

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА  
ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

К.б.н Нипорко Олексій Юрійович

Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_\_\_\_ р.

**ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИВІРУСНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СРІБНИХ  
НАНОЧАСТИНОК НА ПРИКЛАДІ ВІРУСУ ЕПШТЕЙНА БАРРА**

Випускна кваліфікаційна робота магістра  
студента спеціальності

162 Біотехнології та біоінженерія

**Тимченко Анастасії Володимирівни**

Науковий керівник від кафедри

Завідувач кафедри теоретичних основ

високих технологій

**Проф., д.ф-м.н. Лозовський Валерій Зіновійович**

Науковий керівник

Завідувач відділом репродукції вірусів

Інститут Мікробіології та Вірусології НАН України

**К.б.н Завгородня Світлана Дмитрівна**

Оцінка захисту роботи

---

Київ 2022 р.

## АНОТАЦІЯ

Тимченко А.В. Дослідження антивірусних властивостей срібних наночастинок на прикладі вірусу Епштейна-Барра. - Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 163 Біотехнології та біоінженерія.

Досліджено 4 типи наночастинок срібла, які відрізняються умовами синтезу. Дослідження наночастинок проводились з їх розведенням від початкової концентрації. Метою досліджень було виявлення або спростування противірусної дії на прикладі вірусу Епштейна-Барра. Зроблено припущення про механізм противірусної дії срібних наночастинок виходячи з результатів експериментів : real-time qPCR. Також додатково були проведені експерименти щодо життєздатності клітин та цитотоксичності при тих же розведеннях наночастинок. Найбільше відсоткове зниження вірусної ДНК (73,42%) спостерігалось при тисячократному розведенні. При цьому, серед деяких наночастинок і при деяких розведеннях спостерігалось і відсоткове збільшення вірусної ДНК. В подальшому в роботі робиться припущення щодо причин виникнення таких ефектів. Отримані результати можуть бути використані для подальших досліджень наночастинок в області вірусології та мікробіології, а також в перспективі розробки новітніх антивірусних засобів.

**Ключові слова:** вірус Епштейна-Барр, герпесвіруси, наночастинок срібла, цитотоксичність

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	4
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури .....	5
1.1. Антивірусні властивості наночастинок. ....	5
1.1.1 Антивірусна активність квантових точок (QD) на прикладі нанокластерів Ag <sub>2</sub> S .....	9
1.1.2 Механізм антивірусної дії графен-оксиду .....	10
1.2. Характеристика вірусу Епштейна-Барр .....	11
1.3 Підходи до лікування патологій, пов'язаних з вірусом Епштейна- Барр .	16
РОЗДІЛ 2. Експериментальна частина .....	19
2.1 Матеріали та методи .....	19
2.2. Дослідження антивірусної дії срібних наночастинок методом ПЛР .....	23
РОЗДІЛ 3. Обговорення результатів експерименту .....	34
3.1 Аналіз даних експерименту .....	34
ВИСНОВКИ .....	38
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	40

## ВСТУП

Вірус Епштейна Барр відносять до родини  $\gamma$  герпес-вірусів. Він є одним з найбільш розповсюджених вірусів на планеті (близько 90% населення є носіями вірусу)[1]. Вірус є онкогенним  $\gamma$ -герпесвірусом людини, часто асоційований з різними В-клітинними злоякісними пухлинами, такими як. Лімфома Беркітта, В-клітинна лімфома, карцинома носоглотки через його тропізм щодо В-клітин та кількох видів епітеліальних клітин [2,3]. Виділяють також другий вид вірусу Епштейна Барр що має тропізм і до Т-клітин. Життєвий цикл вірусу умовно можна поділити на активну та “пасивну” імуносупресивну стадію. Варто зазначити що саме під час “пасивної” стадії вірус не може бути поміченим імуною системою, і у випадку імуносупресивних пацієнтів може викликати трансформацію В-клітин. В асоційованих з вірусом Епштейна Барра онкоклітинах спостерігається лімітована до “латентної програми” експресія генів без активної реплікації вірусу[3]. “Літична” стадія реплікації вірусу супроводжується виходом вірусних часток поза межі клітини і є необхідною для передачі вірусу до наступного хазяїна. Реактивація літичної стадії потребує експресії генів вірусних трансактиваторних білків BZLF1 (Zta) та BRLF1 (Rta). Відомо, що деякі хімічні та біологічні агенти можуть активувати літичну стадію реплікації вірусу. Наразі немає вакцини або ефективного лікування злоякісних пухлин етимологія яких пов’язана з вірусом Епштейна-Барра, але одним із можливих методів лікування може бути активація цитолітичної стадії життєвого циклу вірусу [4].

Противірусна активність наночастинок срібла широко досліджувалась щодо різних вірусів, включаючи вірус Епштейна Барра. Противірусні механізми nAg можуть бути різними, серед них: пряма взаємодія з поверхневими глікопротеїнами вірусу, фізична інактивація вірусних частинок, конкуренція за зв’язування вірусу з клітиною-господарем або інтеркаляція наночастинок з вірусною дволанцюговою ДНК. Також можливе припущення, що взаємодія наночастинок срібла з вірусом Епштейна Барра

може активізувати літичну стадію реплікації вірусу викликаючи імунну відповідь[5].

## РОЗДІЛ 1. Огляд літератури

### 1.1. Антивірусні властивості наночастинок.

Для реплікації та життєдіяльності віруси використовують клітини хазяїна. Вірусну інфекцію загалом поділяють на шість етапів : прикріплення до клітини, проникнення в клітину, вивільнення нуклеокапсиду від оболонки, реплікація, збір вірусних частинок та вихід з клітини. Специфічність вірусів до клітини чітко визначається структурою рецептора клітини хазяїна. Віруси прикріплюються до специфічного рецептора на мембрані клітини хазяїна за допомогою білків капсиду або глікопротеїнів, вбудованих в вірусну оболонку. Віруси тварин та деяких рослин можуть потрапляти в клітину шляхом ендоцитозу, при цьому весь вірус оточений фрагментом клітинної мембрани. Потрапляючи в клітину хазяїна вірусний капсид руйнується і це призводить до вивільнення вірусного генетичного матеріалу в цитоплазму. Після цього розпочинається механізм реплікації який залежить від виду вірусного геному (ДНК-віруси, РНК-віруси, ретровіруси) Останнім етапом вірусної реплікації є вихід нових віріонів які здатні інфікувати інші клітини хазяїна і повторити цикл реплікації. Процес вірусної реплікації може викликати патологічні зміни в клітинах хазяїна та/або призвести до їх руйнування. [8].

Механізми антивірусної активності наночастинок досліджується загалом на двох типах наночастинок: функціоналізованих органічними молекулами (полімерами) або нефункціоналізованих наночастинок. Різні типи наночастинок можуть оптимізувати таргетну доставку відомих антивірусних речовин, інгібувати зв'язування вірусу з чутливою клітиною шляхом блокування рецептора на поверхні вірусу або клітини, змінювати структуру рецептора, або ж діяти всередині чутливої клітини ускладнюючи реплікацію вірусного геному. Наприклад, адсорбуючись на поверхні вірусу, наночастинка призводить до локальних трансформацій на поверхні, таких як, наприклад аглютинація глікопротеїнів вірусу, які вважаються ключовими у зв'язуванні з чутливою клітиною. Антивірусна активність наночастинок залежить від наступних

факторів : будови і структури наночастинок та мішені, на яку націлені наночастинок, часу експозиції, стадії вірусного життєвого циклу, тощо. Результати дослідження показали, що наночастинок меншого розміру проявляють більш інтенсивну антивірусну активність ніж ті які мають більший розмір[16]. Поясненням цього може бути ефект підсилення локального поля, що виникає поблизу поверхні вірусу та наночастинок. Внаслідок ефекту градієнт поля на поверхні вірусної частинки стає сильнішим. Таким чином, адсорбція наночастинок на поверхні вірусу є головною умовою для антивірусної активності наночастинок. Фундаментальною характеристикою адсорбції є адсорбційний потенціал. Адсорбційний потенціал складається з атрактивної та репульсивної частин, що є причиною формування стабільної конфігурації між двома наночастинками (наночастиною та власне вірусом). Коли на одному нано-об'єкті через флуктуації виникає неоднорідний розподіл електричного заряду, то на протилежному об'єкті миттєво зв'являється індуковане електричне поле, що і є причиною виникнення взаємодії. Стабільні конфігурації між вірусом та наночастиною формуються на відстані співрозмірної з лінійним розміром наночастинок (тобто 1-10 нм). В такому випадку, хімічні зв'язки між наночастиною та поверхнею вірусу не утворюються. Тоді, в системі з двох наночастинок може виникнути ефект підсилення локального поля який може індукувати "гарячі точки" на поверхні вірусу внаслідок високих градієнтів індукованого електричного поля. Внаслідок цього можлива зміна конформації вірусних глікопротеїнів або клітинних рецепторів, що є принципово важливим для проникнення вірусу в клітину. Ця ідея добре узгоджується з експериментальними даними, але все ж потребує подальших досліджень.

Розглянемо один з антивірусних механізмів який пов'язаний з локальним полем на рецептори на поверхні вірусу. Явища, продемонстровані наночастинками у середовищі з вірусами, відбуваються всередині багатокомпонентного колоїдного розчину, що має особливості електроліту. Вплив наночастинок на інфекційну активність вірусів складається як з польових

(фізичних) впливів, так і з біохімічних процесів. За будь-яких обставин польовий(фізичний) механізм діє на початковій стадії взаємодії наночастинки з вірусом. Як було згадано вище, наночастинка та вірус утворюють стабільну конфігурацію. Тоді можуть мати місце два сценарії.

1. Оскільки потенціал взаємодії має мінімум на відстані між наночастинкою та вірусом порядку розміру наночастинок, між вірусом і наночастинкою немає хімічних зв'язків. Тоді можна припустити [11, 13–15], що пригнічення вірусної активності в основному зумовлене фізичними ефектами. Наприклад, під дією посиленого локального поля на поверхні вірусу його рецепторні молекули можуть втратити здатність проникати крізь клітинну мембрану.

2. Мінімум адсорбційного потенціалу наночастинок на поверхні вірусу знаходиться на невеликій відстані від поверхні вірусу. Наночастинка може наблизитися до поверхні вірусу на відстані, на якій відбуваються хімічні зв'язки. В такому випадку можуть відбуватися фотокаталітичні реакції між наночастинами та рецепторами на поверхні вірусу, в результаті чого рецептори пошкоджуються або руйнуються [38]. Дія наночастинок може також передаватися всередині клітини, блокуючи, наприклад, реплікацію вірусної ДНК (РНК) [39] і тим самим знижувати інфекційну активність вірусу[6].

Таблиця 1.1 Типові антивірусні механізми(ефекти) наночастинок

Тип наноматеріалу	Вірус	Механізм (ефект)	Джерело
Оксид графену	Респіраторно-синцитіальний вірус	Пряма інактивація вірусу, інгібування прикріплення до клітини	[9]
Срібні наночастинки	Вірус простого герпесу	Вплив на прикріплення до чутливої клітини	[10]
Золоті наночастинки	Вірус простого герпесу	Запобігання прикріплення і проникнення до чутливої клітини	[11]
Ag <sub>2</sub> S нанокластери	Коронавірус	Блокування синтезу вірусної РНК та	[12]

		відпочковування від клітини хазяїна	
Нано-оксид цинку	H1N1	Зниження вірусного навантаження після проникнення вірусу в клітину	[13]
Нано-оксид міді	Вірус простого герпесу	Окиснення вірусних білків і деградація геному	[14]
Si наночастинки saliphenylhalamide (SaliPhe) loaded	Вірус грипу А	Зниження вірусного навантаження	[15]

### **1.1.1 Антивірусна активність квантових точок (QD) на прикладі нанокластерів $Ag_2S$**

На сьогоднішній день квантові точки (Qantum Dots, QD) успішно застосовуються в області медичної візуальної діагностики через їх особливі оптичні та електричні властивості, які сильно залежать від лінійних розмірів частинки. Авторами було проведено дослідження антивірусної дії малотоксичних квантових точок (нанокластерів срібла  $Ag_2S$ ). Механізм антивірусної дії нанокластерів срібла відрізняється від механізму дії інших функціоналізованих наночастинок. Результати експериментів показали, що нанокластери срібла  $Ag_2S$  інгібують синтез вірусної негативно зарядженої РНК а також вихід вірусу з клітини. Також вірус позитивно регулює генерацію IFN-стимульованих генів та експресію протизапальних цитокінів, що може запобігти зараженню вірусом епідемічної діареї свиней (PEDV). Нанокластери срібла також мають інгібуючий ефект серед інших РНК-вірусів, таких як вірус репродуктивного та респіраторного симптому свиней.

### **1.1.2 Механізм антивірусної дії графен-оксиду**

Окрім біомедичного застосування графен оксиду, також широко досліджувалась його антивірусна дія. Було показано, що оксид графену може ефективно інгібувати патогенний агент EV71 та ендемічний вірус пташиного грипу А штаму H9N2 в залежності від температури. Так, за кімнатної температури 25°C дезінфікуючий ефект був слабким, при фізіологічній температурі 37°C ефект посилювався, а при підвищенні температури до 56°C ефект інактивації був набагато вищий[18]. Варто зазначити, що результати досліджень були отримані для графену без жодної додаткової модифікації. Антивірусний ефект може бути заснований на фізико-хімічній взаємодії поверхні оксиду графену та поверхні капсиду вірусу, а також його оболонки. Нагрівання є ефективним способом посилення ефектів інкапсуляції вірусу та денатурації вірусних білків завдяки властивостям переносу електронів і переносу енергії графен оксиду. При температурі 56 °C деградація EV71 не була чітко помітною на протязі 15 хвилин, в той час як з використанням графен оксиду вірус не детектувався після 5 хвилин обробки. Вірус пташиного грипу H9N2 зберігав нативну структуру на протязі 30 хвилин за температури 56°C в той час як обробка оксидом графену при тій самій температурі знищила вірус за 5 хвилин.

## 1.2. Характеристика вірусу Епштейна-Барр

Вірус Епштейна Барра є одним із найпоширеніших герпес-вірусів людини. Він відноситься до родини гамма герпесвірусів 4 типу і проявляє тропізм до В-клітин та деяких видів недиференційованих епітеліальних клітин. Також виділяють вірус 2-го типу, що здатний вражати і Т-клітини. Вірусний тропізм реалізується за допомогою восьми глікопротеїнів з яких найбільш відомими є gp350/220[7]. Особливістю гамма герпесвірусів є те, що вони здатні підтримувати латентну стадію інфекції в клітині, водночас викликаючи їх проліферацію. В більшості випадків проліферативних захворювань, пов'язаних з вірусом Епштейна Барр експерсія генів вірусу обмежена, активна реплікація вірусу не спостерігається. В таких випадках геном вірусу існує в окремих онко-клітинах в латентній (епісомальній) формі, і реплікується під час кожного циклу використовуючи ДНК-полімеразу хазяїна. Детекція латентної епісомальної ДНК вірусу може бути використана для визначення клональності пухлини та вірусу і розглядається як доказ ранньої участі вірусу Епштейна Барра у розвитку пухлини. Початкова фаза прикріплення вірусу до поверхні В-клітини відбувається завдяки взаємодії вірусного глікопротеїну gp350/gp220 та клітинного цитокінового рецептору CD21 (або альтернативного CD 35 на CD21 негативних клітинах)[19]. Вірус потрапляє до клітини шляхом мікропіноцитозу та ендоцитозу. Життєвий цикл вірусу можна умовно поділити на дві стадії: латентна стадія, літична стадія. Латентна стадія характеризується експресією обмеженої кількості вірусних білків, які специфічні до типу клітини хазяїна (6 ядерних білків EBV (EBNA1 - 6), 3 мембранних білка (LMP1, LMP2A, LMP2B) ) та дві невеликі нетрансльовані молекули ядерної РНК (EBER1 та EBER2). Виділяють декілька типів(програм) латентної інфекції які відрізняються транскрипційним профілем. In vitro, іморталізація В-клітин опосередкована програмою вірусної латентності III під час якої транскрибуються всі шість нуклеарних антигенів вірусу (EBNAs 1, 2, 3A,

3В, 3С, -LP), три латентні мембранні протеїни (LMPs 1, 2А, 2В) та вірусні некодуєчі РНК (EBERs, miRNAs, BARTs). Безперервна та обмежена експресія латентних генів, яка пов'язана з програмою росту, відповідає за підтримання високого рівня Т-клітинної пам'яті до інфікованих клітин. Пригнічена функція Т-клітинного імунітету спостерігається в імуносупресивних людей, які схильні до високого ризику розвитку лімфопрліферативного захворювання та злоякісної лімфоми пов'язаних з вірусом Епштейна Барра. Третя програма латентності найменш рестриктивна та спостерігається в лімфопрліферативних захворюваннях серед імуносупресивних пацієнтів. Програма латентності II характеризується експресією EBNA 1, LMP 1, LMP 2A/B та найчастіше асоційована з лімфомою Ходжкіна, Назофарингальною карциномою, Т/НК лімфомами. В першій програмі латентності яка асоційована з лімфомою Беркіта, а також гастрокарциномою експресується тільки EBNA1. Стадія латентності 0 характеризується персистенцією вірусного геному і водночас відсутністю експресії вірусних генів. Сімейство EBNA генів підлягає епігенетичній модифікації під час вірусної латентності. Шість антигенів які експресуються під час стадії латентності III склалися з одного сплайсованого транскрипту. G метилювання промотора латентності Cp відіграє ключову роль в регуляції вірусної латентності та лімітує експресію вірусних генів в нормальних лімфоцитах та деяких лімфомах типу Беркіта, Ходжкіна, НК лімфомах, тощо. Під час латентної фази геном вірусу перебуває в клітині в формі циркулярної епісоми яка проходить цикли реплікації починаючи з точки оріджина oriP. EBNA1 є єдиним білком, необхідним для реплікації з точки oriP. Було показано, що EBNA1 є ключовим білком в підтриманні вірусної латентності. Варто зазначити, що в порівнянні з іншими генними продуктами EBNA1 залишається відносно непомітним для CD8+ Т-лімфоцитів. Регуляція більш "імуногенних" антигенів (EBNA2, 3A-C), LMP1, ранніх вірусних антигенів а також літичних вірусних кіназ сприяє властивості вірусу "обманювати" імунну систему під час латентності[20].

Літична стадія життєвого циклу вірусу необхідна для його передачі від хазяїна до хазяїна, а отже є невід'ємною частиною вірусного патогенезу. За літичної інфекції, вірус імовірно інфікує спочатку епітеліальні клітини ротової порожнини в літичній формі, інфікує “наївні” В-клітини, перетворюючи їх на активно проліферуючі бласти. Приблизно через місяць після первинного інфікування розвивається синдром інфекційного мононуклеозу. Симптоми ІМ пов'язані з початком активної цитотоксичної Т-відповіді на інфіковані вірусом В-клітини. Літична інфекція імовірно передуює початку клінічного ІМ оскільки у хворих ІМ спостерігається надзвичайно сильна Т-клітинна відповідь CD 8, CD4, направлена проти літичних епітопів вірусного білка. Проте варто зазначити що існують певні складнощі в документації первинної літичної інфекції у пацієнтів переважного через довгий безсимптомний інкубаційний період ІМ. Після одужання від ІМ часто виявляється складним або неможливим ідентифікувати літично інфіковані клітини в імунокомпетентних людей. Диференціація В-клітини пам'яті в антитілопродукуючу клітину під впливом антигенного триггеру реактивує вірус, перебуваючий в В-клітині з латентного стану в літичний. Цей процес в основному відбувається в мигдалинах(оро-носоглоточних лімфоїдних тканинах), які вважаються місцем локалізації більшості EBV В-клітин. Вірус з В-клітин може переходити в підслизові епітеліальні клітини, що призводить до активної продукції вірусу. У людей з послабленим імунітетом літична інфекція може зберігатися у вигляді оральної волосистої лейкоплакії, а неконтрольована проліферація латентних В-клітин, інфікованих EBV може призвести до розвитку злоякісної лімфоми, ілюструючи важливість імунного контролю на обох етапах життєвого циклу вірусу.

Трьохступеневий літичний каскад починається з активації експресії immediate early (“негайно” ранніх трансактиваторних білків, які кодуються BZLF1(ZEBRA або Zta) та BRLF1 (Rta). Існує багато клітинних та вірусних білків, які модулюють індукцію та функцію ZEBRA та Rta в порушенні латентності, і це залежить від типу клітин. Ген BZLF1 кодує специфічний ДНК-зв'язуючий білок

(ZEBRA), який є частиною сімейства bZIP лейцин-зіперних трансактиваторів. Промотор BZLF1 (Zp) - це послідовність довжиною 233 bp (base pairs) в геномі EBV, яка зазвичай сильно метильована та транскрипційно неактивна в латентній стадії вірусу. Однак внаслідок відповіді на деякі хімічні або біологічні агенти, навколишні фактори (напр. стрес), епігенетичні модифікатори Zp може “самоактивуватися”. Процес самопосилуючої активації контролюється клітинними транскрипційними факторами такими як фактор посилення міоцитів 2 (MEF2), білок специфічності 1 (SP1), та зв’язуючий цинковий палець E-box гомеобокс (ZEB). Активність промотора підтримується балансом між деметилуючими та деацетилуючими ферментами, регулюючими доступ та активність клітинних факторів транскрипції Zp. Для експресії ZEBRA (Zta) необхідне метилювання ДНК вірусу. ZEBRA може зв’язуватись щонайменше з 32 варіантами ZEBRA-респонсивних елементів (ZRE), які присутні в Zp и в промоторах ранніх генів EBV [33,34]. Таким чином, ZEBRA разом з ендогенними специфічними клітинними факторами транскрипції активують Zp в аутоstimулюючу петлю. Ген BZLF1 також може бути активованим за допомогою трансактиватора Rta (який в свою чергу кодується BRLF1). В зворотному напрямку ZEBRA стимулює експресію Rta (та іншого вірусного білка, який кодується геном BRRF1), в результаті чого відбувається Zta-Rta-BRRF1 синергізм, формуючий петлю зворотнього позитивного зв’язку для активації Zp. Продукт гена BMLF1 (EB2 або I’ta) є ще одним “immediate early” білком, який підвищує рівень вірусних та клітинних білків, необхідних для стабільної експресії Zta.

Будучи індукованими ці продукти викликають зупинку клітинного циклу в фазі G1 і спільно індукують другий крок в каскаді реактивації, тобто “ранню” (early) фазу, в кінцевому випадку викликаючи повну літичну активацію та реплікацію вірусу. Було продемонстровано, що в деяких EBV-асоційованих злоякісних пухлинах, в спорадичних онкоклетинах детектується експресія ZEBRA. Низькі рівні експресії ZEBRA імовірно свідчать про часткову (абортивну) активацію літичної фази. Під час реактивації відбувається експресія багатьох

генних продуктів, таких як : EBV-ДНК-зв'язучі білки, хелікази, тимідинкіназа, протеїнкіназа та інші ферменти, які беруть участь в метаболізмі нуклеотидів. Ці ферменти готують клітину хазяїна до реплікації вірусної ДНК за допомогою вірусної ДНК полімерази(DNApol, BALF5). На третьому етапі вірусної реактивації, яка тісно пов'язана з синтезом нових неметильованих шаблонів вірусної ДНК, відбувається експресія пізніх структурних білків, які переміщуються в ядро зборки стабільних капсидних структур, які включають в себе нову синтезовану лінійну вірусну ДНК. Після того відбувається їх вивільнення в цитоплазму, створення нових інфекційних віріонів які згодом секретуються у міжклітинний простір. Заново синтезований вірусний геном є лінійним та епігенетично немодифікованим. Різноманітні фактори клітиної диференціації регулюють спонтанну реактивацію вірусу і це в більшому ступені залежить від типу клітин. BLIMP1 є одним з ключових факторів в диференціюванні епітеліальних та В-клітин і сприяє реактивації вірусу з латентного стану в вірус-специфічних клітинах. Інший диференційований залежний клітинний фактор транскрипції, Крупель-подібний фактор (KLF4), грає важливу роль в епітеліальних клітинах. Модифікації вірусного геному, такі як 5-гідроксометилування цитозину (важливого для диференціювання епітеліальних клітин), можуть також впливати на літичну реактивацію вірусу та регулюються клітинними ферментами ТЕТ.

Радіація та деякі хіміотерапевтичні препарати - окремо чи в комбінації з інгібіторами деацетилази гістонів HDACi-s, можуть індукувати літичну стадію вірусу. Білки, які синтезуються на цій стадії (вірусні неоантигени) мають велику імуногенність та можуть бути розпізнані імунною системою[4].

### 1.3 Підходи до лікування патологій, пов'язаних з вірусом Епштейна-Барр

Вірус Епштейна-Барра може бути так званою “Ахілесовою п'ятою” в вірус асоційованих онкологічних захворюваннях і націленість на вірусний життєвий цикл може допомогти пацієнтам уникнути використання токсичної хемотерапії та отримати більш цільову терапію. Нові стратегії вірус таргетної терапії, які застосовують при вірус-асоційованих онко захворюваннях можна умовно поділити на два аспекти. Перший аспект направлений на ініціювання вірусної реактивації (індукування літичної стадії) та подальше розпізнавання онкоклітин імунною системою. Другий аспект стосується антивірусних препаратів, які можуть бути метаболізовані до активної форми тільки у клітині яка знаходиться в літичній стадії інфекції [4]. Наприклад, антивірусний препарат Ганцикловір (GCV) який широко застосовується у відношенні до герпес вірусів, потребує фосфорилування до монофосфату під впливом вірусних кіназ(протеїн-кінази/тимідин кінази), після чого монофасфат послідовно перетворюється в дифосфат та трифосфат під дією клітинних кіназ. Діючи як субстрат і вбудовуючись у ДНК, трифосфат ганцикловіру конкурентно інгібує ДНК-полімеразу, що в свою чергу призводить до пригнічення синтезу ДНК за рахунок інгібування стадії елонгації. Ганцикловір пригнічує вірусну ДНК-полімеразу активніше ніж клітинну полімеразу. При зниженні концентрації ганцикловіру стадія елонгації поновлюється. Активність вірусних протеїн/тирозин кіназ потребує ініціації літичної стадії життєвого циклу вірусу[20].

Доклінічні випробовування показали що фармакологічна індукція дексаметазоном та ритуксімабом індукує експерсію білків літичної стадії та відповідно робить інфіковані EBV В-лімфоцити чутливими до ганцикловіру. Інші хіміотерапевтичні препарати такі як 5-фторурацил, платинові агенти або паклітаксел в поєднанні з противірусними препаратами також викликали літичну

активацію та збільшення чутливості до антивірусної терапії в назофарингальній карциномі. Аспірин може індукувати експерсію літичних генів опосередковано через пригнічення NF- $\kappa$ B, що забезпечує даунрегуляцію LMP1 та наступну експерсію BZLF1. In vitro комбінація аспірину та ганцикловіру показує значно кращий цитотоксичний ефект ніж використання тільки одного з двох препаратів. В багатьох випадках було продемонстровано синергетичний ефект між традиційною хімотерапією та протівірусною терапією, так само як і збільшення вірусної ДНК в крові. In vitro інгібітори гістон деацетилази (HDACi) змінюють послідовності промоторів або порушують генний сайсленсинг генів BZLF1 та BRLF1 тим самим викликаючи літичну реактивацію вірусу.

Інша стратегія лікування заснована на адаптивній Т-клітинній імунотерапії. У імункомпетентних пацієнтів вірус Епштейна Барра активно контролюється вірус специфічними цитотоксичними Т-лімфоцитами(CTL). У пацієнтів з ослабленим імунітетом внаслідок трансплантації органів або інфекційних захворювань таких як, наприклад ВІЛ-інфекція, вірус Епштейна Барра отримує можливість проліферувати через виснаження цитотоксичних лімфоцитів. Адаптивна Т-клітинна імунотерапія включає в себе введення вірус специфічних цитотоксичних лімфоцитів, створених in vitro для відновлення імунітету проти вірусу Епштейна Барра і цілеспрямованого знищення інфікованих вірусом онкоклетин. Важливим моментом є те що нативні Т-клітини хазяїна “обмежені” головним комплексом білків гістосумісності (HLA), що означає те, що Т-клітини хазяїна зможуть розпізнавати тільки антигени, представлені головним комплексом гістосумісності свого особистого алельного типу. Введення неспецифічних популяцій цитотоксичних лімфоцитів може мати серйозні наслідки пов’язані з алореактивністю Т-лімфоцитів такі як хвороба “трансплантант проти хазяїна”.

Стратегія блокади чек-пойнтів (check-point blockade) виявилась перспективною у відношенні до злоякісних пухлин, викликаних вірусом Епштейна Барра. Інфіковані вірусом клітини лімфоми експресують інгібуючий

ліганд PD-L1. PD-L1 також виявлений в вірус-асоційованому раку шлунка та Т-НК клітинних лімфомах. Доклінічні дослідження показали, що інгібування PD-1 та CTLA-4 значно зменшує розміри лімфоми, асоційованої з вірусом Епштейна Барра. Антитіло PD1 пембролізумаб було ефективним при рецидивуючих/рефракторних НК-клітинних лімфомах. Комбінація інгібіторів чек-пойнтів разом з індукцією літичної фази може виявитись перспективною стратегією в майбутньому.

## РОЗДІЛ 2. Експериментальна частина

### 2.1 Матеріали та методи

#### Культура клітин P3HR1

Для виконання роботи використовувалась культура клітин P3HR1. Дана культура являє собою лімфобластоїдні клітини (похідні В-лімфоцитів) та хронічно продукує вірус Епштейна Барра(віріони спостерігалися в 78% досліджених за допомогою електронного мікроскопу клітин)[2].

#### Культуральні середовища

Для виконання роботи використовувались наступні середовища: RPMI +1 % ЕТС (ембріональної телячої сироватки) та RPMI + 10 % ЕТС.

#### МТТ-аналіз

МТТ аналіз використовується для дослідження клітинної проліферації, життєздатності та цитотоксичності. Метод базується на відновленні барвника – жовтої солі тетразолію (3- (4,5-диметилтіазол-2-іл) -2,5-дифенілтетразолій бромід або МТТ до пурпурних нерозчинних кристалів формазану (Рис. 2.1).

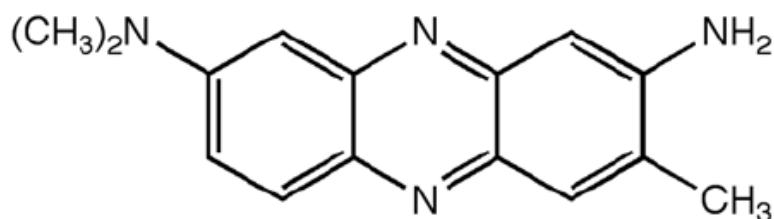


Рис. 2.1 Структура барвника нейтрального червоного

Щоб перевести нерозчинні кристали формазану у розчин використовують де сорбуючі розчини (в даній роботі де сорбуючий розчин являє собою 96% спирт). Процес відновлення відбувається в мітохондріях життєздатних клітин під впливом ферментів НАД (Ф) Н-залежних оксидоредуктаз. Кількість життєздатних клітин оцінюють за інтенсивністю пурпурного забарвлення. Інтенсивність забарвлення оцінюють кількісно шляхом вимірювання оптичної густини з використанням багатолучного спектрофотометру за довжини хвилі 500-600 нанометрів[1].

В даній роботі МТТ аналіз був проведений на культурі клітин P3HR1 які були оброблені розчинами наночастинок Ag чотирьох типів (Ag1, Ag2, Ag3, Ag4) в діапазоні розведень  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ . Розведення проводилися в тому ж середовищі, на якому були вирощені клітини. У випадку аналізів МТТ та NR це було поживне середовище RPMI + 10 % ETC. У випадку з PCR аналізом поживним середовищем було RPMI + 1 % ETC.

### **NR-аналіз**

**NR** аналіз є одним з найбільш використовуваних аналізів, який дозволяє визначити цитотоксичність препаратів. В основі аналізу лежить здатність слабкокатионного барвника нейтрального червоного проходити крізь мембрану клітини, і локалізуватися у лізосомах. За фізіологічного рівня рН сумарний заряд барвника наближається до нуля, що дозволяє йому проникати крізь клітинні мембрани. Всередині лізосоми рівень рН нижчий ніж у цитоплазмі клітини, який підтримується за рахунок протонного градієнту у лізосомі. Таким чином барвник нейтральний червоний набуває заряду і накопичується у лізосомах. Барвник зв'язується слабкими електростатичними гідрофобними зв'язками з аніонними або фосфатними групами лізосомального матриксу. Коли клітина помирає або градієнт рН зменшується, то барвник не може накопичуватись у лізосомах. Відповідно, між кількістю поглинутого барвника та кількістю життєздатних клітин спостерігається пряма пропорційність. Накопичення нейтрального червоного також залежить від змін в зовнішній мембрані клітини/мембрані лізосом. Таким чином, можна відрізнити живі, мертві, або пошкоджені клітини в залежності від специфічного лізосомного накопичення барвника. Цілісність лізосом, і як наслідок ефективність зв'язування нейтрального червоного є чутливим індикатором життєздатності клітин. Далі барвник екстрагується з життєздатної клітини підкисленим розчином спирту. Власне цитотоксичність визначається кількісно за інтенсивністю забарвлення, виміряною на спектрофотометрі[3].

### **Визначення відсотка живих клітин**

Фарбування клітин барвником трипановим синім - давно відомий спосіб ідентифікації мертвих клітин. Трипановий синій - барвник, що здатен проникати крізь пошкоджені мембрани клітин. Таким чином, клітини з непошкодженими мембранами фарбуватися не будуть. В даній роботі кількість живих та мертвих клітин оцінювалась шляхом підрахунку забарвлених клітин з використанням камери Горяєва та оптичного мікроскопу.

### **Real time PCR(q-PCR)**

Для визначення вмісту ДНК вірусу Епштейна-Барра використовувався методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу використовувався набір “РеалБест ДНК ВЕБ”, створений для виявлення ДНК вірусу Епштейна Барра в клінічному матеріалі і для кількісного визначення вірусу в сировотці, плазмі та крові методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією продуктів ПЛР в режимі реального часу. Виділення ДНК з проб проводиться за допомогою наборів “РеалБест ДНК-експрес”, “РеалБест ДНК-екстракція 1”, “РеалБест ДНК-екстракція 2”, “РеалБест ДНК-екстракція 3” або “РеалБест екстракція 100”. Принцип аналізу заснований на реєстрації процесу ампліфікації заданої ділянки ДНК збудника інфекції в ході проведення ПЛР. Процес ампліфікації складається з повторюваних циклів : температурна денатурація ДНК-матриці, віджиг праймерів з комплементарними послідовностями ДНК-матриці, синтез комплементарного ланцюга з цих праймерів Таq полімеразою. В основі реєстрації процесу ампліфікації лежить вимірювання сигналів флуоресценції в кожному циклі ПЛР. Збільшення сигналів флуоресценції відбувається завдяки використанню гібридизаційного ДНК-зонда, специфічного для вибраної ділянки ДНК збудника інфекції, який в ході реакції зв’язується з одним з ланцюгів ДНК, забезпечуючи також додаткову специфічність метода. ДНК зонд містить на 5’-кінці флуоресцентний барвник, а на 3’-гасник флуоресценції, суттєво знижуючий інтенсивність флуоресценції. В ході полімеразного синтезу комплементарного ланцюга, завдяки 5’-3’-нуклеазної активності Таq ДНК-полімерази, зонд розщеплюється з 5’-кінця і відбувається

розділення барвника і гасника, яке призводить по мірі накопичення продукту реакції до збільшення сигналу флуоресценції. При цьому, вимірювана інтенсивність флуоресценції залежить від кількості виникнутих специфічних ампліконів та динаміка наростання флуоресценції визначається кількістю ДНК збудника в пробі.

## 2.2. Дослідження антивірусної дії срібних наночастинок методом ПЛР

Для досліджень було обрано 4 типи наночастинок, характеристики яких наведені в табл. 2.1

Таблиця 2.1 Характеристики срібних наночастинок Ag1-Ag4

Тип наночастинок	Розмір, нм	Розчинник	Температура синтезу, С°	Початкова концентрація, моль/л
Ag1	10	SDS	1-60	10 <sup>(-4)</sup>
Ag2	10	SDS	3-25	10 <sup>(-4)</sup>
Ag3	10	Цитратний буфер	1-60	10 <sup>(-4)</sup>
Ag4	10	SDS	3-25	10 <sup>(-4)</sup>

Вміст вірусної ДНК та цитотоксичність досліджувались з використанням культури клітин P3HR1, що вирощувались на поживному середовищі RPMI + 1% ETC (ембріональна теляча сироватка) (для PCR аналізу та аналізу на цитотоксичність Tryp Blue), та RPMI + 10 % ETC (для аналізу на цитотоксичність MTT та NR). Для PCR аналізу посадкова доза клітин становила 500 тис. клітин в 1 мл суспензії. До суспензії клітин були додані розведення наночастинок у тому ж середовищі, на якому вирощувалася культура клітин. Суспензії клітин разом із розведеннями 0,01, 0,001, 0,0001 наночастинок інкубувалися 48 годин в термостаті (температура 37С°, в присутності CO<sub>2</sub>).

Вміст вірусної ДНК у пробах кількісно оцінювався методом PCR аналізу у відсотках (шляхом порівняння з контролем клітин(проба у якій містився тільки вірус). Результати проведеного аналізу наведені у таблиці 2.2 нижче.

Таблиця 2.2 Результати PCR аналізу

Наночастинка	Розведення	зменшення вірусної ДНК, %	збільшення вірусної ДНК, %
<b>Ag1</b>	0,01		6,14
	0,001		37,12
	0,0001		60,75
<b>Ag2</b>	0,01		53,43
	0,001	46,19	
	0,0001	52,75	
<b>Ag3</b>	0,01	53,18	
	0,001	49,18	
	0,0001	54,52	
<b>Ag4</b>	0,01		82,64
	0,001	73,42	
	0,0001		5,61

За результатами аналізу можна припустити що різні типи наночастинок у різних ступенях розведення викликають відсоткове збільшення або зниження кількості вірусної ДНК. Це може бути пов'язано як з різними умовами синтезу наночастинок, так і з різним ступенем розведення. Детальніший аналіз наведено в розділі “Аналіз даних ПЛР”.

### 2.3 Дослідження життєздатності клітин під дією срібних наночастинок.

Дослідження життєздатності клітин проводилось за допомогою використання барвника Tryph Blue, який здатен проникати крізь пошкоджені мембрани клітин. Клітини для дослідження вирощувались на поживному середовищі RPMI + 1% ENC (ембріональна теляча сироватка). Аналіз на цитотоксичність Tryph Blue проводився безпосередньо після 48 годинної інкубації культур клітин з розведеннями наночастинок 0,01, 0,001, 0,0001. Після 48 годинної інкубації до визначеного об'єму (20 мкл) суспензії клітин, які були інкубовані з наночастинками, була додана еквівалентна кількість барвника трипанового синього. Після цього зафарбовані та незафарбовані клітини були порашовані на оптичному мікроскопі. Культури клітин інкубувалися в термостаті за температури 37C°, в присутності CO<sub>2</sub>. Життєздатність клітин оцінювалась шляхом визначення відсотка мертвих клітин в залежності від розведення кожної наночастинок. В таблиці 2.3 наведені результати аналізу: відсоток мертвих клітин та розведення наночастинок. Результати аналізу проілюстровані на рисунках 2.1-2.5. Окремо побудовані графіки залежності відсотка мертвих клітин від розведеннь наночастинок та загальний графік, ілюструючий ефект всіх трьох видів наночастинок.

Таблиця 2.3 Результати аналізу життєздатності клітин

Відсоток мертвих клітин, %	Розведення	Вид наночастинок
42,5	0,01	Ag1
11,76	0,001	
13,79	0,0001	
53,85	0,01	Ag2
8,16	0,001	
14,03	0,0001	
27,78	0,01	Ag3
13,89	0,001	
8,69	0,0001	
36,36	0,01	Ag4
15,79	0,001	
10,64	0,0001	



Рис. 2.1 Життєздатність клітин під впливом наночастинок Ag1



Рис. 2.2 Життєздатність клітин під впливом наночастинок Ag 2

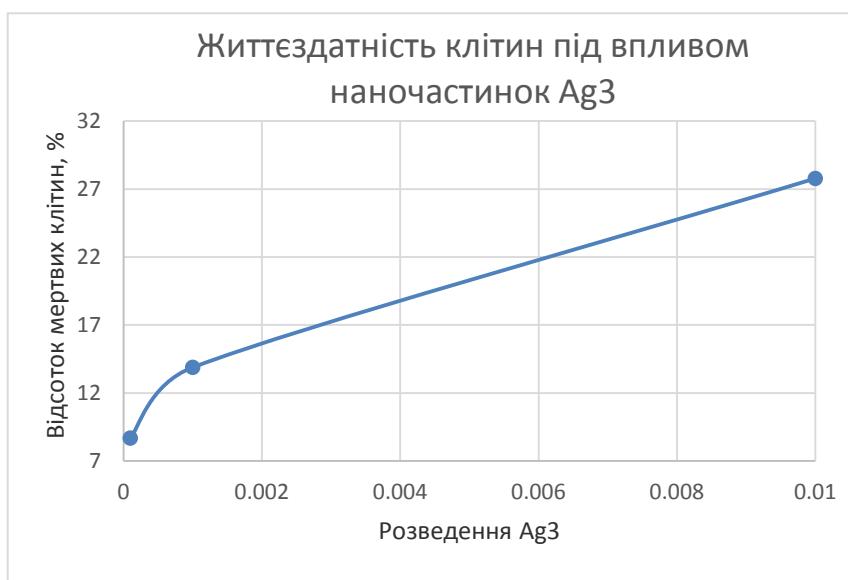


Рис. 2.3 Життєздатність клітин під впливом наночастинок Ag3

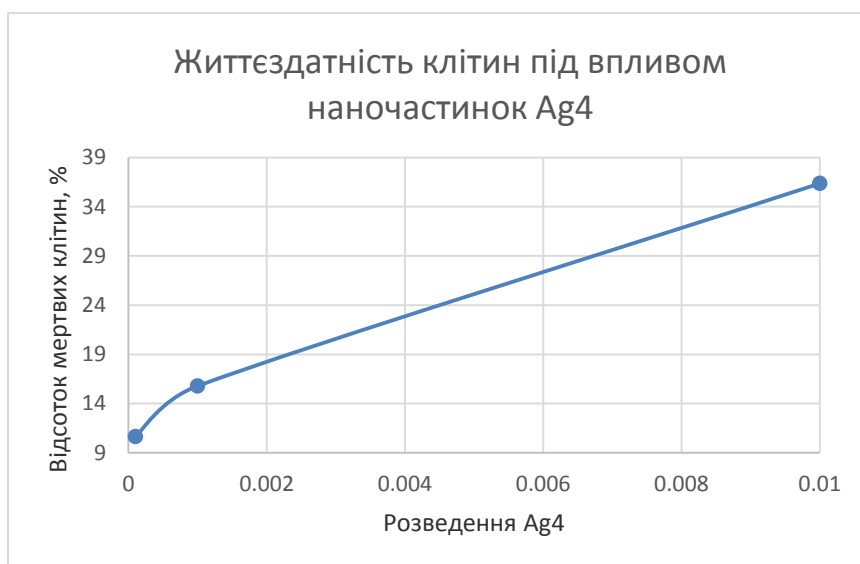


Рис. 2.4 Життєздатність клітин під впливом наночастинок Ag4

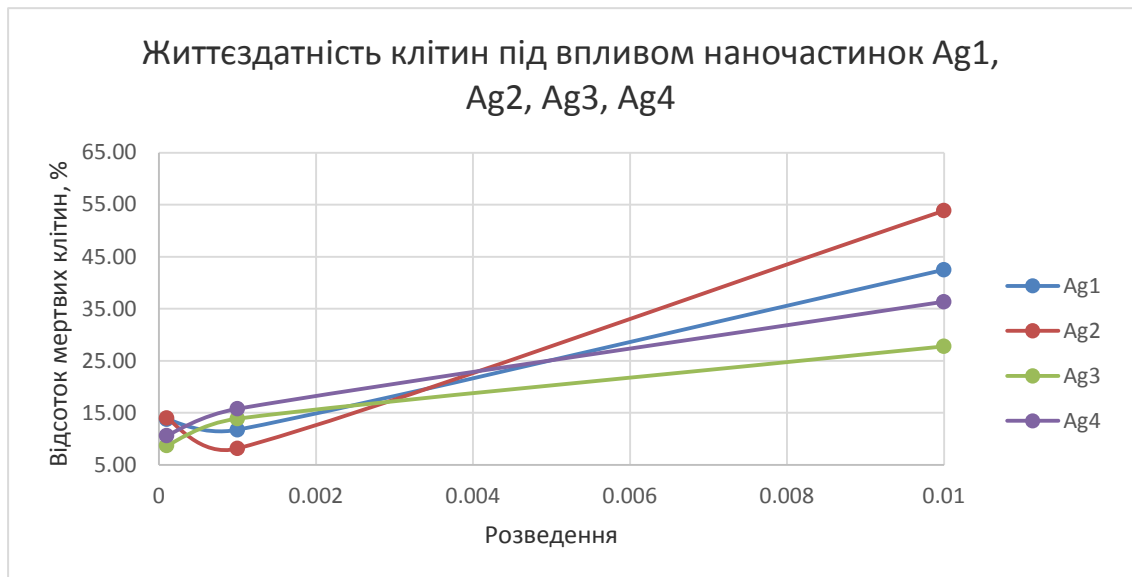


Рис. 2.5 Життєздатність клітин під впливом наночастинок Ag1, Ag2, Ag3, Ag4

За результатами досліджень можна припустити, що два з чотирьох типів наночастинок викликають однакову динаміку життєздатності клітин, наприкінці усі чотири типи наночастинок викликають найбільший відсоток мертвих клітин у найменшому розведенні.

## 2.4 Дослідження цитотоксичності срібних наночастинок

Цитотоксичність наночастинок визначалась за допомогою МТТ та NR аналізу. Для МТТ та NR аналізу на цитотоксичність посадкова доза клітин становила 1 млн в мл суспензії клітин. До суспензії клітин були додані розведення наночастинок у тому ж середовищі, у якому вирощувалася культура клітин. Суспензії клітин разом із розведеннями 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 наночастинок інкубувалися 48 годин в термостаті (температура 37C°, в присутності CO<sub>2</sub>). В таблиці 2.4 та 2.5 наведені результати аналізу : відсоток мертвих клітин та розведення наночастинок. Також результати проілюстровані на рисунках 2.6-2.11. Окремо побудовані графіки залежності відсотка мертвих клітин від розведень наночастинок для методу МТТ та загальний графік, ілюструючий ефект всіх трьох видів наночастинок (для методу МТТ та NR).

Таблиця 2.4 Результати аналізу цитотоксичності наночастинок методом МТТ

Відсоток мертвих клітин, %	Розведення	Вид наночастинок
90,23	0,1	Ag1
27,85	0,01	
18,10	0,001	
13,39	0,0001	
8,34	0,00001	
71,34	0,1	Ag2
25,24	0,01	
12,74	0,001	
7,45	0,0001	
5,17	0,00001	
96,40	0,1	Ag3
30,36	0,01	
10,49	0,001	
13,35	0,0001	
6,37	0,00001	
73,30	0,1	Ag4
44,88	0,01	
31,38	0,001	
21,26	0,0001	
16,09	0,00001	

Таблиця 2.5 Результати аналізу цитотоксичності наночастинок методом NT

Відсоток мертвих клітин, %	Розведення	Вид наночастинок
41,20	0,1	Ag1
0	0,01	
0	0,001	
0	0,0001	
0	0,00001	
0	0,1	Ag2
0	0,01	
0	0,001	
0	0,0001	
0	0,00001	
30,41	0,1	Ag3
0	0,01	
0	0,001	
0	0,0001	
0	0,00001	
0	0,1	Ag4
0	0,01	
0	0,001	
0	0,0001	
0	0,00001	

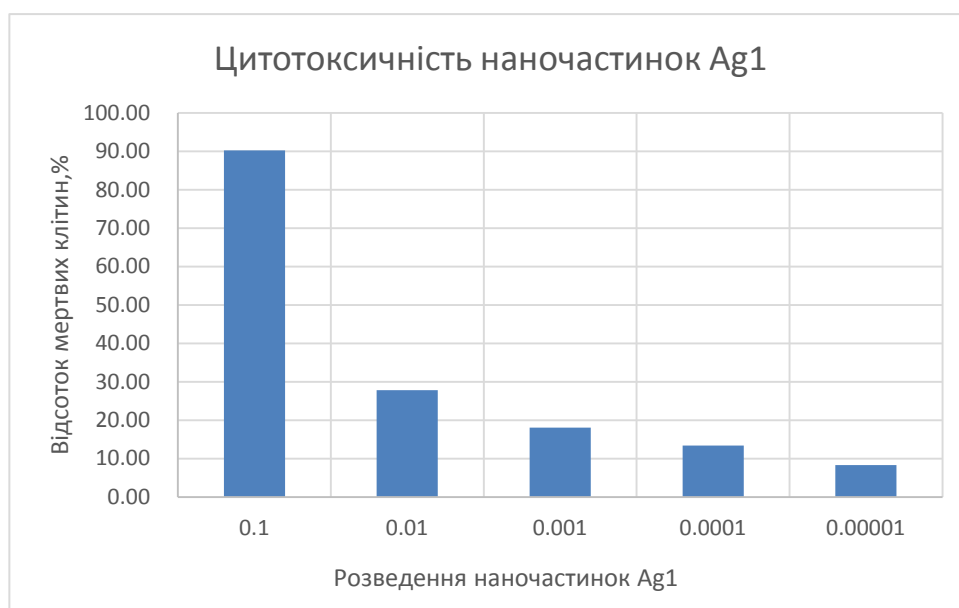


Рис. 2.6 Цитотоксичність наночастинок Ag1

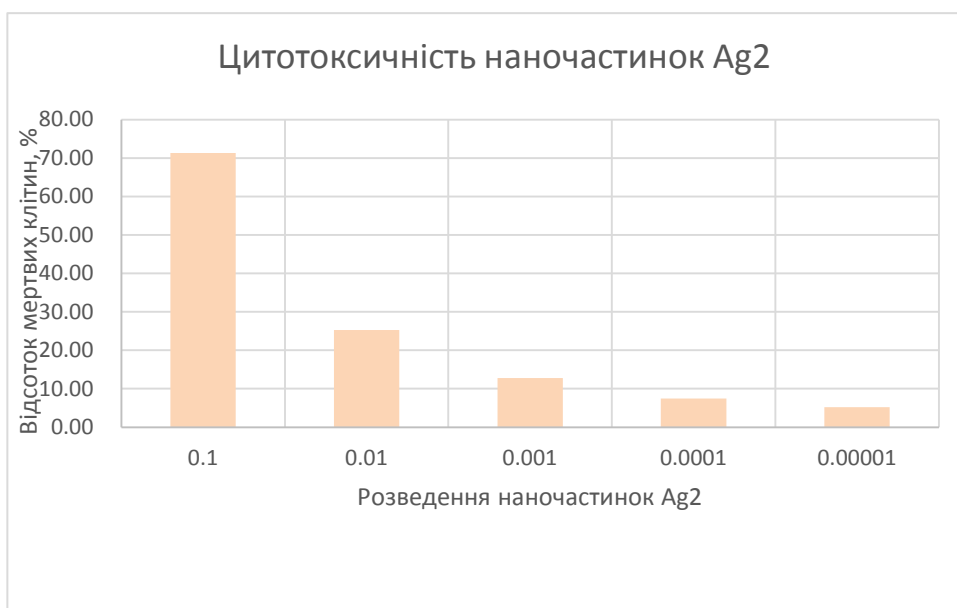


Рис. 2.7 Цитотоксичність наночастинок Ag2

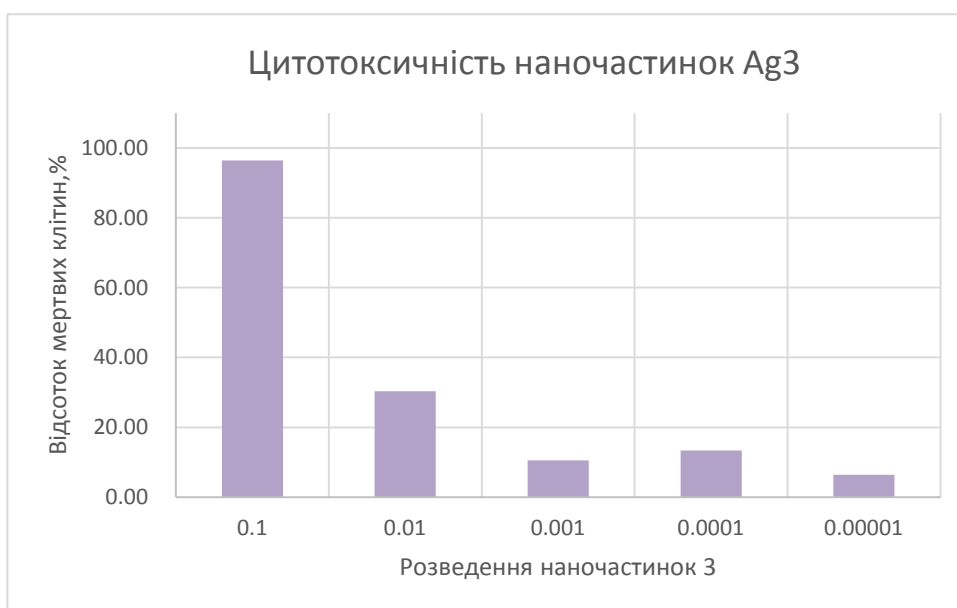


Рис. 2.8 Цитотоксичність наночастинок Ag3



Рис. 2.9 Цитотоксичність наночастинок Ag4

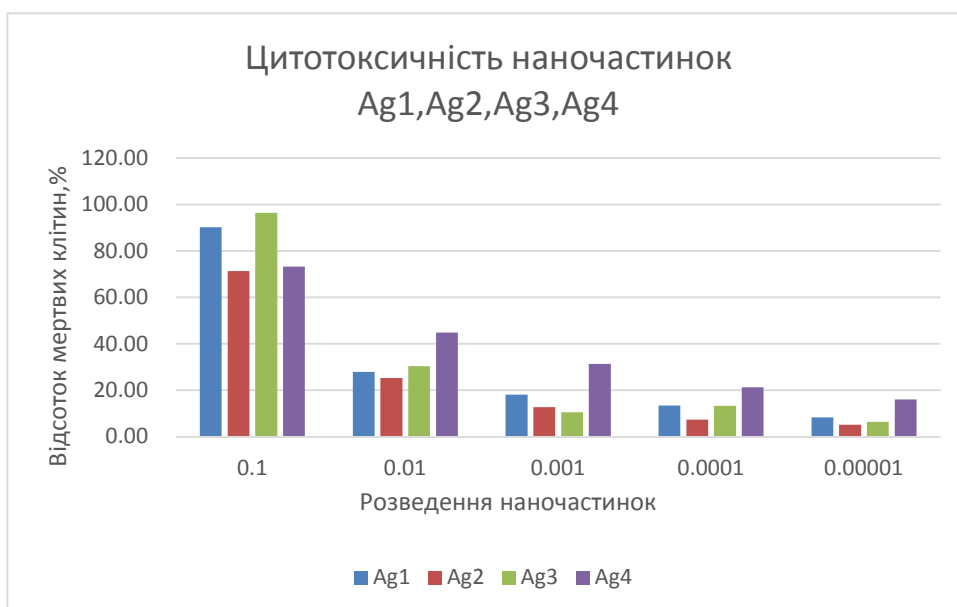


Рис. 2.10 Цитотоксичність наночастинок Ag1, Ag2, Ag3, Ag4, метод МТТ

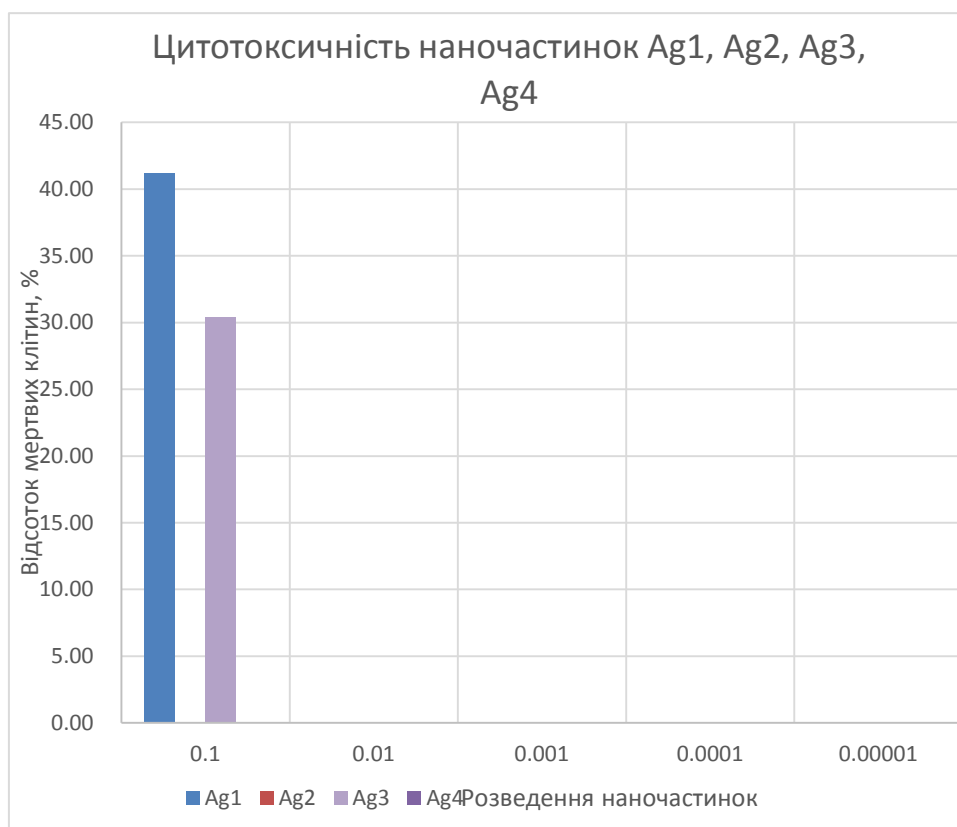


Рис. 2.11 Цитотоксичність наночастинок Ag1, Ag2, Ag3, Ag4, метод NT

## РОЗДІЛ 3. Обговорення результатів експерименту

### 3.1 Аналіз даних експерименту

Одним з підходів до лікування пухлин, асоційованих з вірусом Епштейна Барра є активація літичної реплікації вірусу, що супроводжується продукцією нових віріонів і виходу їх з клітини, а також супроводжується загибеллю клітин[4,5]. Пухлинні клітини, асоційовані з вірусом Епштейна Барра є нечутливими до дії такого антивірусного препарату, як, наприклад, Ганцикловір, оскільки в таких клітинах вірус знаходиться в латентному стані і не експресує специфічні кінази необхідні для перетворення Ганцикловіру в його активну токсичну форму[4]. Ряд авторів вказують на те, що реактивні форми кисню (ROS) сприяють літичній активації вірусу[3,1]. Можна припустити, що одним з можливих механізмів терапевтичної дії наночастинок срібла є генерація реактивних форм кисню в ВЕБ-позитивній пухлинній клітині та відповідно літична активація вірусу, яка супроводжується апоптозом та аутофагією[3]. Авторами було досліджено, що суттєву цитотоксичну дію на ВЕБ-позитивні клітини викликають лише певні концентрації наночастинок срібла[3]. В даному експерименті наночастинок срібла першого типу сприяли збільшенню кількості вірусної ДНК в порівнянні з контролем клітин. Причому збільшення розведення даного типу наночастинок сприяло збільшенню вмісту нуклеїнової кислоти вірусу. Відсоткове збільшення кількості вірусної ДНК може свідчити про літичну активацію вірусу, проте потребує подальшого дослідження експресії immediate early (“негайно” ранніх трансактиваторних білків), які кодуються BZLF1 (ZEBRA або Zta) та BRLF1 (Rta), визначення фази клітинного циклу, та дослідження експресії інших генних продуктів, таких як EBV-ДНК-зв’язучі білки, хелікази, тимідинкіназа, протеїнкіназа та інші ферменти, які є характеристичними для літичної реактивації. Відсоток мертвих клітин, розрахований за результатами МТТ аналізу зменшувався зі збільшенням розведення наночастинок першого типу, а за результатами NR аналізу цитотоксична дія проявлялася лише в найбільшому розведенні. За результатами аналізу цитотоксичності за барвником трипановим

синім суттєва цитотоксична дія також проявлялася лише в найменшому розведенні, що може свідчити про суттєву загальну цитотоксичну дію наночастинок даного типу лише в найменшому розведенні. Наночастинки другого типу сприяли збільшенню вмісту нуклеїнової кислоти вірусу лише в стократному(найменшому) розведенні, тоді як за наступного збільшення розведень вміст нуклеїнової кислоти вірусу в порівнянні з контролем починав зменшуватись. Варто зазначити, що найбільша цитотоксична дія наночастинок другого типу спостерігалася за найменших розведень. Збільшення кількості нуклеїнової кислоти у пробі за найменшого розведення, а також найбільша цитотоксична дія наночастинок за цього розведення узгоджується з результатами досліджень[4]. Для наночастинок 3 типу не було виявлено суттєвої різниці у вмісті вірусної ДНК в залежності від розведення. За допомогою трипанового синього було виявлено, що відсоток мертвих клітин зменшувався зі збільшенням розведення. МТТ аналіз показав незначні коливання цитотоксичності у межах розведень 0,001 та 0,0001.

За результатами PCR аналізу можна припустити, що найбільшому зменшенню вмісту вірусної нуклеїнової кислоти сприяють наночастинки 4 типу (зменшення в порівнянні з контролем 73,42%) в тисячократному розведенні. З аналізу на життєздатність клітин випливає, що для наночастинок 4 типу в розведенні при якому спостерігався найнижчий відсоток вірусної ДНК, відсоток мертвих клітин становив 15,8 % що може свідчити про токсичність даних наночастинок для вірусу, проте не для клітини, або перебування вірусу в даних умовах в латентній стадії/абортивній літичній життєвого циклу. Загалом при зменшенні концентрації 4 типу наночастинок (збільшенні розведення) спостерігається зниження кількості мертвих клітин. В тисячократному розведенні наночастинки викликали відносно великий відсоток мертвих клітин (31,8%) виявлений за допомогою МТТ аналізу, в той час як аналіз цитотоксичності з використанням барвника нейтрального червоного не показав жодного відсотку мертвих клітин. Це може свідчити про нетоксичність наночастинок власне для

лізосом, але про певне пошкодження клітинної мембрани. Для наночастинок 2 типу найменший відсоток вірусної ДНК спостерігався в розведенні 0,0001. В такому розведенні наночастинок 2 типу не проявляли майже жодної цитотоксичності (відсоток мертвих клітин виміряний всіма методами становив менше 15%).

У роботах деяких авторів вказано, що цитотоксичність наночастинок срібла залежить від їх розміру та форми[5]. В даному дослідженні використовувались 4 типи наночастинок однакового розміру та форми. Також було виявлено, що цитотоксичність наночастинок срібла залежить від концентрації хлориду срібла, а також від вмісту органічних компонентів культурального середовища, наприклад білків, та від сульфурвмісних компонентів. Вміст білків у культуральному середовищі головним чином залежить від процентного вмісту ембріональної телячої сироватки у культуральному середовищі. За даними авторів, концентрація хлориду срібла в культуральному середовищі збільшує цитотоксичність наночастинок срібла, а збільшення концентрації ембріональної телячої сироватки збільшило кількість живих клітин незалежно від присутності хлориду або сульфату. Загалом, концентрація хлоридів у культуральному середовищі, а також вміст органічних компонентів впливають на агрегацію срібла та утворення комплексу, а також на наявність вільних іонів срібла ( $Ag^+$ ), розчинених у культуральному середовищі. Авторами було виявлено, що кількість розчинених неорганічних та органічних комплексів срібла в культуральних середовищах після додавання наносрібла або іонного срібла залежить від вихідної концентрації хлориду в культуральному середовищі. Таким чином, в межах даних експериментів різницю між результатами аналізів на цитотоксичність можна частково пояснити використанням культуральних середовищ з різним вмістом ембріональної телячої сироватки. Зокрема, перед аналізом на життєздатність клітини інкубувалися у середовищі з 1% ембріональної телячої сироватки, а перед аналізом на цитотоксичність (МТТ та NR) у середовищі з 10% ембріональної телячої сироватки. Цим можна частково пояснити більший відсоток мертвих

клітин у дослідженні життєздатності в порівнянні з дослідженнями цитотоксичності. Суттєве значення для цитотоксичності має також покриття наночастинок[21]. Для наночастинок третього типу найнижчий вміст вірусної ДНК спостерігався у розведенні 0,0001 (на 54,52% менше ніж в контролі клітин) при цьому кількість мертвих клітин, виявлених за допомогою барвника трипанового синього при такому ж розведенні виявилась найменшою(8,7 %). Найбільший відсоток мертвих клітин спостерігався при найменшому розведенні наночастинок усіх типів, що узгоджується з результатами роботи[21,5]. Також варто зазначити майже повну відсутність лізосомальної цитотоксичності, згідно з даними NR аналізу. Зокрема, NR аналіз виявив цитотоксичну дію лише для наночастинок першого та третього типу в найменших розведеннях.

## ВИСНОВКИ

Під час виконання даної дипломної роботи було досліджено 4 типи наночастинок срібла на наявність противірусної активності на прикладі вірусу Епштейна-Барра. Всі 4 типи наночастинок мали однакову форму та розмір, при цьому відрізнялися умовами синтезу (температура синтезу, розчинник), та були дослідженні у декількох розведеннях. Варто зазначити, що як і потенціальна противірусна дія будь-яких наночастинок, противірусна дія срібних наночастинок не є специфічною до вірусу (може бути застосована до кількох вірусів одночасно), тому частково позбавляє проблеми виникнення вірусної резистентності до противірусної дії наночастинок. Противірусна дія срібних наночастинок може проявлятися на декількох рівнях : зв'язування вірусу з чутливим рецептором, проникнення вірусу у клітину, стадія реплікації вірусу, реактивація літичної стадії(і таким чином, можливість подальшого застосування тривіальної антивірусної терапії та/або виникнення імунної відповіді).

Крім визначення відсоткового зниження або збільшення вірусної ДНК методом real-time qPCR під впливом наночастинок були проведені експерименти щодо визначення життєздатності клітин та цитотоксичності двома методами (МТТ та NR аналіз). Співставляючи результати ПЛР аналізу та дані щодо життєздатності/цитотоксичності можна зробити висновок щодо противірусної та “загальної”, “неспецифічної” дії наночастинок на досліджувані клітини. Досліджувані наночастинок імовірно, мають різний механізм противірусної дії, адже деякі з них продемонстрували ефект збільшення вірусної ДНК у пробі (наночастинок першого типу - Ag1) . Збільшення розведення наночастинок першого типу сприяло збільшенню вмісту нуклеїнової кислоти вірусу. Це може свідчити про літичну реактивацію вірусу. Разом з тим, зі збільшенням розведення наночастинок першого типу їх токсичність зменшувалась. Наночастинок четвертого типу Ag4 спричиняли як збільшення (при стократному розведенні) так і зменшення кількості вірусної ДНК (при тисячократному розведенні). При чому, зменшення вірусної ДНК при використанні даного розведення і даного типу

наночастинок виявилось найбільшим з усіх досліджуваних. З цих результатів випливає, що наночастинка може мати різний механізм дії на вірус, в залежності від розведення. Перспективними є подальші дослідження щодо особливостей структурних та поверхневих взаємодій вірус-наночастинка, для того щоб виявити або заперечити роль розведення наночастинок у механізмі дії на вірус. Також перспективними є подальші молекулярно-біологічні дослідження, для того щоб ідентифікувати стадію життєвого циклу вірусу з більшою точністю і виявити або заперечити дію наночастинок на молекулярно-біологічному рівні (у процесі реплікації вірусу, синтезу характеристичних білків, тощо). Використання в експериментах культуральних середовищ визначеного складу (визначений відсоток ЕТС, хлоридів /сульфатів срібла), може надати інформацію про вплив вмісту культуральних середовищ на цитотоксичність клітин *in vitro*.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Young LS, Rickinson AB (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4: 757-768.
2. Biggin M, Bodescot M, Perricaudet M, Farrell P. Epstein-Barr virus gene expression in P3HR1-superinfected Raji cells. *J Virol.* 1987;61(10):3120-3132. doi:10.1128/JVI.61.10.3120-3132.1987
3. Bishop GA, Busch LK. Molecular mechanisms of B-lymphocyte transformation by Epstein-Barr virus. *Microbes Infect.* 2002 Jul;4(8):853-7. doi: 10.1016/s1286-4579(02)01605-2. PMID: 12270732.
4. Novalić Z, van Rossen TM, Greijer AE, Middeldorp JM (2016) Agents and Approaches for Lytic Induction Therapy of Epstein-Barr Virus Associated Malignancies. *Med chem (Los Angeles)* 6: 449-466. doi:10.4172/2161-0444.1000384
5. Wan C, Tai J, Zhang J, Guo Y, Zhu Q, Ling D, Gu F, Gan J, Zhu C, Wang Y, Liu S, Wei F, Cai Q. Silver nanoparticles selectively induce human oncogenic  $\gamma$ -herpesvirus-related cancer cell death through reactivating viral lytic replication. *Cell Death Dis.* 2019 May 21;10(6):392. doi: 10.1038/s41419-019-1624-z. PMID: 31113937; PMCID: PMC6529488.
6. Lysenko V. *et al* 2018 *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.* **9** 025021
7. Yakushina S.A., Kisteneva L.B. Epstein-Barr virus (Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4): replication strategies. *Problems of Virology.* 2020;65(4):191-202. (In Russ.) <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-191-202>
8. Chen L, Liang J. An overview of functional nanoparticles as novel emerging antiviral therapeutic agents. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020;112:110924. doi:10.1016/j.msec.2020.110924
9. Yang X.X., Li C.M., Li Y.F., Wang J., Huang C.Z. Synergistic antiviral effect of curcumin functionalized graphene oxide against respiratory syncytial virus infection. *Nanoscale.* 2017;9:16086–16092.
10. Szymańska E., Orłowski P., Winnicka K., Tomaszewska E., Baska P., Celichowski

G., Grobelny J., Basa A. Multifunctional tannic acid/silver nanoparticle-based mucoadhesive hydrogel for improved local treatment of HSV infection: in vitro and in vivo studies. *Inter. J. Mol. Sci.* 2018;19:387–408.

11. Halder A., Das S., Ojha D., Chattopadhyay D. Highly monodispersed gold nanoparticles synthesis and inhibition of herpes simplex virus infections. *Mater. Sci. Eng. C.* 2018;89:413–421.

12. Du T., Liang J.G., Dong N., Lu J., Fu Y.Y., Fang L.R., Xiao S.B., Han H.Y. Glutathione-capped Ag<sub>2</sub>S nanoclusters inhibit coronavirus proliferation through blockage of viral RNA synthesis and budding. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018;10:4369–4378.

13. Ghaffari H, Tavakoli A, Moradi A, et al. Inhibition of H1N1 influenza virus infection by zinc oxide nanoparticles: another emerging application of nanomedicine. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):70. Published 2019 Sep 10. doi:10.1186/s12929-019-0563-4

14. Tavakoli A., Hashemzadeh M.S. Inhibition of herpes simplex virus type 1 by copper oxide nanoparticles. *J. Virol. Methods.* 2020;275:1–7.

15. Bimbo LM, Denisova OV, Mäkilä E, Kaasalainen M, De Brabander JK, Hirvonen J, Salonen J, Kakkola L, Kainov D, Santos HA. Inhibition of influenza A virus infection in vitro by saliphenylhalamide-loaded porous silicon nanoparticles. *ACS Nano.* 2013 Aug 27;7(8):6884-93. doi: 10.1021/nn402062f. Epub 2013 Aug 1. PMID: 23889734.

16. Lysenko V, Lozovski V and Spivak M 2013 *Ukr. J. Phys*

17. Frisan T., Levitsky V., Masucci M. (2001) Generation of Lymphoblastoid Cell Lines (LCLs). In: Wilson J.B., May G.H.W. (eds) Epstein-Barr Virus Protocols. *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>, vol 174. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-227-9:125>

18. Song Z.Y., Wang X.W., Zhu G.X., Nian Q.G., Zhou H.Y., Yang D., Qin C.F., Tang R.K. Virus capture and destruction by label-free graphene oxide for detection and disinfection applications. *Small.* 2015;11:1171–1176.

19. Kentaro Kikuchi, Harumi Inoue, Yuji Miyazaki, Fumio Ide, Masaru Kojima, Kaoru Kusama,

Epstein–Barr virus (EBV)-associated epithelial and non-epithelial lesions of the oral cavity, *Japanese Dental Science Review*, Volume 53, Issue 3, 2017, Pages 95-109, ISSN 1882-7616, <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2017.01.002>

20. Dugan James P., Coleman Carrie B., Haverkos Bradley “Opportunities to Target the Life Cycle of Epstein-Barr Virus (EBV) in EBV-Associated Lymphoproliferative Disorders”, *Frontiers in Oncology*, Vol.9, 2019

21. Kaiser, JP., Roesslein, M., Diener, L. *et al.* Cytotoxic effects of nanosilver are highly dependent on the chloride concentration and the presence of organic compounds in the cell culture media. *J Nanobiotechnol* **15**, 5 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0244-3>