

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

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

к.б.н. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол № _____ засідання кафедри

Від «__» _____ 2024 р.

**ТОКСИКОЛОГІЧНІ ТА АПОПТОЗ-ІНДУКУЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ
ПОХІДНИХ ЕФІРІВ ФТОРОВАНИХ АМІНОКИСЛОТ В ВЕБ-
АСОЦІЙОВАНІЙ КУЛЬТУРІ КЛІТИН**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
Студентки спеціальності 091 Біологія
ОП Біоінформатика та структурна біологія
Волкової Дарини Володимирівни

Робота виконана у відділі репродукції вірусів
Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного
Під керівництвом к.б.н., старший дослідник
Загородня Світлана Дмитрівна

Оцінка захисту роботи

АНОТАЦІЯ

Волкова Д.В. Токсикологічні та апоптоз-індукуючі властивості похідних ефірів фторованих амінокислот в ВЕБ-асоційованій культурі клітин. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія, ОП Біоінформатика та структурна біологія. Київський Національний Університет імені Тараса Шевченка, Навчально-науковий інститут високих технологій. 2024 рік.

У роботі проведено дослідження токсикологічних та апоптоз-індукуючих властивостей похідних ефірів фторованих амінокислот (трет-бутиловий ефір N-(2,2,3,3-тетрафтортіопропіоніл) аланіну (10S-20) та метиловий ефір N-(2,2,3,3-тетрафтортіопропіоніл) фенілаланіну (10S-21)) на культурі клітин В95-8 (В-лімфоцити мавп, що містять інтегрований геном вірусу Епштейна-Барр). Оцінено цитотоксичний ефект сполук, досліджено їхню здатність стимулювати апоптоз, спрогнозовано біологічну активність та фармакокінетичні параметри сполук *in silico* за допомогою платформи ADMETlab 2.0.

Цитотоксичність сполук оцінювали за допомогою фарбування трипановим синім та МТТ-тесту. Встановлено, що сполука 10S-21 має високу цитотоксичність з CC_{50} 22,13 мкг/мл за методом трипанового синього і 8,24 мкг/мл за МТТ-методом, тоді як сполука 10S-20 має CC_{50} 124,77 мкг/мл і 53,09 мкг/мл відповідно. Дослідження апоптозстимулюючих властивостей за допомогою проточної цитометрії та флуоресценції з барвником Hoechst 33342 показало, що обидві сполуки викликають значний апоптоз у клітинах В95-8, при цьому 10S-21 виявляється більш ефективною.

Прогнозування біологічної активності сполук за допомогою програми PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) підтвердило їх потенціал як індукторів апоптозу та антивірусних агентів. Оцінка фармакокінетичних параметрів *in silico* за допомогою ADMETlab 2.0 дозволила визначити профіль адсорбції, розподілу, метаболізму, екскреції та токсичності (ADMET), що є важливим для подальшої розробки лікарських засобів. Прогнозування фармакокінетичних параметрів за допомогою ADMETlab 2.0 показало, що сполука 10S-21 має високу біодоступність і низький ризик токсичності. Сполука

10S-21 продемонструвала кращий профіль фармакокінетики порівняно зі сполукою 10S-20, що підтверджує її потенціал як перспективного терапевтичного агента.

Отримані результати можуть бути використані для подальшої розробки антивірусних препаратів проти вірусу Епштейна-Барр, а також для оптимізації фармацевтичних властивостей цих сполук.

Ключові слова: фторовані амінокислоти, апоптоз, токсичність, фармакокінетика, Епштейн-Барр вірус, 10S-20, 10S-21, біологічна активність, B95-8.

ABSTRACT

Volkova D.V. Toxicological and Apoptosis-Inducing Properties of Fluorinated Amino Acid Ester Derivatives in EBV-Associated Cell Culture. – Master's Thesis for the specialty 091 Biology, OP Bioinformatics and Structural Biology. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Institute of High Technologies. 2024.

The study investigates the toxicological and apoptosis-inducing properties of fluorinated amino acid ester derivatives (tert-butyl ester of N-(2,2,3,3-tetrafluorothiopropionyl) alanine (10S-20) and methyl ester of N-(2,2,3,3-tetrafluorothiopropionyl) phenylalanine (10S-21)) on the B95-8 cell culture (monkey B-lymphocytes containing the integrated Epstein-Barr virus genome). The cytotoxic effect of the compounds was evaluated, their ability to stimulate apoptosis was studied, and the compounds' biological activity and pharmacokinetic parameters were predicted *in silico* using the ADMETlab 2.0 platform.

The cytotoxicity of the compounds was assessed using trypan blue staining and the MTT assay. It was found that compound 10S-21 has high cytotoxicity with a CC_{50} of 22.13 $\mu\text{g/mL}$ by the trypan blue method and 8.24 $\mu\text{g/mL}$ by the MTT method, whereas compound 10S-20 has a CC_{50} of 124.77 $\mu\text{g/mL}$ and 53.09 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The study of apoptosis-inducing properties using flow cytometry and fluorescence with Hoechst 33342 dye showed that both compounds cause significant apoptosis in B95-8 cells, with 10S-21 being more effective.

Prediction of the biological activity of the compounds using the PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) program confirmed their potential as apoptosis inducers and antiviral agents. Evaluation of pharmacokinetic parameters *in silico* using ADMETlab 2.0 allowed the determination of the absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) profile, which is important for further drug development. Prediction of pharmacokinetic parameters using ADMETlab 2.0 showed that compound 10S-21 has high bioavailability and low toxicity risk. Compound 10S-21 demonstrated a better pharmacokinetic profile than compound 10S-20, confirming its potential as a promising therapeutic agent.

The obtained results can be used to further develop antiviral drugs against the Epstein-Barr virus and optimize the pharmaceutical properties of these compounds.

Keywords: fluorinated amino acids, apoptosis, toxicity, pharmacokinetics, Epstein-Barr virus, 10S-20, 10S-21, biological activity, B95-8.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	8
ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1. Особливості вірусу Епштейна-Барр серед герпетичних захворювань.....	12
1.2. Структура геному вірусу Епштейна-Барр.....	14
1.3. Життєвий цикл ВЕБ.....	15
1.4. Огляд препаратів для терапії вірусу Епштейна-Барр і аналіз їхньої ролі в лікуванні онкологічних патологій.....	19
1.4.1. Етіотропні лікарські препарати.....	19
1.4.2. Інші препарати з активністю проти ВЕБ.....	20
1.4.3. Неспецифічна імунотерапія.....	20
1.4.4. Вітаміни з активністю проти ВЕБ.....	21
1.4.5. Фторорганічні сполуки проти ВЕБ.....	21
1.5. Сучасні біоінформатичні підходи до розробки і аналізу дії препаратів проти ВЕБ.....	23
1.5.1. Геномний аналіз.....	23
1.5.2. Протеомні підходи.....	23
1.5.3. Транскриптомні дослідження.....	24
1.5.4. Обчислювальні моделі в пошуку ліків. Ідентифікація цілі.....	24
1.5.5. Обчислювальні моделі в пошуку ліків. Молекулярний докінг і моделювання.....	25
1.5.6. Обчислювальні моделі в пошуку ліків. Моделі машинного навчання.....	25
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	27
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	27
2.1. Об'єкти дослідження.....	27
2.2. Матеріали та обладнання, що було використано у роботі.....	28
2.2.1. Реактиви та розчини.....	28
2.2.2. Обладнання.....	28
2.3. Методи дослідження.....	30
2.3.1. Культивування клітин В95-8.....	30
2.3.2. Визначення життєздатності культур за допомогою барвника трипанового синього.....	30

2.3.3. МТТ-тест.....	31
2.3.4. Проточна цитометрія.....	31
2.3.5. Прогнозування біологічної активності досліджуваних сполук.....	33
2.3.5.1. Створення хімічних форматів для аналізу.....	33
2.3.5.2. Прогнозування біологічної активності сполук.....	33
2.3.5.3. Ідентифікація мішеней.....	34
2.3.6. Оцінка параметрів фармакокінетики <i>in silico</i> за допомогою ADMETlab 2.0.....	34
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ.....	36
3.1. Цитотоксичність сполук 10S-20 та 10S-21.....	36
3.2. Апоптозстимулююча дія сполуки 10S-21.....	40
3.3. Апоптозстимулююча дія сполуки 10S-20.....	47
3.4. Оцінка біологічної активності сполук.....	48
3.5. Фармакокінетичні та токсикологічні властивості сполуки 10S-20.....	51
3.6. Фармакокінетичні та токсикологічні властивості сполуки 10S-21.....	58
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	67
ВИСНОВКИ.....	69
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	71

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕБ – Вірус Епштейна-Барр

TR – Кінцеві повтори (**T**erminal **r**epeats)

ORF – Відкриті рамки зчитування (**O**pen **r**eading **f**rame)

IR – Внутрішні повтори (**I**nternal **r**epeats)

ЗЦ – Зародковий центр

CC₅₀ – Середня цитотоксична концентрація (**M**ean **c**ytotoxic **c**oncentration)

ADMET – Адсорбція, розподіл, метаболізм, екскреція, токсичність (**A**bsorption, **D**istribution, **M**etabolism, **E**xcretion, and **T**oxicity)

PASS – **P**rediction of **A**ctivity **S**pectra for **S**ubstances

EBNA – Антиген ядерний вірусу Епштейна-Барр (**E**pstein-**B**arr **N**uclear **A**ntigen)

LMP – Латентний мембранний протеїн (**L**atent **M**embrane **P**rotein)

TFA – Трифталевий ангідрид (**T**rifluoroacetic **a**nhydride)

МТТ – Метод визначення клітинної життєздатності (**M**ethylthiazolyldiphenyl-**t**etrazolium bromide assay)

Ноехст 33342 – Флуоресцентний барвник для фарбування ДНК

PDB – База даних білкових структур (**P**rotein **D**ata **B**ank)

ГКГС – Головний Комплекс Гістосумісності

ІІ-2 – Інтерлейкін-2

CD21 - молекула, яка є рецептором для комплексу C3d та вірусу Епштейна-Барр (**C**luster of **D**ifferentiation **21**)

BLAST – Базовий інструмент для пошуку локального вирівнювання (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool)

LC-MS – рідинна хромато-мас-спектрометрія (**L**iquid **C**hromatography **M**ass **S**pectrometry)

ВСТУП

Зараз герпесвірусні інфекції стали однією з найбільш актуальних проблем у медицині. Це пов'язано з різноманітністю клінічних проявів, особливостями збудників та їх здатністю поширюватися різними шляхами. Тому Європейське регіональне бюро ВООЗ визнало герпесвірусні інфекції серйозними хворобами, які визначатимуть майбутнє інфекційної патології [1]. Герпесвіруси можуть викликати латентні, гострі, хронічні та повільні форми захворювань, які можуть впливати на різні органи та системи організму. Негативна екологічна ситуація та складні соціальні умови також призводять до пригнічення захисних функцій організму, що призводить до збільшення кількості хворих на герпесвірусні інфекції у всьому світі [2].

Особливе місце серед герпесвірусів займає інфекція, спричинена вірусом Епштейна-Барр (ВЕБ), яка зараз заражає понад 90% населення [3]. Цей вірус викликає гостру інфекцію і пов'язаний з багатьма лімфопроліферативними та аутоімунними захворюваннями.

У сучасній стратегії боротьби з вірус-асоційованими пухлинами, особливо пов'язаними з вірусом Епштейна-Барра (ВЕБ), все більше уваги приділяється використанню специфічних терапевтичних агентів, що цілеспрямовано індукують апоптоз у пухлинних клітинах. Однією з таких стратегій є використання фторорганічних сполук, які можуть модулювати біохімічні шляхи всередині клітин, що інфіковані ВЕБ. Наприклад, деякі з цих сполук демонструють потенціал у зміні метилювання ДНК, що може впливати на експресію вірусних генів та включення літичного циклу вірусу, що призводить до загибелі пухлинних клітин [4].

Додатково, фторорганічні сполуки вивчаються за їхній вплив на трансмісію сигналів у клітинах, інфікованих ВЕБ, і здатність взаємодіяти з білками, що регулюють апоптоз та імунні відповіді. Такий взаємодіючий вплив може бути корисним для розробки нових лікарських засобів, які специфічно ціляться на ВЕБ-позитивні пухлинні клітини, зменшуючи при

цьому шкідливий вплив на здорові клітини [5].

Мета роботи: виявити токсикологічні та апоптоз-індукуючі властивості похідних ефірів фторованих амінокислот в ВЕБ-асоційованій культурі клітин В95-8.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. оцінити цитотоксичний ефект сполук 10S-20 та 10S-21, вводячи її в культуру клітин В95-8 у різних концентраціях;
2. дослідити здатність сполук 10S-20 та 10S-21 стимулювати апоптоз, використовуючи метод проточної цитофлуориметрії та проточної цитометрії відповідно;
3. провести оцінку потенційної біологічної активності досліджуваних сполук за допомогою програми PASS;
4. виконати скринінг потенційних мішеней для хімічних сполук за допомогою серверів IdTarget та PharmMapper;
5. оцінити фармакокінетичні параметри сполук 10S-20 та 10S-21 *in silico* за допомогою платформи ADMETlab 2.0.

Наукова новизна. Унікальність дослідження визначається використанням сполук 10S-20 та 10S-21, які раніше не досліджувалися в контексті їхньої цитотоксичності та впливу на апоптоз у клітинах, інфікованих вірусом Епштейна-Барр (ВЕБ). Було встановлено, що сполука 10S-21 має високу цитотоксичність і здатність стимулювати апоптоз у клітинах В95-8, які є лімфоцитами мавп, що містять геном ВЕБ. Це відкриває нові перспективи для розробки терапевтичних агентів, спрямованих на індукцію апоптозу у ВЕБ-позитивних пухлинних клітинах. Інноваційний підхід *in silico* з використанням програмного забезпечення ADMETlab 2.0 для прогнозування фармакокінетичних параметрів і токсичності досліджуваних сполук дозволив здійснити комплексну оцінку їхньої адсорбції, розподілу, метаболізму і виведення, що є важливим для майбутньої розробки лікарських засобів. Сполуки були проаналізовані на предмет їхньої біологічної активності через оцінку взаємодій з молекулярними мішенями вірусу Епштейна-Барр, що

включало індивідуальне моделювання взаємодій на рівні білків вірусу. Ці нові дані розширюють розуміння потенційних механізмів дії фторованих амінокислотних похідних та їхньої ролі в розробці нових антивірусних стратегій, спрямованих проти ВЕБ

Практичне значення роботи. Отримані результати дозволяють використовувати сполуки 10S-20 та 10S-21 як потенційні агенти для розробки нових антивірусних препаратів проти вірусу Епштейна-Барр. Висока цитотоксичність сполуки 10S-21, встановлена в дослідженні, вказує на її можливість застосування в антитуморній терапії. *In silico* аналіз фармакокінетичних параметрів сполук 10S-20 та 10S-21 за допомогою платформи ADMETlab 2.0 дозволяє прогнозувати їхню біодоступність та токсичність, що сприяє оптимізації фармацевтичних властивостей цих сполук та їхньому подальшому використанню в клінічній практиці

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Особливості вірусу Епштейна-Барр серед герпетичних захворювань

Вірус Епштейна-Барр (ВЕБ), також відомий як людський герпесвірус 4 типу, є членом родини *Gammapherpesviridae* та роду *Lymphocryptovirus*. Його відкриття відбулося в 1964 році англійським вірусологом Майклом Епштейном та канадською вірусологинею Івонною Барр під час вивчення клітин раку Беркітта [6, 7].

Структура вірусу Епштейна-Барр (ВЕБ), що зображена на рис.1.1., є характерною для родини герпесвірусів та споріднених вірусів. Вірус має зовнішню ліпідну оболонку, яка формується з клітинної мембрани клітини-господаря, в яку вбудовані численні вірусні білки разом з білками мембрани господарської клітини. Багато з цих білків оболонки вірусу є глікопротеїнами. До цього часу ідентифіковано 13 таких глікопротеїнів, з яких 12 експресуються тільки під час продуктивного літичного циклу реплікації, а один (BARF1) може також експресуватися під час латентної фази [8]. Всередині ліпідної оболонки розташований вірусний тегумент, який оточує капсид із вкладеним геномом та асоційованими білками. Вірусний геном може існувати як у лінійній формі, так і у вигляді епісоми, залежно від стадії життєвого циклу вірусу.

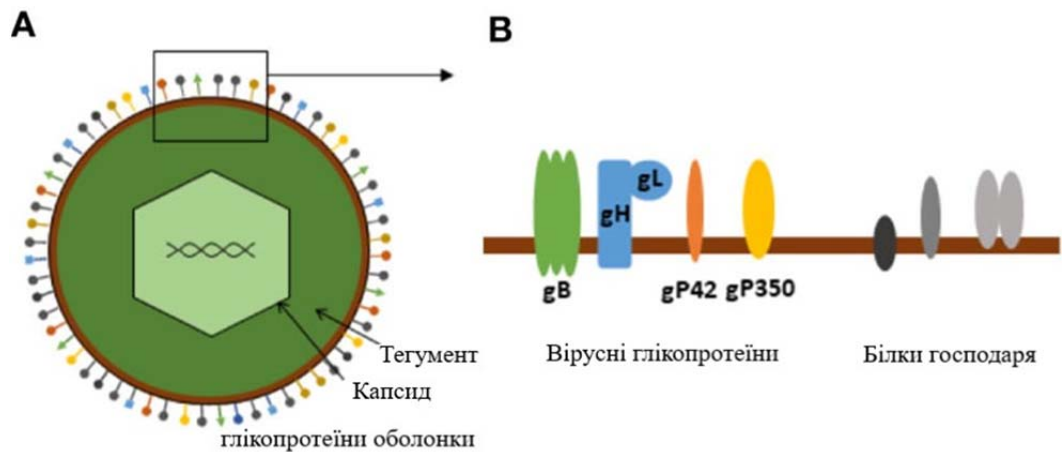


Рис. 1.1. Схематичне зображення вірусу Епштейна-Барр. (А) Схематична ілюстрація базової структури ВЕБ. (В) Збільшена секція мембрани, що показує глікопротеїни вірусної оболонки (комплекс входу) та гіпотетичні білки мембрани, походженням від хазяїна. Адаптовано з [8].

ВЕБ існує у двох генотипах, тип 1 та тип 2, які розрізняються за послідовностями генів *EBNA-2* та *EBNA-3*. Тип 1 зазвичай асоціюється з більш ефективною іморталізацією В-лімфоцитів, тоді як тип 2 має вищу літичну здатність [9]. Географічне розповсюдження цих типів також відрізняється: тип 1 переважає у багатьох регіонах світу, включаючи Америку, Європу, та Азію, тоді як тип 2 зустрічається головним чином в Африці [10].

Захворюваність на ВЕБ дуже поширена, він інфікує понад 95% населення світу. Основний шлях передачі вірусу – через слину, хоча він також може передаватися через грудне молоко, тілесні рідини та трансплантати [7]. ВЕБ є відомим збудником різноманітних форм раку, таких як лімфоми та насофарингеальна карцинома, а також вірус пов'язаний з інфекційним мононуклеозом та оральною волосяною лейкоплакією.

Характерною особливістю ВЕБ є його здатність до довготривалого персистування в організмі людини в латентному стані, з періодичними епізодами реактивації. Цей латентний стан є фундаментальною рисою герпесвірусів і включає мінімальну експресію вірусних генів. Під час латентності вірус використовує машинерію ДНК-реплікації клітини-

господаря для свого розмноження, передаючи свою ДНК дочірнім клітинам. Внаслідок цього інфіковані клітини можуть уникати імунного нагляду, що сприяє їхньому виживанню та розмноженню [11].

1.2. Структура геному вірусу Епштейна-Барр

Геном ВЕБ представлений лінійною дволанцюговою ДНК розміром близько 172 т.п.о., яка під час інфекційного процесу трансформується в кільцеву форму [12]. Ця кільцева форма ДНК здатна інтегруватися у геном клітини-господаря, формуючи епісоми [13], що мають важливе значення для реплікації вірусного геному під час мітотичного поділу клітин господаря.

Геном ВЕБ, окремі ділянки якого зображені на рис. 1.2., має унікальні регіони, розділені внутрішніми (IR1-IR4) та термінальними повторами (TR), які важливі в процесі циркуляризації вірусної ДНК під час інфекції. Геном містить близько 85 відкритих рамок зчитування (ORF), що кодують ряд білків, які беруть участь у реплікації ДНК, регуляції генної експресії, формуванні капсиду та інших клітинних процесах [14].

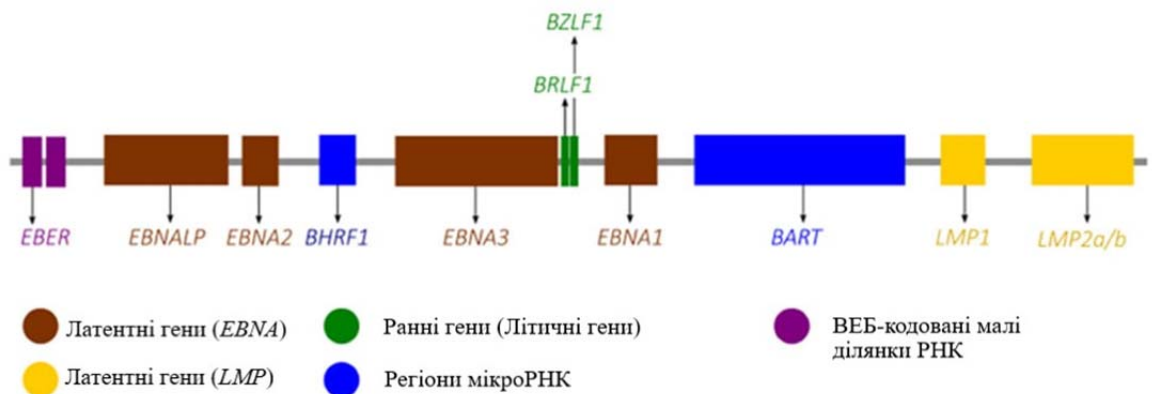


Рис. 1.2. Схематичне зображення окремих ділянок геному ВЕБ. Адаптовано з [15].

ВЕБ має здатність перебувати у латентному та літичному станах. У латентному стані вірус мінімізує експресію своїх генів, що дозволяє йому уникнути імунної відповіді господаря та забезпечує його персистенцію у

геномі клітини-господаря. Важливу роль у цьому процесі відіграють дев'ять латентних генів, включаючи *EBNA1* [16], що підтримує вірусний геном у епісомному стані, і *LMP1*, що має онкогенні властивості та сприяє антиапоптичним шляхам.

Літичний стан активується різними зовнішніми стимулами та призводить до інтенсивної реплікації вірусних генів, виробництва нових віріонів та потенційного цитолізу клітини-господаря. Вірус також кодує мікроРНК та малі РНК, зокрема EBER-1 та EBER-2, що відіграють важливу роль у модуляції імунної відповіді господаря та допомагають уникнути імунного виявлення [17].

Така структура геному дозволяють вірусу не лише ефективно персистувати в господарському організмі, але й спричиняти ряд захворювань, що включають як гострі, так і хронічні стани, зокрема, онкогенез.

1.3. Життєвий цикл ВЕБ

ВЕБ є вірусом, що інфікує виключно людей. Основний шлях передачі – через слину інфікованих осіб. Після первинного зараження концентрація вірусу в слині може досягати високих концентрацій та зберігатися на цьому рівні протягом декількох місяців [7]. На рис. 1.3. показано, що вірус виявляє специфічний тропізм до епітеліальних клітин ротоглотки та В-лімфоцитів, які мають на своїй поверхні молекули CD21, що виконують функцію рецепторів для приєднання вірусу, а молекули головного комплексу гістосумісності (ГКГС) класу II сприяють його введенню в клітину [18, 19].

Інфекційний цикл ВЕБ охоплює активну літичну фазу з високим рівнем реплікації вірусу і латентну фазу, коли вірус залишається у організмі на все життя. ВЕБ імітує процес дозрівання В-лімфоцитів у зародкових центрах (ЗЦ) лімфоїдних тканин, що також пов'язано з механізмами розвитку лімфом, що спровоковані вірусом.

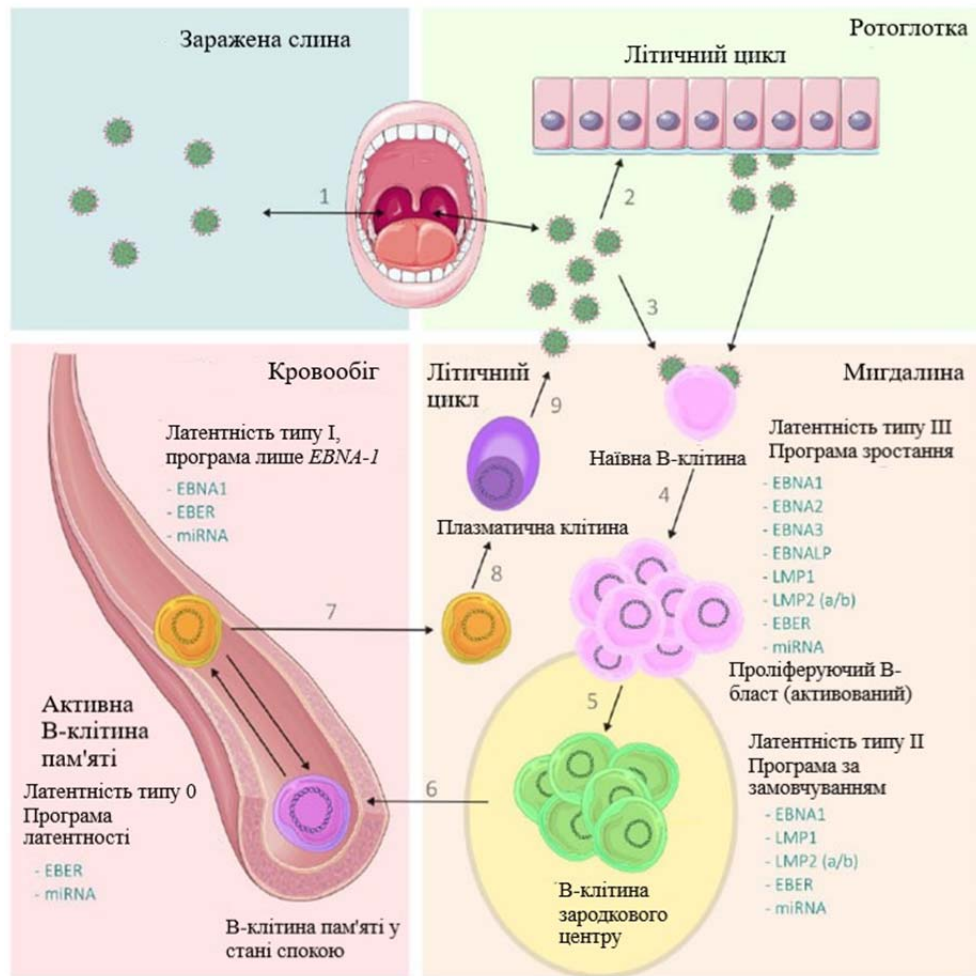


Рис. 1.3. Життєвий цикл ВЕБ. Адаптовано з [15].

У ході первинного інфікування через заражену слину вірус спочатку може розмножуватися в епітеліальних клітинах ротоглотки або безпосередньо заражати наївні або В-клітини пам'яті в лімфоїдній тканині мигдаликів. Заражені В-лімфоцити активують латентні вірусні гени, що спонукають їх до поділу та перешкоджають апоптозу. Латентний цикл ВЕБ поділяється на кілька етапів: тип III [20], або «програма зростання», коли активно виражаються багато латентних генів, включно з *EBNA1*, *EBNA2*, *EBNA3A/B/C*, *EBNA-LP*, *LMP1*, *LMP2* та численні мікроРНК, що сприяє розширенню інфікованих В-лімфоцитів. Частина активованих В-лімфоцитів переходить до ЗЦ мигдаликів, де реалізується тип II латентності або «програма за замовчуванням», під час якої виробляються тільки *EBNA1*, *LMP1*, *LMP2* та деякі мікроРНК. Вважається, що з цих клітин в ЗЦ у

латентності II може розвинути хвороба Ходжкіна. Заражені В-лімфоцити довічно зберігаються у ЗЦ, служать резервуаром для ВЕБ і можуть поширюватися до інших вторинних лімфоїдних клітин через кровообіг. Латентність типу I, або програма тільки з *EBNA-1*, відбувається у кровообігу, де виробляються тільки EBNA1 та деякі мікроРНК, що дозволяє В-лімфоцитам пам'яті ділитися та реплікувати геном ВЕБ. Латентність 0 також відбувається у кровообігу, де В-лімфоцити пам'яті, які не виробляють жодного вірусного білка, уможливають ВЕБ ухилятися від імунної системи, зокрема від відповіді CD8⁺ Т-клітин [19].

Ці дозрілі інфіковані В-лімфоцити можуть переключатися з латентного стану на літичну реплікацію. Літичний цикл сприяє виробництву нових інфекційних віріонів і складається з трьох етапів специфічної генної експресії: негайно-ранні, ранні та пізні. На рис. 1.4. можна побачити, що реактивація контролюється за допомогою *BZLF-1* та *BRLF-1* (негайно-ранні гени) і завершується виробництвом структурних компонентів ВЕБ, що веде до вивільнення віріонів ВЕБ після перетворення В-лімфоцитів у плазматичні клітини.

Вироблені віріони здатні інфікувати епітеліальні клітини ротоглотки та інші В-лімфоцити. Інфекція клітин ротоглотки призводить до місцевої реплікації вірусу і його виділення у слину, що сприяє інфікуванню нових осіб [15]. Детально з білками вірусу Епштейна-Барр та їх функціями можна ознайомитися в таблиці 1.1.

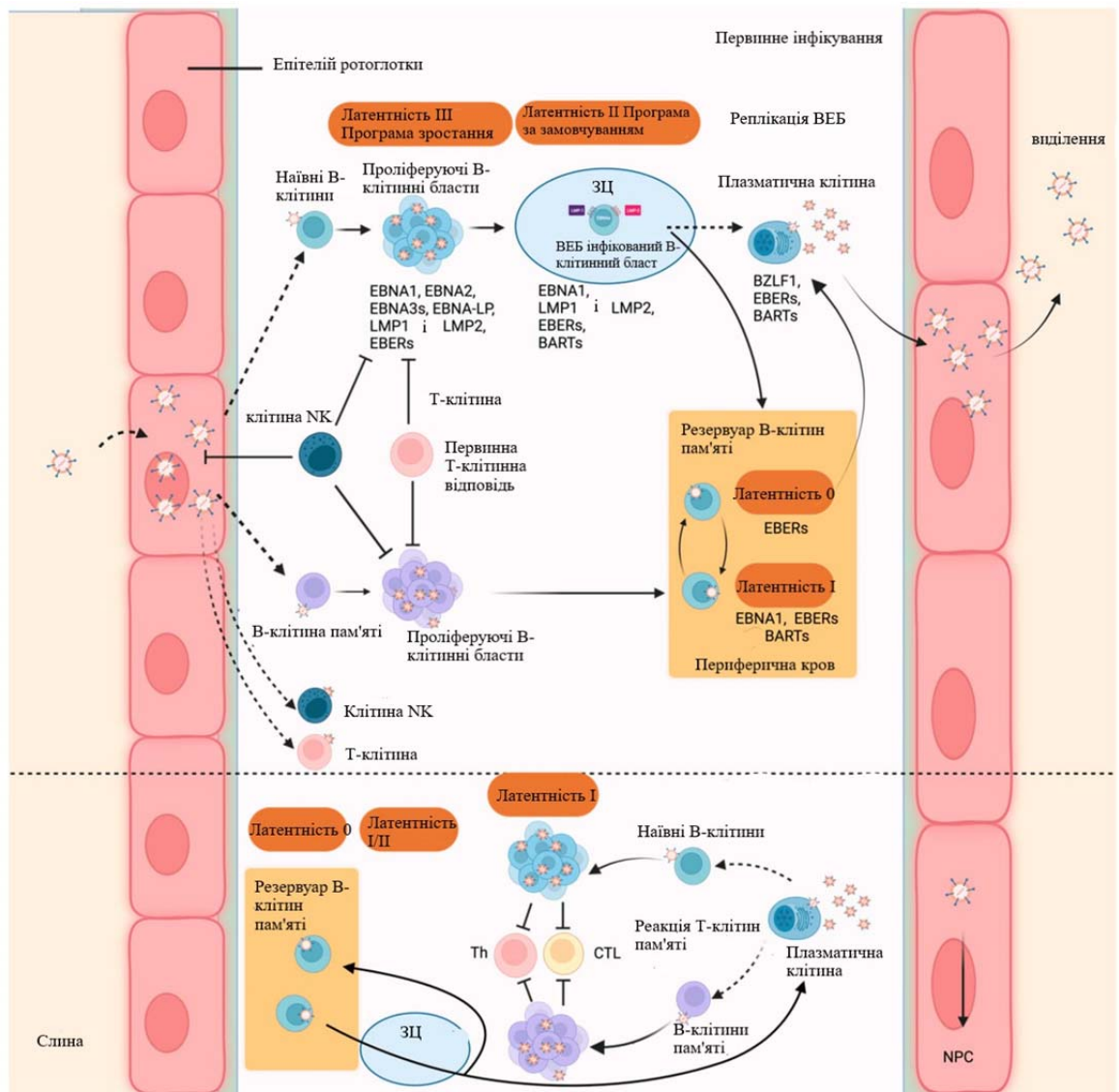


Рис. 1.4. Взаємодія вірусу Епштейна-Барр з людиною-хазяїном та латентна інфекція вірусу у В-лімфоцитах. Верхня панель: Первинна інфекція. Нижня панель: Персистуюча інфекція. Адаптовано з [21].

Таблиця 1.1. Білки вірусу Епштейна-Барр та їх функції. Адаптовано з [8].

Функція	Білки
Глікопротеїни для проникнення	BLLF1 (gP350), BZLF2 (gP42), BMRF2m, BXL2F2 (gH), BKRF2 (gL), BALF4 (gP110), BLRF1 (gN), BHLF1, BDLF2
Літична реплікація	BRRF1, BZLF1, BRLF1, BMRF1 (EA/D), BSLF1,

	BBLF4, BBLF2/3, BDLF3.5
Синтез вірусної ДНК	BORF2, BaRF1, BSLF2, BLLF3, BKRF3, BMLF1/BSLF2
Пізня експресія генів	BGLF4, BGLF3, BCRF1, BBRF2, BDLF4, BVLF1, BDLF3.5
Упаковка і транслокація вірусної ДНК	BFLF1, BFRF1A, BBRF1, BGRF1/BBDRF1, BALF3, BGLF1, BVRF1
Капсид	BCLF1 (VCAp160), BFRF3 (VCAp18), BORF1, BDLF1, BVRF2, BdRF1 (VCAp40)
Тегумент	BNRF1 (VCAp143), BPLF1, BSRF1, BBRF2, BGLF3.5, BGLF2, BTRF1, BLRF2 (VCAp23), BRRF2, BKRF4
Збірка віріонів та вихід	BFLF2, BFRF1, BBRF3 (gM), BXRF1, BOLF1, BBLF1
Латентність, стадія I:	EBNA1
Стадія II:	EBNA5, LMP1, LMP2A, LMP2B
Стадія III:	EBNA2, EBNA3, EBNA4, EBNA6
Літичні імуномодулятори	BCRF1 (vIL-10), BARF1, LF2, BNLF2a, BDLF3 (gp150), BILF1, BHRF1 (EA/R), BALF1, BGLF5
Нехарактеризовані білки	BLLF2, BNLF2b, BWRF1, LF3, LF1, RPMS1, A73, BARF0, BILF2

1.4. Огляд препаратів для терапії вірусу Епштейна-Барр і аналіз їхньої ролі в лікуванні онкологічних патологій

1.4.1. Етіотропні лікарські препарати. Лікування інфекції ВЕБ складне через відсутність спеціалізованої антивірусної терапії, хоча використовуються специфічні ліки для хронічних ВЕБ-інфекцій та асоційованих пухлин [22]. Ацикловір і його про-лік валацикловір, що є

аналогами пуринового нуклеозиду, вступають у взаємодію з ДНК-полімеразою вірусів, включаючи Епштейна-Барра, блокуючи синтез вірусної ДНК [23]. Ганцикловір і валганцикловір знижують ризик інфікування після трансплантації нирки. Омацикловір і валомацикловір ефективніші для гострих ВЕБ-інфекцій, адже вони зменшують вірусне навантаження [24, 25]. Марибавір – новітній засіб, що знижує кількість вірусних копій, покращуючи клінічні результати. Ефективність лікування обмежена через латентний стан вірусу, коли він "спить" у клітині, використовуючи клітинні механізми для реплікації [24].

1.4.2. Інші препарати з активністю проти ВЕБ. Циметидин, перший антагоніст H₂-рецепторів, володіє протираковою дією, що включає антипроліферативні ефекти, імуномодуляцію, вплив на адгезію клітин та антиангіогенез. Цей препарат ефективний у лікуванні хворих з хронічною активацією ВЕБ, оскільки він інгібує Т-супресори і посилює цитотоксичну активність CD8⁺ Т-клітин [26]. Вальпромід – амід вальпроєвої кислоти, пригнічує деякі вірусні гени і не впливає на експресію клітинних генів, обмежуючи тим самим розвиток ВЕБ-інфекції. JQ1 блокує експресію ключового гену ВЕБ, що може запобігати літичній реплікації вірусу, і є потенційним засобом для лікування прогресивного раку носоглотки [24]. Артесунат, протималарійний препарат, також показує гарні результати у зниженні реплікації ВЕБ у клітинах. Новий інгібітор H31 ефективно блокує діяльність EBNA-1, що знижує персистенцію ВЕБ-епісом і сповільнює ріст ВЕБ-інфікованих клітин [24, 26].

1.4.3. Неспецифічна імунотерапія. Як імуностимулюючу терапію розглядається застосування інтерферонів, включно з їх комбінацією з індукторами. Однак, міжнародні дослідження не підтверджують високу ефективність такого підходу [27], попри існування даних про короткострокові позитивні ефекти інтерферону- α та інтерферону- γ [28]. У випадках хронічної активної ВЕБ-інфекції іноді використовуються прозапальні інтерлейкіни, як-от ІЛ-2, але з обмеженим успіхом, віддаючи

перевагу інтерферонам через їх більшу спектральну дію. Для важких форм інфекції рекомендовано кортикостероїди та цитостатики, такі як циклофосфамід чи циклоспорин. Такі засоби, хоча й корисні короткостроково, не мають довготривалого впливу і можуть призвести до зниження імунітету, підвищуючи ризик розвитку лімфоми та інших смертельних ускладнень [29].

1.4.4. Вітамін С з активністю проти ВЕБ. Вітамін С ефективно знищує клітини Лімфоми Беркіта, інфіковані ВЕБ, та ВЕБ-трансформовані В-клітини *in vitro*, також припиняючи активацію ВЕБ у лімфобластоїдних клітинах людини. Ретиноева кислота, метаболіт вітаміну А1, необхідний для росту та розвитку, впливає на рецептор ретиноевої кислоти та регулює транскрипцію генів залежно від типу клітини. Цей метаболіт також є негативним регулятором ВЕБ гена *BZLF-1*, який пригнічує його реактивацію [26].

1.4.5. Фторорганічні сполуки проти ВЕБ. Фторорганічні сполуки, які є хімічними сполуками, що містять атом фтору, показали перспективу в різних терапевтичних застосуваннях, включаючи протівірусне лікування. Фторорганічні сполуки характеризуються наявністю одного або кількох атомів фтору, приєднаних до органічної частини. С-Ф зв'язок є одним із найміцніших в органічній хімії, що надає цим сполукам унікальні властивості, такі як підвищена термічна та хімічна стабільність, висока ліпофільність і здатність проникати через біологічні мембрани. Ці властивості роблять фторорганічні сполуки особливо придатними для фармацевтичного застосування, включаючи протівірусні препарати [30, 31].

Деякі фторорганічні сполуки можуть перешкоджати здатності ВЕБ зв'язуватися з клітинами-господарями або проникати в них. Це може включати блокування рецепторів, які використовуються ВЕБ для інфікування В-клітин або епітеліальних клітин, таких як CD21 або інших молекулярних компонентів, які беруть участь у процесі злиття. Фторорганічні сполуки можуть змінювати динаміку мембрани або безпосередньо втручатися у взаємодію цих рецепторів, тим самим пригнічуючи початкові стадії інфекції

ВЕБ [32].

Атоми фтору у фармацевтичних препаратах часто підвищують спорідненість і специфічність зв'язування препарату з його мішенню. Фторорганічні сполуки можуть пригнічувати основні вірусні ферменти або порушувати механізм реплікації ВЕБ. Наприклад, вони можуть бути націлені на вірусну ДНК-полімеразу, яка має вирішальне значення для синтезу нових вірусних геномів. Цей підхід міг би ефективно зупинити цикл реплікації ВЕБ, запобігаючи виробленню нових вірусних частинок [33].

Ці сполуки можуть впливати на трансляцію вірусних білків, діючи на функцію рибосом або руйнуючи регуляторні елементи мРНК вірусу. Втручаючись у синтез вірусного білка, ці сполуки можуть знижувати вірулентність і здатність до реплікації ВЕБ [34].

Окрім безпосереднього впливу на вірус, фторорганічні сполуки також можуть модулювати імунну відповідь, підвищуючи здатність організму боротися з ВЕБ. Це може включати посилення відповідей цитотоксичних Т-клітин проти інфікованих клітин або модулювання виробництва цитокінів. Змінюючи імунне середовище, ці сполуки можуть покращити очищення ВЕБ-інфікованих клітин і зменшити стійкість вірусу [27].

Фторовані аналоги нуклеозидів і нуклеотидів продемонстрували перспективність інгібування реплікації ВЕБ. Наприклад, трифлуридин [35], похідне трифтортимідину, було досліджено на його здатність інгібувати вірусну ДНК-полімеразу. Включення фторованих аналогів у вірусну ДНК може призвести до передчасного розриву ланцюга або дефектної вірусної ДНК, таким чином пригнічуючи подальшу реплікацію вірусу. Такі механізми порушують життєвий цикл вірусу та запобігають розповсюдженню вірусу всередині хазяїна [32, 33].

Фторовані сполуки можуть змінювати взаємодію між вірусом і його клітиною-хазяїном. Змінюючи метаболізм ліпідів у клітині-господарі через фторовані молекули, збірка вірусних частинок може бути порушена. Це перешкоджає дозріванню та вивільненню інфекційних віріонів. Стратегічне

втручання в метаболізм ліпідів може вплинути на структурну цілісність вірусу, перешкоджаючи його здатності збиратися та розвиватися з інфікованих клітин [34, 36].

Дослідження щодо застосування фторорганічних сполук проти ВЕБ все ще знаходяться на дослідницькій фазі. Дослідження показують, що ці сполуки можуть модулювати імунну відповідь або безпосередньо пригнічувати реплікацію вірусу, забезпечуючи подвійний механізм дії проти інфекції ВЕБ. Завданням залишається розробка специфічних, потужних і безпечних методів лікування на основі фторорганічних сполук, які можуть ефективно діяти на ВЕБ без значної токсичності [33, 34].

1.5. Сучасні біоінформатичні підходи до розробки і аналізу дії препаратів проти ВЕБ

1.5.1. Геномний аналіз. Технології високопродуктивного секвенування відкрили суттєве уявлення про структуру та варіації геному ВЕБ. Наприклад, дослідження виявили критичні мутації в гені *EBNA1*, які впливають на здатність вірусу зберігати свій геном у клітинах господаря, впливаючи на стійкість вірусу та онкогенність [37]. Такі інструменти, як Bowtie і BLAST, дозволяють точно відображати послідовності, дозволяючи дослідникам ідентифікувати критичні геномні варіації, на які можна орієнтуватися при розробці терапії [38].

1.5.2. Протеомні підходи. Протеомні дослідження, що вивчають взаємодію між білками ВЕБ і клітинним механізмом хазяїна, зокрема за участю EBNA3C і p53, були досліджені в різних наукових статтях. Мас-спектрометрія, критично важливий інструмент у цих аналізах, була ефективно використана для вивчення цих білок-білкових взаємодій, надаючи розуміння ролі, яку вони відіграють в онкогенному процесі.

В одному з таких досліджень повідомлялося про модуляцію p53 за допомогою EBNA3C через індукцію кінази Аутога В, підкреслюючи складні

молекулярні взаємодії, які сприяють ВЕБ для впливу на клітинні шляхи хазяїна [39].

Для більш повного розуміння того, як протеомні технології, такі як MaxQuant, допомагають у цих аналізах, інше дослідження демонструє загальні протеомні підходи до вивчення взаємодії хазяїн-патоген. Це включає використання рідинної хромато-мас-спектрометрії (LC-MS) як для якісного, так і для кількісного аналізів, які є важливими для окреслення складності цих взаємодій (білок і клітина) [40].

1.5.3. Транскриптомні дослідження. Щоб зрозуміти, як RNA-seq розкриває детальні аспекти транскриптома ВЕБ і його маніпуляції з транскрипцією клітини-господаря, кілька досліджень використовували цю технологію разом із інструментами біоінформатики, такими як STAR і Cufflinks. Ці інструменти допомагають проаналізувати диференційовану експресію на різних етапах життєвого циклу вірусу, таких як затримка та літична реплікація, що може висвітлити потенційні цілі для порушення життєвого циклу вірус. Дослідження, описане в статті [41], вивчає різні інструменти та методології диференціального аналізу експресії RNA-seq, підкреслюючи їх використання для ідентифікації ключових вірусних транскриптів. Крім того, огляд у Briefings in Bioinformatics [42] обговорює найновіші методології RNA-seq, у тому числі використання STAR для ефективного відображення послідовностей RNA, що відіграє вирішальну роль у цих аналізах.

1.5.4. Обчислювальні моделі в пошуку ліків. Ідентифікація цілі. Використання інтегративних біоінформаційних підходів для ідентифікації та перевірки нових мішеней для ліків, зокрема за допомогою загальногеномних досліджень асоціацій (GWAS), є ключовим елементом прецизійної медицини, адаптованої до захворювань, пов'язаних з ВЕБ. Ці підходи поєднують мультиомічні дані — геномні, транскриптомні, протеомні — для виявлення генетичних варіацій, які можуть вплинути на реакцію на ліки. Цей цілісний погляд допомагає зрозуміти складні механізми захворювання та

пристосувати лікування до індивідуальних генетичних профілів, підвищуючи ефективність і безпеку терапії [43].

1.5.5. Обчислювальні моделі в пошуку ліків. Молекулярний докінг і моделювання. Ряд досліджень демонструють, як молекулярний докінг, зокрема використання AutoDock Vina, відіграв важливу роль у виявленні нових сполук, які потенційно можуть пригнічувати ключові ферменти, такі як ДНК-полімераза ВЕБ, яка має вирішальне значення для реплікації вірусу. В одному з досліджень було проведено молекулярний докінг і моделювання динаміки, щоб передбачити потенційні інгібітори ADAR2, підкреслюючи універсальність цих обчислювальних підходів у націленні на різні білки та ферменти при різних захворюваннях. Хоча цей конкретний приклад зосереджений на ADAR2, методи та принципи застосовні до подібних досліджень ВЕБ, демонструють потенціал AutoDock Vina у відкритті ліків [44].

1.5.6. Обчислювальні моделі в пошуку ліків. Моделі машинного навчання. Технології машинного навчання відіграють трансформаційну роль у прогнозуванні поведінки ліків в організмі, зосереджуючись на їхній фармакокінетиці та фармакодинаміці. У цих технологіях використовуються алгоритми, навчені величезною кількістю даних про реакцію на ліки, що покращує нашу здатність передбачати, як ліки взаємодіють із біологічними системами, що особливо важливо для розробки методів лікування складних вірусів, таких як ВЕБ [45].

Крім того, ADMETlab 2.0 є комплексним інструментом для оцінки *in silico*, що має вирішальне значення для прогнозування фармакокінетичних параметрів, таких як абсорбція, розподіл, метаболізм, виведення та токсичність. Моделюючи ці параметри, дослідники можуть точніше спрогнозувати поведінку сполуки в організмі людини, скорочуючи часові рамки для клінічних випробувань і покращуючи процес розробки ліків. ADMETlab 2.0 підтримує відкриття ліків шляхом моделювання та оцінки властивостей, фармакокінетичних параметрів і потенційної токсичності

препаратів, тим самим сприяючи безпеці та ефективності терапевтичних засобів [46].

РОЗДІЛ 2

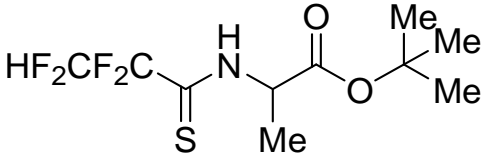
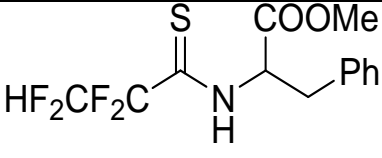
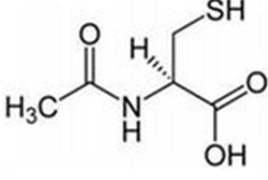
ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження

Досліджуваним об'єктом була клітинна культура В95-8 (В-лімфоцити мавп-мармазеток *Saguinus oedipus*, що містять інтегрований геном вірусу Епштейна-Барр та продукують повноцінні вірусні частки). Ця клітинна культура надійшла з банку Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кравецького НАН України. Наразі клітини В95-8 зберігаються в рідкому азоті при температурі -195°C у криопробірках на території Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного, відділ репродукції вірусів.

Також до об'єктів дослідження входять трет-бутиловий ефір N-(2,2,3,3-тетрафтортіопропіоніл) аланіну (10S-20) та метиловий ефір N-(2,2,3,3-тетрафтортіопропіоніл) фенілаланіну (10S-21), які були синтезовані в Інституті органічної хімії НАН України. До дослідження також залучено референс препарат – ганцикловір, який виробляється компанією Хубей Гедянь Хьюменвелл Фармасьютікал Ко (Китай). Структура досліджуваних речовин та референс препарату наведені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1. Структура досліджуваних речовин та референс препарату

t-butyl (2,2,3,3-tetrafluoropropanethioyl)-L-alaninate (10S-20)	Метилловий ефір N-(2,2,3,3-тетрафтортіопропіоніл) фенілаланіна (10s-21)	Ганцикловір (9-(1,3-дегідрокси-2-пропоксиметил) гуанін)
		

2.2. Матеріали та обладнання, що було використано у роботі

2.2.1. Реактиви та розчини. Реактиви включають трипановий синій барвник, барвник Hoechst 33342, індуктори вірусу Епштейна-Барр – ТФА та натрій-бутират, а також пропідій йодид, що були придбані у компанії «Sigma» (США).

Для досліджень використовували розчини, такі як стерильний фосфатно-сольовий буфер (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) з pH 7.2, 96% етанол та стерильний 70% розчин етилового спирту.

Щодо середовищ, використовували ростове середовище, що складається з 90% RPMI 1640 «Sigma» (США) та 10% розчину ембріональної сироватки теляти «Sigma» (США), з додаванням антибіотика гентаміцину (50 мкг/мл) та L-глутаміну (2 mM).

2.2.2. Обладнання. Робота з клітинною культурою проводилася у ламінарному боксі класу II захисту виробництва ESCO (Німеччина). Культура клітин вирощувалася в CO₂-інкубаторі компанії ThermoScientific (США).

Кількість клітин визначали за допомогою камери Горяєва, використовуючи світловий мікроскоп з 10-кратним збільшенням. Аналіз

результатів МТТ-тесту виконувався за допомогою спектрофотометра Multiskan FC (ThermoScientific, США) на довжині хвилі 538 нм.

Для вимірювань використовували прилад Beckman Coulter Epics XL (США), а обробка даних здійснювалася з використанням програми Flowing Software.

У проведенні роботи зі створенням та опрацюванням хімічних форматів сполук використовувалась програма Marvin Sketch. Це програмне забезпечення дозволяє створювати хімічні формули та конвертувати їх у різні формати, такі як mol, mol2 та pdb. Для прогнозування біологічної активності досліджуваних сполук застосовували програму PASS, яка базується на математичному алгоритмі встановлення залежностей "структура-активність".

Також використовувалися онлайн-сервери IdTarget і PharmMapper для скринінгу потенційних мішеней для хімічних сполук. IdTarget базується на алгоритмі MEdock і використовується для пошуку стійких структур лігандів, отримуючи дані з Protein Data Bank (PDB). PharmMapper визначає потенційні мішені з використанням фармакофорного підходу, аналізуючи дані з баз таких як TargetBank, BindingDB та DrugBank. Обидва ці сервери дозволяють завантажувати файл ліганду у хімічних форматах для подальшої обробки та аналізу.

Для повноцінного аналізу в дослідженні також використовувалася платформа ADMETlab 2.0, яка призначена для *in silico* оцінки фармакокінетичних параметрів. Цей інструмент дозволяє визначити профіль адсорбції, розподілу, метаболізму, екскреції та токсичності (ADMET) хімічних сполук, що є критичним для розуміння їхніх потенційних лікарських властивостей та безпечності.

Завдяки використанню ADMETlab 2.0 у поєднанні з програмами Marvin Sketch для створення хімічних форматів, PASS для прогнозування біологічної активності, а також онлайн-серверами IdTarget та PharmMapper для ідентифікації мішеней, дослідження має змогу глибоко аналізувати хімічні сполуки з точки зору їхньої потенційної ефективності та безпеки

застосування.

2.3. Методи дослідження

2.3.1. Культивування клітин B95-8. Клітинні культури культивували в середовищі, що включало 90% RPMI 1640 і 10% вмісту ембріональної телячої сироватки (обидва від "Sigma", США), з додаванням гентаміцину (50 мкг/мл) та L-глутаміну (2 мМ). Це середовище підтримувалось у інкубаторі при температурі 37°C і 5% концентрації CO₂.

Як індуктори вірусу Епштейна-Барр у культурі клітин B95-8 використовували Na-бутират та ТФА, також від "Sigma" США, з додаванням згідно з рекомендаціями виробника.

2.3.2. Визначення життєздатності культур за допомогою барвника трипанового синього. Дослідження життєздатності клітинних культур проводилося з використанням 0,4% розчину трипанового синього, наданого компанією Sigma (США), що дозволяє ідентифікувати мертві клітини за їх здатністю вбирати барвник. Живі клітини залишаються нефарбованими, оскільки їхні мембрани є непроникними для цього барвника.

Перед проведенням відбору проб для подальших вимірювань суспензію клітин піпетували для забезпечення її однорідності. Кількісний аналіз клітинної популяції виконувався за допомогою лічильної камери Горяєва.

Аналітичний процес передбачав відбір аліквоти клітинної суспензії (100 мкл), з подальшим додаванням 0,4% розчину трипанового синього. Ресуспендування клітин в даному розчині дозволяло визначити кількість живих (що в синій колір непофарбовані) та мертвих (що пофарбовані в синій колір) клітин. Відібрані по 25 мкл суспензії переносились у лічильну камеру Горяєва для проведення вимірювань.

Визначення кількості клітин на мілілітр суспензії здійснювалось відповідно до формули

$$S = A \times B \times 16665, \quad (1.1)$$

де A – середнє значення кількості живих чи мертвих клітин у 15 вибраних квадратах камери Горяєва, вздовж двох діагональних ліній; B – кратність розведення клітинної суспензії барвником; S – загальна кількість клітин на мілілітр.

Для спостережень використовувався світловий мікроскоп Micromed XS-3320 (Україна) з двадцятикратним збільшенням.

2.3.3. МТТ-тест. Дослідження мітохондріальної активності лімфобластоїдних клітин В95-8 проводили за допомогою МТТ-тесту, що є методом вимірювання целюлярної активності через діяльність мітохондріальних дегідрогеназ. Цей метод використовує МТТ як субстрат, який живі клітини можуть перетворювати у формаза́н — речовину, що спектрофотометрично вимірюється.

Реакція перетворення МТТ на формаза́н залежить від дозування і суттєво знижується, коли клітини гинуть від впливу вірусів або токсичних агентів. Для проведення дослідження МТТ розчиняли до концентрації 5 мг/мл у стерильному фосфатному буфері з рН 7,2, після чого розчин проходив через фільтр з порами 0,22 мкм. В експерименті використовували 96-лункові культуральні планшети, куди додавали 100 мкл клітинної суспензії та 25 мкл розчину МТТ, а потім інкубували протягом трьох годин за температури 37°C. Після інкубації клітини промивали і ресуспендували у 96% етанолі для екстракції формаза́ну. Вимірювання результатів виконували за допомогою спектрофотометра Multiskan FC (ThermoScientific, USA) при довжині хвилі 538 нм.

2.3.4. Проточна цитометрія. Проточна цитометрія була застосована для виявлення апоптозу. Зазначене явище аналізувалося як при присутності, так і при відсутності вірусної індукції протягом 48 і 72 годин. Експеримент був проведений з використанням клітинної культури В95-8, розділеної на дві основні дослідні групи. У першій групі для активації вірусної реплікації використовувались ТФА та натрій бутират у визначених концентраціях, після

чого клітини інкубували 4 години при 37°C у 5% CO₂. Клітини з обох груп поділяли на чотири рівні порції, до яких додавали досліджувані речовини: для 10S-21 у дозах 10 та 100 мкг/мл, та ганцикловіру 10 мкг/мл, продовжуючи інкубацію на 48 та 72 години.

Зразки відбирали на 24, 48 та 72 годину, клітини з концентрацією $0,5 \cdot 10^6$ кл/мл відмивали фосфатно-сольовим буфером, центрифугували та фіксували 70% етанолом. Напередодні вимірювань у проточному цитометрі зразки знову центрифугували, після чого ресуспендували у фосфатно-сольовому буфері.

У досліді були такі зразки: контроль культури клітин B95-8, клітини з ганцикловіром та з 10S-21 у двох концентраціях, а також культура клітин з індукцією хімічними речовинами і ті ж самі клітини, але з додаванням лікувальних речовин. Апоптоз визначався за допомогою забарвлення пропідію йодидом, який інтенсивно взаємодіє з ДНК. Зразки інкубували у холодильнику вночі у темряві, а вимірювання проводились на цитометрі Beckman Coulter Epics XL, а результати аналізувались за допомогою програми Flowing Software. В експерименті також брали участь зразки з досліджуваною сполукою 10S-21 та референсним препаратом ганцикловір.

Дослідження апоптотичних властивостей сполуки 10S-20 у клітинах B95-8 включало використання двох методів: проточної цитофлуориметрії та флуоресценції з барвником Hoechst 33342. В рамках проточної цитофлуориметрії клітини інкубували зі сполукою 10S-20 у концентраціях 50 мкг/мл та 100 мкг/мл, а через 96 годин проводили аналіз, використовуючи флуоресцентні маркери для детектування апоптотичних клітин. В якості апоптотичних маркерів використовували пропідій йодид, який дозволяє визначити некротичні клітини завдяки своїй здатності проникати в клітини з пошкодженою мембраною.

Метод флуоресценції з барвником Hoechst 33342 полягав у фарбуванні клітин через 24 години інкубації зі сполукою, що дозволяло візуалізувати апоптотичні зміни у ядрі клітин. Завдяки цьому барвнику можна було

спостерігати конденсацію хроматину та фрагментацію ядра, що є характерними ознаками апоптозу. Подальші вимірювання проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопа для кількісної оцінки відсотка клітин з апоптотичними ядерними змінами.

Завершальний аналіз даних включав обробку результатів за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення, що дозволяло детально проаналізувати ступінь апоптозу, інтегруючи часову динаміку змін відсотка апоптотичних клітин у залежності від концентрації та часу експозиції до сполуки.

2.3.5. Прогнозування біологічної активності досліджуваних сполук

2.3.5.1. Створення хімічних форматів для аналізу. Методика створення та конвертації хімічних форматів для аналізу сполук проводилася за допомогою програми Marvin Sketch, розробленої компанією ChemAxon. Ініційовано процес шляхом введення даних про хімічну структуру сполуки у програму. Після цього програма автоматично генерує цифрове представлення структури сполуки, що дозволяє детально візуалізувати і аналізувати молекулярну конфігурацію. Отримані структури конвертуються у три основні формати: MDL Mol Format (mol) для загальних хімічних досліджень, Sybyl Mol2 Format (mol2) для фармакоінформатичних досліджень, та Protein Data Bank Format (pdb) для досліджень у структурній біології. Завершується процес експортом готових форматів для їх подальшого використання у наукових дослідженнях та інтеграції з різними біоінформаційними інструментами, забезпечуючи необхідну сумісність і точність даних.

2.3.5.2. Прогнозування біологічної активності сполук. Методика оцінки потенційної біологічної активності сполук застосовується через програму PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), доступну за адресою <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>. Цей процес починається з введення структурної формули хімічної сполуки в програму. PASS використовує MNA дескриптори (Multilevel Neighbourhoods of Atoms), що дозволяє забезпечити детальний опис залежностей між структурою

молекули та її біологічною активністю.

Програма аналізує структурну формулу і застосовує математичний алгоритм для прогнозування різноманітних видів біологічної активності. Результати, які досягають точності більше 90%, виражаються у вигляді спектру можливих активностей.

2.3.5.3. Ідентифікація мішеней. Скринінг потенційних мішеней для хімічних сполук проводився за допомогою серверів IdTarget та PharmMapper, які використовують передові технології для аналізу біологічної активності. Веб-сервер IdTarget застосовує алгоритм MEDock (Maximum Entropy based Docking), що забезпечує формування стійких тривимірних структур лігандів з високою ефективністю пошуку, використовуючи дані з Protein Data Bank. Для запуску процесу завантажували ліганд у форматах pdb, mol2 або pdbqt. Результати аналізу представили у таблиці, де білки класифікуються за гомологією і ранжуються за показниками вільної енергії зв'язування, що дозволяє вибирати найбільш перспективні цілі для подальших випробувань.

PharmMapper, з іншого боку, використовує фармакофорний підхід для ідентифікації мішеней, аналізуючи значну кількість фармакофорів у базах даних, таких як TargetBank, BindingDB, DrugBank, і базі потенційних лікарських мішеней (PDTD). Цей сервер дозволяє завантажити структуру ліганду у форматах mol2 або SDF, після чого здійснюється пошук мішеней, результати якого представляють у вигляді списку потенційних цілей для перевірки *in vitro*.

2.3.6. Оцінка параметрів фармакокінетики *in silico* за допомогою ADMETlab 2.0. Оцінка параметрів фармакокінетики *in silico* за допомогою ADMETlab 2.0 проводиться методом комп'ютерного моделювання, який дозволяє передбачити адсорбцію, дистрибуцію, метаболізм, екскрецію та токсичність (ADMET) потенційних лікарських засобів. ADMETlab 2.0 використовує набір передових алгоритмів та баз даних для аналізу хімічних структур та їх біологічних властивостей. При роботі з цією платформою, спочатку завантажили структуру сполуки у форматі SMILES, після чого

система автоматично згенерувала молекулярні дескриптори.

Після генерації дескрипторів, ADMETlab 2.0 аналізував сполуку з точки зору її фармакокінетичних параметрів, використовуючи кілька моделей машинного навчання, заснованих на великих наборах даних з експериментально підтвердженими значеннями. Це дозволило отримати передбачення щодо швидкості абсорбції, розподілу по організму, потенційних метаболічних шляхів, очікуваної швидкості виведення лікарських засобів та можливої токсичності. Результати представили у вигляді детальних звітів із переліком потенційних ризиків і можливостей для подальшої оптимізації сполуки. Кожен з параметрів ADMET оцінювався на основі порівняння з великим діапазоном відомих лікарських сполук, що забезпечує високу надійність і точність прогнозування.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Цитотоксичність сполук 10S-20 та 10S-21

Цитотоксичність сполук 10S-20 та 10S-21 оцінювали на культурі клітин В95-8. Ці сполуки вводили в клітини в концентраціях 12,5, 25, 50 та 100 мкг/мл, при цьому кожену концентрацію тестували в трьох повторах разом із контрольними зразками, до яких речовини не додавали. Через 48 годин інкубації досліджували відсоток мертвих клітин за допомогою фарбування трипановим синім та аналізу мітохондріальної активності за МТТ-методом. Рівень апоптозу визначали за допомогою проточної цитометрії.

Сполука 10S-20 демонструвала зменшену цитотоксичність порівняно із сполукою 10S-21. Значення CC_{50} для 10S-20 становило 124,77 мкг/мл за методом трипанового синього та 53,09 мкг/мл за МТТ-методом. Результати, що представлені в табл. 3.1. свідчать, що для зниження життєздатності клітин на 50% потрібна відносно висока концентрація сполуки 10S-20.

Згідно результатам, що вказані у табл. 3.2., сполука 10S-21 має вищу цитотоксичність. CC_{50} для цієї сполуки за методом трипанового синього склала 22,13 мкг/мл, а за МТТ-методом — 8,24 мкг/мл. Ці дані підтверджують, що сполука 10S-21 є значно більш цитотоксичною при нижчих концентраціях.

Обидві сполуки демонструють цитотоксичний ефект, але сполука 10S-21 є більш потужною, з нижчими концентраціями, необхідними для досягнення значної токсичності. Різниця в результатах між ТС і МТТ методами може вказувати на те, що хоча мембрани клітин швидко пошкоджуються,

мітохондрії можуть залишатися функціональними на більш низьких концентраціях, але під впливом високих концентрацій теж швидко втрачають активність. Це підтверджує потенційну ефективність цих сполук як антиплевонних агентів, які цілять клітинні мембрани та мітохондрії.

Таблиця 3.1. Визначення цитотоксичної концентрації досліджуваної сполуки 10S-20

Концентрація речовин, мкг/мл	Трипановий синій	МТТ
	% мертвих клітин	
12,5	7,5	36
25	12	40
50	23	50
100	44	57
CC ₅₀	124,77	53,09

Таблиця 3.2. Визначення цитотоксичної концентрації досліджуваної сполуки 10S-21

Концентрація речовин, мкг/мл	Трипановий синій	МТТ
	% мертвих клітин	
12,5	3	61
25	47	52
50	71	82
100	70	78
CC ₅₀	22,13	8,24

Дослідження показало, що в культурі клітин В95-8 основний інгібуючий вплив спостерігався на мітохондріальну систему. Активність мітохондрій знижувалася на 40 – 60% при використанні всіх аналізованих сполук у концентраціях від 12,5 до 100 мкг/мл. Зокрема, сполука 10S-21 виявилася найбільш токсичною, знижуючи життєздатність клітин В95-8 майже на 80% при концентрації 100 мкг/мл, що ілюструється на рисунку 3.1 (Б).

Зі збільшенням концентрації сполуки 10S-20 від 12,5 до 100 мкг/мл за методом ТС спостерігається лінійне зростання відсотка мертвих клітин, що зображено на рисунку 3.1. (А). Це вказує на поступове збільшення цитотоксичної дії з підвищенням дози. Згідно МТТ-методу, відсоток клітин з низькою мітохондріальною активністю збільшується зі зростанням концентрації, але крива більш полого порівняно з ТС, що свідчить про менш виразний ефект на мітохондріальну активність.

Значне зростання відсотка мертвих клітин, згідно методу ТС, при переході від 25 мкг/мл до 50 мкг/мл, свідчить про сильну цитотоксичність сполуки 10S-21 в цьому діапазоні. За МТТ-методом мітохондріальна активність різко падає між 25 та 50 мкг/мл, згодом стабілізується. Це може вказувати на швидкий токсичний вплив сполуки 10S-21 на мітохондрії.

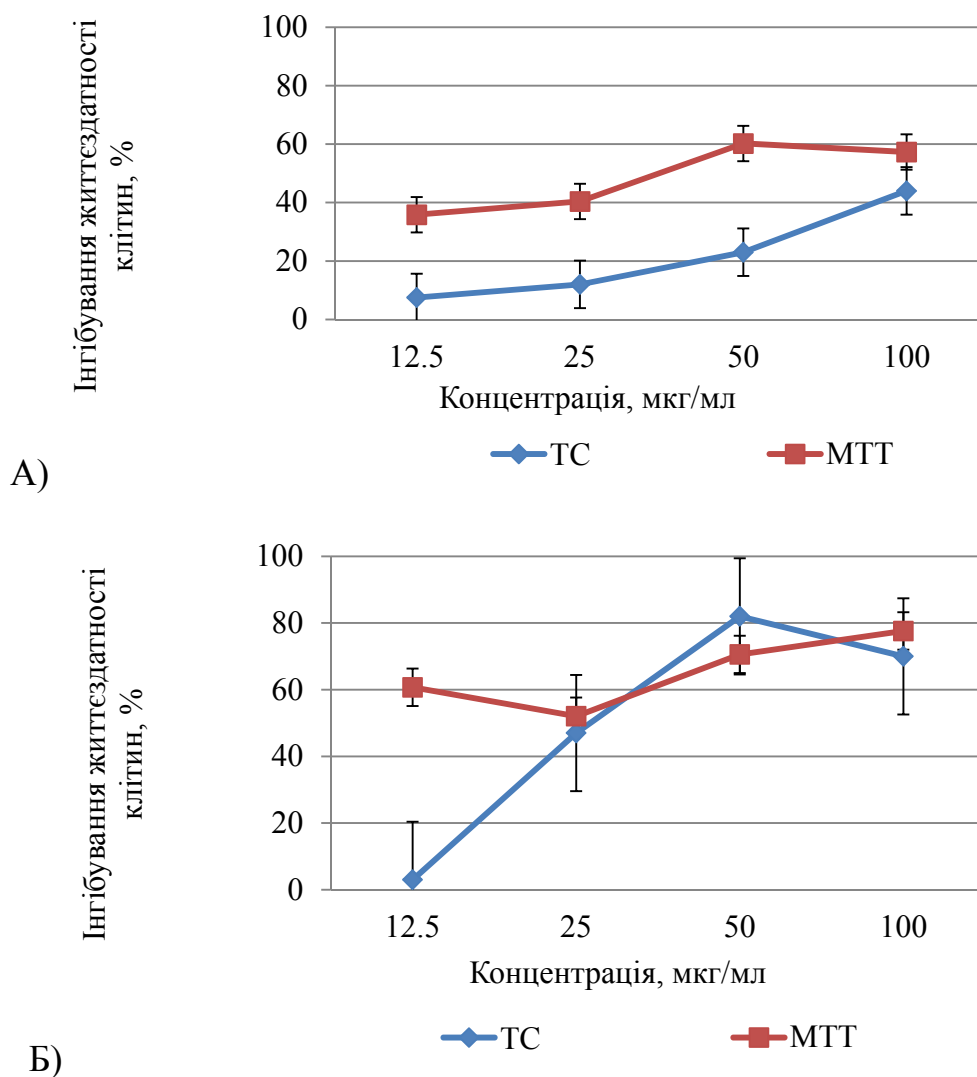


Рис. 3.1. Цитотоксична дія похідних ефірів фторованих амінокислот в культурах клітин В95-8: А – вплив сполуки 10S-20; Б – вплив сполуки 10S-21, ТВ – фарбування трипановим синім, МТТ – МТТ метод.

У культурі клітин В95-8 спостерігалось виражене пригнічення дегідрогеназної системи, де вже при мінімальній концентрації 12,5 мкг/мл інгібування досягало 60%. Варто зазначити, що похідні амінокислот виявили сильний цитотоксичний вплив у культурі клітин В95-8, при цьому інгібуючи життєздатність клітин на рівні 40 до 90% у всіх вивчених концентраціях від 12,5 до 100 мкг/мл.

3.2. Апоптозстимулююча дія сполуки 10S-21

Аналіз апоптозстимулюючої дії сполуки 10S-21 на клітинній культурі В95-8 надає важливу інформацію щодо її потенціалу як молекулярного агента для індукції клітинної смерті. Ці результати відкривають можливості для застосування сполуки в терапевтичних стратегіях, зокрема у боротьбі з раковими захворюваннями, де цілеспрямована індукція апоптозу може бути ключовим елементом лікування. Результати дослідження вказують на значущий вплив 10S-21 на індукцію апоптозу, зі зміною ефективності в залежності від концентрації сполуки та часу експозиції.

Початково, згідно табл.3.3., контрольні клітини без додавання індукторів показали зниження відсотка апоптозу з часом, що може бути пов'язано зі стабільністю клітинної популяції в контрольних умовах. Рис.3.2. свідчить про те, що в клітинах з додаванням ганцикловіру відбувалося підвищення апоптотичної активності на 48 годин, і знижувалось на 72 годину (рис. 3.3), вказуючи на можливу початкову токсичну реакцію, яка згодом стабілізувалась.

При введенні сполуки 10S-21 у концентрації 10 мкг/мл було виявлено зростання відсотка апоптотичних клітин з 48 по 72 годину, що свідчить про постійний стимулюючий вплив сполуки на апоптоз. Більш виражені ефекти апоптозу були зафіксовані при використанні більш високої концентрації сполуки (100 мкг/мл), де апоптотична активність також зростала з часом. Це демонструє, що 10S-21 має дозозалежний вплив на індукцію апоптозу в клітинах.

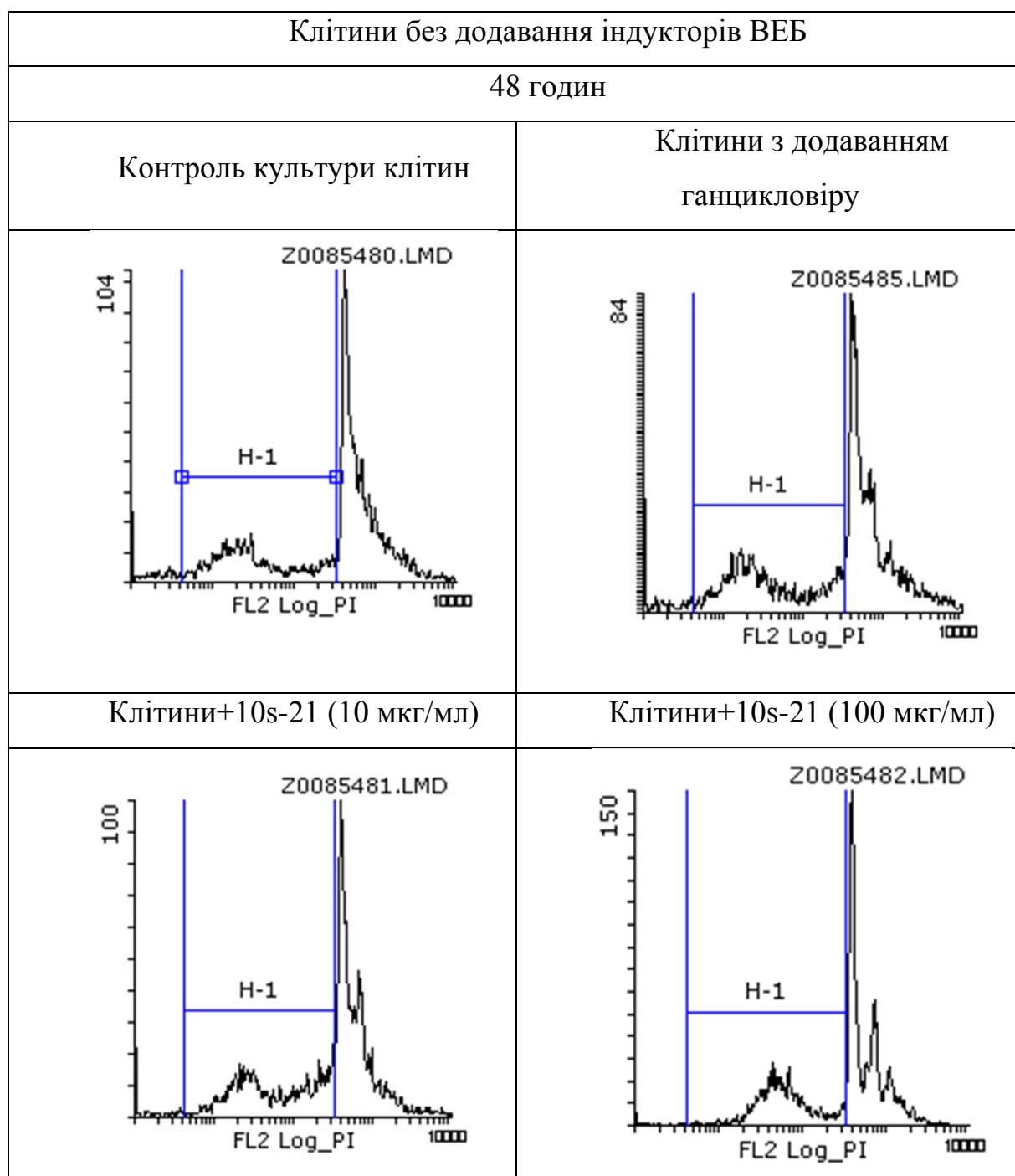


Рис. 3.2. Культури В95-8 з додаванням 10s-21 та ганцикловіру на 48 годину

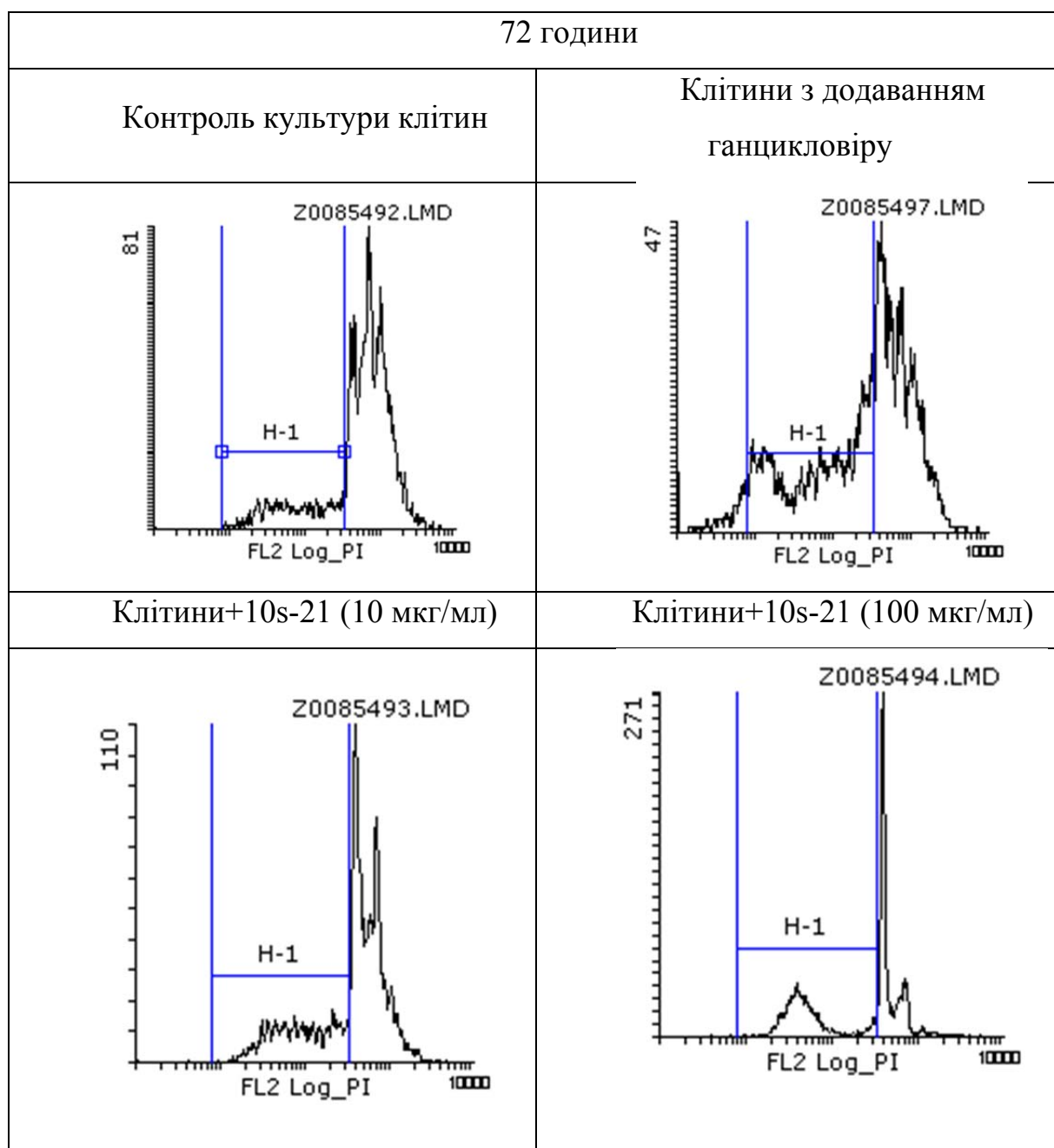


Рис. 3.3. Культури В95-8 з додаванням 10s-21 та ганцикловіру на 72 годину

Аналіз апоптозстимулюючої дії сполуки 10S-21 на клітинній культурі В95-8 в умовах індукції додатково підкреслює ефективність цієї сполуки як потенційного апоптоз-індуктора. Індукція клітин здійснювалася за допомогою індукторів, які самі по собі можуть впливати на апоптозні процеси, тим самим створюючи складніші умови для оцінки впливу сполуки 10S-21.

Згідно таблиці 3.3., в експерименті з індукованими клітинами, контрольні показники апоптозу значно зростали з часом, від 53,12% апоптотичних клітин на 48 годин до 73,36% на 72 години, що свідчить про вищу базову рівень апоптозу в індукованих клітинах порівняно з неіндукованими. Таке зростання може бути результатом додаткового стресу, спричиненого індукторами, який активує апоптозні шляхи.

Клітини, оброблені ганцикловіром (10 мкг/мл), в індукованому стані показали ще вищий рівень апоптотичної активності: з 63,70% на 48 годин до 86,02% на 72 години. Це може вказувати на синергічний вплив ганцикловіру і індукторів на апоптоз.

При додаванні сполуки 10S-21 у концентрації 10 мкг/мл до індукованих клітин спостерігалось зростання апоптотичних клітин з 57,40% на 48 годин (рис 3.4.) до 59,58% на 72 години (рис. 3.5.). Хоча зростання апоптотичних клітин було помітним, воно було менше виражене порівняно з впливом ганцикловіру, що може свідчити про різні механізми дії сполуки та індукторів.

Найбільш помітні результати були зафіксовані при використанні більшої концентрації сполуки 10S-21 (100 мкг/мл) у індукованих клітинах: відсоток апоптотичних клітин збільшився з 48,18% на 48 годин до 79,24% на 72 години. Це засвідчує потужний апоптозіндукуючий потенціал сполуки при вищих концентраціях, навіть у складних умовах індукції.

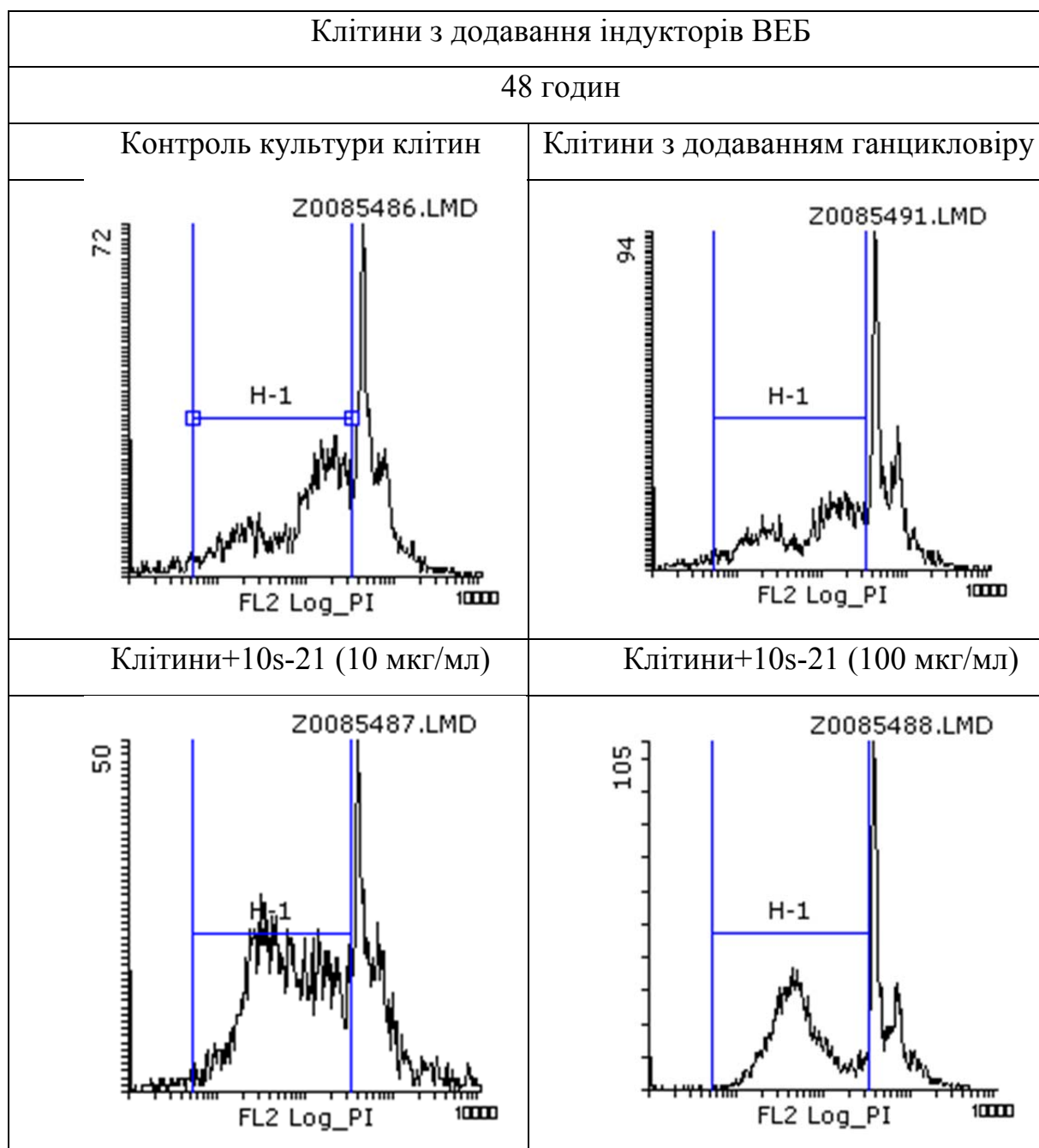


Рис. 3.4. Індуковані культури В95-8 з додаванням 10s-21 та ганцикловіру на 48 годину

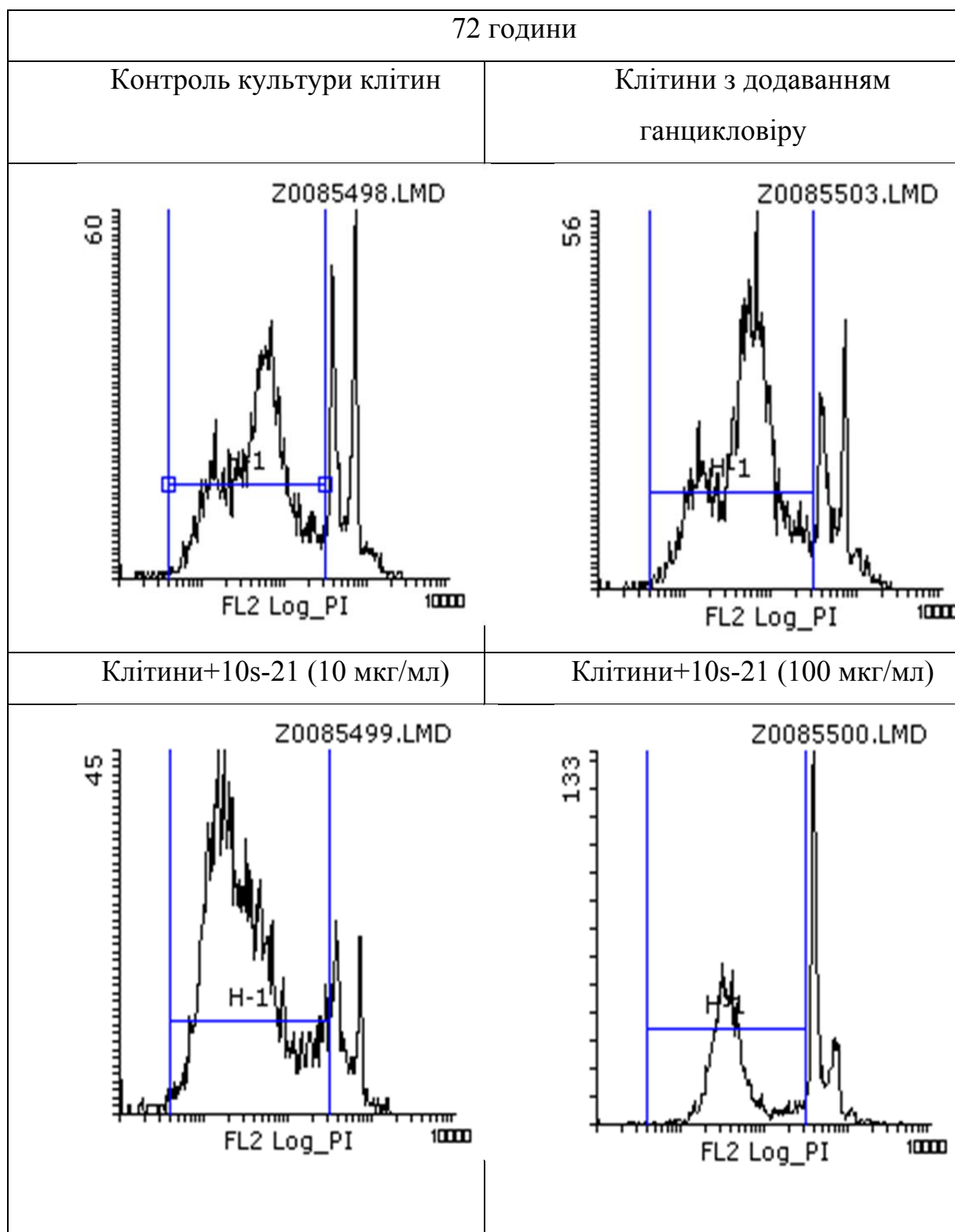


Рис. 3.5. Індуковані культури В95-8 з додаванням 10s-21 та ганцикловіру на 72 годину

Ці результати підкреслюють, що сполука 10S-21 ефективно стимулює

апоптоз у клітинах, незалежно від базового стану індукції, з дозозалежним збільшенням ефекту. Це демонструє потенціал сполуки для застосування в медичних стратегіях, які вимагають точного контролю апоптозу, особливо у контекстах, де клітинна смерть є бажаним результатом, таких як лікування раку.

Таблиця 3.3. Відсоток апоптотичних клітин в динаміці визначений за допомогою проточної цитометрії

Клітини без додавання індукторів ВЕБ		
Зразки	Відсоток апоптотичних клітин, %	
	48 години	72 години
Контроль культури	30,14	18,92
Клітини + ганцикловір (концентрації 10 мкг/мл)	37,44	31,58
Клітини + 10s-21 (концентрації 10 мкг/мл)	35,70	41,24
Клітини + 10s-21 (концентрації 100мкг/мл)	34,26	42,98
Клітини з додавання індукторів ВЕБ		
Зразки	Відсоток апоптотичних клітин, %	
	48 години	72 години
Контроль культури	53,12	73,36
Клітини + ганцикловір (концентрації 10 мкг/мл)	63,70	86,02
Клітини + 10s-21 (концентрації 10	57,40	59,58

мкг/мл)		
Клітини + 10s-21 (концентрації 100мкг/мл)	48,18	79,24

3.3. Апоптозстимулююча дія сполуки 10S-20

Люмінісцентна мікроскопія показала, що при концентрації 50 мкг/мл відсоток апоптотичних клітин коливався від 18% до 31% протягом 96 годин, про що свідчать результати з таблиці 3.4., з піком на 48 годині. Однак при збільшенні концентрації до 100 мкг/мл, відсоток апоптотичних клітин не продемонстрував значного зростання, коливаючись від 19% до 24%.

Проточна флюориметрія виявила більш виражений апоптозіндукуючий ефект при вищій концентрації. При 50 мкг/мл відсоток апоптотичних клітин зростав до 37% на 48 годині, але потім спадав. При 100 мкг/мл, на відміну від люмінісцентної мікроскопії, відсоток апоптотичних клітин досяг 41% на 96 годині, що є значно вищим порівняно з іншими точками даних.

Ці результати підтверджують, що сполука 10S-20 має здатність індукувати апоптоз, причому ефективність залежить від вибраної методики аналізу та концентрації сполуки. Проте, цю сполуку не можна назвати високоефективною апоптозіндукуючою речовиною, незважаючи на певну активність у цьому напрямку. Особливо виражений ефект при вищій концентрації вказує на можливість дозозалежного впливу сполуки на клітини, що слід враховувати при подальшому дослідженні її властивостей.

Таблиця 3.4. Дослідження апоптозіндукуючого потенціалу сполуки 10S-20

Концентрація		50 мкг/мл		100 мкг/мл	
Культура клітин / час інкубації		Люмінісцентна мікроскопія	Проточна флюориметрія	Люмінісцентна мікроскопія	Проточна флюориметрія
B95-8	24	21	29	21	28
	48	31	37	15	38
	72	18	27	24	35
	96	19	35	22	41

3.4. Оцінка біологічної активності сполук

Речовини, що були проаналізовані, охоплюють велике розмаїття молекулярних мішеней, як показано у таблиці 3.5. В цьому списку присутні регуляторні білки, білки, які беруть участь у метаболізмі амінокислот та комплексних вуглеводів, проапоптичні білки, а також ферменти, що задіяні у синтезі ДНК і РНК. Зокрема, сполука 10S-20 може взаємодіяти з широким колом мішеней, включаючи ацетилхолінестеразу, дезоксирибонуклеотидазу (мітохондріальну), білок теплового шоку Hsp90- α , тирозинову протеїн фосфатазу, аспартат амінотрансферазу, аланін рацемазу і трансформуючий фактор росту β 2.

Таблиця 3.5. Список потенційних мішеней похідних ефірів фторованих амінокислот, визначений за допомогою комп'ютерного моделювання

Сполука 10S-20		Сполука 10S-21	
Назва мішені	Fit score	Назва мішені	Fit score

Ацетилхолін естераза	4.771	Епідермальний фактор росту	4.533
Мітохондріальна дезоксирибонуклеозидаза	4.320	Gag-Pol протеїн	4.468
Білок теплового шоку Hsp90- α	4.184	Пурин нуклеозид фосфорилаза	4.288
Тирозин протеїн фосфорилаза	4.182	γ глутамил трансфераза	4.078
Аспартат амінотрансфераза	3.904	Ядерний рецептор підродини 1 групи 1	4.063
β лактамаза	3.833	MAP кінза	3.910
Серин кінза	3.783	Білок теплового шоку Hsp90- α	3.900
MAP кінза 1	3.740	Аланін карбоксипептидаза	3.861
Каталітична субодиниця серин/треонін фосфатази	3.607	Метитрансфераза	3.730
Трансформуючий фактор росту β 2	3.605	Рецептор фактору росту стовбурових клітин	3.716

Багато з аналізованих мішеней беруть участь у метаболізмі білків та вуглеводів. Білки теплового шоку відіграють ключову роль у реакції клітин

на стресові стани. У випадку онкологічних захворювань спостерігається зростання синтезу цих білків, що є критичним для виживання змінених клітин. Таким чином, однією з перспективних стратегій протипухлинної терапії є блокування дії білків теплового шоку.

За оцінками, сполука 10S-21 має потенціал для взаємодії з регуляторними білками клітинного циклу (зокрема, протеїнкіназа 2 клітинного поділу) і декількома проапоптичними білками (МАР-кіназами), що може вказувати на її потенційні протипухлинні властивості. Ця взаємодія включає акцепторно-водневі зв'язки та механізми позитивної взаємодії, як показано на рисунку 3.6.

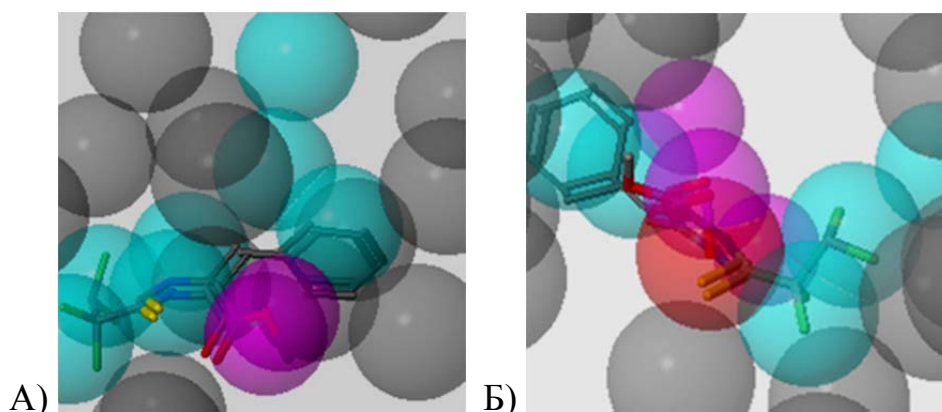


Рис. 3.6. Фармакофорні моделі потенційних мішеней для похідних ефірів фторованих амінокислот з використанням веб-серверу PharmMapper: А – модель комплексу сполуки 10S-20 з Gag-Pol протеїн; Б – модель взаємодії сполуки 10S-21 з міоген-активуєча кіназа 1 (МАРК 1). Блакитний колір – гідрофобні зв'язки, червоний – негативні, рожеві – акцепторні зв'язки, сірого кольору молекули навколосполуки, що не беруть участі в формуванні комплексу.

Серед потенційних мішеней для амінокислотних похідних можна виділити регуляторні білки клітинного циклу, проапоптотичні білки, вірусні білки та білки теплового шоку. Аналіз взаємодій між мішенями та сполуками показує значну присутність гідрофобних зв'язків. Згідно з прогнозами біологічної активності, сполуки 10S-20 і 10S-21 можуть проявити

антивірусну активність, але не мають протипухлинних властивостей. Проте, враховуючи список потенційних мішеней, є можливість антивірусної та протипухлинної дії кожної сполуки. Завдяки наявності амінокислот у складі, можна передбачати, що сполуки можуть мати різноманітний механізм дії. Амінокислотні ефіри (10S-20 і 10S-21) продемонстрували антивірусну активність при гострій ВЕБ-інфекції. Обидві сполуки, що містять два атоми фтору, відрізняються амінокислотним складом: 10S-20 містить аланін, тоді як 10S-21 — фенілаланін. Ці сполуки інгібували синтез ДНК ВЕБ. Сполуки 10S-20 (трет-бутиловий ефір N-(2,2,3,3-тетрафтортиопропионил)аланіна) та 10S-21 (метиловий ефір N-(2,2,3,3-тетрафтортиопропионил)фенілаланіна) показали антивірусну активність у низьких концентраціях. Оскільки фенілаланін є незамінною амінокислотою і не синтезується в організмі людини, вбудовування сполуки 10S-21 відбувається ефективніше. Таке аномальне амінокислотне похідне може порушувати конформацію білків під час фолдингу, що призводить до інгібування білкової активності через неправильну структуру активного центру. Ці сполуки є об'єктами для подальших досліджень.

3.5. Фармакокінетичні та токсикологічні властивості сполуки 10S-20

Аналізуючи фізико-хімічні параметри сполуки 10S-20, продемонстровані на рис. 3.7., можна зробити висновок про потенційну придатність цієї речовини для досліджень, пов'язаних із вірусом Епштейна-Барр. Відзначається, що молекулярна вага речовини становить 291.090, що є типовим для багатьох маленьких молекул. Щільність сполуки 1.163 г/см³ та об'єм 250.236 кубічних ангстрем свідчать про помірну розмірність та масивність молекули.

Значення logP 3.262 та logD 3.574 вказують на гарну ліпофільність, що є критично важливим для проникнення через ліпідні мембрани клітин,

включно з тими, що інфіковані вірусом Епштейна-Барр. Негативне значення $\log S$ (-3.117) показує низьку розчинність у воді, але в контексті ліпофільності це може бути позитивним аспектом для мішеневої доставки в неполярні регіони клітин.

Гнучкість молекули висока, 8.000, що свідчить про потенціал до структурної адаптації при взаємодії з білками вірусу. Наявність двох стереоцентрів може вказувати на складність просторової конфігурації, що може бути використано для специфічної взаємодії з молекулярними цілями вірусу.

Таким чином, згідно рис. 3.7. та рис. 3.8., сполука 10S-20 має оптимальні фізико-хімічні показники для подальшого дослідження як потенційний антивірусний агент проти вірусу Епштейна-Барр. Її висока ліпофільність та низька розчинність у воді можуть сприяти ефективній мішеневій доставці.

Physicochemical Property		
Molecular Weight (MW)	291.090	i
Volume	250.236	i
Density	1.163	i
nHA	3	i
nHD	1	i
nRot	8	i
nRing	0	i
MaxRing	0	i
nHet	8	i
fChar	0	i
nRig	1	i
Flexibility	8.000	i
Stereo Centers	2	i
TPSA	38.330	i
$\log S$	-3.117	i
$\log P$	3.262	i
$\log D$	3.574	i

Рис. 3.7. Фізико-хімічні властивості сполуки 10S-20

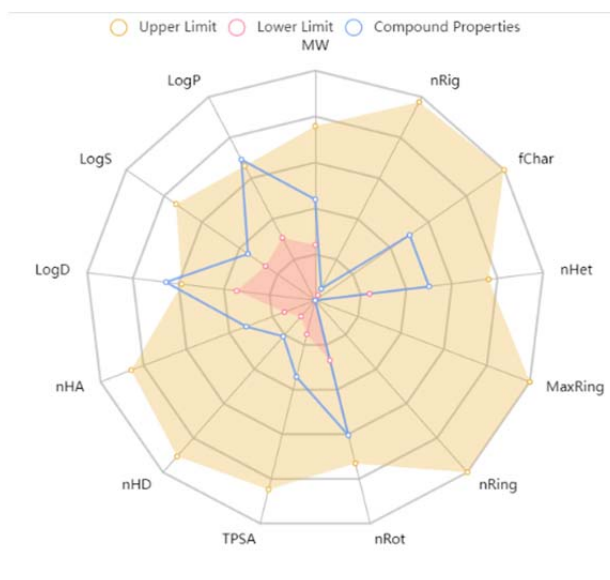


Рис. 3.8. Павукова діаграма фізико-хімічних властивостей сполуки 10S-20 з верхніми та нижніми межами допустимих значень

Сполука 10S-20, згідно рис. 3.9., має значення QED 0.806, що свідчить про високий потенціал як лікарського засобу, з хорошим балансом між фізико-хімічними властивостями та біологічною активністю. Водночас, SAscore 3.760 вказує на певні складнощі у синтезі, що може ускладнити масштабне виробництво. Великий відсоток насичених вуглеців у молекулі, показник F_{sp^3} 0.900, корелює з більш тривимірною структурою та потенційною біологічною активністю. Значення MCE-18 9.000 підкреслює високу молекулярну складність, що може сприяти унікальній активності або селективності. Негативний NPscore -0.947 підтверджує, що сполука не має характеристик природнього продукту.

Сполука задовольняє Ліпінські правило, що робить її потенційно придатною для перорального застосування, але вона не відповідає Pfizer Rule, що може вказувати на можливі проблеми з біодоступністю. Проте, прийняття GSK Rule і Golden Triangle свідчить про хороші фізико-хімічні властивості для орального застосування. Значення PAINS та одне попередження за ALARM NMR Rule вказують на специфічні молекулярні особливості, які потребують уваги при біологічних тестуваннях. Таким чином, сполука 10S-20 має потенціал для досліджень як препарат проти вірусу Епштейна-Барр,

хоча деякі параметри потребують додаткового аналізу та оптимізації.

Medicinal Chemistry			
QED	0.806	●	ⓘ
SAscore	3.760	●	ⓘ
Fsp ³	0.900	●	ⓘ
MCE-18	9.000	●	ⓘ
NPscore	-0.947		ⓘ
Lipinski Rule	Accepted	●	ⓘ
Pfizer Rule	Rejected	●	ⓘ
GSK Rule	Accepted	●	ⓘ
Golden Triangle	Accepted	●	ⓘ
PAINS	0 alert(s)		ⓘ
ALARM NMR Rule	1 alert(s)	DETAIL	ⓘ
BMS Rule	0 alert(s)		ⓘ
Chelator Rule	0 alert(s)		ⓘ

Рис. 3.9. Результати оцінки сполуки за правилами медичної хімії

Аналіз абсорбції та розподілу сполуки 10S-20 (рис.3.10.) вказує на деякі обмеження, які можуть вплинути на її потенціал як препарату проти вірусу Епштейна-Барр. Значення проникності через клітини Caco-2 та MDCK є дуже низькими, що може вказувати на погану засвоюваність через кишковий бар'єр та низьку біодоступність для орального застосування. Оскільки сполука не є інгібітором чи субстратом глікопротеїну-P, це може впливати на її видалення та токсичність. Для оцінки ефективності речовини, слід отримати та проаналізувати дані про засвоюваність у людському організмі.

Щодо розподілу, високий рівень зв'язування з білками плазми (87.59%) може обмежувати доступність сполуки для взаємодії з біологічними мішенями. Об'єм розподілу на рівні 1.062 л/кг свідчить про помірну здатність сполуки залишатися в крові або розподілятися між тканинами. Позначка "+" щодо проникнення через крово-мозковий бар'єр вказує на потенційну можливість лікувати інфекції в центральній нервовій системі, хоча для вірусу Епштейна-Барр це не є ключовим. Значення 15.269% вільної сполуки в плазмі може вказувати на достатню доступність для біологічної активності.

Absorption			
Caco-2 Permeability	-4.582	●	ⓘ
MDCK Permeability	3.8e-05	●	ⓘ
Pgp-inhibitor	---	●	ⓘ
Pgp-substrate	---	●	ⓘ
HIA	---	●	ⓘ
F _{20%}	---	●	ⓘ
F _{30%}	--	●	ⓘ
Distribution			
PPB	87.590%	●	ⓘ
VD	1.062	●	ⓘ
BBB Penetration	+	●	ⓘ
Fu	15.269%	●	ⓘ

Рис. 3.10. Результати оцінки сполуки за параметрами абсорбції та розподілу

Сполука є субстратом та інгібітором для кількох ізоферментів цитохрому P450, про що свідчить інформація з рис. 3.1., що може призвести до потенційних взаємодій з ліками. Зокрема, сильне інгібування CYP2C19 може впливати на метаболізм інших препаратів. Сполука також виявляє взаємодію з CYP2D6, що важливо враховувати при її застосуванні у пацієнтів. Відсутність значної інгібіції та субстратної активності для CYP3A4 є позитивним, оскільки цей ізофермент бере участь у метаболізмі багатьох лікарських засобів.

Значення кліренсу 9.604 мл/хв/кг свідчить про високу швидкість виведення з організму, що може вимагати більш частого дозування для підтримання терапевтичного ефекту. Короткий період напіввиведення (0.453 години), згідно рис.3.11., також підкреслює швидку метаболічну деградацію або екскрецію.

Metabolism		
CYP1A2 inhibitor	++	
CYP1A2 substrate	++	
CYP2C19 inhibitor	+++	
CYP2C19 substrate	++	
CYP2C9 inhibitor	++	
CYP2C9 substrate	+	
CYP2D6 inhibitor	---	
CYP2D6 substrate	+	
CYP3A4 inhibitor	-	
CYP3A4 substrate	+	
Excretion		
CL	9.604	
T _{1/2}	0.453	

Рис. 3.11. Результати оцінки сполуки за параметрами метаболізму та виведення

Згідно отриманим результатам, про що свідчить рис. 3.12., сполука має високий потенціал індукції DILI (пошкодження печінки, індуковане ліками) та канцерогенності, що може обмежувати її використання або вимагати додаткових заходів безпеки. Високий ризик респіраторної токсичності та кардіотоксичності також важливий для розгляду при лікуванні вірусу Епштейна-Барр, особливо у вразливих пацієнтів. Водночас, низький потенціал гострої токсичності та відсутність алергенних властивостей можуть бути сприятливими для її профілю безпеки.

Toxicity			
hERG Blockers	---	●	i
H-HT	+++	●	i
DILI	+++	●	i
AMES Toxicity	---	●	i
Rat Oral Acute Toxicity	-	●	i
FDAMDD	+	●	i
Skin Sensitization	--	●	i
Carcinogenicity	+++	●	i
Eye Corrosion	---	●	i
Eye Irritation	---	●	i
Respiratory Toxicity	---	●	i
Environmental Toxicity			
Bioconcentration Factors	0.537		i
IGC ₅₀	2.491		i
LC ₅₀ FM	3.447		i
LC ₅₀ DM	4.890		i
Tox21 Pathway			
NR-AR	---	●	i
NR-AR-LBD	---	●	i
NR-AhR	---	●	i
NR-Aromatase	---	●	i
NR-ER	---	●	i
NR-ER-LBD	---	●	i
NR-PPAR-gamma	---	●	i
SR-ARE	---	●	i
SR-ATAD5	---	●	i
SR-HSE	---	●	i
SR-MMP	---	●	i
SR-p53	---	●	i
Toxicophore Rules			
Acute Toxicity Rule	0 alert(s)		i
Genotoxic Carcinogenicity Rule	2 alert(s)	DETAIL	i
NonGenotoxic Carcinogenicity Rule	0 alert(s)		i
Skin Sensitization Rule	0 alert(s)		i
Aquatic Toxicity Rule	3 alert(s)	DETAIL	i
NonBiodegradable Rule	3 alert(s)	DETAIL	i
SureChEMBL Rule	0 alert(s)		i
FAF-Drugs4 Rule	1 alert(s)	DETAIL	i

Рис. 3.12. Результати оцінки сполуки за параметрами токсичності

На підставі доступної інформації, хоча сполука 10S-20 має обнадійливі фізико-хімічні параметри для використання проти вірусу Епштейна-Барр, її розвиток як лікарського засобу вимагає подальшої оптимізації, включаючи покращення біодоступності та зниження токсичності.

3.6. Фармакокінетичні та токсикологічні властивості сполуки 10S-21

Аналізуючи фізико-хімічні властивості речовини 10S-21, продемонстровані на рисунку 3.13. і 3.14., можна зазначити, що ця речовина може мати потенціал у лікуванні вірусу Епштейна-Барра. Показники молекулярної ваги (323.060) та гідрофобні властивості ($\log P$ 2.762) вказують на потенційно високу проникність через ліпідні бар'єри, що є важливим фактором для антивірусних препаратів. Хоча $\log S$ (-3.102) підкреслює низьку розчинність у воді, це може бути компенсовано застосуванням певних фармацевтичних формулювань. Велика кількість гетероатомів (nHet 8) і гнучкість (1.000) також можуть сприяти взаємодії з біомолекулами вірусу. Загалом, за умови оптимізації деяких параметрів та аналізу інших параметрів, речовина 10S-21 може стати об'єктом глибших досліджень у фармацевтичній противірусній терапії.

Physicochemical Property		
Molecular Weight (MW)	323.060	ⓘ
Volume	283.022	ⓘ
Density	1.141	ⓘ
nHA	3	ⓘ
nHD	1	ⓘ
nRot	8	ⓘ
nRing	1	ⓘ
MaxRing	6	ⓘ
nHet	8	ⓘ
fChar	0	ⓘ
nRig	8	ⓘ
Flexibility	1.000	ⓘ
Stereo Centers	2	ⓘ
TPSA	38.330	ⓘ
logS	-3.102	ⓘ
logP	2.762	ⓘ
logD	2.847	ⓘ

Рис. 3.13. Фізико-хімічні властивості сполуки 10S-20

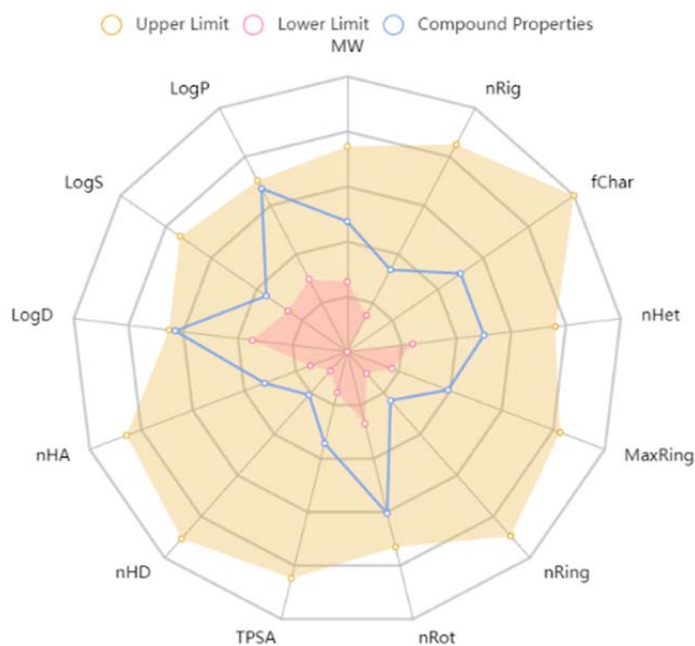


Рис. 3.14. Павукова діаграма фізико-хімічних властивостей сполуки 10S-21 з верхніми та нижніми межами допустимих значень

Аналізуючи медико-хімічні характеристики речовини 10S-21, представлені на рис. 3.15. для можливого використання проти Вірусу

Епштейна-Барра (ВЕБ), можна виділити кілька ключових аспектів, які можуть впливати на її ефективність та розробку як лікарського засобу. Перш за все, відзначаємо, що речовина відповідає основним правилам Ліпінські, Pfizer, GSK, та Golden Triangle, що підтверджує її потенційну придатність за стандартними параметрами молекулярної ваги, ліпофільності, кількості водневих зв'язків і розчинності. Ці показники є критичними для забезпечення адекватної біодоступності та фармакокінетики.

Однак, низьке значення QED (0.391) вказує на потенційні виклики з оптимізацією фармацевтичних властивостей речовини, зокрема щодо її стабільності і безпеки. Цей показник служить оцінкою "лікарської придатності" молекули на основі квантових властивостей, і його низьке значення може вказувати на недостатність потенціалу для розробки як ліки без додаткової хімічної модифікації.

Значення SAscore (3.534) позитивно свідчить про відносну простоту синтезу речовини, що є перевагою для виробничих процесів. Проте, NPscore (-0.122) може вказувати на відсутність природних аналогів або низьку біологічну активність, що вимагає додаткових досліджень для підтвердження її ефективності проти ВЕБ.

Наявність сповіщень за правилами ALARM NMR і BMS може свідчити про специфічні структурні особливості або потенційні проблеми з ядерно-магнітним резонансом, що важливо розглянути при подальшій оцінці токсичності та взаємодії з біологічними молекулами.

Medicinal Chemistry			
QED	0.391	●	i
SAscore	3.534	●	i
Fsp ³	0.385	●	i
MCE-18	22.000	●	i
NPscore	-0.122		i
Lipinski Rule	Accepted	●	i
Pfizer Rule	Accepted	●	i
GSK Rule	Accepted	●	i
Golden Triangle	Accepted	●	i
PAINS	0 alert(s)		i
ALARM NMR Rule	1 alert(s)	DETAIL	i
BMS Rule	1 alert(s)	DETAIL	i
Chelator Rule	0 alert(s)		i

Рис. 3.15. Результати оцінки сполуки за правилами медичної хімії

Згідно рис. 3.16., речовина 10S-21 володіє низькою пермеабільністю через клітини Caco-2 та MDCK зі значеннями -4.344 та $3e-05$ відповідно, що свідчить про погану проникність речовини через кишковий епітелій та клітинні бар'єри, що може значно обмежувати її оральну біодоступність і ефективність при системному застосуванні.

Однак, високий рівень зв'язування речовини з білками плазми, що становить 81.992%, свідчить про велику частку молекули, яка може бути неактивною та недоступною для взаємодії з вірусом. Об'єм розподілу, що становить 1.239, вказує на обмежений розподіл речовини у тканинах, зосереджуючи її, можливо, у плазмі крові, що може сприяти вищій концентрації в місцях інфекції.

Висока проникність через гематоенцефалічний бар'єр, позначена як +++, робить речовину потенційно важливою для лікування ВЕБ-асоційованих неврологічних розладів, де потрібен доступ до центральної нервової системи. Низька вільна фракція (19.95%) також підкреслює значне зв'язування з

білками, що може вимагати коригування дозування для досягнення оптимальної терапевтичної активності.

Absorption			
Caco-2 Permeability	-4.344	●	ⓘ
MDCK Permeability	3e-05	●	ⓘ
Pgp-inhibitor	---	●	ⓘ
Pgp-substrate	---	●	ⓘ
HIA	---	●	ⓘ
F _{20%}	---	●	ⓘ
F _{30%}	---	●	ⓘ
Distribution			
PPB	81.992%	●	ⓘ
VD	1.239	●	ⓘ
BBB Penetration	+++	●	ⓘ
Fu	19.951%	●	ⓘ

Рис. 3.16. Результати оцінки сполуки за параметрами абсорбції та розподілу

Речовина 10S-21 має значний вплив на систему цитохромів P450, будучи сильним інгібітором CYP2C19 та CYP2C9 і в меншій мірі CYP2D6. Це може призводити до зниження метаболічного кліренсу інших лікарських засобів, що метаболізуються цими ферментами, і як наслідок — до підвищення ризику їхньої токсичності. Важливим є те, що речовина також є субстратом для CYP2C9 і CYP2D6, що свідчить про її залежність від цих ферментів для власного метаболізму, що може впливати на її стабільність і ефективність.

Екскреційні параметри речовини 10S-21, що вказані на рисунку 3.17. також важливі для її клінічного застосування. З високим кліренсом, який становить 5.804 мл/мін, і коротким періодом напіввиведення, лише 0.454 години, речовина швидко виводиться з організму. Це може вимагати частішого дозування або розробки формул з контрольованим вивільненням для забезпечення стабільного терапевтичного ефекту. Швидке виведення

може бути перевагою в ситуаціях, де потрібно швидко знизити рівень речовини у випадку побічних ефектів, але також може ускладнити підтримку необхідної концентрації лікарського засобу в організмі для ефективного лікування.

Metabolism			
CYP1A2 inhibitor	+		
CYP1A2 substrate	--		
CYP2C19 inhibitor	+++		
CYP2C19 substrate	+		
CYP2C9 inhibitor	+++		
CYP2C9 substrate	+++		
CYP2D6 inhibitor	---		
CYP2D6 substrate	+		
CYP3A4 inhibitor	+		
CYP3A4 substrate	-		
Excretion			
CL	5.804		
T _{1/2}	0.454		

Рис. 3.17. Результати оцінки сполуки за параметрами метаболізму та виведення

Розглядаючи токсикологічний профіль речовини 10S-21 на рисунку 3.18., який є критичним для оцінки її безпеки та потенційного використання у лікуванні інфекцій, спричинених Вірусом Епштейна-Барра (EBV), ми бачимо декілька значних проблем, що можуть обмежувати її застосування. По-перше, висока ймовірність кардіотоксичності, вказана через її властивості блокувати калієві канали hERG, може призвести до серйозних порушень серцевого ритму. Додатково, значний ризик гепатотоксичності та можливість індукувати лікарсько-індуковану печінкову інсуфіцієнцію (DILI) роблять її використання ризикованим без додаткового моніторингу та ретельного управління.

Речовина також показує помірний рівень респіраторної токсичності, що може вплинути на дихальні шляхи пацієнтів під час лікування. Щодо її впливу на довкілля, високий рівень екологічної токсичності та здатність біоконцентруватися у живих організмах вимагають особливої уваги при масштабному виробництві та застосуванні. Хоча речовина не показала мутагенності в AMES тесті, що є позитивним аспектом, низький рівень канцерогенності також має одне попередження, що вказує на потенційний ризик у цій сфері.

Toxicity		
hERG Blockers	---	● ⓘ
H-HT	+++	● ⓘ
DILI	+++	● ⓘ
AMES Toxicity	---	● ⓘ
Rat Oral Acute Toxicity	--	● ⓘ
FDAMDD	++	● ⓘ
Skin Sensitization	--	● ⓘ
Carcinogenicity	+	● ⓘ
Eye Corrosion	---	● ⓘ
Eye Irritation	---	● ⓘ
Respiratory Toxicity	++	● ⓘ
Environmental Toxicity		
Bioconcentration Factors	0.972	ⓘ
IGC ₅₀	4.329	ⓘ
LC ₅₀ FM	5.224	ⓘ
LC ₅₀ DM	5.536	ⓘ
Tox21 Pathway		
NR-AR	-	● ⓘ
NR-AR-LBD	---	● ⓘ
NR-AhR	---	● ⓘ
NR-Aromatase	--	● ⓘ
NR-ER	---	● ⓘ
NR-ER-LBD	---	● ⓘ
NR-PPAR-gamma	---	● ⓘ
SR-ARE	---	● ⓘ
SR-ATAD5	---	● ⓘ
SR-HSE	++	● ⓘ
SR-MMP	--	● ⓘ
SR-p53	---	● ⓘ
Toxicophore Rules		
Acute Toxicity Rule	0 alert(s)	ⓘ
Genotoxic Carcinogenicity Rule	1 alert(s)	DETAIL ⓘ
NonGenotoxic Carcinogenicity Rule	1 alert(s)	DETAIL ⓘ
Skin Sensitization Rule	0 alert(s)	ⓘ
Aquatic Toxicity Rule	1 alert(s)	DETAIL ⓘ
NonBiodegradable Rule	1 alert(s)	DETAIL ⓘ
SureChEMBL Rule	1 alert(s)	DETAIL ⓘ
FAF-Drugs4 Rule	2 alert(s)	DETAIL ⓘ

Рис. 3.18. Результати оцінки сполуки за параметрами токсичності

Отже, хоча речовина 10S-21 може виявитися обнадійливим кандидатом для розробки лікарських препаратів проти ВЕБ завдяки своїй потенційній

терапевтичній активності, її високий профіль токсичності, потенційні ризики для здоров'я та навколишнього середовища роблять важливим проведення подальших досліджень та розробку стратегій для зниження цих ризиків перед її клінічним використанням. Врахування всіх цих факторів є ключовим для забезпечення безпеки та ефективності будь-якої майбутньої терапії на базі 10S-21.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

В даній роботі було детально досліджено цитотоксичні та апоптоз-індукувальні властивості сполук 10S-20 та 10S-21 на клітинній культурі B95-8, що містить інтегрований геном вірусу Епштейна-Барр. Сполуки 10S-20 та 10S-21 були оцінені на їх здатність викликати цитотоксичність у клітинній лінії B95-8, що виробляє повноцінні вірусні частки. Цитотоксичність вимірювалась за допомогою двох методів: фарбування трипановим синім та МТТ-тестом, які дозволяли визначити відсоток мертвих клітин та мітохондріальну активність відповідно.

Сполука 10S-20 показала меншу цитотоксичність порівняно з 10S-21, з CC_{50} значеннями 124,77 мкг/мл (метод трипанового синього) і 53,09 мкг/мл (МТТ-метод), що вказує на відносно високу потрібну концентрацію для зниження життєздатності клітин на 50%. Сполука 10S-21 демонструвала вищу цитотоксичність із CC_{50} 22,13 мкг/мл (метод трипанового синього) і 8,24 мкг/мл (МТТ-метод), показуючи більш сильний ефект при нижчих концентраціях.

Обидві сполуки знижували мітохондріальну активність, що може свідчити про їхній потенціал як антитуморних агентів. Сполука 10S-21 була визначена як особливо сильний інгібітор мітохондріальної функції, що зменшувала життєздатність клітин B95-8 майже на 80% при концентрації 100 мкг/мл.

Аналіз апоптозу виявив здатність сполуки 10S-21 значно стимулювати клітинну смерть, що було показано зростанням апоптотичних клітин, особливо при вищих концентраціях. Сполука 10S-20 також показувала дозозалежний вплив на індукцію апоптозу, але її ефективність була менша, ніж у 10S-21.

Сполуки продемонстрували широкий спектр взаємодій з різними біологічними мішенями, включаючи ензими, регуляторні і проапоптичні білки, що надає їм потенційні протипухлинні та антивірусні властивості.

Сполука 10S-20 особливо перспективна завдяки високій ліпофільності, що сприяє ефективному проникненню через ліпідні мембрани клітин, інфікованих ВЕБ.

Водночас, фармакокінетичні параметри обох сполук вказують на необхідність подальшої оптимізації їх фармацевтичних властивостей. Це зокрема стосується покращення біодоступності та зниження потенційної токсичності, оскільки обидві сполуки виявили високі показники кардіотоксичності, гепатотоксичності та потенційної канцерогенності, особливо сполука 10S-21. Подальші дослідження мають включати хімічні модифікації, розробку нових фармацевтичних формулювань та детальне вивчення взаємодій сполук з біомолекулами.

Загалом, ці сполуки мають обнадійливий потенціал як антивірусні агенти проти ВЕБ, проте потребують значної доробки для мінімізації ризиків і покращення клінічних характеристик перед можливим введенням в клінічну практику.

ВИСНОВКИ

1. Сполука 10S-21 виявляє високу цитотоксичність на клітинах B95-8. За результатами фарбування трипановим синім та МТТ-тесту, середня цитотоксична концентрація (CC_{50}) для сполуки 10S-21 становить 22,13 мкг/мл та 8,24 мкг/мл відповідно. Це свідчить про більшу токсичність порівняно зі сполукою 10S-20, яка має CC_{50} 124,77 мкг/мл та 53,09 мкг/мл відповідно. При цьому обидві сполуки демонструють високу ефективність в інгібуванні клітинної життєздатності.

2. Аналіз апоптозу виявив здатність сполуки 10S-21 значно стимулювати клітинну смерть, особливо при вищих концентраціях. Сполука 10S-20 також показувала дозозалежний вплив на індукцію апоптозу, але її ефективність була меншою, ніж у 10S-21.

3. Використання програми PASS підтвердило потенціал сполук 10S-20 та 10S-21 як індукторів апоптозу та антивірусних агентів. Це дозволяє прогнозувати їхню ефективність у терапії вірусу Епштейна-Барр.

4. Оцінка фармакокінетичних параметрів за допомогою ADMETlab 2.0 показала, що сполука 10S-21 має високу біодоступність і низький ризик токсичності, що робить її перспективною для подальшої розробки як терапевтичного агента. Сполука 10S-21 продемонструвала кращий фармакокінетичний профіль порівняно зі сполукою 10S-20.

5. Референсний препарат ганцикловір показав нижчу ефективність порівняно зі сполуками 10S-20 та 10S-21. Зокрема, сполука 10S-21 має кращі показники цитотоксичності та апоптозстимулюючих властивостей, що свідчить про її потенційну вищу терапевтичну ефективність.

6. За допомогою онлайн-серверів IdTarget і PharmMapper було ідентифіковано потенційні молекулярні мішені для сполук 10S-20 та 10S-21. Це включає взаємодію з вірусними білками, що є ключовими для реплікації вірусу Епштейна-Барр.

7. Висока цитотоксичність та апоптозстимулюючі властивості

сполук 10S-20 та 10S-21 роблять їх перспективними для використання в терапії онкологічних захворювань, пов'язаних з вірусом Епштейна-Барр.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. A WHO Meeting. Prevention and control of herpesvirus diseases. Part 1. Clinical and laboratory diagnosis and chemotherapy. A WHO meeting. Bull World Health Organ. 1985;63(2):185-201 contd. PMID: 2990748; PMCID: PMC2536392
2. Whitley RJ. Herpesviruses. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 68. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8157/>
3. Kuri, A., Jacobs, B. M., Vickaryous, N., Pakpoor, J., Middeldorp, J., Giovannoni, G., & Dobson, R. (2020). Epidemiology of Epstein-Barr virus infection and infectious mononucleosis in the United Kingdom. BMC Public Health, 20(1). doi:10.1186/s12889-020-09049-x
4. Bauer M, Jasinski-Bergner S, Mandelboim O, Wickenhauser C, Seliger B. Epstein–Barr Virus—Associated Malignancies and Immune Escape: The Role of the Tumor Microenvironment and Tumor Cell Evasion Strategies. Cancers. 2021; 13(20):5189. <https://doi.org/10.3390/cancers13205189>
5. Wang, X., Xiang, Z., Liu, Y., Huang, C., Pei, Y., Wang, X., ... Tu, W. (2020). Exosomes derived from V δ 2-T cells control Epstein-Barr virus-associated tumors and induce T cell antitumor immunity. Science Translational Medicine, 12(563), eaaz3426. doi:10.1126/scitranslmed.aaz3426
6. Lieberman, P. M. (2014). Epstein-Barr Virus Turns 50. Science, 343(6177), 1323–1325. doi:10.1126/science.1252786
7. Damania B, Kenney SC, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus: Biology and clinical disease. Cell. 2022 Sep 29;185(20):3652-3670. doi: 10.1016/j.cell.2022.08.026. Epub 2022 Sep 15. PMID: 36113467; PMCID: PMC9529843
8. Houen, G., & Trier, N. H. (2021). Epstein-Barr Virus and Systemic Autoimmune Diseases. Frontiers in Immunology, 11, 587380.

doi:10.3389/fimmu.2020.587380

9. Palser, A. L., Grayson, N. E., White, R. E., Corton, C., Correia, S., Ba
abdullah Mohammed M., ... Kellam, P. (2015). Genome Diversity of Epstein-Barr
Virus from Multiple Tumor Types and Normal Infection. *Journal of Virology*,
89(10), 5222–5237. doi:10.1128/JVI.03614-14
10. Peh, S.-C., Kim, L.-H., & Poppema, S. (2002). Frequent presence of
subtype A virus in Epstein–Barr virus-associated malignancies. *Pathology*, 34(5),
446–450. doi:10.1080/0031302021000009379
11. Sausen DG, Bhutta MS, Gallo ES, Dahari H, Borenstein R. Stress-
Induced Epstein-Barr Virus Reactivation. *Biomolecules*. 2021; 11(9):1380.
<https://doi.org/10.3390/biom11091380>
12. Tao, Q. (2006). Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human
cancers - Genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics. *Frontiers in
Bioscience*, 11(1), 2672. doi:10.2741/2000
13. Smatti, M. K., 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.
Frontiers in Oncology, 8. doi:10.3389/fonc.2018.00211
14. Blanco, R., Carrillo-Beltrán, D., Osorio, J. C., Calaf, G. M., &
Aguayo, F. (2020). Role of Epstein-Barr Virus and Human Papillomavirus
Coinfection in Cervical Cancer: Epidemiology, Mechanisms and Perspectives.
Pathogens, 9(9), 685. doi:10.3390/pathogens9090685
15. Debuyschere C, Nekoua MP, Hober D. Markers of Epstein-Barr
Virus Infection in Patients with Multiple Sclerosis. *Microorganisms*. 2023;
11(5):1262. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051262>
16. Kang, M.-S., & Kieff, E. (2015). Epstein–Barr virus latent genes.
Experimental & Molecular Medicine, 47(1), e131–e131.
doi:10.1038/emm.2014.84
17. Blazquez AC, Berenstein AJ, Torres C, Izquierdo A, Lezama C,
Moscatelli G, De Matteo EN, Lorenzetti MA, Preciado MV. Comprehensive

Evolutionary Analysis of Complete Epstein–Barr Virus Genomes from Argentina and Other Geographies. *Viruses*. 2021; 13(6):1172. <https://doi.org/10.3390/v13061172>

18. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Biological Agents*. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2012. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 100B.) EPSTEIN-BARR VIRUS. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304353/>

19. Huang W, Bai L, Tang H. Epstein-Barr virus infection: the micro and macro worlds. *Virol J*. 2023 Oct 2;20(1):220. doi: 10.1186/s12985-023-02187-9. PMID: 37784180; PMCID: PMC10546641

20. Germini, D., Sall, F. B., Shmakova, A., Wiels, J., Dokudovskaya, S., Drouet, E., & Vassetzky, Y. (2020). Oncogenic Properties of the EBV ZEBRA Protein. *Cancers*, 12(6), 1479. doi:10.3390/cancers12061479

21. Yu H, Robertson ES. Epstein–Barr Virus History and Pathogenesis. *Viruses*. 2023; 15(3):714. <https://doi.org/10.3390/v15030714>

22. Покровська, Т. (2015). ХРОНІЧНА ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСНА ІНФЕКЦІЯ – АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ. *Infectious Diseases – Infektsiyni Khvoroby*, (3). <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2014.3.4049>

23. Gershburg, E., & Pagano, J. S. (2005). Epstein–Barr virus infections: prospects for treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(2), 277–281. doi:10.1093/jac/dki240

24. Andrei, G., Trompet, E., & Snoeck, R. (2019). Novel Therapeutics for Epstein–Barr Virus. *Molecules*, 24(5), 997. doi:10.3390/molecules24050997

25. Höcker, B., Böhm, S., Fickenscher, H., Küsters, U., Schnitzler, P., Pohl, M., ... Tönshoff, B. (2012). (Val-)Ganciclovir prophylaxis reduces Epstein-Barr virus primary infection in pediatric renal transplantation. *Transplant International*, 25(7), 723–731. doi:10.1111/j.1432-2277.2012.01485.x

26. Kerr, J. R. (2019). Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *Journal of Clinical Pathology*, jclinpath–2019–205822.

doi:10.1136/jclinpath-2019-205822

27. Kimura, H., & Cohen, J. I. (2017). Chronic Active Epstein–Barr Virus Disease. *Frontiers in Immunology*, 8. doi:10.3389/fimmu.2017.01867
28. Sakai, Y., Ohga, S., Tonegawa, Y., Takada, H., Nakao, F., Nakayama, H., ... Hara, T. (1998). Interferon- α Therapy for Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 20(4), 342–346. doi:10.1097/00043426-199807000-00013
29. Cohen, J. I. (2009). Optimal treatment for chronic active Epstein-Barr virus disease. *Pediatric Transplantation*, 13(4), 393–396. doi:10.1111/j.1399-3046.2008.01095.x
30. Inoue, M., Sumii, Y., & Shibata, N. (2020). Contribution of Organofluorine Compounds to Pharmaceuticals. *ACS Omega*. doi:10.1021/acsomega.0c00830
31. Shabir G, Saeed A, Zahid W, Naseer F, Riaz Z, Khalil N, Muneeba, Albericio F. Chemistry and Pharmacology of Fluorinated Drugs Approved by the FDA (2016–2022). *Pharmaceuticals*. 2023; 16(8):1162. <https://doi.org/10.3390/ph16081162>
32. Zhang N, Zuo Y, Jiang L, Peng Y, Huang X, Zuo L. Epstein-Barr Virus and Neurological Diseases. *Front Mol Biosci*. 2022 Jan 10;8:816098. doi: 10.3389/fmolb.2021.816098. PMID: 35083281; PMCID: PMC8784775
33. Wu, C.-C., Fang, C.-Y., Cheng, Y.-J., Hsu, H.-Y., Chou, S.-P., Huang, S.-Y., ... Chen, J.-Y. (2017). Inhibition of Epstein-Barr virus reactivation by the flavonoid apigenin. *Journal of Biomedical Science*, 24(1). doi:10.1186/s12929-016-0313-9
34. Xu, W., Jiang, X., Chen, J. et al. Chronic active Epstein-Barr virus infection involving gastrointestinal tract mimicking inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol* 20, 257 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01395-9>
35. Mondal, D. (2007). Trifluridine. In *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1-3). doi:10.1016/B978-008055232-3.62800-4
36. Sako, K., Kenzaka, T. & Kumabe, A. Epstein–Barr virus-associated

infectious mononucleosis with acute epididymitis: a case report. *BMC Infect Dis* 22, 147 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07116-9>

37. Wilson JB, Manet E, Gruffat H, Busson P, Blondel M, Fahraeus R. EBNA1: Oncogenic Activity, Immune Evasion and Biochemical Functions Provide Targets for Novel Therapeutic Strategies against Epstein-Barr Virus-Associated Cancers. *Cancers*. 2018; 10(4):109. <https://doi.org/10.3390/cancers10040109>

38. Hatem, A., Bozdağ, D., Toland, A. E., & Çatalyürek, Ü. V. (2013). Benchmarking short sequence mapping tools. *BMC Bioinformatics*, 14(1), 184. doi:10.1186/1471-2105-14-184

39. Jha H. C., Yang K., El-Naccache D. W., Sun Z., Robertson E. S. EBNA3C regulates p53 through induction of Aurora kinase B. *Oncotarget*. 2015; 6: 5788-5803. Retrieved from <https://www.oncotarget.com/article/3310/text/>

40. Yang, Y., Hu, M., Yu, K., Zeng, X., & Liu, X. (2015). Mass spectrometry-based proteomic approaches to study pathogenic bacteria-host interactions. *Protein & Cell*, 6(4), 265–274. doi:10.1007/s13238-015-0136-6

41. Costa-Silva, J., Domingues, D., & Lopes, F. M. (2017). RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLOS ONE*, 12(12), e0190152. doi:10.1371/journal.pone.0190152

42. Arfa Mehmood, Asta Laiho, Mikko S Venäläinen, Aidan J McGlinchey, Ning Wang, Laura L Elo, Systematic evaluation of differential splicing tools for RNA-seq studies, *Briefings in Bioinformatics*, Volume 21, Issue 6, November 2020, Pages 2052–2065, <https://doi.org/10.1093/bib/bbz126>

43. Rüeger, S., Hammer, C., Loetscher, A. et al. The influence of human genetic variation on Epstein–Barr virus sequence diversity. *Sci Rep* 11, 4586 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84070-7>

44. Broni E, Striegel A, Ashley C, Sakyi PO, Peracha S, Velazquez M, Bebla K, Sodhi M, Kwofie SK, Ademokunwa A, et al. Molecular Docking and Dynamics Simulation Studies Predict Potential Anti-ADAR2 Inhibitors: Implications for the Treatment of Cancer, Neurological, Immunological and

Infectious Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(7):6795. <https://doi.org/10.3390/ijms24076795>

45. Keutzer L, You H, Farnoud A, Nyberg J, Wicha SG, Maher-Edwards G, Vlasakakis G, Moghaddam GK, Svensson EM, Menden MP, et al. Machine Learning and Pharmacometrics for Prediction of Pharmacokinetic Data: Differences, Similarities and Challenges Illustrated with Rifampicin. *Pharmaceutics*. 2022; 14(8):1530. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081530>

46. Hodgson, J. (2001). ADMET—turning chemicals into drugs. *Nature Biotechnology*, 19(8), 722–726. doi:10.1038/90761