індукуються наночастинками оксиду графену та SWCNTs, дають можливість виявляти досить чутливі генетичні маркери порушення метаболічних процесів, а це є важливим для виявлення небезпечних для здоров'я побічних ефектів.

Отримані результати досліджень вказують на вагомість вияснення молекулярних механізмів дії наночастинок оксиду графену і вуглецевих нанотрубок при оцінці біологічної безпеки їх застосування для різних цілей у біології та медицині, оскільки за дії як наночастинок оксиду графену, так і одностінних вуглецевих нанотрубок істотно порушується експресія генів важливих, контролюючих метаболізм транскрипційних та регуляторних факторів шляхом змін у функціонуванні геному опосередковано через стрес ЕР. Ідентифіковані зміни в експресії як мРНК, так і мікроРНК, можуть віддзеркалювати можливі механізми розвитку різних патологічних станів на молекулярному рівні та можуть використовуватися для визначення токсичної дії наночастинок.

Ключові слова: вуглецеві наночастинки, експресія генів, транскрипційні фактори, мікроРНК, HBEGF, TOB1, ACTB, пригнічення ERN1, мРНК, кількісна ПЛР, геном, стрес, ендоплазматичний ретикулум, нормальні астроцити, пухлинні клітини.

ANNOTATION

Kulish Y.V. The effect of carbon nanoparticles on the expression of genes of transcription factors and microRNA. – Qualification scientific work as a manuscript.

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, 2025.

The dissertation is devoted to the study of the molecular mechanisms of action of carbon nanoparticles, such as graphene oxide and single-walled carbon nanotubes (SWCNTs), on gene expression of important transcription factors and microRNAs in normal human astrocytes of the NHA/TS line, as well as in glioblastoma cells of the U87MG line to elucidate the sensitivity of normal and tumor cells to the action of these nanoparticles and to elucidate the significance of endoplasmic reticulum (ER) stress in the molecular mechanisms of their action.

The significance of this work is linked to the constantly growing use of nanoparticles of different natures and structures in various fields, including biology and medicine, in particular for cancer diagnosis as well as treatment, and much other pathology. Carbon nanoparticles are considered the most promising due to their great constancy and diversity of structure. At the same time, the molecular mechanism of their influence on the cells of malignant tumors and their genome remains insufficiently elucidated. Even less is known about the possible influences of carbon nanoparticles, and nanoparticles of another nature, on normal cells of the body, including astrocytes. There is evidence of numerous negative consequences of carbon using nanoparticles, such as graphene oxide (GrO) and single-walled carbon nanotubes (SWCNTs). The benefits of using nanoparticles for treat tumors should significantly outweigh their negative effects on normal cells of the body. And that is why the in-depth and comprehensive study of the molecular mechanisms of action of not only carbon, but also other, different in nature, nanoparticles on normal cells of all organs and tissues of the

body should be in the foreground. And only then, under the conditions of the absence of negative effects, it is rational to ask questions about the possibility of their use in biology and medicine for certain purposes.

A possible molecular mechanism of action on cells of nanoparticles of various nature and structure is ER stress. It reliably maintains homeostasis, and under the influence of various toxic substances, it supports the vital activity of cells by altering metabolic processes and enhancing cell viability, thereby facilitating their adaptation to new conditions of existence. In the case of long-term and severe negative effects, it leads to the launch of a special, specific for endoplasmic reticulum cell death program or the formation and growth of malignant tumors.

An important task of this work was to investigate the effect of carbon nanoparticles such as graphene oxide and single-walled carbon nanotubes on the expression of genes of ER stress-dependent transcription factors and some key regulatory factors in normal astrocytes (NHA/TS) and tumor (glioblastoma) cells to detect the effect of carbon nanoparticles on normal and tumor cells in terms of the sensitivity of the expression of the studied genes. To clarify the mechanisms of the effect of carbon nanoparticles on brain cells, experiments were conducted to detect changes in microRNA expression in astrocytes and embryos of Danio rerio, using RNA preparations from these embryos available in the department. The results obtained clarify the molecular mechanisms of the appearance of various disorders when using these nanoparticles for both diagnostic and therapeutic purposes, in particular, for the treatment of oncological diseases.

To carry out the dissertation work, the latest biochemical and molecular biological methods were used: cell cultivation, RNA extraction, determination of RNA absorption spectra on a spectrophotometer, cDNA synthesis using reverse transcriptase, methods of quantitative real-time PCR, reverse transcription of microRNA, analysis of amplificates by agarose gel electrophoresis, methods of bioinformatics, and statistics of the obtained results.

To elucidate the effects of graphene oxide nanoparticles and SWCNTs on NHA/TS and glioblastoma cells at the microscale, we conducted a study of the expression level of genes encoding key transcription factors: **DDIT3** (DNA Damage Inducible Transcript 3), also known as CHOP or GADD153, **ATF3** (Activating Transcription Factor 3), **ATF4** (Activating Transcription Factor 4), **E2F1** (E2F Transcrip4tion Factor 1), **TP53** (Tumor Protein 53), **TFPI2** (Tissue Factor Pathway Inhibitor 2) and **ZNF395** (Zinc Finger Protein 395), as well as important ER stress-dependent regulatory factors and enzymes: **HBEGF** (Heparin binding epidermal growth factor like growth factor), also known as diphtheria toxin receptor, **TOB1** (Transducer of ERBB2, 1), **DNAJB9** (DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B9), **HSPA5** (Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5), **EDEM1** (ER Degradation-Enhancing Alpha-Mannosidase-Like Protein 1), **P4HA1** (Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 1), **P4HA2** (Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 2), **IDH2** (Isocitrate Dehydrogenase), **AK3** (adenylate kinase 3), **PTGS2** (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2), **GJA1** (Gap Junction Protein Alpha 1), **KRT18** (Keratin 18) and **MEST** (Mesoderm Specific Transcript). For this, relatively small doses of both graphene oxide (1 and 4 ng/ml) and SWCNTs (2 and 8 ng/ml) were selected. It is worth noting that most of the studied genes are poly-functional and strictly related to ER stress and carcinogenesis, and this is important for clarifying genotoxicity in the action of carbon nanoparticles on normal astrocytes compared to tumor (glioblastoma) cells. To resolution the problem of the role of ER stress in the mechanisms of action of carbon nanoparticles on the functional activity of the genome, glioblastoma cells with suppressed ERN1, the main signaling protein of ER stress, which controls the expression of hundreds of genes, including the important transcription factor genes, were also used.

In connection with the fact that microRNAs are important regulators of the expression of numerous mRNAs at the post-transcriptional level and are involved in neurogenesis, and changes in their expression can affect the expression level of the mRNAs of transcription factors selected by us, as well as other regulatory

factors and enzymes, we also conducted bioinformatics studies to identify miRNA binding sites with 3'-untranslated mRNA regions and to determine the impact of graphene oxide and SWCNTs on the levels of some miRNA expressions.

Since miRNAs play an important role in the development of the brain, to clarify the possible influence of carbon nanotubes on the growth of brain tissue, an investigation of the impact of these nanoparticles on the level of microRNAs miR-19a-3p, miR-21-5p and miR-96-5p expressions was conducted, which are closely related to metabolic control, neurogenesis and cell proliferation, in *Danio rerio* fish embryos.

The conducted studies established that the level of expression of such transcription factors as DDIT3, ATF3, and TP53 in normal human astrocytes is very sensitive to the effect on them of graphene oxide nanoparticles in a dose of both 1 and 4 ng/ml, and the expression of *DDIT3* and *ATF3* increased, and *TP53* - decreased. The expression level of other investigated transcription factors also increased, but to a lesser extent and dose-dependently. At the same time, the level of expression of all studied genes of transcription factors in glioblastoma cells under the influence of the same doses of graphene oxide nanoparticles was significantly lower compared to normal astrocytes, although the direction of changes was similar. These results are fundamentally new and important, as they demonstrate significantly greater sensitivity of normal cells compared to tumor cells to the action of graphene oxide nanoparticles, which may be due to the poly-resistance of glioblastoma cells.

Since numerous studies testify to the possibility of the involvement of signaling pathways of endoplasmic reticulum stress in the application of the genotoxic effect of nanoparticles, we led investigations using glioblastoma cells with inhibited enzymatic activities of the signaling protein ERN1, the main sensory and signaling pathway of endoplasmic reticulum stress. It was shown by us that in such glioblastoma cells, the sensitivity of the expression of all the transcription factor genes we studied to the action of graphene oxide is

significantly reduced compared to those glioblastoma cells that had the native signaling protein ERN1. This indicates the indirect effect of graphene oxide nanoparticles on gene expression of transcription factors by ER stress, particularly by its signaling protein ERN1.

Similar results were obtained when studying the effect of graphene oxide on the level of gene expression of several regulatory factors and enzymes, which demonstrated a significantly greater sensitivity of the expression of these genes in normal astrocytes compared to glioblastoma cells, as well as the mediation of the revealed effects of graphene oxide on gene expression of ERN1, the main signaling protein ER stress.

Using bioinformatics methods, the binding sites of the microRNA miR-182-5p with the 3'-sequences of the *HBEGF* and *TOB1* mRNAs were identified, and the expression level of this miRNA under the action of graphene oxide nanoparticles on normal astrocytes and glioblastoma cells was studied. It was established that the level of miR-182-5p decreases under the action of graphene oxide in a dose-dependent manner in both normal astrocytes and glioblastoma cells, but is more pronounced in normal cells. Since miR-182-5p miRNA has binding sites on the 3'-sequences of *HBEGF* and *TOB1* mRNA, it is important to note that decreased expression of this miRNA is associated with increased expression of both *TOB1* mRNA and *HBEGF* mRNA. These results indicate the possibility of post-transcriptional regulation of *HBEGF* and *TOB1* mRNA expression under the action of graphene oxide on normal astrocytes and glioblastoma cells.

In addition, it was shown for the first time that carbon nanotubes also exert a marked effect on the level of several transcription and other regulatory factors expressions involved in the regulation of cell population proliferation, both in normal (NHA/TS) and in glioblastoma cells, and the tumor cells were less sensitive to these carbon nanoparticles action. It can be assumed that this is due to the poly-resistance of glioblastoma cells, which is determined by ER stress. The

dependence of the impact of different carbon nanoparticles on the studied gene expressions, specifically on the signaling protein ERN1, was also revealed.

Therefore, the results of our investigation of the influence of different carbon nanoparticles on normal cells (astrocytes) and glioblastoma cells demonstrated for the first time their gene-specific effect on the certain gene expressions associated with the control of metabolic processes and cell proliferation, and the impact of graphene nanoparticles was more noticeable compared to carbon nanotubes. It is worth noting that most of the genes we studied are poly-functional and associated with the growth of malignant tumors. It is also known that a decrease in the expression level of some of these genes contributes to cell proliferation and metastasis inhibition.

Thus, changes in mRNA and microRNA expression in normal astrocytes can initiate changes in the nervous system. Our studies of the level of miRNA in embryos of *Danio rerio* exposed to different doses of carbon nanotubes showed that after 24 hours there was a dose-dependent decrease in miR-19-3p and miR-21-5p miRNA expression, and after 72 hours – a sharp suppression of the expression of not only these microRNAs, but also miR-96-5p, and these results are well consistent with the appearance of pronounced neurotoxic effects in the brain of embryos at the early stages of embryonic development of the central nervous system and were dose-dependent.

The scientific innovation of the dissertation work lies in the identification of significant changes in the level of gene expression of important transcriptional and regulatory factors controlling the processes of metabolism and cell proliferation were detected in normal and tumor cells under the action of graphene oxide nanoparticles and SWCNTs. Their effect was comparatively stronger in normal astrocytes than in U87MG glioblastoma cells. It was also shown for the first time that the effect of these carbon nanoparticles on the expression of various genes is mainly mediated by endoplasmic reticulum stress, since under conditions of inhibition of ERN1, the main signaling pathway of this stress, the effect of both graphene oxide nanoparticles and SWCNTs was

significantly reduced. Our results established the significant role of the enzymatic activity of ERN1 in controlling the expression of ER stress-dependent transcription factors (DDIT3, ATF3, ATF4, E2F1 and TP53), as well as important regulatory factors and enzymes (DNAJB9, HBEGF, TOB1, EDEM1, DDX58, P4HA2, TFPI2 and IDH2). It was shown for the first time that graphene oxide nanoparticles affect the expression level of microRNAs, which are important regulators of HBEGF, TOB1, and TP53 gene expression at the post-transcriptional level due to the presence of specific binding sites in their mRNA, since the increase in *HBEGF* mRNA level and *TOB1* was consistent with a decrease in the level of their specific microRNA miR-182, and a decrease in the expression level of *TP53* mRNA - with an increase in miR-98.

It was first established that NHA/TS exhibit greater sensitivity to the action of graphene oxide nanoparticles and SWCNTs at the level of gene expression of key transcription factors and stress-dependent proteins, when compared to glioma cells. Consequently, graphene oxide nanoparticles and SWCNTs change the level of the *DDIT3*, *ATF3,* and *DNAJB9* gene expressions in normal astrocytes more pronouncedly compared to glioblastoma cells under the influence of both smaller and bigger doses of SWCNTs. The less pronounced response of glioblastoma cells to their action may be due to the poly-resistance of tumor cells due to the endoplasmic reticulum stress present in them.

The practical significance of our results is determined by the fact that glioblastoma cells are less sensitive to the effects of graphene oxide nanoparticles and SWCNTs compared to NHA/TS, which was assessed by the level of gene expression of key transcriptional and regulatory factors. This result is a very important warning to the use of carbon nanoparticles in biomedicine without a detailed study of their possible impact on various normal cells of the body, and on the functional activity of the genome. It is worth noting that changes in the expression of key transcriptional and regulatory factors induced by graphene oxide nanoparticles and SWCNTs make it possible to detect sensitive genetic

markers of metabolic disorders, which is important for detecting health-threatening side effects.

The obtained research results indicate the importance of elucidating the molecular mechanisms of action of graphene oxide nanoparticles and carbon nanotubes when assessing the biological safety of their use for various purposes in biology and medicine since gene expression is significantly disrupted under the action of both graphene oxide nanoparticles and single-walled carbon nanotubes significantly disrupt the expression of important genes that control the metabolism of transcriptional and regulatory factors by reprogramming the genome through endoplasmic reticulum stress. Identified disturbances in the expression of several mRNAs and microRNAs are considered as possible molecular mechanisms of the development of various pathologies and can be used to assess the toxic effects of various nanoparticles.

Keywords: carbon nanoparticles, gene expression, inhibition of ERN1, mRNA, microRNA, HBEGF, TOB1, transcription factor, ACTB, qPCR, genome, stress, endoplasmic reticulum, normal astrocytes, tumor cells.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Rudnytska O.V., Khita O.O., Minchenko D.O., Tsymbal D.O., **Yefimova Y.V. (Kulish 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. Curr. Res. Toxicol. 2021, 2: 64–71. doi: 10.1016/j.crtox.2021.02.001 *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів ZNF395, DJA1 та KRT18 і мікроРНК miR-7-5p, miR-10a-5p, miR-144-5p та miR-150-5p, обробка даних та участь у написанні статті).* Олена Хіта і Мирослава Слюсар допомагали у вивченні експресії *miR-10a-5p та KRT18*. Ольга Рудницька, Дмитро Мінченко та Дарія Цимбал приймали участь в обговоренні отриманих результатів і оформленні статті до друку. Олександр Мінченко керував дослідженнями та подав статтю до журналу. **Scopus і PubMed**

2. Minchenko O.H., Khita O.O., Rudnytska O.V., **Yefimova Y.V. (Kulish Y.V.)**, Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Sliusar M.Y., He Q., Liu K. The impact of single walled carbon nanotubes on the expression of microRNA in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Endocr. Regul. 2022, 56(2): 115-125. doi: 10.2478/enr-2022-0013. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії мікроРНК miR-19a-3p, miR-21-5p і miR-96-5p, обробка результатів та участь в оформленні публікації).* Олена Хіта і Мирослава Слюсар допомагали у вивченні експресії *miR-21-5p*. Ольга Рудницька, Дарія Цимбал та Дмитро Мінченко приймали участь в обговоренні отриманих результатів і оформленні статті для направлення до журналу. Q. He та K. Liu надали можливість О. Мінченку виконати дослідження з ембріонами і дозволили використати отримані препарати РНК для продовження досліджень в ІБХ. Олександр Мінченко керував дослідженнями та подав статтю до друку. **Scopus і PubMed**

3. Rudnytska O.V., **Kulish YV**, Khita O.O., Minchenko D.O., Tsymbal D.O., Viletska Y.M., Sliusar M.Y., Trufanova D.D., Minchenko O.H. Exposure

to nanographene oxide induces gene expression dysregulation in normal human astrocytes. Endocr. Regul. 2022, 56(3): 216-226. doi: 10.2478/enr-2022-0023. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PTGS2, P4HA1, і P4HA2, обробка даних та участь у написанні статті).* Олена Хіта і Мирослава Слюсар, а також студентка Дарія Труфанова допомагали у вивченні експресії гена *PTGS2*. Ольга Рудницька, Дмитро Мінченко та Дарія Цимбал приймали участь в обговоренні отриманих результатів і оформленні статті до друку. Олександр Мінченко керував дослідженнями та подав статтю для публікації у журналі. **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 TOB1, DDX58, TFPI2 і P4HA2, обробка даних та участь у написанні статті*). Юлія Вілецька допомагали у вивченні експресії гена *P4HA2 і TFPI2*. Ольга Рудницька, Дмитро Мінченко, Олена Хіта, Олег Галкін, Сергій Даніловський і Оксана Ратушна приймали участь в обговоренні отриманих результатів та оформленні статті. Олександр Мінченко керував дослідженнями, редагував та подав статтю до журналу. **Scopus і PubMed**

5. Minchenko O.H., **Kulish Y.V**., Viletska Y.M., Khita O.O., Rudnytska O.V., Kozynkevych H.E., Minchenko D.O. The expression of DNAJB9 in normal human astrocytes is more sensitive to nanographene oxide than in glioblastoma cells. Endocr. Regul. 2024, 58(4): 242-251. https://doi.org/10.2478/enr-2024-0029. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів DDIT3, ATF3, ATF4, TOB1 і DNAJB9, обробка отриманих результатів та участь у написанні статті*). Юлія Вілецька допомагала у вивченні експресії генів *EDEM1* і *IDH2*. Олена Хіта, Ольга Рудницька, Дмитро Мінченко та Галина Козинкевич приймали участь в

обговоренні отриманих результатів і оформленні статті до друку. Олександр Мінченко керував дослідженнями, редагував статтю та подав її до друку у журналі. **Scopus і PubMed**

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

7. Rudnytska O., **Yefimova Y. (Kulish 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.

8. **Yefimova Y. (Kulish 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.

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

10. **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.

11. Minchenko O.H., **Kulish Y.V.**, Rudnytska O.V. Expression of DDX58 and other mRNAs is more sensitive to SWCNTs in normal human astrocytes than U87MG cells. 1st International conference "Enlight Cancer

Days", September 28-29, 2023. BRIC, Bordeaux University; Talence, France, 2023: 81.

12. Rudnytska O.V., **Kulish Y.V.**, Khita O.O., Viletska Y.M. The impact of graphene oxide on the expression of endoplasmic reticulum stress-dependent genes is more pronounced in normal human astrocytes than glioblastoma cells. Конференція молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії і біотехнології – 2024». Biotech. acta, 2024, 17 (2): 67-69.

13. Rudnytska O.O., **Kulish Y.V.**, Viletska Y.M., Minchenko O.H. The genotoxic risks of using carbon nanoparticles in the brain tumor treatment. XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists, May 21-22, IMBG, Book of abstracts, Kyiv 2024: 47.

14. **Kulish Y.V.**, Rudnytska O.V., Minchenko O.H. The effect of single-walled carbon nanotubes and nanographene oxide on expression levels of TOB1, PTGS2 and HSPA5 in normal human astrocytes. International Research and Practice Conference "Nanotechnology and Nanomaterials", 21-24 of August, 2024, Uzhhorod: 322-323.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ATF3 – activation transcription factor 3 (активуючий транскрипційний фактор 3)

ATF4 – activation transcription factor 4 (активуючий транскрипційний фактор 4)

ATF6 – activation transcription factor 6 (активуючий транскрипційний фактор 6)

DDIT3 – DNA damage inducible transcript 3 (транскрипційний фактор 3, який індукує пошкодження ДНК)

DDX58 – DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58 (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) бокс-поліпептид 58), відомий ще як RIG1 (retinoic acid-inducible gene 1 protein)

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)

E2F1 – E2F transcription factor 1 (E2F транскрипційний фактор 1)

EDEM1 – endoplasmic reticulum degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1 (протеїн 1, подібний до альфа-маннозідази і посилює деградацію в ендоплазматичному ретикулумі)

eIF2α – alpha subunit of the eIF2 translation initiation complex (α-субодиниця комплексу ініціації трансляції eIF2)

EMT – epithelial–mesenchymal transition (епітелійно-мезенхімний перехід)

ERAD – endoplasmic-reticulum-associated protein degradation (асоційована з ендоплазматичним ретикулумом деградація протеїнів)

ERN1 – endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 (сигнальний шлях від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1) відомий ще як IRE1 – inositol-requiring enzyme 1 (залежний від іонзитолу ензим 1/

GADD34 – growth arrest and DNA-damage-inducible protein 34 (протеїн-34, що індукується за пошкодження ДНК і зупиняє ріст)

GrO – graphene oxide (оксид графену)

HBEGF – heparin binding epidermal growth factor like growth factor (фактор росту подібний до епідермального фактора росту, що зв'язує гепарин)

HSPA5 – heat shock protein family A (small) member 5 (член 9 родини А малих протеїнів теплового шоку), відомий ще як GRP78 (78-kDa glucose-regulated protein) та BiP (binding-immunoglobulin protein)

IDH2 – isocitrate dehydrogenase 2, NADP+ (ізоцитратдегідрогеназа 2, NADP+)

NHA – normal human astrocyte (нормальні астроцити людини)

P4HA1 – prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1 (альфа 1 субодиниця проліл-4-гідроксилази)

PERK – PKR-like endoplasmic reticulum kinase (подібна до PRK кіназа ендоплазматичного ретикулума)

PTGS2 – prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (простогландин-ендопероксидсинтаза)

qPCR – quantitative real-time polymerase chain reaction (кількісна полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі)

rGO – reduced graphene oxide (відновлений оксид графену)

siRNA – small interfering RNA (мала інтерферуюча РНК)

TP53 – tumor protein 53, transcription factor (протеїн пухлини 53, транскрипційний фактор)

SWCNTs – single-walled carbon nanotubes (одностінні вуглецеві нанотрубки)

TOB1 – transducer of ERBB2,1 (перетворювач ERBB2,1)

UPR – unfolded protein response (відповідь на незгорнуті протеїни)

XBP1 – X-box binding protein 1 (протеїн 1, що зв'язується з Х-боксом)

XBP1s – X-box binding protein 1, splice variant (протеїн 1, що зв'язується з Х-боксом, сплайс-варіант)

ZNF395 – Zinc finger protein 395, transcription factor (протеїн 395 цинкового пальця, транскрипційний фактор)

ЕР – ендоплазматичний ретикулум

ВСТУП

Актуальність теми. Рівень онкологічних захворювань постійно зростає у всьому світі, а високоефективного лікування так і немає. Особливо це стосується пухлин головного мозку, зокрема гліобластом, що є досить агресивними і тяжко піддаються лікуванню. Це обумовлено численними факторами. Гліобластоми характеризуються високою резистентністю до лікування, що обумовлено різними механізмами, у тому числі мікрооточенням цих злоякісних пухлин, а саме астроцитами, асоційованими з пухлиною [1, 2]. Саме вони “слугують” гліобластомам і вносять значний внесок у їх виживання, пригнічуючи імунну відповідь, посилюючи проліферацію клітин та їх інвазивність.

На даний момент, лікування гліобластом включає хірургічне видалення, опромінення, хіміотерапію та імунотерапію, але є значна кількість обмежень щодо їх застосування, зокрема полі-резистентність до лікарських препаратів, відсутність специфічності у терапії та поява цитотоксичних впливів на нормальні клітини.

Разом з тим, застосування різних наночастинок, а особливо вуглецевих наночастинок, таких як оксид графену і нанотрубки, є новим та можливо і перспективним напрямком розвитку ефективних способів як лікування, так і діагностики онкологічних захворювань, які можуть зняти більшість перерахованих вище обмежень. Ці вуглецеві наночастинки мають багато модифікованих варіантів і характеризуються більшою стійкістю, підвищеною проникністю та надовго затримуються у клітинах, що суттєво підвищує час їх дії та загальну токсичність як оксиду графену, так і нанотрубок [3].

Саме тому, перед активним впровадженням вуглецевих наночастинок, як і всіх інших наночастинок, у різні сфери біології та медицини необхідно провести різносторонні і поглиблені дослідження їх можливого впливу на

різні нормальні клітини організму, а особливо на їх генетичний апарат, на експресію генів швидкого реагування. Добре відомо, що пухлинні клітини характеризуються полі-резистентністю, причому вони мають чи виробляють резистентність не лише на лікарські препарати, а і на багато інших чинників порушення гомеостазу [4, 5]. А нормальні клітини, у тому числі і нормальні астроцити людини не мають такої резистентності і тому є більш чутливими їх гени до дії різних хімічних сполук. Це питання є дуже важливим для біології та медицини, адже недостатнє вияснення можливої негативної дії при використанні наноматеріалів, у тому числі вуглецевих наночастинок, істотно підвищує рівень ризиків як для здоров'я, так і життя людини.

Варто відмітити, що ті ж самі властивості наноматеріалів, які надають їм перевагу для використання у біології та медицині, несуть і потенційні ризики за умов їх використання. Це, перш за все, стосується їх стабільності, що детермінує розвиток довготривалого стресу ЕР під впливом цих наночастинок і метаболічних ускладнень, пов’язаних з цим. Відомо, що токсичність різних за природою і структурою наночастинок визначається не лише їх структурною організацією і хімічним складом, а перш за все від розмірів, форми, гідрофобності, здатності до утворення агломератів та комплексів із протеїнами [6].

Дослідження токсичності різних наночастинок, у тому числі наночастинок оксиду графену і нанотрубок, продемонстрували їх здатність змінювати життєздатність різних клітин, впливати на хроматин, у тому числі і на ДНК, а також порушувати експресію генів пов'язаних з проліферацією, клітинним циклом і виживанням клітин [7 - 16].

При вивченні генотоксичності наночастинок важливим є з’ясування дії на клітини саме малих доз для виявлення найбільш ранніх і високочутливих маркерів їх негативного впливу на експресію генів, а особливо стрес-залежних генів, і це є пріоритеним напрямом молекулярних досліджень. Вивченння дії наночастинок на геном і виявлення чутливих маркерів різноманітних порушень в експресії генів є надзвичайно важливим

підходом, причому важливим моментом цих досліджень є порівняльне визначення впливу наночастинок на функцію генів не лише у пухлинних клітинах, а і у різних нормальних клітинах та у піддослідних тварин з експериментальними моделями патологій. За таких умов можна ідентифікувати ті маркерні гени, по змінам експресії яких можна оцінювати порушення метаболізму та пробувати корегувати їх [17]. Отже, вивчення експресії важливих транскрипційних факторів та низки регуляторних протеїнів і ензимів у нормальних клітинах і клітинах злоякісних пухлин за дії різних вуглецевих наночастинок, зокрема наночастинок графену та вуглецевих нанотрубок нададуть можливість виявити негативні ефекти цих наночастинок та сприяти розробці оптимальних підходів до зниження негативних впливів.

Таким чином, виявлення можливих негативних ефектів дії вуглецевих наночастинок, зокрема оксиду графену та нанотрубок, по змінах в експресії генів ключових транскрипційних факторів й інших важливих регуляторних протеїнів до початку використання наночастинок у різних галузях біології та медицини є вкрай потрібним і досить актуальним напрямком наукових пошуків.

Мета і завдання дослідження

Мета дослідження: дослідити вплив малих доз наночастинок оксиду графену та вуглецевих нанотрубок на експресію генів, що кодують важливі транскрипційні фактори та інші регуляторні протеїни, які пов'язані з процесами проліферації, стресом ЕР і канцерогенезом, як у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS, так і у клітинах гліобластоми U87MG, а також на експресію мікроРНК.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні **завдання**:

1. Дослідити вплив оксиду графену на рівень експресії генів важливих транскрипційних факторів у нормальних астроцитах та клітинах гліобластоми.

2. Вивчити ефект оксиду графену на рівень експресії генів низки регуляторних протеїнів у нормальних астроцитах людини і клітинах гліобластоми.

3. Дослідити вплив одностінних вуглецевих нанотрубок на рівень експресії генів важливих транскрипційних факторів у нормальних астроцитах та клітинах гліобластоми.

4. Вивчити вплив вуглецевих нанотрубок на рівень експресії генів низки регуляторних протеїнів у нормальних астроцитах та клітинах гліобластоми.

5. Дослідити вплив різних доз вуглецевих наночастинок на рівень експресії мікроРНК в ембріонах *Danio rerio*.

Об’єкт дослідження: молекулярні механізми дії вуглецевих наночастинок на експресію генів транскрипційних факторів та важливих регуляторних протеїнів і мікроРНК, а також роль стресу ендоплазматичного ретикулума у цих механізмах.

Предмет дослідження: рівень експресії генів транскрипційних факторів та важливих регуляторних протеїнів і мікроРНК у нормальних астроцитах людини і клітинах гліобластоми, а також у препаратах РНК із ембріонів *Danio rerio* за дії малих доз вуглецевих наночастинок.

Методи дослідження. У ході виконання роботи були використанні сучасні методи біохімії та молекулярної біології: культивування клітин, виділення РНК, визначення кількості і спектральних характеристик РНК на нано-спектрометрі, синтез комплементарних ДНК за допомогою зворотної транскрипції для визначення рівня експресії мРНК і мікроРНК, методи кількісної полімеразної ланцюгової реакції для визначення рівня експресії мРНК і мікроРНК, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, методи біоінформатики для статистичного опрацювання результатів досліджень.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше встановлено, що у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS під впливом наночастинок оксиду графену відбуваються істотні зміни в експресії важливих транскрипційних факторів, а також низки регуляторних протеїнів і мікроРНК. У той же час, у клітинах гліобластоми були виявлені менш виражені зміни рівня експресії важливих транскрипційних факторів та регуляторних протеїнів і мікроРНК під впливом оксиду графену. Аналогічні зміни в експресії досліджених генів спостерігалися і за дії одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs) як у нормальних астроцитах, так і у клітинах гліобластоми, причому у нормальних клітинах зміни в експресії генів були також більш вираженими.

Вперше було показано, що дія наночастинок оксиду графену та вуглецевих нанотрубок на експресію різних генів переважно опосередковується стресом ендоплазматичного ретикулума, оскільки за умов пригнічення ERN1, головного сигнального шляху цього стресу, ефект як наночастинок оксиду графену, так і SWCNTs, різко зменшувався. Отримані результати продемонстрували важливу роль ензиматичної активності ERN1 у регуляції експресії генів як важливих, стрес-залежних транскрипційних факторів (DDIT3, ATF3, ATF4, E2F1 та TP53), так і вагомих регуляторних факторів та ензимів (DNAJB9, HBEGF, TOB1, EDEM1, DDX58, P4HA2, TFPI2 і IDH2). Вперше показано, що наночастинки оксиду графену впливають на рівень експресії мікроРНК, які є важливими регуляторами експресії генів *HBEGF, TOB1* та *TP53* на пост-транскрипційному рівні за рахунок наявності в їх мРНК специфічних сайтів зв'язування, оскільки збільшення рівня мРНК HBEGF і TOB1 узгоджувалося зі зниженням рівня експресії специфічної до них мікроРНК miR-182-5p, а зменшення рівня експресії мРНК TP53 – з підвищенням miR-98-5p.

Аналіз рівня експресії мікроРНК в ембріонах рибок *Danio rerio* за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок виявив значнгі порушення

експресії низки мікроРНК: miR-19-3p, miR-21-5p і miR-96-5p, які контролюють проліферацію клітин та процеси нейрогенезу, причому це може ініціювати порушення і нормального розвитку головного мозку ембріонів.

Вперше встановлено, що експресія ключових транскрипційних факторів і стрес-залежних протеїнів змінюється у значно більшій мірі під впливом як наночастинок оксиду графену, так і одностінних нанотрубок саме у нормальних астроцитах, ніж у клітинами гліобластоми. Більш виражений вплив наночастинок оксиду графену і одностінних вуглецевих нанотрубок був показаний для генів *DDIT3, ATF3* та *DNAJB9* у нормальних астроцитах, ніж у клітинах гліобластоми як за дії менших, так і більших доз цих вуглецевих наночастинок, причому зменшена чутливість клітин гліобластоми до їх дії може бути обумовлена полі-резистентністю пухлинних клітин із-за наявного у них стресу ендоплазматичного ретикулума.

Практичне значення результатів цієї роботи заключається у з'ясуванні більш вираженої реакції нормальних клітин, а саме нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS, порівняно з пухлинними клітинами, зокрема клітинами гліобластоми лінії U87MG, до дії на них наночастинок оксиду графену та SWCNTs, яку оцінювали по рівню експресії генів важливих транскрипційних і регуляторних факторів. Цей результат є дуже важливим застереженням щодо застосування наночастинок нанографену та нанотрубок у біомедицині без детального вивчення їх можливого впливу на різні нормальні клітини організму, на функціональну активність геному в них. Виявлені нами зміни рівня експресії генів вагомих транскрипційних факторів і регуляторних протеїнів під впливом наночастинок оксиду графену та SWCNTs є основою для виявлення високочутливих геномних маркерів порушень метаболізму. Це є важливим для раннього виявлення порушень головного мозку, які становлять серйозні ризики для здоров'я та життя пацієнтів.

Особистий внесок здобувача. Ця дисертаційна робота є завершеним дослідженням, яке було виконане авторкою відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і проведених протягом 2021 – 2025 рр. Дисертанткою було самостійно здійснено аналіз даних літератури за темою цієї роботи, проведено експериментальні дослідження по вивченню дії низьких доз оксиду графену та одностінних вуглецевих нанотрубок на рівень експресії генів транскрипційних факторів та важливих регуляторних протеїнів, а також експресію мікроРНК у нормальних астроцитах людини, клітинах гліобластоми та препаратах РНК із ембріонів *Danio rerio*. Особливо важливими були дослідження по виявленню більшої чутливості нормальних клітин до дії вуглецевих наночастинок порівняно з клітинами гліобластоми та можливої ролі стресу ендоплазматичного ретикулума у дії цих наночастинок на експресію генів. Авторкою 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, к.б.н. Юлії ВІЛЕЦЬКОЇ та доктора філософії 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 2021–2025 рр. у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: «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: 5-та та 6-та Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 2020 і 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; 1st International conference “Enlight Cancer Days”, Bordeaux University; Talence, France, 2023; XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists, IMBG, Kyiv, 2024; Конференції молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії і біотехнології – 2024», Київ, 2024; International Research and Practice Conference “Nanotechnology and Nanomaterials”, Uzhhorod, 2024.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 14 робіт, з них 5 статей в іноземних фахових наукових виданнях, які представлені в базах Scopus і PubMed, та 9 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 165 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 202 посилання. Робота містить 57 рисунків та 4 таблиці.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Інтенсивний розвиток наукових технологій сприяв створенню низки принципово нових наночастинок та наноматеріалів різної природи, як за участі металів, так і різноманітних неметалевих структур. У зв'язку з цим, постає надзвичайно актуальна проблема біологічної безпеки цих наночастинок, їх токсичності, що спонукає до проведення численних досліджень їх впливу на живих істот на рівні організму, клітинному і субклітинному рівнях.

Наночастинки і наноматеріали широко використовуються у різних сферах виробництва, у техніці, "захисті" довкілля, а також у біології та медицині. У майбутньому їх використання можливо буде розширюватися. Але їх застосування у біомедицині розглядається як важливий і перспективний напрямок досліджень, а тому детальне вивчення позитивних і негативних ефектів різних наночастинок інтенсифікується, особливо на молекулярно-генетичному рівні [12, 18 - 23].

Разом з тим, технічний аспект розвитку нанотехнологій не супроводжується всебічним вивченням впливу різних за природою наночастинок на живі організми та навколишнє середовище, а тому призводить як до негативних екологічних наслідків, так і до розвитку різноманітних патологічних станів [18, 24 - 28].

Варто відмітити, що наночастинки здебільшого мають істотно нові властивості та біологічні ефекти, які не є притаманними для сполук із яких вони побудовані, які вони проявляють у молекулярній та мікроскопічній формі. Доказано, що наночастинки залежно від їх розміру легко проникають у клітини, а також і в ядра клітин, викликають стрес ендоплазматичного ретикулума та ініціюють розвиток запальних процесів [29 – 31].

1.1. Застосування наночастинок у біології та медицині

Стрімкий розвиток досліджень різних за своїм складом, структурою і властивостями наночастинок та їх широке застосування у створенні нових матеріалів стали основою для інтенсивного використання багатьох наночастинок у різноманітних галузях біології і медицини. Разом з тим, вивчення біологічної безпечності використання цих наноматеріалів як у біології, так і медицині сильно відстає у часі.

Сучасні нанотехнології відкривають нові можливості для доставки ліків та діагностики захворювань, а також дослідження біологічних процесів. Створення сенсорів на основі наночастинок позволяє більш ефективно ідентифікувати різні за структурою біологічні сполуки, оскільки вони можуть селективно і ефективно реагувати на наявність певних молекул, передаючи сигнал їх виявлення для молекулярного зображення. Варто відзначити, що уже створені комерційні препарати на основі деяких наночастинок для використання їх у методах візуалізації в якості контрастних речовин, зокрема при флуоресцентній та магнітно-резонансній томографії, а також для інших цілей [32].

Варто відмітити, що різні наночастинки використовуються не лише для діагностики та лікування захворювань, а також для покриття хірургічних інструментів та імплантатів наночастинками срібла, платини і титану для підвищення їх стійкості або надання антибактеріальних властивостей, для прискорення приживання імплантатів та аналізу терапевтичної ефективності лікування [33]. Більше того, інтенсивно розвивається напрямок створення методів транспортування ліків за допомогою наночастинок, що може сприяти зниженню негативних ефектів деяких хіміотерапевтичних сполук шляхом їх доставки за допомогою нанографену чи нанотрубок до мішені їх дії, зокрема до злоякісних пухлин, може зменшити побічні ефекти, і таким чином зменшити їх можливий вплив на нормальні клітини життєво важливих тканин. оскільки за таких

терапевтичних підходів з’являється можливість значно знизити необхідну для отримання лікувального ефекту дозу препарату [34, 35].

Функціоналізація чи різнопланова модифікація наночастинок може істотно змінювати їх властивості і сприяти доставці ліків до органів-мішеней. Було встановлено, що зміна властивостей наночастинок віддзеркалюється на її поверхні, а це може впливати на гідрофільність і каталітичну активність. Все це може модифікувати взаємодію наночастинок з навколишнім середовищем, а особливо при формуванні протеїнової корони [36]. Така взаємодія поверхні різних за структурою наночастинок з протеїнами може істотно змінити їх властивості та ініціювати зовсім іншу поведінку у клітинах, а це може суттєво вплинути і на розподіл наночастинок у клітинах організму [37].

Прийнято вважати, що вуглецеві наночастинки є найбільш перспективними для використання у біології і медичній сфері, оскільки ці наночастинки є унікальними в плані оптимального поєднання різних фізико-хімічних властивостей. Наноматеріали є хімічно стійкими і також мають прекрасні механічні властивості. У різних галузях біології і медицини знаходять застосування різні вуглецеві наночастинки, зокрема наноалмази, фулерени, вуглецеві нанотрубки та графенові нанопластинки, включаючи оксид графену й інші пов’язані з графеном матеріали [38].

Графен є особливим наноматеріалом, товщиною в один атом. Серед важливих його властивостей — дивовижна міцність, але його можна і розтягувати, і згортати та згинати, оскільки він є гнучким. Використання графену може сприяти створенню більш вдосконалених і легких куленепробивних жилетів. Для графену характерним є високий рівень провідності тепла та електрики, що дозволяє використовувати його для різних електронних пристроїв, причому має повну оптичну прозорість. Таким чином, наноматеріали на основі графену мають чудові фізико-хімічні властивості, придатні для різноманітних застосувань у електроніці, телекомунікаціях, енергетиці та охороні здоров’я [39, 40]. Вплив

наноматеріалів на основі графену на людину та навколишнє середовище постійно зростає завдяки прогресу в синтезі, характеристиках і великомасштабному виробництві графену, а також подальшій розробці нових біологічних, медичних і споживчих продуктів на основі графену [41 - 45].

Графен можна легко функціоналізувати шляхом хімічної модифікації. Функціоналізований графен і його похідні використовуються в різноманітних нанобіотехнологічних додатках, таких як екологічна інженерія, біомедицина та біотехнологія. Однак перспективне використання матеріалів, пов'язаних із графеном, у біологічному контексті вимагає детального розуміння властивостей цих матеріалів, що має важливе значення для розширення їхнього застосування у біології та медицині у майбутньому [20, 43, 46 - 48].

Велика кількість досліджень була присвячена вивченню токсичності наноматеріалів на основі графену, синтезованих різноманітними методами та вихідними матеріалами, на мікроорганізмах, тваринах і клітинах ссавців [25 – 28, 39]. Основна мета цих досліджень полягала у з'ясуванні зв'язку внутрішньоклітинних біохімічних реакцій із хімічними та морфологічними властивостями графену. Численні дослідження вказують на гено-токсичність графену і їх екологічну небезпеку як незміненого, так і функціоналізованого графену [31, 39, 49, 50].

Одним із найбільш перспективних варіантів функціоналізованого графену є оксид графену. Його використовують для пломбування зубів, причому такі пломби не піддаються корозії. Оксид графену виявився найменш токсичним порівняно з немодифікованим та відновленим графеном, які викликали ураження ротової порожнини. Графен є антибактеріальним, він вбиває збудників карієсу, а тому він може стати альтернативою сучасним антибактеріальним засобам [51]. Однак для такого використання необхідно детально дослідити токсичність, а саме гено-

токсичність наночастинок на основі графену, яка є високочутливим маркером, причому не лише за захворювання, а і без нього [21, 39, 52, 53].

Оксид графену знаходить широке застосування у розробках способів боротьби із злоякісними пухлинами, у тому числі для лікування гліобластом [20, 46, 48, 54]. Більше того, на основі оксиду графену створюють нано-модулятори аутофагії та апоптозу [48].

Останнім часом все більш широке використання набувають вуглецеві нанотрубки у різноманітних галузях, зокрема у наноелектроніці як компоненти для створення біосенсорів, а також для терапевтичних цілей як носії ліків [55 – 61]. Вони представляють собою згорнутий у трубку шар графену. Це перш за все одностінні вуглецеві нанотрубки (SWCNTs). їх діаметр коливається від 1 до 2 нм, але вуглецеві нанотрубки можуть мати не лише одну стінку, а і декілька концентричних стінок у трубках, причому їх кількість є важливим параметром цих наночастинок, який безпосередньо визначає багато властивостей [62].

Вуглецеві нанотрубки часто цілеспрямовано модифікують, змінюючи їх властивості, частіше за все шляхом окиснення кислотами, що призводить до появи карбоксильних та гідроксильних функціональних груп як до зовнішньої поверхні стінки, а також і до внутрішньої поверхні вуглецевої нанотрубки, якщо вона відкрита Така функціоналізація вуглецевих нанотрубок може відбуватися і шляхом адсорбції різних молекул, включаючи ДНК, протеїнів та полімерів [63 - 65].

Останнім часом інтенсивно вивчається можливість використання вуглецевих нанотрубок і особливо їх функціоналізованих варіантів у різних галузях біології та медицини, зокрема для таргетної терапії для доставки ліків, а також діагностичних цілей, завдяки тому, що нанотрубки легко проникають у клітини долаючи тканинні бар’єри і надовго там затримуються, а це має виняткове значення у боротьбі зі злоякісними пухлинами [66, 67]. Разом з тим, це має і негативне значення, оскільки вуглецеві нанотрубки активно проникають у всі органи і тканини,

включаючи головний мозок і ендокринні залози, а не лише у злоякісні пухлини, не деградують та можуть ініціювати розвиток патологічних процесів, порушуючи регуляторні процеси [66]. Численні наукові дослідження свідчать про різного роду токсичність вуглецевих нанотрубок [59, 68 - 71]. Недавно розроблені тунельні вуглецеві нанотрубки з унікальними властивостями, які впливають на ріст і хеморезистентність злоякісних пухлин. Розроблені також вуглецеві нанотрубки на основі фосфіду для виявлення аденокарциноми грудної залози, причому терапевтичне і діагностичне застосування різних модифікацій вуглецевих нанотрубок постійно зростає [59 – 61, 74 - 76].

Вуглецеві нанотрубки застосовуються також при виготовленні біосенсорів для виявлення та моніторингу різних захворювань, як контрастні речовини для біовізуалізації, у магнітно-резонансній томографії [55, 77, 78]. Також вуглецеві нанотрубки успішно підтримують проліферацію пухлинних клітин і можуть служити платформами для вивчення певних онкологічних захворювань [79].

І хоча існує багато напрямків застосування різноманітних вуглецевих наночастинок, як і всіх інших наноструктур, проте їх біологічна безпека заслуговує на більш глибоке і всебічне вивчення до їх впровадження у різних сферах, у тому числі у біології та медицині. Варто відмітити, що ті самі властивості наночастинок, які роблять їх настільки приманливими для впровадження у наномедицину та для конкретних технічних і біотехнологічних процесів, також можуть виявитися небезпечними для живих організмів, коли попадають на нормальні клітини. Таким чином, повноцінний контроль біобезпеки наночастинок є необхідним, оскільки їх застосування у різних галузях промисловості та вплив на живих істот і людей постійно зростає через ймовірність викидів у навколишнє середовище [11, 29, 53, 70, 71].

1.2. Молекулярні механізми дії наночастинок на метаболізм

У зв’язку з використання різних наноматеріалів, включаючи різні форми вуглецевих наночастинок, для терапевтичних і діагностичних цілей, постала гостра необхідність більш детального вивчення можливого впливу цих наночастинок на клітини людини і тварин, на метаболічні процеси в них, на експресію генів, в залежності від складу наночастинок, їх структури, розміру та наявності різноманітних функціональних груп. Для кращого розуміння можливого впливу різних наночастинок на клітини живих організмів слід пам’ятати, що вони штучно створені із хімічних компонентів і тому не можуть бути біосумісними структурами. Вони є дійсно чужорідними для клітин, а тому можуть лише порушувати життєдіяльність і структурну цілісність клітин, а також різноманітні метаболічні процеси у складних біологічних системах [80, 81].

У зв’язку з тим, що різні наночастинки проявляють різноманітні токсичні ефекти на клітини живих організмів, у численних публікаціях піднімається проблема необхідності всебічного дослідження молекулярних механізмів взаємодії різних наночастинок із клітинами та визначення напрямків подальшого вдосконалення наноструктур для зменшення їх негативних ефектів на організми [7, 9 – 13, 53, 80].

Слід відмітити, що дослідження наночастинок для можливого їх застосування у діагностичних та терапевтичних цілях на перших етапах були здебільшого орієнтовані на з’ясування їх корисних фізико-хімічних властивостей, а про біобезпеку не думали. Віджомо, що розробники наноструктур для використання у медицині не завжди враховують усі їх можливі властивості, але більш важливою виявилася їх ефективність цільової доставки. У звязку з цим, усі зусилля дослідників були спрямовані на таку модифікацію наночастинок, яка б забезпечила їх накопичення саме у пухлинах [82, 83].

Але головною метою при розробці транспортуючих засобів до злоякісних пухлин має бути відсутність негативних ефектівв щодо нормальних клітин організму, щодо порушення протікання численних метаболічних процесів, які призводять до розвитку різноманітних ускладнень.

При дослідженні біобезпеки наночастинок важливим має бути вивчення розподілу наночастинок у організмі та їх виведення, а також здатності проникати до життєво-важливих органів і порушувати регуляторні системи організму. Проникнення наночастинок до різних клітин організму залежить також від взаємодії з протеїнами при їх мігшрації по організму, і яка може змінювати цитотоксичні ефекти, проте також може послаблювати здатність асоційованих з наночастинками специфічних лігандів взаємодіяти з рецепторами клітин та знижувати їх знищення імунними клітинами [84]. Досить важливими є порівнянні дослідження дії наночастинок на нормальних і пухлинних клітинах, оскільки вони дозволяють більш детально з'ясовувати особливості їх взаємодії на молекулярному та генетичному рівнях, а також порівняти чутливість нормальних і пухлинних клітин до дії наночастинок на різні метаболічні процеси на молекулярно-генетичному рівні. Токсичність деяких наночастинок залежить від їх здатності генерувати активні форми оксигену [85].

Деякий час наночастинки діоксиду титану вважали біологічно інертними і впроваджували у косметиці та терапії захворювань для покращення доставки лікарських засобів, але тепер накопилися експериментальні дані про його токсичний потенціал [14, 15, 82, 86]. Ці титановмісні наночастинки добре проникають у клітини, причому їх надходження до клітин значною мірою визначається не лише розміром наночастинок, а також і їх структурою та формою [14, 15].

Наночастинки діоксиду титану, проникаючи у клітини фібробластів легень людини та клітин аденокарциноми легень А549, генерують вільні

радикали і активні форми кисню, ініціюючи розвиток оксидативного стресу, змінюють внутрішньоклітинний гомеостаз кальцію, що призводить до стресу ендоплазматичного ретикулума [15, 84, 87, 88].

Але окрім з'ясування впливу різних за хімічним складом і структурою наночастинок на процеси метаболізму, необхідним є багатогранне дослідження їх впливу на генетичний апарат, на експресію важливих регуляторних генів, зокрема транскрипційних факторів і мікроРНК, які контролюють протікання практично всіх метаболічних процесів.

1.3. Стрес ендоплазматичного ретикулума і його роль у механізмах дії наночастинок

Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) контролює синтез та пост-трансляційну модифікацію протеїнів, а також гомеостаз кальцію [5, 15, 89, 90]. Під впливом різних токсичних речовин, включаючи тунікаміцин чи тапсигаргін, розвивається стрес ЕР і відбуваються важливі для відновлення та підтримання гомеостазу зміни як у клітині, так і у позаклітинному середовищі [89, 91-96].

Численними дослідженнями також показана важлива роль стресу ендоплазматичного ретикулума в дії різних за природою наночастинок на клітини, а також різних хімічних речовин, у тому числі і високотоксичних агентів [4, 89, 92, 93, 97].

Надходження наночастинок до клітин змінює протікання важливих процесів в ЕР, зокрема, порушує активність ензимів, які контролюють пост-трансляційну модифікацію щойно синтезованих протеїнів і правильне формування їх структури. У результаті порушення активності цих ензимів відбувається накопичення неправильно згорнутих протеїнів в ЕР, у результаті чого розвивається специфічна відповідь на появу незгорнутих протеїнів [4, 92]. Особливістю цієї відповіді є збільшення транскрипції тих

генів, що кодують синтез специфічних протеїнів, шаперонів та фолдингових ензимів ендоплазматичного ретикулума для виправлення процесів фолдингу протеїнів і повернення до нормальних умов, до підтримання гомеостазу [4, 92, 93].

Разом з тим, окрім контролю стрес-відповіді ЕР на появу неповністю згорнутих чи незгорнутих протеїнів, шаперони також направляють ці неправильно згорнуті протеїни на деградацію спеціальним шляхом, пов'язаним з ендоплазматичним ретикулумом, через ERAD (ЕР-асоційована деградація) систему [4, 92, 93].

Загальний контроль над процесами відповіді на нагромадження в ЕР незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів у клітинах олпосередковується специфічними сигнальними шляхами від ЕР до інших внутрішньоклітинних структур та ядра. Виявлено три головні сигнальні системи стресу ЕР, які ініціюються: трансмембранними протеїнами, такими як ERN1 (від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1; endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1), PERK (подібна до PRK кіназа ендоплазматичного ретикулума; PRK-like ER kinase) та ATF6 (активуючий транскрипційний фактор 6; activating transcription factor 6) [4, 92, 93, 95, 98]. Встановлено також, що стрес ЕР тісно пов'язаний із кальцієвим сигналюванням і що кальцієвий гомеостаз є важливим як у нормі, так і за стресу ЕР [99].

Ці три сенсорно-сигнальні протеїни стресу ЕР за відсутності стресу є асоційованими із шапероном HSPA5, який ще називають BiP або GRP78, задіяні у контролі пост-трансляційної модифікації щойно синтезованих протеїнів, їх правильного згортання, а також розпізнаванні протеїнів з порушеною конформацією та відновленні гомеостазу [4, 90, 93, 100]. Більше того, за стресу блокується вхід нових протеїнів до ЕР, але ініціюється трансляція певних мРНК, необхідних для утворення залежних від стресу протеїнів для нормалізації пост-трансляційної модифікації щойно синтезованих протеїнів, а також запускається система опосередкованого

стресом шляху апоптозу [4, 92, 95, 98, 100, 101]. Важливо відмітити, що коженому із сигнальних шляхів стресу є притаманною спеціалізовану роль у контролі певних шляхів метаболізму, проте між ними існує тісний взаємозвязок на різних регуляторних рівнях [4, 91, 102].

Індукція стресу ЕР спостерігається за дії на клітини наночастинок діоксиду титану та оксиду цинку та у в результаті їх оксичності, причому у цьому певну роль відіграє і порушення балансу кальцію [15, 102 - 108]. Недавно наночастинки були знайдені в організмах морських тварин, у яких були виявлені порушення різних систем, включаючи репродуктивну і нервову системи, причому це пов'язують з розвитком оксидативного стресу та стресу ЕР [105]. В організм людей наночастинки попадають переважно з повітрям та їжею і можуть вражати нервову, репродуктивну та інші системи організму, ініціюючи розвиток різноманітних захворювань, причому стрес ЕР може значно посилювати негативний вплив різних наночастинок [104 – 106, 108].

1.4. Вплив наночастинок на експресію генів

Проникнення наночастинок до клітин створює умови для їх появи у всіх внутрішньоклітинних структурах, у тому числі і в ядрі, у результаті чого відбувається взаємодія з гістонами і ДНК, що виражається у зміні експресії генів та стабільності геному [109]. Наночастинки здатні змінювати експресію генів, впливаючи на механізми регуляції їх експресії, що істотно не залежать від змін у послідовності ДНК [109 - 113].

Так, було показано, що інгаляція вуглецевими наночастинками призводить до запальних процесів у легенях і що це опосередковується активацією деацетилази гістонів 6, а її пригнічення протидіє розвитку запалення [112]. Більше того, ці наночастинки пригнічують експресію ароматази і секрецію естрадіолу через ERK1/2 шлях [114]. Це може бути

обумовлено впливом наночастинок на РНК-полімерази та їх регулятори, транскрипційні фактори і мікроРНК, а також епігенетичним шляхом, порушуючи фундаментальні механізми регуляції експресії генів, що може призводити до розвитку різноманітних захворювань, особливо онкологічних [115].

Встановлено, що під впливом наночастинок оксиду цинку у мишей розвиваються патологічні процеси у печінці, які супроводжуються вираженими змінами в експресії залежних від стресу ЕР генів, таких як HSPA5/GRP78, XBP1, а також посиленим фосфорилюванням PERK, eIF2a, JNK та CHOP/DDIT3 [116]. Багато інших досліджень присвячено вивченню впливу різних наночастинок, як металевих, так і вуглецевих, на експресію генів транскрипційних факторів та онкогенів у нормальних і пухлинних клітинах, які вказували на гено-токсичну дію наночастинок на функціональну активність геному, причому експресія більшості із цих досліджених генів істотно залежала від стресу ЕР [7 – 11, 81, 117].

При дослідженні впливу наночастинок срібла було показано, що при попаданні до легень ці наночастинки швидко попадають до всіх органів мишей, легко долають гемато-енцефалічний бар'єр і проникають у клітини головного мозку порушуючи експресію генів біологічного годинника, казеїнкінази-1, SNARK кінази та 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази уже через 24 години, а через 3 і 14 днів зміни були більш вираженими [7, 118]. Виражені зміни в експресії генів SNARK кінази та казеїнкінази-1 були виявлені у сім'яниках, печінці, серці, легенях і серці. Дисрегуляція під впливом наночастинок срібла експресії цих генів, що кодують ключові регуляторні протеїни, порушує сигнальні шляхи у клітинах головного мозку та низці інших органів і може призвести до розвитку патологічних процесів.

Виражений ефект на експресію генів транскрипційних факторів і про-онкогенів був виявлений у нормальних астроцитах людини за дії на них С60-фулерену і діоксиду церію [9, 10]. Так, С60-фулерен посилював

проліферацію клітин і збільшував рівень експресії протеїну 2, що зв'язується з подібним до інсуліну фактором росту (IGFBP2) та транскрипційного фактора E2F8, але знижував шаперон HSPB8, а діоксид церію пригнічував експресію транскрипційних факторів E2F8, FOXF1 і TBX3, а також IGFBP2.

При дослідженні впливу наночастинок дісиліциду хрому на нормальні астроцити виявлено суттєве зниження рівня експресії генів *IGFBP2, IGFBP5* та *SNARK* (протеїнкінази, залежної від SNF1/AMPK), але експресія генів *IGFBP3* і *CD36* підвищувалася. За дії ж нітриду титану на нормальні астроцити людини спостерігалося зниження рівня експресії *IGFBP2* та *SNARK*, у той час як експресія *CD36, IGFBP3* і *IGFBP4* – збільшувалася [12, 13].

Було висловлено припущення про можливу спорідненість вуглецевих наночастинок до клітин та їх компонентів [119]. Але це є досить примітивна оцінка живих організмів, їх клітин, оскільки клітини досить чітко відрізняють чужі протеїни від своїх, свої ДНК і РНК від чужих. А вуглецеві наночастинки є штучно створеними структурами, які дуже далекі від біологічних молекул, сильно відрізняються від усього, що споконвічно оточувало живі істоти. Можливо, що саме тому живі клітини не можуть виставити бар’єр на вхід до них різних наночастинок, включаючи вуглецеві наночастинки.

Результати численних досліджень токсичності вуглецевих наноматеріалів показали, що за їх дії на живі істоти можуть розвиватися різноманітні патологічні процеси, хоча ступінь токсичності залежить від способу їх надходження до організму [120]. Але дослідження, що проводяться на клітинах дозволяють глибше з’ясувати і зрозуміти тонкі молекулярні механізми токсичності як вуглецевих наночастинок, так і наночастинок іншої природи. Встановлено, що токсичність наночастинок визначається їх розміром (діаметром), характером модифікацій, хімічною чистотою, наявністю залишків каталізаторів та інших сполук [121 - 122].

Проте значно більшу увагу слід приділяти з’ясуванню впливу наночастинок на геном, їх гено-токсичності, оскільки порушення не лише структури геному, а і його нормального функціонування, може призводити до низки непередбачуваних дефектів, які можуть стати причиною розвитку як метаболічних порушень, так і різноманітних захворювань.

Було також встановлено, що вуглецеві наночастинки порушують експресію генів, що контролюють різні процеси у клітинах. Так, залежний від дози і часу дії пригнічуючий ефект одностінних вуглецевих нанотрубок був показаний для генів PFKFB3 та PFKFB4, а також для цикліну D2, але також були виявлені гени, рівень експресії яких значно збільшувався під впливом цих вуглецевих наночастинок [11].

Варто відмітити, що різні за природою наночастинки можуть ініціювати розвиток мутацій, зокрема і спадкових, оскільки наночастинки не знають бар’єрів і легко долають гемато-енцефалічний бар’єр, проникають до статевих органів [7, 118]. А особливість вуглецевих наночастинок ще і в тому, що вони мають досить високу реакційну здатність, а це призводить до активної взаємодії наночастинок з різними біологічними структурами, наслідки якої ще далеко не вияснені. Більше того, гено-токсичні впливи як металевих, так і вуглецевих наночастинок значною мірою опосередковуються стресом ендоплазматичного ретикулума і його трьома сенсорно-сигнальними шляхами, причому величина цих впливів визначається як силою стресового стану, так і його тривалістю [9, 10, 103, 104, 106, 108].

Добре відомо, що стрес ЕР контролює експресію багатьох сотень генів переважно через ERN1, сенсорно-сигнальний протеїн, що передає сигнали від ендоплазматичного ретикулума до ядра [125]. Цей сигнальний протеїн є трансмембранним протеїном ЕР і контролює процеси, що направлені на вихід із стану стресу, сприяє виживанню клітин, в критичних ситуаціях запускає специфічну для ЕР програму загибелі клітини [89, 92, 102]. Важлива роль у контролі цих процесів належить також транскрипційним

факторам, які регулюють протікання більшості метаболічних процесів в організмі і експресія яких може змінюватися під впливом як різних металевих, так і вуглецевих наночастинок [9, 10].

1.5. Транскрипційні фактори і їх роль у регуляції експресії генів

Численні дослідження показали, що транскрипційні фактори є ключовими регуляторами більшості метаболічних процесів в організмі, контролюючи експресію численних генів, у тому числі і ключових регуляторних генів, відповідальних за підтримання гомеостазу та стрес ендоплазматичного ретикулума, а порушення їх експресії призводить до розвитку патологічних станів [126 - 131]. Так, було встановлено, що CLOCK-ARNTL(BMAL1) транскрипційний комплекс відіграє ключову роль у підтриманні добових ритмів гомеостазу, регулюючи експресію тисяч генів, серед яких є й інші гени біологічного годинника, білкові продукти яких контролюють різні сторони метаболізму та виконують як онкогенні функції, так і роль пухлинних супресорів [132 - 134].

Не менш важливу роль у контролі метаболізму відіграють транскрипційні фактори, що задіяні у сигнальних шляхах стресу ЕР, які регулюють експресію сотень генів і задіяні у процесах відновлення порушеного гомеостазу. Це, зокрема, DDIT3 (DNA damage inducible transcript 3), який ще часто називають CHOP або GADD153, а також активуючі транскрипційні фактори ATF4 та ATF3 [135 - 138]. Так, було показано, що усі ці три транскрипційні фактори задіяні у регуляції клітинного циклу і апоптозу у клітинах гліобластоми і що вітаферин А запускає зупинку G2/M і апоптоз у цих клітинах через вісь ATF4-ATF34-CHOP [137]. Фактор активації транскрипції 3 індукується за стресу ЕР і діє як головний регулятор метаболічного гомеостазу, він відіграє життєво важливу роль у контролі метаболізму як у нормальних клітинах, так і за

онкогенезу [138 - 140]. Крім того, цей фактор транскрипції регулює експресію численних проліферативних генів та генів, пов'язаних з апоптозом, і бере участь в адаптивній відповіді клітин, діючи як активатор, так і репресор транскрипції [141]. ATF4 є також транскрипційним фактором, який індукується стресом ЕР, і регулює експресію генів у відповідь на цей стрес, включаючи DDIT3/CHOP, приймає участь у контролі гомеостазу глюкози, причому рівень його експресії залежить від гіпоксії і збільшується у клітинах різних злоякісних пухлин, включаючи клітини гліобластоми [142 - 147].

Не менш важливу роль у стрес-залежному контролі метаболізму відіграє фактор транскрипції XBP1, вірніше його сплайс-варіант (XBP1s), утворення якого індукується за стресу ЕР, а також пухлино-супресорний транскрипційний фактор TP53 та багато інших [148 - 157]. Утворення транскрипційного фактора XBP1s опосередковується ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1, причому цей фактор контролює експресію сотень генів, асоційованих зі стресом ЕР, а особливо з контролем якості фолдингу протеїнів [4, 125, 151, 158 - 160]. Показано, що інгібування ензиматичних активностей ERN1 (ендорибонуклеазної та протеїнкіназної) пригнічує процеси проліферації клітин гліобластоми і ріст пухлин [144, 161 - 167].

Встановлено, що різні наночастинки по-різному впливають на рівень експресії багатьох транскрипційних факторів, особливо тих факторів, експресія яких залежить від стресу ендоплазматичного ретикулума [9, 10, 13, 118]. Так, було встановлено, що наночастинки діоксиду церію пригнічують експресію транскрипційних факторів TBX3 та E2F8, а фулерен-С60, навпаки, збільшує рівень експресії E2F8 у нормальних астроцитах людини, причому ефект цих наночастинок посилювався зі збільшенням часу їх дії [9, 10].

Наночастинки срібла та інших металів здатні впливати на експресію численних генів, у тому числі і тих, що пов'язані зі стресом ЕР. Так,

наночастинки срібла здатні викликати стрес ЕР шляхом індукції утворення активного транскрипційного фактора ATF6, індукції протеїну HSPA5 та фактора транскрипції DDIT3/CHOP. Було також показано, що наночастинки оксиду цинку у відносно малій концентрації ініціюють у венозних ендотеліальних клітинах людини (HUVEC) розвиток стресу ЕР, що виражалося у збільшенні експресії сплайс-варіанту XBP1 (XBP1s), а також низки інших маркерних стрес-протеїнів ЕР, таких як HSPA5/BiP, DDIT3, PPP1R15A/GADD34 (регуляторної субодиниці 15A протеїн-фосфатаза 1), фосфорильованої форми PERK (p-PERK) та еукаріотичного фактору ініціації трансляції 2α (p-eIF2α) [166].

У дослідженнях, проведених на нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS, було показано, що вуглецеві наночастинки, такі як фулерен С60, суттєво змінює експресію залежними від стресу ЕР генів, які регулюють процеси проліферації клітин [9]. Встановлено, що фулерен С60 посилював проліферацію нормальних астроцитів людини та збільшував рівень експресії генів таких про-проліферативних факторів як IGFBP2 (протеїн 2, що зв’язується з подібним до інсуліну фактором росту) та E2F8, важливі в оркеструванні роботи геному та онкогенезі [9]. За більш тривалої дії фулерену С60 на нормальні астроцити спостерігається пригнічуючий його вплив на експресію транскрипційних факторів TBX3 та FOXF1 у астроцитах [9].

Було також встановлено, що ефект фулерену С60 на експресії *IGFBP2* та *E2F8* істотно залежав від часу його дії. Максимальний ефект на IGFBP2 був виявлений через 24 години, а через три доби – значно менший, тоді як експресія E2F8 підвищувалася через через 24 години, але через три доби ефект був значно більшим [9]. Під впливом фулерену С60 виражено зменшувалася експресія такого протеїну як HSPB8 у нормальних астроцитах, причому різке зниження спостерігалося як через 24 години, так і після трьох діб [9].

Ці дані свідчать про різносторонній вплив фулерену С60, унікальних вуглецевих наночастинок, на рівень експресії різних за своєю функцією генів в астроцитах, причому їх ефект суттєво змінювався при збільшенні часу їх дії, що вказує на опосередкованість змін в експресії досліджених генів стресом ЕР, що індукувався цими наночастинками [9].

1.6. Структура та регуляторні функції мікроРНК

МікроРНК – це клас невеликих одно ланцюгових некодуючих, часто філогенетично консервативних ендогенних молекул РНК, які відіграють важливу роль у контролі експресії генів на пост-транскрипційному рівні головним чином через взаємодію з 3’-некодуючими ділянками цільових матричних РНК і подальшу індукцію їхньої деградації або репресії трансляції. МікроРНК також відіграють вагому роль у регуляції всіх метаболічних процесів у різних клітинах організму, в тому числі і в астроцитах, а також у розвитку нервової системи [167 - 171]. Крім того, була показана вирішальна регуляторна роль мікроРНК у розвитку зебристих рибок [172, 173].

Разом з тим, рівень експресії різних мікроРНК істотно змінюється у клітинах злоякісних пухлин, у тому числі у клітинах гліобластоми, а також за нейродегенеративних захворювань [167, 169, 174 - 178]. Більше того, було показано, що інгібування мікроРНК miR-21 та miR-10b призводить до пригнічення проліферації та інвазії клітин гліоми [170]. Виявлена мікроРНК, яка регулює стрес ЕР й індукує апоптоз у клітинах пухлин опосередковано через цей стрес [167]. У зв’язку з цим, розробляються нанотехнології доставки мікроРНК до пухлинних клітин на основі наночастинок [176, 179]. Є також дані, що наночастинки впливають на процеси росту і змінюють рівень експресії мікроРНК [53, 180].

Таким чином, дослідження рівня експресії генів, що контролюють різні сторони метаболізму, зокрема генів ключових транскрипційних факторів, а також мікроРНК, за дії на нормальні та пухлинні клітини вуглецевих наночастинок є актуальним для вияснення їх гено-токсичності і біобезпеки їх застосування у біології та медицині.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали, культури клітин та умови проведення експериментів

Для вивчення дії вуглецевих наночастинок на рівень експресії генів ключових транскрипційних факторів і важливих регуляторних протеїнів, а також мікроРНК були взяті наночастинки оксиду графену та одностінні вуглецеві (вуглецеві) нанотрубки (SWCNTs).

Оксид графену (нанографен оксид) у виді водної дисперсії пластинок товщиною 1нм (2 мг/мл) був отриманий від Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Німеччина. Схематична структура оксиду графену представлена на Рис. 2.1. [181].

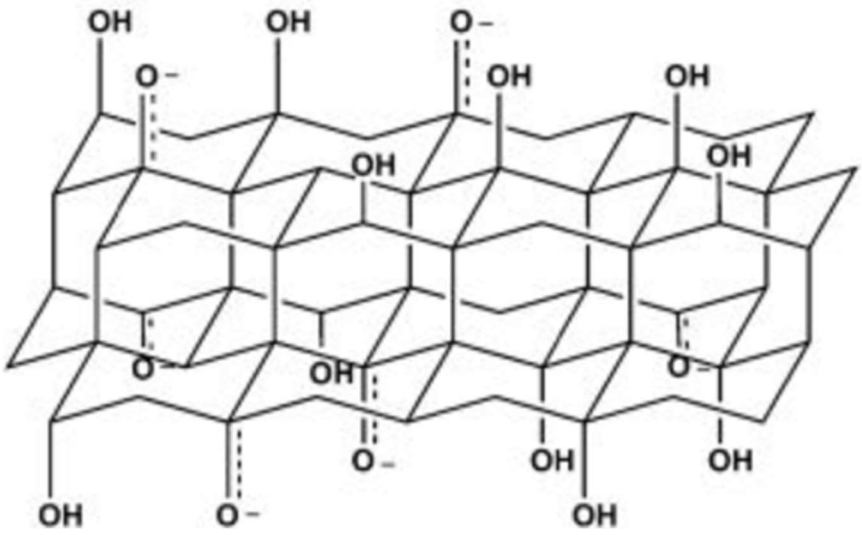


Рис. 2.1. Структурна формула оксиду графену Nakajima-Matsuo [181].

Графен – це шар атомів вуглецю із гексагональною структурою і його можна представити як «розгорнуту» вуглецеву нанотрубку. Оксидом графену є поєданання атомів вуглецю, водню та кисню. Серед головних фізичних властивостей оксиду графену виділяють пластичність, гнучкість, а також міцність. Одностінні вуглецеві нанотрубки — протяжні циліндричні

структури діаметром від одного до двох нанометрів. Функціоналізовані одностінні вуглецеві нанотрубки були отримані від професора Уве Ріттера з Інституту хімії та біотехніки Технічного університету Ільменау (Ільменау, Німеччина) [11]. Вони були суспендовані у дистильованій воді та дезагреговані ультразвуком протягом 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 розміром пор мембранного фільтра. Характеристики цих нанотрубок частково були описані раніше [53]. За даними атомно-силової мікроскопії діаметр нанотрубок становив 1-2 нм, а основна маса їх водної суспензії (5 мкг/мл) за результатами 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 (polidispersity index) цих наночастинок становив 0,273 [53, 182, 183]. Значення дзета-потенціалу характеризує стабільність суспензії і воно має бути більшим за -15 mV.

Дослідження проводили на нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS та клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих вектором pcDNA3.1 або домінант-негативною конструкцією ERN1 (dnERN1). Нормальні астроцити людини лінії NHA/TS були отримані для експериментальних досліджень науковим керівником Олександром МІНЧЕНКОМ від докторів К. Сасаі та С. Танака із лабораторії молекулярної та клітинної патології (Медична школа університету Хоккайдо, Японія). Астроцити ростили згідно з рекомендаціями авторів статті [184]. Дослідження експресії мікроРНК були проведені на препаратах РНК із ембріонів зебристих рибок *Danio rerio* після внесення до середовища різних доз вуглецевих наночастинок до кінцевої концентрації 2 нг/мл та 8 нг/мл [183].

У дослідах з наночастинками оксиду графену, до нормальних астроцитів людини додавали у культуральне середовище суспензію оксиду

графену до кінцевої концентрації 1 нг/мл і 4 нг/мл та інкубували протягом 24 годин [185]. Наночастинки оксиду графену були отримані у вигляді водяної суспензії (2 мг/мл) із компанії Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Німеччина.

Для вивчення впливу SWCNTs на нормальні астроцити людини лінії NHA/TS до поживного середовища клітин вносили водну суспензію вуглецевих нанотрубок до кінцевої концентрації 2 нг/мл та 8 нг/мл і клітини ростили протягом 24 годин, а порівнювали з тими клітинами, до яких не додавали наночастинок.

Частина експериментів була проведена також на клітинах гліобластоми лінії U87MG, стабільно трансфікованих "порожнім" вектором pcDNA3.1, і клітинах із домінант-негативною конструкцією на основі цього вектора, що містила вкорочену кДНК сигнального протеїну ERN1 (без протеїнкіназного та ендорибонуклеазного доменів; dnERN1), які були створені проф. Олександром МІНЧЕНКОМ у співавторстві з проф. Michel Moenner (INSERM U1029 Лабораторія молекулярних механізмів ангіогенезу, Університет Бордо 1, Франція) [164].

Клітини гліобластоми людини лінії U87 з порожнім вектором та домінант-негативною конструкцією ERN1 (U87-dnERN1), вирощували у модифікованому Дульбекко мінімальному есенціальному середовищі Ігла (DMEM; *Gibco, Invitrogen*, США) з високим вмістом глюкози (4,5 г/л), доповненому глутаміном (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 % CO_2, як описано раніше [164].

Для дослідження впливу наночастинок оксиду графену і вуглецевих нанотрубок на клітини гліобластоми лінії U87MG, трансфіковані вектором або домінант-негативною конструкцією ERN1, до цих клітин додавали вуглецеві наночастинки у тих же концентраціях, що і до нормальних астроцитів та інкубували протягом 24 годин.

Експерименти з ембріонами *Danio rerio* були проведені проф. Олександром МІНЧЕНКОМ, який отримав із ембріонів, витриманих у воді з різними дозами наночастинок вуглецевих нанотрубок у концентрації 2 і 8 нг/мл протягом 24 та 72 годин, препарати РНК, які потім і надав їх мені для синтезу комплементарних ДНКЕ та аналізу експресії мікроРНК. Розвиток личинок *Danio rerio* було охарактеризовано за допомогою інверсного мікроскопа, оснащеного цифровою камерою, і задокументовано фотографіями [183].

2.2. Методи досліджень

У ході виконання роботи були використанні сучасні методи біохімії та молекулярної біології: виділення РНК, визначення концентрації та спектральних характеристик РНК спектрометричним методом, синтез комплементарних ДНК за допомогою методу зворотної транскрипції, методи кількісної полімеразної ланцюгової реакції для визначення рівня експресії мРНК та мікроРНК, електрофоретичні методи аналізу нуклеїнових кислот, методи біоінформатики та статистичної обробки результатів досліджень.

2.2.1. Виділення РНК із культури клітин, визначення її концентрації

Препарати РНК виділяли із нормальних астроцитів людини та клітин гліобластоми за допомогою реагенту TRIzol (Invitrogen, С.Ш.А.) згідно рекомендаціям виробника як описано [164]. РНК розчиняли у вільній від рибонуклеаз воді. Для додаткової очистки препаратів РНК проводили переосадження РНК етанолом з ацетатом натрію. Потім вимірювали концентрацію РНК та визначали її спектральні характеристики для оцінки якості отриманих препаратів РНК на спектрофотометрі.

2.2.2. Синтез кДНК для визначення експресії мРНК та мікроРНК

Для зворотної транскрипції мРНК 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 4 мкл 5× реакційного буферу для зворотної транскрипції, 1 мкл суміші дезоксирибонуклеозидтрифосфатів (dNTP mix), 0,5 мкл праймера для зворотної транскрипції, 0,5 мкл Verso Enzyme mix (містить зворотну транскриптазу та інгібітор РНКази для захисту РНК) і вільну від рибонуклеаз воду. Проби інкубували протягом 30 хвилин при 42 °С. Для зупинення реакції реакційну суміш прогрівали протягом 2 хвилин при 95 °С, а потім охолоджували до 4 °С. Отриману кДНК розводили у 50 разів і використовували для дослідження рівня експресії генів за допомогою методу кількісної ПЛР.

У випадку синтезу кДНК для аналізу експресії мікроРНК був використаний набір реагентів Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (Takara, Японія), який забезпечував поліаденілювання та зворотну транскрипцію мікроРНК. Синтез цих кДНК проводили згідно протоколу виробника [183].

2.2.3. Визначення рівня експресії мРНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі

Рівень експресії досліджених генів визначали за допомогою методу кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі, використовуючи ампліфікатор „QuantStudio 5 Real-Time PCR System” (*Applied Biosystems*, США).

Для ампліфікації до 3 мкл розведеної кДНК додавали 2× реакційну суміш Absolute QPCR SYBR-Green Mix (*Thermo Scientific*, Великобританія),

пару специфічних для кожного гена олігонуклеотидних праймерів (прямого та зворотного; *Sigma-Aldrich*, США), а також вільну від рибонуклеаз воду до 20 мкл. Характеристики праймерів, використаних для ампліфікації представлені у таблицях 2.1, 2.2 і 2.3).

Таблиця 2.1.

Характеристики праймерів, які використовували для кількісної ПЛР у реальному часі.

Символ гена	Назва гена	Послідовності праймера	Номери нуклеотидів у відповідній послідовності	Номер у GenBank
DDIT3 (*CHOP*)	DNA damage-inducible transcript 3	F: 5′- cattgcctttctccttcggg R: 5′- ccagagaagcagggtcaaga	351–370 518–499	NM_001195053
ATF3	Activating transcription factor 3	F: 5′- ttgccatccagaacaagcac R: 5′- acactttccagcttctccga	314–333 545–526	NM_001674.4
ATF4	Activating transcription factor 4	F: 5′- gtccctccaacaacagcaag R: 5′- actttctgggagatggccaa	1093-1112 1328-1309	NM_001675.4
E2F1	E2F transcription factor 1	F: 5′- cttcgtagcattgcagaccc R: 5′- tatggtggcagagtcagtgg	872–891 1111–1092	NM_005225.3
TP53	Tumor protein 53	F: 5′- gttccgagagctgaatgagg R: 5′- gttccgagagctgaatgagg	1222–1241 1380–1361	NM_000546.6
DNAJB9	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B9	F: 5′-gtcggagggtgcaggatatt R: 5′-tcagggtggtacttcatggc	217–236 407–388	NM_012328.3
TOB1	Transducer of ERBB2, 1	F: 5′- agcccgaacaagatcactca R: 5′- cacgtctcctgggaagctta	293-312 516-497	NM_005749.4

Таблиця 2.2

Характеристики праймерів, які були використані для кількісної ПЛР у реальному часі.

Символ гена	Назва гена	Послідовності праймера	Номери нуклеотидів у відповідній послідовності	Номер у GenBank
HBEGF	Heparin binding EGF like growth factor	F: 5′- tggtgctgtcatctgtctgt R: 5′- gtctttcccctctgcagtct	778–797 986–967	NM_001945.3
EDEM1	ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1	F: 5′- tggaaacgatatggtgccct R: 5’- tctccatccggtcttctgtg	1495–1514 1741–1722	NM_014674.3
AK3	Adenylate kinase 3	F: 5′- tctcattcagcgtgaggatg R: 5′- gctttctggcttctttgtgg	586–605 783–764	NM_016282.4
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	F: 5′- tgagcatctacggtttgctg R: 5′- tgcttgtctggaacaactgc	931–750 1088–1069	NM_000963.4
IDH2	Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	F: 5′- tgcttccagtatgccatcca R: 5′- tcatagttcttgcaggccca	781–800 1013–994	NM_002168.4
HSPA5	Heat shock protein family A member 5	F: 5′-aggacaagaaggaggacgtg R: 5′- atcagacgttccccttcagg	279–298 444–425	NM_005347.5
P4HA1	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1	F: 5′- ggcagccaaagctctgttac R: 5′- ggcttgttccatccacagtt	520–539 703–684	NM_000917.4
P4HA2	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2	F: 5′- gggtttccaaaagctcctgg R: 5′- ttccccgtccctaaatgctt	1552–800 1759–1730	NM_004199.3
ACTB	Beta-actin	F: 5′- catccgcaaagacctgtacg R: 5′- cctgcttgctgatccacatc	948–967 1165–1146	NM_001101.5

Таблиця 2.3.

Характеристики праймерів, які були використані для кількісної ПЛР у реальному часі.

Символ гена	Назва гена	Послідовності праймера	Номери нуклеотидів у відповідній послідовності	Номер у GenBank
ZNF395	Zinc finger protein 395	F: 5′- tctgctcttccaccacctct R: 5′- ggtgagactgggatctggaa	1219–1238 1391–1372	NM_018660.3
KRT18	Keratin 18	F: 5′- cacagtctgctgaggttgga R: 5′- gagctgctccatctgtaggg	966–985 1129–1110	NM_000224.3
MEST	Mesoderm specific transcript	F: 5′- aagatggaggtgtgctgtca R: 5′- gcgccttctgaacttcttcc	813-832 1021-1002	NM_002402.4
GJA1	Gap junction protein alpha 1	F: 5′- ggcgtgaggaaagtaccaaa R: 5′- cctccagcagttgagtaggc	46–65 268–249	NM_000165.4

Ампліфікацію проводили протягом 40 циклів за наступними параметрами: денатурація протягом 30 сек. при 95 °С; “відпал” праймерів протягом 30 сек. при 55 °С, а синтез продукту ампліфікації протягом 30 сек. при 72 °С. Дослідження рівня експресії кожного гена здійснювали у трьох повторах у кожному із чотирьох незалежних експериментів.

Якість продуктів ампліфікації аналізували за допомогою кривих плавлення та електрофорезу у 2,5 % агарозному гелі, використовуючи камеру для горизонтального електрофорезу. 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 експресії мікроРНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі

Рівень експресії мікроРНК miR-19a-3p, miR-21-5p, miR-96-5p, miR-98-5p та miR-182-5p вимірювали за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі, використовуючи ампліфікатор “QuantStudio 5 Real-Time PCR System” (*Applied Biosystems*, США) та специфічний реагент високої чутливості (Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR Kit; *Takara*, Японія), причому полімеразну ланцюгову реакцію проводили в трьох повторах. Для аналізу експресії мікроРНК використовували універсальний зворотний qPCR праймер, а прямі праймери були специфічними для кожної із досліджуваних мікроРНК (табл. 2.4).

Таблиця 2.4.

Праймери для визначення експресії мікроРНК кількісною ПЛР.

Символ мікроРНК	Специфікація	Праймер
miR-19	microRNA-19a-3p	5′- tgtgcaaatctatgcaaaactga
miR-21	microRNA-21-5p	5′-ttcacagtggctaagttccgc
miR-96	microRNA-96-5p	5′- tttggcactagcacatttttgct
miR-98	microRNA-98-5p	5′- tgaggtagtaagttgtattgtt
miR-182	microRNA-182-5p	5′- tttggcaatggtagaactcaca
U6	RNA U6	F 5′- cttgcttggggaggacatatac
U6	RNA U6	R 5′- aacgcttcacgaatttgcgtg

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 по рівню експресії РНК U6 і представлені у відсотках від контролю (100 %).

2.2.5. Електрофорез ампліфікованих фрагментів ДНК в агарозному гелі

Продукти ампліфікації аналізували методом електрофорезу у 2,5 % агарозному гелі. Агарозу розчиняли в 0,5-кратному TRIS-ацетатному буфері з ЕДТА (буфер ТАЕ) шляхом нагрівання до 100 °С. Потім цей розчин охолоджували приблизно до 45 °С, заливали у камеру і залишали на 35-40 хв для формування гелю 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 40 хвилин. Після завершення електрофорезу гель витримували у спеціальному флоуресцентному фарбнику для забарвлення ДНК SYBR* Safe DNA Gel Stain (*Life Technologie*s, США). Візуалізацію результатів здійснювали в ультрафіолетовому світлі при довжині хвилі 310 нм у спеціальній камері.

2.2.6. Біоінформаційний аналіз сайтів зв’язування мікроРНК з мРНК

Пошук сайтів зв'язування мікроРНК з мРНК відповідних генів здійснювали за допомогою програми TargetScanHuman 8.0, яка дозволяє виявити на обраній нами мРНК місця специфічного зв'язування мікроРНК, ідентифікувати їх.

2.2.7. Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку отриманих в результаті проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі результатів вивчення рівня експресії досліджених генів, проводили за допомогою програмного

пакету «Differential expression calculator". Усі значення Δ, ΔCt від трьох повторів вимірювання були виражені як середнє і ці середні дані чотирьох незалежних експериментів опрацьовували статистично та виражали як M ± 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, а також у програмі Prism8.0.1. У деяких випадках для перевірки достовірності отриманих результатів були застосовані тест Д'Агостіно-Пірсона (*p* був близький до 1,00) та тест Шапіро – Вілка (W>0,9; *p*>0,9) []. Різницю між середніми значеннями контролю та середніми значеннями експресії під впливом вуглецевих наночастинок (нанотрубок і оксиду графену) вважали статистично значимою при значенні похибки *p*<0,05.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Рівень експресії генів транскрипційних факторів та низки регуляторних протеїнів і мікроРНК у нормальних астроцитах людини за дії наночастинок оксиду графену

Для з’ясування механізмів дії наночастинок оксиду графену на генетичний апарат нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS, було проведені дослідження, направлені на вивчення рівня експресії генів, які кодують синтез важливих транскрипційних факторів, що контролюють перебіг процесів метаболізму як у нормі, так і за різноманітних патологій, зокрема у злоякісних пухлинах. Це гени *DDIT3, ATF3, ATF4, E2F1* та *TP53*. Більшість із цих генів дуже тісно пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулума і ростом злоякісних пухлин, а це є надзвичайно важливим з погляду на з’ясування можливого негативного впливу цих вуглецевих наночастинок на функцію геному, їх гено-токсичності. Був досліджений також вплив наночастинок оксиду графену на низку інших генів, зокрема тих, які кодують синтез регуляторних факторів та ензимів, задіяних у контролі правильності формування вторинної структури протеїнів і численних метаболічних процесах як у нормальних клітинах, так і у злоякісних пухлинах. Це такі гени як *DNAJB9, HSPA5/BiP, EDEM1, HBEGF, TOB1, IDH2, AK3, PTGS2, P4HA1* та *P4HA2.*

Проведеними дослідженнями встановлено, що рівень експресії транскрипційного фактора DDIT3, який ще часто називають CHOP або GADD153, сильно збільшується у нормальних астроцитах людини під впливом наночастинок оксиду графену, причому дозо-залежно. Так, через 24 год. після внесення до середовища вирощування нормальних астроцитів людини наночастинок оксиду графену до кінцевої концентрації 1 нг/мл рівень експресії мРНК DDIT3 підвищувався більше, ніж удвічі (+139 %), а

збільшення дози цих наночастинок до 4 нг/мл значно посилювало ефект наночастинок оксиду графену на рівень експресії цієї мРНК (+211 %; Рис. 3.1).

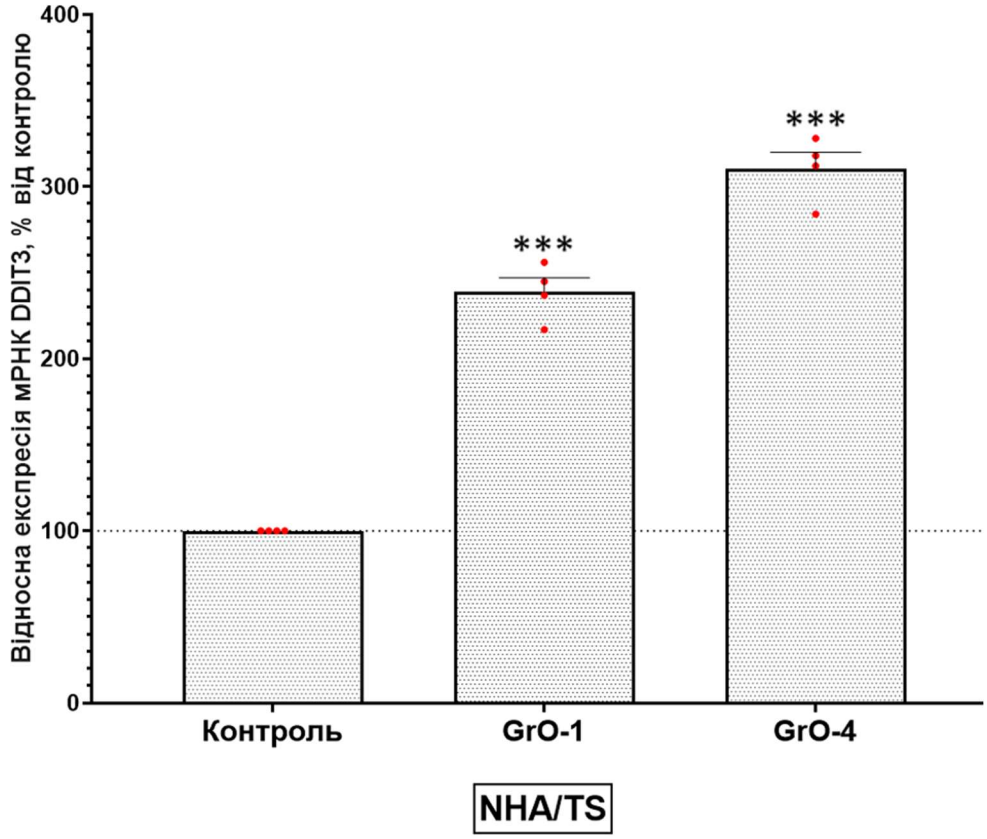


Рис. 3.1. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційного фактора DDIT3 (DNA damage-inducible transcript 3) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Подібні зміни були виявлені і при дослідженні рівня експресії транскрипційного фактора ATF3 у нормальних астроцитах людини за дії різних доз наночастинок оксиду графену, причому виявлені зміни були

дозо-залежними також. Так, під впливом наночастинок оксиду графену у концентрації 1 нг/мл рівень експресії мРНК цього транскрипційного фактора збільшувався рівно у два рази (+100 %), але більша доза наночастинок оксиду графену (4 нг/мл) проявляла більш виражений ефект цих наночастинок на рівень експресії мРНК цього транскрипційного фактора у нормальних астроцитах (+198 %; Рис. 3.2).

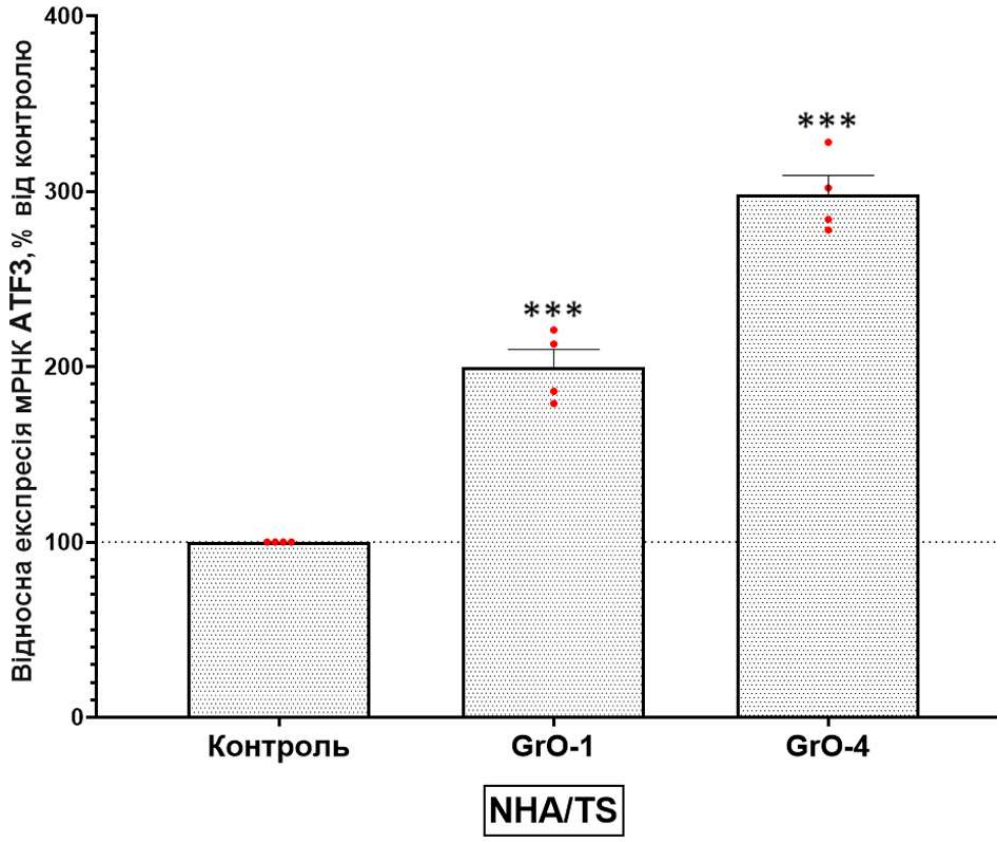


Рис. 3.2. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційного фактора ATF3 (activating transcription factor 3) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Але рівень експресії транскрипційного фактора ATF4 у нормальних астроцитах змінювася під впливом наночастинок оксиду графену в значно

меншій мірі порівняно з ATF3, хоча залежний від дози характер змін зберігався. Так, за дії наночастинок оксиду графену у концентрації 1 нг/мл рівень експресії мРНК транскрипційного фактора ATF4 у нормальних астроцитах людини збільшувався лише на 41 %, а у чотири рази більша доза цих наночастинок підвищувала рівень експресії мРНК цього транскрипційного фактора на 98 % (Рис. 3.3).

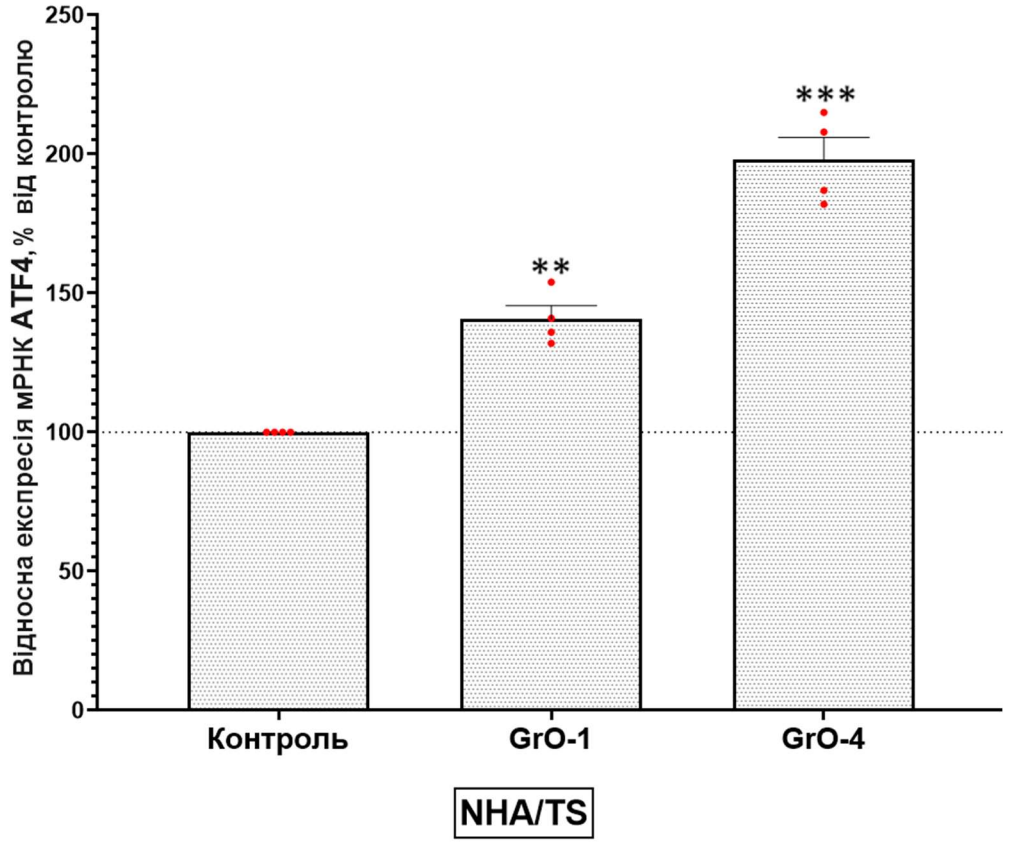


Рис. 3.3. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційного фактора ATF4 (activating transcription factor 4) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; ** - $p < 0{,}01$ і *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

На Рис. 3.4 представлені результати дослідження рівня експресії мРНК транскрипційного фактора E2F1 (E2F transcription factor 1) у нормальних астроцитах людини через 24 год. після внесення до культурального середовища різних концентрацій наночастинок оксиду графену.

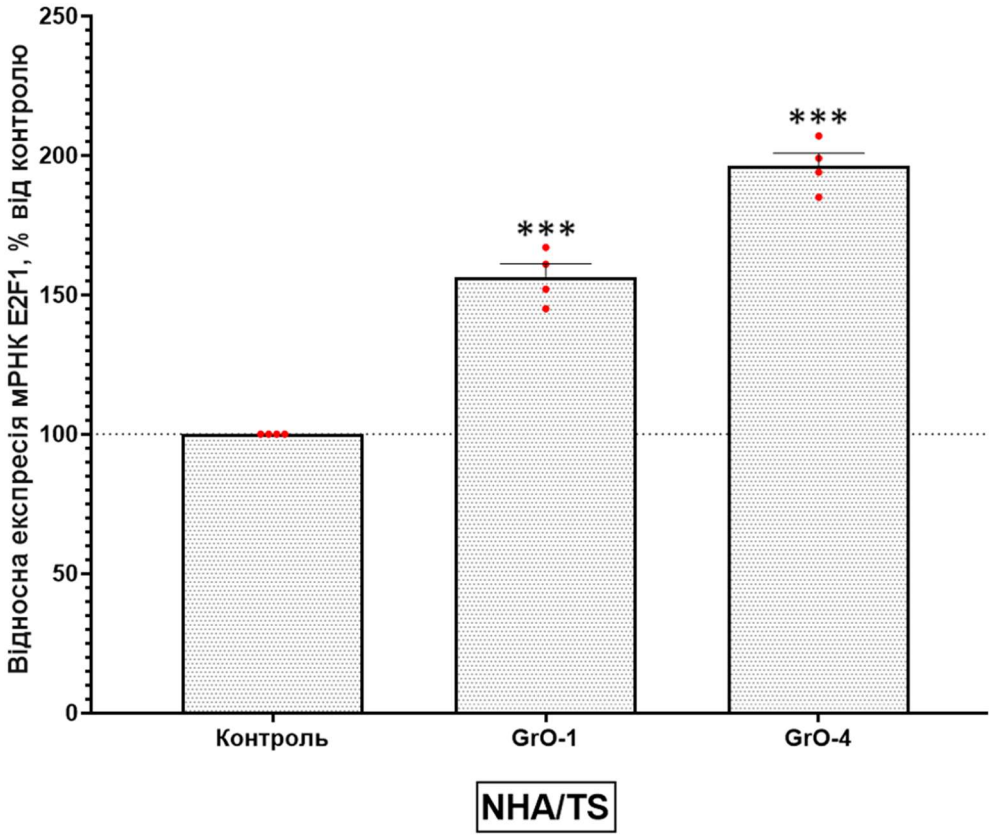


Рис. 3.4. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційного фактора E2F1 (E2F transcription factor 1) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них різних доз наночастинок оксиду графену (кінцева концентрація 1 нг/мл [GrO-1] та 4 нг/мл [GrO-4]) протягом 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Так, за дії наночастинок оксиду графену у концентрації 1 нг/мл рівень експресії мРНК транскрипційного фактора E2F1 збільшувався у нормальних

астроцитах людини лише на 56 %, а більша доза цих наночастинок (4 нг/мл) посилювала експресію цієї мРНК на 96 % (Рис. 3.4).

Були також проведені дослідження по вивченню експресії транскрипційного фактора TP53, який є надзвичайно важливим регулятором більшості процесів у клітинах і якого називають ще “сторожем” геному, у нормальних астроцитах людини за дії на них наночастинок оксиду графену (Рис. 3.5).

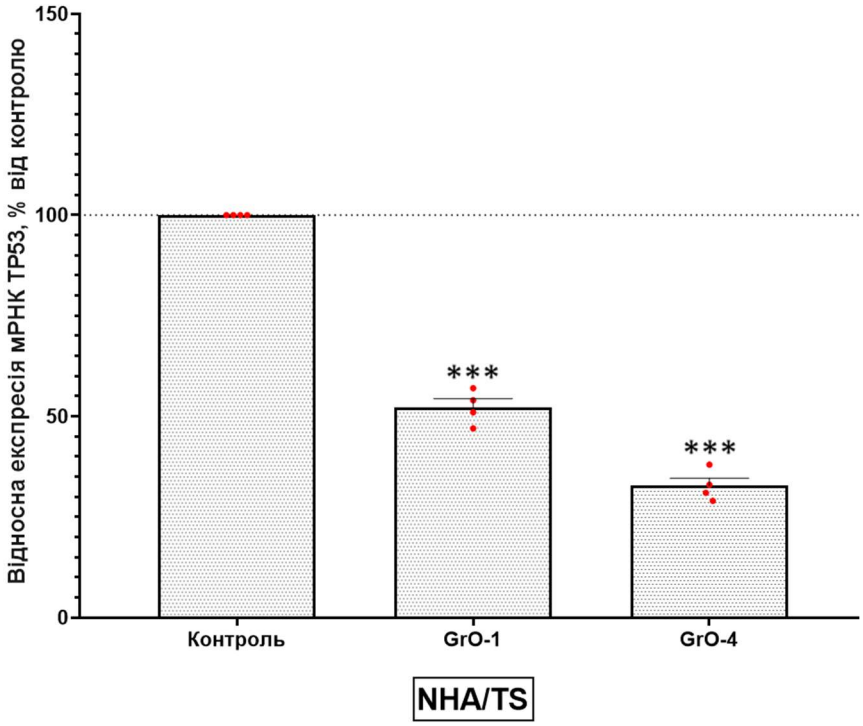


Рис. 3.5. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційного фактора TP53 (tumor protein 53) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до культурального середовища у концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) і витримували на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Встановлено, що наночастинки оксиду графену пригнічують експресію гена *TP53* у нормальних астроцитах дозо-залежно: менша доза (1 нг/мл) вдвічі, а більша доза (4 нг/мл) втричі (Рис. 3.5).

Наступним етапом досліджень було вивчення впливу наночастинок оксиду графену на експресію гена шаперона DNAJB9 у нормальних астроцитах. Із даних, представлених на Рис. 3.6, видно, що оксид графену різко підвищує рівень експресії гена цього шаперона навіть у меншій дозі (1 нг/мл; +126 %).), а більша доза цих наночастинок (4 нг/мл) проявляє більш виражену дію на експресію *DNAJB9* (+203 %).

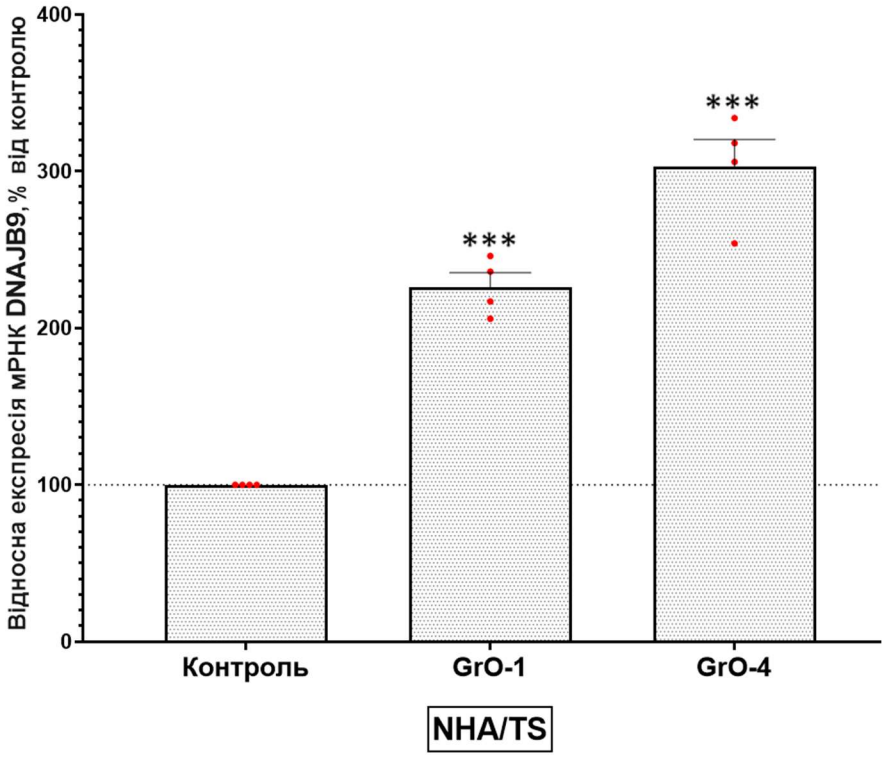


Рис. 3.6. Відносний рівень експресії мРНК DNAJB9 (DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B9) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до культурального середовища у концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) і витримували на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних

клітин (контроль), прийнятого за 100 %; *n*=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Дещо менш виражені зміни були виявлені при дослідженні впливу наночастинок оксиду графену на експресію гена *TOB1* (transducer of ERBB2, 1). Так, було встановлено, що менша доза цих наночастинок збільшує рівень експресії гена *TOB1* на 86 %, а більша – аж на 175 % у нормальних астроцитах людини (Рис. 3.7).

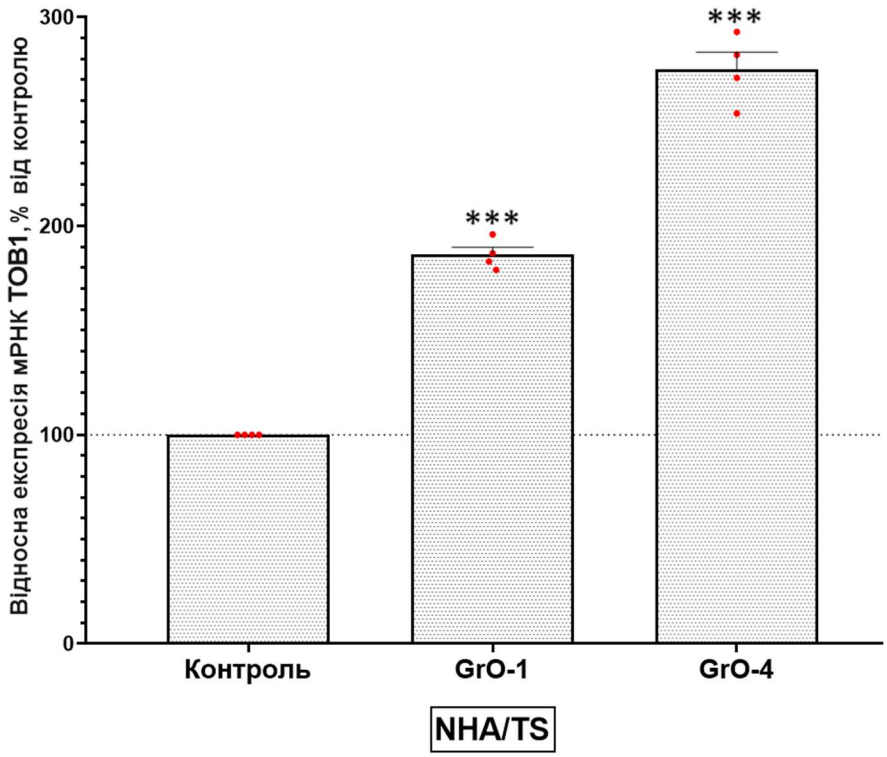


Рис. 3.7. Відносний рівень експресії мРНК шаперона TOB1 (transducer of ERBB2, 1) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до культурального середовища у концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) і витримували на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину, який виражено у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; *n*=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Як видно із даних, представлених на Рис. 3.8, під впливом наночастинок оксиду графену підвищується рівень експресії гена фактора росту, а саме *HBEGF* (heparin binding EGF like growth factor), який має ще називають рецептором дифтерійного токсину (DFR).

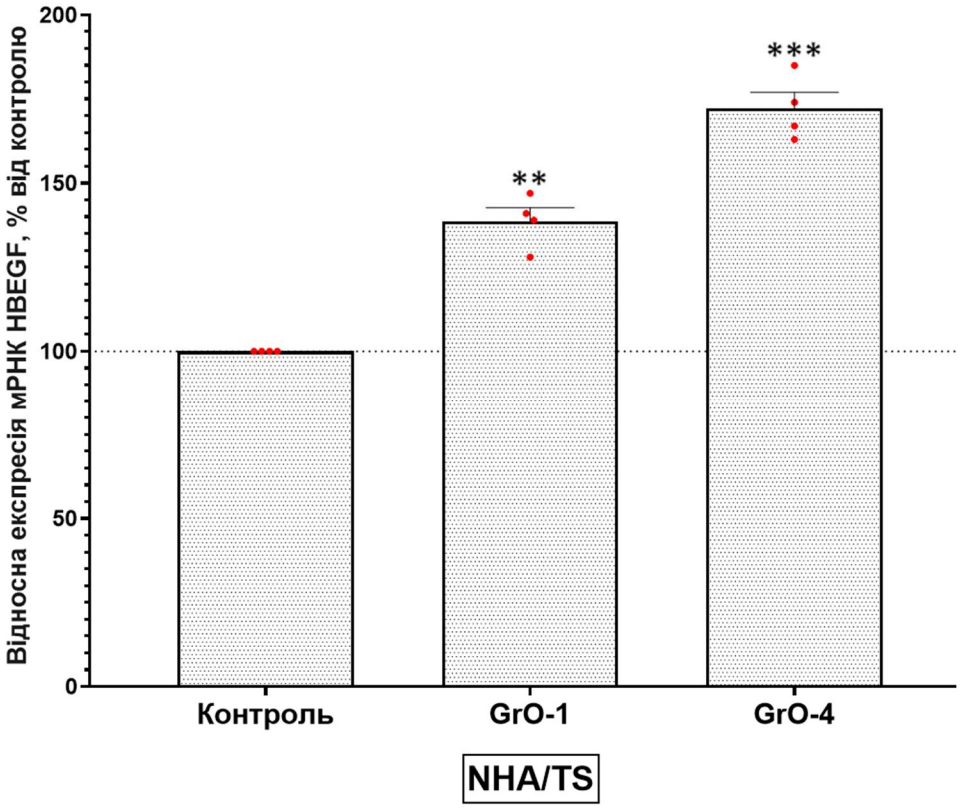


Рис. 3.8. Відносний рівень експресії мРНК HBEGF (heparin binding EGF like growth factor) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до культурального середовища у концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) і витримували на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину та виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; ** - $p < 0{,}001$ і *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Так, рівень експресії цього фактора росту збільшується на 39 % за меншої дози наночастинок оксиду графену, але збільшення дози наночастинок у чотири рази призводить до більш виражених змін рівня експресії HBEGF у нормальних астроцитах людини (+72 %).

Важливу роль у розвитку ефектів стресу ендоплазматичного ретикулума відіграє EDEM1 (ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1), який задіяний у деградації неправильно згорнутих протеїнів у ЕР. У зв'язку з цим, було доцільним дослідити вплив наночастинок оксиду графену на рівень експресії мРНК EDEM1 у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Встановлено, що за дії цих наночастинок на нормальні астроцити рівень експресії мРНК EDEM1 збільшується на 38 % та 81 %, відповідно за меншої і більшої дози наночастинок (Рис. 3.9).

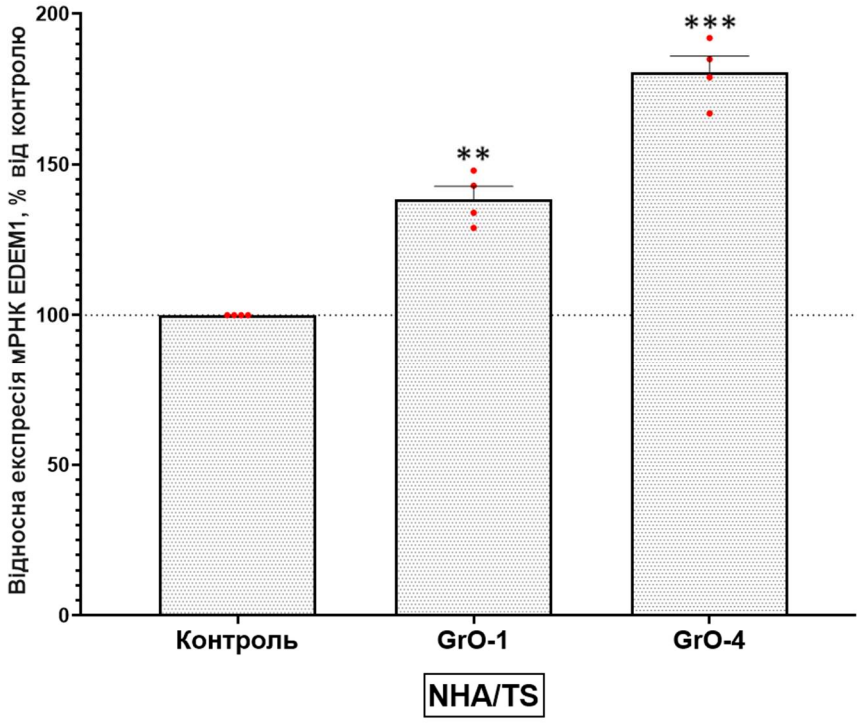


Рис. 3.9. Відносний рівень експресії мРНК EDEM1 (ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК

бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; *n*=4; ** - $p < 0,01$ і *** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем.

Виявлено, що рівень експресії мРНК IDH2 істотно зменшувався за дії на нормальні астроцити людини наночастинок оксиду графену, але також дозо-залежно (Рис. 3.10).

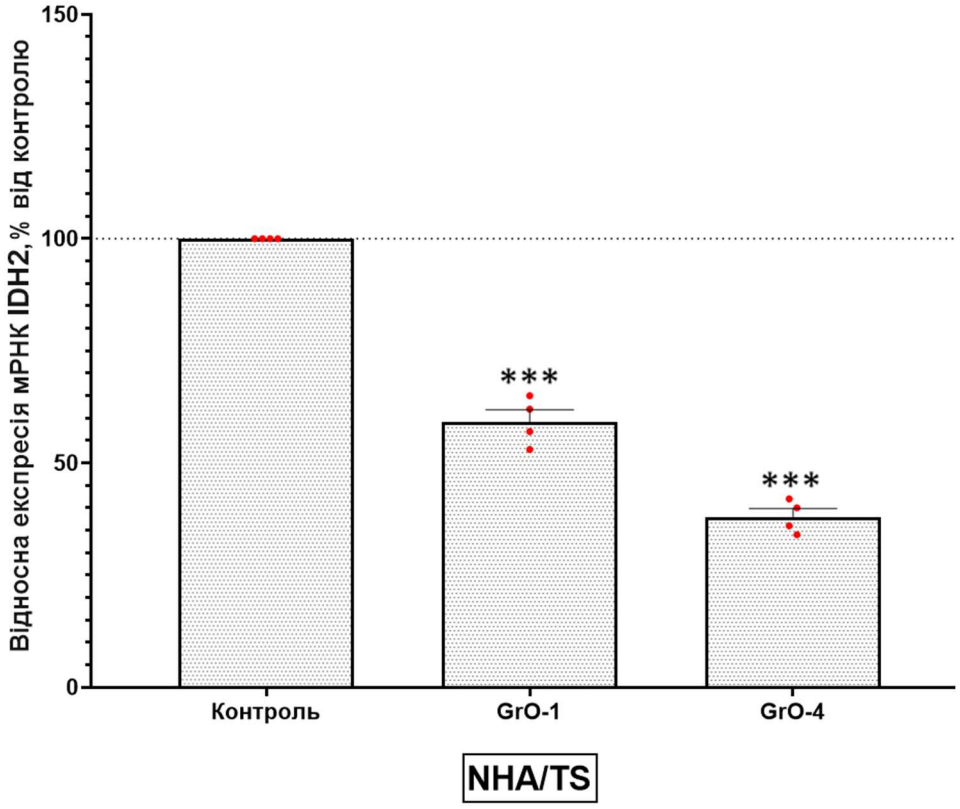


Рис. 3.10. Відносний рівень експресії мРНК IDH2 (isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; *n*=4; *** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем.

Показано, що менша доза наночастинок оксиду графену (1 нг/мл) знижує рівень експресії мРНК IDH2 на 48 %, а більша доза (4 нг/мл) ще у більшій мірі – втричі (-67 %).

Було ще проведено вивчення рівня експресії одного із основних регуляторів відповіді на незгорнуті протеїни – шаперона HSPA5/BiP. Із даних представлених на Рис. 3.11, видно, що за дії наночастинок оксиду графену на нормальні астроцити людини спостерігається значне підвищення рівня експресії цього шаперона: на 57 % за меншої дози і на 96 % за більшої дози наночастинок оксиду графену.

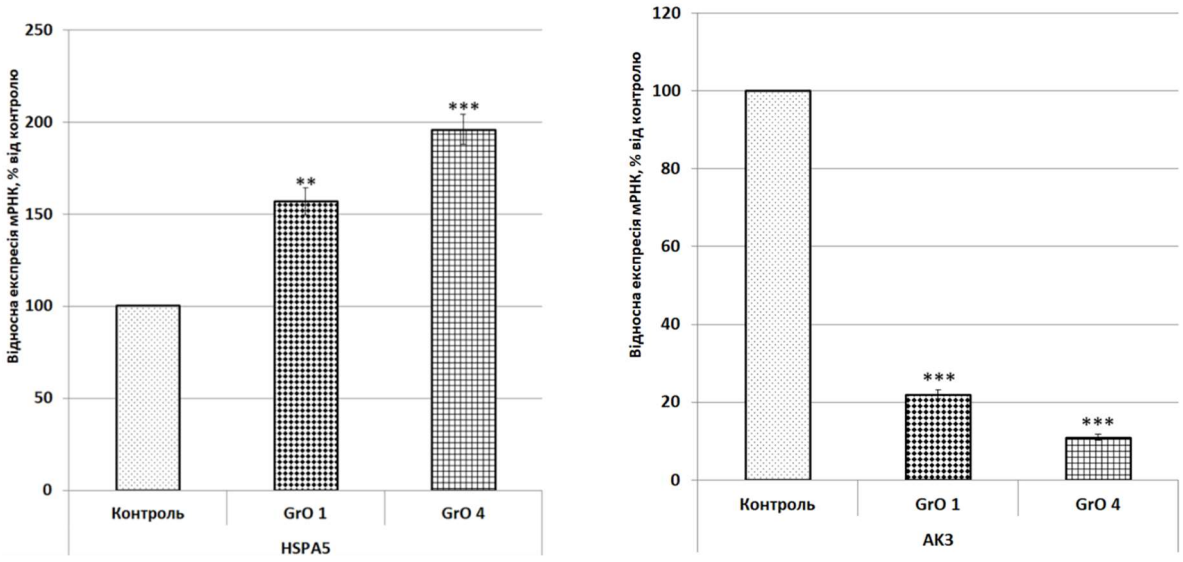


Рис. 3.11. Відносний рівень експресії мРНК HSPA5 (heat shock protein family A member 5) і AK3 (adenylate kinase 3) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цих мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; ** - $p < 0,01$ і *** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем.

Протилежно направлені і сильно виражені зміни в експресії за дії наночастинок оксиду графену були виявлені для гена *AK3* (adenylate kinase 3). Так, показано, що менша доза наночастинок оксиду графену пригнічувала експресію цього гена більше ніж у 4 рази (-78 %), а під впливом більшої дози зниження рівня експресії *AK3* було ще більш вираженим (-89 %; Рис. 3.11).

Дуже чутливим до впливу наночастинок оксиду графену виявилися гени субодиниць проліл-4-гідроксилази *P4HA1* та *P4HA2* (Рис. 3.12).

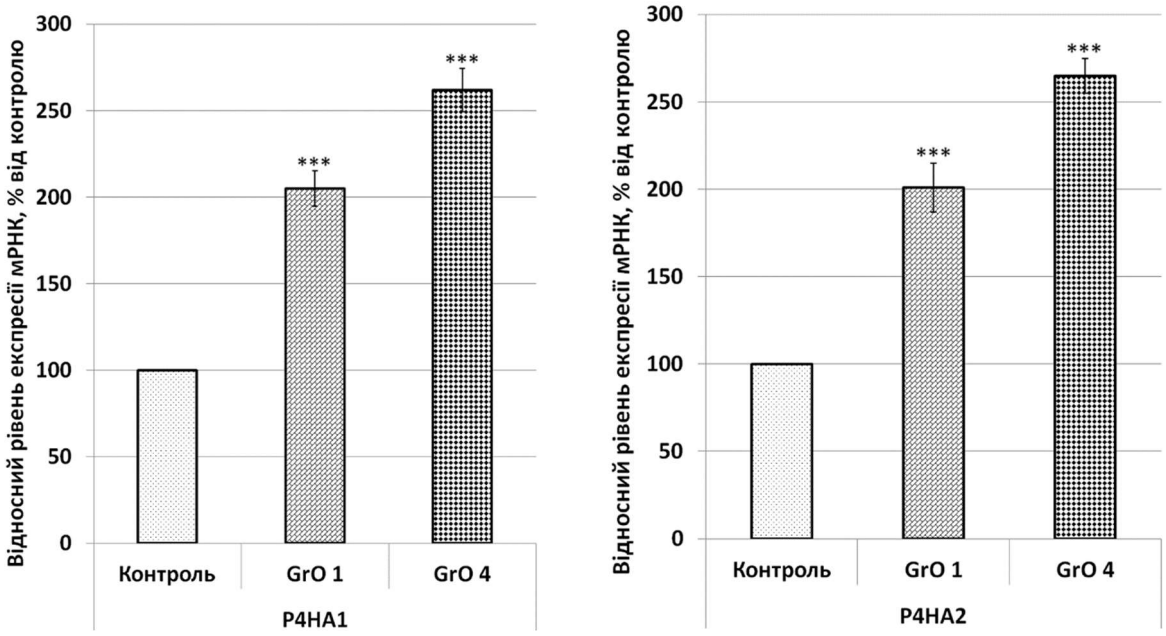


Рис. 3.12. Відносний рівень експресії мРНК P4HA1 (prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1) та P4HA2 у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цих мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Встановлено, що зміни в експресії цих генів під впливом наночастинок оксиду графену були близькими і дозо-залежними: менша доза наночастинок збільшувала рівень експресії P4HA1 і P4HA2 вдвічі, а більша доза ще більше посилювала експресію мРНК цих субодиниць проліл-4-гідроксилази (+162 та + 165 %, відповідно для P4HA1 і P4HA2 (Рис. 3.12)

Із даних, наведених на Рис.3.13, видно, що експресія гена PTGS2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2), відомого ще як циклооксигеназа, який є ключовим ензимом у синтезі простагландинів, також індукується під впливом наночастинок оксиду графену.

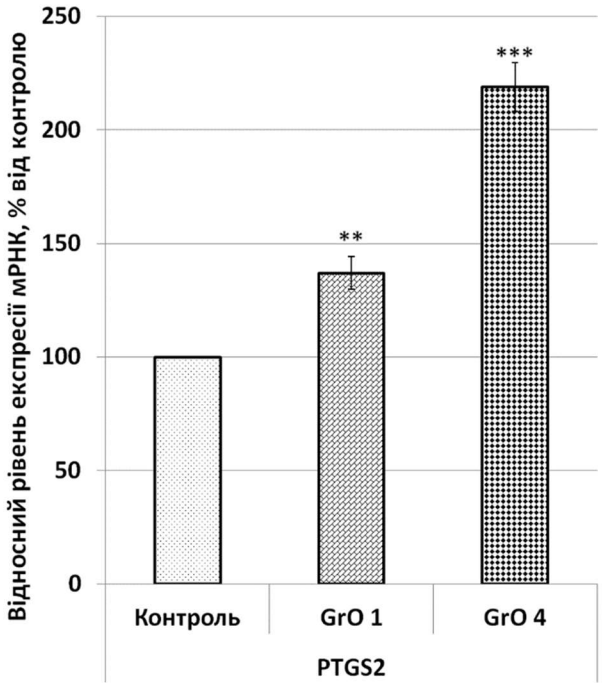


Рис. 3.13. Відносний рівень експресії мРНК PTGS2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; ** - $p < 0,01$ і *** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем.

Встановлено, що рівень експресії мРНК PTGS2 збільшується на 37 % під впливом меншої дози наночастинок оксиду графену (1 нг/мл), а за дії більшої дози – аж на 119 % порівняно з контролем (Рис. 3.13).

Таким чином, наведені вище результати вказують на виражений вплив наночастинок оксиду графену на експресію важливих регуляторних факторів та ензимів.

Разом з тим, відомо, що різні біологічні процеси, включаючи проліферацію клітин, їх диференціацію і апоптоз, у нормі та за патологічних станів, контролюються також і мікроРНК, які відіграють важливу роль у нейрогенезі і регулюють експресію генів шляхом їх взаємодії з 3′-нетранслюємою ділянкою (3' UTR) мРНК, ініціюючи її деградацію або репресію трансляції мРНК. Відомо, що у нормальних астроцитах людини під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок змінюється рівень експресії мікроРНК, які пост-транскрипційно контролюють рівень експресії мРНК, пов'язаних з імунною відповіддю [53].

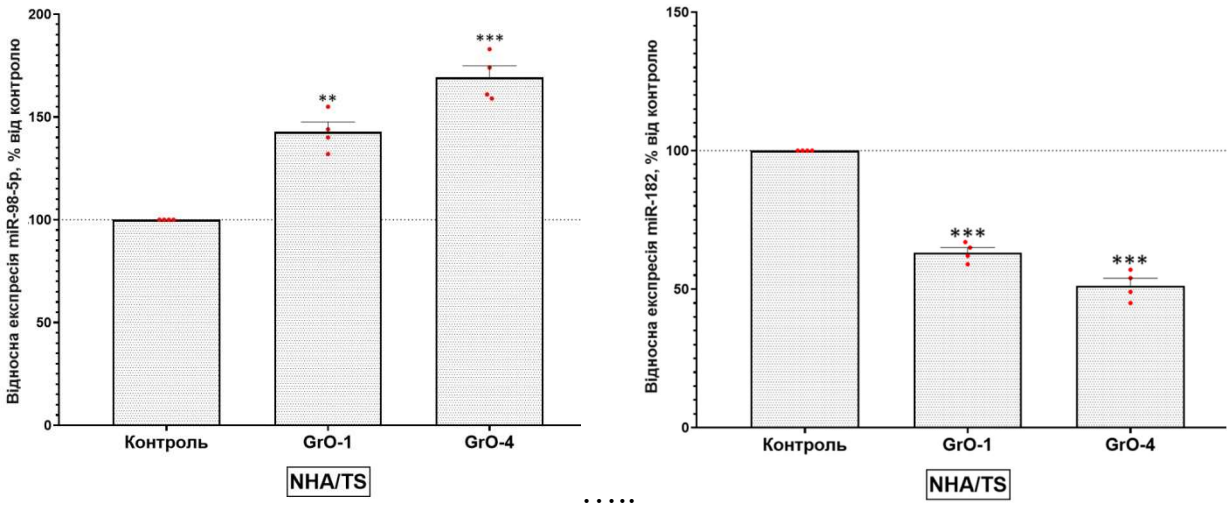
У зв'язку з цим, були проведено біоінформаційний аналіз для виявлення сайтів зв’язування мікроРНК з дослідженими нами мРНК, зокрема TOB1, HBEGF і TP53. Показано, що мРНК TOB1 та HBEGF мають сайти зв’язування мікроРНК miR-182-5p, а мРНК TP53 – з miR-98-5p, причому мРНК TP53 має аж по два таких сайти зв’язування мікроРНК (Рис. 3.14). Із даних, приведених на цьому ж рисунку, також видно, що в мРНК TOB1 виявлено сайти зв'язування двох мікроРНК: miR-182-5p і miR-218-5p, які розташовані поруч.

Position 153-159 of TOB1 3' UTR	5' ...UGCAUCAUUUUUCAUUUGCCAAC...
	|||||||
hsa-miR-182-5p	3' UCACACUCAAGAUGGUAACGGUUU
Position 162-169 of TOB1 3' UTR	5' ...UUUCAUUUGCCAACCAAGCACAA...
	|||||||
hsa-miR-218-5p	3' UGUACCAAUCUAGUUCGUGUU
Position 152-159 of HBEGF 3' UTR	5' ...CCUCCCAUAAUUGCUUUGCCAAA...
	|||||||
hsa-miR-182-5p	3' UCACACUCAAGAUGGUAACGGUUU
Position 234-240 of TP53 3' UTR	5' ...CCAAAAAGGGUCAGUCUACCUCC...
	|||||||
hsa-miR-98-5p	3' UUGUUAUGUUGAAUGAUGGAGU
Position 699-706 of TP53 3' UTR	5' ...UGCUGGCAUUUGCACCUACCUCA...
	|||||||
hsa-miR-98-5p	3' UUGUUAUGUUGAAUGAUGGAGU

Рис. 3.14. Сайти зв'язування мікроРНК з 3′-нетранслюємими послідовностями (UTR) мРНК TOB1, HBEGF та TP53, а також їх локалізація в цих мРНК.

На рисунку 3.15 представлені результати визначення рівня експресії двох мікроРНК: miR-98 та miR-182 у астроцитах лінії NHA/TS після дії на них різних доз наночастинок оксиду графену. Встановлено, що ці наночастинки дозо-залежно підвищують рівень експресії мікроРНК miR-98-5p у нормальних астроцитах: менша доза оксиду графену на 43 %, а більша доза – на 69 %.

Однак, рівень експресії мікроРНК miR-182-5p у нормальних астроцитах, навпаки, знижувався під впливом наночастинок оксиду графену на 37 та 49 %, відповідно за меншої і більшої дози цих наночастинок (Рис. 3.15).



…..

Рис. 3.15. Відносний рівень експресії мікроРНК miR-98-5p (зліва) та miR-182-5p (справа) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цих мікроРНК нормалізували по рівню експресії РНК U6 і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; ** - $p < 0{,}01$ і *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Результати дослідження рівня експресії мікроРНК miR-98-5p та miR-182-5p у нормальних астроцитах за дії на них наночастинок оксиду графену добре узгоджуються зі змінами рівня експресії мРНК TOB1, HBEGF та TP53, оскільки підвищення рівня експресії мікроРНК miR-98-5p асоціюється зі зниженням рівня експресії мРНК TP53, а зниження рівня експресії мікроРНК miR-182-5p узгоджується зі зниженням рівня експресії мРНК TOB1 і HBEGF.

3.2. Рівень експресії генів транскрипційних факторів та низки регуляторних протеїнів і мікроРНК у клітинах гліобластоми за дії наночастинок оксиду графену

Задачею цього розділу досліджень було вивчити особливості впливу різних доз наночастинок оксиду графену на рівень експресії важливих транскрипційних факторів та регуляторних протеїнів у клітинах гліобластоми в залежності від пригнічення ERN1. На Рис. 3.16 наведені дані по впливу оксиду графену на експресію гена *DDIT3*.

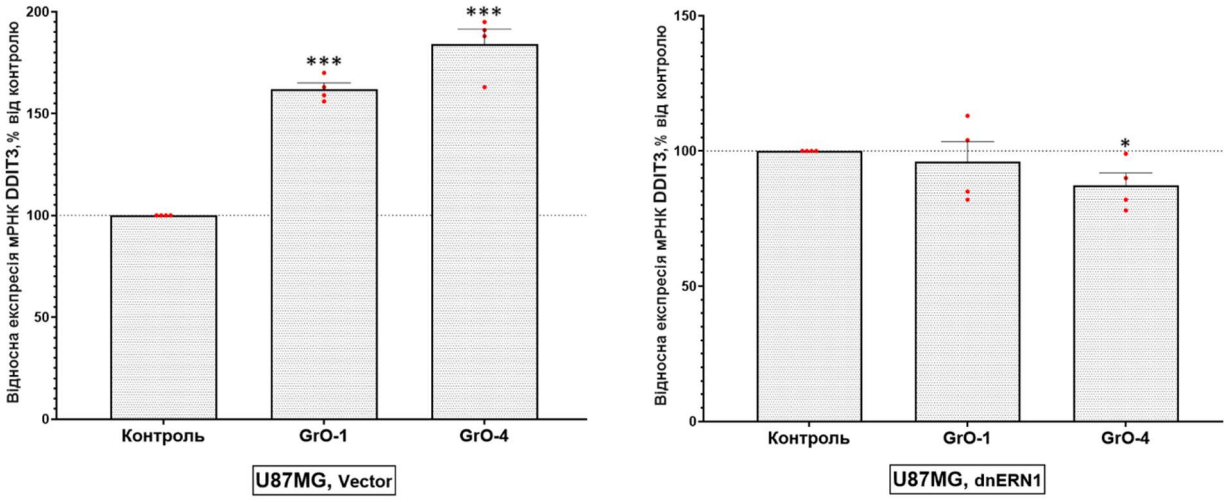


Рис. 3.16. Відносний рівень експресії мРНК DDIT3 (DNA damage-inducible transcript 3) у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих "порожнім" вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; * - $p < 0,05$ і *** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем.

Встановлено, що наночастинки оксиду графену підвищують рівень експресії мРНК транскрипційного фактора DDIT3 у клітинах гліобластоми на 62 і 84 %, відповідно за меншої та більшої доз цих наночастинок, але у клітинах з пригніченими ензиматичними активностями ERN1 було виявлено невелике зниження рівня (-13 %) експресії DDIT3 (Рис. 3.16).

На Рис. 3.17 наведені результати дослідження експресії ATF3, які показують стимулюючу дію наночастинок оксиду графену на рівень експресії цього фактора транскрипції: +27 і + 51 %, відповідно за дії меншої та більшої доз оксиду графену, причому у клітинах з пригніченим ERN1 істотних змін в експресії ATF3 також не виявлено.

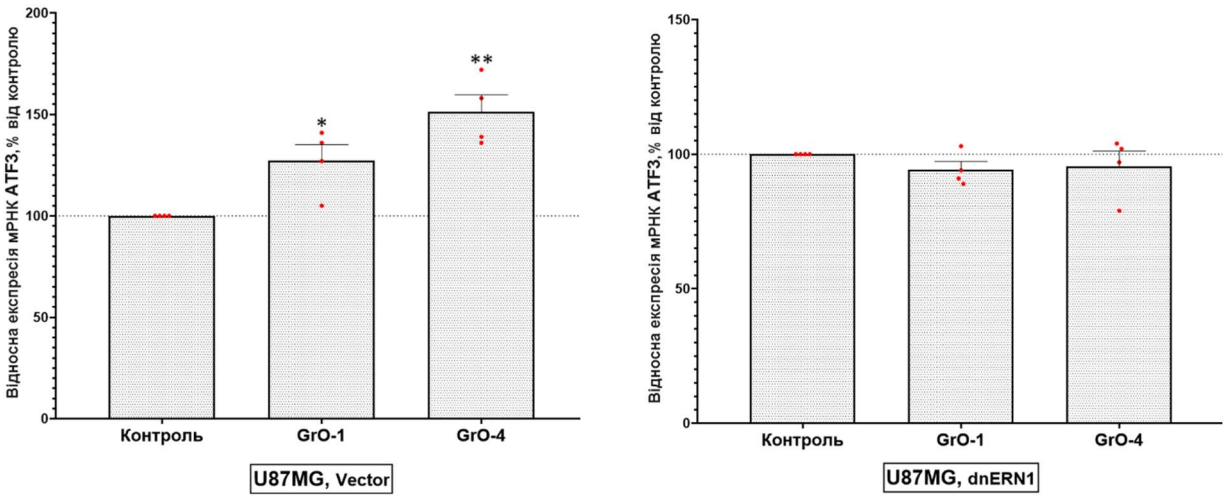


Рис. 3.17. Відносний рівень експресії мРНК ATF3 у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 для пригнічення ензиматичних активностей ERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

При дослідженні рівня експресії ATF4 було встановлено, що наночастинки оксиду графену також підвищують рівень експресії цього транскрипційного фактора у клітинах гліобластоми, але в меншій мірі, порівняно з DDIT3 та ATF3: +14 і + 36 %, відповідно, за дії меншої та більшої дози оксиду графену, і лише у клітинах з нативним ERN1 (Рис. 3.18).

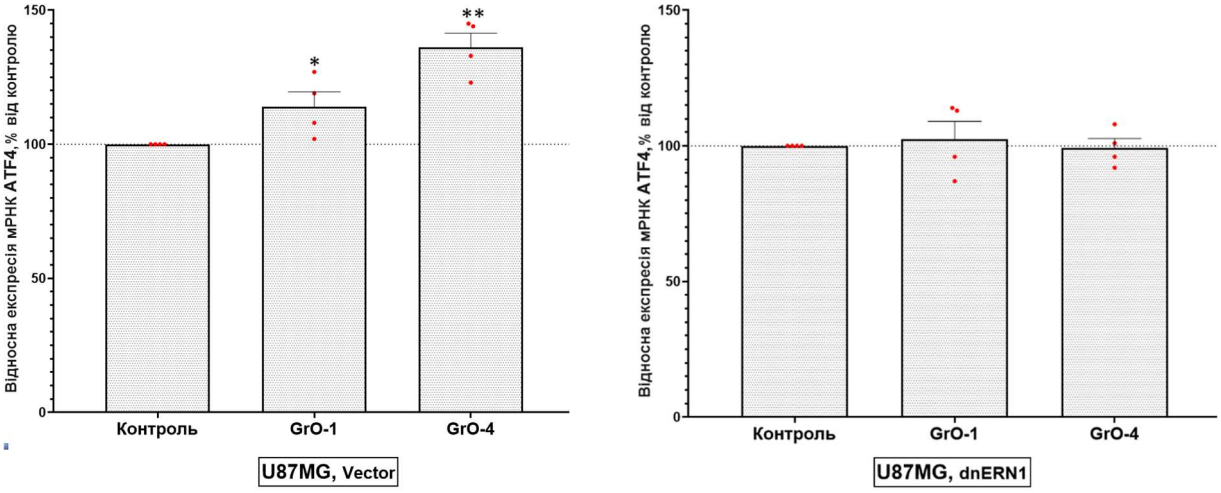


Рис. 3.18. Відносний рівень експресії мРНК ATF4 у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 для пригнічення ензиматичних активностей ERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Наночастинки оксиду графену збільшували також рівень експресії про-онкогенного транскрипційного фактора E2F1, причому майже в такій мірі, як і ATF4: +21 і + 39 %, відповідно, за дії на клітини гліобластоми меншої та більшої дози оксиду графену, істотно не впливаючи на рівень

його експресії у клітинах з пригніченими ензиматичними активностями ERN1 (Рис. 3.19).

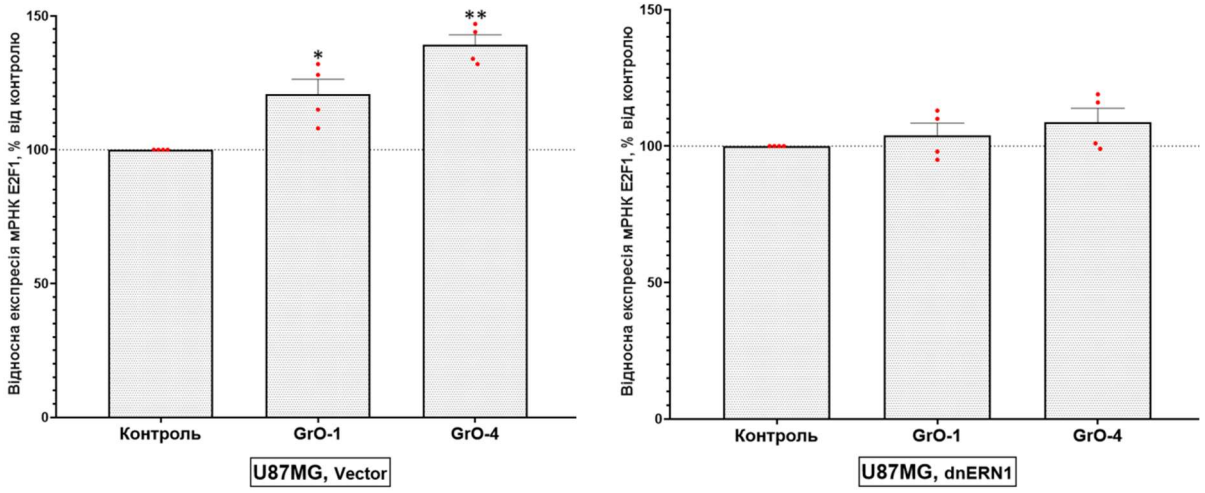


Рис. 3.19. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційного фактора E2F1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 для пригнічення ензиматичних активностей ERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Були також проведені дослідження по вивченню впливу наночастинок оксиду графену на рівень експресії транскрипційного фактора TP53, який є надзвичайно важливим супресором росту пухлин і який є мутантним у більшості злоякісних пухлин, причому деякі із мутантів проявлять про-онкогенну дію. І хоча експресія більшості досліджених транскрипційних факторів посилюється у клітинах гліобластоми за дії наночастинок оксиду графену, рівень експресії гена *TP53* у цих клітинах дозо-залежно

пригнічується: -18 % за меншої дози (1 нг/мл) і -33 % за більшої його дози (4 нг/мл), причому і за умов пригнічення сигнального протеїну ERN1 спостерігалося невелике, але статистично значиме зниження рівня експресії цього транскрипційного фактора (Рис. 3.20).

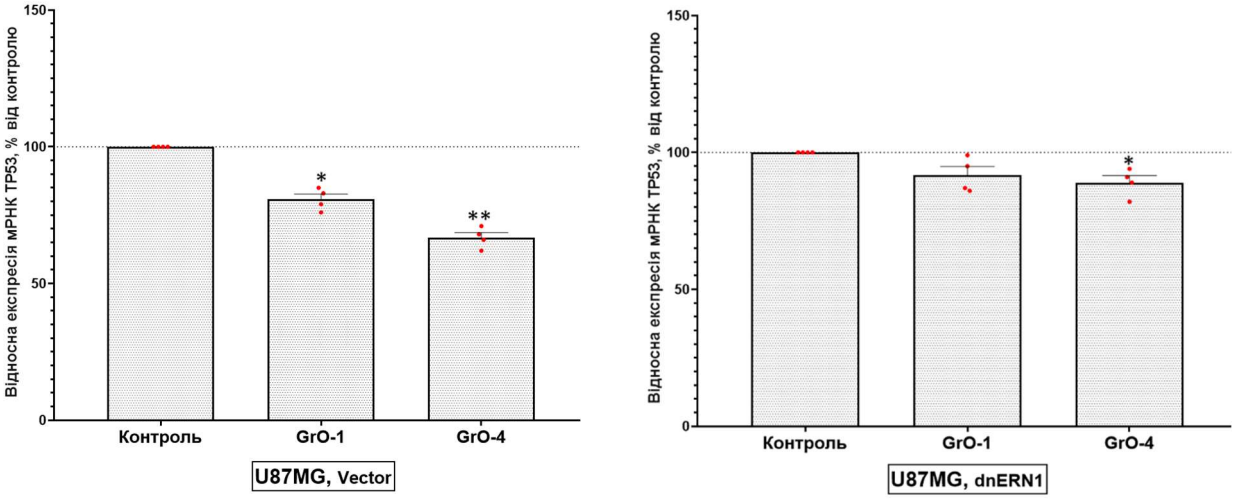


Рис. 3.20. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційного фактора TP53 у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 для пригнічення ензиматичних активностей ERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Високочутливою до впливу наночастинок оксиду графену у клітинах гліобластоми виявилася експресія гена шаперона DNAJB9. Із даних, представлених на Рис. 3.21, видно, що оксид графену збільшує рівень експресії гена цього шаперона навіть у меншій його дозі (1 нг/мл; +41 %), а більша доза цих наночастинок (4 нг/мл) проявляє значно більший ефект на

рівень експресії *DNAJB9* (+82 %). Більше того, у клітинах гліобластоми з пригніченими ензиматичними активностями ERN1 спостерігалось зниження на 14 % рівня експресії цього важливого у реалізації ефектів стресу ЕР шаперона (Рис. 3.21).

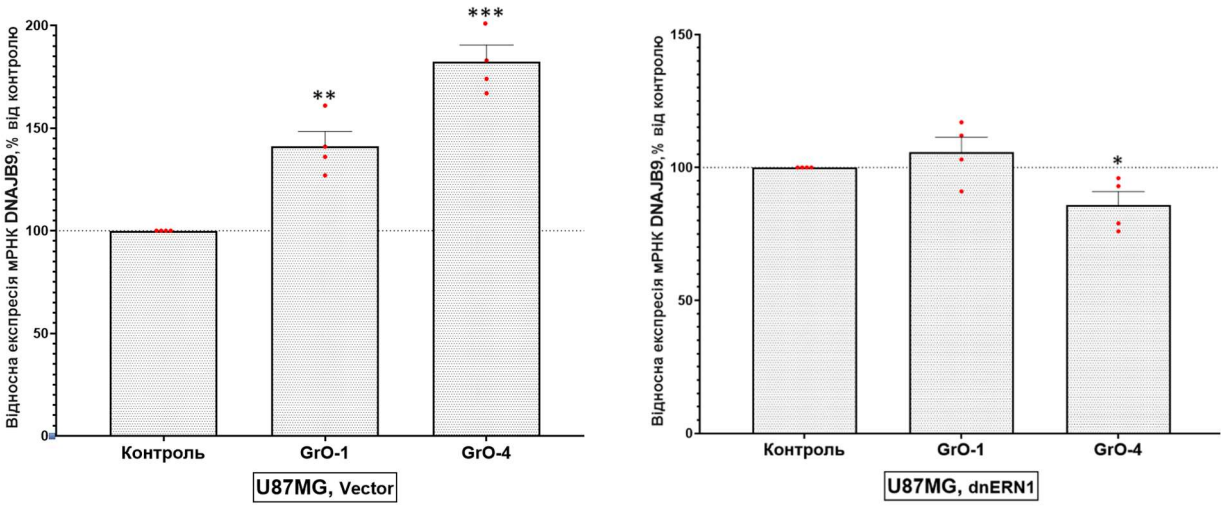


Рис. 3.21. Відносний рівень експресії мРНК шаперона DNAJB9 у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 для пригнічення ензиматичних активностей ERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ і *** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем.

Чутливою до дії наночастинок оксиду графену у клітинах гліобластоми виявилася також експресія й іншого гена, який кодує протеїн, що задіяний у реалізації сигнальних шляхів стресу ЕР, а саме EDEM1 (ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1). Проведеними дослідженнями встановлено, що за дії різних доз оксиду графену рівень експресії гена *EDEM1* збільшується у клітинах гліобластоми як за меншої

(+11 %), так і за більшої дози (+31 %) цих наночастинок, але істотного впливу на рівень експресії цього гена не було виявлено у клітинах гліобластоми з пригніченими ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1(Рис. 3.22).

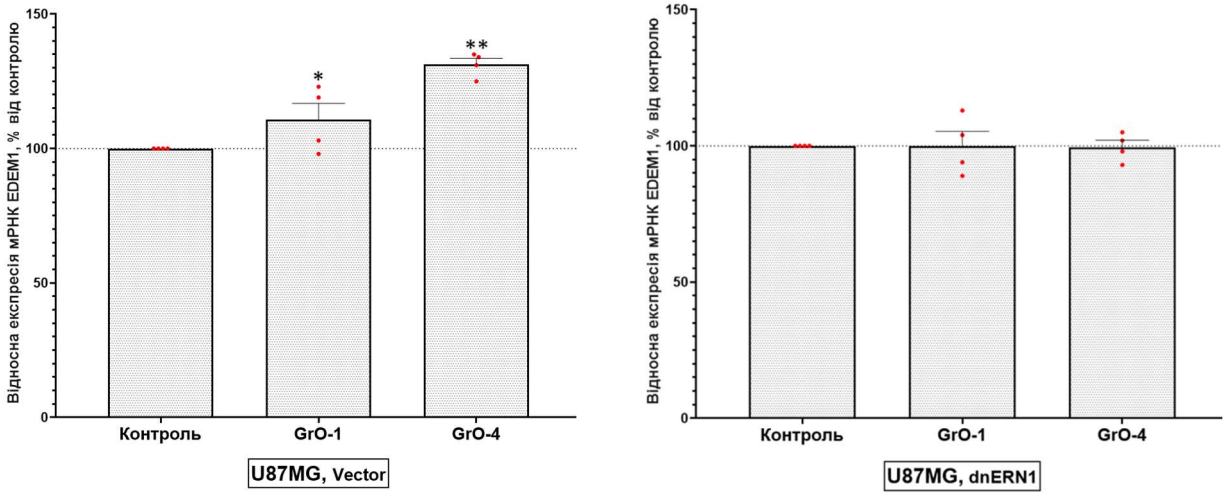


Рис. 3.22. Відносний рівень експресії мРНК EDEM1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 для пригнічення ензиматичних активностей ERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Наступним етапом було дослідити вплив наночастинок оксиду графену на рівень експресії генів, які кодують ростові фактори та їх регулятори. Фактор HBEGF (heparin binding EGF like growth factor) є трансмембранним рецепторним протеїном, який опосередковує свою активність фактора росту переважно через EGF рецептор (EGFR/HER1) та ERBB2 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2; HER2), які посилено експресуються у

багатьох злоякісних пухлинах, а особливо в аденокарциномах грудної залози. Проведеними дослідженнями встановлено, що наночастинки оксиду графену збільшують рівень експресії гена *HBEGF* у клітинах гліобластоми на 22 % у дозі 1 нг/мл і на 40 % за більшої концентрації (4 нг/мл), що видно із даних, представлених на Рис. 3.23.

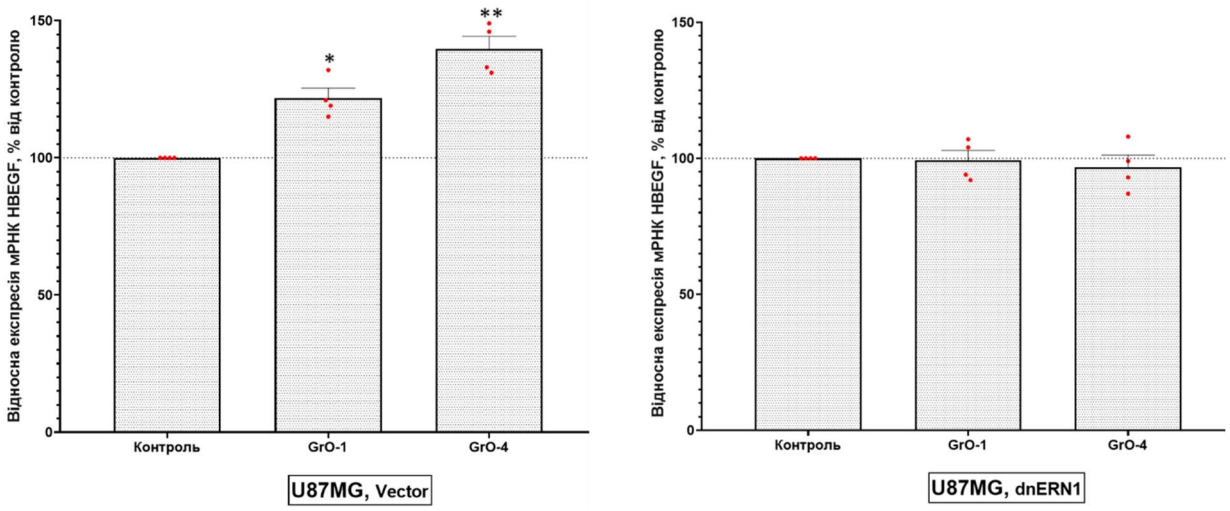


Рис. 3.23. Відносний рівень експресії мРНК HBEGF у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 для пригнічення ензиматичних активностей ERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

У той же час, рівень експресії мРНК HBEGF у клітинах гліобластоми з пригніченими ензиматичними активностями ERN1 виявився резистентним до дії як меншої, так і більшої дози наночастинок оксиду графену (Рис. 3.23).

Протеїн TOB1 (transducer of ERBB2, 1) є у ланцюжку реалізації ефектів HBEGF, опосередкованих EGFR/HER1 та ERBB2/HER2. У зв'язку з цим, було досліджено вплив наночастинок оксиду графену на рівень його експресії у клітинах гліобластоми і показано, що рівень експресії мРНК TOB1 збільшується на 15 % за концентрації наночастинок 1 нг/мл і на 41 % за значно більшої їх концентрації (4 нг/мл), але пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 знімало цей ефект наночастинок оксиду графену, що видно із даних, представлених на Рис. 3.24.

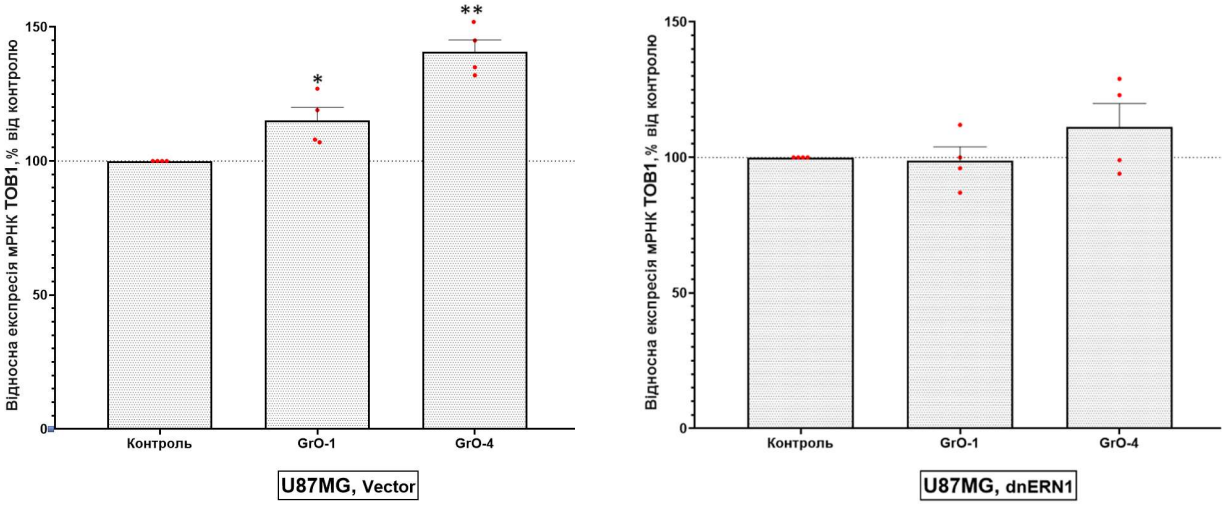


Рис. 3.24. Відносний рівень експресії мРНК TOB1 (transducer of ERBB2, 1) у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих "порожнім" вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 для пригнічення ензиматичних активностей ERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Наступним етапом цих досліджень було вивчення впливу різних доз наночастинок оксиду графену у клітинах гліобластоми на експресію IDH2 (isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial), яка є полі-функціональним ензимом і проявляє істотний вплив також і на процеси проліферації клітин. Встановлено, що під впливом як меншої, так і більшої дози наночастинок оксиду графену спостерігається зниження рівня експресії мРНК ізоцитратдегідрогенази 2 на 14 та 30 %, відповідно (Рис. 3.25).

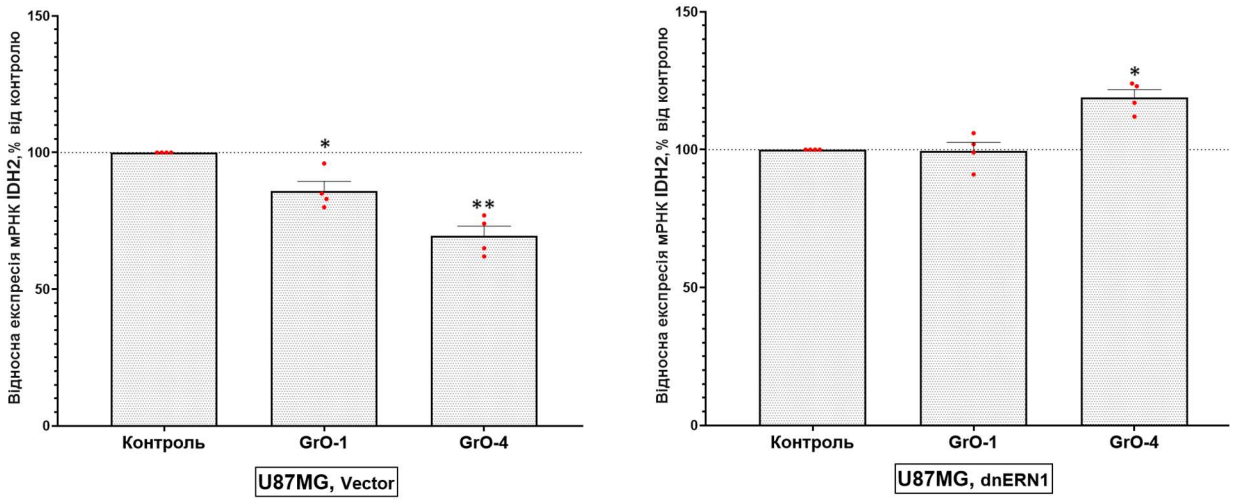
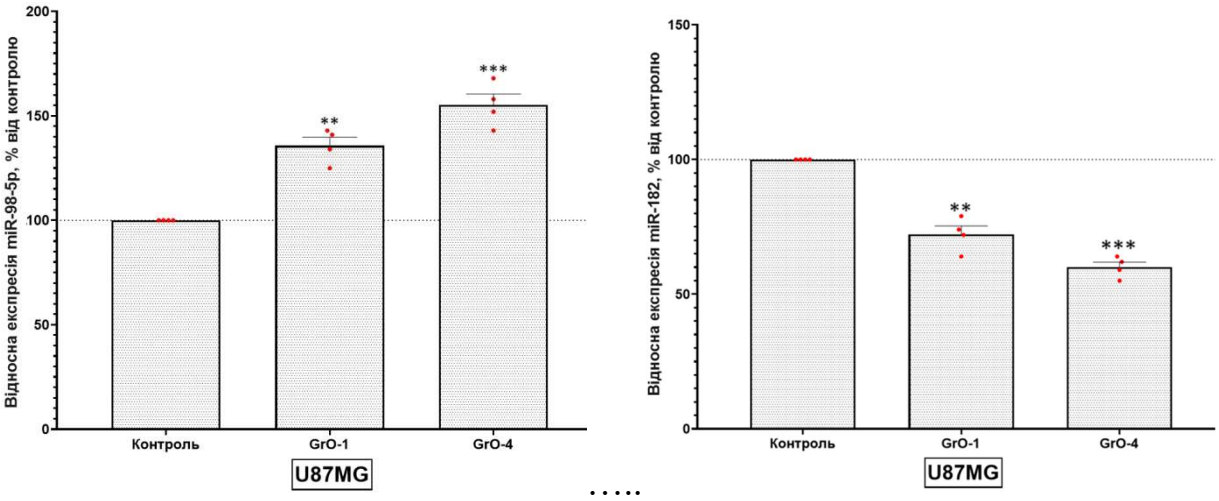


Рис. 3.25. Відносний рівень експресії мРНК IDH2 (isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial) у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 для пригнічення ензиматичних активностей ERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

У той же час, рівень експресії мРНК IDH2 у клітинах гліобластоми з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 істотно не змінювався під впливом наночастинок оксиду графену у концентрації 1 нг/мл, але більша їх концентрація (4 нг/мл) посилювала експресію мРНК ізоцитратдегідрогенази 2 на 19 %, що видно із даних, представлених на Рис. 3.25.

Були проведені також дослідження по вивченню рівня експресії мікроРНК miR-98-5p та miR-182-5p, що мають сайти зв'язування з мРНК TP53, HBEGF і TOB1, у клітинах гліобластоми лінії U87MG за дії на них різних доз наночастинок оксиду графену. Встановлено, що ці наночастинки дозо-залежно підвищують рівень експресії мікроРНК miR-98-5p у клітинах гліобластоми: менша доза оксиду графену на 36 %, а більша доза – на 55 %, а рівень експресії мікроРНК miR-182-5p у цих клітинах знижувався під впливом наночастинок оксиду графену на 28 та 40 %, відповідно за меншої і більшої дози цих наночастинок (Рис. 3.26).



…..

Рис. 3.26. Відносний рівень експресії мікроРНК miR-98-5p (зліва) та miR-182-5p (справа) у клітинах гліобластоми лінії U87MG за дії на них наночастинок оксиду графену (GrO), який додавали до кінцевої

концентрації 1 нг/мл (GrO-1) та 4 нг/мл (GrO-4) на 24 год. Рівень експресії цих мікроРНК нормалізували по рівню експресії РНК U6 і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; ** - $p < 0,01$ і *** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем.

У той же час, рівень експресії мікроРНК miR-182-5p у клітинах гліобластоми знижувався під впливом наночастинок оксиду графену на 28 та 40 %, відповідно за меншої і більшої дози цих наночастинок (Рис. 3.26).

Таким чином, у клітинах гліобластоми під впливом наночастинок оксиду графену порушується експресія ключових, залежних від стресу ЕР транскрипційних факторів, а також низки регуляторних факторів та ензимів, які є важливими у реалізації сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума і контролі процесів проліферації. Варто відмітити, що наночастинки оксиду графену збільшують рівень експресії більшості як транскрипційних, так і регуляторних факторів, хоча на деякі гени проявляють пригнічуючий вплив. Більше того, виявлені у клітинах гліобластоми зміни в експресії досліджених генів є менш вираженими порівняно з нормальними астроцитами, що вказує на більшу чутливість нормальних клітин до дії на них наночастинок оксиду графену і що може бути обумовлено резистентністю пухлинних клітин до цих наночастинок.

3.3. Рівень експресії генів транскрипційних факторів та вагомих регуляторних протеїнів у нормальних астроцитах людини за дії вуглецевих нанотрубок

Для з’ясування механізмів дії наночастинок вуглецевих нанотрубок на функціональну активність генетичного апарату нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS, також були проведені дослідження, направлені на вивчення рівня експресії генів, які кодують синтез важливих

транскрипційних факторів, а саме DDIT3, ATF3, ATF4, E2F1, TP53 та ZNF395, що контролюють протікання численних метаболічних процесів як у нормі, так і за злоякісного росту.

Вони тісно пов'язані зі стресом ЕР і пухлинним ростом, що важливо для з’ясування можливого негативного впливу цих вуглецевих наночастинок на функцію геному, їх гено-токсичності. Також були проведені дослідження по вивченню впливу одностінних вуглецевих нанотрубок на гени низки регуляторних факторів та ензимів, задіяних у контролі правильності формування вторинної структури протеїнів і численних метаболічних процесах як у нормальних клітинах, так і у злоякісних пухлинах. Це такі гени як *HSPA5/BiP, DDX58, TOB1, TFPI2, GJA1, MEST, KRT18* та *P4HA2.*

Проведеними дослідженнями встановлено, що рівень експресії мРНК транскрипційного фактора DDIT3/CHOP сильно збільшується у нормальних астроцитах людини під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок. Так, через 24 год. після внесення до середовища вирощування нормальних астроцитів людини цих наночастинок до кінцевої концентрації 2 нг/мл рівень експресії мРНК DDIT3 підвищувався на 109 %, а при збільшенні дози вуглецевих нанотрубок до 8 нг/мл їх ефект на рівень експресії цієї мРНК значно посилювався (+163 %; Рис. 3.27).

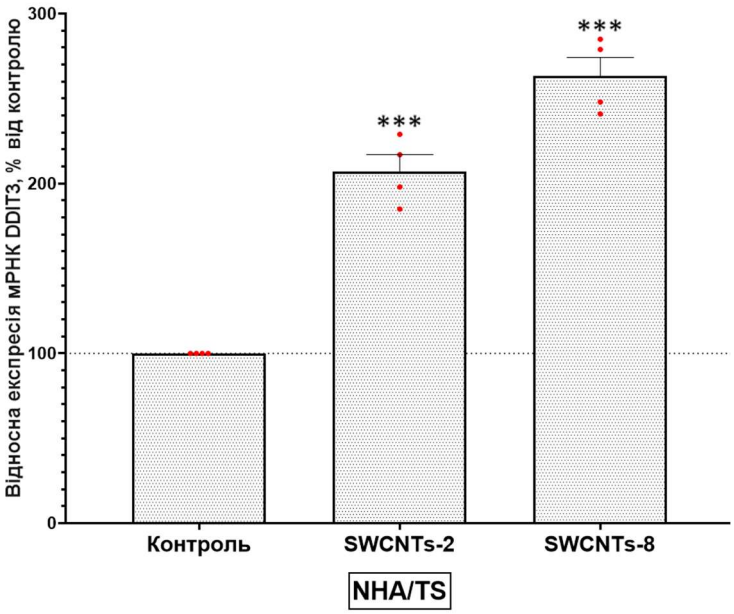


Рис. 3.27. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційного фактора DDIT3 (DNA damage-inducible transcript 3) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), які додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Подібні зміни спостерігалися і в рівні експресії транскрипційного фактора ATF3 у нормальних астроцитах людини за дії різних доз одностінних вуглецевих нанотрубок, причому виявлені зміни були дозо-залежними також. Так, під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок у концентрації 2 нг/мл рівень експресії мРНК цього транскрипційного фактора збільшувався на 68 %), але при збільшенні дози цих наночастинок до 8 нг/мл спостерігали більш виражений ефект одностінних вуглецевих нанотрубок на рівень експресії мРНК транскрипційного фактора ATF3 у нормальних астроцитах людини (+146 %); що видно із даних, представлених на Рис. 3.28.

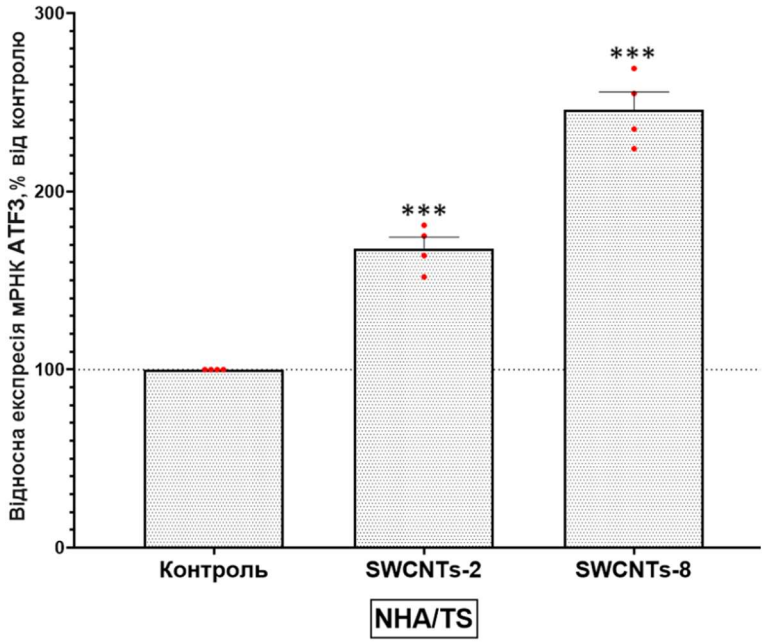


Рис. 3.28. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційного фактора ATF3 (activating transcription factor 3) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), які додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

У той же час, при дослідженні рівня експресії транскрипційного фактора ATF4 у нормальних астроцитах людини були виявлені істотно менші за величиною зміни під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок порівняно з ATF3, хоча дозо-залежний характер цих змін зберігався. Так, за дії наночастинок оксиду графену у концентрації 1 нг/мл, рівень експресії мРНК ATF4 у нормальних астроцитах людини збільшувався лише на 39 %, а у чотири рази більша доза цих наночастинок підвищувала рівень експресії мРНК транскрипційного фактора ATF4 на 83 % (Рис. 3.29).

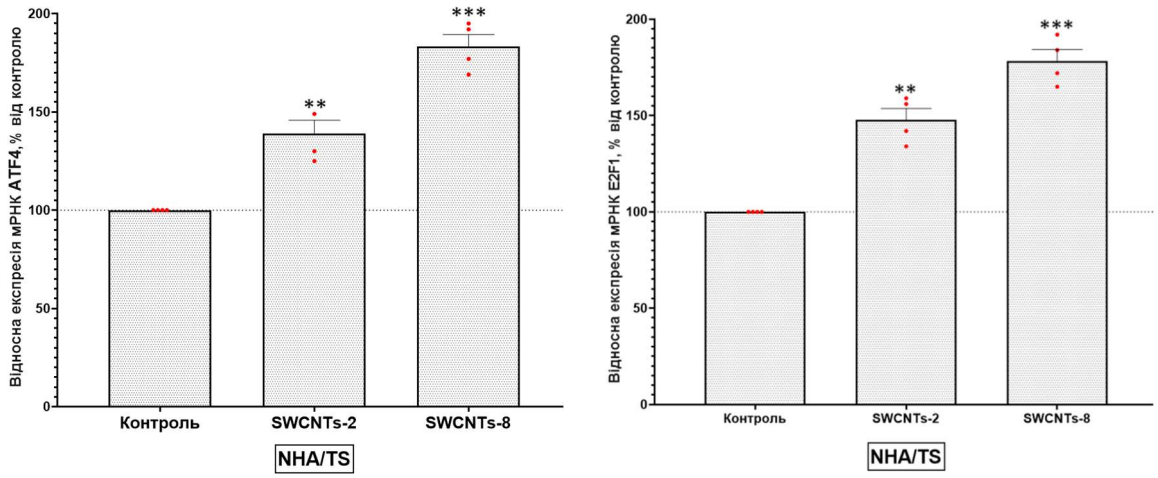
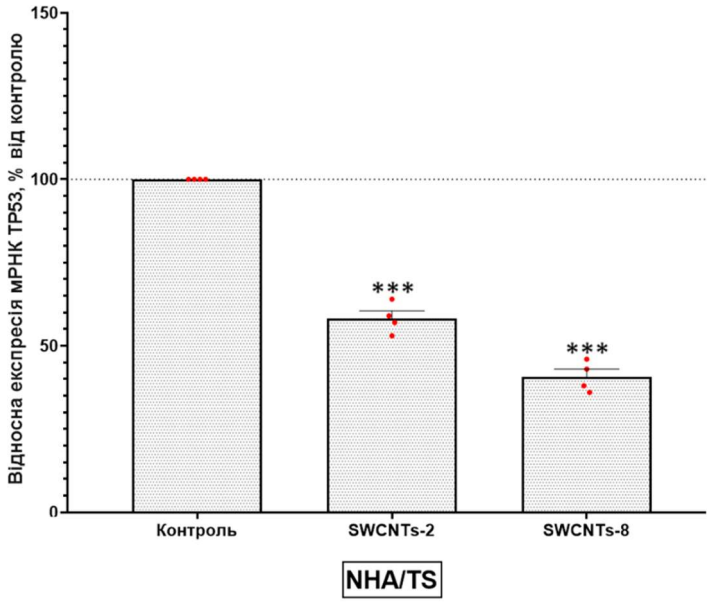


Рис. 3.29. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційних факторів ATF4 (activating transcription factor 4) та E2F1 (E2F transcription factor 1) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), які додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цих мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; ** - $p < 0,01$ і *** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем.

На цьому ж рисунку представлені також результати дослідження рівня експресії мРНК транскрипційного фактора E2F1 (E2F transcription factor 1) у нормальних астроцитах людини через 24 год. після внесення до культурального середовища різних концентрацій одностінних вуглецевих нанотрубок. Так, за дії одностінних вуглецевих нанотрубок у концентрації 2 нг/мл рівень експресії мРНК транскрипційного фактора E2F1 збільшувався у нормальних астроцитах людини на 48 %, а у чотири рази більша концентрація цих наночастинок посилювала експресію мРНК E2F1 на 78 % (Рис. 3.29).

Були також проведені дослідження по вивченню експресії транскрипційного фактора TP53, пухлинного супресора, який є надзвичайно важливим регулятором більшості метаболічних процесів у різних клітинах,

у тому числі і у клітинах злоякісних пухлин, “сторожа” геному, у нормальних астроцитах людини за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (Рис. 3.30).



….

Рис. 3.30. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційного фактора TP53 (tumor protein 53) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), які додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Встановлено, що одностінні вуглецеві нанотрубки зменшують рівень експресії гена пухлинного супресора *TP53* у нормальних астроцитах, причому дозо-залежно: менша доза (2 нг/мл) на 42 %, а більша доза (8 нг/мл) на 59 % (Рис. 3.30).

На Рис. 3.31 представлені результати дослідження рівня експресії мРНК транскрипційного фактора ZNF395 (zinc finger protein 395) у нормальних астроцитах людини через 24 год. після внесення до

культурального середовища різних концентрацій одностінних вуглецевих нанотрубок.

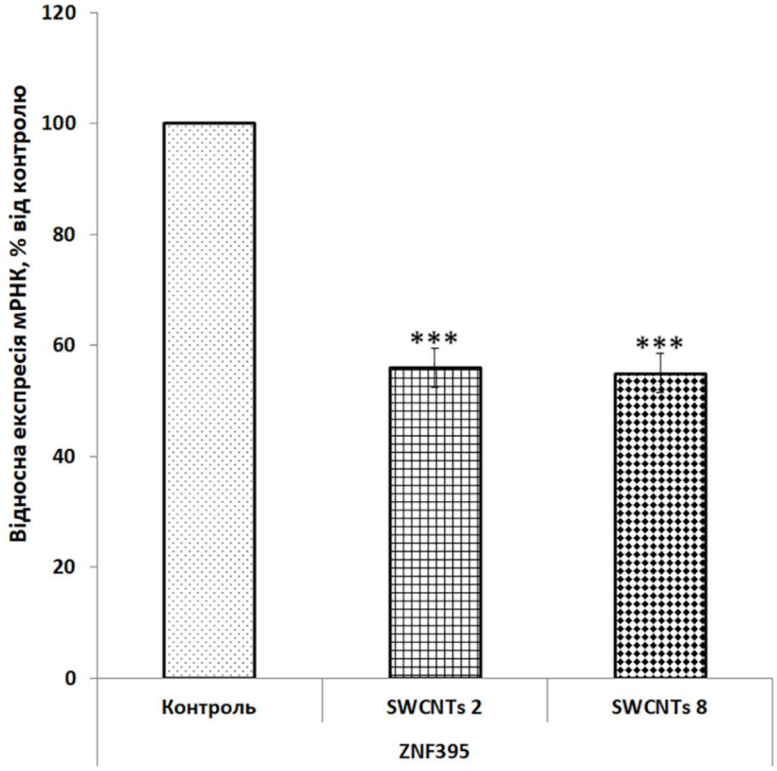


Рис. 3.31. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційного фактора ZNF395 (zinc finger protein 395) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), які додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Так, за дії одностінних вуглецевих нанотрубок у концентрації 2 нг/мл рівень експресії мРНК транскрипційного фактора ZNF395 знижувався у нормальних астроцитах людини на 44 %, але збільшення концентрації цих наночастинок у чотири рази не посилювала експресію цієї мРНК (-45 %; Рис. 3.31).

На Рис. 3.32 наведені результати вивчення впливу одностінних вуглецевих нанотрубок у різних концентраціях на рівень експресії мРНК DDX58/RIGI (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58/RNA sensor RIG-I) у нормальних астроцитах людини за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок.

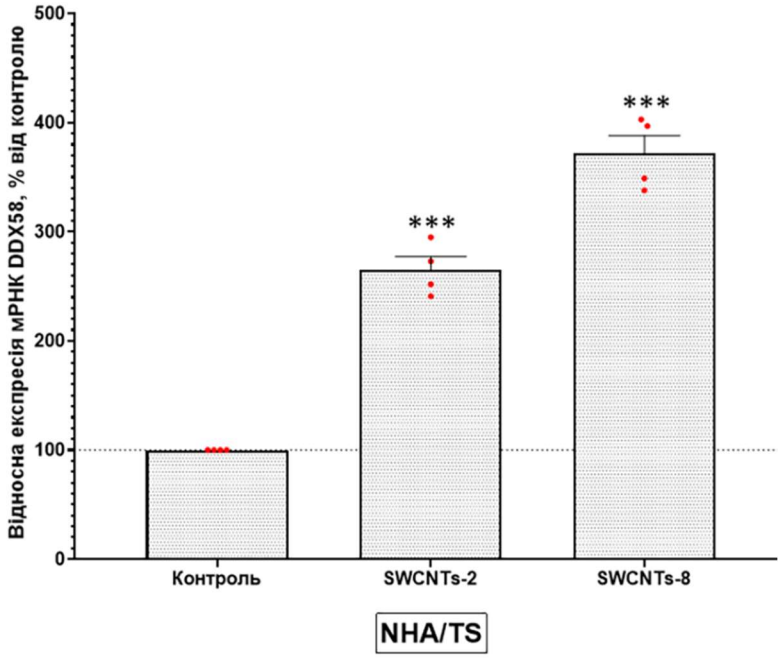


Рис. 3.32. Відносний рівень експресії мРНК DDX58/RIGI (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58/RNA sensor RIG-I) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), які додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Встановлено, що у нормальних астроцитах під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок спостерігається різке збільшення рівня експресії гена *DDX58/RIGI* (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58/RNA sensor RIG-I), який має РНК-геліказну активність і може активувати сигнальні каскади для посилення синтезу інтерферонів і про-запальних цитокінів. Так,

за дії одностінних вуглецевих нанотрубок у концентрації 2 нг/мл рівень експресії мРНК DDX58/RIGI у нормальних астроцитах людини збільшувався на 165 %, а у чотири рази більша доза цих наночастинок підвищувала рівень експресії цієї мРНК аж на 272 % (Рис. 3.32).

На Рис. 3.33 представлені результати дослідження рівня експресії мРНК P4HA2 (Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2) у нормальних астроцитах за дії одностінних вуглецевих нанотрубок.

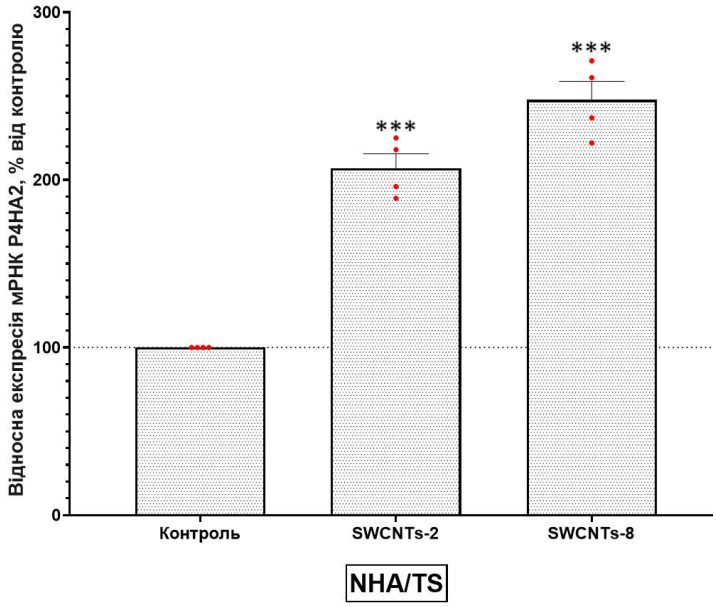


Рис. 3.33. Відносний рівень експресії мРНК P4HA2 (Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), які додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Встановлено, що одностінні вуглецеві нанотрубки у концентрації 2 нг/мл збільшували рівень експресії мРНК P4HA2 у нормальних астроцитах людини на 107 %, а більша доза цих наночастинок (8 нг/мл) підвищувала рівень експресії цієї мРНК на 148 % (Рис. 3.33).

На Рис. 3.34 представлені результати дослідження рівня експресії мРНК фактора TFPI2 (tissue factor pathway inhibitor 2) у нормальних астроцитах людини через 24 год. після внесення до культурального середовища різних концентрацій одностінних вуглецевих нанотрубок.

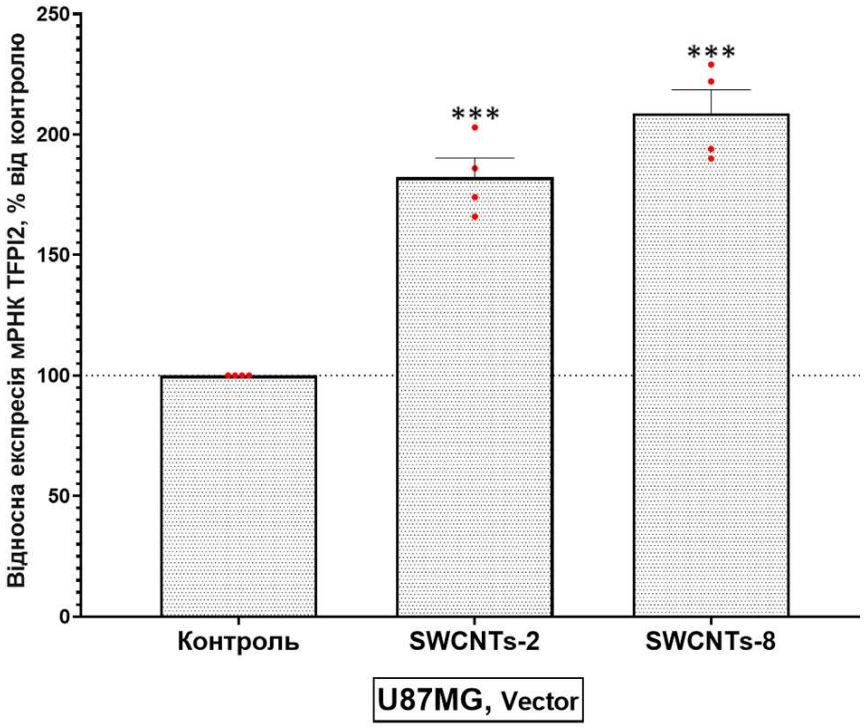


Рис. 3.34. Відносний рівень експресії мРНК фактора TFPI2 (tissue factor pathway inhibitor 2) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них різних доз одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), які додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Встановлено, що за дії одностінних вуглецевих нанотрубок у концентрації 2 нг/мл рівень експресії мРНК TFPI2 збільшувався у нормальних астроцитах людини лише на 82 %, а за більшої у 4 рази дози

цих наночастинок рівень експресії цієї мРНК підвищувався на 109 % (Рис. 3.34).

Були також проведені дослідження по вивченню експресії TOB1, який є надзвичайно важливим регулятором процесів росту у клітинах, за дії одностінних вуглецевих нанотрубок на нормальні астроцити (Рис. 3.35).

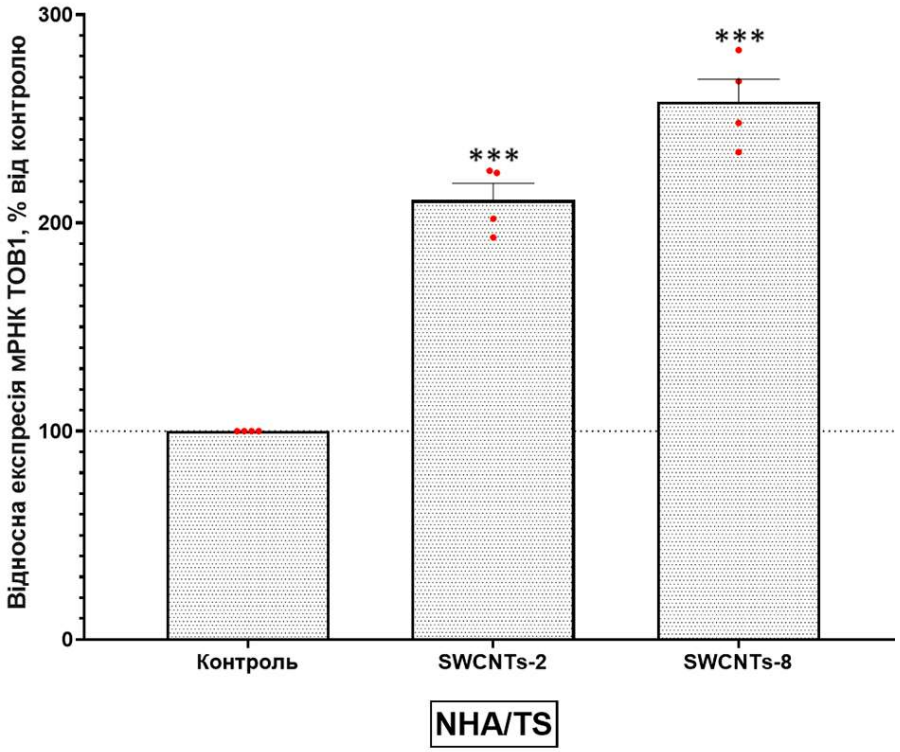


Рис. 3.35. Відносний рівень експресії мРНК TOB1 (transducer of ERBB2, 1) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), які додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Встановлено, що одностінні вуглецеві нанотрубки посилюють експресію гена *TOB1* у нормальних астроцитах дозо-залежно: менша доза (2 нг/мл) на 111 %, а більша доза (8 нг/мл) на 158 % (Рис. 3.35).

Встановлено також, що одностінні вуглецеві нанотрубки посилюють експресію гена *HSPA5/BiP* у нормальних астроцитах на 46% за меншої дози (2 нг/мл) і на 83 % за більшої дози (8 нг/мл), але знижують рівень експресії гена *GJA1* на 72 і 76 % за меншої та більшої дози наночастинок, відповідно (Рис. 3.36).

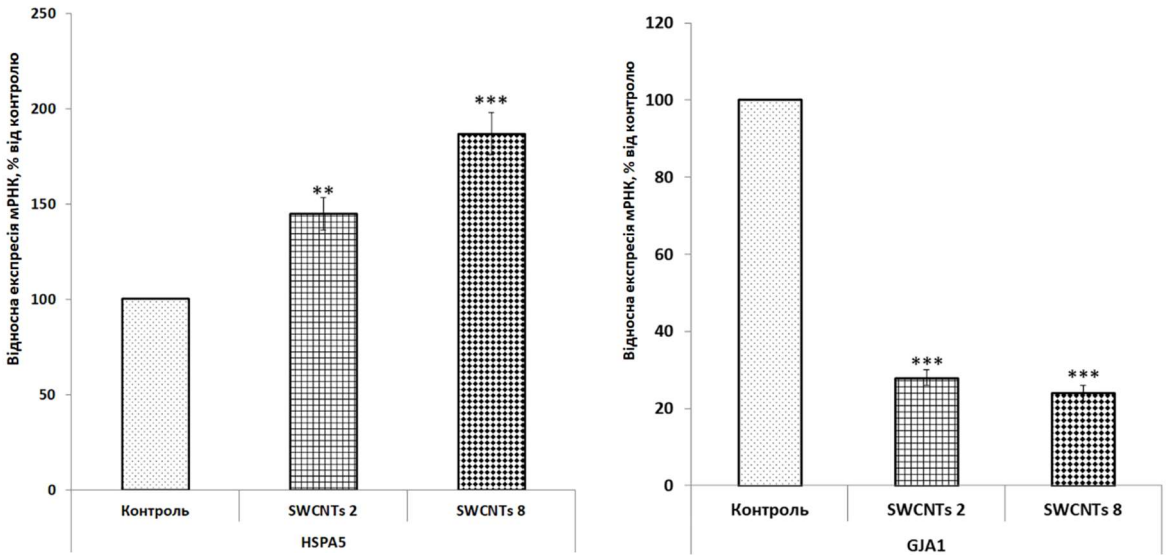


Рис. 3.36. Відносний рівень експресії мРНК HSPA5/BiP та GJA1 у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), які додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цих мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; ** - $p < 0{,}01$ і *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Як видно із даних, представлених на Рис. 3.37, рівень експресії гена *MEST* (mesoderm specific transcript) знижувався у нормальних астроцитах людини під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок на 40 і 55 %, а *KRT18* (keratin 18) на 13 і 15 % за меншої та більшої дози цих наночастинок, відповідно.

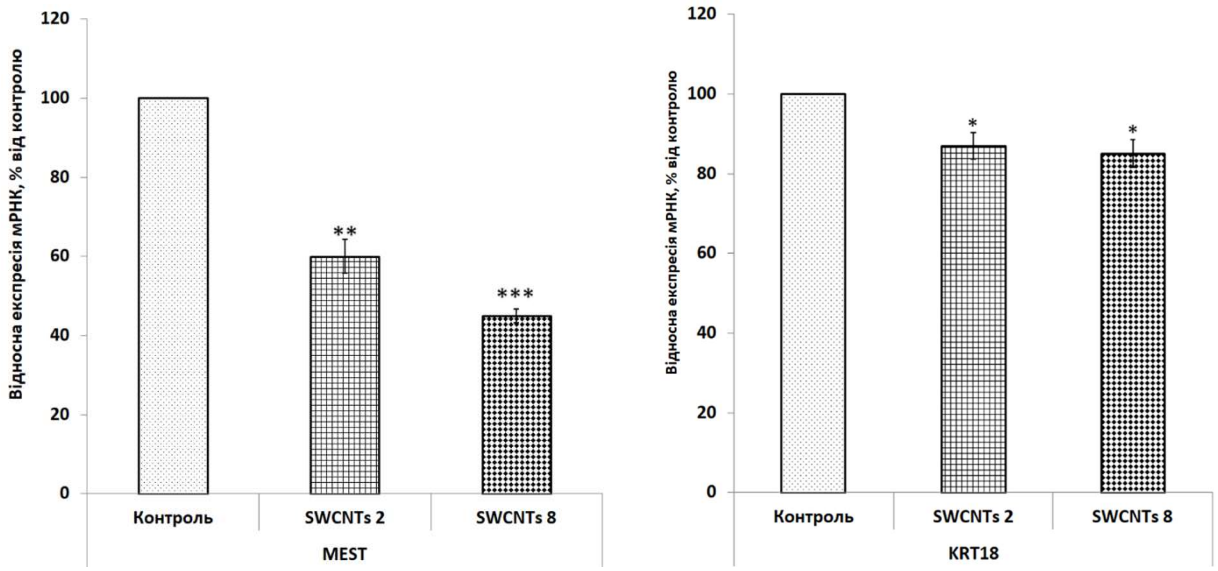


Рис. 3.37. Відносний рівень експресії мРНК MEST (mesoderm specific transcript) і KRT18 (keratin 18) у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), які додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цих мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ і *** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем.

Таким чином, у нормальних астроцитах людини під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок виражено змінюється рівень експресії досліджених транскрипційних факторів, а також низки важливих регуляторних факторів, частина із яких задіяна у розвитку стресу ЕР та реалізації його регуляторних сигналів, що вказує на участь стресу ЕР у механізмах дії цих вуглецевих нанотрубок на функціональну активність геному і віддзеркалює гено-токсичну їх дію на нормальні клітини, зокрема нормальні астроцити.

3.4. Рівень експресії генів транскрипційних факторів та вагомих регуляторних протеїнів у клітинах гліобластоми за дії вуглецевих нанотрубок

Проведеними дослідженнями встановлено, що рівень експресії мРНК транскрипційного фактора DDIT3, якого ще часто позначають як CHOP, сильно збільшується у клітинах гліоми під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок, причому при збільшенні їх концентрації ефект посилювався (Рис. 3.38).

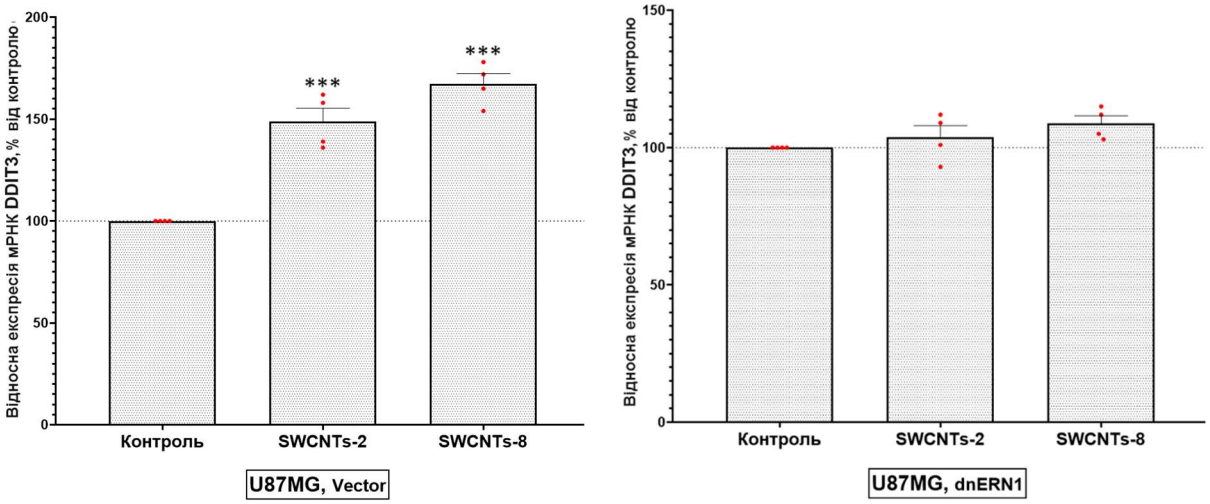


Рис. 3.38. Відносний рівень експресії мРНК DDIT3 (DNA damage-inducible transcript 3) у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих "порожнім" вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), який додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Встановлено, що за дії одностінних вуглецевих нанотрубок підвищується рівень експресії мРНК транскрипційного фактора DDIT3 у клітинах гліобластоми на 49 і 67 %, відповідно за меншої та більшої доз цих наночастинок, але у клітинах з пригніченими ензиматичними активностями ERN1 не було виявлено змін рівня експресії DDIT3 за дії одностінних нанотрубок (Рис. 3.38).

Подібні зміни були виявлені і при дослідженні рівня експресії транскрипційного фактора ATF3 у клітинах гліобластоми за дії різних доз одностінних вуглецевих нанотрубок, причому виявлені зміни були також дозо-залежними. Так, під впливом цих наночастинок у концентрації 2 нг/мл рівень експресії мРНК цього транскрипційного фактора збільшувався лише на 23 %, але більша доза одностінних вуглецевих нанотрубок (8 нг/мл) проявляла більш виражений ефект на рівень експресії мРНК ATF3 у клітинах гліобластоми (+42 %; Рис. 3.39).

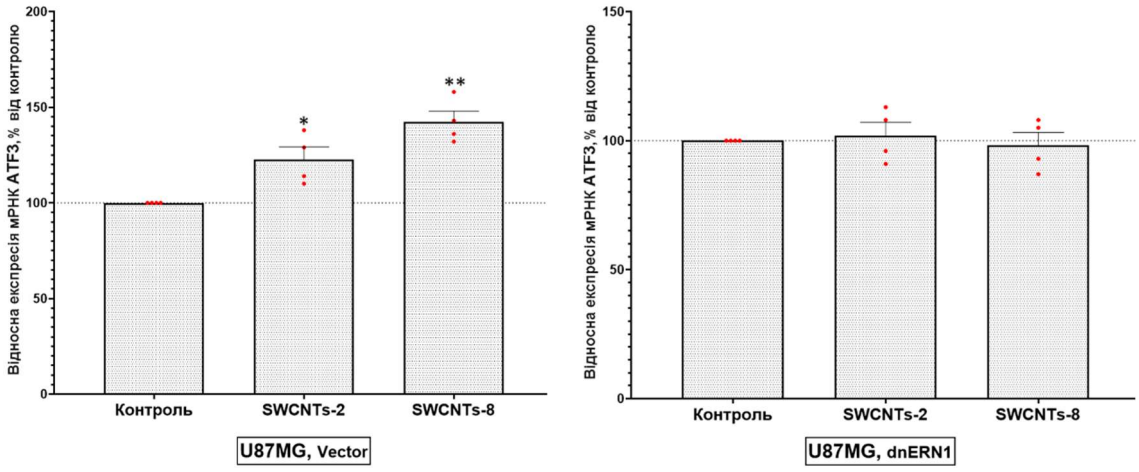


Рис. 3.39. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційного фактора ATF3 у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), який додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у

відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; *n*=4; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Із даних, приведених на Рис. 3.39, також видно, що рівень експресії ATF3 істотно не змінюється у клітинах гліобластоми з пригніченою активністю ERN1 за дії на них різних доз одностінних вуглецевих нанотрубок.

Було також проведено вивчення експресії гена транскрипційного фактора ATF4 у клітинах гліобластоми за дії одностінних вуглецевих нанотрубок у різних концентраціях у залежності від активності сигнального протеїну ERN1 (Рис. 3.40)

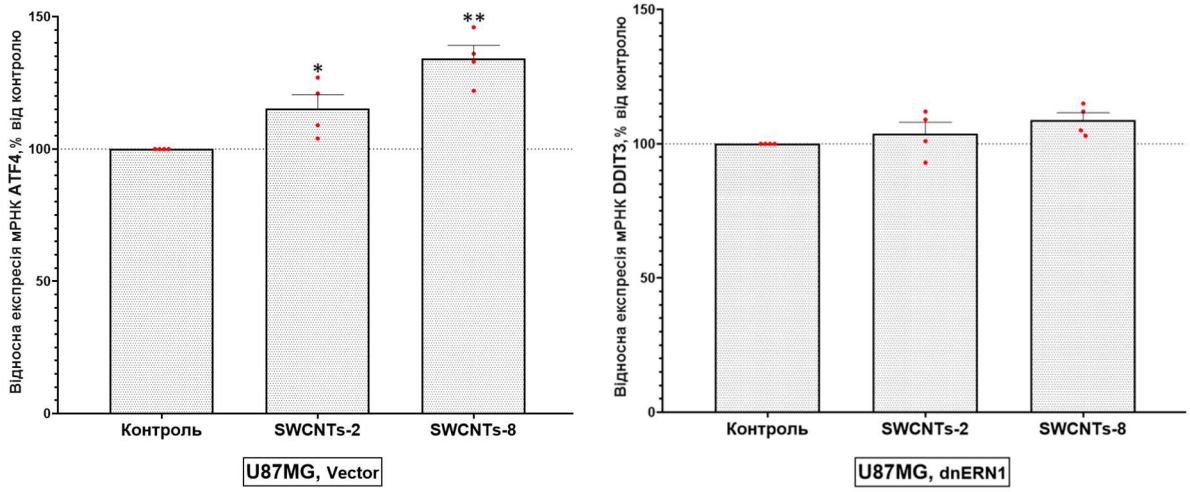


Рис. 3.40. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційного фактора ATF4 у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), який додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; *n*=4; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Так, у клітинах гліобластоми під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок були виявлені зміни рівня експресії транскрипційного фактора ATF4, які були істотно меншими за ATF3, хоча залежний від дози характер змін зберігався. Так, за дії одностінних вуглецевих нанотрубок у концентрації 2 нг/мл рівень експресії мРНК транскрипційного фактора ATF4 у клітинах гліобластоми збільшувався лише на 15 %, а у чотири рази більша доза цих наночастинок підвищувала рівень експресії мРНК цього транскрипційного фактора на 34 %, причому пригнічення ензиматичних активностей ERN1 повністю блокувало дію цих нанотрубок на експресію ATF4 (Рис. 3.40).

На Рис. 3.41 представлені результати дослідження рівня експресії мРНК транскрипційного фактора E2F1 (E2F transcription factor 1) у клітинах гліобластоми через 24 год. після внесення до культурального середовища різних концентрацій одностінних вуглецевих нанотрубок.

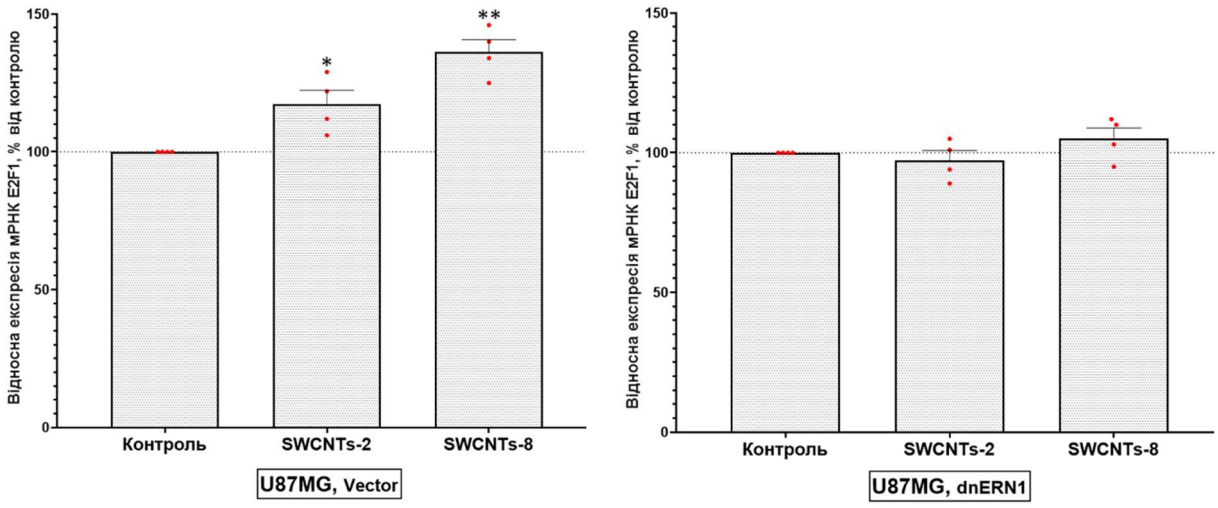


Рис. 3.41. Відносний рівень експресії мРНК транскрипційного фактора E2F1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), який додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї

мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; *n*=4; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Встановлено, що у клітинах гліобластоми за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок спостерігається підвищення рівня експресії гена транскрипційного фактора E2F1 на 17 і 36 %, відповідно за меншої і більшої дози нанотрубок, причому пригнічення сигнального протеїну ERN1 повністю знімає це підвищення в експресії гена *E2F1* (Рис. 3.41).

Проведеними дослідженнями виявлено також ген транскрипційного фактора, рівень експресії якого не підвищується, а знижується у клітинах гліобластоми під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок. Це ген пухлинного супресора TP53. Отримані результати наведені на Рис. 3.42.

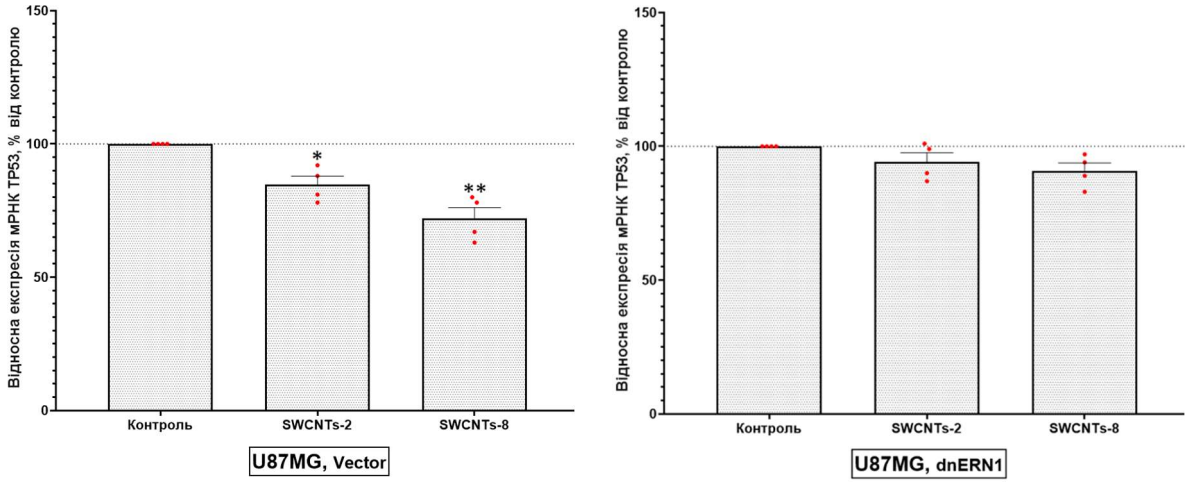


Рис. 3.42. Відносний рівень експресії мРНК TP53 у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), який додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; *n*=4; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Так, за дії одностінних вуглецевих нанотрубок у концентрації 2 нг/мл рівень експресії мРНК транскрипційного фактора TP53 зменшувався у клітинах гліобластоми на 15 %, а більша доза цих наночастинок (8 нг/мл) знижувала експресію цієї мРНК на 28 %, причому пригнічення ензиматичних активностей ERN1 знімало ефект вуглецевих нанотрубок на експресію TP53 у цих клітинах (Рис. 3.42).

Були також проведені дослідження по вивченню експресії DDX58/RIGI, який проявляє РНК-геліказну активність і приймає участь у активації сигнальних каскадів для посилення синтезу інтерферонів та низки про-запальних цитокінів, у клітинах гліобластоми за дії на них вуглецевих нанотрубок (Рис. 3.43).

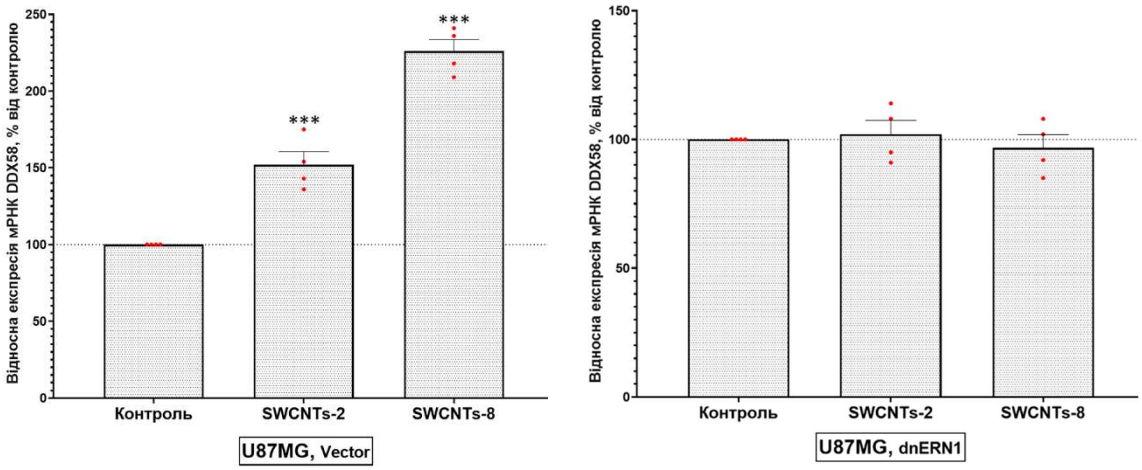


Рис. 3.43. Відносний рівень експресії мРНК DDX58/RIGI у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), який додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; n=4; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Встановлено, що у клітинах гліобластоми під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок спостерігається різке збільшення рівня експресії мРНК DDX58/RIGI (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58/RNA sensor RIG-I), який має РНК-геліказну активність і може активувати сигнальні каскади для посилення синтезу як інтерферонів, так і прозапальних цитокінів. Так, за дії одностінних вуглецевих нанотрубок у концентрації 2 нг/мл рівень експресії мРНК DDX58/RIGI у клітинах гліобластоми збільшувався на 52 %, а у чотири рази більша доза вуглецевих наночастинок підвищувала рівень експресії цієї мРНК аж на 126 %, але пригнічення ензиматичних активностей ERN1 повністю попереджало дію цих вуглецевих нанотрубок на експресію DDX58, незалежно від їх дози (Рис. 3.43).

На Рис. 3.44 результати дослідження впливу одностінних вуглецевих нанотрубок на рівень експресії гена *P4HA2* у клітинах гліобластоми.

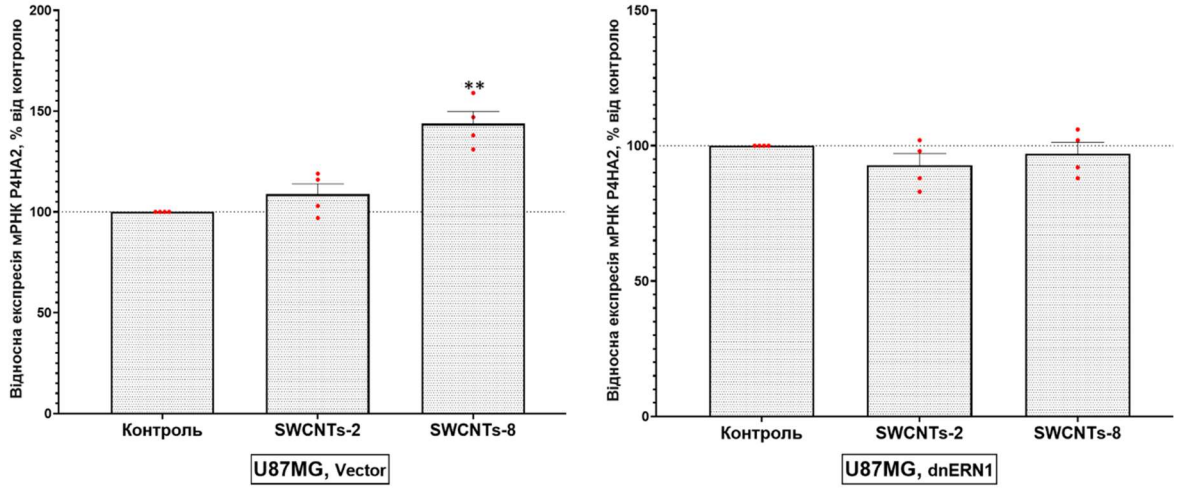


Рис. 3.44. Відносний рівень експресії мРНК P4HA2 у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), який додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по

рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; *n*=4; ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Встановлено, що у клітинах гліобластоми під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок спостерігається підвищення рівня експресії гена *P4HA2* за більшої дози (8 нг/мл) нанотрубок, а менша доза (2 нг/мл) істотно не змінювала рівень експресії цього гена (Рис. 3.44). Більше того, у пухлинних клітинах з пригніченим сигнальним протеїном ERN1, змін в експресії гена *P4HA2* за дії різних доз одностінних вуглецевих нанотрубок не було виявлено (Рис. 3.44).

Результати дослідження впливу одностінних вуглецевих нанотрубок на рівень експресії мРНК TFPI2 у клітинах гліобластоми представлені на Рис. 3.45.

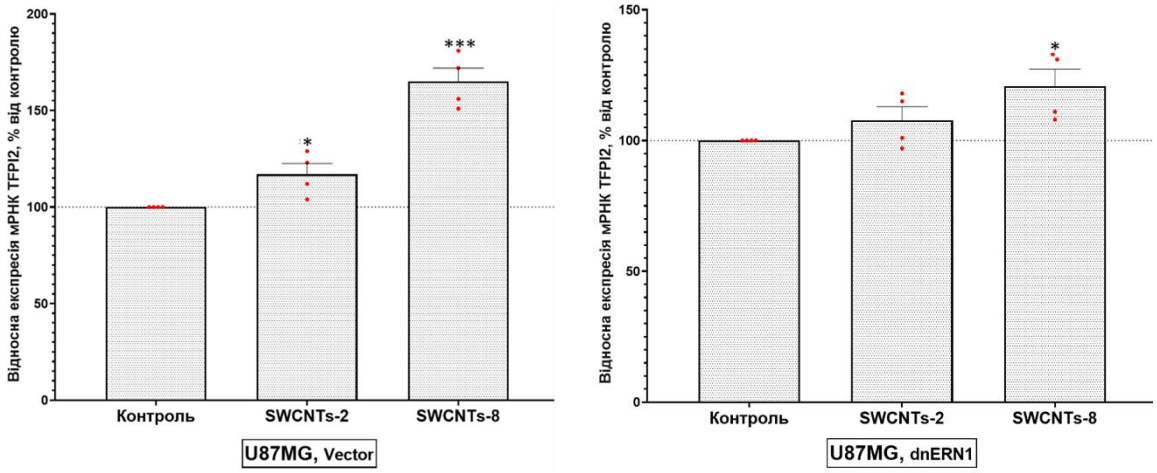


Рис. 3.45. Відносний рівень експресії мРНК TFPI2 у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), який додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних

клітин (контроль), прийнятого за 100 %; *n*=4; * - $p < 0,05$ і *** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем.

Встановлено, що у клітинах гліобластоми під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок спостерігається дозо-залежне підвищення рівня експресії гена *TFPI2*. Так, у клітинах гліобластоми за дії цих нанотрубок у концентрації 2 нг/мл рівень експресії мРНК TFPI2 збільшувався лише на 17 %, а у чотири рази більша доза одностінних вуглецевих нанотрубок підвищувала рівень експресії цього гена на 65 %, причому пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 зменшувало ефект цих вуглецевих нанотрубок втричі (до +21 %; Рис. 3.45).

На Рис. 3.46 представлені результати дослідження рівня експресії мРНК TOB1 у клітинах гліобластоми через 24 год. після внесення до культурального середовища різних концентрацій одностінних вуглецевих нанотрубок.

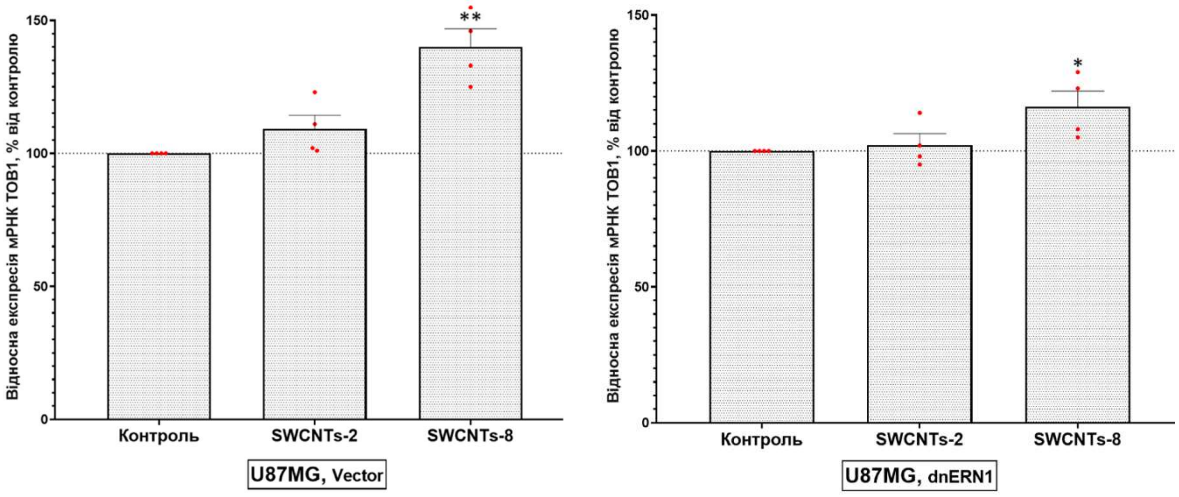


Рис. 3.46. Відносний рівень експресії мРНК TOB1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG, трансфікованих “порожнім” вектором pcDNA3.1 (U87MG, Vector) та клітинах гліобластоми, трансфікованих dnERN1 (U87MG, dnERN1) за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs), який додавали до кінцевої концентрації 2 нг/мл (SWCNTs-2) та 8 нг/мл (SWCNTs-8) на 24 год. Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по

рівню експресії мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контрольних клітин (контроль), прийнятого за 100 %; *n*=4; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Показано, що під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок спостерігається підвищення на 40 % рівня експресії гена *TOB1* у клітинах гліобластоми лише за більшої дози нанотрубок (8 нг/мл), а менша їх доза (2 нг/мл) істотно не змінювала рівень експресії цього гена (Рис. 3.46). А у клітинах гліобластоми з пригніченими ензиматичними активностями ERN1 також спостерігалось збільшення рівня експресії гена *TOB1* лише за більшої дози нанотрубок, але у значно меншій мірі (+16 %).

Таким чином, у клітинах гліобластоми одностінні вуглецеві нанотрубки порушують рівень експресії низки стрес-залежних транскрипційних та інших регуляторних факторів, що є важливими у реалізації сигнальних шляхів стресу ЕР і контролі процесів проліферації. Одностінні вуглецеві нанотрубки збільшують рівень експресії більшості транскрипційних і регуляторних факторів, хоча експресію деяких генів пригнічують. Виявлені у клітинах гліобластоми зміни в експресії досліджених генів за дії вуглецевих нанотрубок є менш вираженими порівняно з нормальними астроцитами, що вказує на більшу чутливість нормальних клітин до дії на них цих наночастинок і що може бути обумовлено резистентністю пухлинних клітин до них.

3.5. Рівень експресії мікроРНК в ембріонах *Danio rerio* за дії вуглецевих нанотрубок

МікроРНК виконують ключову роль у пост-транскрипційному контролі експресії генів шляхом взаємодії з 3′-нетранслюючою послідовністю (3'-UTR) певних мРНК. Результатом такої взаємодії є ініціація деградації мРНК або пригнічення її трансляції. МікроРНК

здійснюють контроль різних процесів у клітинах, у тому числі проліферацію, інвазію та апоптоз, що істотно впливає на процеси нейрогенезу і розвитку головного мозку [171].

Відомо, що у SWCNTs порушують експресію низки мікроРНК у нормальних астроцитах, причому встановлено, що ці мікроРНК мають сайти зв'язування з тими мРНК, продукти трансляціїх яких ассоційовані з імунною відповіддю [53]. Таким чином, зміни рівня мікроРНК можуть бути причетними до змін експресії мРНК на пост-транскрипційному рівні.

Рибка *Danio rerio* розглядається як одна з найбільш чутливих моделей для нейробіології та генетики людини, для вивчення процесів розвитку, а також для поглибленого вивчення молекулярних основ захворювань людини [186].

Використання зебристих рибок *Danio rerio* як об'єкта досліджень має багато переваг, зокрема оптична прозорість ембріонів, що дає можливість бачити протікання процесів розвитку організмів. Ці рибки характеризуються високою плодючістю та короткотривалістю періоду розвитку личинок, що істотно прискорює проведення досліджень та полегшує їх виконання.

МікроРНК є універсальними регуляторами розвитку головного мозку, регуляції процесів проліферації клітин та регенеративних процесів, а також виживання нейронів після інсультів [187]. Порушення експресії мікроРНК у нервовій тканині можуть призводити до нейродегенеративних захворювань [174, 175].

У зв’язку з цим, були проведені дослідження направлені на вивчення можливого впливу різних доз SWCNTs на експресію тих мікроРНК, які контролюють проліферацією клітин, а також метаболічні процеси і нейрогенез у личинках *Danio rerio*. У зв’язку з цим, для дослівдження були обрані ті мікроРНК, які контролюють проліферацію клітин та нейрогенез: miR-19-3p, miR-21-5p і miR-96-5p [183].

Проведені дослідження показали, що за малих доз SWCNTs (2 та 8 нг/мл води, в якій росли ембріони *Danio rerio*, спостерігається порушення експресії всіх досліджених мікроРНК уже через 24 години, а через 72 години зміни рівня їх експресії були більш вираженими.

Так, за дії одностінних вуглецевих нанотрубок (2 нг/мл протягом 24 годин) рівень мікроРНК miR-19-3p зменшувався на 26 %, а при збільшенні дози нанотрубок до 8 нг/мл – на 43 %, відносно контролю, але через 3 доби вирощування ембріонів зебристих рибок в присутності цих вуглецевих наночастинок спостерігалося дуже велике зменшення рівня експресії miR-19-3p як за меншої дози нанотрубок (-88 %), так і за більшої їх дози (-96 %) у порівнянні з відповідною контрольною групою ембріонів, що вказує на виражені порушення в експресії мікроРНК miR-19-3p під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок за умов їх тривалої дії (Рис. 3.47).

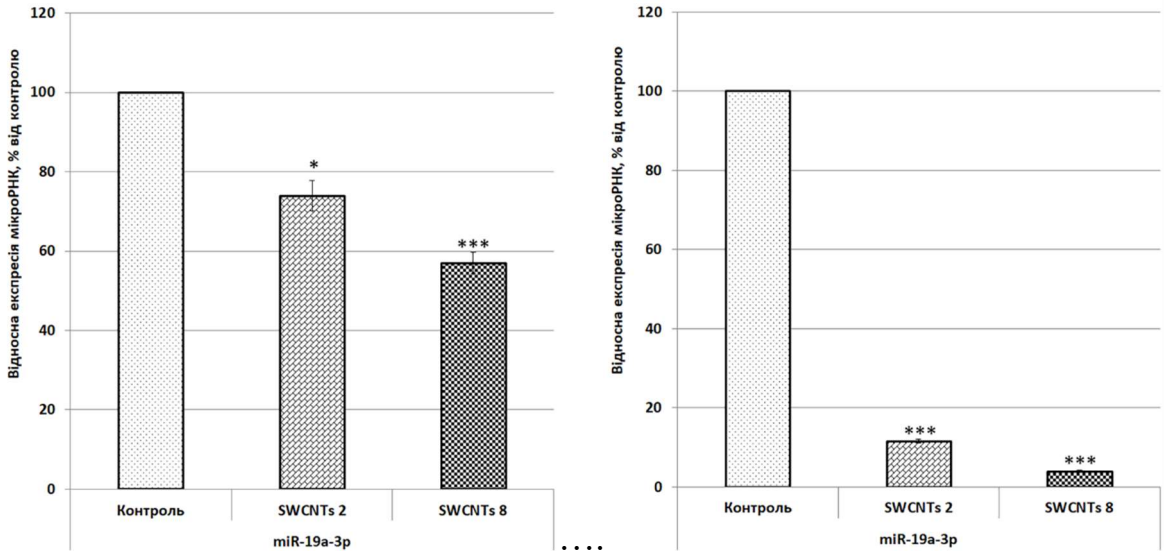


Рис. 3.47. Вплив одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs) у дозі 2 (SWCNTs 2) і 8 (SWCNTs 8) нг/мл) на рівень експресії мікроРНК miR-19a-3p протягом 24 (зліва) та 72 (справа) годин в ембріонах рибки *Danio rerio* у порівнянні з контролем. Рівень експресії досліджених мікроРНК був нормалізований по рівню експресії РНК U6 і виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; n=3; * - $p < 0,05$ і *** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем.

Подібний, але більш виражений ефект від дії одностінних вуглецевих нанотрубок було виявлено при дослідженні рівня експресії мікроРНК miR-21-5p, яка є важливим регулятором численних метаболічних та інших процесів у клітинах різних організмів, у ембріонах рибки *Danio rerio*. Проведеними дослідженнями встановлено, що 24-х годинна експозиція ембріонів рибок *Danio rerio* з меншою концентрацією (2 нг/мл) одностінних вуглецевих нанотрубок призводила до значного зниження рівня (-62 %) і що збільшення концентрації цих наночастинок до 8 нг/мл ініціювало подібні зміни (-67 %) в експресії мікроРНК miR-21-5p, у порівнянні з контролем (Рис. 3.48).

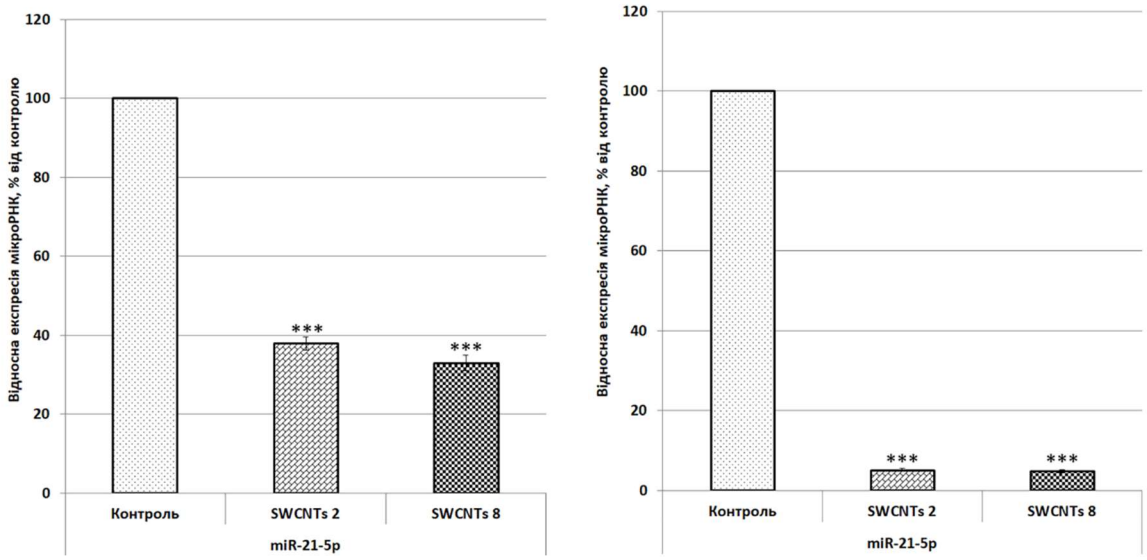


Рис. 3.48. Вплив одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs) у дозі 2 (SWCNTs 2) і 8 (SWCNTs 8) нг/мл) на рівень експресії мікроРНК miR-21-5p протягом 24 (зліва) та 72 (справа) годин в ембріонах рибки *Danio rerio* у порівнянні з контролем. Рівень експресії досліджених мікроРНК був нормалізований по рівню експресії РНК U6 і виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; n=3; *** - $p < 0{,}001$ у порівнянні з контролем.

Більше того, за більш тривалої дії одностінних вуглецевих нанотрубок (72 години) спостерігалось різке пригнічення рівня експресії мікроРНК miR-21-5p уже при концентрації цих нанотрубок у 2 нг/мл, причому рівень пригнічення експресії мікроРНК в ембріонах *Danio rerio* практично не залежав від збільшення концентрації одностінних вуглецевих нанотрубок до 8 нг/мл. Як видно із даних, представлених на Рис. 3.48, через 72 години після внесення до води з ембріонами 2 нг/мл одностінних вуглецевих нанотрубок відмічалося різке зниження рівня експресії мікроРНК miR-21-5p (-95 %), причому і за більшої концентрації вуглецевих нанотрубок (8 нг/мл) були виявлені такі ж зміни (–95 %), у порівнянні з контролем.

Були також проведені дослідження рівня експресії мікроРНК miR-96-5p в ембріонах рибки за дії різних доз вуглецевих нанотрубок (Рис. 3.49).

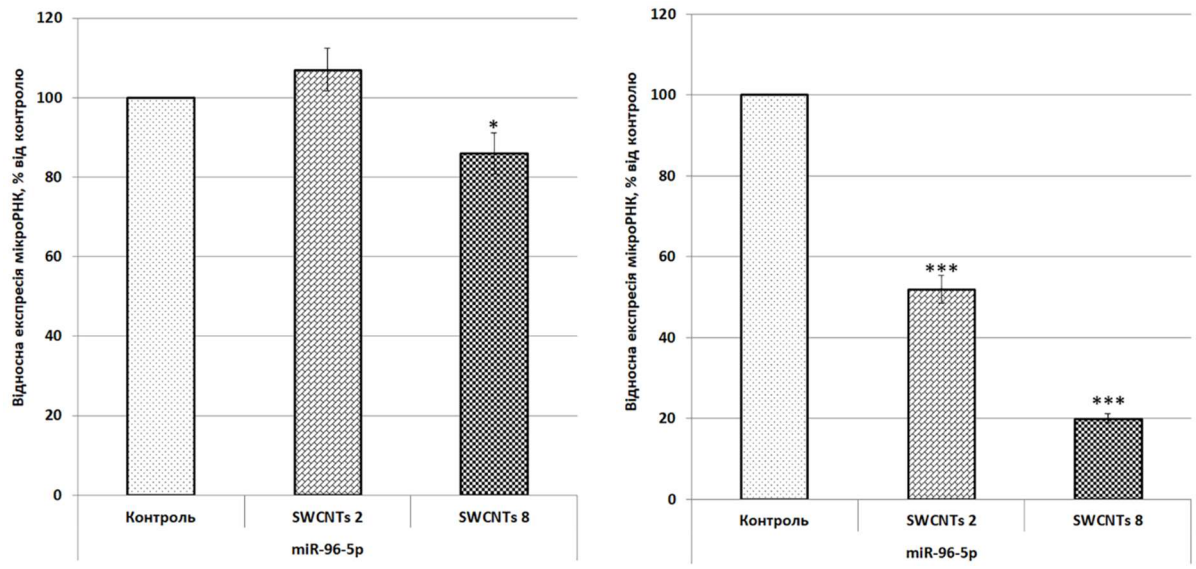


Рис. 3.49. Вплив одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs) у дозі 2 (SWCNTs 2) і 8 (SWCNTs 8) нг/мл) на рівень експресії мікроРНК miR-96-5p протягом 24 (зліва) та 72 (справа) годин в ембріонах рибки *Danio rerio* у порівнянні з контролем. Рівень експресії досліджених мікроРНК був нормалізований по рівню експресії РНК U6 і виражений у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; n=3; * - $p < 0,05$ і *** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем.

Проведеними дослідженнями встановлено, що за дії вуглецевих нанотрубок на ембріони рибки *Danio rerio* рівень експресії мікроРНК miR-96-5p також порушувався, але ефект істотно залежав від концентрації наночастинок та тривалості їх дії. Так, протягом 24-х годинної дії вуглецевих нанотрубок у концентрації в 2 нг/мл не було виявлено істотних змін рівня експресії miR-96-5p у ембріонах рибки, а за більшої їх концентрації (8 нг/мл) уже спостерігалося зниження рівня експресії цієї мікроРНК на 14 %, у порівнянні з контролем (Рис. 3.49). Більш виражений ефект цих вуглецевих наночастинок на рівень мікроРНК miR-96-5p спостерігався після 72-х годинної експозиції ембріонів зебристої рибки *Danio rerio*: рівень її експресії знижувався на 48 % під впливом меншої їх дози (2 нг/мл) та на 80 % - за дії нанотрубок у дозі 8 нг/мл у порівнянні з контрольною групою ембріонів (Рис. 3.49).

Таким чином, найбільший ефект пригнічення експресії всіх досліджених мікроРНК у клітинах ембріонів рибки *Danio rerio* проявляється через три доби впливу одностінних вуглецевих нанотрубок і за більшої їх концентрації, причому найбільш чутливою до дії цих вуглецевих наночастинок виявилася мікроРНК miR-21-5p, а найбільш резистентною – miR-96-5p.

Узагальнюючи отримані результати, можна сказати, що негативний вплив наночастинок оксиду графену і одностінних вуглецевих нанотрубок проявлявся не лише на рівні експресії важливих транскрипційних факторів та низки інших регуляторних факторів та ензимів, а і на рівні мікроРНК як у нормальних астроцитах людини, так і у клітинах гліобластоми, причому цей вплив був виражений значно більше у нормальних клітинах, ніж у клітинах злоякісних пухлин. Більше того, токсичний вплив одностінних вуглецевих нанотрубок був виявлений і на ембріонах, який проявлявся у порушеннях експресії мікроРНК і формуванні нервової системи [183].

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У зв’язку із створенням великої кількості унікальних за своїми властивостями наночастинок та наноматеріалів різної природи, а також їх впровадженням у біологію та медицину, постала надзвичайно актуальна проблема їх біологічної безпеки, їх токсичності для живих істот на рівні організму, клітинному і субклітинному рівнях, а особливо їх гено-токсичності.

Ідея застосування наночастинок, зокрема вуглецевих наночастинок, для діагностики та лікування онкологічних захворювань є актуальною, але вона може втілюватися у життя лише за умови відсутності токсичного впливу на нормальні клітини організму.

Молекулярні механізми токсичної дії різних за природою наночастинок, у тому числі і вуглецевих наночастинок, ще остаточно не з’ясовані, однак їх стійкість до біологічного розщеплення та здатність проходити бар'єри, зокрема гематоенцефалічний, і нагромаджуватися у ядрах є важливою пересторогою щодо їх потенційного використання у біології та медицині. Було виявлено, що ядро є важливим місцем накопичення наночастинок оксиду графену і SWCNTs, що ініціює ушкодження геномної ДНК та змінює її спіральну структуру [188]. Але для пізнання молекулярних механізмів гено-токсичності наночастинок більш чутливим і значимим є вивчення впливу наночастинок на експресію генів, що контролюють основні метаболічні процеси, а також процеси проліферації та виживання клітин [189, 190].

У цій роботі було досліджено вплив таких вуглецевих наночастинок як оксид графену та одностінні вуглецеві нанотрубки на експресію генів ключових транскрипційних і регуляторних факторів та ензимів у нормальних клітинах (нормальних астроцитах людини) і клітинах пухлин (клітинах гліобластоми) для з’ясування чутливості цих клітин до дії на них

наночастинок, що необхідно для оцінки можливого негативного впливу вуглецевих наночастинок на нормальні клітини за умов їх націлювання на пухлинні клітини.

Результати проведених нами досліджень чітко продемонстрували, що наночастинки оксиду графену посилюють рівень експресії генів ключових транскрипційних факторів, задіяних у численних метаболічних процесах, контролі проліферації та в реалізації сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума, як у нормальних астроцитах людини, так і у клітинах гліобластоми, але чутливість нормальних астроцитів до дії наночастинок оксиду графену виявилася значно більшою, порівняно з клітинами гліобластоми, що наглядно видно із схематично зображених на Рис. 4.1 результатів цих досліджень.

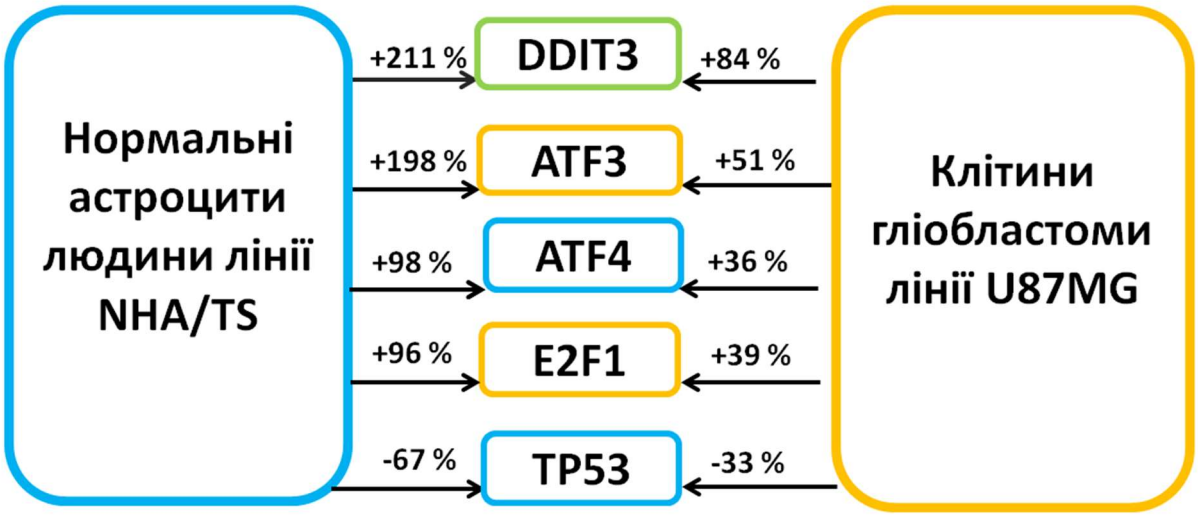


Рис. 4.1. Схематичне зображення результатів впливу наночастинок оксиду графену у концентрації 4 нг/мл на рівень експресії генів важливих транскрипційних факторів у нормальних астроцитах та клітинах гліобластоми, порівняно з відповідними контролями (клітини без наночастинок).

Ці результати переконливо свідчать про функціональні порушення у геномі нормальних астроцитів за дії наночастинок оксиду графену, про

посилення експресії транскрипційних факторів DDIT3/CHOP, ATF3, ATF4 і E2F1, що контролюють стрес-опосередковані процеси проліферації, і про різке пригнічення транскрипційного фактора TP53, який є пухлинним супресором і “охоронцем” геному і що вказує на про-онкогенну роль цих наночастинок [136 – 139, 141, 142, 144, 148, 149].

Подібні результати були отримані і для низки інших генів, що кодують важливі регуляторні фактори та ензими, які задіяні у метаболізмі і регуляції процесів проліферації. На Рис. 4.2. схематично зображено результати досліджень впливу наночастинок оксиду графену у концентрації 4 нг/мл на рівень експресії генів важливих регуляторних факторів та ензимів у нормальних астроцитах людини і клітинах гліобластоми.

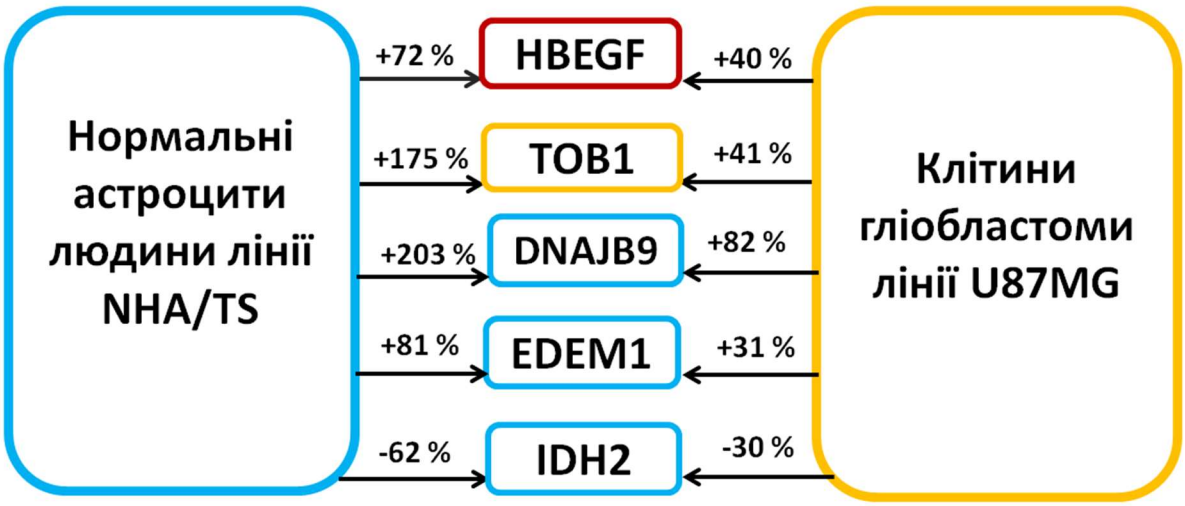


Рис. 4.2. Схематичне зображення результатів впливу наночастинок оксиду графену у концентрації 4 нг/мл на рівень експресії генів важливих регуляторних факторів та ензимів у нормальних астроцитах людини і клітинах гліобластоми, порівняно з відповідними контролями (клітини без наночастинок).

Із приведених на цьому рисунку даних видно, що наночастинки оксиду графену різко збільшують також рівень експресії генів *DNAJB9, TOB1, HBEGF* та *EDEM1,* але пригнічують експресію *IDH2* як у нормальних

клітинах (астроцитах), так і у пухлинних (клітини гліобластоми), причому виявлені зміни в експресії цих генів у нормальних клітинах є значно більшими порівняно з клітинами гліобластоми. Більшість із цих генів є також залежними від стресу ендоплазматичного ретикулума або задіяні у розвитку цього стресу і реалізації сигналів відповіді на неправильно згорнуті протеїни, а також контролюють процеси проліферації. Посилення експресії цих генів, зокрема шаперонів DNAJB9 та HSPA5/Bip, а також EDEM1 і транскрипційних факторів DDIT3/CHOP, ATF3 і ATF4, є реакцією на стрес ендоплазматичного ретикулума, що узгоджується з численними даними по механізмам дії різних наночастинок на клітини та стрес-залежний контроль експресії генів у них [4, 5, 15, 95, 104, 106 - 108, 116, 123, 141, 143, 145, 149, 191].

У той же час, під впливом наночастинок оксиду графену спостерігається зниження рівня експресії гена ізоцитратдегідрогенази 2 (NADP+) мітохондрій (IDH2), пригнічення активності чи мутації гена якої сприяють росту гліоми підвищуючи рівень експресії генів, що сприяють росту злоякісних пухлин [192 - 194]. Таким чином, отримані нами результати вказують на про-онкогенну дію наночастинок оксиду графену на нормальні астроцити шляхом активації про-онкогенних генів і пригнічення анти-онкогенних генів [135 – 144, 192 - 194].

Варто відмітити, що вуглецеві наночастинки є штучно створеними структурами, які надто далекі від реальних біологічних молекул, причому сильно відрізняються від усього, що споконвічно оточувало живі істоти. Можливо, що саме тому живі клітини не спроможні виставити бар’єр на вхід до них різних наночастинок, включаючи і вуглецеві наночастинки.

Відомо, що одностінні вуглецеві нанотрубки (SWCNTs) також впливають на експресію важливих регуляторних факторів і ензимів, що пов'язані з проліферацією та апоптозом, зокрема таких як циклін D2 (CCND2), парвін бета (PARVB), дистробревін альфа (DTNA), 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза-3 (PFKFB3) та PFKFB4 у

клітинах гліоми лінії U87 [11]. Також було показано, що SWCNTs впливають і на імунну відповідь, оскільки за їх дії спостерігається різке 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) [53].

У цій роботі нами показано, що у нормальних астроцитах людини та клітинах гліобластоми під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок також спостерігаються суттєві зміни в експресії низки генів, які кодують ключові транскрипційні фактори, відповідальні за контроль різноманітних метаболічних процесів у клітинах і пов'язані з контролем проліферації клітин та канцерогенезом, а також задіяні у реалізації сигналів стресу ЕР. Результати проведених нами досліджень схематично зображені на Рис. 4.3.

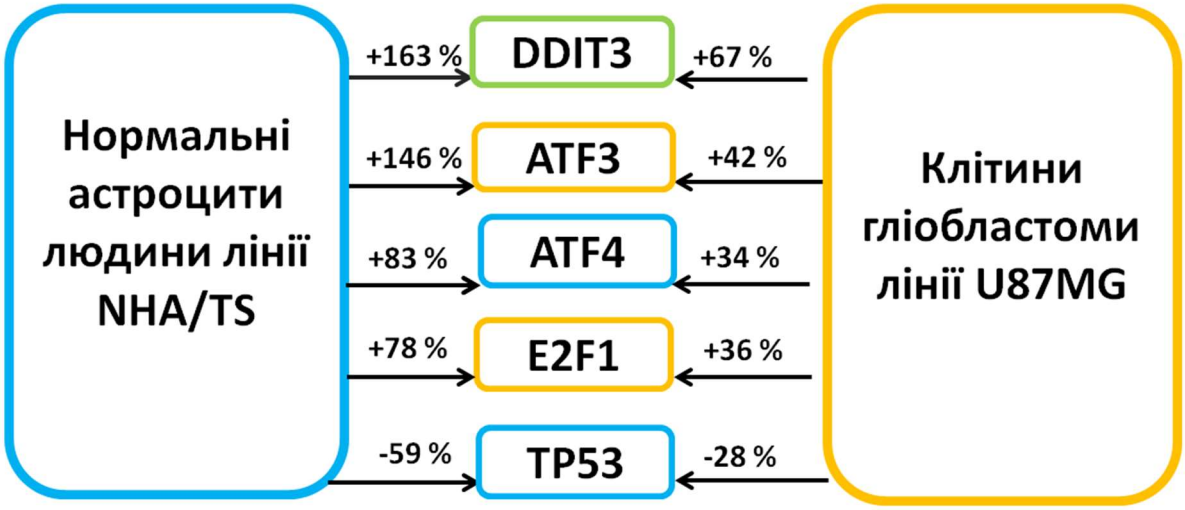


Рис. 4.3. Схематичне зображення результатів впливу одностінних вуглецевих нанотрубок у концентрації 8 нг/мл на рівень експресії генів вагомих транскрипційних факторів у нормальних астроцитах та клітинах гліобластоми, порівняно з відповідними контролями (клітини без наночастинок).

Ці дослідження необхідно було провести як на нормальних астроцитах людини, так і пухлинних клітинах (клітинах гліобластоми) для

оцінки можливого негативного впливу вуглецевих нанотрубок на нормальні клітини за умов націлювання вуглецевих нанотрубок на пухлинні клітини за умов нано-терапії. Результати, приведені на Рис. 4.3, чітко демонструють, що за дії одностінних вуглецевих нанотрубок підвищується рівень експресії генів важливих транскрипційних факторів таких як DDIT3/CHOP, ATF4, ATF3 та E2F1 і знижується рівень експресії пухлинного супресора TP53, причому як у нормальних астроцитах людини, так і у клітинах гліобластоми, але чутливість нормальних астроцитів до дії цих нанотрубок є значно більшою порівняно з клітинами гліобластоми. Це може бути обумовлено наявною у пухлинних клітинах резистентністю до дії на них різних чинників, включаючи наночастинки [5, 92, 95, 160].

Цікаві результати отримані при дослідженні експресії генів *DDX58/RIGI, P4HA2, TOB1* і *TFPI2,* що кодують важливі регулятори процесів проліферації та метаболізму, як у нормальних астроцитах, так і у клітинах гліобластоми за дії на них одностінних вуглецевих нанотрубок у концентрації 8 нг/мл (Рис. 4.4).

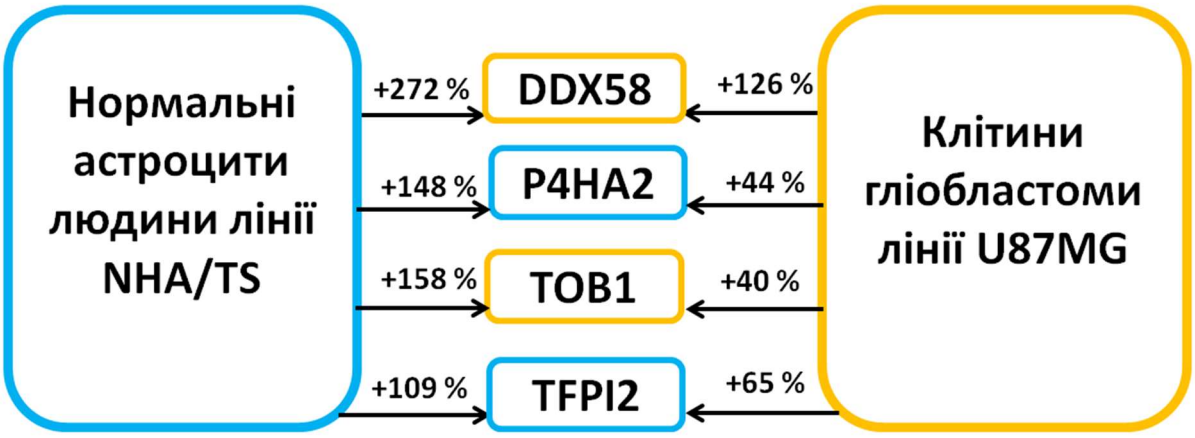


Рис. 4.4. Схематичне зображення результатів впливу одностінних вуглецевих нанотрубок у концентрації 8 нг/мл на рівень експресії генів низки регуляторних факторів у нормальних астроцитах та клітинах гліобластоми, порівняно з відповідними контролями (клітини без наночастинок).

Рівень експресії усіх цих генів різко збільшується під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок як у нормальних астроцитах, так і у клітинах гліобластоми, але це збільшення є більш вираженим саме у нормальних клітинах, що вказує на їх більшу чутливість до дії цих вуглецевих нанотрубок і що може бути обумовлено наявністю у клітинах гліобластоми резистентності до нанотрубок як токсичних чужорідних агентів [95, 97, 104, 107]. Разом з тим, функціональне значення цих генів різне: *DDX58/RIGI, TOB1* і *TFPI2* проявляють проти-пухлинні властивості, а ген альфа субодиниці проліл-4-гідроксилази 1 (*P4HA2)*, навпаки, функціонує переважно як про-пухлинний ензим [195 - 198].

Таким чином, як наночастинки оксиду графену, так і одностінні вуглецеві нанотрубки порушують експресію великого числа генів, зокрема важливих транскрипційних та низки регуляторних факторів, експресія яких контролюється стресом ЕР. Добреи відомо, що рівень їх експресії здебільшого збільшується за різних типів онкозахворювань, що свідчить про їх можливе відношення до канцерогенезу. Для перевірки ролі цього стресу у механізмі дії вуглецевих наночастинок ми провели досліди, використовуючи клітини гліобластоми з пригніченими ензиматичними активностями ERN1, і показали, що такі клітини були майже повністю резистентними до дії різних доз як наночастинок оксиду графену, так і одностінних вуглецевих нанотрубок, що узгоджується з даними літератури [163, 191, 199 - 201].

Відомо, що мікроРНК (малі некодуючі РНК), які регулюють експресію певних генів на пост-транскрипційному рівні, вибірково ініціюючи деградацію мРНК або пригнічуючи її трансляцію, і задіяні у контролі численних клітинних процесів, зокрема таких як проліферація та інвазія, впливають на нейрогенез і розвиток головного мозку, а також стрес ендоплазматичного ретикулума і асоційований з ним онкогенез [167 - 171, 174, 175, 201]. Нами встановлено, що наночастинки оксиду графену у

концентрації 4 нг/мл змінюють рівень експресії мікроРНК miR-98-5p та miR-182-5p у NHA/TS і у клітинах гліоми лінії U87MG, але різно-направлено, причому нормальні клітини реагують на дію цих наночастинок більш виражено (Рис. 4.5).

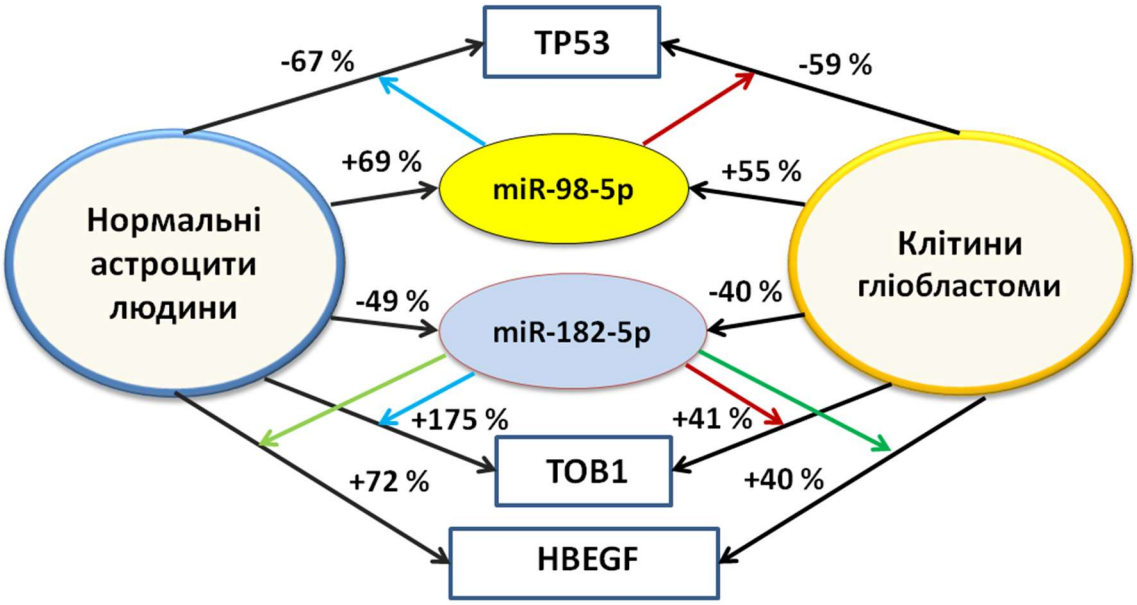


Рис. 4.5. Схематичне зображення результатів впливу наночастинок оксиду графену у концентрації 4 нг/мл на рівень експресії мікроРНК miR-98-5p та miR-182-5p у нормальних астроцитах та клітинах гліобластоми, а також генів важливих регуляторних факторів TP53, TOB1 і HBEGF, мРНК яких мають сайти зв'язування з цими мікроРНК при порівнянні з відповідними контролями (клітини без наночастинок).

Із даних, представлених на цьому рисунку також видно, що рівень експресії мікроРНК miR-98-5p підвищується в обох типах клітин, а експресія мРНК транскрипційного фактора TP53, яка має сайти зв'язування з цією мікроРНК, навпаки, різко знижується, що вказує на можливу причетність miR-98-5p до пост-транскрипційної регуляції мРНК пухлинного супресора TP53, що узгоджується з даними літератури [53, 199, 200]. У той же час, рівень експресії мікроРНК знижується як у нормальних астроцитах

людини, так і у клітинах гліобластоми, але рівень експресії мРНК TOB1 і HBEGF, які мають сайти зв’язування з мікроРНК miR-182-5p, збільшується, і це вказує на причетність цієї мікроРНК до можливої пост-транскрипційної регуляції мРНК *TOB1* і *HBEGF*, що узгоджується з даними літератури [53, 191, 200].

Таким чином, за дії оксиду графену як на нормальні астроцити людини, так і на клітини гліобластоми порушується експресія не лише важливих регуляторних мРНК, а мікроРНК, що вказує на наявність як транскрипційних, так і пост-транскрипційних механізмів контролю експресії генів, опосередкованих переважно сигнальними шляхами стресу ендоплазматичного ретикулума, причому мав місце обернений зв'язок між збільшенням рівня експресії мікроРНК та зниженням цільової мРНК і, навпаки, між зменшенням експресії мікроРНК та ппосиленням експресії мРНК, що добре узгоджується з даними літератури [89, 94, 158, 163]. Виявлені порушення в експресії мРНК і мікроРНК у нормальних клітинах вказують на можливість появи змін у розвитку головного мозку, оскільки уже відомо, що функцією астроцитів є контроль нейрогенезу [202].

Варто відмітити, що результати проведених нами досліджень по вивченню впливу одностінних вуглецевих нанотрубок на експресію малих некодуючих РНК, а саме мікроРНК, в ембріонах зебристих рибок, добре узгоджуються з ролзвитком дефектів головного мозку [183]. Встановлено, що внесення до води з ембріонами низьких концентрацій порушувало рівень експресії мікроРНК miR-19a-3p, miR-21-5p і miR-96-5p уже через 24 години, а за більш тривалої дії цих вуглецевих наночастинок спостерігалися більш виражені зміни в їх експресії.

Так, було показано, що за дії одностінних вуглецевих нанотрубок на ембріони зебристих рибок спостерігається різне за величиною пригнічення експресії мікроРНК miR-19a-3p та miR-21-5p, причому miR-21-5p мала значно більшу чутливість до дії цих одностінних вуглецевих наночастинок, у той час, як експресія miR-96-5p виявилася резистентною до їх впливу

(Рис. 4.6). За більш тривалого часу дії (протягом 72 годин) одностінних вуглецевих нанотрубок у концентрації 2 нг/мл відмічалося більш виражене пригнічення експресії усіх досліджених мікроРНК (Рис. 4.6).

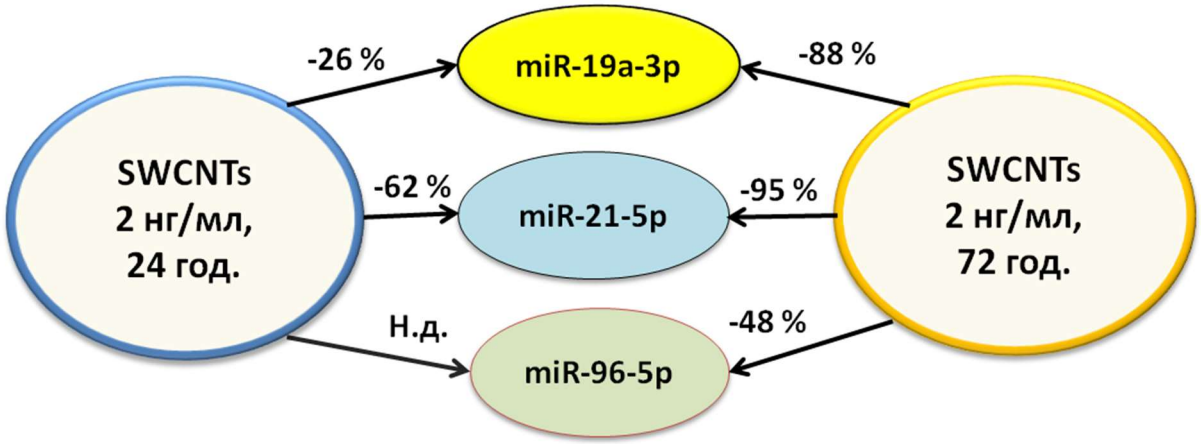


Рис. 4.6. Схематичне зображення результатів визначення рівня експресії мікроРНК miR-19a-3p, miR-21-5p і miR-96-5p в ембріонах *Danio rerio* за дії одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs, 2 нг/мл води) у залежності від часу їх дії (протягом 24 та 72 год), у відсотках від відповідного контролю, прийнятого за 100 %.

Збільшення концентрації одностінних вуглецевих нанотрубок до 8 нг/мл спричиняли більш виражені зміни рівня експресії усіх досліджених мікроРНК в ембріонах *Danio rerio*. Так, за дії одностінних вуглецевих нанотрубок у концентрації 8 нг/мл протягом 24 години рівень експресії мікроРНК miR-19a-3p та miR-21-5p знижувався на 43 і 67 %, а експресія miR-96-5p також пригнічувалася, але лише нам14 % (Рис. 4.7). Разом з тим, через 72 години дії одностінних вуглецевих нанотрубок спостерігалося різке пригнічення експресії всіх цих мікроРНК в ембріонах зебристих рибок *Danio rerio*.

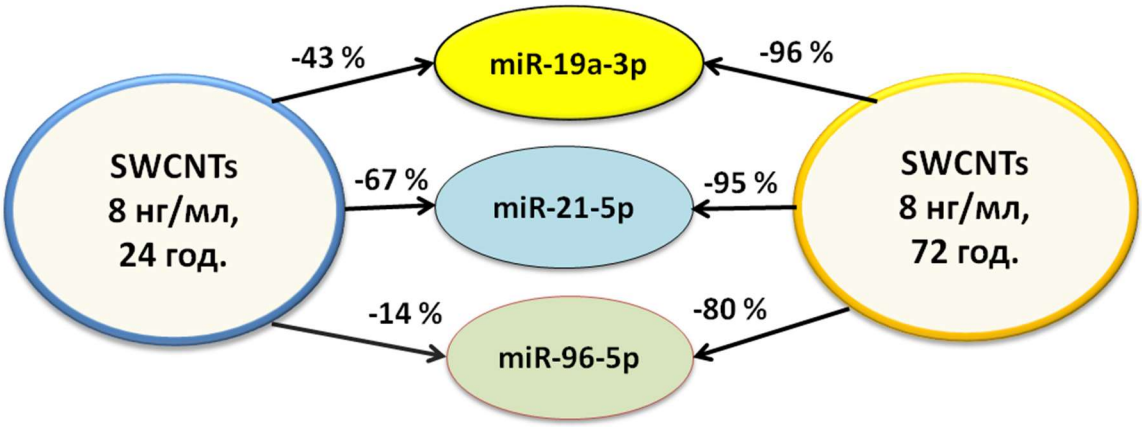


Рис. 4.7. Схематичне зображення результатів визначення рівня експресії мікроРНК miR-19a-3p, miR-21-5p і miR-96-5p в ембріонах *Danio rerio* за дії одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs) у концентрації 8 нг/мл води) у залежності від часу їх дії (протягом 24 та 72 год), у відсотках від відповідного контролю, прийнятого за 100 %.

Відомо, що досліджені нами мікроРНК miR-19a-3p, miR-21-5p та miR-96-5p) є важливими у контролі метаболізму і нейрогенезу. Окрім того, вони необхідні для розвитку зебристих рибок, і тому отримані нами результати добре узгоджуються із результатами інших дослідників стосовно значення мікроРНК для розвитку головного мозку та цереброваскулярних патологій, зокрема мальформацій головного мозку [167 – 169, 171 – 175, 183, 200]. Виявлені нами дозо-залежні зміни рівня експресії мікроРНК за дії одностінних вуглецевих нанотрубок на ембріони *Danio rerio* можуть порушувати розвиток головного мозку і відображають як гено-токсичний, так і нейро-токсичний вплив цих вуглецевих нанотрубок на ранні стадії ембріонального розвитку рибок *Danio rerio*.

Таким чином, проведеними дослідженнями виявлено виражений гено-токсичний ефект різних вуглецевих наночастинок (оксиду графену і одностінних нанотрубок) на нормальні астроцити і клітини гліобластоми по рівню експресії важливих, асоційованих зі стресом ендоплазматичного

ретикулума транскрипційних і регуляторних факторів та мікроРНК, причому показана значно більша чутливість нормальних клітин до дії цих наночастинок, яка опосередковується стресом ендоплазматичного ретикулума і може бути причиною розвитку патологічних станів.

.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені результати експериментальних досліджень по виясненню актуальної наукової проблеми біохімії та молекулярної біології, а саме впливу наночастинок оксиду графену і одностінних вуглецевих нанотрубок на експресію генів ключових транскрипційних та регуляторних факторів у нормальних астроцитах, клітинах гліобластоми та в ембріонах зебристих рибок. Показано, що наночастинки оксиду графену і одностінних вуглецевих нанотрубок порушують експресію генів транскрипційних та інших регуляторних факторів у клітинах гліобластоми і нормальних астроцитах людини, причому нормальні астроцити є більш чутливими до дії вуглецевих наночастинок. Отримані результати розкривають стрес-залежність механізмів дії вуглецевих наночастинок на нормальні та пухлинні клітини і свідчать про потенційні ризики їхнього запстосування у біологівї та медицині.

1. Встановлено, що наночастинки оксиду графену порушується експресія генів важливих факторів транскрипції та регуляторних протеїнів у нормальних астроцитах людини.

2. Показано, що за дії наночастинок оксиду графену у клітинах гліобластоми також порушується експресія генів низки транскрипційних і регуляторних факторів та мікроРНК, але у меншій мірі порівняно з нормальними астроцитами.

3. Встановлено, що під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок у нормальних астроцитах порушується рівень експресії генів важливих факторів транскрипції, що опосередковано стресом ендоплазматичного ретикулума.

4. Показано, що під впливом одностінних вуглецевих нанотрубок у клітинах гліобластоми також порушується експресія генів низки транскрипційних і регуляторних факторів, але в меншій мірі порівняно з

нормальними астроцитами і залежить від активності сигнального протеїну ERN1.

5. Встановлено, що інкубація ембріонів зебристих рибок *Danio rerio* з різними дозами одностінних вуглецевих нанотрубок призводить до зниження рівня експресії важливих для нейрогенезу мікроРНК miR-19-3p, miR-21-5p та miR-96-5p, причому ефект цих наночастинок посилювався зі збільшенням їхньої дози і часу дії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Brandao, M., Simon, T., Critchley, G., Giamas, G. Astrocytes, the rising stars of the glioblastoma microenvironment. Glia. 2019; 67(5), 779–790. https://doi.org/10.1002/glia.23520.
2. Zhang, H., Zhou, Y., Cui, B., Liu, Z., Shen, H. Novel insights into astrocyte-mediated signaling of proliferation, invasion and tumor immune microenvironment in glioblastoma. Biomed. Pharmacother. 2020; 126, 110086. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110086.
3. Gavas, S., Quazi, S., Karpiński, T. M. Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges. Nanoscale Res. Lett. 2021; 16(1), 173. https://doi.org/10.1186/s11671-021-03628-6.
4. Almanza, A., Carlesso, A., Chintha, C., Creedican, S., Doultsinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., de Belleroche, J., Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman, A. M., Healy, S., Kozlov A, Muñoz-Pinedo C, Rehm M, Chevet E, Samali, A. Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. FEBS J. 2019; 286(2), 241–278. https://doi.org/10.1111/febs.14608.
5. Minchenko, O.H., Tsymbal, D.O., Khita, O.O., Minchenko, D.O. Inhibition of ERN1 signaling is important for the suppression of tumor growth. Clinical Cancer Drugs. 2021; 8(1), 27-38. 1https://doi.org/10.2174/2212697X08666211006100250.
6. 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. Toxicity of Nanoparticles in Biomedical Application: Nanotoxicology. J. Toxicol. 2021; 9954443. https://doi.org/10.1155/2021/9954443.

7. Minchenko DO, Bozhko IV, Zinchenko TO, Mykhalchenko VG, Yavorovsky OP, Minchenko OH. Effect of silver nanoparticles on the expression of circadian genes and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in rat brain. Biotechnologia. 2010; 3(3), 42-49. PMID: 21674963.
8. Minchenko, D.O., Bozhko, I.V., Zinchenko, T.O., Yavorovsky, O.P., Minchenko, O.H. Expression of SNF1/AMP-activated protein kinase and casein kinase-1ε in different rat tissues are sensitive markers of in vivo silver nanoparticles action. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, 2011; 42. https://doi.org/10.1002/mawe.201100742.
9. Minchenko D.O., Prylutska S.V., Moenner M., Minchenko O.H., Prylutskyy Y.I., Schütze C., Ritter U. Effect of C60 Fullerene on the expression of ERN1 signaling related genes in human astrocytes. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik. 2013; 44 (2-3), 150-155. https://doi.org/10.1002/mawe.201300084.
10. Minchenko D.O., Spivak M.Y., Herasymenko R.M., Ivanov V.K., Tretyakov Y.D., Minchenko O.H. Effect of cerium dioxide nanoparticles on the expression of selected growth and transcription factors in human astrocytes. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik. 2013; 44 (2-3), 156-160. https://doi.org/10.1002/mawe.201300091.
11. Minchenko O.H., Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Prylutska S.V., Cherepanov V.V., Prylutskyy Y.I., Tsierkezos N.G. Single-walled carbon nanotubes affect the expression of the CCND2 gene in human U87 glioma cells. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik. 2016; 47 (2-3), 180-188. https://doi.org/10.1002/mawe.201600462.
12. Minchenko D.O, Tsymbal D.O, Yavorovsky O.P, Solokha N.V, Minchenko O.H. Expression of genes encoding IGFBPs, SNARK, CD36, and PECAM1 in the liver of mice treated with chromium disilicide and titanium nitride nanoparticles. Endocr. Regul. 51(2), 84-95 https://doi.org/10.1515/enr-2017-0008.

13. Minchenko O.H., Yavorovsky O.P., Solokha N.V., Minchenko D.O., Kuznetsova A.Y. 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. 2017; 89 (2), 31-42. https://doi.org/10.15407/ubj89.02.031.

14. Simon, M., Barberet, P., Delville, M.H., Moretto, P., Seznec, H. Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity. Nanotoxicology, 2011; 5(2), 125–139. https://doi.org/10.3109/17435390.2010.502979.

15. Simon, M., Saez, G., Muggiolu, G., Lavenas, M., Le Trequesser, Q., Michelet, C., Devès, G., Barberet, P., Chevet, E., Dupuy, D., Delville, M. H., Seznec, H. In situ quantification of diverse titanium dioxide nanoparticles unveils selective endoplasmic reticulum stress-dependent toxicity. Nanotoxicology, 2017; 11(1), 134–145. https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1278803.

16. Periasamy, V. S., Athinarayanan, J., Alfawaz, M. A., Alshatwi, A. A. Carbon nanoparticle induced cytotoxicity in human mesenchymal stem cells through upregulation of TNF3, NFKBIA and BCL2L1 genes. Chemosphere, 2016; 144, 275–284. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.018.

17. 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. Differentially expressed genes reflect disease-induced rather than disease-causing changes in the transcriptome. Nat. Commun. 2021; 12(1), 5647. https://doi.org/10.1038/s41467-021-25805-y.

18. Cellot, G., Franceschi Biagioni, A., Ballerini, L. Nanomedicine and graphene-based materials: advanced technologies for potential treatments of diseases in the developing nervous system. Pediatr. Res. 2022; 92, 71-79. https://doi.org/10.1038/s41390-021-01681-6.

19. Barberet, P., Chevet, E., Dupuy, D., Delville, M.-H., Seznec, H. In situ quantification of diverse titanium dioxide nanoparticles unveils selective endoplasmic reticulum stress-dependent toxicity. Nanotoxicology. 2017; 11, 134-145. https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1278803.

20. Avitabile, E., Bedognetti, D., Ciofani, G., Bianco, A., Delogu, L.G. How can nanotechnology help the fight against breast cancer? Nanoscale. 2018; 10, 11719-11731. https://doi.org/10.1039/c8nr02796j.

21. Fadeel, B., Bussy, C., Merino, S., Vazquez, E., Flahaut, E., Mouchet, F., Evariste, L., Gauthier, L., Koivisto, A.J., Vogel, U., Martín, C., Delogu, L.G., Buerki-Thurnherr, T., Wick, P., Beloin-Saint-Pierre, D., Hischier, R., Pelin, M., Candotto Carniel, F., Tretiach, M., Cesca, F., Benfenati, F., Scaini, D., Ballerini, .L, Kostarelos, K., Prato, M., Bianco, A. Safety assessment of graphene-based materials: focus on human health and the environment. ACS Nano. 2018; 12, 10582–10620. https://doi.org/10.1021/acsnano.8b04758.

22. Itoo, A.M., Vemula, S.L., Gupta, M.T., Giram, M.V., Kumar, S.A., Ghosh, B., Biswas, S. Multifunctional graphene oxide nanoparticles for drug delivery in cancer. J. Control Release 2022; 350, 26-59. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.08.011.

23. Tonelli FM, Goulart VA, Gomes KN, Ladeira MS, Santos AK, Lorençon E, Ladeira LO, Resende RR. Graphene-based nanomaterials: biological and medical applications and toxicity. Nanomedicine (Lond). 2015; 10, 2423-2450. https://doi.org/10.2217/nnm.15.65.

24. Jia, P.P., Sun, T., Junaid, M., Yang, L., Ma, Y.B., Cui, Z.S., Wei, D.P., Shi, H.F., Pei, D.S. Nanotoxicity of different sizes of graphene (G) and graphene oxide (GO) in vitro and in vivo. Environ. Pollut. 2019; 247, 595–606. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.072.

25. Chen, L., Li, J., Chen, Z., Gu, Z., Yan, L., Zhao, F., Zhang, A., Toxicological evaluation of graphene-family nanomaterials. J. Nanosc. Nanotechnol. 2020; 20, 1993–2006. https://doi.org/10.1166/jnn.2020.17364.

26. Malhotra, N., Villaflores, O.B., Audira, G., Siregar, P., Lee, J.S., Ger, T.R., Hsiao, C.D. Toxicity studies on graphene-based nanomaterials in aquatic organisms: current understanding. Molecules. 2020; 25, 3618. https://doi.org/10.3390/molecules25163618.

27. Cruces, E., Barrios, A.C., Cahue, Y.P., Januszewski, B., Gilbertson L.M., Perreault F. Similar toxicity mechanisms between graphene oxide and oxidized multi-walled carbon nanotubes in Microcystis aeruginosa. Chemosphere. 2021; 265, 129137. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129137.

28. Li, J., Zeng, H., Zeng, Z., Zeng, Y., Xie, T., Promising graphene-based nanomaterials and their biomedical applications and potential risks: A comprehensive review. ACS Biomater. Sci. Eng. 2021; 7, 5363–5396. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00875.

29. Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ. Health Perspect. 2005; 113(7), 823–839. https://doi.org/10.1289/ehp.7339.

30. 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. Nanotoxicology--a pathologist's perspective. Toxicol. Pathol. 2011; 39(2), 301–324. https://doi.org/10.1177/0192623310390705.

31. Sharma H, Mondal S. Functionalized Graphene Oxide for Chemotherapeutic Drug Delivery and Cancer Treatment: A Promising Material in Nanomedicine. Int. J. Mol. Sci. 2020; 21(17):6280. https://doi.org/10.3390/ijms21176280.

32. Wang, E.C., Wang, A.Z. Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. Integr Biol (Camb), 2014; 6(1), 9–26. https://doi.org/10.1039/c3ib40165k.

33. Shrivastava, S., Jain, S.R., Kumar, D., Soni, S.L., Sharma, M. A Review on Theranostics: An Approach to Targeted Diagnosis and Therapy. Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development. 2019; 7 (2), 63-69 http://dx.doi.org/10.22270/ajprd.v7i2.463.

34. Li B, Shao H, Gao L, Li H, Sheng H, Zhu L. Nano-drug co-delivery system of natural active ingredients and chemotherapy drugs for cancer treatment: a review. Drug Deliv. 2022; 29(1): 2130-2161. https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2094498.

35. Beach MA, Nayanathara U, Gao Y, Zhang C, Xiong Y, Wang Y, Such GK. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. Chem. Rev. 2024; 124(9): 5505-5616. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.3c00705.

36. Oliveira, S.F., Bisker, G., Bakh, N.A. et al. Protein Functionalized Carbon Nanomaterials for Biomedical Applications. Carbon. 2015; 95, 767–779. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.08.076.

37. Aggarwal, P., Hall, J.B., McLeland, C.B., Dobrovolskaia, M.A., McNeil, S.E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. Adv. Drug Deliv. Rev. 2009; 61(6), 428–437. https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.009.

38. 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. Classification framework for graphene-based materials. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2014; 53(30), 7714–7718. https://doi.org/10.1002/anie.201403335.

39. Lalwani, G., D'Agati, M., Khan, A.M., Sitharaman, B. Toxicology of Graphene-Based Nanomaterials. Adv Drug Deliv Rev. 2016; 105(Pt B): 109–144. https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.028.

40. Jaleel, J.A., Sruthi, S., Pramod, K. Reinforcing nanomedicine using graphene family nanomaterials. J Control Release. 2017; 255: 218-230. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.04.041.

41. Krishna, K.V., Ménard-Moyon, C., Verma, S., Bianco, A. Graphene-based nanomaterials for nanobiotechnology and biomedical applications. Nanomedicine (Lond). 2013; 8(10): 1669-1688. https://doi.org/PDF 10.2217/nnm.13.140.

42. Orecchioni, M., Ménard-Moyon, C., Delogu, L.G., Bianco, A. Graphene and the immune system: Challenges and potentiality. Adv. Drug Deliv. Rev. 2016; 105(Pt B): 163-175. https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.014.

43. Zhang, B., Wie, P., Zhou, Z., Wie, T. Interactions of graphene with mammalian cells: Molecular mechanisms and biomedical insights. Adv. Drug Deliv. Rev. 2016; 105(Pt B): 145-162. https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.08.009.

44. Backes, C., Behera, R.K., Bianco, **A.**, Casiraghi, C., Doan, H., Criado, A., Galembeck, F., Goldie, S., Gravagnuolo, A.M., Hou, H.L., Kamali, A.R., Kostarelos, K., Kumar, V., Lee, W.H., Martsinovich, N., Palermo, V., Palma, M., Pang, J., Prato, M., Samori, P., Silvestri, A., Singh, S., Strano, M., Wetzl, C. Biomedical applications: general discussion. Faraday Discuss. 2021; 227: 245-258. https://doi.org/10.1039/D1FD90003J.

45. Ma, B., Bianco, A. Recent Advances in 2D Material-Mediated Immuno-Combined Cancer Therapy. Small. 2021; 17(46): e2102557. https://doi.org/10.1002/smll.202102557.

46. Dash, B.S., Jose, G., Lu, Y.J., Chen, J.P. Functionalized Reduced Graphene Oxide as a Versatile Tool for Cancer Therapy. Int. J. Mol. Sci. 2021; 22(6): 2989. https://doi.org/10.3390/ijms22062989.

47. Giusto, E., Žárská, L., Beirne, D.F., Rossi, A., Bassi, G., Ruffini, A., Montesi, M., Montagner, D., Ranc, V., Panseri, S. Graphene Oxide Nanoplatforms to Enhance Cisplatin-Based Drug Delivery in Anticancer Therapy. Nanomaterials (Basel). 2022; 12(14), 2372. https://doi.org/10.3390/nano12142372.

48. Taheriazam, A., Abad, G.G.Y., Hajimazdarany, S., Imani, M.H., Ziaolhagh, S., Zandieh, M.A., Bayanzadeh, S.D., Mirzaei, S., Hamblin, M.R., Entezari, M., Aref A.R., Zarrabi, A., Ertas, Y.N., Ren, J., Rajabi, R., Paskeh, M.D.A., Hashemi, M., Hushmandi, K. Graphene oxide nanoarchitectures in cancer biology: Nano-modulators of autophagy and apoptosis. J. Control Release. 2023; 354, 503-522. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.01.028.

49. Wu, S.Y., An, S.S., Hulme, J. Current applications of graphene oxide in nanomedicine. Int. J. Nanomedicine. 2015; 10 Spec Iss(Spec Iss): 9-24. https://doi.org/10.2147/IJN.S88285.

50. Tabish, T.A. Graphene-based materials: The missing piece in nanomedicine? Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018; 504(4), 686-689. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.029.

51. Bhatt, S., Punetha, V.D., Pathak, R., Punetha, M. Graphene in nanomedicine: A review on nano-bio factors and antibacterial activity. Colloids Surf. B Biointerfaces. 2023; 226, 113323. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113323.

52. Gurunathan, S., Kim, J.-H. Synthesis, toxicity, biocompatibility, and biomedical applications of graphene and graphene-related materials. Int J Nanomedicine. 2016; 11: 1927–1945. https://doi.org/10.2147/IJN.S105264.

53. Minchenko, O. H., Tsymbal, D. O., Minchenko, D. O., Prylutska, S. V., Hnatiuk, O. S., Prylutskyy, Y. I., Tsierkezos, N. G., Ritter, U. Single-walled carbon nanotubes affect the expression of genes associated with immune response in normal human astrocytes. Toxicology in vitro. 2018; 52, 122–130. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.06.011.

54. Szczepaniak, J., Strojny, B., Chwalibog, E.S., Jaworski, S., Jagiello, J., Winkowska, M., Szmidt, M., Wierzbicki, M., Sosnowska, M., Balaban, J., Winnicka, A., Lipinska, L., Witkowska Pilaszewicz, O., Grodzik, M. Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. Int. J. Mol. Sci. 2018; 19(12), 3939. https://doi.org/10.3390/ijms19123939.

55. Simon, J., Flahaut, E., Golzio, M. Overview of Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. Materials (Basel, Switzerland), 2019; 12(4), 624. https://doi.org/10.3390/ma12040624.

56. Negri, V., Pacheco-Torres, J., Calle, D., López-Larrubia, P. Carbon Nanotubes in Biomedicine. Top. Curr. Chem. (Cham). 2020; 378(1), 15. https://doi.org/10.1007/s41061-019-0278-8.

57. Prajapati, S.K., Malaiya, A., Kesharwani, P., Soni, D., Jain, A. Biomedical applications and toxicities of carbon nanotubes. Drug Chem Toxicol. 2022; 45(1), 435-450. https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1709492.

58. Melwani, P.K., Pandey, B.N. Tunneling nanotubes: The intercellular conduits contributing to cancer pathogenesis and its therapy. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2023; 1878(6), 189028. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.189028.

59. Srivastava, N., Mishra, Y., Mishra, V., Ranjan, A., Tambuwala, M.M. Carbon Nanotubes in Breast Cancer Treatment: An Insight into Properties, Functionalization, and Toxicity. Anticancer Agents Med Chem. 2023; 23(14), 1606-1617. https://doi.org/10.2174/1871520623666230510094850.

60. Sun, L., Liu, H., Ye, Y., Lei, Y., Islam, R., Tan, S., Tong, R., Miao, Y.B., Cai, L. Smart nanoparticles for cancer therapy. Signal Transduct Target Ther. 2023; 8(1): 418. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01642-x.

61. Halwai, K., Khanna, S., Gupta, G., Wahab, S., Khalid, M., Kesharwani, P. Folate-conjugated carbon nanotubes as a promising therapeutic approach for targeted cancer therapy. J Drug Target. 2025; 33(1): 1-16. https://doi.org/10.1080/1061186X.2024.2393423.

62. Bortolamiol, T., Lukanov, P., Galibert, A.M., Soula, B., Lonchambon, P., Datas, L., Flahaut, E. Double-walled carbon nanotubes: Quantitative purification assessment, balance between purification and degradation and solution filling as an evidence of opening. Carbon, 2014; 78: 79-90. https://doi.org/10.1016/J.CARBON.2014.06.051.

63. Gostaviceanu A, Gavrilaş S, Copolovici L, Copolovici DM. Graphene-Oxide Peptide-Containing Materials for Biomedical Applications. Int J Mol Sci. 2024; 25(18), 10174. https://doi.org/10.3390/ijms251810174.

64. Sajid, M.I., Jamshaid, U., Jamshaid, T., Zafar, N., Fessi, H., Elaissari, A. Carbon nanotubes from synthesis to in vivo biomedical applications. Int. J. Pharm. 2016; 501(1-2), 278-299. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.064.

65. Zhou, Y., Fang, Y., Ramasamy, R. P. Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes for Electrochemical Biosensor Development. Sensors (Basel, Switzerland), 2019; 19(2), 392. https://doi.org/10.3390/s19020392.

66. Bianco, A., Kostarelos, K., Prato, M. Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable. Chem. Commun. (Camb). 2011; 47(37), 10182-10188. https://doi.org/10.1039/c1cc13011k.

67. Fabbro, C., Ali-Boucetta, H., Da Ros, T., Kostarelos, K., Bianco, A, Prato M. Targeting carbon nanotubes against cancer. Chem. Commun. (Camb). 2012; 48(33), 3911-3926. https://doi.org/10.1039/c2cc17995d.

68. Wang, J., Xu, Y., Yang, Z., Huang, R., Chen, J., Wang, R., Lin, Y. Toxicity of carbon nanotubes. Curr. Drug Metab. 2013; 14(8), 891-899. https://doi.org/10.2174/1389200211314001111.

69. Yan, H., Xue, Z., Xie, J., Dong, Y., Ma, Z., Sun, X., Kebebe Borga, D., Liu, Z., Li, J. Toxicity of Carbon Nanotubes as Anti-Tumor Drug Carriers. Int. J. Nanomedicine. 2019; 14, 10179-10194. https://doi.org/10.2147/IJN.S220087.

70. Saleemi, M.A., Hosseini Fouladi, M., Yong, P.V.C., Chinna, K., Palanisamy, N.K., Wong, E.H. Toxicity of Carbon Nanotubes: Molecular Mechanisms, Signaling Cascades, and Remedies in Biomedical Applications. Chem. Res. Toxicol. 2021; 34(1), 24-46. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00172.

71. Witkowska, M., Florek, E., Mrówczyński, R. Assessment of Pristine Carbon Nanotubes Toxicity in Rodent Models. Int. J. Mol. Sci. 2022; 23(23), 15343. https://doi.org/10.3390/ijms232315343.

72. Chen, M., Zhao, D. Invisible Bridges: Unveiling the Role and Prospects of Tunneling Nanotubes in Cancer Therapy. Mol. Pharm. 2024; 21(11), 5413-5429. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.4c00563.

73. Padmanabhan, S., Deniz, K., Sarkari, A., Lou, E. Tunneling Nanotubes: Implications for Chemoresistance. Results Probl. Cell Differ. 2024; 73, 353-373. https://doi.org/10.1007/978-3-031-62036-2_15.

74. Ahmadian, E., Janas, D., Eftekhari, A., Zare, N. Application of carbon nanotubes in sensing/monitoring of pancreas and liver cancer. Chemosphere. 2022; 302, 134826. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134826.

75. Rahman, A.U., Saaduzzaman, D.M., Hasan, S.M., Sikder,. M.K.U. Potentiality of phosphide-based nanotubes for breast cancer detection: A DFT investigation. Nanotechnology. 2024; 35(36). https://doi.org/10.1088/1361-6528/ad5681.

76. Sharma, M., Alessandro, P., Cheriyamundath, S., Lopus, M. Therapeutic and diagnostic applications of carbon nanotubes in cancer: recent advances and challenges. J. Drug Target. 2024; 32(3), 287-299. https://doi.org/10.1080/1061186X.2024.2309575.

77. Ojeda, I., Barrejón, M., Arellano, L.M., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Langa, F., Pingarrón, J.M. 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, 2015; 74, 24–29. https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.001.

78. Mohajeri M, Behnam B, Sahebkar A. Biomedical applications of carbon nanomaterials: Drug and gene delivery potentials. J. Cell. Physiol. 2018; 234(1), 298-319. https://doi.org/10.1002/jcp.26899.

79. 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. 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. 2018; 106(5), 1637–1644. https://doi.org/10.1002/jbm.b.34012.

80. Albanese, A., Tang, P.S., Chan, W.C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. Ann. Rev. Biomed. Engineering. 2012; 14, 1–16. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124.

81. Yavorovsky, A.P., Minchenko, D.O., Solokha, N.V., Shish, A.M., Minchenko, O.H. Genotoxic and cytotoxic effects of titanium nitride and chromium

disilicide nanoparticles as a criterion for the effect on the body. Likars'ka Sprava. 2017; (8), 3-8. https://doi.org/10.31640/LS-2017-8-01.

82. Wang, J., Liu, K., Mo, C., Minchenko, O.H., Zhang, Y., Chen, J.-R., Hsiao, C.-D., Zhu, Q., He, Q. Nano-titanium nitride causes developmental toxicity in zebrafish through oxidative stress. Drug and Chemical Toxicology, 2022, 45(4), 1660-1669. https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1853765.
83. Francis, A.P., Devasena, T. Toxicity of carbon nanotubes: A review. Toxicol. Industrial Health, 2018; 34(3), 200–210. https://doi.org/10.1177/0748233717747472.
84. Bhattacharya, K., Mukherjee, S. P., Gallud, A., Burkert, S. C., Bistarelli, S., Bellucci, S., Bottini, M., Star, A., Fadeel, B. Biological interactions of carbon-based nanomaterials: From coronation to degradation. Nanomedicine. 2016; 12(2), 333–351. https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.011.
85. Yu, Z., Li, Q., Wang, J., Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q., Li, P. Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field. Nanoscale Res. Lett. 2020; 15(1), 115. https://doi.org/10.1186/s11671-020-03344-7.
86. Jovanović B. Review of titanium dioxide nanoparticle phototoxicity: Developing a phototoxicity ratio to correct the endpoint values of toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 2015; 34(5), 1070–1077. https://doi.org/10.1002/etc.2891.
87. Tang, Y., Wang, F., Jin, C., Liang, H., Zhong, X., Yang, Y. Mitochondrial injury induced by nanosized titanium dioxide in A549 cells and rats. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2013; 36(1), 66–72. https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.03.006.
88. Djurišić, A.B., Leung, Y.H., Ng, A.M., Xu, X.Y., Lee, P.K., Degger, N., Wu, R. S. Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. Small. 2015; 11(1), 26–44. https://doi.org/10.1002/smll.201303947.

89. Sicari, D., Delaunay-Moisan, A., Combettes, L., Chevet, E., Igbaria, A. A guide to assessing endoplasmic reticulum homeostasis and stress in mammalian systems. FEBS J. 2020; 287(1): 27-42. https://doi.org/10.1111/febs.15107.

90. Chevet, E., Hetz, C., Samali, A. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. Cancer Discov. 2015; 5, 586–597. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1490.

91. Wu, J., Kaufman, R. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. Cell. Death Differ. 2006; 13, 374–384. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401840.

92. Hetz, C., Zhang, K., Kaufman, R.J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020; 21, 421–438. https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z.

93. Rutkowski, D.T., Arnold, S.M., Miller, C.N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K.M., Mori, K., Sadighi Akha, A.A., Raden, D., Kaufman, R.J. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro- apoptotic mRNAs and proteins. PLoS Biol. 2006; 4(11), e374. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040374.

94. Maurel, M., Chevet, E. Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2013; 304(12), C1117–C1126. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00061.2013.

95. Ajoolabady, A., Kaplowitz, N., Lebeaupin, C., Kroemer, G., Kaufman, R.J., Malhi, H., Ren, J. Endoplasmic reticulum stress in liver diseases. Hepatology. 2023; 77(2), 619-639. https://doi.org/10.1002/hep.32562.

96. Kaufman, R.J., Back, S.H., Song, B., Han, J., Hassler, J. The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in β-cells. Diabetes, Obes. Metab. 2010; 12 (Suppl. 2), 99–107. https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01281.x.

97. Chakrabarti, A., Chen, A. W., Varner, J. D. A review of the mammalian unfolded protein response. Biotechnol. Bioeng. 2011; 108(12), 2777–2793. https://doi.org/10.1002/bit.23282.

98. Oakes, S.A. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells. Am. J. Pathol. 2020; 190, 934-946. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.01.010.

99. Groenendyk, J., Agellon, L.B., Michalak, M. Calcium signaling and endoplasmic reticulum stress. Int. Rev. Cell. Mol. Biol. 2021; 363, 1-20. https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.03.003.

100. Celik, C., Lee, S.Y.T., Yap, W.S., Thibault, G. Endoplasmic reticulum stress and lipids in health and diseases. Prog. Lipid Res. 2023; 89, 101198. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101198.

101. An, Y., Wang, X., Guan, X., Yuan, P., Liu, Y., Wei, L., Wang, F., Qi, X. Endoplasmic reticulum stress-mediated cell death in cardiovascular disease. Cell Stress Chaperones. 2024; 29(1), 158-174. https://doi.org/10.1016/j.cstres.2023.12.003.

102. Chen, X., Shi, C., He, M., Xiong, S., Xia, X. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. Signal Transduct. Target Ther. 2023; 8(1), 352. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01570-w.

103. Chen, R., Huo, L., Shi, X., Bai, R., Zhang, Z., Zhao, Y., Chang, Y., Chen, C. Endoplasmic reticulum stress induced by zinc oxide nanoparticles is an earlier biomarker for nanotoxicological evaluation. ACS Nano. 2014; 8(3), 2562-2574. https://doi.org/10.1021/nn406184r.

104. Chen, G., Shen, Y., Li, X., Jiang, Q., Cheng, S., Gu, Y., Liu, L., Cao, Y. The endoplasmic reticulum stress inducer thapsigargin enhances the toxicity of ZnO nanoparticles to macrophages and macrophage-endothelial co-culture. Environ Toxicol. Pharmacol. 2017; 50, 103-110. https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.020.

105. Yang, S., Li, M., Kong, R.Y.C., Li, L., Li, R., Chen, J., Lai, K.P. Reproductive toxicity of micro- and nanoplastics. Environ Int. 2023; 177, 108002. https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108002.

106. Cao, Y., Long, J., Liu, L., He, T., Jiang, L., Zhao, C., Li, Z. A review of endoplasmic reticulum (ER) stress and nanoparticle (NP) exposure. Life Sci. 2017; 186, 33-42. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.003.

107. Gu, W., Yang, C. Zinc oxide nanoparticles inhibit malignant progression and chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by activating endoplasmic reticulum stress and promoting autophagy. Exp. Ther. Med. 2023; 26(5), 508. https://doi.org/10.3892/etm.2023.12207.

108. Li, B., Zhang, T., Tang, M. Toxicity mechanism of nanomaterials: Focus on endoplasmic reticulum stress. Sci. Total Environ. 2022; 834, 155417. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155417.

109. Shukla, R. K., Badiye, A., Vajpayee, K., Kapoor, N. Genotoxic Potential of Nanoparticles: Structural and Functional Modifications in DNA. Front. Genet. 2021; 12, 728250. https://doi.org/10.3389/fgene.2021.728250.

110. Kulasza, M., Skuza, L. Changes of Gene Expression Patterns from Aquatic Organisms Exposed to Metal Nanoparticles. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2021; 18(16), 8361. https://doi.org/10.3390/ijerph18168361.

111. Horstmann, C., Davenport, V., Zhang, M., Peters, A., Kim, K. Transcriptome Profile Alterations with Carbon Nanotubes, Quantum Dots, and Silver Nanoparticles: A Review. Genes (Basel). 2021 May 23;12(6):794. https://doi.org/10.3390/genes12060794.

112. Lin, H., Fu, G., Yu, Q., Wang, Z., Zuo Y., Shi, Y., Zhang, L., Gu, Y., Qin, L., Zhou, T. Carbon black nanoparticles induce HDAC6-mediated inflammatory responses in 16HBE cells. Toxicol. Ind. Health. 2020; 36(10), 759-768. https://doi.org/10.1177/0748233720947214.

113. Basaki, M., Keykavusi, K., Sahraiy, N., Akbari, G., Hejazi, M. Small Heat Shock Protein's Gene Expression Response to Iron Oxide Nanoparticles in the Brain. Biol. Trace Elem. Res. 2022; 200(4): 1791-1798. https://doi.org/10.1007/s12011-021-02761-8.

114. Minchenko, D.O., Zinchenko, T.O., Yavorovsky, O.P., Minchenko, O.H. Expression of SNF1/AMP-activated Protein Kinase and Casein Kinase-1e in the

Brain, Liver, Lungs, Kidney and Heart is a Sensitive Marker of Silver Nanoparticles Action. BIT's 2nd Annual World Congress of Nanomedicine-2011, Shenzhen, China, 2011, 21-22.

115. Marczylo, E.L., Jacobs, M.N., Gant, T.W. Environmentally induced epigenetic toxicity: potential public health concerns. Critical Rev. Toxicol. 2016; 46(8), 676–700. https://doi.org/10.1080/10408444.2016.1175417.

116. Yang, L., Kuang, H., Zhang, W., Aguilar, Z. P., Wei, H., Xu, H. Comparisons of the biodistribution and toxicological examinations after repeated intravenous administration of silver and gold nanoparticles in mice. Sci. Rep. 2017; 7(1), 3303. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03015-1.

117. Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., Dusinska, M. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. Nanotoxicology, 2014; 8(3), 233–278. https://doi.org/10.3109/17435390.2013.773464.

118. Minchenko, D.O., Bozhko, I.V., Zinchenko, T., Yavorovsky, O. P., Minchenko, O.H. Expression of SNF1/AMP-activated protein kinase and casein kinase-1ε in different rat tissues are sensitive markers of in vivo silver nanoparticles action. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, 2011; 42. https://doi.org/10.1002/mawe.201100742.

119. Toyokuni, S. Genotoxicity and carcinogenicity risk of carbon nanotubes. Adv. Drug Delivery Rev. 2013; 65(15), 2098–2110. https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.011.

120. Samadian, H., Salami, M. S., Jaymand, M., Azarnezhad, A., Najafi, M., Barabadi, H., Ahmadi, A. Genotoxicity assessment of carbon-based nanomaterials; Have their unique physicochemical properties made them double-edged swords? Mut. Res. Rev. Mut. Res. 2020; 783, 108296. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108296.

121. Jain, S., Singh, S.R., Pillai, S. Toxicity Issues Related to Biomedical Applications of Carbon Nanotubes: J. Nanomed. Nanotech. 2012; 3(5), http://dx.doi.org/10.4172/2157-7439.1000140.

122. Madani, S.Y., Mandel, A., Seifalian, A.M. A concise review of carbon nanotube's toxicology. Nano Rev. 2013; 4. https://doi.org/10.3402/nano.v4i0.21521.

123. Yan, Y., Wang, G., Luo, X., Zhang, P., Peng, S., Cheng, X., Wang, M., Yang, X. Endoplasmic reticulum stress-related calcium imbalance plays an important role on Zinc oxide nanoparticles-induced failure of neural tube closure during embryogenesis. Environ. Int. 2021; 152, 106495. https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106495.

124. Li, B., Zhang, T., Tang, M. Toxicity mechanism of nanomaterials: Focus on endoplasmic reticulum stress. Sci Total Environ. 2022; 834, 155417. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155417.

125. Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N.H., Arias, C., Lennon, C.J., Kluger, Y., Dynlacht, B.D. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. Mol Cell. 2007; 27, 53–66. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.011.

126. Shafi, A.A., Knudsen, K.E. Cancer and the Circadian Clock. Cancer Res. 2019; 79(15): 3806-3814. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0566.

127. de Assis, L.V.M., Oster, H. The circadian clock and metabolic homeostasis: entangled networks. Cell. Mol. Life Sci. 2021; 78(10), 4563-4587. https://doi.org/10.1007/s00018-021-03800-2.

128. Catalano, F., De Vito, F., Cassano, V., Fiorentino, T.V., Sciacqua, A., Hribal, M.L. Circadian Clock Desynchronization and Insulin Resistance. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2022; 20(1), 29. https://doi.org/10.3390/ijerph20010029.

129. Fekry, B., Eckel-Mahan, K. The circadian clock and cancer: links between circadian disruption and disease pathology. J. Biochem. 2022; 171(5), 477-486. https://doi.org/10.1093/jb/mvac017.

130. Sebti, Y., Hebras, A., Pourcet, B., Staels, B., Duez, H. The Circadian Clock and Obesity. Handb Exp Pharmacol. 2022; 274, 29-56. https://doi.org/10.1007/164_2021_579.

131. Wang, Z., Chen, G. Insights about circadian clock in glioma: From molecular pathways to therapeutic drugs. CNS Neurosci. Ther. 2022; 28(12), 1930-1941. https://doi.org/10.1111/cns.13966.

132. Terajima, H., Yoshitane, H., Ozaki, H., Suzuki, Y., Shimba, S., Kuroda, S., Iwasaki, W., Fukada, Y. ADARB1 catalyzes circadian A-to-I editing and regulates RNA rhythm. Nat. Genet. 2017; 49(1), 146-151. https://doi.org/10.1038/ng.3731.

133. Cox, K.H., Takahashi, J.S. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. J. Mol. Endocrinol. 2019; 63(4), R93-R102. https://doi.org/10.1530/JME-19-0153.

134. Ortega-Campos, S.M., Verdugo-Sivianes, E.M., Amiama-Roig, A., Blanco, J.R., Carnero, A. Interactions of circadian clock genes with the hallmarks of cancer. Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer. 2023; 1878(3), 188900. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.188900.

135. Ma, S., Pang, C., Song, L., Guo, F., Sun, H. Activating transcription factor 3 is overexpressed in human glioma and its knockdown in glioblastoma cells causes growth inhibition both in vitro and in vivo. Int. J. Mol. Med. 2015; 35(6), 1561-1573. https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2173.

136. Wortel, I.M.N., van der Meer, L.T., Kilberg, M.S., van Leeuwen, F.N. Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. Trends Endocrinol. Metab. 2017; 28(11), 794-806. https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.07.003.

137. Tang, Q., Ren, L., Liu, J., Li, W., Zheng, X., Wang, J., Du, G. Withaferin A triggers G2/M arrest and intrinsic apoptosis in glioblastoma cells via ATF4-ATF3-CHOP axis. Cell Prolif. 2020; 53 (1), e12706. https://doi.org/10.1111/cpr.13706.

138. Ku, H.-C., Cheng, C.-F. Master Regulator Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Metabolic Homeostasis and Cancer. Front. Endocrinol. (Lausanne) 2020;11, 556. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00556.

139. Wang, X.M., Liu, X.M., Wang, Y., Chen, Z.Y. Activating transcription factor 3 (ATF3) regulates cell growth, apoptosis, invasion and collagen synthesis in keloid fibroblast through transforming growth factor beta (TGF-beta)/SMAD signaling pathway. Bioengineered. 2021; 12(1), 117-126. https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1860491.

140. Wang, C.M., Yang, W.H., Cardoso, L., Gutierrez, N., Yang, R.H., Yang, W.H. Forkhead Box Protein P3 (FOXP3) Represses ATF3 Transcriptional Activity. Int. J. Mol. Sci. 2021; 22(21), 11400. https://doi.org/10.3390/ijms222111400.

141. Rozpedek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Diehl, J.A., Majsterek, I. The Role of the PERK/eIF2alpha/ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. Curr. Mol. Med. 2016; 16, 533–544. https://doi.org/10.2174/1566524016666160523143937.

142. Gao, S., Ge, A., Xu, S., You, Z., Ning, S., Zhao, Y., Pang, D. PSAT1 is regulated by ATF4 and enhances cell proliferation via the GSK3beta/beta-catenin/cyclin D1 signaling pathway in ER-negative breast cancer. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2017; 36, 179. https://doi.org/10.1186/s13046-017-0648-4.

143. Minchenko, O.H., Tsymbal, D.O., Minchenko, D.O., Moenner, M., Kovalevska, O.V., Lypova, N.M. Inhibition of kinase and endoribonuclease activity of ERN1/IRE1a affects expression of proliferation-related genes in U87 glioma cells. Endoplasm. Reticul. Stress Dis. 2015; 2(1), 18-29. https://doi.org/10.1515/ersc-2015-0002.

144. Minchenko, O.H., Sliusar, M.Y., Khikhlo, Y.P., Halkin, O.V., Viletska, Y.M., Khita, O.O., Minchenko, D.O. Knockdown of ERN1 disturbs the expression of phosphoserine aminotransferase 1 and related genes in glioblastoma cells. Arch Biochem Biophys, 2024, 759: 110104. https://doi.org/10.1016/j.abb.2024.110104.

145. Sliusar, M.Y., Minchenko D.O., Khita O.O., Tsymbal D.O., Viletska Y.M., Luzina, O.Y., Danilovskyi, S.V., Ratushna, O.O., Minchenko, O.H. Hypoxia controls the expression of genes responsible for serine synthesis in U87MG

cells on ERN1-dependent manner. End Reg, 2023, 57(4): 252-261. https://doi.org/10.2478/enr-2023-0028.

146. Minchenko, O.H., Tsymbal, D.O., Minchenko, D.O., Kovalevska, O.V., Karbovskyi, L.L., Bikfalvi, A. Inhibition of ERN1 signaling enzyme affects hypoxic regulation of the expression of E2F8, EPAS1, HOXC6, ATF3, TBX3 and FOXF1 genes in U87 glioma cells. Ukr. Biochem. J. 2015; 87(2), 76–87. https:/dx./doi:10.15407/ubj87.02.076.

147. Tao, J, Gu, P, Lai, H, Peng, H, Guo, Z, Yuan, Y, Yu, X, Shen, X, Liu, J, Xier, Z, Li, G, Yang, Y. TXLNG improves insulin resistance in obese subjects in vitro and in vivo by inhibiting ATF4 transcriptional activity. Mol. Cell. Endocrinol. 2023; 568-569, 111928. https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111928.

148. Barnoud, T., Parris, J.L.D., Murphy, M.E. Common genetic variants in the TP53 pathway and their impact on cancer. J. Mol. Cell. Biol. 2019; 11(7), 578-585. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz052.

149. Akhter, N., Wilson, A., Arefanian, H., Thomas, R., Kochumon, S., Al-Rashed, F., Abu-Farha, M., Al-Madhoun, A., Al-Mulla, F., Ahmad, R., Sindhu, S. Endoplasmic Reticulum Stress Promotes the Expression of TNF-alpha in THP-1 Cells by Mechanisms Involving ROS/CHOP/HIF-1alpha and MAPK/NF-kappaB Pathways. Int. J. Mol. Sci. 2023; 24 (20), 15186. 10.3390/ijms242015186.

150. Minchenko, D.O., Danilovskyi, S.V., Kryvdiuk, I.V., Bakalets, T.V., Lypova, N.M., Karbovskyi, L.L., Minchenko, O.H. Inhibition of ERN1 modifies the hypoxic regulation of the expression of TP53-related genes in U87 glioma cells. Endoplasm. Reticul. Stress Dis., 2014; 1(1), 18-26. https://doi.org/10.2478/ersc-2014-0001.

151. Liu, S., Gao, Q., Li, Y., Lun, J., Yu, M., Zhang, H., Fang, J. XBP1s acts as a transcription factor of IRE1alpha and promotes proliferation of colon cancer cells. Arch. Biochem. Biophys. 2023; 737, 109552. https://doi.org/10.1016/j.abb.2023.109552.

152. Chalmers, F., Mogre, S., Son, J., Blazanin, N., Glick, A.B. The multiple roles of the unfolded protein response regulator IRE1α in cancer. Mol. Carcinog. 2019; 58(9), 1623-1630. https://doi.org/10.1002/mc.23031.

153. Bartoszewska, S., Cabaj, A., Dabrowski, M., Collawn, J.F., Bartoszewski, R. miR-34c-5p modulates X-box-binding protein 1 (XBP1) expression during the adaptive phase of the unfolded protein response. FASEB J. 2019; 33 (10), 11541-11554. https://doi.org/10.1096/fj.201900600RR.

154. Bartoszewska, S., Sławski, J., Collawn, J.F., Bartoszewski, R. Dual RNase activity of IRE1 as a target for anticancer therapies. J. Cell Commun. Signal. 2023; 17, 1145-1161. https://doi.org/1010.1007/s12079-023-00784-5.

155. Donehower, L.A., Soussi, T., Korkut, A., Liu, Y., Schultz, A., Cardenas, M., Li, X., Babur, O., Hsu, T.K., Lichtarge, O., Weinstein, J.N., Akbani, R., Wheeler, D.A. Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas. Cell Rep. 2019; 28(5), 1370-1384.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.001.

156. Tornesello, M.L. TP53 mutations in cancer: Molecular features and therapeutic opportunities (Review). Int. J. Mol. Med. 2025; 55(1), 7. https://doi.org/10.3892/ijmm.2024.5448.

157. Mansur, M.B., Greaves, M. Convergent TP53 loss and evolvability in cancer. BMC Ecol. Evol. 2023; 23(1), 54. https://doi.org/10.1186/s12862-023-02146-6.

158. Pelizzari-Raymundo, D., Maltret, V., Nivet, M., Pineau, R., Papaioannou, A., Zhou, X., Caradec, F., Martin, S., Le Gallo, M., Avril, T., Chevet, E., Lafont, E. IRE1 RNase controls CD95-mediated cell death. EMBO Rep. 2024; 25(4), 1792-1813. https://doi.org/10.1038/s44319-024-00095-9.

159. Moon, H. W., Han, H. G., Jeon, Y. J. Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum and Cancer. Int J Mol Sci. 2018; 19(10), 3020. https://doi.org/10.3390/ijms19103020.

160. Wang, M., Kaufman, R.J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. Nature. 2016; 529(7586), 326–335. https://doi.org/10.1038/nature17041.

161. Pelizzari-Raymundo, D., Doultsinos, D., Pineau, R., Sauzay, C., Koutsandreas, T., Langlais, T., Carlesso, A., Gkotsi, E., Negroni, L., Avril, T., Chatziioannou, A., Chevet, E., Eriksson, L.A., Guillory, X. (2023). A novel IRE1 kinase inhibitor for adjuvant glioblastoma treatment. iScience. 26(5), 106687. https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106687.

162. Pelizzari Raymundo, D., Eriksson, L.A., Chevet, E, Guillory,. X. (2022). Structure-Based Drug Discovery of IRE1 Modulators. Methods Mol Biol. 2378, 293-315. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1732-8_19.

163. 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. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010; 107, 15553–15558. https://doi.org/10.1073/pnas.0914072107.

164. Auf, G., Jabouille, A., Delugin, M., Guérit, S., Pineau, R., North, S., Platonova, N., Maitre, M., Favereaux, A., Vajkoczy, P., Seno, M., Bikfalvi, A., Minchenko, D., Minchenko, O., Moenner, M. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1α and promotes autocrine growth through EGF receptor. BMC Cancer. 2013; 13, 597. https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-597.

165. Zhang, R., Piao, M. J., Kim, K. C., Kim, A. D., Choi, J. Y., Choi, J., Hyun, J. W. Endoplasmic reticulum stress signaling is involved in silver nanoparticles-induced apoptosis. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2012; 44(1), 224–232. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.019.

166. Chen, R., Huo, L., Shi, X., Bai, R., Zhang, Z., Zhao, Y., Chang, Y., Chen, C. Endoplasmic reticulum stress induced by zinc oxide nanoparticles is an earlier biomarker for nanotoxicological evaluation. ACS Nano. 2014; 8(3), 2562–2574. https://doi.org/10.1021/nn406184r.

167. Rezghi Barez, S., Movahedian Attar, A., Aghaei, M. MicroRNA-30c-2-3p regulates ER stress and induces apoptosis in ovarian cancer cells underlying ER stress. EXCLI J. 2021; 20, 922-934. https://doi.org/10.17179/excli2020-2970.

168. Krichevsky, A.M., King, K.S., Donahue, C.P., Khrapko, K., Kosik, K.S. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. RNA. 2003; 9, 1274–1281.

169. Ahmed, S.P., Castresana, J.S., Shahi, M.H. Glioblastoma and MiRNAs. Cancers (Basel). 2021; 13(7), 1581. https://doi.org/10.3390/cancers13071581.

170. Dong, C.G., Wu, W.K., Feng, S.Y., Wang, X.J., Shao, J.F., Qiao, J. (2012). Co-inhibition of microRNA-10b and microRNA-21 exerts synergistic inhibition on the proliferation and invasion of human glioma cells. Int. J. Oncology. 41(3), 1005–1012. https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1542.

171. Yapijakis, C. Regulatory Role of MicroRNAs in Brain Development and Function. Adv. Exp. Med. Biol. 2020; 1195, 237-247. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32633-3_32.

172. Bhattacharya, M., Sharma, A.R., Sharma, G., Patra, B.C., Nam, J.S., Chakraborty, C., Lee, S.S. The crucial role and regulations of miRNAs in zebrafish development. Protoplasma 2017; 254, 17-31. https://doi.org/10.1007/s00709-015-0931-1.

173. Mishima, Y. Widespread roles of microRNAs during zebrafish development and beyond. Dev. Growth Differ. 2012; 54, 55-65. https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2011.01306.x.

174. Feng, W., Feng, Y. MicroRNAs in neural cell development and brain diseases. Sci. China Life Sci. 2011; 54, 1103-1112. https://doi.org/10.1007/s11427-011-4249-8.

175. Gizak, A., Duda, P., Pielka, E., McCubrey, J.A., Rakus, D. GSK3 and miRNA in neural tissue: From brain development to neurodegenerative diseases. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res. 2020; 1867, 18696. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118696.

176. Wang, N., Chen, C., Ren, J., Dai, D. MicroRNA delivery based on nanoparticles of cardiovascular diseases. Mol. Cell. Biochem. 2024; 479(8), 1909-1923. https://doi.org/10.1007/s11010-023-04821-0.

177. Wang, H., Fang, Q., You, S., Wu, Y., Zhang, C. (2023). miRNA-195-5p/PSAT1 feedback loop in human triple-negative breast cancer cells. Genes Genomics. 45, 39-47. https://doi.org/10.1007/s13258-022-01327-9.

178. Petri, B.J., Piell, K.M., Wilt, A.E., Howser, A.D., Winkler, L., Whitworth, M.R., Valdes, B.L., Lehman, N.L., Clem, B.F., Klinge, C.M. MicroRNA regulation of the serine synthesis pathway in endocrine-resistant breast cancer cells. Endocr. Relat. Cancer. 2023; 30(11), e230148. https://doi.org/10.1530/ERC-23-0148.

179. Guo, W., Wu, Z., Chen, J., Guo, S., You, W., Wang, S., Ma, J., Wang, H., Wang, X., Wang, H., Ma, J., Yang, Y., Tian, Y., Shi, Q., Gao, T., Yi, X., Li, C. Nanoparticle delivery of miR-21-3p sensitizes melanoma to anti-PD-1 immunotherapy by promoting ferroptosis. J. Immunother. Cancer. 2022; 10(6): e004381. 10.1136/jitc-2021-004381.

180. Frazier, T.P., Burklew, C.E., Zhang, B. Titanium dioxide nanoparticles affect the growth and microRNA expression of tobacco (Nicotiana tabacum). Funct. Integr. Genomics. 2014; 14(1), 75-83. 10.1007/s10142-013-0341-4.

181. Kim, J., Cote, L.J., Kim, F., Yuan, W., Shull, K.R., Huang, J. Graphene oxide sheets at interfaces. J. Am. Chem. Soc. 2010; 132(23), 8180-8186. https://doi.org/10.1021/ja102777p.

182. Ritter, U., Prylutskyy, Y., Cherepanov, V., Tsierkesos, N. Structure and electrochemical properties of aqueous suspensions of functionalized single- and multi-walled carbon nanotubes. Ukr. J. Phys. 2014; 59(4), 433–438. https://doi.org/10.15407/ujpe59.04.0433.

183. 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. The impact of single walled carbon nanotubes on the expression of microRNA in zebrafish (*Danio*

rerio) embryos. Endocr. Regul. 2022; 56(2): 115-125. https://doi.org/10.2478/enr-2022-0013.

184. Sasai, K., Akagi, T., Aoyanagi, E., Tabu, K., Kaneko, S., Tanaka, S. O6-methylguanine-DNA methyltransferase is downregulated in transformed astrocyte cells: implications for anti-glioma therapies. Mol Cancer. 2007; 6, 36. https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-36.

185. 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. Exposure to nanographene oxide induces gene expression dysregulation in normal human astrocytes. Endocr. Regul. 2022; 56(3), 216-226. doi: 10.2478/enr-2022-0023.

186. Otsuka, T., Matsui, H. Fish Models for Exploring Mitochondrial Dysfunction Affecting Neurodegenerative Disorders. Int. J. Mol. Sci. 2023; 24(8), 7079. https://doi.org/10.3390/ijms24087079.

187. 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. MicroRNAs: protective regulators for neuron growth and development. Neural Regenerat. Res. 2023; 18(4), 734–745. https://doi.org/10.4103/1673-5374.353481.

188. Jiang, T., Amadei, C.A., Gou, N., Lin, Y., Lan, J., Vecitis, C.D., Gu, A.Z. Toxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes (SWCNTs): Effect of Lengths, Functional Groups and Electronic Structures Revealed by a Quantitative Toxicogenomics Assay. Environ. Sci. Nano. 2020; 7(5), 1348–1364. https://doi.org/10.1039/d0en00230e.

189. Alaraby, M., Demir, E., Domenech, J., Velázquez, A., Hernández, A., Marcos, R. In vivo evaluation of the toxic and genotoxic effects of exposure to cobalt nanoparticles using Drosophila melanogaster. Environ. Sci. Nano. 2020; 7, 610-622. https://doi.org/10.1039/C9EN00690G.

190. Asare, N., Duale, N., Slagsvold, H.H., Lindeman, B., Olsen, A.K., Gromadzka-Ostrowska, J., Meczynska-Wielgosz, S., Kruszewski, M., Brunborg, G., Instanes, C. Genotoxicity and gene expression modulation of

silver and titanium dioxide nanoparticles in mice. Nanotoxicology. 2016; 10(3), 312–321. https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1071443.

191. Minchenko, O.H., Kulish, Y.V., Viletska, Y.M., Khita, O.O., Rudnytska, O.V., Kozynkevych, H.E., Minchenko, D.O. The expression of DNAJB9 in normal human astrocytes is more sensitive to nanographene oxide than in glioblastoma cells. Endocr. Regul. 2024; 58(4), 242-251. https://doi.org/10.2478/enr-2024-0029.

192. Minchenko, O.H., Riabovol, O.O., Tsymbal, D.O., Minchenko, D.O., Ratushna, O.O. Effect of hypoxia on the expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells. Ukr. Biochem. J. 2016; 88(3), 54-65. https://doi.org/10.15407/ubj88.03.054.

193. Flavahan, W.A., Drier, Y., Liau, B.B., Gillespie, S.M., Venteicher, A.S., Stemmer-Rachamimov, A.O., Suvà, M.L., Bernstein, B.E. Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. Nature. 2016; 529(7584)б 110-114. https://doi.org/10.1038/nature16490.

194. Grimmer, M.R., Costello, J.F. Cancer: Oncogene brought into the loop. Nature. 2016; 529(7584), 34-35. https://doi.org/10.1038/nature16330.

195. Deng, Y., Fu, H., Han, X., Li, Y., Zhao, W., Zhao, X., Yu, C., Guo, W., Lei, K., Wang, T. Activation of DDX58/RIG-I suppresses the growth of tumor cells by inhibiting STAT3/CSE signaling in colon cancer. Int J Oncol. 2022; 61(4), 120. https://doi.org/10.3892/ijo.2022.5410.

196. Guan, R., Peng, L., Wang, D., He, H., Wang, D., Zhang, R., Wang, H., Hao, H., Zhang, J., Song, H., Sui, S., Meng, X., Cui, X., Bai, J., Sun, W., Fu, S., Yu, J. Decreased TOB1 expression and increased phosphorylation of nuclear TOB1 promotes gastric cancer. Oncotarget. 2017; 8, 75243-75253. https://doi.org/10.18632/oncotarget.20749.

197. Zhao, D., Qiao, J., He, H., Song, J., Zhao, S., Yu, J. TFPI2 suppresses breast cancer progression through inhibiting TWIST-integrin α5 pathway. Mol Med. 2020; 26(1), 27. https://doi.org/10.1186/s10020-020-00158-2.

198. El-Deek, H.E.M., El-Naggar, M.S., Morsy, A.M.M., Sedik, M.F., Osman, H.A., Ahmed, A.M. P4HA2 involved in SLUG-associated EMT predicts poor prognosis of patients with KRAS-positive colorectal cancer. Med. Mol. Morphol. 2024; 57 (3), 167-176. https://doi.org/10.1007/s00795-024-00385-0.

199. 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. Curr. Res. Toxicol. 2021; 2, 64-71. https://doi.org/10.1016/j.crtox.2021.02.001.

200. Wu,Y.X., Lin,Y.S., Li,S.C., Yao,X., Cheng,M., Zhu,L, Liu,H.Y. microRNA-194 is increased in polycystic ovary syndrome granulosa cell and induce KGN cells apoptosis by direct targeting heparin-binding EGF-like growth factor. Reprod. Biol. Endocrinol. 2021; 19, 170. https://doi.org/10.1186/s12958-021-00850-w.

201. 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.

202. Schneider, J., Karpf, J., Beckervordersandforth, R. Role of Astrocytes in the Neurogenic Niches. Methods Mol. Biol. (Clifton, N.J.). 2019; 1938, 19–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9068-9_2.

Додаток 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Rudnytska O.V., Khita O.O., Minchenko D.O., Tsymbal D.O., **Yefimova Y.V. (Kulish 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. Curr. Res. Toxicol. 2021, 2: 64–71. doi: 10.1016/j.crtox.2021.02.001 *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів ZNF395, DJA1 та KRT18 і мікроРНК miR-7-5p, miR-10a-5p, miR-144-5p та miR-150-5p, обробка даних та участь у написанні статті).* Олена Хіта і Мирослава Слюсар допомагали у вивченні експресії *miR-10a-5p та KRT18*. Ольга Рудницька, Дмитро Мінченко та Дарія Цимбал приймали участь в обговоренні отриманих результатів і оформленні статті до друку. Олександр Мінченко керував дослідженнями та подав статтю до журналу. **Scopus і PubMed**

2. Minchenko O.H., Khita O.O., Rudnytska O.V., **Yefimova Y.V. (Kulish Y.V.)**, Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Sliusar M.Y., He Q., Liu K. The impact of single walled carbon nanotubes on the expression of microRNA in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Endocr. Regul. 2022, 56(2): 115-125. doi: 10.2478/enr-2022-0013. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії мікроРНК miR-19a-3p, miR-21-5p і miR-96-5p, обробка результатів та участь в оформленні публікації).* Олена Хіта і Мирослава Слюсар допомагали у вивченні експресії *miR-21-5p*. Ольга Рудницька, Дарія Цимбал та Дмитро Мінченко приймали участь в обговоренні отриманих результатів і оформленні статті для направлення до журналу. Q. He та K. Liu надали можливість О. Мінченку виконати дослідження з ембріонами і дозволили використати отримані препарати РНК для продовження досліджень в ІБХ. Олександр Мінченко керував дослідженнями та подав статтю до друку. **Scopus і PubMed**

3. Rudnytska O.V., **Kulish YV**, Khita O.O., Minchenko D.O., Tsymbal D.O., Viletska Y.M., Sliusar M.Y., Trufanova D.D., Minchenko O.H. Exposure to nanographene oxide induces gene expression dysregulation in normal human astrocytes. Endocr. Regul. 2022, 56(3): 216-226. doi: 10.2478/enr-2022-0023. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PTGS2, P4HA1, і P4HA2, обробка даних та участь у написанні статті).* Олена Хіта і Мирослава Слюсар, а також студентка Дарія Труфанова допомагали у вивченні експресії гена *PTGS2*. Ольга Рудницька, Дмитро Мінченко та Дарія Цимбал приймали участь в обговоренні отриманих результатів і оформленні статті до друку. Олександр Мінченко керував дослідженнями та подав статтю для публікації у журналі. **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 TOB1, DDX58, TFPI2 і P4HA2, обробка даних та участь у написанні статті*). Юлія Вілецька допомагали у вивченні експресії гена *P4HA2 і TFPI2*. Ольга Рудницька, Дмитро Мінченко, Олена Хіта, Олег Галкін, Сергій Даніловський і Оксана Ратушна приймали участь в обговоренні отриманих результатів та оформленні статті. Олександр Мінченко керував дослідженнями, редагував та подав статтю до журналу. **Scopus і PubMed**

5. Minchenko O.H., **Kulish Y.V**., Viletska Y.M., Khita O.O., Rudnytska O.V., Kozynkevych H.E., Minchenko D.O. The expression of DNAJB9 in normal human astrocytes is more sensitive to nanographene oxide than in glioblastoma cells. Endocr. Regul. 2024, 58(4): 242-251. https://doi.org/10.2478/enr-2024-0029. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів DDIT3, ATF3, ATF4, TOB1 і DNAJB9, обробка отриманих результатів та участь у написанні статті*). Юлія Вілецька

допомагала у вивченні експресії генів *EDEM1* і *IDH2*. Олена Хіта, Ольга Рудницька, Дмитро Мінченко та Галина Козинкевич приймали участь в обговоренні отриманих результатів і оформленні статті до друку. Олександр Мінченко керував дослідженнями, редагував статтю та подав її до друку у журналі. **Scopus і PubMed**

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

7. Rudnytska O., **Yefimova Y. (Kulish 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.

8. **Yefimova Y. (Kulish 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.

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

10. **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.

11. Minchenko O.H., **Kulish Y.V**., Rudnytska O.V. Expression of DDX58 and other mRNAs is more sensitive to SWCNTs in normal human astrocytes than U87MG cells. 1st International conference "Enlight Cancer Days", September 28-29, 2023. BRIC, Bordeaux University; Talence, France, 2023: 81.

12. Rudnytska O.V., **Kulish Y.V.**, Khita O.O., Viletska Y.M. The impact of graphene oxide on the expression of endoplasmic reticulum stress-dependent genes is more pronounced in normal human astrocytes than glioblastoma cells. Конференція молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії і біотехнології – 2024». Biotech. acta, 2024, 17 (2): 67-69.

13. Rudnytska O.O., **Kulish Y.V.**, Viletska Y.M., Minchenko O.H. The genotoxic risks of using carbon nanoparticles in the brain tumor treatment. XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists, May 21-22, IMBG, Book of abstracts, Kyiv 2024: 47.

14. **Kulish Y.V.**, Rudnytska O.V., Minchenko O.H. The effect of single-walled carbon nanotubes and nanographene oxide on expression levels of TOB1, PTGS2 and HSPA5 in normal human astrocytes. International Research and Practice Conference "Nanotechnology and Nanomaterials", 21-24 of August, 2024, Uzhhorod: 322-323.