

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

Завідувач кафедри молекулярних біотехнологій

проф. Олексій Юрійович Нипорко

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20 ____ р.

**ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ПРОТИГЕРПЕТИЧНОЇ ДІЇ
НАНОЧАСТИНОК ТА НАНОКОМПОЗИТИВ
НА ОСНОВІ ЗОЛОТА**

Випускна кваліфікаційна робота
бакалавра студента спеціальності 091
Біологія ОП «Біологія (високі технології)»
Синиці Марії Станіславівни

Науковий керівник доцент кафедри
молекулярної біотехнології та біоінформатики,
к. б. н. **Компанець Тарас Анатолійович**

Робота виконана у відділі репродукції вірусів
Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України під керівництвом завідувачки відділу,
к.б.н., старшого дослідника **Загородньої Світлани Дмитрівни**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

АНОТАЦІЯ

Синиця М.С. Порівняльний аналіз протигерпетичної дії наночастинок та нанокompatитів на основі золота. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія, ОП Біологія (високі технології) спеціалізацією вірусологія.

У роботі досліджуються противірусні нанотехнології як потенційні інструменти для боротьби з герпесвірусними інфекціями. Вона містить детальний аналіз молекулярних характеристик, патогенезу та традиційних підходів до хіміотерапії герпесвірусів. Основна увага зміщується в бік оцінки ефективності нових противірусних нанотехнологій, включаючи наночастинки та наноструктури. Дослідження спрямоване на глибше розуміння цих інноваційних підходів та їх значення для противірусної терапії. Результати підкреслюють ключові відкриття щодо життєздатності клітин, цитотоксичності та противірусної ефективності наноматеріалів. Перспективи подальших досліджень стосуються механістичних пояснень, синергічних ефектів, безпеки, фармакокінетики та потенційних застосувань у сфері противірусних стратегій на основі нанотехнологій. Систематичний аналіз галузі наноматеріалів сприятиме поточним зусиллям у дослідженні противірусних засобів, що матиме наслідки для покращення результатів лікування та майбутніх терапевтичних розробок.

Ключові слова: Герпесвірусні інфекції, противірусні нанотехнології, цитотоксичність, залежність доза-реакція, механізми дії

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
ВСТУП	7
РОЗДІЛ I: ГЕРПЕСВІРУСНІ ІНФЕКЦІЇ: БІОЛОГІЧНІ І ТЕРАПЕВТИЧНІ АСПЕКТИ	9
1.1. Загальна будова та класифікація герпесвірусів	9
1.2. Організація геному та особливості реплікації герпесвірусів	11
1.3. Латентний період, реактивація та клінічні прояви герпесвірусної інфекції.....	15
1.4. Механізми та мішені дії противірусних препаратів.....	18
1.5. Комбінована терапія та нові підходи до хіміотерапії герпесвірусу	20
1.6. Наночастинки з противірусною дією.....	22
1.7. Наноструктури як елементи запобігання поширення вірусу	26
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	29
2.1. Матеріали дослідження	29
2.2. Методи дослідження.....	31
2.2.1 Культивування клітин.....	31
2.2.2 Визначення життєздатності клітин МТТ-методом.....	32
2.2.3 Визначення антивірусної активності	33
2.2.4 Дослідження противірусної дії речовин	35
2.2.5 Аналіз біохімічних та гематологічних показників органів мишей.	36
2.2.6 Методи статистичної обробки даних	37
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ	38
3.1 Результати досліджень.....	38
3.1.1 Вплив препаратів на клітини та оцінка цитотоксичності	38

	4
3.1.2 Виявлення антивірусної активності	40
3.1.3 Визначення протівірусної ефективності. Зв'язок доза-реакція	43
3.1.4 Результати аналізу біохімічних та гематологічних показників органів мишей.....	46
3.2. Обговорення.....	50
3.2.1 Наслідки для розробки антивірусних засобів	51
3.3. Перспективи подальших досліджень	51
3.3.1 Безпека та фармакокінетика.....	52
3.3.2 Застосування нанотехнологій	53
ВИСНОВКИ.....	54
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	55

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

HSV-1-	вірус простого герпесу типу 1
HSV-2-	вірус простого герпесу типу 2
HHV-6-	вірус герпесу людини 6-ого типу
HHV-7-	вірус герпесу людини 7-ого типу
HHV-8-	герпесвірус людини 8-ого типу
UL-	унікальна довга ділянка геному вірусу
US-	унікальна коротка ділянка геному вірусу
TRL-	Terminal Repeat Long (термінований довгий повтор)
IRL-	Internal Repeat Long (внутрішній довгий повтор)
IRS-	Internal Repeat Short (внутрішній короткий повтор)
TRS-	Terminal Repeat Short (термінований короткий повтор)
THV-	тахітрансмівний вірус Харрана
EBV-	Вірус Епштейна — Барр
PRV-	вірусу псевдосказу
TK-	тимідинкіназа
siRNA-	інтерферуюча РНК
ZFN-	нуклеази цинкового пальця
TALEN-	ефекторні нуклеази, подібні до активатора транскрипції
CRISPR/Cas9-	асоційований білок 9 (Cas9) з кластеризованим регулярним вкрапленим коротким паліндромним

	повтором (CRISPR)
SAMMA-	Конденсаційний полімер мигдальної кислоти
ICP4-	інфекційний клітинний білок-4
PRO 2000-	2-Нафталінсульфонова кислота
Vero-	African Green Monkey Kidney (Нирка африканської зеленої мавпи)
PBS-	Phosphate-Buffered Saline (фосфатно-сольовий буфер)
DMEM-	Dulbecco's Modified Eagle Medium (модифіковане середовище Ігла Дульбекко)
ETC-	Ембріональна теляча сироватка
MTT-	3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід
DMSO-	Диметилсульфоксид
ЦПД-	Цитопатична дія вірусу
PRMI-	Peripheral Blood Mononuclear Cell Reprogramming for Immune Cell Therapy (Перепрограмування мононуклеарних клітин периферичної крові для імуноклітинної терапії)
TCID ₅₀ /мл-	Median Tissue Culture Infectious Dose (середня інфекційна доза культури тканин)
AST-	Аспартатамінотрансфераза
ALT-	Аланінамінотрансфераза

ВСТУП

Герпесвірусні інфекції є серйозною проблемою для людства, яка щороку вражає мільйони людей (World Health Organization, 2020). Клінічні прояви можуть бути абсолютно різноманітними і непередбачуваними, і проявлятися як незначними симптомами, так і важкими та потенційно смертельними захворюваннями. Протягом багатьох років традиційна противірусна терапія була розроблена для націлювання на різні етапи життєвого циклу герпесвірусу, але такі проблеми, як стійкість до ліків і обмежена ефективність, залишаються.

Впровадження нанотехнологій у антивірусні дослідження відкрило нові шляхи боротьби з герпесвірусними інфекціями. Наночастинки та нанокompозити демонструють унікальні фізико-хімічні властивості, які можна використовувати для покращення доставки ліків, підвищення противірусної ефективності та зниження цитотоксичності. Цей перехід до антивірусних стратегій, заснованих на нанотехнологіях, викликає значний інтерес через потенціал цільових та ефективних варіантів лікування.

Метою роботи є оцінка ефективності противірусних нанотехнологій, зокрема наночастинок і наноструктур на основі золота, у боротьбі з герпесвірусними інфекціями. Досліджуючи взаємодію між наноматеріалами та герпесвірусами, вона робить внесок у розробку інноваційної противірусної терапії з підвищеною ефективністю та зменшенням побічних ефектів. У рамках роботи проводилися експерименти з препаратами, що містили мумійо і колоїдне золото, для вивчення їх впливу на клітини WISH і Vero, а також організм мишей.

Виходячи з мети роботи, було сформульовано наступні завдання:

- Оцінка профілів цитотоксичності та безпеки противірусних нанотехнологій на основі наночасток золота.
- Оцінка противірусної ефективності наноматеріалів проти вірусу простого герпесу 1-го типу *in vitro*.

- Вивчення можливих механізмів дії, що лежать в основі противірусної активності нанотехнологій.

Актуальність роботи: Актуальність цієї роботи полягає в її потенціалі для усунення прогалин у сучасній противірусній терапії герпесвірусних інфекцій. Вивчаючи застосування нанотехнологій, це дослідження має на меті зробити внесок у розробку більш ефективних і цілеспрямованих методів лікування, які можуть пом'якшити проблеми, пов'язані зі стійкістю до ліків і побічними ефектами, пов'язаними з традиційними методами лікування. Крім того, результати дослідження можуть мати наслідки для ширшої галузі антивірусних досліджень, пропонуючи розуміння нових механізмів дії та синергічних підходів, які можна застосувати до інших вірусних інфекцій. Зрештою, це дослідження спрямоване на покращення нашого розуміння противірусних нанотехнологій та їхнього потенціалу революції в лікуванні герпесвірусних інфекцій у клінічних умовах.

Об'єкт дослідження: Противірусні нанотехнології та механізми їх впливу на інфіковані клітини

РОЗДІЛ I: ГЕРПЕСВІРУСНІ ІНФЕКЦІЇ: БІОЛОГІЧНІ І ТЕРАПЕВТИЧНІ АСПЕКТИ

1.1. Загальна будова та класифікація герпесвірусів

Родина Herpesviridae включає різноманітну групу дволанцюгових ДНК-вірусів, які можуть інфікувати широкий спектр господарів, від людини до тварин. Представники родини Herpesviridae мають сферичні віріони з оболонкою з характерною складною структурою. Лінійні дволанцюгові геноми ДНК розміром 125–241 kbp містять 70–200 генів. Після первинного зараження вони здатні викликати латентну інфекцію, під час якої спостерігається обмежена експресія вірусних генів. Важке захворювання зазвичай спостерігається лише у плода, дуже молодого, з ослабленим імунітетом або після інфікування альтернативного господаря (Gatherer et al, 2021).

Віріони мають характерну складну структуру, що складається з симетричних і несиметричних компонентів. Віріон містить кор, капсид, тегумент (матрикс), який містить численні вірусні білки, що беруть участь у циклі реплікації і оболонку (Рис. 1.1). Кор складається з вірусного геному (лінійної дволанцюгової молекули ДНК), упакованого у попередньо сформований капсид. ДНК знаходиться під тиском у рідкокристалічному масиві, який заповнює весь внутрішній об'єм капсиду. Зрілий капсид є ікосаедром з $T=16$.

На основі нуклеотидних послідовностей консервативних генів герпесвіруси можна класифікувати на три підродини: альфа-, бета- та гаммагерпесвіруси.

Кожна підродина включає кілька родів герпесвірусів, які додатково класифікуються на основі їхніх біологічних і генетичних властивостей.

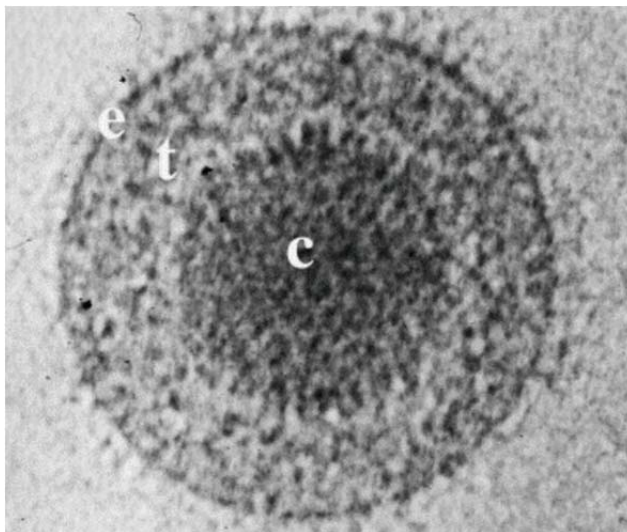


Рисунок 1.1 *Herpesviridae*. Будова віріону та капсиду. Кріоелектронне мікроскопічне зображення одного віріону вірусу простого герпесу типу 1 (HSV1). Кор (c) вбудований в тегумент (t) і оточений ліпідною оболонкою, що містить глікопротеїни (e). (McGeoch et al., 2006)

Підродина Альфагерпесвіруси включає такі важливі патогени людини, як HSV-1, HSV-2, які викликають оральний і генітальний герпес, і вірус вітряної віспи. Ця підродина також включає патогени тварин, таких як вірус герпесу великої рогатої худоби.

Підродина Бетагерпесвіруси включає цитомегаловірус людини, який може викликати важкі захворювання в осіб з ослабленим імунітетом, і віруси HHV- 6 і 7, які зазвичай асоціюються з дитячими хворобами. Інші представники цієї підродини заражають таких тварин, як гризуни та примати.

Підродина Гаммагерпесвіруси включає вірус Епштейна-Барр, який пов'язаний з різними видами раку людини, і HHV-8, пов'язаний із саркомою Капоші, який викликає саркому Капоші в осіб з ослабленим імунітетом. До цієї підродини також входять патогени тварин, такі як мишачий

гаммагерпесвірус і конячий герпесвірус. Кожна підродина герпесвірусів має схожу структуру вірусного капсиду і характеризується наявністю оболонки. На відміну від Альфа- і Бета-підродин, геноми більшості Гаммагерпесвірусів зазвичай мають дефіцит динуклеотиду CG.

1.2. Організація геному та особливості реплікації герпесвірусів

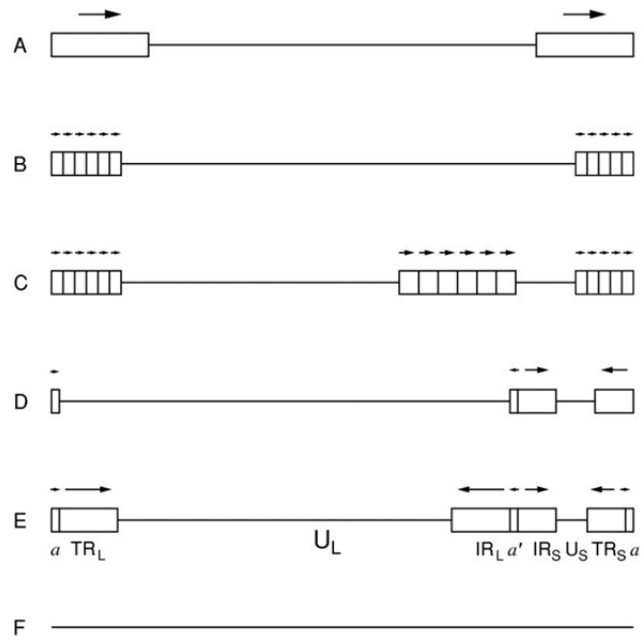
Враховуючи генетичне різноманіття представників порядку *Herpesvirales*, ймовірно, що деталі стратегії їхньої реплікації відрізняються, іноді, суттєво. Геном герпесвірусів є складним і варіюється за розміром залежно від типу вірусу. Він кодує від 70 до 200 генів, які розташовані унікальним чином. Було узагальнено основні класи структури геному, які зустрічаються серед вірусів герпесу (Roizman et al., 2007).

Геном вірусу герпесу має дві ділянки, обмежені повторювальними областями на кінцях: унікальну довгу (UL) і унікальну коротку (US) ділянки. Ділянка UL містить гени, важливі для реплікації та патогенезу вірусу, тоді як ділянка US містить гени, які беруть участь у затримці вірусу та ухиленні від імунітету. Така структура, зокрема, характерна для HSV-1 (Szpara et al., 2014).

Розташування повторюваних послідовностей (прямих або інвертованих повторів на кінцях геному або всередині) призводить до кількох класів архітектури геному, деякі з яких включають орієнтаційні ізомери, що є результатом рекомбінації між кінцевими та внутрішніми інвертованими повторами (Рис. 1.2).

Геном класу А складається з унікальної послідовності, обмеженої прямим повтором. Вперше він був описаний для Вірусу мавпячої саркоми (Watson, 1979), але також притаманний деяким представникам Бетта- та одному представнику Гаммагерпесвірусів (кінський цитомегаловірус) (Browning and Studdert, 1989).

Геноми класу В також мають безпосередньо повторювані послідовності на кінцях, але вони складаються зі змінної кількості копій тандемно повторюваної послідовності 0,8–2,3 kbp. Таке розташування характеризує більшість Гаммагерпесвірусів у роді Rhadinovirus (саркома



Капоші, первинна випітна лімфома), таких як герпесвірус саймірі та HHV-8. Повторювані ділянки можуть становити до 30% молекули ДНК.

Рисунок 1.2 Класи структур геному герпесвірусу. Унікальні та повторювані області відображаються горизонтальними лініями та прямокутниками відповідно. Орієнтація повторів показана стрілками. Кінцева надлишковість (a) і її внутрішня інвертована копію (a'), вказана для генома класу E (Roizman and Pellett, 2001)

Наявність додаткових кінцевих повторюваних послідовностей у зворотній орієнтації всередині геному призводить до виникнення спорідненої структури, яка присутня в іншого представника Гаммагерпесвірусів, вірусу герпесу кроликів (Sebrian et al., 1989). Віріонна ДНК цього вірусу демонструє інверсію сегментів, оскільки вже дві унікальні області обмежені інвертованими повторами.

Структура класу С є похідною від класу В, у якій внутрішній набір прямих повторів присутній, але не пов'язаний з кінцевим набором. Вірус EBV роду *Lymphocryptovirus*, має таку структуру (Given et al., 1979). Інверсія сегмента не відбувається, оскільки внутрішні та кінцеві повтори не пов'язані.

Геноми класу D містять дві унікальні області (UL і US), кожна обмежена інвертованими повторами. Ця структура характерна для Альфагерпесвірусів роду *Varicellovirus*, таких як вірус псевдосказу і Вірус вітряної віспи, а також окремо еволюціонувала у лососевому герпесвірусі-1 (Davison, 1998). Інверсія сегмента відбувається, оскільки еквімолярні кількості геномів, що містять дві орієнтації US, знаходяться у віріонній ДНК, але UL присутній переважно або повністю в одній орієнтації.

Клас Е є найскладнішою структурою геному, і він був першим, який був описаний для HSV-1 (Sheldrick and Berthelot, 1974). Він подібний до класу D, за винятком того, що TRL/IRL набагато більші, а інверсія сегмента призводить до чотирьох еквімолярних ізомерів геному. Невеликі пропорції геномів містять численні копії послідовності *a* на лівому кінці або на з'єднанні IRL/IRS. Клас Е характерний для вірусів роду *Simplexvirus* Альфагерпесвірусів (Бичачий альфагерпесвірус-2, Вірус простого герпесу людини -1, -2).

Клас F представлений представником Бетагерпесвірус, THV, у якого, очевидно, відсутні типи інвертованих і прямих повторів, які характеризують інші геноми герпесвірусу. Однак, оскільки кінці геному THV не були проаналізовані безпосередньо, існування цієї незвичайної структури вважається схематичним і має ймовірний характер.

Цикл реплікації вірусів зазвичай включає кілька етапів, включаючи прикріплення, входження, депротейнізацію, реплікацію, збирання та вивільнення з клітини. (Koonin and Dolja, 2014) Під час прикріплення вірус зв'язується зі специфічними рецепторами на поверхні клітини-хазяїна. Ця взаємодія запускає проникнення вірусу в клітину хазяїна шляхом

ендоцитозу або злиття. Потрапляючи всередину клітини-господаря, вірусний геном вивільняється з капсида і транспортується до ядра або цитоплазми, залежно від вірусу. Потім геном реплікується та транскрибується у вірусні білки, які збираються в нові вірусні частинки. Нарешті, нові вірусні частинки вивільняються з клітини-хазяїна і можуть інфікувати інші клітини.

Експресія генів герпесвірусу є динамічною та складною, з різними доповненнями вірусних генів, що експресуються в певний час у різних контекстах інфекції. Використання альтернативних промоторів забезпечує підвищений рівень контролю, дозволяючи різним промоторам спрямовувати транскрипцію одного гена у відповідь на різні часові та контекстуальні сигнали. Під час літичної реплікації герпесвіруси експресують свої гени у часовому каскаді з трьома різними моделями експресії генів: негайно ранній, ранній та пізній. У клітинах, які підтримують латентність, герпесвіруси обмежують експресію вірусного гена, щоб уникнути імунного нагляду, зберігаючи при цьому вірусний геном. Ці залежні від часу та контексту зміни в експресії вірусних генів свідчать про важливу роль окремих регуляторних механізмів транскрипційної регуляції на різних стадіях циклу реплікації вірусу (Hale and Moorman, 2021). Негайно-ранні гени кодують регуляторні білки, які активують ранню експресію генів, тоді як ранні гени кодують білки, що беруть участь у реплікації ДНК і синтезі білка. Пізні гени кодують структурні білки, необхідні для збірки віріону. Одним із механізмів, які використовують віруси герпесу для адаптації експресії вірусного гена до окремих умов інфекції, є використання кількох промоторів для регулювання транскрипції одного вірусного гена.

Віруси герпесу використовують альтернативні промотори, щоб забезпечити точний часовий контроль експресії вірусного гена та інтегрувати експресію вірусного гена в залежні від типу клітини сигнали навколишнього середовища. Нові дані свідчать про те, що використання альтернативного промотору може також розширити кодуючу здатність геномів герпесвірусу, породжуючи різні ізоформи ключових вірусних білків.

Загальні генні продукти герпесвірусу були визнані ключовими білками, які формують характерну структуру віріону герпесвірусу та забезпечують ключові загальні функції для реплікативного циклу, починаючи з входу в клітини, продовжуючи через процес синтезу вірусної ДНК і метаболізму нуклеїнових кислот і завершуючи капсидом дозрівання і вихід віріонів.

1.3. Латентний період, реактивація та клінічні прояви герпесвірусної інфекції

Часто вірусна інфекція може протікати безсимптомно, і бути виявленою лише тоді, коли шкода для організму, в якому вона розвивається, стає очевидною. Найпоширенішим сценарієм є те, що вірусна активність всередині хазяїна не призводить до жодних клінічних симптомів. Це було продемонстровано для ряду потенційно патогенних вірусів шляхом виявлення їхньої високої поширеності серед здорових людей. При цьому, віруси, які мають довготривалі еволюційні стосунки з видами-господарями, як правило, відносно доброякісні. Ці віруси залежать від своїх хазяїв, зокрема для реплікації, тому еволюційно їхня взаємодія не викликає важких патологій, адже серйозне захворювання чи загибель організмів у яких відбувається репродукція, завадить подальшому життєвому циклу вірусу. Латентним вірусам потрібен господар, який залишається живим і достатньо здоровим, щоб взаємодіяти з іншими. І герпесвірусам характерна латентність (Weidner-Glunde et al., 2020).

Віруси можна розділити на три типи, відносно їх реплікативних стратегій. Латентний період із періодичним рецидивом — перший. Вірусну латентність не слід плутати з клінічною латентністю, тобто інкубаційним періодом, протягом якого вірус активний, але симптоми ще не з'явилися. Другий варіант є підхід «бий і біжи». Типовими прикладами є грип і діарея, що викликає норovірус. Вони демонструють швидкий сплеск реплікації, але

згодом покидають організм. Вони виділяють велику кількість вірусних частинок у надії, що деякі з них знайдуть шлях до нових особин. Третій варіант — тактика «повільно і непомітно». Такі віруси розмножуються безперервно, але на достатньо малоактивному рівні, щоб серйозно не пошкодити свого хазяїна або не спровокувати імунну відповідь достатнього масштабу для ризику вигнання.

Велике різноманіття генів герпесу дозволяє створювати складні стосунки з господарем. Ці віруси маніпулюють не тільки інфікованими ними клітинами, але й імунною відповіддю.

Альфа – підродина в основному націлена на нейрони для тривалого перебування, але альфагерпесвіруси також реплікуються в епітелії, що є важливим для ефективної передачі через шкіру або слизову оболонку. Інші (бета і гаммагерпесвіруси) віддають перевагу різним підгрупам лейкоцитів, але більшість із них також можуть інфікувати епітеліальні клітини. Клітинний тропізм визначається наявністю рецепторів клітинної поверхні, а також тим, чи сприятливі внутрішньоклітинні умови для активності вірусу.

Виникаюча картина природної біології герпесвірусів — це первинна інфекція з помірними симптомами або без них і дуже успішне встановлення довготривалих стосунків із господарем. Вірусна активність може бути пов'язана з ураженнями шкіри, ротової порожнини чи статевих органів як засіб передачі вірусних частинок новим господарям. Нормальний перебіг взаємовідносин «хазяїн-вірус» передбачає добре регульовану вірусемію і, таким чином, обмежене нездужання (Grinde, 2013).

Проте іноді таке співіснування порушується, що викликає реактивацію. Реактивація герпесвірусів відбувається, коли вірус реактивується зі свого латентного стану та починає розмножуватися, що призводить до вивільнення нових інфекційних вірусних частинок. Ключовою вимогою латентності є оборотність, тобто здатність геному реактивувати повну експресію вірусного гена з продукуванням «інфекційних нащадків» (продуктивна або літична реплікація). Реактивація

може бути спровокована різноманітними подразниками, включаючи стрес, гормональні зміни та імуносупресію. Точні механізми, за допомогою яких відбувається реактивація, до кінця не вивчені, але вважається, що вони включають активацію експресії вірусного гена та модуляцію імунної відповіді господаря (Speck and Ganem, 2010).

Герпесвірусні інфекції можуть викликати широкий спектр клінічних проявів, залежно від конкретного вірусу та локалізації інфекції. Деякі поширені клінічні прояви включають герпес (HSV-1), генітальний герпес (HSV-2), оперізуючий лишай (вірус вітряної віспи), інфекційний мононуклеоз (вірус Епштейна-Барра) і саркому Капоші (HHV-8). Крім цих клінічних проявів, герпесвірусні інфекції також пов'язані з різними неврологічними, очними та респіраторними захворюваннями. HSV-1 більшість людей інфікуються з раннього дитячого віку. Він зазвичай викликає ураження слизових оболонок губ, рота, рідше геніталій. HSV-2 зараження може відбутися тільки з початком статевого життя. HSV-2 уражає геніталії, викликає генітальний герпес. Серологічні ознаки інфекції HSV-1 серед людей у світі варіюються від 56–85%, а HSV-2 — від 13–40% (Накім et al., 2022). Первинне ураження супроводжується реплікацією вірусу в місці інвазії, а потім він існує латентно в клітинах нервових гангліїв. У інфікованих осіб HSV-1 зберігається в нервових вузлах трійчастого нерва, HSV-2 — у крижових нервових вузлах. Проникнення вірусу в ганглії може здійснюватися гематогенним або неврогенним шляхом.

Ураження шкіри та слизових оболонок характеризуються висипаннями на гіперемійованому фоні згрупованих пухирців (везикул) із прозорим, а потім каламутним вмістом. Пухирці зсихаються в скориночки, які після відторгнення не залишають рубців. Переважна локалізація — на губах, щоках, крилах носа, слизовій оболонці рота, статевих органах. Часто спостерігається лімфаденопатія. Характерна схильність до рецидивів.

1.4. Механізми та мішені дії противірусних препаратів

Противірусні препарати відіграють вирішальну роль у лікуванні інфекцій вірусу герпесу, перешкоджаючи розмноженню вірусу та полегшуючи симптоми. Повне розуміння циклів реплікації вірусу є життєво важливим для визначення ефективних мішеней для ліків.

Віруси герпесу еволюціонували, щоб кодувати механізм реплікації ДНК. Ця складна система включає такі ключові компоненти, як одноланцюговий ДНК-зв'язуючий білок, ДНК-полімераза та комплекс геліказа/праймаза (Weller and Coen, 2012).

Цикл реплікації HSV-1, що відбувається переважно в ядрах епітеліальних клітин, включає взаємодію з вірусним геномом, регулюючи реплікацію ДНК, транскрипцію та упаковку геному (Rice, 2021).

Інфекція починається з приєднання віріону до гепарансульфату – лінійного полісахариду, розташованого на поверхні клітин-господарів за допомогою спеціальних білків (gB, gC, gD і gE). Це призводить до злиття мембрани, інтерналізації оболонки та капсиду в цитоплазму господаря. HSV-1 і HSV-2 є альфагерпесвірусами, які інфікують людей, використовуючи різні ділянки ДНК для реплікації. α -Гени, які головним чином регулюють реплікацію вірусу, β -гени, які беруть участь у синтезі та упаковці ДНК та γ -гени, які синтезують структурні компоненти вірусів (Boff et al., 2020).

Ліки проти герпесвірусних інфекцій в основному бувають двох типів: аналоги нуклеозидів, такі як ацикловір та інгібітори гелікази-праймази, наприклад аменакевір, є поширеними, націленими на ДНК-полімеразу/тимідинкіназу. Оскільки виникає резистентність до ліків, необхідно глибше розуміти механізми реплікації вірусу. Нові біотехнологічні підходи, такі як РНК-інтерференція та засоби редагування генів, такі як нуклеази цинкового пальця (ZFN), ефекторні нуклеази, подібні до активатора транскрипції (TALEN) – сконструйовані білки, які можуть

бути розроблені для зв'язування та розщеплення певних компонентів ДНК, що складаються з ДНК-зв'язують домену та нуклеазного домену. І асоційований білок 9 (Cas9) з кластеризованим регулярним вкрапленням коротким паліндромним повтором (CRISPR), що робить можливим редагування геномів вірусної ДНК, є перспективним у придушенні герпесвірусів на генному рівні, надаючи альтернативи для дослідження ефективних противірусних мішеней (H. Dong et al., 2021).

Блокування прикріплення вірусу до клітин хазяїна є вирішальною стратегією боротьби з герпетичними інфекціями. Ідеальний і класичний противірусний підхід забезпечує пряме блокування факторів прикріплення вірусу, таких як gB і gC. Дослідження показали, що ретроциклін 2 може одночасно зв'язуватися з gB2 HSV-2 з високою спорідненістю і таким чином запобігати проникненню вірусу в клітини-мішені (Bushra et al., 2004). Ретроциклін 2 і Конденсаційний полімер мигдальної кислоти (SAMMA) демонструють ефективність проти HSV-2, зменшуючи приєднання вірусу. Перспективними є агенти, що утворюють стійкі комплекси з gB, у тому числі PRO 2000 (експериментальний вагінальний мікробіцид).

Якщо говорити про придушення реплікації гена герпесвірусу на білковому рівні, результати генетичного аналізу показують значну схожість між захворюваннями, викликаними HSV-1 і HSV-2. Ацикловір і споріднені аналоги нуклеозидів використовують для лікування інфекції та пригнічення передачі вірусу. Ці препарати можуть фосфорилюватися за допомогою Т3 і утворювати трифосфати через ферменти хазяїна, які конкурують з дезоксигуанозинтрифосфатом для інгібування ДНК-полімерази, кодованого герпесвірусом, і вибірково інгібують реплікацію вірусної ДНК з низькою токсичністю клітини хазяїну. Інгібітори, націлені на вірусну ДНК-полімеразу, можуть пригнічувати тільки віруси на стадії спалаху зі швидкою реплікацією, але не пригнічувати віруси в латентній фазі. Більшість інгібіторів ДНК-полімерази, таких як пенцикловір і фоскарнет, здатні сприйняти реплікацію гена всіх підродин герпесвірусів. Інгібітор ферменту

протеїнази, циклопропавір і марибавір також є ефективними противірусними препаратами проти EBV. Однак ацикловір може блокувати реплікацію EBV в реально інфікованих клітинах, але не має такого ефекту в латентно інфікованих клітинах (H. Dong et al., 2021).

Передові технології редагування геному, такі як ZFN, TALEN і CRISPR/Cas9, дозволяють цілеспрямовано пригнічувати гени для боротьби з герпесвірусними інфекціями, але ZFN і TALEN широко не застосовуються через вартість і складність розробки цих ендонуклеаз. CRISPR-Cas9, особливо ефективний завдяки своїй адаптивності. На рівні РНК з'являється синтетична siRNA як потенційна стратегія. Орієнтація на конкретні стадії циклу є багатообіцяючими шляхами терапевтичного втручання, яке пом'якшує вплив інфекції і покращує результати. Однак, наразі жодна технологія не може вважатися ідеальною чи навіть застосовною до кожного випадку, оскільки контекст диктує найкращий підхід для генетичної модифікації в цільовому організмі (Castro et al., 2021).

1.5. Комбінована терапія та нові підходи до хіміотерапії герпесвірусу

Комбінована терапія передбачає використання двох або більше препаратів з різними механізмами дії для досягнення синергічного ефекту при лікуванні герпесвірусних інфекцій. Одним із прикладів комбінованої терапії є використання ацикловіру або валацикловіру, у поєднанні з препаратами, які діють на вірусну протеазу або геліказу. Показано, що цей підхід є ефективним *in vitro* та на тваринних моделях герпесвірусної інфекції (Piret and Boivin, 2010).

Іншим підходом до комбінованої терапії є використання імунних терапій, таких як моноклональні антитіла або терапевтичні вакцини, у поєднанні з противірусними препаратами. Коктейлі моноклональних антитіл і біспецифічних конструкцій можна використовувати для одночасного

націлювання на кілька вірусних епітопів і для подолання проблем нейтралізації. Наприклад, було показано, що терапевтична вакцина, яка націлена на вірусний глікопротеїн D (трансмембранний делеційний мутант), знижує частоту та тяжкість рецидивуючих спалахів генітального герпесу в клінічному дослідженні II фази. Порівняно з вихідним рівнем, рівень генітального виділення HSV-2 одразу після введення дози знизився з 13,4% до 6,4% для 30 мкг і з 15,0% до 10,3% для 100 мкг. Рівень уражень також значно знизився (Bernstein et al., 2017). Поєднання цієї вакцини з противірусними препаратами потенційно може ще більше покращити результати лікування.

Крім комбінованої терапії існує кілька нових підходів до хіміотерапії герпесвірусів, які зараз досліджуються. Одним із таких підходів є використання технології редагування генів CRISPR/Cas9 для націлювання на геном герпесвірусу та порушення реплікації вірусу. Система CRISPR/Cas9 може націлюватись на будь-який тип гена чи геномної області, дозволяючи сайт-спрямоване редагування гена, наприклад мутацію, нокаут, вставку та видалення. Головним чином, CRISPR/Cas9 зосереджується на противірусній терапії, функціональному дослідженні факторів вірусної вірулентності та відновленні вірусних векторів, які зазвичай використовуються для розробки генно-інженерної вакцини. У 2014 році повідомлялося, що система CRISPR/Cas9 вбудовує чужорідні гени в аденовірусний вектор і HSV-1 лише з одним раундом селекції, змінюючи геноми великих ДНК-вірусів і перешкоджаючи реплікації вірусу. Ефективність геномної мутації рекомбінантного потомства вірусу досягла 47–52 % (Teng et al., 2021). Цей підхід показав перспективність *in vitro* та на тваринних моделях герпесвірусної інфекції, але необхідні подальші дослідження, щоб визначити його безпеку та ефективність у людей. Геном герпесвірусу легко редагується за допомогою CRISPR/Cas9, оскільки представляє собою дволанцюгову ДНК. Дослідження показали, що індукована ділянка мутації CRISPR/Cas9

UL7, яка кодує білок тегументу, знижує здатність до реплікації HSV-1 (Xu et al., 2016).

Іншим новим підходом до хіміотерапії герпесвірусу є використання малих інтерферуючих РНК (siRNA) для націлювання на вірусні гени та пригнічення реплікації вірусу. Кілька siRNAs, націлених на різні аспекти життєвого циклу герпесвірусу, були розроблені та випробувані *in vitro* та на тваринних моделях герпесвірусної інфекції з багатообіцяючими результатами. Головною проблемою терапії голою siRNA є стабільність нуклеази сироватки. Більшість вірусних досліджень були націлені на інгібування HSV-1 або HSV-2, і дуже небагато досліджень, які намагалися націлитися на обидва з використанням однієї siRNA. (Manda et al., 2019).

Було доведено, що нокдаун гена інфекційного клітинного білка-4 (ICP4) у HSV-1 призводить до інгібування вірусу (F. Duan et al., 2011).

Також дослідження *in vitro* показали, що siRNAs можуть ефективно пригнічувати інфекцію цитомегаловірусу, націлюючись на вірусну ДНК-полімеру, фермент pUL54, кіназу pUL97 і ранні гени UL123 і UL122 (Hamilton et al., 2014).

Підсумовуючи, сучасні методи лікування мають обмежену ефективність і пов'язані з побічними ефектами. Комбінована терапія кількома препаратами, спрямованими на різні аспекти життєвого циклу вірусу, і нові підходи, такі як редагування генів CRISPR/Cas9 і терапія на основі siRNA, пропонують багатообіцяючі шляхи для покращення хіміотерапії герпесвірусу, проте необхідні подальші дослідження, щоб визначити безпеку та ефективність цих підходів для людей та розробити нові методи лікування герпесвірусних інфекцій.

1.6. Наночастинки з противірусною дією

Вакцини проти серйозних вірусних інфекцій, таких як кір, епідемічний паротит, гепатит А та гепатит В, значно знизили захворюваність. Однак існують віруси з високим рівнем мутацій, що ускладнює вакцинацію. Оскільки вірусні інфекції мають загальний вплив, легко розвивають стійкість до сучасних ліків, а нові віруси все ще з'являються, існує постійна потреба у відкритті нових ліків, а також удосконаленні рецептури поточних ліків. Оскільки наноматеріали демонструють чудові фізичні та хімічні властивості, високе співвідношення площі поверхні до об'єму та підвищену реакційну здатність, нові підходи до противірусної терапії включають комбінації наноматеріалів і сучасних противірусних агентів.

Багатовалентні наноструктури, полімери, дендримери та ліпосоми можуть встановлювати багатовалентні зв'язувальні взаємодії з багатьма біологічними системами і таким чином можуть націлюватися на патогенні взаємодії. Є повідомлення про противірусну дію наночастинок різних металів, особливо наночастинок золота, та їх потенціал для лікування, профілактики та контролю вірусних інфекцій. Інтеграція класичних противірусних препаратів у формі кількох лігандів у наноструктури забезпечує переваги, створюючи високу локальну концентрацію активних молекул (Milovanovic et al., 2017).

За останні кілька років наночастинки з'явилися як альтернативний матеріал для передових діагностичних і терапевтичних застосувань у медицині. Наночастинки - це невеликі тверді колоїдні полімерні частинки діаметром менше 1 мкм. Структура наночастинок подібна до мікросфер і може бути матричноподібною (наночастинки) і капсулоподібною (нанокапсули). Для створення наночастинок можна використовувати різні матеріали, білки, ліпіди, неорганічні матеріали (Mekuye and Abera, 2023). Однак полімерні наночастинки в основному складаються з природних або синтетичних біосумісних та біорозкладаних полімерів (молочна кислота, альгінат, циклодекстрин, гіалуронова кислота та інші). Використання цих полімерів максимізує тканинну сумісність і зменшує цитотоксичні ефекти.

Усередині наночастинок активні молекули можуть бути розчинені, інкапсульовані, адсорбовані або кон'юговані. Оскільки їх розмір дуже малий, наночастинок можна застосовувати внутрішньовенно.

Ліпідні наночастинок, включаючи тверді ліпідні наночастинок та наноструктуровані ліпідні носії, пропонують стабільну систему доставки терапевтичних засобів. Тверді ліпідні наночастинок забезпечують стабільність, захищають лабільні інгредієнти та модулюють вивільнення ліків. Наноструктуровані ліпідні носії поєднують тверду ліпідну матрицю з рідкою ліпідною фазою. *In vitro* ліпідні наночастинок, що містили ацикловір, продемонстрували більшу активність, ніж вільний препарат (Hassan et al., 2020). З іншого боку, білкові наночастинок, отримані з полімерів альбуміну, з'явилися як система доставки ганцикловіру та антисмислових олігонуклеотидів, спрямованих на цитомегаловірусні інфекції (Arnedo et al., 2004).

Кілька досліджень показали антивірусний потенціал наночастинок золота (A. Babaei et al., 2021) (Dehghani et al., 2022). Наночастинок золота вважаються важливим хімічним препаратом через їхні виняткові фізико-хімічні та хімічні характеристики разом з іншими біологічними характеристиками, а саме протизапальну, антиагрегантну, протигрибкову, ангіогенну, протиракову та антибактеріальну дію.

Іони, що вивільняються з наночастинок золота, безпосередньо взаємодіють з біомолекулами, які містять фосфор або сірку, включаючи білки, ДНК і РНК. Схоже, що наночастинок золота перешкоджають декільком стадіям циклу реплікації вірусів, включаючи прикріплення вірусів до клітинної мембрани та їх проникнення в клітини, реплікацію ДНК і РНК і синтез білка (Milovanovic et al., 2017).

Найдрібніші наночастинок проникають у клітини господаря, а потім у вірусний геном, перешкоджаючи реплікації вірусного вектора. Ці наночастинок прикріплюються до вірусного геному, запобігаючи дії полімерази та утворенню віріонів-потомків. Блокуючі агенти, такі як

полімери, полісахариди та поверхнево-активні речовини, підвищують ефективність наночастинок.

Срібло також взаємодіє з тіоловими групами в бактеріальних дихальних ферментах, прикріплюючись до клітинної стінки та мембрани, пригнічуючи дихання. Усередині клітини, іони золота в основному викликають антибактеріальну дію, взаємодіючи в цитоплазмі. Іони проникають через іонні канали, не пошкоджуючи клітинні мембрани, що призводить до денатурації рибосом, пригнічення експресії ферментів і білків і спричиняє загибель клітин. (Sarkar et al., 2022).

Останні дослідження висвітлюють певні структури з активністю проти HSV. Наночастинки золота та срібла з сульфонатними функціями перешкоджають проникненню вірусу та перешкоджають поширенню від клітини до клітини. Наприклад, наночастинки золота розміром 4 нм з меркаптоетансульфонатом імітують гепарансульфат, блокуючи прикріплення та проникнення HSV (Baram-Pinto et al., 2010).

Частково негативно заряджені мікронаноструктури ZnO інгібують HSV-1 *in vitro*. Наночастинки золота, кон'юговані з дубильною кислотою, знижують інфекційність HSV-2 *in vitro* та *in vivo*, взаємодіючи з глікопротеїнами, запобігаючи прикріпленню та проникненню (Orłowski et al., 2018).

При доставці противірусних препаратів, посилених наночастинами, полімерні наночастинки інкапсулюють звичайні ліки, вирішуючи проблеми повільного всмоктування та низької біодоступності при пероральному прийомі (Maus, Strait and Zhu, 2021). Наночастинки виявилися корисними в противірусній терапії, підвищуючи ефективність ліків, зменшуючи побічні ефекти та дозволяючи зменшити частоту введення ліків. Майбутні дослідження мають на меті охарактеризувати наноматеріали, розробити біосумісні наноносії зі специфічним націлюванням і створити наномолекули з притаманними противірусними терапевтичними характеристиками. Ці

досягнення спрямовані на подолання поточних обмежень і підвищення ефективності протівірусної терапії.

1.7. Наноструктури як елементи запобігання поширення вірусу

Наноструктури відіграють ключову роль у перешкоджанні поширенню вірусів, зокрема через їхню участь у доставці ліків і протівірусних ефектах. Пасивне націлювання полегшує доставку ліків до певних органів або тканин за рахунок використання наночастинок із такими відмінними властивостями, як розмір і характеристики поверхні.

Існує 2 види націлювання структур залучених до імунної відповіді для подолання вірусних інфекцій, які по своїй природі є лімфатичними, оскільки саме лімфатична система виконує ключові функції в організмі, включаючи підтримку балансу рівнів рідини в тканинах, а також транспортування клітин. Пасивне націлювання, яке використовує наночастинок в діапазоні оптимальних розмірів 10–100 нм для накопичення в лімфатичній тканині, що виявляється ефективним у націлюванні на вірусні резервуари, що зберігаються у цій ділянці. Вибірковий характер пасивного націлювання підвищує точність доставки ліків, мінімізуючи нецільові ефекти. Та активне націлювання, яке передбачає модифікацію поверхні наночастинок для досягнення точної доставки ліків. Цей метод використовує взаємодії ліганд-рецептор, такі як моноклональні антитіла або чутливі до стимулів наноносії, що реагують на внутрішні або зовнішні стимули. Покращуючи специфічність вивільнення ліків, активне націлювання забезпечує вищу концентрацію терапевтичних агентів у бажаному місці, мінімізуючи системний вплив і зменшуючи потенційні побічні ефекти (Lan et al., 2023).

Активне націлювання може включати в себе використання наночастинок срібла як чутливих до стимулів компонентів, які реагують на зовнішні чи внутрішні стимули для точного вивільнення протівірусних

препаратів в потрібних областях. Ці наночастинки взаємодіють з оболонковими або капсидними білками, перешкоджаючи прикріпленню, проникненню та реплікації вірусу. Крім того, їх внутрішньоклітинні дії поширюються на втручання у вірусну ДНК або РНК, пригнічуючи реплікацію та синтез білка. Стимуляція вродженої імунної відповіді наночастинками сприяє посиленню протівірусного захисту (Galdiero et al., 2011).

Розвиваючи дослідження наноструктур у протівірусних програмах, поточні дослідження наночастинок на основі золота і срібла розкривають їхній терапевтичний потенціал проти герпесвірусних інфекцій.

Розглядаючи наноструктури як елементи для запобігання поширенню вірусів, різні стратегії та програми виходять на перший план. Захищаючи інкапсульовані терапевтичні засоби, наночастинки можуть сприяти тривалому вивільненню ліків і розширювати терапевтичне вікно. Наночастинки можуть складатися з матеріалів, що реагують на подразники, або їх поверхні можуть бути кон'юговані з націлюючими лігандами, щоб направляти корисні навантаження ліків у місця високого вірусного навантаження (Raton, 2022). Цільова доставка, досягнута таким чином, може не тільки підвищити ефективну концентрацію препарату в осередку захворювання, але й покращити профіль безпеки шляхом зменшення нецільового впливу препарату. Крім того, наночастинки знаходяться в ідеальному діапазоні розмірів для участі в багатовалентних взаємодіях з різними біологічними субстратами. У системах доставки ліків наноструктури служать носіями для протівірусних препаратів, підвищуючи їх ефективність і мінімізуючи побічні ефекти. Нанопідсилені вакцини, що використовують такі структури, як ліпосоми або вірусоподібні наночастинки, покращують стабільність вакцини, презентацію антигену та імунну відповідь, сприяючи ефективній профілактиці поширення вірусу (Chattopadhyay et al., 2017). Діагностичні наносенсори, створені за допомогою наноструктурних матеріалів, забезпечують високочутливі

інструменти для виявлення вірусних частинок або біомаркерів, що дозволяє швидко й точно ідентифікувати інфекцію.

Окрім доставки ліків, наночастинки можуть бути розроблені для прямої взаємодії з вірусами та діяти як приманка для пригнічення вірусних функцій на різних стадіях інфекції. Наночастинки, що блокують віруси, розроблені з використанням певних функціональних груп, порушують життєвий цикл вірусу, запобігаючи прикріпленню та проникненню в клітини господаря. Ці наноструктуровані противірусні засоби, прикладом яких є модифіковані наночастинки золота або срібла, спрямовані безпосередньо на віруси, пригнічуючи реплікацію вірусів і запобігаючи вивільненню інфекційних частинок (Zhou et al., 2021).

Таким чином, різноманітні застосування наноструктур, починаючи від доставки ліків і противірусних ефектів до діагностичних інструментів, підкреслюють їх ключову роль у боротьбі з вірусними інфекціями. Невпинний розвиток нанотехнологій розширює потенціал наноструктур у запобіганні поширенню вірусів і пропонує багатогранний підхід до антивірусних стратегій.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Матеріали дослідження

Клітини:

- WISH: Людські клітини епітеліального походження, використані для дослідження цитотоксичності.
- Vero: Клітини мавпячих нирок, використані для оцінки цитотоксичності та ефективності препаратів.

Культури клітин були надані Банком культур Інститутом експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України

Наночастинки та нанокompозити:

- 99.99+% Pure True Colloidal Gold 250 мл/100 ppm (Sirius Metals США): Високочисте колоїдне золото з концентрацією понад 99.99%, збережене у прозорій пластиковій пляшці з фенольною кришкою для зберігання.
- Pürblack® Live Resin True Gold Shilajit 30 грамів (Pürblack® США): Органічне мумію з високим вмістом біологічно доступного золота і понад 80 мінералами.
- SHILAJIT UK 100% Pure Himalayan Shilajit Resin 20 грамів (SHILAJIT UK): Чисте гімалайське мумію без вмісту наночастинок.

Буферні розчини та культуральні середовища:

- PBS: Фосфатно-солевий буфер, використовуваний для промивання клітин та інших процедур
- DMSO (Sigma, США): Використовувався для розчинення речовин та приготування робочих розчинів.

Для Vero:

- 46% DMEM (Sigma, США): Культурне середовище, що забезпечує оптимальні умови для клітинного росту та поділу.
- 46% RPMI 1640 (Sigma, США): середовище для культивування клітин, використовується для культивування клітин ссавців
- 8% інактивованої прогріванням при 56°C ETC (Sigma, США) з додаванням 100 мкг/мл гентаміцину;

Для WISH:

- 92% RPMI 1640 (Sigma, США)
- 8% інактивованої прогріванням при 56°C ETC (Sigma, США) з додаванням 100 мкг/мл гентаміцину;

Реагенти для аналізу органів з впливом на них мумію:

- Набори реагентів E-lyte: Використовуються для визначення рівнів ALT, AST, глюкози, загального білку, сечовини, креатиніну, білірубіну прямого і загального, тригліцеридів, холестеролу, в тканинах печінки та крові мишей.

Аналіз життєздатності клітин та вірусної активності:

- МТТ (NeoFroxx, Німеччина): Барвник, що використовується для оцінки життєздатності клітин шляхом вимірювання активності мітоспецифічного ферменту.
- Трипсин і Версен (Biowest, Франція): Використовуються для промивки клітин перед проведенням аналізу.
- Кристалічний фіолетовий (neoFroxx, Німеччина): Використовувався для визначення титру вірусу та пригнічення репродукції вірусу.

Кліматичні умови:

Експерименти проводилися при стандартних умовах температури (37°C), в умовах підтримки CO₂ для клітинного росту та експериментів.

2.2. Методи дослідження

2.2.1 Культивування клітин

Культури клітин вирощували у стерильних пластикових флаконах (Sarstedt, Німеччина). Епітеліальні клітини перещеплювали кожні 48 годин, після попередньої перевірки цілісності моношару. Кратність розсіву – 1:10.

Для зняття клітин з поверхні флакона використовували спочатку 0,02% розчин Версену (Biowest, Франція), а потім 0,025% розчин трипсину (Biowest, Франція), далі ресуспендували у поживному середовищі.

Після інкубування протягом 24 години (37°C, 5% CO₂), перевіряли цілісність моношару (не менше 90%) за допомогою світлового інвертованого мікроскопу. За наявності моношару та відсутності контамінації, планшет з клітинами включали в дослідження.

Метод підрахунку клітин за допомогою камери Горяєва використовувався для визначення концентрації клітин у зразку (оптимальна концентрація для роботи з моношаром 300-500 тис. клітин). Шляхом такого мікроскопічного підрахунку клітин було визначено щільність клітин для культивування.

Для фарбування використовувався 0,4% розчин трипанового синього, який є стандартним барвником для визначення живих та мертвих клітин. Трипановий синій проникає в мертві клітини, де він взаємодіє з неклітинними компонентами і формує синій комплекс. Живі клітини залишаються безбарвними, оскільки їх мембрани не проникні для барвника. Культура клітин вважається придатною для проведення дослідів, якщо частка мертвих клітин становить <5%. Для фарбування трипановим синім до суспензії клітин додавали фарбник у пропорції 1:1 і ресуспендували.

Наступним кроком для підрахунку клітин, під покривне скельце був внесений розчин до повного заповнення одної із камер. Далі препарат поміщався на робочу поверхню мікроскопа, і проводився підрахунок живих і мертвих клітин. Кількість клітин обраховували в 15 великих квадратах двох незалежних площин. Для того аби отримати щільність клітин в 1 мл, отриману кількість необхідно помножити на коефіцієнт $k = 16665$.

2.2.2 Визначення життєздатності клітин МТТ-методом

МТТ – це хімічна сполука, яка використовується для визначення життєздатності клітин. Живі, життєздатні клітини метаболізують субстрат МТТ за допомогою ферментативної системи мітохондрій, перетворюючи його на формазан. Формазан накопичується всередині клітин і утворює фіолетовий осад. Інтенсивність забарвлення пропорційна метаболічній активності клітини або їхній життєздатності.

МТТ розчиняли у стерильному фосфатному буфері (рН 7,2) до концентрації 5 мг/мл. Для визначення токсичності речовин, брали підготовлені за добу 96-лункові планшети з клітинами, видаляли з лунок середовище і додавали по 150 мкл розчину сполук, розведених на ростовому середовищі. У такому вигляді плашка інкубувалася 48 годин при 37°C. Потім додавали по 20 мкл розчину МТТ для епітеліальних культур і інкубували протягом 3 годин при 37°C.

Після інкубації з лунок видаляли надосад. Після цього клітини ресуспендували у 100 мкл 96% етанолу для розчинення формазану. Вимірювали оптичну щільність лунок при 538 нм на спектрофотометрі «Multiscan FC» (США), приймаючи лунку А1 (містить лише розчинник) за бланк, значення якого віднімались автоматично від значень оптичної щільності (ОЩ) в інших лунках. Вираховували середні значення оптичної

щільності для кожного зразка та контролю клітин та значення стандартної похибки, використовуючи функції програми Microsoft Excel 2016.

Визначені оптичні щільності кожної лунки порівнювали з оптичною щільністю контролю клітин, що служить контролем, та за формулою вираховували % життєздатності клітин за дії різних концентрацій сполуки:

$$\% \text{ життєздатності} = \frac{A}{B} \times 100\%, \text{ де } A - \text{ середнє значення оптичної}$$

щільності дослідних зразків для певної концентрації сполуки, B - середнє значення оптичної щільності зразків контролю клітин.

Вираховували концентрацію сполуки, яка пригнічує життєздатність клітин на 50% (CC₅₀) у порівнянні з контролем клітин не оброблених досліджуваною сполукою.

2.2.3 Визначення антивірусної активності

Клітини Vero вирощували у культуральних флаконах на середовищі, що складалося з 46% DMEM (Sigma, США), 46% RPMI 1640 (Sigma, США) та 8% інактивованої прогріванням при 56°C сироватки великої рогатої худоби – ETC (Sigma, США) з додаванням 100 мкг/мл гентаміцину. Для зняття клітин з поверхні флакона використовували 0,02% розчин Версену (Biowest, Франція) та 0,25% розчин Трипсин-EDTA (Biowest, Франція), далі ресуспендували у поживному середовищі. У 96-лункові культуральні планшети розсівали по 100 мкл клітинної суспензії (щільність – 250-300 тис. кл/мл) і залишали на 24 год інкубації при 37°C в атмосфері 5% CO₂. Після цього видаляли середовище з клітин та 1 раз промивали PBS (pH = 7,2). Суспензію вірусу герпесу 1 типу на середовищі DMEM (Sigma, США) вносили у лунки по 50 мкл та інкубували 90 хв у термостаті при 37°C в атмосфері 5% CO₂.

Після інкубації видаляли надосад і вносили по 200 мкл досліджуваних речовин, розведених на 46% DMEM (Sigma, США), 46% RPMI 1640 (Sigma,

США) та 8% ETC (Sigma, США) з додаванням 100 мкг/мл гентаміцину. Плашку залишали на інкубацію при 37°C і 5% CO₂. Через 48 год перевіряли наявність ЦПД за допомогою інвертованого мікроскопу. Далі видаляли середовище і додавали по 50 мкл барвника кристалічного фіолетового у концентрації 5 мг/мл, далі 5 хв інкубували на шейкері та промивали під проточною водою. Після промивки плашку залишали на 24 год при кімнатній температурі, потім додавали по 150 мкл 96% етанолу та міряли при довжині хвилі 538 нм на спектрофотометрі Multiscan FC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Показник антивірусної активності сполуки (Пригнічення репродукції вірусу, %) розраховували за наступною формулою:

Пригнічення репродукції вірусу (%) = $\frac{D-KB}{KK-KB} \times 100\%$, де D – показник оптичної густини досліджуваної концентрації сполуки, KB – показник оптичної густини контролю вірусу, KK – показник оптичної густини контролю клітин (Mosmann, 1983).

Визначення інфекційного титру de novo

Для визначення інфекційного титру використовували відібраний надосад з вірусом після 48 год інкубації з досліду визначення антивірусної активності. Попередньо проводили 8-кратне титрування надосаду на середовищі PRMI (Sigma, США). Далі до моношару клітин у 96-лунковому планшеті (попередньо промитого 150 мкл PBS) вносили по 50 мкл суспензії. Інкубували 90 хв у термостаті при 37°C в атмосфері 5% CO₂. Після цього видаляли надосад і додавали по 200 мкл підтримуючого середовища. Після 48 год при 37°C та 5% CO₂, оцінювали ЦПД за допомогою інвертованого мікроскопу та фарбували кристалічним фіолетовим. Значення оптичної густини міряли при довжині хвилі 538 нм на спектрофотометрі «Multiscan FC» (США). На основі отриманих даних розраховували значення TCID₅₀ /мл за методом Ріда-Менча.

Метод Ріда-Менча використовується для визначення TCID₅₀ /мл — кількість інфекційних одиниць для культури тканин за мілілітр. Цей метод полягає у проведенні серійних розведень вірусу у культурі клітин, з метою визначення концентрації вірусу, яка зумовлює інфекцію у 50% клітин. Визначення TCID₅₀ /мл виконується шляхом визначення такого розведення, при якому 50% клітин демонструють ознаки інфекції.

2.2.4 Дослідження противірусної дії речовин

Чутливі до вірусів клітини спочатку інфікували вірусом по 50 мкл на лунку та проводили його адсорбцію на поверхні клітин протягом 1-2 год. при 37°C в атмосфері 5% CO₂. Потім вірус видаляли та додавали підтримуюче середовище з відповідним розведенням дослідних речовин. Через 48-72 год. проводили відбір проб у стерильних умовах для подальшого дослідження зміни інфекційності утвореного *de novo* вірусу.

Для визначення інфекційного титру вірусу клітини інфікували десятикратними серійними розведеннями вірусомісного матеріалу (лізати зразків відібрані з лунок через 48-72 год. після обробки вірусу відповідними розведеннями речовин). Для цього з планшета видаляли живильне середовище та додавали у лунки 50 мкл суспензії вірусомісного матеріалу розведеного у підтримуючому середовищі без сироватки і проводили його адсорбцію на поверхні клітин протягом 1,5 - 2 годин при 37°C в атмосфері 5% CO₂. В контрольних клітинах проводили заміну середовища на підтримуюче. Після адсорбції до клітин додавали 150 мкл підтримуючого середовища без сироватки та інкубували в атмосфері 5% CO₂ при 37°C протягом 2-3 діб. Для виявлення ЦПД стан моношару клітин контролювали з використанням світлового інвертованого мікроскопу (збільшення x70).

Титр вірусу визначати використовуючи фарбуванням кристалічним фіолетовим. Результати аналізували спектрофотометрично на рідері

Multiskan FC (Thermo Scientific, США) при довжині хвиль 538 нм. Використовуючи отримані оптичні щільності визначали титр вірусів та його зміну за формулами:

$$\% \text{ розвитку ЦПД вірусу} = 100 - \frac{A \times 100}{B}, \text{ де } A - \text{оптична щільність зразка, а } B - \text{оптична щільність контролю клітин.}$$

Визначали розведення вірусу, яке зменшує оптичну щільність зразка у порівнянні з оптичною щільністю контролю клітин на 50 %, що і є титром вірусу та виражається в TCID₅₀/мл.

Антивірусну дію екстрактів аналізували за зниженням титру та інфекційності вірусу за формулою:

$$\text{Противірусна ефективність} = A - B, \text{ де } A - \text{титр вірусу у контролі, а } B - \text{титр вірусу у досліді.}$$

2.2.5 Аналіз біохімічних та гематологічних показників органів мишей

Для дослідження впливу препаратів з наночастинками золота та без домішок на біохімічні та гематологічні показники органів мишей були проведені експерименти із застосуванням двох різних форм препаратів: Purblack Experimental W. Shilajit (мумійо без наночастинок, чистий) і Purblack True Gold 30g (мумійо з наночастинками золота).

Мишам згодовували препарати у концентрації 0,36 мг/особину (що відповідає 18 мг/кг). Зразки органів для аналізу відбиралися через 21 день від початку експерименту. Печінку та кров мишей аналізували для визначення біохімічних та гематологічних показників. Експериментальні тварини - білі безпородні миші та миші лінії Balb/c утримувалися в стандартних умовах віварію Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного. Період карантину - 5 діб. Всі експериментальні протоколи були схвалені Комісією з питань біоетики Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Проведені експерименти не

суперечать чинному законодавству України (ст. 26 Закону України 5456-VI від 16.10.2012 "Про захист тварин від жорстокого поводження") та "Загальним етичним принципам експериментів на тваринах".

Біохімічні показники, які вимірювалися у печінці та крові:

ALT (аланінамінотрансфераза) Од/л, AST (аспартатамінотрансфераза) Од/л, глюкоза г/л, тригліцериди г/л, холестерин ммоль/л, загальний білок г/л, сечовина ммоль/л, креатинін ммоль/л, прямий білірубін мкмоль/л, загальний білірубін мкмоль/л. Біохімічний аналіз сироваток проводили використовуючи напівавтоматичний біохімічний аналізатор HTI BIOCHEM SA (High Technology, Inc.).

Отримані результати порівнювали з відповідними показниками контрольних мишей, які не отримували препаратів. Це дозволило оцінити вплив препаратів на організм мишей і виявити потенційні відмінності між шиджилахатом з наночастинками золота та шиджилахатом без наночастинок.

2.2.6 Методи статистичної обробки даних

Було досліджено три препарати: мумійо (з наночастинками золота та без) і колоїдне золото. Контрольними зразками були культури клітин Vero без препаратів для клітинного контролю та вірус HIV-1 для контролю вірусу, при дослідженні метаболічної активності та антивірусної дії. Зразки, клітинний контроль і вірусний контроль аналізувалися в кількох аналітичних повторах. Для визначення достовірності середніх значень використовувалися статистичні показники (середнє арифметичне та стандартне відхилення). Статистична обробка даних та побудова графіків здійснювалася за допомогою Microsoft Excel.

РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Метою цього дослідження було дослідити протигерпетичну активність різних речовин, включаючи мумію, мумію з наночастинками золота та колоїдне золото, на різних модельних системах. В якості модельних систем використовувалися клітини WISH та Vero, чисті, та інфіковані HIV-1 та кров і печінка мишей.

Герпесвіруси — група ДНК-вірусів, які спричиняють низку захворювань у людини і тварин, що робить їх серйозною проблемою для охорони здоров'я. Розуміння ефективності потенційних противірусних засобів має вирішальне значення для розробки нових терапевтичних заходів.

3.1 Результати досліджень

3.1.1 Вплив препаратів на клітини та оцінка цитотоксичності

Було перевірено 3 препарати (Pure True Colloidal Gold, Pürblack® Live Resin True Gold Shilajit, SHILAJIT UK 100% Pure Himalayan Shilajit Resin) у декількох повторях на клітинах WISH (Рис. 3.1.а) та Vero (Рис. 3.1.б)

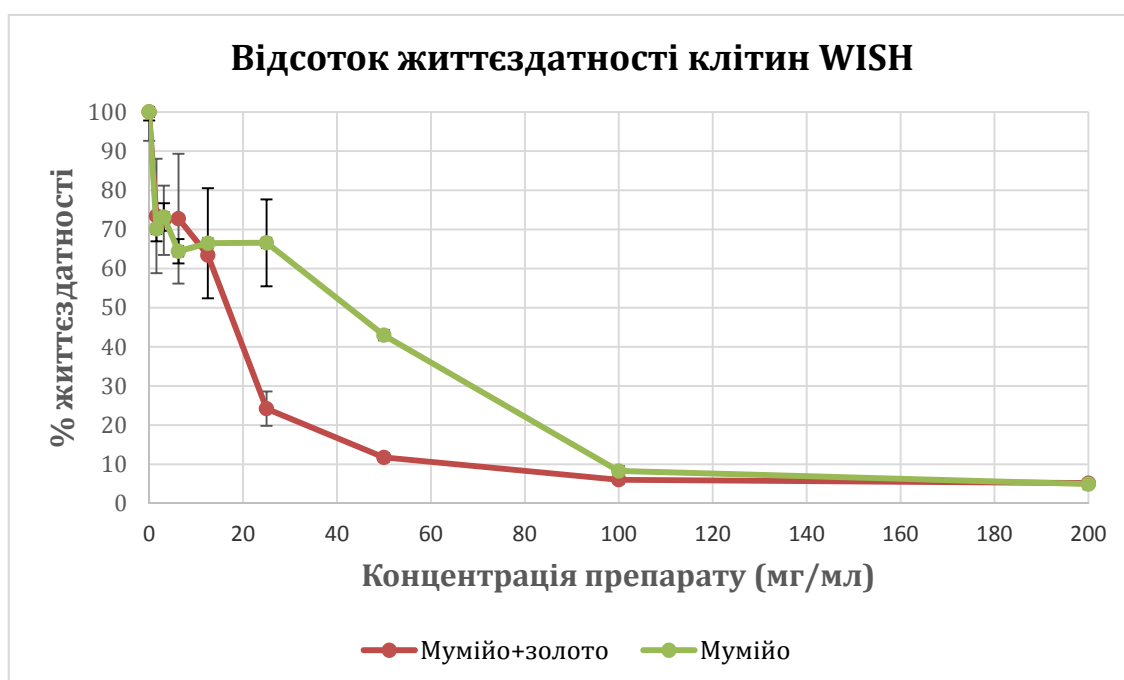


Рис. 3.1 (а) Результат аналізу життєздатності клітин під впливом препаратів на клітинах WISH, отриманий методом МТТ-аналізу за допомогою спектрофотометру «Multiscan FC».

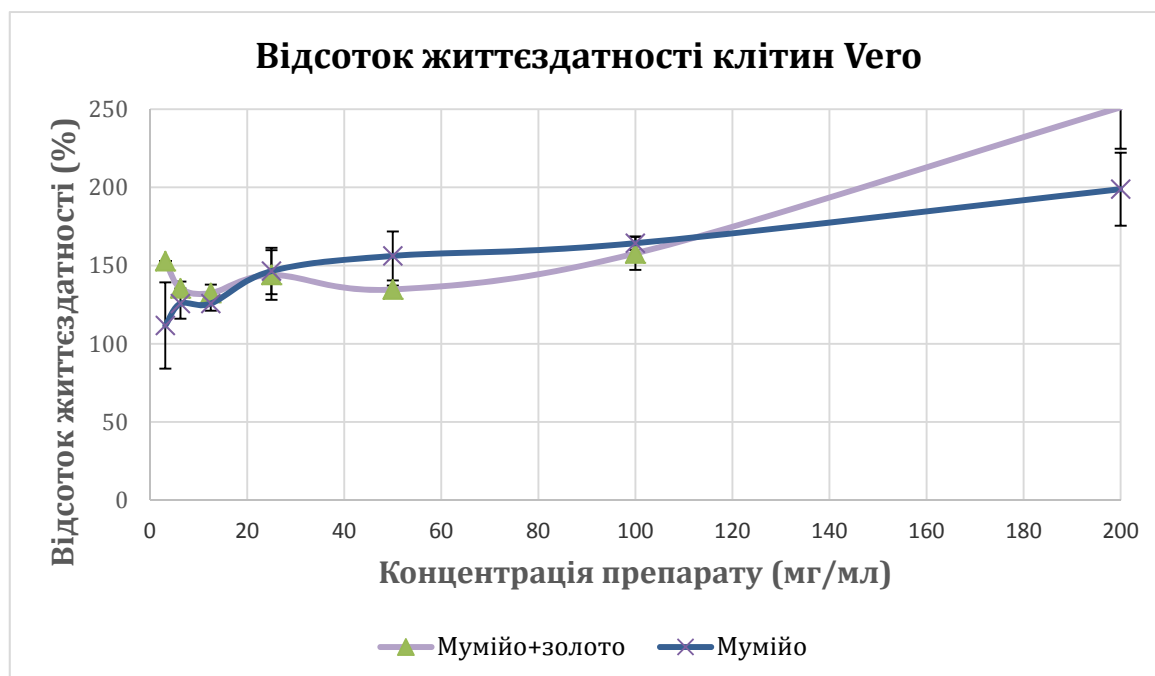


Рис. 3.1 (б) Результат аналізу життєздатності клітин під впливом препаратів на клітинах Vero, отриманий методом МТТ-аналізу за допомогою спектрофотометру «Multiscan FC».

Результати експериментів виявили чіткий вплив досліджуваних речовин на життєздатність клітин WISH. Мумійо із частинками золота та без домішок продемонстрували залежний від концентрації цитотоксичний ефект, причому більш високі концентрації призводили до помітного зниження життєздатності клітин.

З іншого боку, життєздатність клітин Vero продемонструвала зворотній ефект і концентрація препаратів в кількості 200 мг/мл продемонструвала найвищий відсоток життєздатності для клітин, що можна пояснити підвищенням метаболічної активності, що говорить про позитивний вплив досліджуваних речовин на клітини Vero. Тому для подальшої роботи зі встановлення протівірусної активності і титрів було вирішено працювати лише з даним типом клітин.

Вирахований коефіцієнт CC_{50} , що позначає концентрацію сполуки, яка пригнічує життєздатність клітин на 50% у порівнянні з контролем клітин не оброблених досліджуваною сполукою для клітин WISH становив: 41 для препарату мумійо із золотом і 49 для препарату мумійо без домішок.

3.1.2 Виявлення антивірусної активності

У ході аналізу на антивірусну ефективність було досліджено клітин Vero з мумійо без домішок, мумійо з додаванням золота та з колоїдним золотом у декількох повторах, до яких попередньо було додано і інкубовано по 50 мікролітрів герпесвірусу першого типу, у якості контролю клітин використовувалися інкубовані клітин Vero без домішок, а у якості контролю вірусу використовувався HSV-1.

Оцінка протівірусної ефективності була зосереджена на пригніченні реплікації вірусу. Результати наведено на графіку (Рис 3.2).

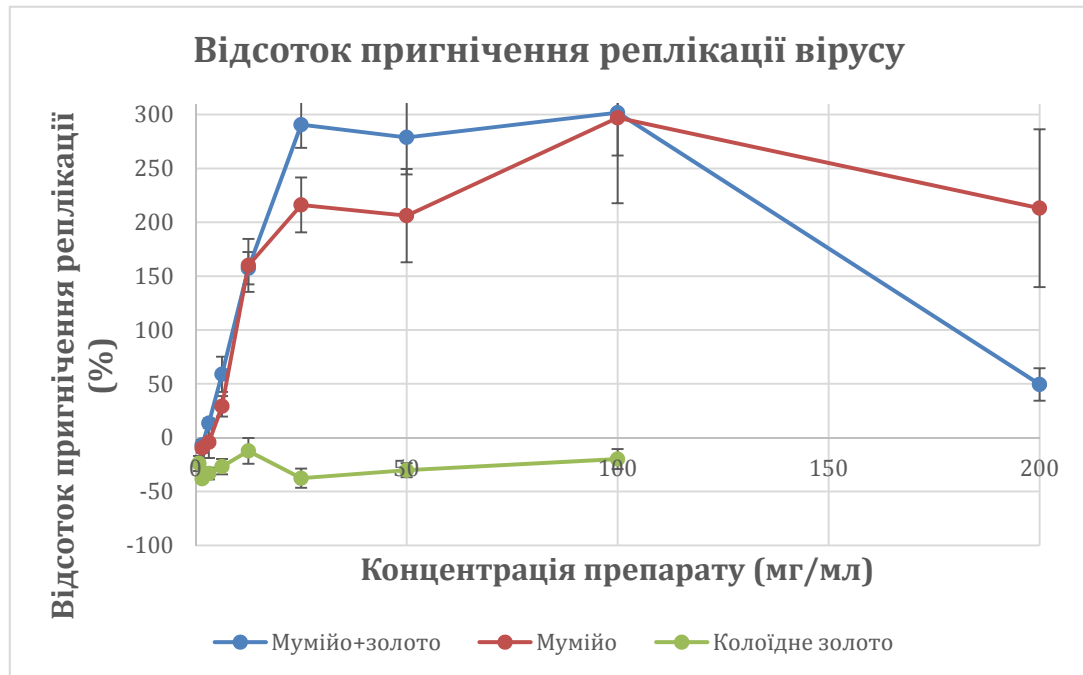


Рис. 3.2 Результат аналізу антигерпетичної дії препаратів на клітинах Vero, отриманий методом вимірювання оптичної щільності за присутності барвника кристалічного фіолетового за допомогою спектрофотометру «Multiscan FC»

Мумійо з частинками золота демонструє сильніший протівірусний ефект порівняно з мумійо без жодних частинок і колоїдним золотом при вищих концентраціях препарату. Це було підтверджено значним зниженням швидкості розмноження вірусу та вищим пригніченням розмноження вірусу в присутності мумійо з частинками золота.

Але при цьому, мумійо без домішок має більшу протівірусну ефективність в найвищій концентрації. Колоїдне золото ж, демонструє сталий від'ємний ефект, а отже має низьку ефективність.

Клітини інфікували десятикратними серійними розведеннями вірусовмісного матеріалу. Для виявлення цитопатичної дії вірусу (ЦПД), стан моношару клітин контролювали з використанням світлового інвертованого мікроскопу (збільшення x70). У всі піддослідні клітини

додавали один із трьох препаратів для дослідження ЦПД: мумію із золотом, мумію без домішок, або колоїдне золото.

Для препаратів із мумію цитопатична дія вірусу була найбільш видимою в найменших концентраціях препарату, особливо для мумію із золотом, в той час як, колоїдне золото не проявляло кореляції з дозою.

При використанні мікроскопу, стан моношару клітин візуально змінився починаючи з 3 ряду, тому для подальшого дослідження титру вірусу було вирішено взяти 3-6 ряди. Титр вірусу визначали використовуючи фарбування кристалічним фіолетовим із розведення вірусу, яке зменшує оптичну щільність зразка у порівнянні з оптичною щільністю контролю клітин на 50 % (TCID₅₀/мл). За результатами тестування були визначені титри вірусу синтезованого *de novo*, тобто були зібрані зразки надосаду клітин інфікованих вірусом та оброблені досліджуваними речовинами та ними проведене інфікування десятикратними розведеннями культуру клітин з метою визначення формування інфекційного потомства. Результати вимірів представлені у таблиці 3.3.

Проаналізувавши антивірусну дію екстрактів за зниженням титру та інфекційності вірусу можна зробити висновок, що використане в роботі колоїдне золото не проявило протигерпетичної дії, а композити нанозолота з шилажитом проявляють виражену протигерпетичну дію, що протдемонстровано зниженням титру вірусу більше ніж на 2 Lg.

Таблиця 3.3

Показник TCID₅₀/мл для визначення титру, що зменшує оптичну щільність зразка на 50 %

Розведення (log10)	Контроль вірусу	Мумійо із золотом	Мумійо	Колоїдне золото
Оптична щільність при 538 нм				
1	0,3968	0,4738	0,4590	0,3870
2	0,4779	0,5756	0,4863	0,3154
3	0,4156	0,8043	0,6545	0,3401
4	0,6569	1,3007	1,3139	0,3721
5	0,4252	1,9728	1,5973	0,4456
6	0,5763	1,9135	1,5471	0,3178
7	0,5339	2,0293	2,0052	0,3555
TCID₅₀/мл, log10	5,9	3,1	3,4	5,6
Зниження на, log10	-	2,8	2,5	0,3

3.1.3 Визначення протівірусної ефективності. Зв'язок доза-реакція

Цікавим результатом роботи було отримання співвідношення доза-реакція, що спостерігалось для кожної речовини. Більш високі концентрації мумійо призвели до посилення цитотоксичності у випадку відсутності вірусу, але при цьому, коли вірус був присутній і діяв на клітини, життєздатність клітин (таблиця 3.4) і протівірусна ефективність (таблиця 3.5) збільшувалась.

З підвищенням концентрації препаратів (мумійо та колоїдного золота) спостерігається зміна життєздатності клітин. Мумійо з наночастинками золота має виражений доза-залежний ефект на життєздатність клітин. При концентраціях від 1,56 мг/мл до 200 мг/мл життєздатність клітин значно зростає.

Чисте мумію також демонструє доза-залежне збільшення життєздатності клітин, проте його ефект трохи нижчий, ніж у мумію з наночастинками золота. Різниця в ефективності між цими двома препаратами свідчить про потенційно додатковий позитивний вплив наночастинок золота на життєздатність клітин у присутності HSV-1.

Колоїдне золото також демонструє певний доза-залежний ефект на життєздатність клітин, проте його вплив дуже незначний порівняно з мумію та мумію з наночастинками золота.

При збільшенні концентрації препаратів спостерігалось підвищення життєздатності клітин до певного рівня, після чого ефективність знижувалась. Колоїдне золото використовувалось в менших концентраціях через його високу біологічну активність і потенційну токсичність при високих дозах, що забезпечувало ефективність, стабільність і безпеку наночастинок у експерименті. Зокрема, для мумію з наночастинками золота концентрації 25, 50 та 100 мг/мл демонстрували вищий рівень життєздатності клітин порівняно з контрольними зразками, тоді як при концентрації 200 мг/мл спостерігалось зниження життєздатності. Це свідчить про те, що надмірна концентрація препарату може мати цитотоксичний ефект або інші негативні впливи на клітини, що перевищують його захисні властивості.

Цей результат підкреслює необхідність ретельного визначення оптимальної концентрації препаратів для досягнення максимального терапевтичного ефекту без негативних наслідків для клітин.

Загалом, доза-залежний вплив препаратів на життєздатність клітин свідчить про їхню потенційну ефективність у протидії вірусній інфекції HSV-1. Найбільш ефективним виявився препарат мумію з наночастинками золота, що може бути обумовлено синергетичним ефектом між компонентами мумію та наночастинками золота.

Таблиця 3.4

Відсоток життєздатних клітин заражених HSV-1

Контроль HSV-1 (%)	Концентрації мумійо (мг/мл)	Концентрації колоїдного золота (мг/мл)	Мумійо+золото (%)	Мумійо (%)
39,21	1,56	0,78	46,82	45,35
47,22	3,13	1,56	56,88	48,05
41,06	6,25	3,13	79,48	64,68
52,92	12,50	6,25	128,53	129,84
42,02	25,00	12,50	194,95	157,84
48,95	50,00	25,00	189,09	152,89
49,76	100,00	50,00	200,53	198,15
50,69	200,00	100,00	74,80	156,36

Таблиця 3.5

Відсоток пригнічення репродукції вірусу під впливом різних концентрацій препаратів

Розведення, lg	Контроль HSV-1 (%)	Мумійо+золото (%)	Мумійо (%)	Мумійо+золото (%)
1	-22,0208	-6,7336	-9,6826	-23,9549
2	-5,9335	13,4532	-4,2673	-38,1577
3	-18,2916	58,8255	29,1041	-33,2680
5	-29,5735	157,2866	159,9116	-26,9204
7	-16,3873	290,6000	216,1212	-12,3407
8	-13,5854	278,8371	206,1699	-37,6816
9	-5,1748	301,8076	297,0270	-30,2132
10	-25,1103	49,4297	213,1325	-19,8884
TCID ₅₀ /мл, log ₁₀	10,8	2,4	2,9	10,7
Зниження на, log ₁₀	0	8,4	7,9	0,1

Порівняння ефектів мумійо, мумійо з частинками золота та колоїдного золота дало цінну інформацію про їхній різний вплив на клітини Vero та реплікацію вірусу герпесу. Мумійо із частинками золота незмінно перевершувало інші речовини з точки зору противірусної ефективності, підкреслюючи свій потенціал як багатообіцяючого противірусного засобу.

3.1.4 Результати аналізу біохімічних та гематологічних показників органів мишей

У цьому підрозділі представлені результати дослідження впливу препаратів Purblack Experimental W. Shilajit чистий (Таблиця 3.6. а) і Purblack True Gold 30g з наночастинками золота (Таблиця 3.6. б) на біохімічні та гематологічні показники органів мишей. Показники біохімічного складу печінки та крові мишей порівнювалися з показниками контрольної групи мишей, які не отримували препарати.

Таблиця 3.6 (а)

Біохімічні та гематологічні показники мишей, які отримували Purblack

Experimental W. Shilajit

	Контроль	Печінка	Різниця (%)
ALT Од/л	54,40	34	-37,50
AST Од/л	69,60	64,9	-6,75
Глюкоза г/л	265,92	перевищення	-
Загальний білок г/л	44,10	45,1	2,27
Сечовина ммоль/л	1,15	1,68	46,09
Креатинін ммоль/л	0,50	0,50	0,00
Білірубін прямий умол/л	1,60	0,5	-68,75
Білірубін загальний умол/л	0,20	0,1	-50,00

	Контроль	Кров	Різниця (%)
ALT Од/л	39	45,7	17,18
AST Од/л	135	49,2	-63,5
Глюкоза г/л	8,19	8,52	4,03
Тригліцериди г/л	1,19	1,7	42,86
Холестерол ммоль/л	2,1	2,61	24,29
Загальний білок г/л	31,4	29,2	-7,01
Сечовина ммоль/л	10,21	5,78	-43,39
Креатинін ммоль/л	1,1	1,3	18,18
Білірубін прямий умол/л	1	0,9	-10,00
Білірубін загальний умол/л	4,2	2,1	-50,00

Таблиця 3.6 (б)

Біохімічні та гематологічні показники мишей, які отримували Purblack True Gold 30g

	Контроль	Печінка	Різниця (%)
ALT Од/л	54,40	перевищення	-
AST Од/л	69,60	перевищення	-
Глюкоза г/л	265,92	87,2	-67,21
Загальний білок г/л	44,10	44,7	1,36
Сечовина ммоль/л	1,15	1,96	70,43
Креатинін ммоль/л	0,50	0,50	0,00
Білірубін прямий умол/л	1,60	1,2	-25,00
Білірубін загальний умол/л	0,20	0,1	-50,00

	Контроль	Кров	Різниця (%)
ALT Од/л	39	45,9	17,69
AST Од/л	135	36,4	-73,03
Глюкоза г/л	8,19	8,34	1,83
Тригліцериди г/л	1,19	1,31	10,08
Холестерол ммоль/л	2,1	2,8	33,33
Загальний білок г/л	31,4	32,4	3,18
Сечовина ммоль/л	10,21	7,29	-28,60
Креатинін ммоль/л	1,1	1,5	36,36
Білірубін прямий умол/л	1	1,3	30,00
Білірубін загальний умол/л	4,2	2	-52,38

Дослідження впливу препаратів Purblack Experimental W. Shilajit та Purblack True Gold 30g на біохімічні та гематологічні показники органів мишей дозволило отримати важливі дані про їх біологічну активність і

потенційну ефективність для подальших медичних застосувань. Результати експерименту продемонстрували різноманітні зміни в біохімічних параметрах, що свідчить про вплив обох препаратів на метаболічні процеси у печінці та крові мишей. Перевищення максимальних меж біохімічних показників на аналізаторі HTI BIOCHEM SA (High Technology, Inc.), пов'язане з високою концентрацією активних компонентів у зразках, що свідчить про їхню значну біологічну активність.

Зниження рівня ALT у печінці мишей, які отримували Purblack Experimental W. Shilajit, свідчить про потенційний протизапальний або гепатопротекторний ефект цього препарату. Натомість, у мишей, які отримували Purblack True Gold 30g, було зафіксовано перевищення контрольних значень, що може вказувати на різні механізми дії або реакції організму на наночастинки золота. Значне зниження рівня AST у крові мишей, при введенні обох препаратів може свідчити про зменшення пошкодження тканин або про покращення метаболічної активності печінки.

Значне перевищення контрольних значень глюкози у печінці мишей, які отримували Purblack Experimental W. Shilajit, може вказувати на гіперглікемічний ефект препарату. Натомість, у мишей, які отримували Purblack True Gold 30g, спостерігалось значне зниження рівня глюкози, що може свідчити про покращення регуляції рівня цукру в крові завдяки наночастинкам золота. Незначне збільшення рівня загального білка у печінці мишей, які отримували обидва препарати, свідчить про покращення білкового обміну або про збільшення синтезу білків під впливом шиджилахату. Стабільні рівні креатиніну у печінці вказують на відсутність значного впливу обох препаратів на цей показник. Зниження рівнів обох форм білірубину у печінці мишей свідчить про покращення функціонального стану печінки і зменшення гемолізу або покращення виведення продуктів розпаду гемоглобіну.

Загалом, отримані результати демонструють, що обидва препарати, як Purblack Experimental W. Shilajit, так і Purblack True Gold 30g, мають значний

вплив на біохімічні та гематологічні показники органів мишей. Важливим аспектом є те, що наночастинки золота у складі Purblack True Gold 30g спричиняють специфічні зміни, які можуть бути корисними для подальших досліджень та розробки нових терапевтичних засобів.

3.2. Обговорення

Одним із ключових спостережень є диференційована цитотоксичність і противірусна ефективність речовин, що були досліджені. Мумійо з частинками золота продемонструвало відсутність значної цитотоксичної дії на клітини Vero, що свідчить про безпеку цього препарату для нормальних клітин. Незважаючи на це, препарат ефективно пригнічував реплікацію вірусу, що вказує на його потенційні противірусні властивості без значного шкодження клітинам. Це може бути пов'язано з тим, що наночастинки золота можуть втручатися у вірусні процеси, не впливаючи значно на життєздатність нормальних клітин.

Після порівняння показників цитотоксичності культур клітин Vero та WISH, була виявлена більша токсичність відносно останніх, що свідчить про можливу протипухлинну ефективність досліджуваних сполук, оскільки дана культура є епітеліоїдного типу клітин з деякими характеристиками як вихідного людського амніонного епітелію, так і трансформованого стану, оскільки містить маркерні хромосоми HeLa (аденокарцинома).

Мумійо без часток золота також виявив противірусну дію, хоча й меншою мірою порівняно з мумійо із частинками золота.

Колоїдне золото не проявило себе, як ефективний і перспективний противірусний препарат. Показники пригнічення реплікації вірусу були негативними, що свідчить про відсутність значного противірусного ефекту у нього. Це може вказувати на те, що колоїдне золото не втручається

ефективно у вірусні процеси або не має необхідної концентрації для досягнення противірусної дії.

Різні профілі цитотоксичності та противірусної ефективності, що спостерігаються для кожної речовини, підкреслюють важливість розуміння їх конкретних механізмів дії.

3.2.1 Наслідки для розробки антивірусних засобів

Багатообіцяюча противірусна ефективність мумію з частинками золота вимагає подальшого вивчення його потенціалу як терапевтичного засобу проти герпесвірусів. Залежний від концентрації характер його ефектів свідчить про необхідність ретельної оптимізації, щоб збалансувати противірусну дію з цитотоксичністю. Крім того, з'ясування молекулярних шляхів, через які мумію з частинками золота виявляє свою противірусну дію, може стати цінними мішенями для розробки ліків.

Колоїдне золото виявило низьку противірусну активність, що свідчить про його обмежену ефективність як самостійного противірусного засобу. Водночас, комбінація мумію з наночастинками золота показала значну противірусну дію, що вказує на потенціал синергетичного ефекту між наноматеріалами та біологічно активними речовинами. Це підкреслює важливість подальших досліджень комбінацій наночастинок з іншими речовинами для розробки більш ефективних противірусних агентів, а також оптимізації дизайну та формулювання таких препаратів для підвищення їх терапевтичної ефективності.

3.3. Перспективи подальших досліджень

В результаті виконаного дослідження визначено кілька перспективних напрямів для подальших досліджень, які могли б поглибити розуміння

механізмів дії наночастинок і нанокompatитів та оптимізувати їх терапевтичне застосування.

Наприклад, глибоке вивчення конкретних молекулярних механізмів, за допомогою яких наночастинок взаємодіють з вірусними компонентами, такими як вірусні оболонки або генетичний матеріал, для пригнічення реплікації вірусу або проникнення в клітини-господарі. Точне налаштування складу, розміру, властивостей поверхні та методів доставки наночастинок і нанокompatитів для підвищення їх противірусної ефективності при мінімізації нецільових ефектів і токсичності. Дослідження *in vivo*: проведення ретельних доклінічних і клінічних досліджень для оцінки безпеки, фармакокінетики та терапевтичного потенціалу противірусних препаратів на основі наночастинок у відповідних моделях на тваринах і, зрештою, у випробуваннях на людях. Вивчення синергетичних ефектів, подолання стійкості до ліків і розширення спектру дії проти різних штамів вірусу та дослідження імуномодулюючої дії наночастинок на імунну відповідь організму-господаря на вірусні інфекції, включаючи їх потенціал для посилення противірусного імунітету або полегшення надмірного запалення та пошкодження тканин.

3.3.1 Безпека та фармакокінетика

Необхідні подальші дослідження для оцінки профілів безпеки та фармакокінетичних параметрів. Проведення всебічних досліджень токсичності, оцінка потенційних нецільових ефектів і дослідження їх біодоступності та метаболізму *in vivo* будуть вирішальними кроками до клінічної трансляції.

Зрештою, трансляційний потенціал мумію, колоїдного золота та їх комбінацій як противірусних агентів залежить від добре спланованих клінічних випробувань. У майбутніх дослідницьких зусиллях пріоритетом

має бути проведення рандомізованих контрольованих досліджень для оцінки їх ефективності в популяціях людей, оцінки режимів дозування, моніторингу побічних явищ і з'ясування їх впливу на вірусне навантаження та клінічні результати.

3.3.2 Застосування нанотехнологій

Враховуючи багатообіцяючу противірусну активність, яку спостерігають наночастинки на основі золота, вивчення ширшого застосування нанотехнологій у противірусній терапії є ще одним перспективним напрямком. Дослідження нових нанопрепаратів, цільових систем доставки та інноваційних механізмів вивільнення ліків може призвести до розробки противірусної терапії нового покоління з покращеними профілями ефективності та безпеки.

Дослідження нових нанопрепаратів, спрямованих на боротьбу з різними видами вірусів, таких як респіраторний синцитіальний вірус, грип, вірус герпесу, інші респіраторні віруси та віруси, що викликають захворювання центральної нервової системи, може призвести до створення нових препаратів з вищою ефективністю, меншими побічними ефектами та здатністю подолати проблему розвитку резистентності до лікарських засобів. Такий підхід до застосування нанотехнологій у медицині відкриває широкі перспективи для подальших досліджень та розробок у сфері противірусної терапії.

ВИСНОВКИ

Встановлено, що мумійо без домішок і мумійо з частинками золота демонструє дозозалежну цитотоксичну дію на клітини WISH, тоді як для клітин Vero ця дія значно нижча, і препарати навіть стимулюють проліферацію і метаболічну активність клітин, що можна пояснити різною реактивністю клітинних ліній до нанокompatитів.

Мумійо з частинками золота і мумійо без домішок виявило високу противірусну активність, що призвело до значного зниження титру вірусу більше ніж на 2 Lg.

Колоїдне золото, не виявило істотної противірусної активності, що підкреслює важливість дослідження саме композитів нанозолота з іншими активними речовинами, такими як мумійо, для досягнення терапевтичного ефекту.

Дослідження показали, що препарати мумійо із золотом і мумійо без домішок впливають на біохімічні параметри, зокрема рівні ALT, AST, глюкози та інші, демонструючи потенційні протизапальні, гепатопротекторні та регуляторні властивості.

Отримані результати підтверджують потенціал використання нанотехнологій у противірусній терапії, зокрема мумійо з частинками золота як перспективного засобу для боротьби з герпесвірусними інфекціями, що може привести до створення нових ефективних противірусних препаратів з мінімальними побічними ефектами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

Джерела

1. ICTV virus taxonomy profile: herpesviridae 2021 / D. Gatherer et al. *Journal of general virology*. 2021. Vol. 102, no. 10. URL: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001673>
2. McGeoch D. J., Rixon F. J., Davison A. J. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus research*. 2006. Vol. 117, no. 1. P. 90–104. URL: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.002>
3. Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis / B. Roizman et al. Cambridge University Press, 2007
4. Watson R. J. Studies of herpes simplex virus type one transcription : thesis. 1979. URL: <http://ethos.bl.uk/OrderDetails.do?uin=uk.bl.ethos.476650>
5. Browning G., Studdert M. Latency of equine herpesvirus 4. *Veterinary record*. 1989. Vol. 124, no. 8. P. 203. URL: <https://doi.org/10.1136/vr.124.8.203-b>
6. Foulon T., Cebrian J. Restriction maps for the cottontail rabbit herpesvirus (CTHV) genome. *Gene*. 1989. Vol. 78, no. 2. P. 371–376. URL: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90240-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90240-0)
7. DNA of epstein-barr virus. V. direct repeats of the ends of epstein-barr virus DNA. / D. Given et al. *Journal of virology*. 1979. Vol. 30, no. 3. P. 852–862. URL: <https://doi.org/10.1128/jvi.30.3.852-862.1979>
8. Sheldrick P., Berthelot N. Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus. *Cold spring harbor symposia on quantitative biology*. 1974. Vol. 39. P. 667–678. URL: <https://doi.org/10.1101/sqb.1974.039.01.080>
9. Koonin E. V., Dolja V. V. Virus world as an evolutionary network of viruses and capsidless selfish elements. *Microbiology and*

molecular biology reviews. 2014. Vol. 78, no. 2. P. 278–303. URL: <https://doi.org/10.1128/membr.00049-13>

10. Hale A. E., Moorman N. J. The ends dictate the means: promoter switching in herpesvirus gene expression. Annual review of virology. 2021. Vol. 8, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-072841>

11. Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response. Journal of oral microbiology. 2013. Vol. 5, no. 1. P. 22766. URL: <https://doi.org/10.3402/jom.v5i0.22766>

12. Fundamental virology, 4th edition; and fields virology, 4th edition, volumes I and ii:fundamental virology, 4th edition; fields virology, 4th edition, volumes I and II / D. M. Knipe et al. Clinical infectious diseases. 2002. Vol. 34, no. 7. P. 1029–1030. URL: <https://doi.org/10.1086/339330>

13. Weller S. K., Coen D. M. Herpes Simplex Viruses: Mechanisms of DNA Replication. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2012. Vol. 4, no. 9. P. a013011. URL: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013011>

14. Rice S. A. Release of HSV-1 Cell-Free Virions: Mechanisms, Regulation, and Likely Role in Human-Human Transmission. Viruses. 2021. Vol. 13, no. 12. P. 2395. URL: <https://doi.org/10.3390/v13122395>

15. Elucidation of the mechanism of anti-herpes action of two novel semisynthetic cardenolide derivatives / L. Boff et al. Archives of Virology. 2020. Vol. 165, no. 6. P. 1385–1396. URL: <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04562-1>

16. Antiviral strategies targeting herpesviruses / H. Dong et al. Journal of Virus Eradication. 2021. Vol. 7, no. 3. P. 100047. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jve.2021.100047>

17. θ Defensins Protect Cells from Infection by Herpes Simplex Virus by Inhibiting Viral Adhesion and Entry / B. Yasin та ін. Journal of

Virology. 2004. T. 78, № 10. C. 5147–5156. URL: <https://doi.org/10.1128/jvi.78.10.5147-5156.2004>

18. The mutated tegument protein UL7 attenuates the virulence of herpes simplex virus 1 by reducing the modulation of α -4 gene transcription / X. Xu та ін. Virology Journal. 2016. T. 13, № 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0600-9>

19. Small interfering RNA targeting for infected-cell polypeptide 4 inhibits herpes simplex virus type 1 replication in retinal pigment epithelial cells / F. Duan et al. Clinical & Experimental Ophthalmology. 2011. Vol. 40, no. 2. P. 195–204. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2011.02668.x>

20. Human Cytomegalovirus Replication Is Strictly Inhibited by siRNAs Targeting UL54, UL97 or UL122/123 Gene Transcripts / S. T. Hamilton et al. PLoS ONE. 2014. Vol. 9, no. 6. P. e97231. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097231>

21. Piret J., Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010. Vol. 55, no. 2. P. 459–472. URL: <https://doi.org/10.1128/aac.00615-10>

22. Therapeutic vaccine for genital herpes simplex virus-2 infection: findings from a randomized trial / D. I. Bernstein et al. The journal of infectious diseases. 2017. Vol. 215, no. 6. P. 856–864. URL: <https://doi.org/10.1093/infdis/jix004>

23. Latest advances of virology research using crispr/cas9-based gene-editing technology and its application to vaccine development / M. Teng et al. Viruses. 2021. Vol. 13, no. 5. P. 779. URL: <https://doi.org/10.3390/v13050779>

24. Manda V., Josyula V. R., Hariharapura R. C. SiRNA intervention inhibiting viral replication and delivery strategies for treating

herpes simplex viral infection. *VirusDisease*. 2019. Vol. 30, no. 2. P. 180–185. URL: <https://doi.org/10.1007/s13337-018-00508-z>

25. Nanoparticles in Antiviral Therapy / M. Milovanovic et al. *Antimicrobial Nanoarchitectonics*. 2017. P. 383–410. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-52733-0.00014-8>

26. Acyclovir-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Optimization, Characterization and Evaluation of Its Pharmacokinetic Profile / H. Hassan et al. *Nanomaterials*. 2020. Vol. 10, no. 9. P. 1785. URL: <https://doi.org/10.3390/nano10091785>

27. Albumin nanoparticles improved the stability, nuclear accumulation and anticytomegaloviral activity of a phosphodiester oligonucleotide / A. Arnedo et al. *Journal of Controlled Release*. 2004. Vol. 94, no. 1. P. 217–227. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.10.009>

28. Antiviral potential of nanoparticles for the treatment of Coronavirus infections / J. Sarkar et al. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2022. Vol. 72. P. 126977. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.126977>

29. Inhibition of HSV-1 Attachment, Entry, and Cell-to-Cell Spread by Functionalized Multivalent Gold Nanoparticles / D. Baram-Pinto et al. *Small*. 2010. Vol. 6, no. 9. P. 1044–1050. URL: <https://doi.org/10.1002/sml.200902384>

30. Antiviral Activity of Tannic Acid Modified Silver Nanoparticles: Potential to Activate Immune Response in Herpes Genitalis / P. Orłowski et al. *Viruses*. 2018. Vol. 10, no. 10. P. 524. URL: <https://doi.org/10.3390/v10100524>

31. Multifunctional nanocarriers for targeted drug delivery and diagnostic applications of lymph nodes metastasis: a review of recent trends and future perspectives / H.-R. Lan et al. *Journal of Nanobiotechnology*. 2023. Vol. 21, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12951-023-01990-4>

32. Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents / S. Galdiero et al. *Molecules*. 2011. Vol. 16, no. 10. P. 8894–8918. URL: <https://doi.org/10.3390/molecules16108894>
33. Nanotechnology for virus treatment / J. Zhou et al. *Nano Today*. 2021. Vol. 36. P. 101031. URL: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.101031>
34. World Health Organization. Massive proportion of world's population are living with herpes infection. World Health Organization (WHO). URL: <https://www.who.int/news/item/01-05-2020-massive-proportion-world-population-living-with-herpes-infection>
35. Weidner-Glunde M., Kruminis-Kaszkiel E., Savanagouder M. Herpesviral Latency–Common Themes. *Pathogens*. 2020. Vol. 9, no. 2. P. 125. URL: <https://doi.org/10.3390/pathogens9020125>
36. Speck S. H., Ganem D. Viral Latency and Its Regulation: Lessons from the γ -Herpesviruses. *Cell Host & Microbe*. 2010. T. 8, № 1. C. 100–115. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.014>
37. Serological Evidence of Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) Infection among Humans from Bandung, West Java Province, Indonesia / D. D. L. Hakim et al. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2022. Vol. 10, B. P. 2087–2092. URL: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2022.10183>
38. Comparison of the Feasibility, Efficiency, and Safety of Genome Editing Technologies / N. G. González Castro et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, no. 19. P. 10355. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms221910355>
39. Mekuye B., Abera B. Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications. *Nano Select*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1002/nano.202300038>

40. Gold nanoparticles show potential in vitro antiviral and anticancer activity / A. Babaei et al. *Life Sciences*. 2021. P. 119652. URL: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119652>

41. Antiviral and antioxidant properties of green synthesized gold nanoparticles using *Glaucium flavum* leaf extract / F. Dehghani et al. *Applied Nanoscience*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1007/s13204-022-02705-1>

42. Maus A., Strait L., Zhu D. Nanoparticles as delivery vehicles for antiviral therapeutic drugs. *Engineered Regeneration*. 2021. Vol. 2. P. 31–46. URL: <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2021.03.001>

43. Madkour L. H. Development of Oligonucleotide Delivery, (siRNAs), and (miRNA) Systems for Anticancer Therapeutic Strategy Immunotherapy. *Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Treatment*. Boca Raton, 2022. P. 311–336. URL: <https://doi.org/10.1201/9781003229674-10>

44. Nanoparticle Vaccines Adopting Virus-like Features for Enhanced Immune Potentiation / S. Chattopadhyay et al. *Nanotheranostics*. 2017. Vol. 1, no. 3. P. 244–260. URL: <https://doi.org/10.7150/ntno.19796>

45. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983. Vol. 65, no. 1-2. P. 55–63. URL: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)