

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Будзанівська І.Г.

Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2023 р.

**ВПЛИВ КОМБІНУВАННЯ ФІЗИЧНИХ ТА ХІМІЧНИХ ФАКТОРІВ НА  
РЕПЛІКАЦІЮ ВІРУСУ ЕПШТЕЙНА-БАРР**

Кваліфікаційна робота магістра  
денної форми навчання

за спеціальністю 091 «Біологія»

Журавльової Марії Дмитрівни

Науковий керівник від кафедри

кандидат біологічних наук, доцент

Харіна А.В

Робота виконана у відділі репродукції вірусів Інституту мікробіології і  
вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН

під керівництвом кандидата біологічних наук, старшого дослідника

Загородньої С.Д.

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2023 р.**

## АНОТАЦІЯ

В роботі було проведено серію експериментів на культурі клітин P3HR-1 (трансформовані В-лімфоцити), для дослідження цитотоксичності біметалевих наночастинок срібла та золота, а також їх антивірусної активності щодо вірусу Епштейна-Барр. Також було досліджено вплив інфрачервоного опромінення на ефективність наночастинок.

Для встановлення цитотоксичності досліджували вплив наночастинок на проліферативну здатність клітин (фарбування трипановим синім), мітохондріальну активність (тест МТТ) та лізосомальну активність (реакція з нейтральним червоним). В тестах на цитотоксичність використовували неактивовані та активовані наночастинок. Сполуки вносили до клітин в концентрації 1 мкг/мл. Активацію наночастинок здійснювали за допомогою інфрачервоного опромінення протягом 10 хв. Проби для перевірки цитотоксичності відбирали через 1, 4 та 24 години після обробки. Для вивчення антивірусної активності використовували метод полімеразної ланцюгової реакції.

Було показано, що найбільше пригнічення проліферативної здатності та лізосомальної активності виявляють наночастинок з вищим вмістом золота, ефективність яких підвищується при активації інфрачервоним опроміненням. Наночастинок з вищим вмістом срібла демонстрували значне пригнічення мітохондріальної активності та високий рівень антивірусної активності.

Кваліфікаційна робота викладена на 57 сторінках, ілюстрована 15 рисунками та 1 таблицею. Список використаних джерел включає 53 роботи.

**Ключові слова:** вірус Епштейна-Барр, цитотоксичність, антивірусна активність, біметалеві наночастинок, срібло та золото

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	4
<b>РОЗДІЛ 1. Характеристика вірусу Епштейна-Барр й наночастинок срібла та золота як потенційних антивірусних агентів</b> .....	7
1.1. Загальна характеристика вірусу Епштейна-Барр.....	7
1.2. Особливості взаємодії вірусу Епштейна-Барр та лімфобластоїдних клітин.....	10
1.3. Властивості наночастинок срібла та золота.....	14
1.4. Вплив опромінення на властивості наночастинок.....	20
1.5. Цитотоксичний вплив та антивірусна активність наночастинок.....	24
<b>РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень</b> .....	27
2.1. Культура клітин.....	27
2.2. Умови вирощування культури.....	27
2.3. Збереження та відновлення культури.....	28
2.4. Досліджувані сполуки.....	28
2.5. Фарбування вітальним барвником трипановим синім.....	29
2.6. Тест МТТ.....	30
2.7. Реакція з барвником нейтральним червоним.....	31
2.8. Виділення ДНК.....	32
2.9. Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК.....	32
2.10. Полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу.....	32
2.11. Статистична обробка результатів.....	33
<b>РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення</b> .....	34
3.1. Вплив інфрачервоного опромінення на проліферативну здатність культури РЗНР-1.....	34
3.2. Вплив наночастинок на проліферативну здатність клітин.....	36
3.3. Вплив наночастинок на мітохондріальну активність клітин.....	39

3.4. Вплив наночастинок на лізосомальну активність клітин.....	43
3.5. Вплив наночастинок на накопичення вірусу Епштейна-Барр в культурі.....	47
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>50</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>51</b>

## ВСТУП

Рак – це група захворювань, головною особливістю яких є трансформація та висока частота проліферації клітин, що є прямим наслідком зміни їх фізіологічних механізмів, а саме – порушення нормального циклу реплікації. Останніми роками кількість випадків захворювання на рак в світі швидко збільшується – рак посідає друге місце серед найбільш розповсюджених причин смерті. Тому встановлення механізмів виникнення ракових захворювань та створення засобів боротьби з ними є актуальним завданням для сучасної медицини [1].

Вірус Епштейна-Барр (або ВЕБ) є типовим представником родини *Herpesviridae* та після абсорбції встановлює латентну інфекцію в клітинах, що є чутливими до нього. До таких клітин належать В-лімфоцити, рідше вірус Епштейна-Барр інфікує також деякі інші типи клітин, а саме клітини ендотелію (внутрішні стінки кровоносних судин тощо) та макрофаги. Встановлення латентної інфекції в таких клітинах може призводити до порушення нормальних процесів реплікації клітин, міжхромосомних транслокацій протоонкогенів з наступною активацією та проліферацією уражених клітин. Саме ці процеси є ключовими для злоякісної трансформації клітин й утворення їх скупчень з подальшим утворенням пухлини [2].

Вірус Епштейна-Барр класифікований як канцероген першої групи, тобто, є доведеним фактором виникнення пухлин, та виявляється у 1,5% від усіх зареєстрованих ракових захворювань (зокрема, при лімфомі Беркітта). Вплив вірусу Епштейна-Барр на клітини включає в себе внесення змін до метаболічних шляхів, в тому числі до процесів мітохондріальної та убіквілін-протеосомної систем, метилювання ДНК клітини-хазяїна тощо [3].

Актуальність даної роботи полягає в тому, що основними способами боротьби з раком, які наразі широко застосовуються, є хірургічне втручання з

метою механічного видалення пухлинних осередків та лікування з використанням діючих речовин, які є достатньо токсичними для організму пацієнта. Зазначені способи лікування також мають ряд значних недоліків, серед яких – ускладнення після хірургічного втручання, побічні ефекти застосування високотоксичних лікарських речовин, виникнення резистентності ракових клітин до цих речовин та їх невибірковість стосовно клітин (уражуються як трансформовані, так й нормальні клітини), зменшення пулу нормальних імункомпетентних клітин та неповне видалення пухлинних скупчень, що може призвести до повторного утворення чи метастазування пухлини [1].

Як альтернатива цим способам пропонується використання металічних наночастинок – речовин, які є високоспецифічними щодо ракових клітин (зокрема, лімфоцитів, латентно інфікованих вірусом). Головними перевагами їх використання є низька токсичність щодо нормальних клітин, відсутність індукції виникнення резистентності уражених клітин та напрямлена дія, оскільки наночастинки можуть накопичуватися в скупченнях ракових клітин, а накопиченням можна керувати, адсорбувавши на наночастиці специфічні речовини [1].

Новизна даної роботи в тому, що для сполук на основі біметалевих наночастинок срібла та золота не до кінця досліджена їх ефективність як потенційних протиракових засобів за умови впливу як безпосередньо на самі трансформовані В-лімфоцити, так й на головний фактор їх трансформації, а саме – на репродукцію вірусу Епштейна-Барр. Тобто, існує необхідність дослідження їх антивірусних властивостей щодо вірусу Епштейна-Барр та цитотоксичного впливу на лімфобластоїдні клітини, а також визначення, як саме ці наночастинки впливають на життєздатність клітин. Крім того, існує необхідність порівняння між собою ефективності наночастинок за умови активації їх інфрачервоним лазером та тих самих наночастинок без активації, аби визначити, чи активація підвищує ефективність сполуки.

Метою роботи було дослідження антивірусної активності біметалевих наночастинок з різним вмістом срібла та золота щодо вірусу Епштейна-Барр, а також їхнього цитотоксичного впливу на трансформовані В-лімфоцити, за умови активації наночастинок інфрачервоним лазером та без активації.

**Ключові слова:** вірус Епштейна-Барр, цитотоксичність, антивірусна активність, біметалеві наночастинок, срібло та золото

## РОЗДІЛ 1

# ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ ЕПШТЕЙНА-БАРР ТА НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ТА ЗОЛОТА ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ АНТИВІРУСНИХ АГЕНТІВ

### 1.1. Загальна характеристика вірусу Епштейна-Барр

Вірус Епштейна-Барр (або *Human Herpesvirus 4*, HHV-4) є лімфотропним вірусом складної будови та взаємодіє з клітинами В-лімфоцитів, що робить його збудником захворювань, пов'язаних з лімфатичною системою. Він віднесений до вірусів, що є потенційними факторами розвитку онкологічних захворювань [4, 5].

Наразі відомо два різновиди вірусів Епштейна-Барр, названі ВЕБ типу 1 та ВЕБ типу 2, які мають майже ідентичні геноми, різниця між якими полягає у наявності чи відсутності генів, що кодують деякі з нуклеарних білків, зокрема, нуклеарних антигенах – EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B та EBNA-3C. Вірус Епштейна-Барр типу 1 є найбільш розповсюдженим варіантом та має вищу трансформаційну здатність щодо В-лімфоцитів (зокрема, досліджувану лінію клітин РЗНР-1 було отримано від первинної лінії, інфікованої саме цим типом). Вірус Епштейна-Барр типу 2 виявляється в основному на африканському континенті та є збудником різновиду лімфоми Беркітта, що пов'язана з коінфекцією малярійним плазмодієм [6].

Віріон вірусу Епштейна-Барр має будову, типову для багатьох герпесвірусів людини; його діаметр складає у середньому 100-200 нм. Структура віріону включає в себе ліпідну оболонку-суперкапсид, що походить від клітинної мембрани, крізь яку проходять пепломери глікопротеїнової природи, що мають вірусне походження, та деякі мембранні білки, що походять від клі-

тин. На сьогоднішній день ідентифіковано близько 13 видів вірусних глікопротеїнів вірусу Епштейна-Барр, 12 з яких експресуються лише при літичній реплікації, та 1 (BARF1, приманковий вірусний рецептор колонієстимулюючого фактору, vCSF1R) експресується виключно під час латентного циклу. Під суперкапсидом розташована з'єднувальна структура, що носить назву тегумент, всередині якої розміщений нуклеокапсид тороїдальної форми. Нуклеокапсид має форму гексаедра, що утворений 162 капсомерами. В центрі віріону розташований геном, асоційований з білками нуклеокапсиду [4-6].

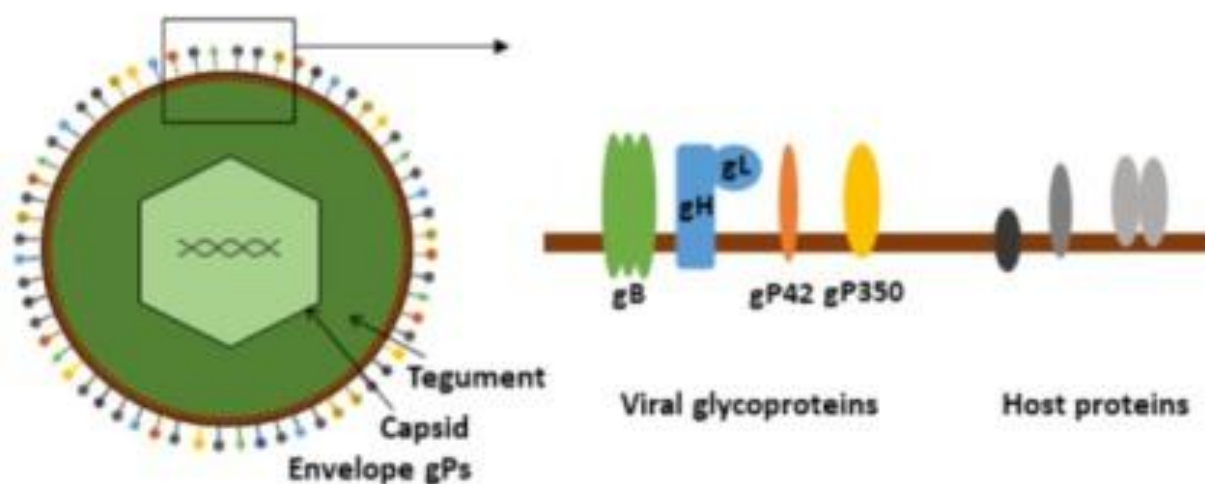


Рис.1.1. Схематичне зображення вірусу Епштейна-Барр [5]

Геном вірусу Епштейна-Барр представлений лінійною дволанцюговою ДНК та має довжину близько 170-180 тисяч пар нуклеотидів. Він містить приблизно 80 відкритих рамок зчитування та більш, ніж 85 генів, зокрема, кодує 44 некодуючих РНК, деякі з яких приймають участь в процесах злоякісної трансформації клітин. Наразі приблизно для 30-40% від усієї кількості генів їх конкретна функція поки що не є остаточно встановленою [4-6].

Вірус Епштейна-Барр належить до підродини  $\gamma$ -герпесвірусів, родина *Herpesviridae*. За оцінками Всесвітньої Організації з Охорони Здоров'я, близько 95% від усього дорослого населення по всьому світу є безсимптомно інфікованими вірусом Епштейна-Барр. В більшості випадків інфікування відбувається в ранньому дитинстві, найчастіше – від членів родини при контакті

з ними, але інфікування можливе також у підлітковому та дорослому віці. Зараження у дитячому віці не має виражених симптомів. Інфекція в підлітків або дорослих може супроводжуватися інфекційним мононуклеозом [4, 7].

В деякого відсотка від загального числа інфікованих розвиваються патології, асоційовані з вірусом Епштейна-Барр. Ці патології також часто є пов'язаними з дефіцитними станами імунної системи (як набутими, зокрема, викликаними вірусом імунодефіциту людини типу 1, так вродженими), генетичною схильністю до розвитку онкологій та факторів навколишнього середовища. Рідше персистуюча інфекція вірусом Епштейна-Барр стає головним фактором розвитку різних видів лімфом [4, 6, 7].

До таких ракових захворювань відносять лімфому Беркітта, лімфому Ходжкіна (лімфогранульоматоз), посттрансплантаційний лімфопроліферативний розлад, Т-клітинну лімфому, хронічну активну інфекцію вірусом Епштейна-Барр, назофарингіальну карциному, рак шлунку (останні два види характерні для людей похилого віку) тощо. В останні десятиліття вплив вірусу Епштейна-Барр також був відмічений у розвитку таких розладів, як множинний склероз та ревматоїдний артрит [4, 6, 7].

Основним способом передачі вірусу Епштейна-Барр є повітряно-крапельний. Передача здійснюється через слину та назофарингіальний секрет, проте також відмічено, що вірус Епштейна-Барр може передаватися при трансплантації органів та переливанні крові [8, 9].

Після первинної інфекції вірус Епштейна-Барр лізогенізується в клітинах В-лімфоцитів, де розташовується в нестабільних регіонах хромосом, проте літичний цикл теж може мати місце – після його реактивації під час активації клітини-хазяїна. При літичній інфекції продукуються нові віріони, чисельність яких контролюється цитотоксичною імунною відповіддю, що здійснюється природними кілерними клітинами та Т-кілерними лімфоцитами. При хронічній інфекції, яка характеризується постійним продукуванням вірі-

онів та встановлюється внаслідок недостатньої імунної відповіді, вірус Епштейна-Барр може також уражувати клітини ендотелію з трансформацією їх у ракові та наступним розвитком карцином [6, 10, 11].

## **1.2. Особливості взаємодії вірусу Епштейна-Барр та лімфобластоїдних клітин**

Лімфома Беркітта є агресивною неходжкінською В-клітинною лімфоною. За класифікацією Всесвітньої Організації з Охорони Здоров'я існує три види лімфом Беркітта – ендемічна, спорадична та пов'язана з імунодефіцитом, що викликається вірусом імунодефіциту людини типу 1 [12, 13].

Основними місцями локалізації вірусу Епштейна-Барр при лімфомі Беркітта є пухлинні скупчення в тканинах, що знаходяться близько до щелеп та лімфатичних вузлів (вірус може також виявлятися й у тканинах ротової порожнини, зокрема, яснах), та в органах черевної порожнини, які приймають участь в очистці крові. Ці пухлинні утворення складаються з однорідної популяції зрілих В-лімфоцитів середнього розміру, які мають округлі ядра з нитками хроматину, що стають видимими внаслідок порушення четвертинної структури хромосом, та можуть містити від одного й більше ядерць [14, 15].

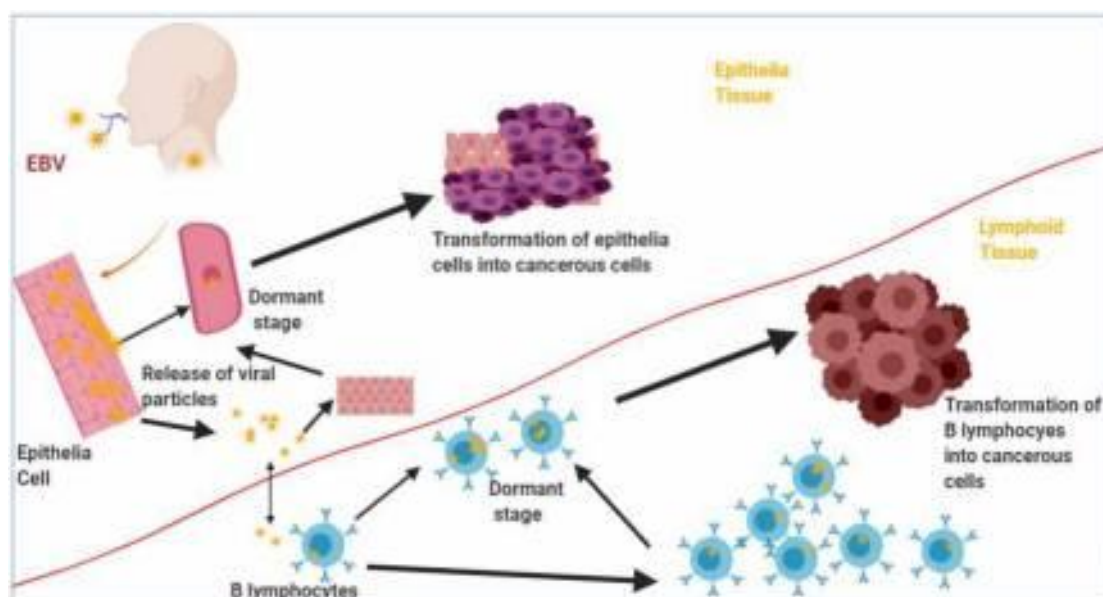


Рис.1.2. Трансформація В-лімфоцитів [12]

При фарбуванні гематоксиліном-еозином уражені клітини мають виражені межі цитоплазматичної мембрани, які набувають нечіткого, «оплавленого» контуру. Такі трансформовані клітини є високопроліферативними та здатними до утворення злоякісних пухлин – тобто, тих, що швидко метастазують [14, 15].

При лімфомі Беркітта експресія генів вірусу Епштейна-Барр відбувається лише при встановленій латентності I типу (усього їх три). Основними антигенами, що утворюються внаслідок цієї експресії, є нуклеарні антигени EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3C та LMP-1, але головні процеси, пов'язані з перетворенням нормальних клітин на ракові, відбуваються за участі антигенів EBNA-1 та LMP-1 як таких, що є притаманними спорадичній лімфомі Беркітта [12, 14, 15].

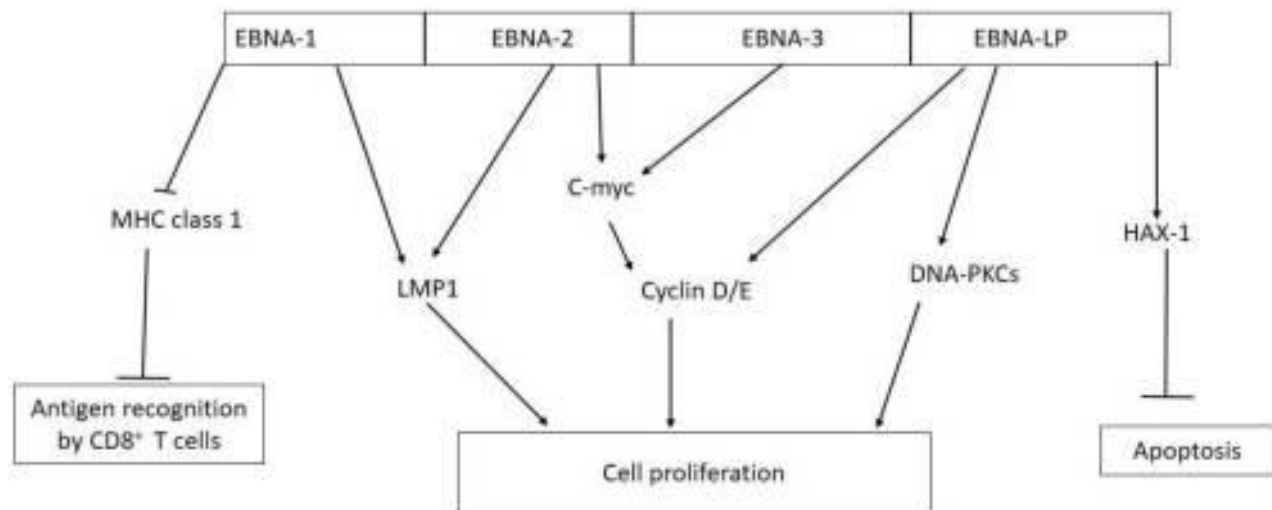


Рис.1.3. Участь нуклеарних антигенів вірусу Епштейна-Барр в трансформації клітин [12]

Експресія білка EBNA-1 в ракових клітинах при лімфомі Беркітта стимулює проліферацію уражених клітин шляхом пригнічення апоптозу, взаємодіючи з білками клітин-хазяїв, такими як сурвивин (антиапоптичний білок) та USP7 (регулятор експресії білка p53, який вважається маркером трансформації клітини на ракову). При цьому стабільним є лише з'єднання білка EBNA-1 з двома білками водночас – USP7 та mdm2. З'єднання лише з білком USP7 порушує нормальну регуляцію білка p53 та пригнічує апоптоз клітини [12, 14, 15].

Перетворення нормальних В-лімфоцитів на ракові найчастіше відбувається через процес транслокації клітинного онкогену *c-myc*; цей процес стимулюється за інтеграції *oriP*-сайту вірусного геному в цю ділянку хромосоми. Родина клітинних генів *myc* складається з регуляторних генів та потенційних онкогенів, що кодують транскрипційні фактори, які регулюють клітинний цикл. Транслокація гену *c-myc* з 8 хромосоми на 14 хромосому є маркером наявності лімфому Беркітта [12, 14, 15].

Найчастіше трапляються транслокації з та на зазначені хромосоми – (8;14)(q24;q32) – з переміщенням протоонкогену під промоторну послідовність важкого ланцюга імуноглобуліну G з наступною постійною експресією

*c-тус*. Іншими транслокаціями є переміщення з 2 хромосоми на 8 хромосому – (2;8)(p12; q24) – та з 8 хромосоми на 22 хромосому – (8;22)(q24; q11); такі транслокації відбуваються рідше. Потрапляння *c-тус* до локусів, де розташовані гени легких ланцюгів імуноглобулінів каппа (2p12) чи лямбда (22q11) призводить до пригнічення його експресії [12, 14, 15].

Активация та транслокація *c-тус* відбувається за участі ферменту цитидиндеамінази (або AID). AID також є важливим ферментом у процесах соматичної гіпермутації та перемикування рекомбінації імуноглобулінових генів, які відіграють важливу роль у процесах гуморального імунітету. Функцією AID є індукція точкових мутацій шляхом дезамінування цитидину до урацилу та, як наслідок, утворення розривів ДНК в генах, що кодують імуноглобуліни [12, 14, 15].

Через те, що цей фермент має здатність до модифікування клітинного геному, AID регулюється не лише на транскрипційному рівні, а й на посттранскрипційному, в процесі транскрипції та певною клітинною локалізацією. AID також регулюється в процесі диференціації В-лімфоцитів й в нормі експресується лише в їх зародковому центрі. Інфекція вірусом Епштейна-Барр індукує активність AID шляхом взаємодії його з антигенами LMP-1 та EBNA-3С, наслідком чого є накопичення точкових мутацій. Індукція LMP-1 є непрямою, через підвищення регуляції транскрипційного фактору Egr-1. EBNA-3С прямо приєднується до регуляторних елементів гену AICDA, що кодує AID. При цьому, підвищена експресія EBNA-2 пригнічувала експресію AID [12, 14, 15].

### 1.3. Властивості наночастинок срібла та золота

Наночастинки, за визначенням Міжнародної Організації зі Стандартизації (ISO), є об'єктами, розмір яких визначається у нанометрах, а їх найдовші та найкоротші осі майже не відрізняються одна від одної, тобто є однаковими. Зазвичай наночастинки є невеликими твердими колоїдними частинками з діаметром, що не перевищує 1 мкм. Класифікація наночастинок базується на їх фізичних властивостях – за розміром та матеріалами, з яких вони зроблені [16, 17].

За розміром наночастинки поділяють на крупні (від 500 нм), середнього розміру (100-500 нм) та дрібні (1-100 нм); від розміру наночастинок напряду залежать їх фізико-хімічні властивості. Залежно від матеріалу, наночастинки можуть бути металічної, діелектричної, напівпровідникової, магнітної чи органічної природи або поєднувати в собі властивості кількох матеріалів – як органічних, так і неорганічних, тобто, окрім самостійної взаємодії з клітинами, можуть виступати як носії для органічних речовин (наприклад, лікарських речовин) [16, 17].

Найчастіше наночастинки мають сферичну форму як таку, що має найбільшу площу взаємодії, й структурно можуть бути матрицеподібними (частинка виступає як носій для якоїсь речовини) або капсулоподібними (частинка є включеною всередині цієї речовини) [16, 17].

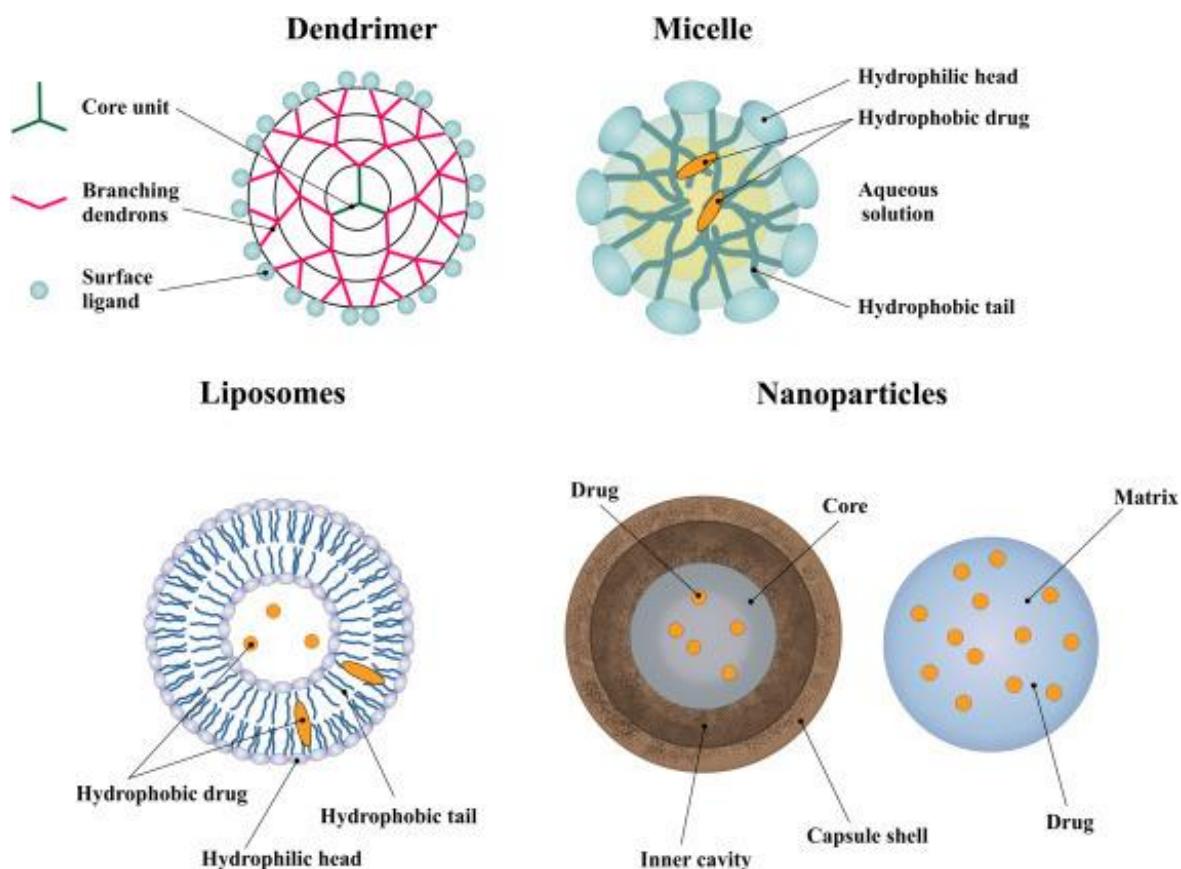


Рис.1.4. Різновиди наночастинок [17]

Наночастинки використовуються в багатьох наукових та виробничих галузях, проте найчастіше виступають як об'єкт біологічних та екологічних досліджень. Основною причиною цієї уваги до них саме в цих галузях є їх розмір та взаємодія з іншими речовинами. В екологічних дослідженнях наночастинок використовуються як об'єкти, які можуть як бути потенційно токсичними для довкілля, так і засобом його очищення. В біологічних дослідженнях наночастинок виступають як компоненти досліджуваних речовин або самі по собі з метою визначення їх впливу на біологічні об'єкти з наступним використанням їх в лікувальних цілях [16, 17].

Частинки срібла отримали найбільше поширення в медицині, оскільки мають антибактеріальні, протівірусні, протизапальні, протигрибкові та протиракові властивості, які підтверджуються значною кількістю досліджень. Ці властивості зумовлені високою спорідненістю молекул срібла до сульфатних

та фосфатних залишків, які містяться в складі білків, які утворюють цитоплазматичні мембрани [16, 18].

Зокрема, відмічено, що життєздатність бактеріальних клітин знижувалася при взаємодії срібла з сірковмісними білками в складі клітинних стінок. Також відзначається, що частинки срібла мають здатність до взаємодії з фосфатвмісними ділянками ДНК, порушуючи реплікацію, та сірковмісними ферментами, які її забезпечують, якщо якимось чином потрапляють всередину клітини [16, 18].

Цитотоксичність наночастинок срібла як речовини металічної природи щодо певних типів клітин визначається в основному їх розміром та формою. Зокрема, *Sriram, M.I. et al.* відзначають в своєму дослідженні, що цитотоксичний вплив наночастинок срібла є обернено пропорційним їх розміру. Тобто, чим меншим є діаметр наночастинок, тим вищий цитотоксичний вплив на клітини вона виявлятиме. Це відбувається через те, що менший розмір наночастинок дозволяє більшій їх кількості прикріплюватися до цільового об'єкта й, відповідно, мати більшу площу взаємодії, аніж великі наночастинок. Також *Nallathamby, P.D.* та *Xu, X-H.N.* встановили, що оптимальним діаметром наночастинок срібла для того, аби вони мали високу спорідненість до трансформованих клітин, є 11 нм [19-21].

В подальших дослідженнях наночастинок срібла було також відмічено, що вони, окрім цитотоксичного впливу, здатні також виявляти й антивірусну активність, зокрема, й щодо  $\gamma$ -герпесвірусів. Показано, що взаємодія наночастинок срібла з клітинами, трансформованими вірусом саркоми Капоші або вірусом Епштейна-Барр, що перебували інтегрованими до клітинного геному, викликала їх реактивацію, ексцизію та подальшу реплікацію за літичним шляхом, наслідком чого була загибель уражених клітин [16, 18].

Як і наночастинок срібла, наночастинок золота широко використовуються в медицині як терапевтичні агенти або їх носії завдяки багатофункціо-

нальності поверхні цих частинок. Наночастинки золота використовують для кон'югації та доставки таких речовин, як олігонуклеотиди, імуноглобуліни, білки тощо. Зокрема, відомо, що наночастинки золота, подібно до наночастинок срібла, виявляють протиракову, протизапальну та противірусну активність [22, 23].

Окрім медичного застосування, наночастинки золота можуть використовуватися в діагностиці. Зв'язування наночастинок золота з певними речовинами призводить до змін в їх властивостях (наприклад, зміні ступеню електропровідності), завдяки чому створюється сигнал, який можна вловити [22, 23].

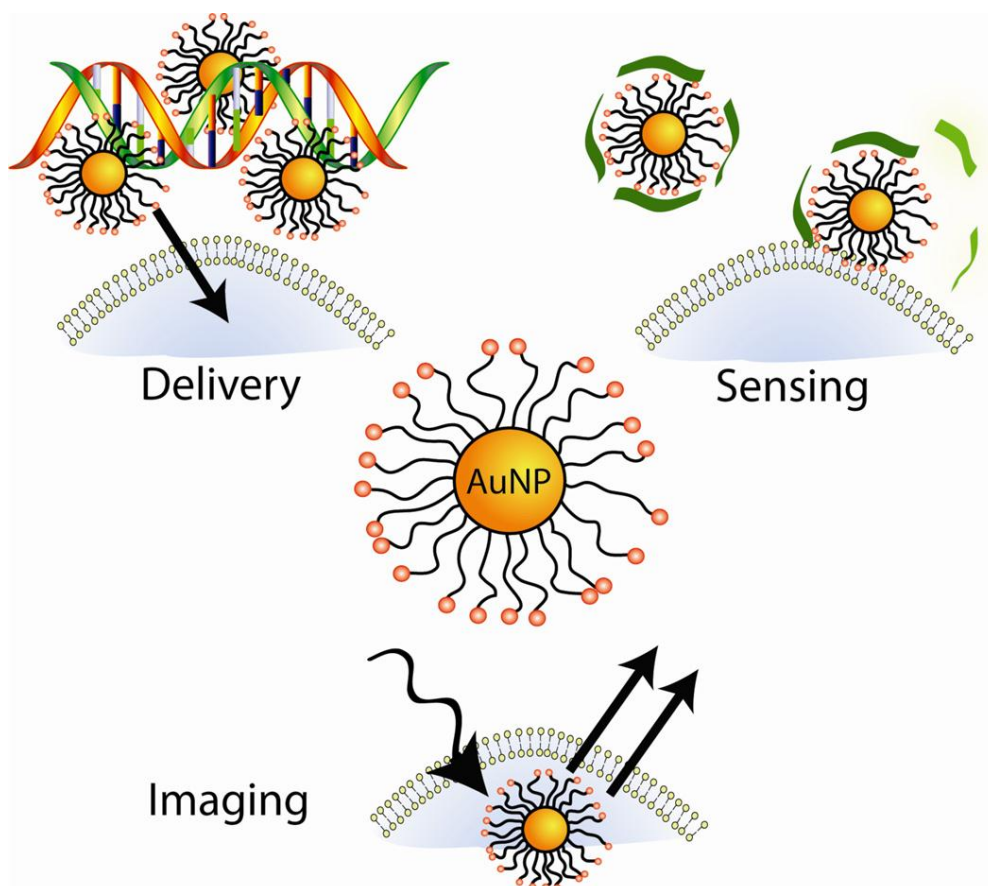


Рис.1.5. Застосування наночастинок золота в нанобіотехнологіях [23]

Одним з прикладів використання наночастинок золота є успішне застосування колоїдного золота як терапевтичного агента при лікуванні ревматоїдного артриту (за даними, отриманими *Abraham G.E. et al.*) та як вектору дос-

тавки фактору некрозу пухлин (TNF- $\alpha$ ) у пухлинні скупчення клітин, що досліджувалося *in vivo* на гуманізованих мишах. В цьому дослідженні наночастинки золота виступали носієм для фактору некрозу пухлин й специфічно зв'язувалися з раковими клітинами. Було відмічено високий рівень вмісту наночастинок золота в пухлинних скупченнях, оскільки спорідненість їх до ракових клітин, підсилена фактором некрозу пухлин, дозволяла їх накопичення. Показано, що таке накопичення відбувалося у випадку лімфом; в здорових органах кровоносної системи, без пухлинних метастазів, такого накопичення не відбувалося [22-24].

В цьому дослідженні фактор некрозу пухлин, кон'югований з наночастинками золота, був показаний як такий, що мав більшу ефективність та нижчу токсичність порівняно з нативним фактором некрозу пухлин, продукованим організмом хазяїна, оскільки кількість використаної речовини була зменшеною за рахунок підсилення її дії наночастинками золота та більш точної доставки [22-24].

Крім того, наночастинки золота виявили протизапальну активність, оскільки можуть специфічно зв'язуватися з ендотеліальним фактором росту й таким чином зменшують залучення великої кількості макрофагів до місця запалення й знижують ступінь запалення. Протизапальні властивості спостерігалися в дослідженнях як *in vitro*, так й *in vivo*. Показано, що ці ж властивості наночастинок золота також підвищували апоптоз уражених клітин при хронічній лімфоцитарній лейкемії (за даними, отриманими *Mukherjee P.et al.*) та пригнічували проліферацію ракових клітин при множинній мієломі (за даними, отриманими *Bhattacharya R.et al.*) [22, 25, 26].

Маючи властивості, характерні й для інших металічних наночастинок, ефективність наночастинок золота змінювалася в залежності від їх форми та розміру. Як носії для лікарських речовин зазвичай використовують наночастинки сферичної форми, в той час як витягнута форма наночастинок є більш зручною для використання їх в діагностиці [22].

Сферичні наночастинки виявляли такі властивості, як високе співвідношення поверхні до об'єму, висока біосумісність та низька токсичність для здорових клітин. Відомо, що основним місцем накопичення наночастинок золота є органи ретикулоендотеліальної системи; при цьому накопичуються в основному наночастинки з діаметром 10-100 нм. Тобто, здатність накопичуватися є прямо пропорційною їх розміру – чим меншим є діаметр наночастинки, тим нижчим є рівень накопичення [22].

Для виведення накопичених наночастинок з органів, що беруть участь в кровотворенні (печінка та селезінка), потрібно близько 3-4 місяців, через що виникає необхідність досліджувати також їх здатність викликати локальні запальні процеси та встановлення дозування, за якого накопичення буде низьким [22].

Наночастинки золота отримують переважно фізичними способами, а саме плавленням. Зокрема, *Turkevich et al.* створили метод для отримання наночастинок золота шляхом утворення гідроген тетрахлораурату ( $\text{HAuCl}_4$ ) з лимонною кислотою в киплячій воді, де лимонна кислота відіграє роль відновлювального агента та стабілізатора [23].

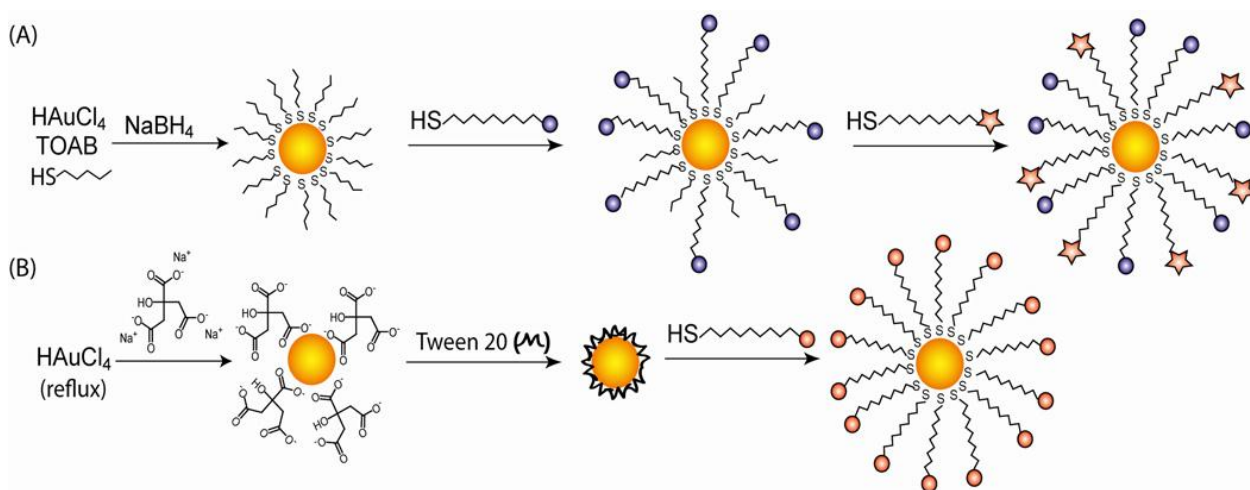


Рис.1.6. Отримання наночастинок золота за *Turkevich et al.* [23]

Цей метод був доповнений *Frens et al.*; доповнення полягало в зміні співвідношення наночастинок до стабілізатора, що дозволило отримувати

наночастинки приблизно однакового діаметру. Цей протокол наразі широко використовується для отримання розчинів доволі стабільних сферичних наночастинок золота з діаметром 10-20 нм. Спрямованість на такий розмір пов'язана зі здатністю частинок проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр – для цього їх розмір не має перевищувати 20 нм. Крім того, частки, що мають розмір 1-2 нм, є більш токсичними через свою здатність необоротно зв'язуватися з внутрішньоклітинними полімерами [23].

#### **1.4. Вплив опромінення на властивості наночастинок**

Опромінення наночастинок металічних речовин (до яких також належать срібло та золото) інфрачервоним лазером здійснюється з метою їх активації. Внаслідок цього змінюються певні властивості наночастинок, зокрема, проявляється така оптична властивість, як локалізований поверхневий плазмонний резонанс. При цьому для наночастинок срібла таке явище не було відмічене [27].

Поверхневий плазмонний резонанс – це оптична властивість деяких металічних наночастинок, що є колективним коливанням вільних електронів в зоні провідності під впливом електромагнітного поля. При активації лазерним опроміненням поверхневий плазмонний резонанс індукує фотон-електронні та електрон-електронні взаємодії. Електрони на поверхні металічних наночастинок колективно осцилюють у відповідь на опромінення; сила цих взаємодій визначається довжиною хвилі [27, 28].

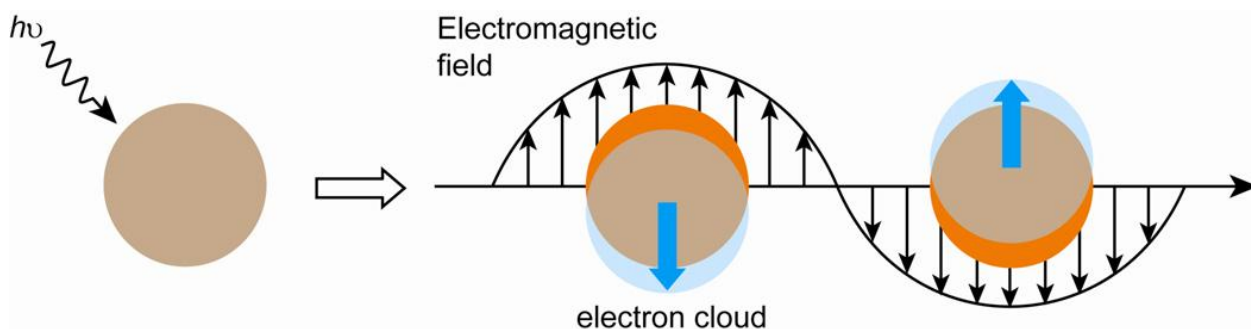


Рис.1.7. Поверхневий плазмонний резонанс [23]

Внаслідок цього в спектрі відбитого світла з'являються піки, які були відсутні в спектрі збуджуючого світла. Якщо на наночастинці іммобілізовано білок (наприклад, антитіло), що має здатність до поглинання світла та має таку саму частоту поглинання, що й плазмонний резонанс, то в піку розсіювання з'являється прогалина в тій області спектра, де світло поглинається білком [27, 28].

Незважаючи на те, що пік поверхневого плазмонного резонансу наночастинок золота залежить від їх геометричної форми та розміру, критичним показником ефективності гіпертермії, опосередкованої наночастинами золота, що є активованими опроміненням, є кількість енергії, доставленої за певний час й на певну площу. Кількість та підсилення тепла, генерованого за допомогою цього резонансу, визначаються концентрацією наночастинок, довжиною хвилі опромінення (яку обирають залежно від піку абсорбції) й типом лазера [27].

Вплив гіпертермії на клітини полягає в тому, що під дією нагрівання змінюється проникність цитоплазматичної мембрани, що призводить до її руйнування. Гіпертермія як явище використовується у таких терапевтичних методах, як радіаційне опромінення та дія ультразвуком, проте її використання обмежується тим, що нагрівання діє невибірково та впливає також на нормальні клітини [27].

Для того, аби зробити дію гіпертермії націленою саме на ракові клітини з мінімальним впливом на здорові, застосовують наночастинки золота. Ці наночастинки мають здатність до специфічної кон'югації з поверхневими білками трансформованих клітин (як специфічними для онкогенних вірусів, якими уражені ці клітини, так і специфічними білками, що є маркерами трансформації клітини в ракову) [27].

Також важливим є те, що наночастинки (найчастіше золота) здатні до накопичення в уражених тканинах, що дозволяє локально підвищувати ступінь нагрівання, завдяки чому можна використовувати меншу потужність лазера й точково діяти на пухлинні утворення. Зокрема, *Raji et al.* продемонстрували, що наночастинки золота, кон'юговані з антитілами до рецептора епідермального фактора росту, можуть вибірково націлюватися на епітеліальні ракові клітини та індукувати загибель цих клітин після активації наночастинок лазером [27, 29].

В дослідженнях, проведених *Qu et al.* та *Krpetić et al.*, було показано, що наночастинки можуть поглинатися клітинами за допомогою невибіркового ендоцитозу з використанням рецепторів. Після опромінення та активації наночастинок вони призводять до перегріву та загибелі цих клітин. Проте у тому випадку, коли наночастинки не були поглинені, а лише кон'юговані з цитоплазматичною мембраною, нагрів, опосередкований поверхневим плазмонним резонансом, призводив тільки до пошкодження мембрани, й клітини мали змогу відновитися при подальшому культивуванні [27, 30, 31].

Опромінення також впливає на нецільові клітини. Цей вплив відзначається змінами в структурі цитоплазматичної мембрани та зміні швидкості метаболічних процесів. Як і у випадку з цільовими клітинами, ефект опромінення залежить від його інтенсивності, тривалості та концентрації наночастинок. Проте, на відміну від трансформованих, опромінення не має настільки пригнічувального ефекту на проліферацію нормальних клітин [27].

Ефективність наночастинок як підсилювачів тепла, генерованого опроміненням, варіює залежно від типу лазера та його потужності й довжини хвилі. Зокрема, в дослідженні, проведеному *Day et al.*, показано, що за опромінення наночастинок золота імпульсним лазером з довжиною хвилі 800 нм та високою потужністю (50 мВт) відзначався високий відсоток смертності клітин, в той час як низька потужність (1 мВт) з використанням цього ж лазера та при тій самій довжині хвилі мала невеликий вплив на життєздатність клітин та була використана для виявлення та візуалізації клітин [32, 33].

Окрім опромінення, великий вплив на ефективність наночастинок має також їх форма. В дослідженні, проведеному *Huang et al.*, було показано, що сферичні наночастишки срібла та золота, що знаходилися в складі аптамеру, вимагали меншої потужності лазера для утворення поверхневого плазмонного резонансу, аніж ті наночастишки, що мали форму стержня чи становили собою нанооболонку [32, 34].

Значний вплив також виявляють певні співвідношення наночастинок срібла та золота. Оскільки обидва види наночастинок є металічними речовинами, між ними існує певна інтерференція. В експерименті, описаному *Hu et al.*, досліджувалися різні співвідношення наночастинок срібла та золота, що входили до складу без'ядерних дендритів, зокрема, ці співвідношення становили 0,3 золота до 0,7 срібла та 0,06 золота до 0,94 срібла. Для цих наночастинок була показана висока біосумісність [32, 34].

Після опромінення наночастинок інфрачервоним лазером з довжиною хвилі 800 нм було відмічено різке зниження життєздатності трансформованих клітин в тих зразках, куди було додано 0,3 золота та 0,7 срібла; потужність лазера становила 10-15 Вт/см<sup>2</sup>. Це може свідчити про те, що більш токсичними щодо трансформованих клітин мають наночастишки срібла, в той час як наночастишки золота значно підсилюють цей ефект, руйнуючи клітинну мембрану [32, 34].

### 1.5. Цитотоксичний вплив та антивірусна активність наночастинок

Окрім вибіркового цитотоксичного впливу щодо лімфобластоїдів, наночастинок срібла та золота виявляють антивірусні властивості щодо широкого спектру вірусів, зокрема, вірусу грипу А, вірусу гепатиту В, вірусу імунодефіциту людини, вірусу парагрипу та майже всіх представників родини  $\gamma$ -герпесвірусів, до якої входять потенційно онкогенні віруси – віруси простого герпесу 1 та 2 типу, вірус саркоми Капоші та вірус Епштейна-Барр [18].

Щодо останньої групи вірусів *Mohammed Fayaz, A. et al.* та *Halder, A. et al.* встановили, що наночастинок срібла та золота мають здатність до зменшення інфекційності зрілих вірусних частинок, але за умови, що наночастинок мають сферичну форму. Також *Wan, C. et al.* встановили, що після кон'югації клітин з наночастинками срібла та золота відбувалася реактивація провірусу й наступне продукування нових віріонів. Також було встановлено, що реактивація індукується утворенням активної форми кисню в уражених ракових клітинах [18, 35-37].

Одним з потенційних механізмів, завдяки яким виявляється антивірусна активність наночастинок срібла та золота (як незалежно один від одного, так й у вигляді сплаву), є взаємодія їх з поверхневими глікопротеїнами герпесвірусів, що створює конкуренцію за сайти зв'язування зі специфічними рецепторами клітин, перешкоджає абсорбції та викликає інактивацію вірусної частинки (за даними, отриманими *Perlman, S. et al*, *Zhang, B. et al* та *Robba, C. et al.*). Також відомо, що наночастинок срібла здатні впливати на вірусну дволанцюгову ДНК та порушувати її реплікацію шляхом кон'югації з фосфатними залишками [18, 38-40].

На відміну від багатьох антивірусних речовин, які використовуються в медицині, наночастинок срібла та золота не стають причиною селекції резистентних штамів вірусів та виявляють також активність не лише щодо вірусів,

але й щодо клітин, уражених ними, в тому числі й ракових. Існує припущення, що такі цитотоксичні властивості забезпечуються наявністю специфічних вірусних глікопротеїнів на поверхні уражених клітин, які експресуються при III типі латентності вірусу Епштейна-Барр [18].

В дослідженні, проведеному *Chunlei Wan et al.*, відзначалося, що наночастинки срібла, що мали сферичну форму та діаметр, що не перевищував 25 нм, мали найвищу токсичність щодо саме тих трансформованих клітин, які були латентно уражені вірусом Епштейна-Барр. Загибель клітин відбувалася саме через реактивацію латентного вірусу Епштейна-Барр та продукування нових віріонів за літичним шляхом [37].

У цьому ж дослідженні при дослідженні токсичності наночастинок щодо клітин було встановлено, що виживаність трансформованих клітин В-лімфоцитів при додаванні до них наночастинок срібла залежала від концентрації цих наночастинок. Так, за дози препарату 15 мкг/мл та інкубації протягом 72 годин виживаність клітин становила 80% від загальної популяції, при цьому виживаність знижувалася до менш, ніж 50% від загальної популяції, якщо доза становила 5 мкг/мл, а інкубація відбувалась протягом 48 годин. Тобто, найвищу ефективність ці наночастинки мали за короткої інкубації та невисокої концентрації [37].

Загалом, отримані результати свідчили про те, що інфіковані В-лімфоцити виявились більш чутливими до дії наночастинок срібла (та, можливо, й інших металічних речовин з подібними властивостями, на кшталт золота), аніж нормальні клітини [37].

Додатково було виявлено, що наночастинки срібла також блокували первинну інфекцію вірусом Епштейна-Барр некомпromетованих клітин шляхом прямого руйнування новоутворених віріонів вірусу Епштейна-Барр за зв'язування з ними [37].

Відомо, що цитотоксичність наночастинок була специфічною щодо ракових клітин, уражених вірусом Епштейна-Барр, і менш специфічною щодо ракових клітин, не асоційованих з вірусом, та нормальних клітин В-лімфоцитів. Було відмічено, що ця цитотоксичність та індукція літичного циклу можуть бути блоковані речовиною NAC, що відіграє важливу роль в утворенні активної форми кисню [37].

Проте також було зазначено, що пригнічувальний ефект наночастинок срібла на пухлинні утворення, асоційовані з вірусом Епштейна-Барр, спостерігався (та досліджувався) *in vitro*, в той час як цей ж ефект був значно нижчим в дослідженнях *in vivo*. Така різниця може пояснюватися тим, що лише невелика частина введених наночастинок здатна акумулюватися в цільових тканинах та дійсно мати якийсь ефект. Для усунення цієї проблеми пропонується кон'югувати наночастинок зі специфічними поліпептидами (специфічними щодо ракових клітин чи вірусів) [37].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Культура клітин

Культура клітин – P3HR-1, трансформовані В-лімфоцити, які хронічно продукують вірус Епштейна-Барр [41, 42]. Культуру було надано Інститутом експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

#### 2.2. Умови вирощування культури

Культуру ревіталізували та вирощували на поживному середовищі RPMI 1640 (Biowest, Франція) з додаванням ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), що складала до 15% від загального об'єму поживного середовища, та антибіотика ампіциліну (100 мкг/мл, Sigma, США).

Культуру вирощували в матрацах CELLSTAR (greiner bio-one, Австрія) при температурі 37°C з додаванням 5% CO<sub>2</sub> в атмосфері з використанням інкубатора Midi (Thermo Fisher Scientific, США). Кожні 2-3 дні поживне середовище оновлювали, а культуру розсівали до посадкової щільності. Зазвичай щільність культури збільшувалася до показника  $2 \times 10^6$  кл/мл. Щільність підраховували за допомогою камери Горяєва з фарбуванням вітальним барвником 0,4%-ним трипановим синім (BioGroxx, Німеччина) [41].

### 2.3. Збереження та відновлення культури

Культуру зберігали в кріопробірках (SPL, Південна Корея) при температурі  $-81^{\circ}\text{C}$  в рідкому азоті в ультранизькотемпературній установці VT-78 (Vestfrost Solutions, Данія). Об'єм культури в кріопробірках становив 1 мл, щільність культури –  $4-6 \times 10^6$  кл/мл.

Для ревіталізації кріопробірки з культурою виймали з ультранизькотемпературної установки, розморожували при кімнатній температурі. По завершенні розморожування вміст кріопробірок переносили до планшету (12-лункового, SPL, Південна Корея) з дотриманням асептичних умов й додавали до клітин 1-2 мл свіжого поживного середовища. Клітини ресуспендували в середовищі, відбирали аліквоту для підрахунку щільності клітин, використовуючи вітальний барвник 0,4%-ний трипановий синій (BioFroxx, Німеччина), та розводили клітини до посадкової щільності.

На наступний день здійснювали перевірку проліферативної здатності та пересівання клітин. За необхідності вміст лунок центрифугували при 1500 об/хв протягом 10 хв при  $20^{\circ}\text{C}$  на високошвидкісній центрифугі TGL-20MB (Biosan, Латвія) для видалення диметилсульфату.

### 2.4. Досліджувані сполуки

Біметалеві наночастинки з різним вмістом срібла та золота були синтезовані та надані Інститутом хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України. Концентрація біметалевих наночастинок становила 10 мкг/мл. Вміст срібла та золота в наночастинках наведений в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1. Склад біметалевих наночастинок

<i>Сполука (маркування)</i>	<i>Вміст металу, %</i>	
	<i>Срібло</i>	<i>Золото</i>
t2	75	25
t3	50	50
t4	25	75

Інфрачервоний лазер, використаний для активації наночастинок, був зроблений та наданий Інститутом фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України. Довжина хвилі опромінення складала 800 нм, потужність лазера становила 10-15 Вт/см<sup>2</sup>.

### **2.5. Фарбування вітальним барвником трипановим синім**

Для проведення візуального підрахунку кількості живих та мертвих клітин з клітинної суспензії відбирали аліквоту та додавали до неї рівний об'єм 0,4%-го розчину барвника трипанового синього (BioFroxx, Німеччина). Клітини ресуспендували в розчині барвника для того, аби мертві клітини забарвилися, після чого відбирали аліквоту суміші та вміщували її в комірку на камері Горяєва. Мікроскопіювали зі збільшенням х40 та візуально підраховували кількість живих та мертвих клітин [43].

Життєздатність клітин визначали за формулою [43]:

$$X = ((X_z - X_m) \times 16665) \times 2, \quad \times 10^6 \text{кл/мл}$$

де  $X_z$  – загальна кількість клітин;

$X_m$  – кількість мертвих клітин.

## 2.6. Тест МТТ

Для проведення тесту МТТ клітинну суспензію відбирали та вносили в лунки 96-лункового планшету (SARSTEDT, Німеччина) в об'ємі по 100 мкл на лунку, додавали барвник МТТ (BioFroxx, Німеччина) в об'ємі по 20-25 мкл на лунку. Планшет вміщували до в інкубатору Midi (Thermo Fisher Scientific, США) та інкубували при температурі 37°C з додаванням 5% CO<sub>2</sub> в атмосфері протягом 3 годин.

Після інкубації планшет центрифугували при 1000 об/хв протягом 10 хв на центрифугі лабораторній LMC-3000 (Biosan, Латвія). Надосад обережно відбирали та відкидали. До осаду, що залишився, додавали по 100-150 мкл 96%-го розчину спирту.

Планшет струшували протягом 5-10 хв для того, аби кристали формаза-ну розчинилися в спирті. Після цього оптичну густину розчину вимірювали на імуноферментному аналізаторі Multiskan FC universal microplate reader (Thermo Scientific, США) при довжині хвилі 538 нм [44].

Зміну мітохондріальної активності клітин визначали за формулою [45]:

$$X = (\text{ОГ}_{\text{дк}} / \text{ОГ}_{\text{кк}}) \times 100, \%$$

де  $\text{ОГ}_{\text{дк}}$  – оптична густина розчину, що містить досліджувані зразки;

$\text{ОГ}_{\text{кк}}$  – оптична густина розчину, що містить контроль клітин.

## 2.7. Реакція з барвником нейтральним червоним

Для проведення реакції з нейтральним червоним клітинну суспензію відбирали та вносили на 96-лунковий планшет (SARSTEDT, Німеччина) в об'ємі по 100 мкл на лунку, центрифугували при 1000 об/хв протягом 10 хв на центрифугі LMC-3000 (Biosan, Латвія). Надосад відбирали та відкидали. До осаду додавали барвник нейтральний червоний в об'ємі по 100-150 мкл на лунку. Планшет вміщували до інкубатору Midi (Thermo Fisher Scientific, США) та інкубували при температурі 37°C з додаванням 5% CO<sub>2</sub> в атмосфері протягом 3 годин.

Після інкубації планшет центрифугували при 1000 об/хв протягом 10 хв на центрифугі LMC-3000 (Biosan, Латвія). Надосад обережно відбирали та відкидали, до осаду, що залишився, додавали по 100-200 мкл фосфатного буферного розчину (PBS) та центрифугували при 1000 об/хв протягом 10 хв на центрифугі LMC-3000 (Biosan, Латвія). Надосад обережно відбирали та відкидали. До осаду, що залишився, додавали по 150 мкл розчинника.

Планшет струшували протягом 5-10 хв для того, щоб екстрагувати барвник з клітин. Після цього яскравість розчину вимірювали на імуноферментному аналізаторі Multiskan FC universal microplate reader (Thermo Fisher Scientific, США) при довжині хвилі 538 нм [46].

Зміну лізосомальної активності клітин визначали за формулою [45]:

$$X = (\text{ОГ}_{\text{дк}} / \text{ОГ}_{\text{кк}}) \times 100, \%$$

де  $\text{ОГ}_{\text{дк}}$  – оптична густина розчину, що містить досліджувані зразки;

$\text{ОГ}_{\text{кк}}$  – оптична густина розчину, що містить контроль клітин.

## **2.8. Виділення ДНК**

Виділення ДНК проводили з використанням набору AvT-E100 (ТОВ “Астрівір Текнолоджі”, Україна) з дотриманням інструкції виробника [47].

## **2.9. Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК**

З пробірок, що містили виділену ДНК, відбирали по 5 мкл та вміщували їх на аналізатор спектрофотометра DS-11 FX + (DeNovix, США), міряли при довжині хвилі 260/280 нм.

## **2.10. Полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу**

Полімеразну ланцюгову реакцію в режимі реального часу проводили з метою визначення вмісту ДНК вірусу Епштейна-Барр в загальній ДНК. Ампліфікацію проводили з використанням набору K013 (ТОВ “Укрґентех”, Україна) з дотриманням інструкції виробника на приладі QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific, США) [48].

Антивірусну активність наночастинок щодо вірусу Епштейна-Барр визначали за формулою [49]:

$$X = (PCR/Sp)/(PCR_{kk}/Sp_{kk}) \times 100, \%$$

де PCR – кількість ДНК вірусу Епштейна-Барр, ампліфікованого;

Sp – кількість ДНК, виділеної з проби, нг/мкл;

PCR<sub>kk</sub> – кількість ДНК клітин контролю;

Sp<sub>kk</sub> – кількість ДНК, виділеної з проби з клітинами контролю, нг/мкл.

## 2.11. Статистична обробка результатів

Статистичний аналіз було здійснено з дотриманням стандартного підходу, використовуючи програму Microsoft Excel 2010. Наведені дані подані як є зі стандартним відхиленням. Усі дослідження були виконані в трьох повторах. Різниця між значеннями в повторах одного дослідження була врахована згідно t-критерію Стюдента й була врахована за прийнятну при P<0.05.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Для дослідження цитотоксичності біметалевих наночастинок клітини культури P3HR-1 вирощували, обробивши їх наночастинками, концентрація яких становила 1 мкг/мл. Така концентрація була обрана з огляду на те, що в умовах *in vivo* біметалеві наночастинок срібла та золота здатні накопичуватися в уражених тканинах, про що відомо з літературних джерел.

Відбір проб здійснювали через 1, 4 та 24 години після обробки клітин з метою визначення тривалості їх дії, а також встановлення, на якому проміжку часу після обробки наночастинок виявляли найвищий рівень цитотоксичності.

Для дослідження антивірусної активності біметалевих наночастинок клітини вирощували за тих самих умов, що й для визначення цитотоксичності. Для визначення впливу наночастинок на накопичення ДНК вірусу в культурі культивування здійснювали протягом 24 годин для того, щоб індукувати перехід вірусу до літичного циклу.

#### **3.1. Вплив інфрачервоного опромінення на проліферативну здатність культури P3HR-1**

Визначення проліферативної здатності клітин проводили фарбуванням вітальним барвником трипановим синім. Цей метод ґрунтується на тому, що барвник трипановий синій забарвлює мертві клітини, цитоплазматична мембрана яких пошкоджена [45]. Отримані результати наведено на рис.3.1.

При опроміненні клітин культури P3HR-1 інфрачервоним лазером було відмічено зниження проліферативної здатності клітин на 13% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 18%, через 24 години – на 2%.

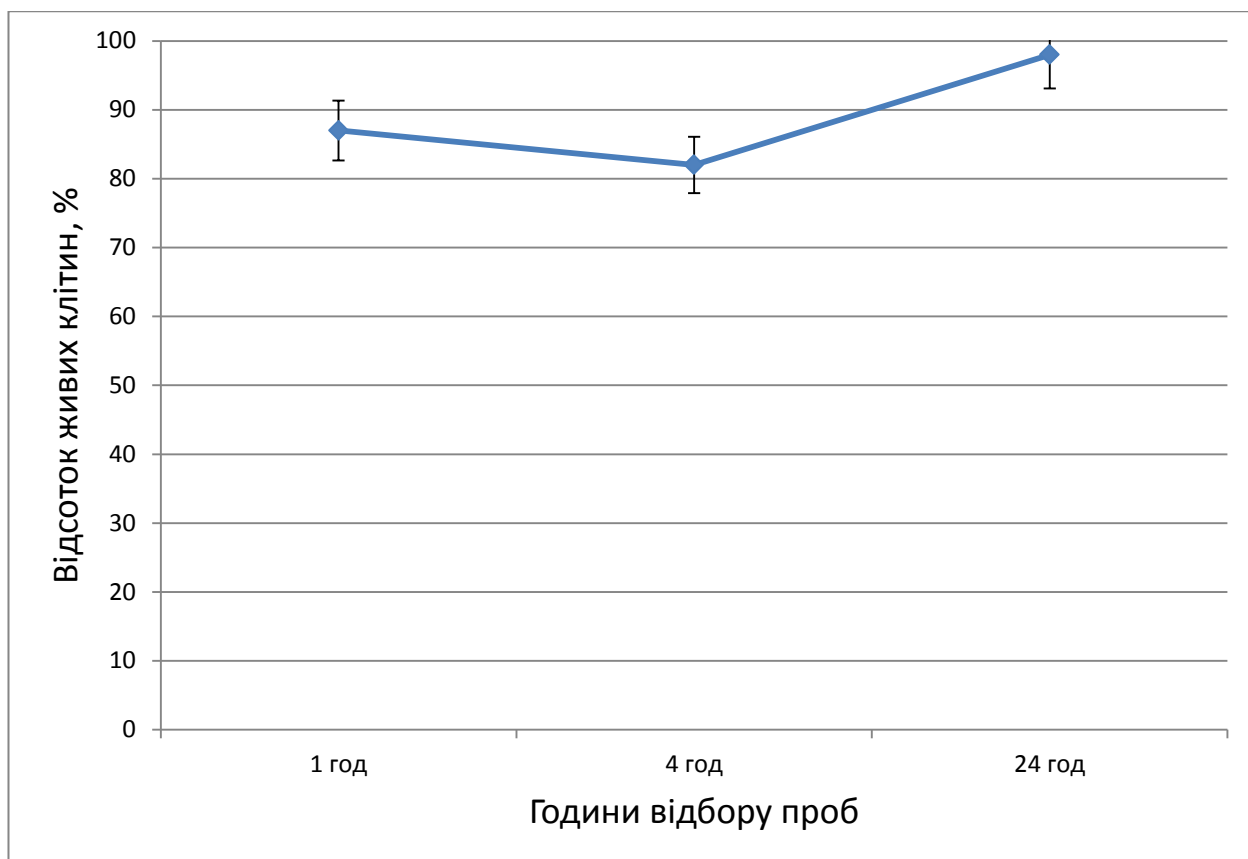


Рис. 3.1. Вплив інфрачервоного опромінення на життєздатність клітинної популяції в порівнянні з контролем

Таким чином, одноразове опромінення виявляє короткостроковий вплив на проліферативну здатність клітин, проте не виявляє значного ефекту в тому випадку, якщо культивування триває добу чи більше.

### **3.2. Вплив наночастинок на проліферативну здатність клітин культури РЗНР-1**

Вплив наночастинок на проліферативну здатність клітин визначали фарбуванням вітальним барвником трипановим синім. Визначення проліферативної здатності є доцільним для визначення, чи обробка наночастинок пригнічує репродукцію трансформованих клітин [45]. Отримані результати наведено на рис.3.2 та рис.3.3.

При додаванні неактивованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 75%, а золота – 25%, було відмічено зниження проліферативної здатності на 12% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 8%, через 24 години – на 10%. Ця сполука не виявляла високої токсичності щодо клітин.

При додаванні неактивованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 50%, а золота – 50%, було відмічено зниження проліферативної здатності на 31% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 10%, через 24 години – на 5%. Ця сполука демонструвала короткострокову та невисоку токсичність щодо клітин через 1 годину після обробки.

При додаванні неактивованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 25%, а золота – 75%, було відмічено зниження проліферативної здатності на 3% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 23%. Через 24 години – на 5%. Дія даної сполуки є короткостроковою та проявляється через 4 години після обробки.

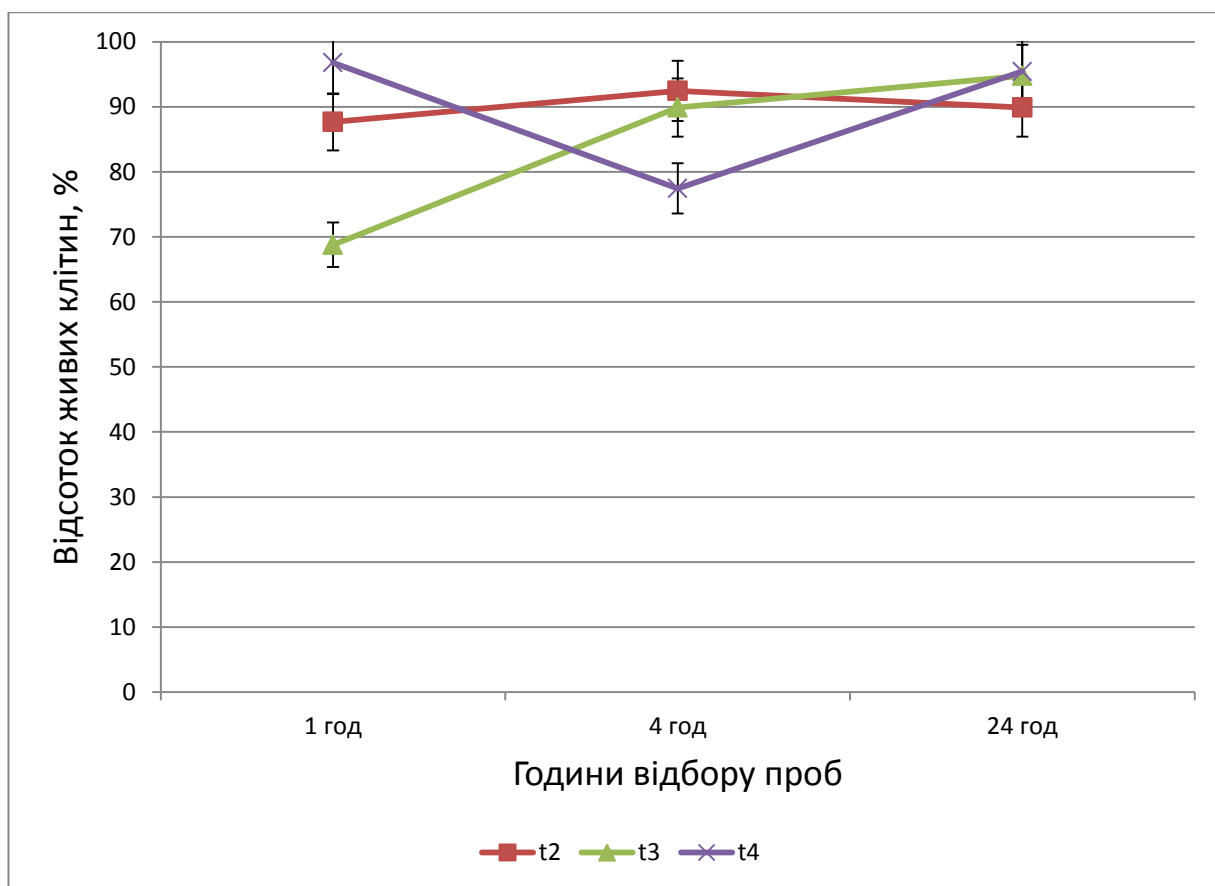


Рис. 3.2. Вплив неактивованих наночастинок на проліферативну здатність клітин

При додаванні активованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 75%, а золота – 25%, було відмічено зниження проліферативної здатності на 11% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 11%, через 24 години – на 13%. Ця сполука, як й нективований варіант, не є високотоксичною для клітин.

При додаванні активованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 50%, а золота – 50%, було відмічено зниження проліферативної здатності на 1% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 3%, через 24 години – на 2%. Ця сполука не є токсичною для клітин, й за умови активації її токсичність знижується.

При додаванні активованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 25%, а золота – 75%, було відмічено зниження проліферативної здатності на 24% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 14%, через 24 години – на 1%. За умови активації ця сполука, як й неактивований варіант, має короткострокову дію та виявляє токсичність через 1 годину після обробки.

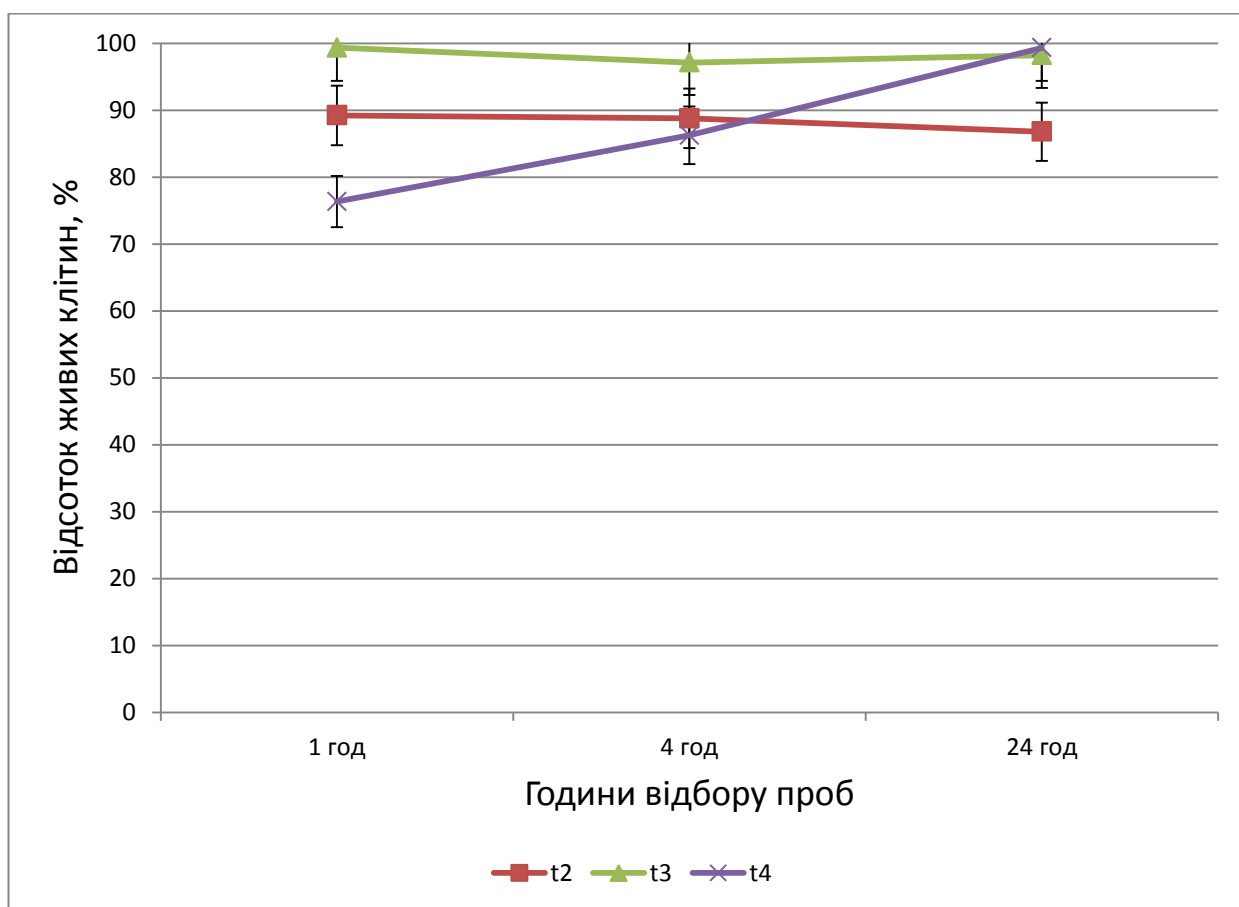


Рис. 3.3. Вплив активованих наночастинок на проліферативну здатність клітин

Таким чином, серед неактивованих сполук найбільш ефективно пригнічення проліферативної здатності клітин культури РЗНР-1 демонструвала сполука, що містила 50% срібла та 50% золота. Найвищий рівень її токсично-

сті виявлявся через 1 годину після обробки зі зниженням проліферативної здатності клітин на 31%.

Серед активованих сполук найвищу цитотоксичність демонструвала сполука, що містила 25% срібла та 75% золота, що проявлялося через 1 годину після обробки зі зниженням проліферативної здатності клітин на 24%. Для обох сполук дія була короткотривалою.

### **3.3. Вплив наночастинок на мітохондріальну активність клітин**

Мітохондріальну активність клітин визначали за допомогою тесту МТТ. Цей тест використовується для вимірювання клітинної метаболічної активності, яка виступає індикатором життєздатності цих клітин, та є широко застосовуваним для визначення цитотоксичності сполук.

Тест базується на перетворенні солі тетразолію (МТТ) на кристалізований формазан, яке забезпечується НАД(Ф)Н-залежними оксидоредуктазами метаболічно активних клітин. При цьому забарвлення розчину змінюється з жовтого на фіолетове; чим більш насиченим є фіолетове забарвлення, тим вищою є концентрація метаболічно активних клітин в суспензії [44].

З даних, наведених в науковій літературі, відомо, що репродукція вірусу Епштейна-Барр пов'язана з клітинними мітохондріальними процесами, стимулюючи диференціацію моноцитів шляхом впливу на рівень внутрішньоклітинної активної форми кисню (ROS), яка продукується мітохондріями та використовується в клітинному сигналінгу, та пригнічуючи процеси, залучені до аутофагії. Тому доцільно визначати мітохондріальну активність клітин, що латентно інфіковані цим вірусом [50]. Отримані результати наведено на рис.3.4 та рис.3.5.

При додаванні неактивованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 75%, а золота – 25%, було відмічено зниження мітохондріальної активності на 14% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 3%, через 24 години – на 12%.

При додаванні неактивованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 50%, а золота – 50%, було відмічено зниження мітохондріальної активності на 13% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 10%, через 24 години – на 15%.

При додаванні неактивованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 25%, а золота – 75%, було відмічено зниження мітохондріальної активності на 7% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 14%, через 24 години – на 30%.

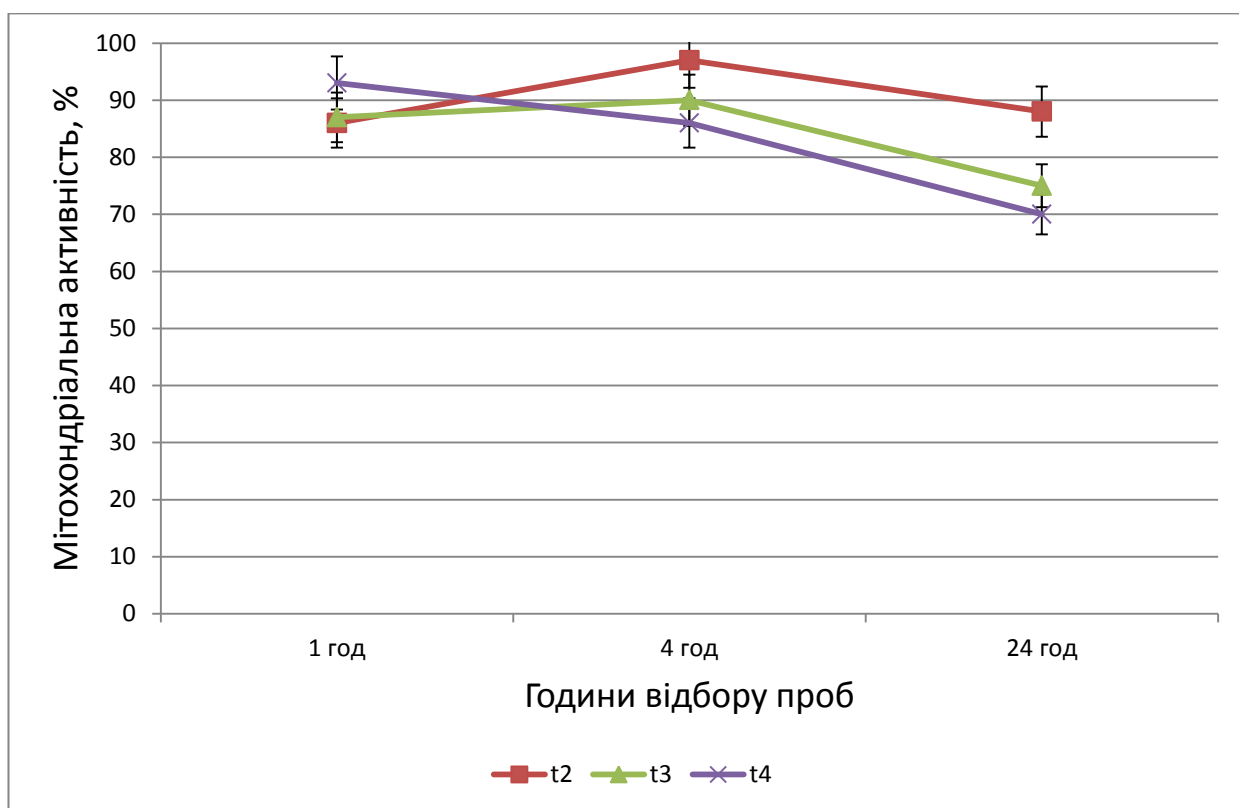


Рис. 3.4. Вплив неактивованих наночастинок на мітохондріальну активність клітин

При додаванні активованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 75%, а золота – 25%, було відмічено зниження мітохондріальної активності на 15% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 7%, через 24 години – на 8%.

При додаванні активованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 50%, а золота – 50%, було відмічено зниження мітохондріальної активності на 21% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 20%, через 24 години – на 35%.

При додаванні активованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 25%, а золота – 75%, було відмічено зниження мітохондріальної активності на 4% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 7%, через 24 години – на 31%.

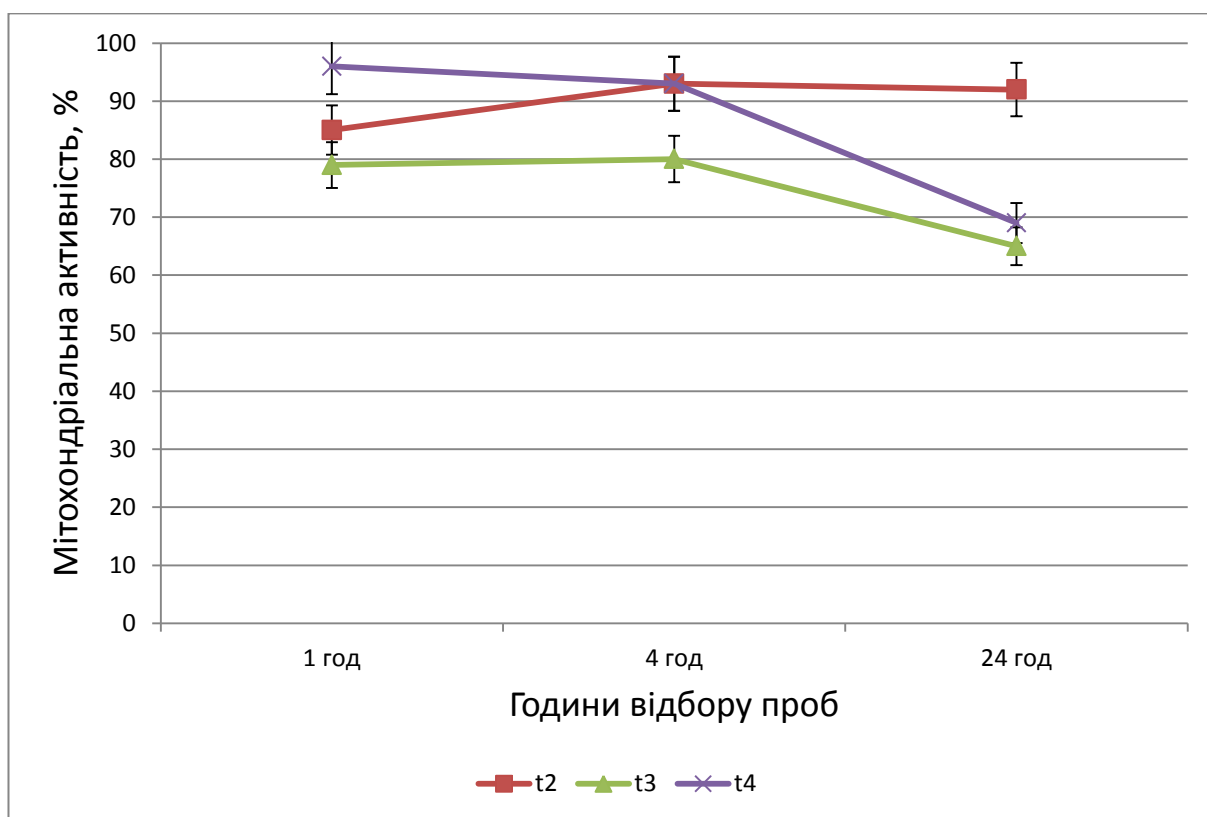


Рис. 3.5. Вплив активованих наночастинок на мітохондріальну активність клітин

Таким чином, найбільш ефективно пригнічення мітохондріальної активності клітин демонструвала неактивована сполука, що містила 25% срібла та 75% золота. Ця сполука мала довгострокову дію зі зниженням мітохондріальної активності на 30% через 24 години після обробки.

Серед активованих сполук найбільш ефективно пригнічення мітохондріальної активності демонструвала сполука, що містила 50% срібла та 50% золота. Мітохондріальна активність знижувалася на 35% через 24 години після обробки.

Високу токсичність також виявила активована сполука, що містила 25% срібла та 75% золота, яка знижувала мітохондріальну активність на 31% через 24 години після обробки. Ця сполука була токсичною для клітин як за умови активації, так і без активації. Найбільш імовірно, що це пов'язано з тим, що в процесі тривалого культивування клітини ендоцитують наночастинки, які можуть порушувати цілісність цитоплазматичної мембрани, зв'язуючись з нею, й інтерферувати з мітохондріальними процесами після потрапляння всередину клітини.

З даних, наведених в науковій літературі, відомо, що наночастинки золота та срібла, ендоцитовані клітинами, здатні впливати на синтез активної форми кисню, внаслідок чого утворюються вільні радикали, що, в свою чергу, пошкоджують ДНК й індукують деградацію внутрішньоклітинних білків, чим може пояснюватися зниження мітохондріальної активності та проліферативної здатності клітин [51].

### 3.4. Вплив наночастинок на лізосомальну активність клітин

Лізосомальну активність клітин визначали за допомогою реакції з барвником нейтральним червоним. Ця реакція, як й тест МТТ, використовується для вимірювання клітинної метаболічної активності, що є ознакою їх життєздатності, й також є одним з основних методів визначення цитотоксичності сполук.

Метод ґрунтується на тому, що метаболічно активні клітини здатні підтримувати внутрішній градієнт рН шляхом продукування АТФ. При нейтральному рН барвник не має заряду, що дозволяє його пасивну дифузію всередину клітин та лізосом, в яких барвник набуває заряду та зв'язується з аніонними чи фосфатними групами лізосомального матриксу за допомогою гідрофобних зв'язків, забарвлюючи розчин в червоний колір, інтенсивність якого можна визначити колориметрично [46].

З даних, наведених в науковій літературі, відомо, що експресія літичних генів вірусу Епштейна-Барр пов'язана з ранніми етапами клітинної аутофагії, й при подальшій літичній реплікації вірусу аутофагічна активність блокується. Зокрема, відомо, що аутофагосоми використовуються вірусом для виходу з клітини, минаючи етап злиття аутофагосом та лізосом, які є важливою частиною процесу аутофагії [52].

Підвищення активності аутофагії також опосередковано впливає на перехід вірусу до літичного циклу, оскільки при цьому деградується транскрипційний репресор літичної реплікації. Блокування аутофагії в інфікованих клітинах пов'язане з пригніченням білка Rab7, який, в свою чергу, пов'язаний з біогенезом лізосом, результатом чого є зменшення їх кількості. Наслідком цього є зниження лізосомальної активності клітин та вільний вихід вірусу в позаклітинний простір, після чого з'являється можливість вико-

ристання віруліцидних препаратів [52]. Отримані результати наведені на рис. 3.6 та 3.7.

При додаванні неактивованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 75%, а золота – 25%, через 1 годину зниження лізосомальної активності відмічено не було. Через 4 години цей показник знизився на 31%, через 24 години – на 21%.

При додаванні неактивованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 50%, а золота – 50%, було відмічено зниження лізосомальної активності на 22% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 17%, через 24 години – на 3%.

При додаванні неактивованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 25%, а золота – 75%, було відмічено зниження лізосомальної активності на 1% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 9%, через 24 години – на 31%.

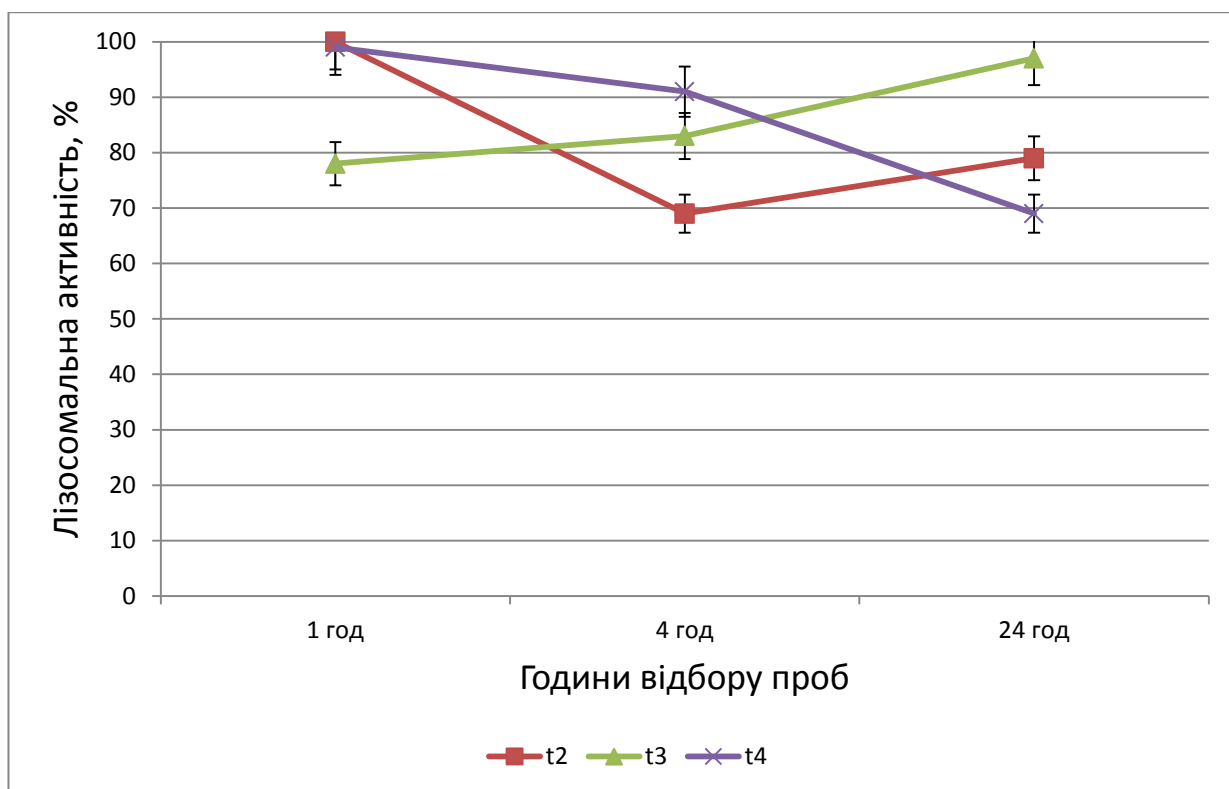


Рис. 3.6. Вплив неактивованих наночастинок на лізосомальну активність клітин

При додаванні активованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 75%, а золота – 25%, було відмічено зниження лізосомальної активності на 1% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 37%, через 24 години – на 6%.

При додаванні активованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 50%, а золота – 50%, було відмічено зниження лізосомальної активності на 2% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 12%, через 24 години – на 31%.

При додаванні активованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 25%, а золота – 75%, було відмічено зниження лізосомальної активності на 2% через 1 годину. Через 4 години цей показник знизився на 6%, через 24 години – на 14%.

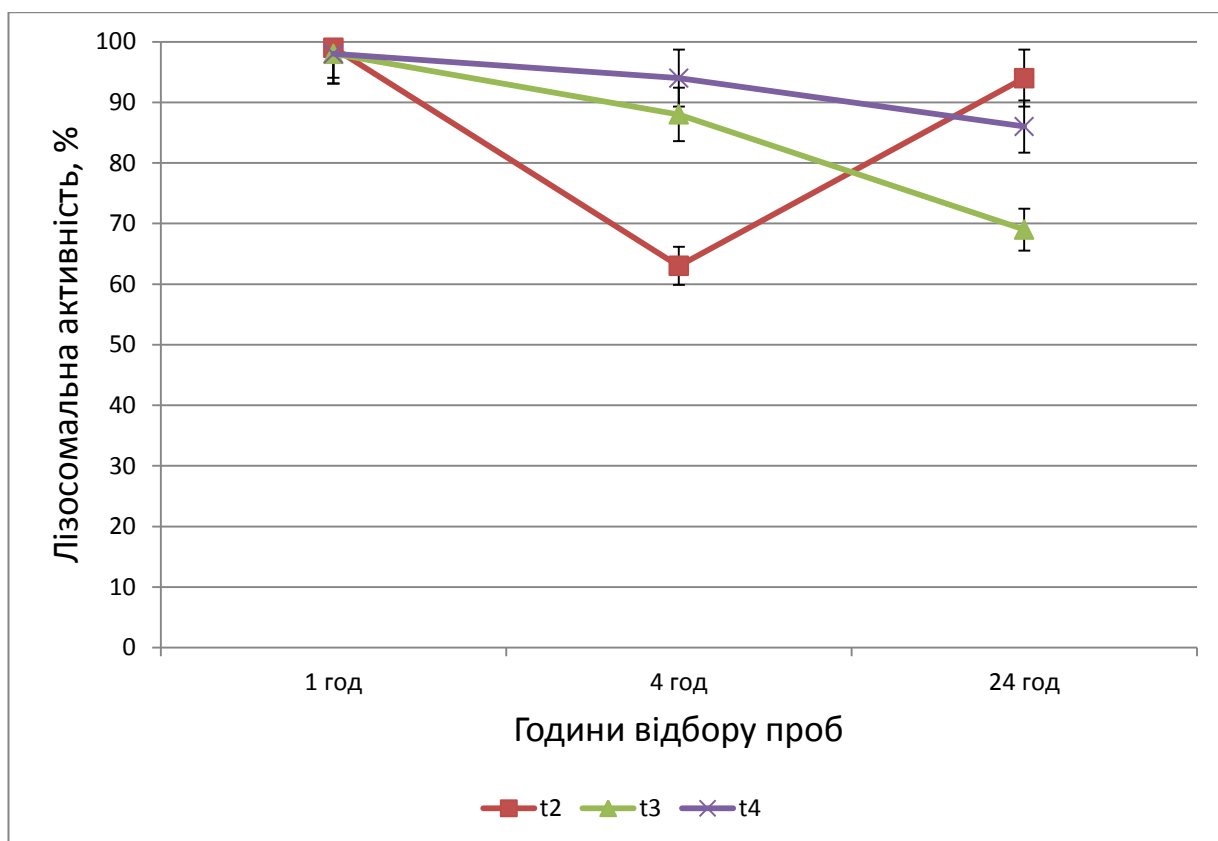


Рис. 3.7. Вплив активованих наночастинок на ліzosомальну активність клітин

Таким чином, найбільш ефективно пригнічення ліzosомальної активності продемонструвала сполука, що містила 75% срібла та 25% золота, що мала короткотривалу дію, яка проявлялася через 4 години після обробки. Неактивований варіант цієї сполуки знижував ліzosомальну активність на 31%, а за умови активації зниження складало на 37%. Тобто, ефективність цієї сполуки підвищувалася за умови активації інфрачервоним опроміненням.

Також значне ефективно пригнічення ліzosомальної активності демонструвала неактивована сполука, що містила 25% срібла та 75% золота (зі зниженням на 31%), а також активована сполука, що містила 50% срібла та 50% золота (зі зниженням на 31%). Обидві сполуки виявляли високу ефективність через 24 години після обробки та мали довгострокову дію.

Як й у випадку з пригніченням мітохондріальної активності, знижена лізосомальна активність може бути пов'язана з тим, що клітини мали достатньо часу, аби ендоцитувати наночастинки, які, після потрапляння всередину клітини, індукували перехід вірусу від латентного до літичного циклу [53].

Короткотривала ефективність біметалевих наночастинок, де вміст срібла був вищим, може бути пов'язана з тим, що клітини краще ендоцитують такі наночастинки, аніж біметалеві наночастинки з вищим вмістом золота. При цьому сполука, що містила 75% срібла, мала довгострокову дію, що може бути пов'язано з тим, що ті наночастинки, що мали вищий вміст срібла, здатні збиратися в агломерати, які адезуються на поверхні трансформованих клітин та порушують цілісність цитоплазматичної мембрани [53].

### **3.5. Вплив наночастинок на накопичення вірусу Епштейна-Барр в культурі**

Вплив біметалевих наночастинок на накопичення ДНК вірусу Епштейна-Барр в культурі визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Отримані результати наведено на рис.3.6.

При додаванні неактивованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 75%, а золота – 25%, було відмічено зниження вмісту вірусної ДНК на 87%. При додаванні цієї ж сполуки, але активованої, вміст вірусної ДНК знижувався на 97%. Тобто, за умови активації ця сполука є більш ефективною, аніж неактивований варіант.

При додаванні неактивованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 50%, а золота – 50%, зниження вмісту вірусної ДНК не відбувалося. Проте при додаванні цієї ж сполуки, але активованої, вміст вірусної ДНК знижувався на 23%.

При додаванні неактивованих біметалевих наночастинок, вміст срібла в яких становив 25%, а золота – 75%, було відмічено зниження вмісту вірусної ДНК на 92%. При додаванні цієї ж сполуки, але активованої, вміст вірусної ДНК знижувався на 92%. Тобто, ефективність обох варіантів була однаковою.

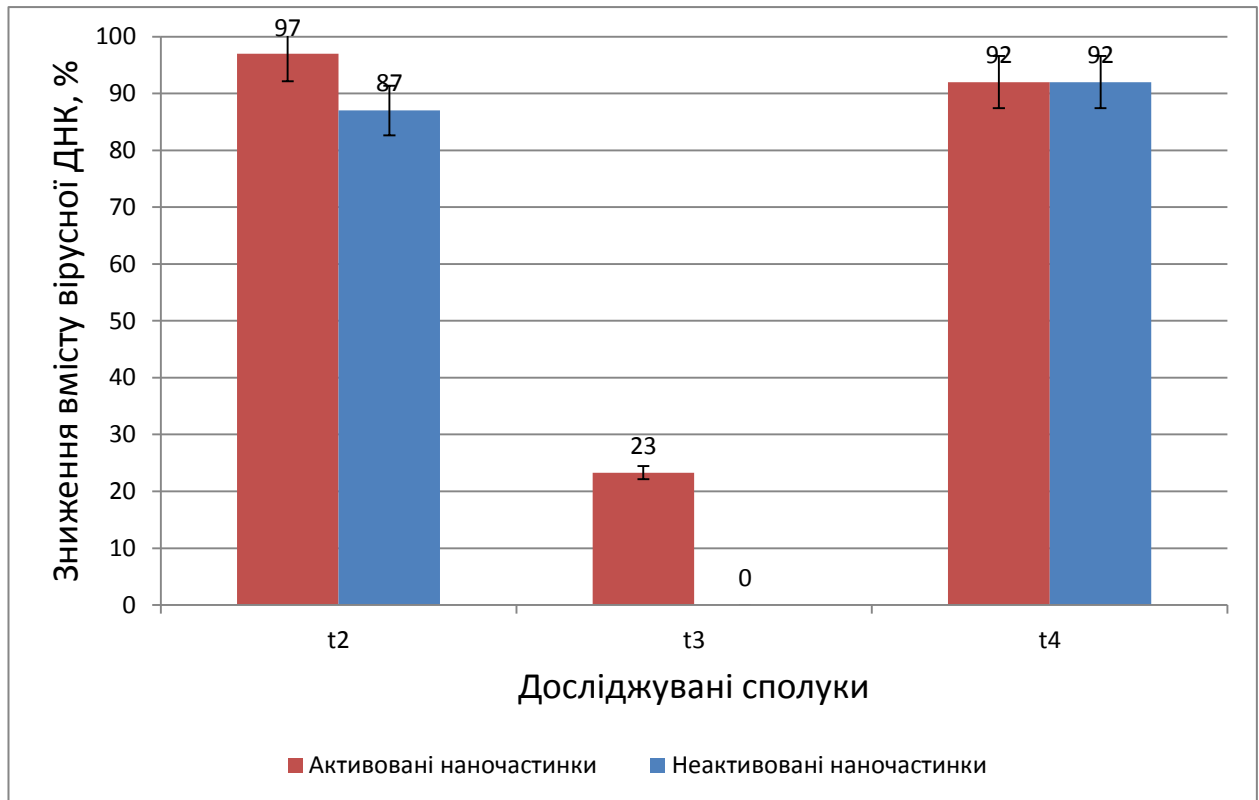


Рис. 3.8. Вплив наночастинок на накопичення вірусу Епштейна-Барр в культурі РЗНР-1

Таким чином, найбільш ефективно пригнічення накопичення ДНК вірусу Епштейна-Барр демонструвала сполука з вмістом срібла 75% – як неактивований, так й активований варіант, проте за умови активації ці наночастинок пригнічували накопичення ДНК більш ефективно.

З літературних джерел відомо, що срібло здатне пригнічувати реплікацію вірусу Епштейна-Барр, тому таке зниження може бути пов'язане з високим вмістом срібла в цій сполуці. Більша ефективність активованого варіанту цієї сполуки може бути пов'язана з тим, що золото виявляє ефект локалізованого поверхневого плазмонного резонансу, який може пошкоджувати цитоплазматичну мембрану клітин, полегшуючи потрапляння наночастинок всередину [37].

## ВИСНОВКИ

1. Біологічна ефективність біметалевих наночастинок значною мірою залежить від комбінації срібла та золота в них, а також від фактору активації інфрачервоним опроміненням. Наночастинки, в складі яких переважало золото, демонстрували високий ступінь пригнічення проліферативної здатності та лізосомальної активності клітин. Наночастинки з високим вмістом срібла демонстрували високий ступінь пригнічення мітохондріальної активності та високий рівень антивірусної активності.

2. Біметалеві наночастинки, що містили 50% золота, демонстрували значне зниження проліферативної здатності клітин (на 31%). Для біметалевих наночастинок, що містили 75% золота, спостерігалось значне зниження лізосомальної активності клітин (на 31%).

3. Біметалеві наночастинки, вміст срібла в яких складав 50%, більш ефективно пригнічували мітохондріальну активність за умови активації наночастинок (на 35%).

4. Токсичність біметалевих наночастинок, в складі яких переважало золото, підвищувалася за умови активації інфрачервоним лазером, що виявлялося як зниження проліферативної здатності клітин та зниження лізосомальної активності.

5. Біметалеві наночастинки, вміст срібла в яких складав 75%, демонстрували значне зниження вмісту вірусної ДНК (на 97%) за умови, що наночастинки були активовані інфрачервоним опроміненням.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bordoni, V., Sanna, L., Lyu, W., Avitabile, E., Zoroddu, S., Medici, S., Kelvin, D.J. and Bagella, L. (2021) Silver Nanoparticles Derived by *Artemisia arborescens* Reveal Anticancer and Apoptosis-Inducing Effects. *Int. J. Mol. Sci.* 22. pp. 1-2.
2. Buschle, A., Hammerschmidt, W. (2020) Epigenetic lifestyle of Epstein-Barr virus. *Seminars in Immunopathology.* 42. pp. 131.
3. Cao, Y., Xie, L., Shi, F., Tang, M., Li, Y., Hu, J., Zhao, L., Zhao, L., Yu, X., Luo, X., Liao, W., Bode, A.M. (2021) Targeting the signaling in Epstein-Barr virus-associated diseases: mechanism, regulation, and clinical study. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 6 (15). pp. 1.
4. Murata, T., Sugimoto, A., Inagaki, T., Yanagi, Y., Watanabe, T., Sato, Y., Kimura, H. (2021) Molecular Basis of Epstein-Barr Virus Latency Establishment and Lytic Reactivation. *Viruses.* 13 (2344). pp. 1-2.
5. Houen, G., Trier, N.H. (2021) Epstein-Barr Virus and Systemic Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* 11 (587380). pp. 1-2.
6. Bauer, M., Jasinski-Bergner, S., Mandelboim, O., Wickenhauser, C., Seliger, B. (2021) Epstein-Barr Virus-Associated Malignancies and Immune Escape: The Role of the Tumor Microenvironment and Tumor Cell Evasion Strategies. *Cancers.* 13 (5189). pp. 1-2.
7. Granato, M. (2021) Nanotechnology Frontiers in  $\gamma$ -Herpesviruses Treatments. *Int. J. Mol. Sci.,* 22. pp. 1.
8. Smatti, M.K.,<sup>1</sup> Al-Sadeq, D.W., Ali, N.H., Pintus, G., Abou-Saleh, H., Nasrallah, G.K. (2018) Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic

Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front. Oncol.* 8 (211). pp. 1-3.

9. Aguayo, F., Boccardo, E., Corvalán, A., Calaf, G.M., Blanco, R. (2021) Interplay between Epstein-Barr virus infection and environmental xenobiotic exposure in cancer. *Infectious Agents and Cancer.* 16 (50). pp. 1-2.

10. Chakravorty, A., Sugden, B., Johannsen, E.C. (2019) An Epigenetic Journey: Epstein-Barr Virus Transcribes Chromatinized and Subsequently Unchromatinized Templates during Its Lytic Cycle. *J Virol.* 93. pp. 1-2.

11. Xu, M., Zhang, W-L., Zhu, Q., Zhang, S., Yao, Y-y., Xiang, T., Feng, Q-S., Zhang, Z., Peng, R-J., Jia, W-H., He, G-P., Feng, L., Zeng, Z-L., Luo, B., Xu, R-H., Zeng, M-S., Zhao, W-L., Chen, S-J., Zeng, Y-X., Jiao, Y. (2019) Genome-wide profiling of Epstein-Barr virus integration by targeted sequencing in Epstein-Barr virus associated malignancies. *Theranostics.* 9 (4). pp. 1115-1116.

12. Ayee, R., Maame Ekua Oforiwaa Ofori, Wright, E., Quaye, O. (2020) Epstein-Barr Virus Associated Lymphomas and Epithelial Cancers In Humans. *Journal of Cancer.* 11., pp. 1737-1739.

13. Hutcheson, R.L., Chakravorty, A., Sugden, B. (2021) Burkitt Lymphomas Evolve to Escape Dependencies on Epstein-Barr Virus. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10. pp. 1-2.

14. Rosemary Rochord (2021). Reframing Burkitt lymphoma: virology not epidemiology defines clinical variants. *Annual Lymphoma.* 5., pp. 1-4.

15. Graham, B.S., Lynch, D.T. (2021). Burkitt Lymphoma. *StatPearls Publishing* [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538148/>

16. Nam, N.H., Luong, N.H. (2019) Nanoparticles: synthesis and applications Materials for Biomedical Engineering: Inorganic Micro and Nanostructures. Elsevier. pp. 211.
17. Milovanovic, M., Arsenijevic, A., Milovanovic, J., Kanjevac, T., Arsenijevic, N. (2017) Nanoparticles in Antiviral Therapy: Antimicrobial Nanoarchitectonics. Elsevier. pp. 399-400.
18. Gurunathan, S., Qasim, M., Choi, Y., Do, J.T., Park, C., Hong, K., Kim, J-H., Song, H. (2020) Antiviral Potential of Nanoparticles – Can Nanoparticles Fight against Coronaviruses? Nanomaterials. 10 (1645). pp. 6-8.
19. Zhang, X-F., Liu, Z-G., Shen, W., Gurunathan, S. (2016) Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. Int. J. Mol. Sci. 17 (1534). pp. 1-3.
20. Nallathamby, P.D., Xu, X-H.N. (2010) Study of Cytotoxic and Therapeutic Effects of Stable and Purified Silver Nanoparticles on Tumor Cells. Nanoscale. 2 (6). pp. 1-2.
21. Sriram, M.I., Kalishwaralal, K., Barathmanikanth, S., Gurunathani, S. (2012) Size-based cytotoxicity of silver nanoparticles in bovine retinal endothelial cells. Nanosci. Methods. 1. pp. 56-58.
22. Dykman, L.A., Khlebtsov, N.G. (2011) Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects. ACTA NATURAE. Vol. 3, 2 (9). pp. 34-35.
23. Yeh, Y-C., Creran, B., M. Rotello, V.M. (2012) Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology. Nanoscale. 4 (6). pp. 1-2.
24. Abraham G.E., Himmel P.B. (1997) Management of rheumatoid arthritis: Rationale for the use of colloidal metallic gold. J. Nutr. Med. 7. pp. 295–305, 473.

25. Mukherjee, P., Bhattacharya, R., Bone, N., Lee, Y.K., Patra, C.R., Wang, S., Lu, L., Secreto, C., Banerjee, P.C., Yaszemski, M.J., Kay, N.E., Mukhopadhyay, D. (2007) Potential therapeutic application of gold nanoparticles in B-chronic lymphocytic leukemia (CLL): enhancing apoptosis. *J. Nanobiotechnology*. 5 (4). pp. 2-9.
26. Bhattacharya, R., Patra, C.R., Verma, R., Kumar, S., Greipp, P.R., Mukherjee, P. (2007) Gold nanoparticles inhibit the proliferation of multiple myeloma cells. *Adv. Mater.* 19. pp. 711-716.
27. Rau, L-R., Huang, W-Y., Liaw, J-W., Tsai, S-W. (2016) Photothermal effects of laser-activated surface plasmonic gold nanoparticles on the apoptosis and osteogenesis of osteoblast-like cells. *International Journal of Nanomedicine*. 11. pp. 3461-3462.
28. Qina, Z., Bischof, J.C. (2012) Thermophysical and biological responses of gold nanoparticle laser heating. *Chem. Soc. Rev.* 41. pp. 1191–1195.
29. Raji, V., Kumar, J., Rejiya, C.S., Vibin, M., Shenoi, V.N., Abraham, A. (2011) Selective photothermal efficiency of citrate capped gold nanoparticles for destruction of cancer cells. *Exp Cell Res.* 317 (14). pp. 2052-2058.
30. Qu, X., Yao, C., Wang, J., Li, Z., Zhang, Z. (2012) Anti-CD30-targeted gold nanoparticles for photothermal therapy of L-428 Hodgkin's cell. *Int J Nanomedicine*. 7. pp. 6095-6103.
31. Krpetić, Z., Nativo, P., Sée, V., Prior, I.A., Brust, M., Volk, M. (2010) Inflicting controlled nonthermal damage to subcellular structures by laser-activated gold nanoparticles. *Nano Lett.* 10 (11). pp. 4549-4554.
32. Fekrazad, R., Naghdi, N., Nokhbatolfoghahaei, H., Bagheri, H. (2016) The combination of laser therapy and metal nanoparticles in cancer treatment originated from epithelial tissues: a literature review. *J Lasers Med Sci.* 7(2). pp. 62-64.

33. Day, E.S., Bickford, L.R., Slater, J.H., Riggall, N.S., Drezek, R.A., West, J.L. (2010) Antibody-conjugated gold-gold sulfide nanoparticles as multifunctional agents for imaging and therapy of breast cancer. *Int J Nanomedicine*. 5. 445-454.
34. Hu, K.W., Huang, C.C., Hwu, J.R., Su, W.C., Shieh, D.B., Yeh, C.S. (2008) A New Photothermal Therapeutic Agent: Core-Free Nanostructured Aux-Ag<sub>1-x</sub> Dendrites. *Chem. Eur. J.* 14. pp. 2956-2964.
35. Fayaz, M.A., Ao, Z., Girilal, M., Chen, L., Xiao, X., Kalaichelvan, P.T., Yao, X. (2012) Inactivation of microbial infectiousness by silver nanoparticles-coated condom: A new approach to inhibit HIV- and HSV-transmitted infection. *Int. J. Nanomed.* 7, pp. 5007-5018.
36. Halder, A., Das, S., Ojha, D., Chattopadhyay, D., Mukherjee, A. (2018) Highly monodispersed gold nanoparticles synthesis and inhibition of herpes simplex virus infections. *Mater. Sci. Eng.* 89, pp. 413-421.
37. Wan, C., Tai, J., Zhang, J., Guo, Y., Zhu, Q., Ling, D., Gu, F., Gan, J., Zhu, C., Wang, Y., et al. (2019) Silver nanoparticles selectively induce human oncogenic  $\gamma$ -herpesvirus-related cancer cell death through reactivating viral lytic replication. *Cell Death Dis.* 10, pp. 1-16.
38. Perlman, S., Netland, J. (2009) Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, pp. 439-450.
39. Zhang, B., Zhou, X., Zhu, C., Feng, F., Qiu, Y., Feng, J., Jia, Q., Song, Q., Zhu, B., Wang, J. (2020) Immune phenotyping based on neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19. *medRxiv*.
40. Robba, C., Battaglini, D., Pelosi, P., Rocco, P.R.M. (2020) Multiple organ dysfunction in SARS-CoV-2: MODS-CoV-2. *Expert Rev. Respir. Med.* pp. 1-4.

41. P3HR-1 | ATCC [online]. Available at: <https://www.atcc.org/products/htb-62>
42. Li, C., Romero-Masters, J.C., Huebner, S., Ohashi, M., Hayes, M., Bristol, J.A., et al. (2020) EBNA2-deleted Epstein-Barr virus (EBV) isolate, P3HR1, causes Hodgkin-like lymphomas and diffuse large B cell lymphomas with type II and Wp-restricted latency types in humanized mice. *PLoS Pathog.* 16 (6). pp. 1-2.
43. Stroben, W. (2019) Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* 111. pp. 1-2.
44. MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation [online]. Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>.
45. Гудзь, Н. І., Кобилінська, Л. І., Філіпська, А. М., Дмитруха, Н. М., Лагутіна, О. С., Коритнюк, Р. С. (2017) Визначення життєздатності клітин під час фармацевтичної розробки розчинів для перитонеального діалізу. *Фармаком.* 3. стор. 56.
46. Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols.* 3 (7). pp. 1125-1130.
47. ТОВ «Астравір Текнолоджі» [online]. Available at: [astravirtech.com.ua](http://astravirtech.com.ua)
48. ТОВ «Українські Генетичні Технології» [online]. Available at: [ukrgentech.com](http://ukrgentech.com)
49. Naumenko K., Golovan A., Baranova G., Zagorognya S., Shermolovyts Yu. (2016) Antiviral and Immunostimulatory Potential of Fluorine-Containing Triazoles. *БІОЛОГІЯ.* 2 (72). pp. 21.
50. Gilardini Montania, M.S., Santarellia, R., M. Granatoa, M., R. Gonnellaa, R., Torrisib, M.R, Faggionia, A., Cirone, M. (2019) EBV reduces autophagy, in-

tracellular ROS and mitochondria to impair monocyte survival and differentiation. *Autophagy*. 15 (4). pp. 652-653.

51. Kus-Li'skiewicz, M., Fickers, P., Ben Tahar, I. (2021) Biocompatibility and Cytotoxicity of Gold Nanoparticles: Recent Advances in Methodologies and Regulations. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (10952). pp. 6-9.

52. Granato, M., Santarelli, R., Farina, A., Gonnella, R., Lotti, L.V., Faggioni, A., Cirone, M. (2014) Epstein-Barr Virus Blocks the Autophagic Flux and Appropriates the Autophagic Machinery To Enhance Viral Replication. *Journal of Virology*. 88 (21) pp. 12715-12716, 12718-12725.

53. Talarska, P., Boruckowski, M., Zurawski, J. (2021) Current Knowledge of Silver and Gold Nanoparticles in Laboratory Research – Application, Toxicity, Cellular Uptake. *Nanomaterials*. 11 (2454). pp. 2, 4-13.