

М. Б. Макарова^{1, 2}, В. О. Ульянов¹, Л. М. Величко², О. В. Богданова²,
Г. І. Дрожжина², Т. Б. Гайдамака², Н. А. Ульянова¹, В. М. Скобеєва³

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА *IN VITRO* НА ЕКСПРЕСІЮ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ АКТИВАЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ ХВОРИХ НА ВІРУСНИЙ КЕРАТИТ

¹ Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна,

² ДУ «Науково-дослідний інститут очних хвороб і тканинної терапії
ім. В. П. Філатова», Одеса, Україна,

³ Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, Одеса, Україна

УДК 345.466-74.867:617.713-007

М. Б. Макарова^{1, 2}, В. А. Ульянов¹, Л. Н. Величко², А. В. Богданова², Г. І. Дрожжина²,
Т. Б. Гайдамака², Н. А. Ульянова¹, В. М. Скобеєва³

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА *IN VITRO* НА ЭКСПРЕССИЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ С ВИРУСНЫМ КЕРАТИТОМ

¹ Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина,

² ГУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней и тканевой терапии
им. В. П. Филатова», Одесса, Украина,

³ Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, Одесса, Украина

В работе исследована экспрессия маркеров активации лимфоцитов и фагоцитарная активность нейтрофилов больных с герпетическим кератитом до и после культивации клеток с наночастицами серебра размером 30 нм *in vitro*. После культивирования с наночастицами серебра экспрессия молекулярных маркеров CD7 увеличилась с (21,1±2,6) до (27,4±1,7) %; CD25 с (19,2±1,1) до (26,8±1,2) % и CD45 с (22,3±1,1) до (31,1±1,8) % (p<0,05). Не обнаружено влияния наночастиц серебра на экспрессию маркеров CD5, CD38, CD54, CD95, CD150. После культивирования с наночастицами серебра фагоцитарная активность нейтрофилов возросла с (58,5±3,9) до (79,4±4,1) % (p<0,05). Таким образом, наночастицы серебра 30 нм *in vitro* вызывают изменение функциональной активности лейкоцитов и лимфоцитов у пациентов с герпетическим кератитом, что выражается в увеличении количества маркеров активации лимфоцитов CD7, CD25, CD45 и фагоцитарной активности нейтрофилов.

Ключевые слова: наночастицы серебра, роговица, вирусный кератит.

UDC 345.466-74.867:617.713-007

М. В. Makarova^{1, 2}, V. O. Uliyanov¹, L. M. Velichko², O. V. Bogdanova², G. I. Drozhzhina²,
T. B. Gaidamaka², N. A. Ulianova¹, V. M. Skobeeva³

THE INFLUENCE OF SILVER NANOPARTICLES *IN VITRO* ON EXPRESSION OF LYMPHOCYTE ACTIVATION MOLECULAR MARKERS IN PATIENTS WITH VIRAL KERATITIS

¹ The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine,

² The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Odessa, Ukraine,

³ Odessa I. I. Mechnikov National University, Odessa, Ukraine

Introduction. Herpetic lesions of the eye is a major cause of infectious corneal blindness. Viral lesion of eyeball surface often has chronic process. Using of traditional drugs does not always provide a positive therapeutic effect and prevents recurrence, determining the relevance of new approaches to the treatment of viral pathologies of the cornea.

Objective. To study the effect of silver nanoparticles *in vitro* on the expression of molecular markers of activation of lymphocytes and the phagocytic activity of neutrophils in patients with herpetic keratitis.

Materials and methods. The research was conducted with 33 patient with herpetic keratitis. It was *in vitro* investigated the expression of molecular markers of activation of lymphocytes (CD 5, CD7, CD25, CD38, CD45, CD54, CD95, CD150) peripheral blood and phagocytic activity of neutrophils before and after cultivation with a colloidal solution of 30 nm silver nanoparticles.

Results. After cultivation with silver nanoparticles the expression of molecular markers CD7 increased from (21.1±2.6) up to (27.4±1.7)%; CD25 from (19.2±1.1) up to (26.8±1.2) and CD45 from (22.3±1.1) up to (31.1±1.8)% (p<0.05). It was not found silver nanoparticles influence on the expression of markers CD5, CD38, CD54, CD95, CD150. After cultivation with silver nanoparticles phagocytic activity of neutrophils increase from (58.5±3.9)% up to (79.4±4.1)% (p<0.05).

Conclusion. Silver nanoparticles of 30 nm *in vitro* cause the change of the functional activity of leukocytes and lymphocytes in patients with herpetic keratitis, as reflected in the increasing of lymphocyte activation markers expression CD7, CD25, CD45 and phagocytic activity of neutrophils.

Key words: silver nanoparticles, cornea, viral keratitis.



Герпетичне ураження ока — основна причина інфекційної рогівкової сліпоты [1], вірусні ураження поверхні очного яблука часто набувають характеру хронічного процесу [2]. Використання традиційних медикаментозних засобів не завжди забезпечує позитивний лікувальний ефект і запобігає виникненню рецидивів [3], що визначає актуальність пошуку нових підходів до терапії вірусної патології рогівки.

Перспективною може бути розробка препаратів на основі наночастинок срібла для лікування вірусного кератиту. Наночастинки срібла мають імуномодулюючу дію, встановлено, що, залежно від дози і розміру частинок, наносрібло може як стимулювати, так і пригнічувати фагоцитарну активність нейтрофілів [4; 5], змінювати функціональну активність лімфоцитів [6], впливати на перебіг запального процесу [7]. Доведено протівірусні властивості наночастинок срібла [8; 9], серед яких здатність пригнічувати життєдіяльність вірусу герпесу [10]. Разом з тим, з огляду на високу проникну здатність наночастинок, не всі автори поділяють думку про повну безпеку їх застосування в медицині [11–13], що потребує подальших досліджень ефективності та безпеки застосування наноматеріалів при лікуванні захворювань ока, у тому числі вірусного кератиту.

Метою роботи було вивчення впливу *in vitro* наночастинок срібла на експресію молекулярних маркерів активації лімфоцитів CD7, CD25, CD38, CD45, CD54, CD95, CD150 та маркера автоімунного процесу CD5, а також на фагоцитарну активність нейтрофілів у хворих на герпетичний кератит.

Матеріали та методи дослідження

Клінічні та лабораторні дослідження проведені на базі відділення патології рогівки ока,

лабораторії імунології ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України» за умов інформованої згоди пацієнтів. Під спостереженням перебували 33 хворих на постпервинний герпетичний кератит, везикулярна форма, віком 25–45 років. Пацієнти скаржилися на біль, сльозотечу та світлочутливість. При обстеженні спостерігалось слабе почервоніння ураженого ока, набряклість рогівки та невеликі пухирці на її поверхні. Взяття крові у хворих проводили на третій день клінічних проявів хвороби. *In vitro* досліджували експресію молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові до та після культивування з наночастинками срібла гістоімуноцитохімічним методом [14], фагоцитарну активність нейтрофілів. Оцінка рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові проводилася з використанням панелі моноклональних антитіл CD5+ (серія M-III), CD7+ (серія A-0), CD25+ (серія 25 A1-I), CD38+ (серія I-p), CD45+ (серія CC-1), CD54+ (серія I-B), CD95+ (серія A-0I) і CD150+ (серія A-0I), розроблених в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Для визначення впливу наночастинок срібла на функціональні властивості лімфоцитів хворих на герпетичний кератит лімфоцити культивували з наночастинками срібла розміром 30 нм протягом 1 год при 37 °С, після чого визначали експресію молекулярних маркерів їх активації [15]. Колоїдний розчин наночастинок срібла сферичної форми розміром 30 нм, концентрацією 0,2 мг/мл синтезували на базі НДІ фізики Одеського національного університету ім. І. І. Мечникова цитратним методом [16].

Статистична обробка отриманих даних проведена за допомогою дисперсійного аналізу, у разі якщо нульова гіпотеза відкидалася, застосовували критерій Ньюмена — Кейлса.

Результати дослідження та їх обговорення

Результати, отримані при вивченні зміни рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові у хворих на вірусну патологію рогівки після культивування лімфоцитів з наночастинками срібла, виявили достовірні відмінності за низкою показників (табл. 1). Проведені дослідження показали, що рівень експресії молекулярного маркера активності лімфоцитів CD7 збільшився на 29,9 %

Таблиця 1

Рівень експресії маркерів активованих лімфоцитів у хворих на вірусний кератит до та після культивування з наночастинками срібла, n=33, M±m, %

Маркер активації лімфоцитів	Група дослідження	
	до культивування	після культивування
CD5+	26,9±2,0	25,8±1,2
CD7+	21,1±2,6	27,4±1,7*
CD25+	19,2±1,1	26,8±1,2*
CD38+	25,7±1,4	26,9±1,3
CD45+	22,3±1,1	31,1±1,8*
CD54+	33,9±1,9	36,2±2,1
CD95+	26,9±1,5	25,9±1,4
CD150+	21,7±1,3	23,1±1,4

Примітка. * — $p < 0,05$ порівняно з лімфоцитами до культивування з наночастинками срібла.



після культивування з наночастинками срібла. Відомо, що CD7 експресований на тимоцитах, зрілих Т-клітинах, NK-клітинах, поліпотентних гемопоетичних стовбурових клітинах, лімфоїдних клітинах-попередниках. Функціонує як костимуляторна молекула, індуктор секреції цитокінів, модифікатор адгезії клітин. Активація субпопуляцій лімфоцитів, що експресують антигени CD7, свідчить про збільшення загальної напруженості імунітету у хворих на вірусний кератит, причому зміна даного показника в процесі лікування вказує на зростання резистентності організму [17].

Після культивування лімфоцитів з наночастинками срібла експресія CD25 зростала на 39,5 %. Маркер активації лімфоцитів CD25 функціонує як рецептор інтерлейкіну-2. Підвищення рівня експресії антигену CD25 свідчить про активацію у хворих на герпетичний кератит Т-лімфоцитів, які беруть участь у специфічній імунній відповіді. Після культивування лімфоцитів з наночастинками срібла відбувається вірогідне збільшення рівня експресії CD45 на 34,4 %. Як і CD7, рівень експресії CD45 відображає загальну напруженість імунітету. Підвищення цих показників, імовірно, зумовлене наявністю дистрофічного процесу в організмі та вказує на подальше посилення проліферації лімфоцитів, яка призводить до дозрівання клону специфічно активованих лімфоцитів, а отже, до активації імунної реакції [11].

Вивчення впливу наночастинок срібла на фагоцитарну активність нейтрофілів показало її значуще збільшення з (58,5±±3,9) до (79,4±4,1) % (p<0,05). Зростання фагоцитарної активності нейтрофілів також спостерігали в попередній роботі з вивчення впливу наночастинок срібла на місцевий імунітет ока за умов моделювання бактеріального кератиту [4]. Даний

ефект доводить імуномодуючу дію наночастинок срібла щодо нейтрофілів. Іншими авторами показано, що нанодисперсні системи можуть на клітинному рівні вибірково діяти на запальний процес, при цьому головною мішенню регулюючої дії наночастинок є саме макрофаги [7]. Отже, імуномодуюча дія наночастинок срібла нами відмічена як до лімфоїдних клітин, так і до нейтрофілів.

Вивчення впливу наночастинок срібла на рівень експресії молекулярного маркера аутоімунного процесу CD5 та молекулярного маркера апоптозу CD95 показало, що наночастинки срібла значущо не змінювали їх експресію. Рівень експресії на лімфоцитах периферичної крові маркерів активації лімфоцитів CD38, CD54 і CD150 після культивування лімфоцитів з наночастинками срібла також значущо не змінювався.

Висновки

Наночастинки срібла розміром 30 нм *in vitro* змінюють функціональну активність лімфоцитів і лейкоцитів хворих на герпетичний кератит, що виявляється зростанням експресії маркерів активації лімфоцитів CD7, CD25, CD45 і фагоцитарної активності нейтрофілів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Farooq A. V. Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update / A. V. Farooq, D. Shukla // *Surv Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 57, № 5. – P. 448–462.
2. Дрожжина Г. И. Особенности клинического течения и лечения кератита, вызванного вирусом *Varicella Zoster* / Г. И. Дрожжина, Т. Б. Гайдамака // *Офтальмологический журнал.* – 2012. – № 1. – С. 9–14.
3. Дрожжина Г. И. Определение тяжести поражения роговицы у больных с персистирующими эпителиальными дефектами, торпидными язвами и при нарушении регенерации роговицы после кератопластики / Г. И. Дрожжина, Л. Ф. Тройченко, Е. И. Драгомирецкая // *Офтальмологический журнал.* – 2013. – № 2. – С. 5–10.

4. *Влияние* курсовых инстилляций наночастиц серебра размером 30 нм на местный иммунитет здорового глаза и на модели бактериального кератита у кроликов / В. А. Ульянов, М. Б. Макарова, Л. Н. Величко [и др.] // *Філатовські читання* — 2016 : наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвячена 80-річчю з дня заснування Інституту очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України; XIV конгрес офтальмологічного товариства країн Причорномор'я, Одеса, 19–20 травня 2016 р. : матеріали. – Одеса : ТЕС, 2016. – С. 33–34.

5. *Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches* / X. F. Zhang, Z. G. Liu, W. Shen, S. Gurunathan // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17, № 9. – P. 1534.

6. *Влияние* наночастиц серебра на местный иммунитет глаза при моделировании бактериального кератита / В. А. Ульянов, М. Б. Макарова, Л. Н. Величко [и др.] // *Одесский медицинский журнал.* – 2016. – № 6. – С. 32–38.

7. Мовчан Б. А. Нанотехнологии на службе офтальмологии / Б. А. Мовчан // *Глаз.* – 2007. – № 5. – С. 7–13.

8. *Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications* / L. Wei, J. Lu, H. Xu [et al.] // *Drug Discov Today.* – 2015. – Vol. 20, № 5. – P. 595–601.

9. *Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches* / X. F. Zhang, Z. G. Liu, W. Shen, S. Gurunathan // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17, № 9. – P. 1534.

10. *Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3* / S. Gaikwad, A. Ingle, A. Gade [et al.] // *Int. J. Nanomed.* – 2013. – № 8. – P. 4303–4314.

11. *Ahamed M.* Silver nanoparticle applications and human health / M. Ahamed, M. Alsalmi, M. Siddiqui // *Clinica chimica acta.* – 2011. – № 411. – P. 1841–1848.

12. *Tang J.* Status of biological evaluation on silver nanoparticles / J. Tang, T. Xi // *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* – 2008. – Vol. 25, № 4. – P. 958–961.

13. *Histopathological effects of nanosilver (Ag-NPs) in liver after dermal exposure during wound healing* / Mohammad Saeed Heydarnejad, Parisa Yarmohammadi-Samani, Mohsen Mobini Dehkordi [et al.] // *Nanomedicine Journal.* – 2014. – Vol. 1. – Iss. 3. – P. 191–197.

14. *Величко Л. Н.* Изучение влияния препарата Амиксин на рецептор-



ный аппарат лимфоцитов периферической крови больных увеальной меланомой / Л. Н. Величко, А. В. Богданова // Офтальмологический журнал. – 2015. – № 1. – С. 68–74.

15. Пат. 105223 Україна, МПК (2016.01): А61К 33/00, А61Р 37/00, G01N 33/50 Спосіб визначення рецептормодифікуючого впливу наночасток срібла на маркери активації лімфоїдних клітин / Ульянов В. О., Величко Л. М., Богданова О. В., Макарова М. Б.; заявник та патенто-власник ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України». – № u201508422; заявл. 27.08.2015; опубл. 10.03.2016, Бул. № 5.

16. Влияние внешних факторов на стабильность оптических свойств наночастиц серебра / В. А. Смынтыва, В. М. Скобеева, Н. К. Воробьев [и др.] // Сенсорна електроніка і мікросистемні технології. – 2012. – № 3 (9). – С. 134–140.

17. Дегтяренко Т. В. Изучение состояния иммунологической реактивности организма в динамике воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения различных диапазонов спектра на зрительный анализатор у больных с макулодистрофией / Т. В. Дегтяренко, А. В. Богданова // Буковинський медичний вісник. – 2011. – Т. 15, № 3. – С. 22–28.

18. Дегтяренко Т. В. Изменение функциональной активности рецепторного аппарата иммунокомпетентных клеток при воздействии in vitro низкоинтенсивного лазерного излучения различных диапазонов спектра у больных с макулодистрофией / Т. В. Дегтяренко, А. В. Богданова // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2011. – № 4 (26). – С. 89–96.

19. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація / І. С. Чекман, З. Р. Ульберг, В. О. Маланчук [та ін.]. – К.: Поліграф плюс, 2012. – 328 с.

REFERENCES

1. Farooq A.V., Shukla D. Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update. *Surv Ophthalmol* 2012; 57 (5): 448-462.
2. Drozhzhina G.I., Gaidamaka T.B. The peculiarities of the clinical course and treatment of Varicella Zoster. *Oftalmologicheskii zhurnal* 2012; 1: 9-14.
3. Drozhzhina G.I., Troychenko L.F., Dragomiretskaya E.I. Determination of affection severity (cornea) in patients with persisting epithelial defects, torpid ulcers and disturbance of the cornea regeneration after keratoplasty. *Oftalmologicheskii zhurnal* 2013; 2: 5-10.
4. Ulianov V.A., Makarova M.B., Velichko L.M., Bogdanova O.V., Haida-

ma T.B., Skobeeva V.M. Effect of exchange rate instillation of silver nanoparticles 30 nm in the local immunity of the healthy eye and in a model of bacterial keratitis in rabbits. *Filatovs'ki chytannya — 2016 : nauk.-prakt. konf. z mizhnar uchastyu, prysvyachena 80-richchu z dnya zasnuvannya Instytutu ochnykh khvorob i tkanynoi terapii im. V. P. Filatova NAMN Ukrainy; XIV kongress oftalmologichnogo tovarystva krain Prychornomor'ya: materialy* (Filatov memorial lectures — 2016 : Scientific-practical conference with international participation, dedicated to the 80th anniversary since the founding of the "Filatov institute of eye diseases and tissue therapy of the academy of medical science of Ukraine" XIV Congress of Ophthalmologic Association of Black Sea countries, Odessa, May, 19–20, 2016), Odessa: TEC, 2016, p. 33-34.

5. Zhang X.F., Liu Z.G., Shen W., Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 2016; 17 (9): 1534.

6. Ulianov V.A., Makarova M.B., Velichko L.N., Bogdanova A.V., Gaydamaka T.B., Skobeeva V.M. The influence of silver nanoparticles on the local immunity of the eye by modeling bacterial keratitis. *Odes'kyi medychny zhurnal* 2016; 6: 32-38.

7. Movchan B.A. Nanotechnology in the service of ophthalmology. *Glaz* 2007; 5: 7-13.

8. Wei L., Lu J., Xu H., Patel A., Chen Z.-S., Chen G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discov Today* 2015; 20 (5): 595-601.

9. Zhang X.F., Liu Z.G., Shen W., Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17 (9): 1534.

10. Gaikwad S., Ingle A., Gade A., Rai M., Falanga A., Incoronato N., Russo L., Galdiero S., Galdiero M. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *Int. J. Nanomed.* 2013; 8: 4303-4314.

11. Ahamed M., Alsalmi M., Siddiqui M. Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica chimica acta* 2011; 411: 1841-1848.

12. Tang J., Xi T. Status of biological evaluation on silver nanoparticles. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2008; 25 (4): 958-961.

13. Mohammad Saeed Heydarnejad, Parisa Yarmohammadi-Samani, Mohsen Mobini Dehkordi, Mohammad Shadkhast, Samira Rahnama Histo-

pathological effects of nanosilver (Ag-NPs) in liver after dermal exposure during wound healing. *Nanomedicine Journal* 2014; 1 (3): 191-197.

14. Velichko L.N., Bogdanova A.V. Study of the influence of the drug amixin in vitro on the level of expression of lymphocyte activation markers in the peripheral blood of patients with uveal melanoma. *Oftalmol Zh* 2015; 1: 68-74.

15. Ulianov V.O., Velichko L.M., Bohdanova O.V., Makarova M.B. Pat. 105223 Ukraine, IPK (2016. 01): A61K 33/00, A61P 37/00, G01N 33/50. Method for assessing receptor modifying effect of silver nanoparticles in lymphoid cells. The applicant and patentee SI "Filatov Institute of eye diseases and tissue therapy of the academy of medical science of Ukraine" № u201508422; stated 27.08.2015; published 10.03.2016, Bul. № 5.

16. Smyntyna V.A., Skobeeva V.M., Vorobyov N.K. The influence of external factors on the stability of the optical properties of silver nanoparticles. *Sensorna elektronika i mikrosistemni tehnologii* 2012; 3(9): 134-140.

17. Degtyarenko T.V., Bogdanova A.V. A study of the body's immunologic reactivity state in the dynamics of the effect of low-intensity laser radiation of different spectrum ranges on the visual analyzer. *Bukovynskyy medychnyy visnyk* 2011; 15 (3): 22-28.

18. Degtyarenko T.V., Bogdanova A.V. Functional activity of immunological cells receptors of influence laser radiation of various diapasons in vitro at patient with macular degeneration. *Aktualnye problemy transportnoy meditsyny* 2011; 26 (4): 89-96.

19. Chekman I.S., Ulberg Z.R., Malanchuk V.O., Gorchakova N.O., Zupansets I.A. *Nanonauka, nanobiologiya, nanofarmatsiya* [Nanosciences, Nanobiology, Nanopharmaceutics]. Kyiv, Poligraf plyus, 2012. 328 p.

Надійшла 25.04.2017

