

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та
медицини» Кафедра вірусології

Завідувач кафедри д. б. н.,

проф. Ірина Будзанівська

Протокол № _____ засідання кафедри

від “ _____ ” _____ 2024 р.

**Дослідження антивірусної та токсичної дії наночастинок срібла з
різними полісахаридними носіями**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091, Біологія
Зайченка Олега В'ячеславовича
Науковий керівник від кафедри
д. б. н., проф. Ірина Будзанівська

Робота виконана у відділі репродукції вірусів Інституту
мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
під керівництвом наукового співробітника, к.б.н. Затовської
Т.В.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

АНОТАЦІЯ

Проведений порівняльний аналіз цитотоксичності наночастинок срібла в полісахаридних носіях, покриті природною смолою та в ксантановій матриці з застосування метаболічних тестів (МТТ та тест нейтральний червоний). Встановлено, що наносрібло виявляє меншу токсичність у В-лімфоцитах людини, а у В-лімфоцитах мавпи тамарину цитотоксичність вища. Особливо токсична дія відмічена на мітохондрії в клітинах В95-8. При індукції продукування вірусу Епштейна-Барр знизилася токсичність наносрібла на мітохондрії. . Відповідно до визначених показників CC_{50} , встановлена вища чутливість для клітин онкологічного профілю (В95-8, Р3HR1, Нер-2) на відміну від клітин MDCK (не трансформовані клітин), що свідчить про вищу тропність саме до клітин онкологічного профілю, тому можна припустити про можливий протипухлинний потенціал наночастинок срібла покритих природнім полісахаридом. Тропність наночастинок срібла до пухлинних клітин продемонстрували і зразок в ксантановій матриці. Показано здатність наночастинок срібла в полісахаридній оболонці природнього походження інгібувати реплікацію вірусу Епштейна-Барр, а при тривалому контакті проявляти віростатичний ефект. Визначені показники токсичності НЧ срібла у полісахаридній оболонці *in vivo*. LD_{50} становить 111.4 mg/kg при внутрішньочеревному введенні, а при пероральному введенні при наносрібла препарат не був токсичним.

Отже, оригінальної наночастки срібла демонструють протівірусну, протипухлинну дію. Встановлена залежність від структури та природи оболонки наночастинки, зразок, котрий покритий полісахаридною оболонкою з природніх смол проявив низьку токсичність в культурах нормальних первинних клітин та при пероральному введенні *in vivo*. Випускна робота викладена на 61 сторінках, ілюстрована 12 таблицями та 13 мікрофотографіями. Список використаних джерел включає – 55 робіт.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- EBV (ВЕБ) – вірус Епштейна-Барр;
- NF-κB – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (ядерний фактор каппа активованих В-клітин);
- IR – internal repeat (внутрішній повтор в геномі);
- UR – unique region (унікальна ділянка геному);
- EBNA – Epstein-Barr nuclear antigen (ядерний антиген ВЕБ);
- LMP – latent membrane protein (латентний мембранний білок ВЕБ);
- BCL-2 – B-cell lymphoma 2 anti-apoptotic protein (антиапоптичний білок В-клітинної лімфоми 2);
- Rta – transcriptional activator R (транскрипційний активатор з гену BRLF1);
- Zta – transcriptional activator Z (транскрипційний активатор з гену BZLF1);
- ПК – протеїнкіназа;
- ТК – тимідинкіназа;
- NPs Ag – наночастинки срібла

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1	9
ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ ЕПШТЕЙНА-БАРР ТА НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ ЯК ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ	9
1.1. Вірус Епштейна-Барр таксономія та поширення	9
1.2. Механізми впливу вірусу на клітини.....	12
1.3. Клінічні прояви ВЕБ-інфекції та підходи до їх лікування	15
1.4. Актуальність використання наночастинок металів	17
РОЗДІЛ 2	23
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	23
2.1. Матеріали, використані у роботі.....	23
2.1.1. Вірус.....	23
2.1.2. Досліджуваний зразок.....	23
2.1.3. Культури клітин.....	23
2.1.4. Тест-системи, які використані для досліджень	24
2.2. Методи.....	25
2.2.1. Культивування ліній клітин.....	25
2.2.2. Визначення цитотоксичної дії речовини колориметричним методом з використанням МТТ	26
2.2.3. Визначення цитотоксичності речовин методом з використанням барвника нейтрального червоного.....	27
2.2.4. Полімеразна ланцюгова реакція.....	28
2.2.5. Трансмисійна електронна мікроскопія (ТЕМ).....	29
2.2.6. DPPH-тест.....	30
2.2.7. Дослідження <i>in vivo</i>	30
2.2.8. Гематологічний та біохімічний аналіз сироваток крові тварин .	31
2.2.9. Статистична обробка результатів	32
РОЗДІЛ 3	
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ	33
3.1. Дослідження цитотоксичної та антирадикальної наночастинок срібла	

в лімфобластоїдних ВЕБ-асоційованих клітинах	33
3.2. Антивірусна дія наночастинок срібла відносно вірусу Епштейна-Барр 43	
3.3 Визначення гострої токсичності наносрібла покритих природною .	46
3.3.2 Визначення гострої токсичності при пероральному введенні	48
ВИСНОВКИ	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	54

ВСТУП

Віруси здатні до трансформації клітин, незважаючи на великі успіхи науки у вивченні молекулярно-генетичних основ цих процесів, залишаються малоконтрольованими патогенами людини та тварин. Первинне ВВЕ-інфікування в більшості випадків відбувається в ранньому віці і клінічно протікає часто безсимптомно або у формі ГРВІ, в подальшому вірус інтегрується у відповідні клітини, де відбувається транскрипція обмеженої кількості генів та трансляція білків, які відповідальні за моделювання клітинної та гуморальної імунної відповіді, дозволяє їм вислизати від імунної відповіді. Мирне співіснування вірусу та організму порушується під час дії різних несприятливих факторів довкілля, застосування антибіотиків, інших хімічних сполук, що призводить до дисбалансу макроорганізму. Це може призводити до активації вірусної репродукції, формування інфекційних частинок та прояву клінічних симптомів. У разі виникнення тригерів онкологічних процесів у присутності пресистентної вірусної інфекції, включаються механізми вірусопосередованої трансформації клітин. Науково обґрунтовано та доведено зв'язок розвитку раку з вірусом Епштейна-Барр (лімфома Беркетта, назофаренгіальна карцинома та інші). За минулий час було визначено багато механізмів взаємодії вірусу з клітиною, зокрема це один з небагатьох трансформаційних вірусних агентів, який персидує у В-лімфоцитах, клітинах відповідальних за імунну відповідь. На сьогоднішній день розроблено різні підходи до терапії ВЕБ-асоційованих захворювань, серед них тільки ганцикловір відноситься до переліку етіологічної терапії цього захворювання, але його застосування обмежене високою токсичністю та ефективністю тільки при повному циклі репродукції вірусу, але він не дозволяє елімінування вірусу в трансформованих клітинах, оскільки там в обмеженій кількості відбувається повний цикл реплікації, а його дії на ділянки вірусу, що

транскрибуються, відсутні. Нові технології, зокрема нанотехнології, дозволяють сподіватися на виявлення нових потенційних засобів боротьби з вірусом асоційованими патологіями з унікальними механізмами дії. Так як наночастки це новий рівень взаємодії з клітиною макроорганізму на атомному рівні. Срібло, що зарекомендувало себе з давніх часів, як елемент, що володіє антибактеріальними, противірусними, антифунгальними і протизапальними властивостями. Як стало відомо останніми роками властивості цієї наночастки змінюються залежно від розміру, форми, концентрації в розчині, стабілізуючих факторів, оскільки площавзаємодії, гомогенність розчину та відсутність негативних фізичних взаємодій частинок між собою дозволяють виявляти їх нові біологічні властивості. У ряді наукових публікацій для стабілізації атомів срібла застосовують оболонки з різних матеріалів, у більшості випадків полісахаридів, крім наявності оболонки, підвищує біодоступність наночастинок в макроорганізмі. Метою роботи було дослідження цитотоксичності та антивірусної активності оригінальної наночастки срібла розміром 10 нм, покритої пористою полісахаридною мембраною.

Мета роботи було визначення антивірусної та токсичної дії наночастинок срібла *in vitro* та *in vivo*.

Завдання даної роботи:

1. Встановити показники цитотоксичності наночастинок срібла в різних матрицях на життєздатність в трансформованих та нормальних культур клітин.
2. Визначити вплив наночастинок срібла на проліферативну активність популяції культур клітин MDCK та B95-8 за умов стимулювання вірусу натрій бутиратом.
3. Дослідити антивірусну дію наночастинок срібла відносно вірусу Епштейна-Барр.
4. Визначити гостру токсичність наночастинок срібла *in vivo*.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ ЕПШТЕЙНА-БАРР ТА НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ ЯК ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ

1.1. Вірус Епштейна-Барр таксономія та поширення

Вірус Епштейна-Барра (EBV), як гаммагерпесвірус, є широко поширеним онкогенним вірусом, який вперше був ідентифікований у біопсії пацієнта з лімфомою Беркїтта. Будучи лімфотропним вірусом герпесу людини, це також перший вірус, ідентифікований Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ), який викликає рак. Епідеміологічні дослідження показали, що інфікованість населення EBV перевищує 95% [1]. EBV в основному поширюється через слину. Вплив біологічних рідин, грудного молока та трансплантація EBV-позитивних органів сприяє поширенню вірусу [2].. Деякі захворювання, асоційовані з EBV, такі як лімфоми Беркїтта та назофарингеальна карцинома, є ендемічними та демонструють упереджене географічне поширення по всьому світу [1] (рис.1.1.). Вірус Епштейна-Барр був названий в честь англійського вірусолога, професора Майкла Ентоні Епштейн та його аспірантом Івонной Барр, які його описали в 1964 році. У 1979 році наукову назву змінили на Human herpesvirus 4 [2,3].

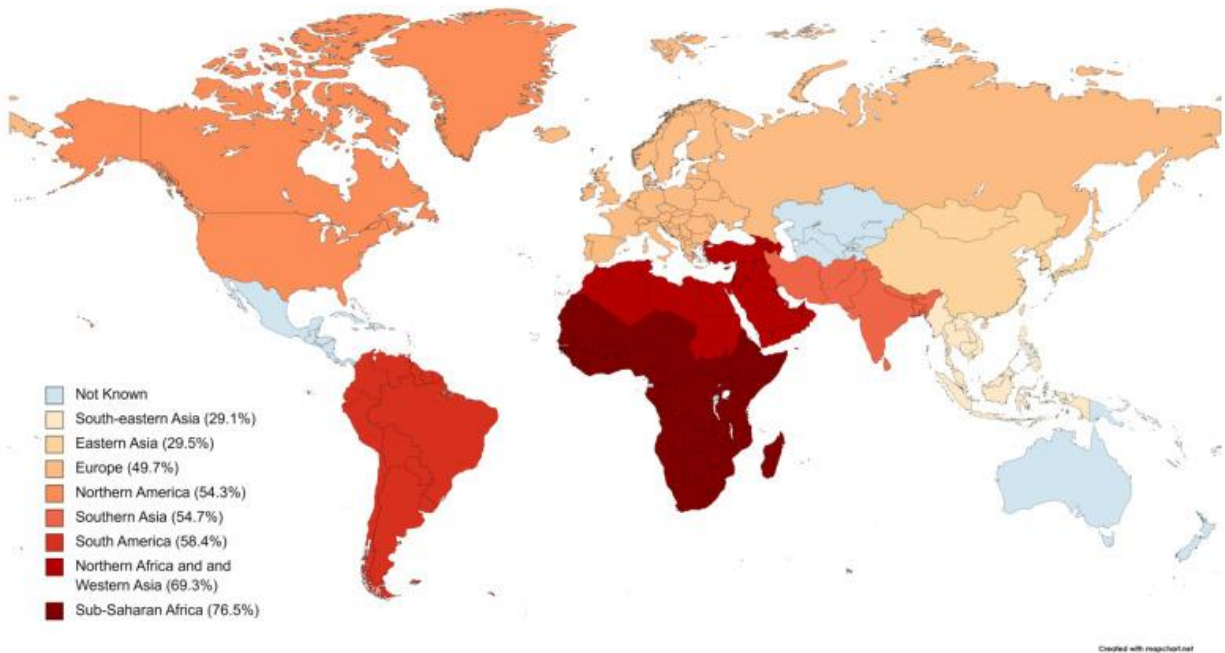


Рис. 1.1. Розповсюдженість Епштейна-Барр в світі
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10296943/>)

Таксономічне положення ВЕБ

Царство *Virus*

Порядок *Herpesvirales*

Родина *Herpesviridae*

Підродина *Gammapherpesvirinae*

Рід *Lymphocryptovirus*

Вид *Human gammaherpesvirus 4*

Геном дволанцюгової вірусної ДНК міститься в ікосаедричному нуклеокапсидію ДНК довжиною 172 тис. пар основ, він здатний як і інші віруси цієї групи, довічно персистувати в організмі людини. Віріон HHV-4 побудований таким чином, що ікосаедричний капсид білкової природи оточує вірусну нуклеїнову кислоту, утворюючи разом з нею структуру, що отримала назву нуклеокапсида [4]. ДНК вірусу оточує капсид що має 25 граней та складається з 162 капсомерів. Зовні вірусна частинка покрита суперкапсидом що складається з поліамінів, ліпідів та глікопротеїнів. Вірус EBV має розмір 100–200 нм.. Компонент між

оболонкою та нуклеокапсидом називається тегументом (рис.1.2.)[5].

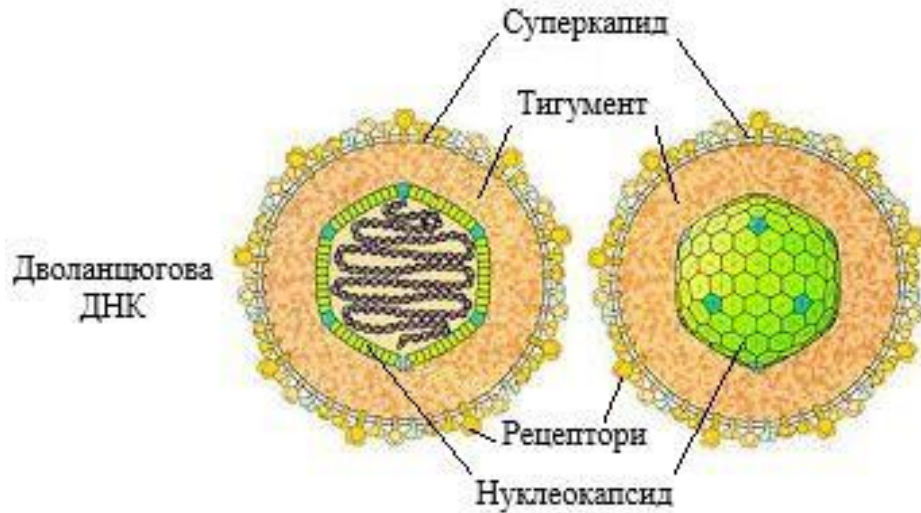


Рис. 1.2. Структура вірусу Епштейна-Барр.
(<https://olgrad.kiev.ua/infekcijnij-mononukleoz-u-doroslix-shho-ce-take-prichini-simptomi-i-likuvannya-foto-patologi%D1%97/>)

В інфікованих вірусом клітинах можливо два види розмноження: літичний (з послідуєчим лізисом клітини-хазяїна) і латентний (коли кількість вірусних копій невелика і клітина не гине). Реактивація вірусу з латентного стану може відбутися в будь-який час під дією активуючих факторів - найчастіше це імунодефіцитний стан людини, спричинений імуносупресивною терапією, супутніми інфекціями (зокрема ВІЛ), дією несприятливих екологічних та антропогенних факторів, гормональними змінами в організмі (під час вагітності, після стресу, впливу ультрафіолетового опромінення) [6]. EBV інфікує В- лімфоцити, що призводить до їх безсмертності, при цьому геном EBV зберігається як епісома. У латентній фазі EBV запобігає повторній активації завдяки ефективному цитотоксичному клітинному імунітету. EBV реактивується (літична фаза) в умовах психологічного стресу з подальшим ослабленням клітинного імунітету, і було показано, що реактивація EBV відбувається у підгрупі осіб із різними видами раку, аутоімунними захворюваннями, аутоімунopodobними захворюваннями, хронічною втомою, синдром/міалгічний енцефаліт та за інших обставин [7].

Оскільки EBV-інфекція диференційованих епітеліальних клітин

призводить до літичного циклу, припускають, що диференційовані епітеліальні клітини (ймовірно, багатошаровий плоский епітелій у ротовій порожнині або глотці) є початковим місцем для EBV-інфекції та розмноження *in vivo*. З іншого боку, EBV-інфекція В-клітин *in vitro* переважно викликає хронічну інфекцію, що свідчить про те, що В-клітини є місцем затримки EBV. Крім того, EBV вибирає латентну інфекцію в багатьох інших типах клітин, таких як встановлені епітеліальні або Т/НК клітинні лінії [8 , 9]. Така схильна до латентності інфекція є відмінною рисою EBV.

1.2. Механізми впливу вірусу на клітини

Вірус Епштейна-Барр після проникнення в молоді епітеліальні клітини переважно викликає літичний вплив на клітини однак при потраплянні в В-клітин вірус інтегрує свою ДНК в клітинну після чого інфекція переходить в латентний стан (рис. 1.3.).

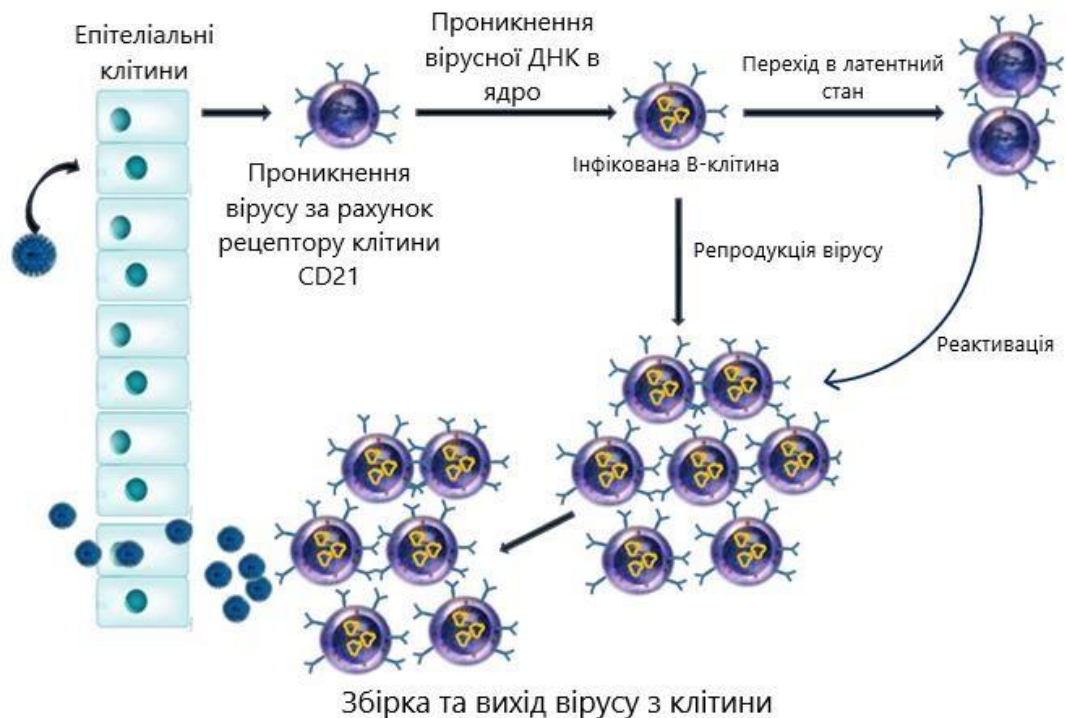


Рис. 1.3. Життєвий цикл вірусу Епштейна-Барр.

(<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00211/full>)

Механізм, який дозволяє вірусу прикріплюватися та проникати в В-клітинита епітеліальні клітини, був добре охарактеризований. Початкове приєднання до В-клітин відбувається через найбільш поширений вірусний глікопротеїн на поверхні віріону, gp350, і його рецептори, або CD21 (рецептор комплементу 2 [CR2]), або CD35 (рецептор комплементу 1 [CR1]) на поверхні клітини). Ця початкова подія приєднання індукує ендоцитоз віріону. Наступним етапом є зв'язування вірусного глікопротеїну gp42 у тримерному комплексі з gH і gL з HLA класу II. Це забезпечує злиття з мембраною ендоцитів за допомогою глікопротеїну gB EBV. Але, ні gp350, ні gp42 не потрібні для інфікування епітеліальних клітин [10]. Початкове прикріплення до епітеліальних клітин відбувається за допомогою димерного комплексу gH і gL, при цьому gH зв'язується з інтегрином $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ або $\alpha\beta 8$ або (як було нещодавно повідомлено) рецептором ефрину A2. Це викликає злиття безпосередньо наплазматичній мембрані з gB, який, як було показано, зв'язує нейропілін-1 [11,12]. Після проникнення вірусного матеріалу в В-клітину відбувається блокування вірусними протиапоптичними генами BALF1 і BHRF1 та гени, які знижують експресію гена антигену лейкоцитів людини (наприклад, BNLF2A, BGLF5, BILF1 і BDLF3) [13]. Відразу після зараження первинних В-клітин експресія шести генів ядерного антигену EBV (EBNA), EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C і LP, досягає піку, і високі рівні зберігаються протягом тривалого періоду (рис. 1.4.).

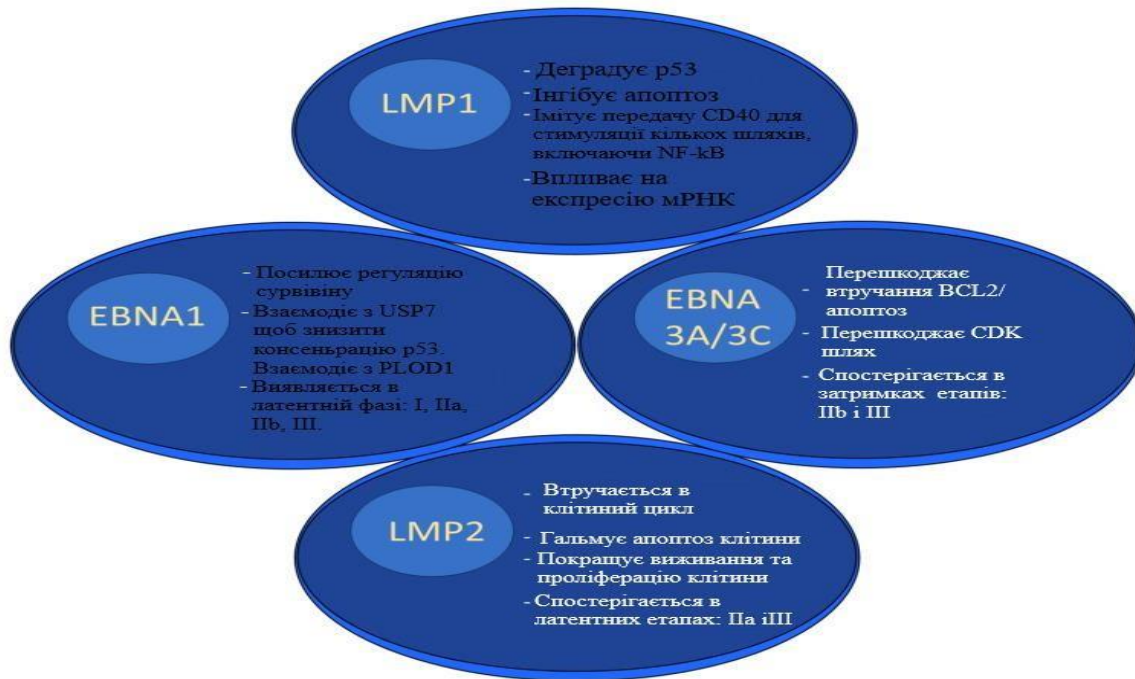


Рис. 1.4. Латентні білки вірусу Епштейна-Барр, які відіграють ключову роль в сприянні онкогенезу.

Хоча EBV утримує приховану інфекцію в клітинах-господарях, він може періодично переходити з латентної фази в літичний цикл, після чого відбувається індукція понад 80 вірусних компонентів, синтез вірусної геномної ДНК і, зрештою, виробництво нащадків віріонів. Після стимуляції активатори вірусної негайної ранньої транскрипції (IE) Rta і Zta спочатку експресуються для посилення ранніх (E) генів, які включають ті, що необхідні для реплікації геному вірусної ДНК. Після ампліфікації вірусної ДНК у фокусах реплікації ядра відбувається транскрипція вірусного пізнього (L) гена; цей процес кодує різноманітні категорії вірусних структурних компонентів, таких як капсидні білки, тегументні білки та глікопротеїни, які є життєво важливими для реплікації ДНК, морфогенезу вірусу або складу віріону. Кілька білків, кодованих EBV, транспортуються в ядро для реплікації вірусної ДНК і складання нуклеокапсидів літичній фазі [14].

1.3. Клінічні прояви ВЕБ-інфекції та підходи до їх лікування

Крім того, що вірус Епштейна-Барр є збудником інфекційного мононуклеозу, він був першим відкритим онкогенним вірусом людини, який був пов'язаний з численними злоякісними новоутвореннями, включаючи різні епітеліальні та мезенхімальні раки та лімфоми. При первинному інфікуванні ВЕБ зазвичай не спостерігають специфічних та значних порушень в організмі людини [15, 16]. Однак, вірус Епштейна-Барр є першим вірусом людини, класифікованим, як онкологічний. ВЕБ асоціюють з розвитком ряду пухлинних, в основному, лімфопроліферативних захворювань (назофарингіальна карцинома, лімфома Беркітта) та аутоімунних захворювань [17]. Зокрема, вірус Епштейна-Барр здатен призводити до іморталізації В-лімфоцитів шляхом порушення сигнальних каскадів апоптозу. Відомо, що рак, асоційований з EBV, впливає як на імунокомпетентних господарів, так і на пацієнтів з ослабленим імунітетом. В усьому світі вважається, що EBV є причиною приблизно 1,5% усіх ракових захворювань людини. Передача EBV в основному відбувається через слину, причому підвищений рівень вірусної ДНК виявляється в виділеннях слини після початкової інфекції [18]. Інші способи передачі включають переливання крові та трансплантацію алотрансплантата. Соціально-економічні фактори впливають на вік, у якому виникає первинна інфекція EBV, як продемонстровано когортним дослідженням, проведеним Gares et al. у Великобританії [19]. В таблиці 1.1 наведені узагальнюючі дані щодо ракових ВЕБ-асоційованих захворювань та підходів до їх лікування.

Таблиця 1.1.

К
лінічні прояви ВЕБ-інфекції та підходи до їх лікування

Ракові захворювання, пов'язані з ВЕБ	Лікування
EBV-асоційований рак шлунка	Хіміотерапія, променева терапія та хірургічна резекція
Карцинома носоглотки	Хірургія, супутня хіміопроменева терапія на основі платини, індукційна хіміотерапія гемцитабіном і цисплатином + торіпалімаб, модульована інтенсивністю (IMRT), терапія частинками
Рак молочної залози	Неоад'ювантна хіміотерапія, лампектомія, вся молочна залоза опромінення, мастектомія
Лімфоепітеліальна карцинома слинних залоз	Хірургія (паратидектомія або видалення підщелепної залози) та індукційна хіміотерапія, супутня терапія, післяопераційна променева терапія.
Лімфоепітеліомоподібна карцинома легені	Хірургія, хіміотерапія на основі цисплатину,
Ниркова клітина	Хіміотерапія, хірургія, циторедуктивна нефректомія
Щитоподібна залоза	Хірургічна резекція, пригнічення ТТГ, радіойодтерапія,
Шийний	Конізація, гістеректомія, променева терапія
Сечовий міхур	Трансуретральна резекція пухлини сечового міхура (ТУРБ), хіміотерапія, індукційна внутрішньоміхурова терапія, індукційна БЦЖ
Лейоміоми/лейоміосаркоми	Терапія EBV-CTL, антиретровірусна терапія, зниження імуносупресивної терапії, хірургія

Вивчення молекулярних механізмів онкогенезу та необхідність лікування патологічних станів, спричинених вірусами, призвів до появи напрямку розробки противірусних препаратів, які були б здатні ефективно інгібувати репродукцію вірусу і впливати на інфіковані клітини, шляхом їх елімінації з організму [20,21].

1.4. Актуальність використання наночастинок металів

Сучасний розвиток нанотехнологій дають можливість застосовувати наноматеріали в нових сферах, отримувати нові властивості в різних сферах промисловості, медицині, біології, інженерії. Наприклад, наночастинки металів, зокрема наносрібло, є альтернативою та перспективними препаратами проти антибіотико-резистентних штамів мікроорганізмів, грибів, вірусів. Однак, біобезпека та токсичний вплив наноматеріалів на організм в аспекті їхньої активності на молекулярному рівні залишаються важливими і не до кінця вивченими явищем. Існують різноманітні типи наночастинок вони розділяються як за розміром так і за походженням (метал, оксид металу, полімер, на основі вуглецю та композити), які можуть бути виготовлені на основі бажаних застосувань (рис. 1.5.) [11. 12].

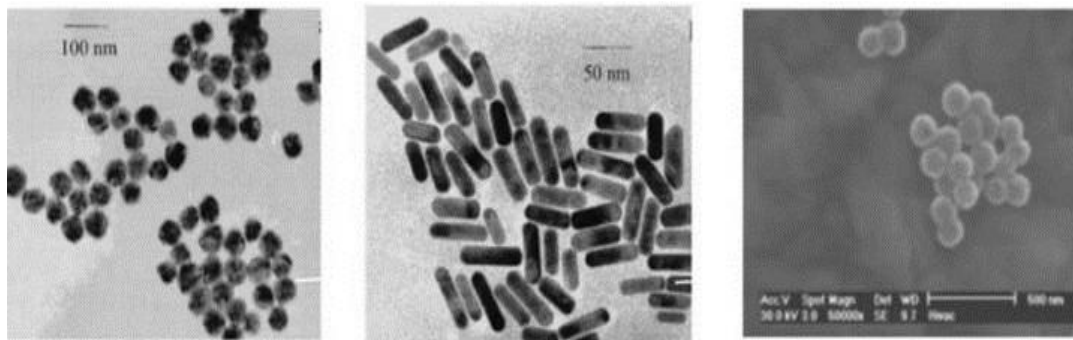


Рис. 1.5. Структура та розміри наночастинок А) плеоморфні; Б) стрижнеподібні; В) сферичні.

(<https://link.springer.com/article/10.1007/s10103-007-0470-x>)

Серед цих наноструктурованих частинок металеві, наночастинки срібла широко використовуються і знаходяться в стадії інтенсивних досліджень для застосування в електроніці, текстилі, сенсорах і наномедицині. Наночастинки срібла мають здатність безперервно

вивільняти іони срібла, які можуть зв'язуватися з клітинною стінкою та цитоплазматичною мембраною за допомогою електростатичного притягання та афінних білків із сіркою, що призводить до пошкодження, пригнічення та перешкоджання інфікування патогеном [22-24]. Вплив наночастинок срібла на клітину ще вивчається, але вже відомі механізми та локалізація впливу наночастинок срібла на організм еукариотів. Потенційна токсичність наночастинок та їх вплив на ріст, розвиток і здоров'я досліджувалися в дослідженнях, проведених на лейкозних клітинних лініях, моделі курячих ембріонів і курчат-бройлерів [25, 26]. Дослідження *in vitro* показали токсичну дію AgNP на клітини кератиноцитів, запускаючи апоптоз, у той час як спостерігався вищий відсоток некротичних моноцитів [27]. Використання наночастинок срібла на рівні <100 ppm, що вводяться в альбумінову або ячну повітряну камеру, не вплинуло негативно на ріст, розвиток і здоров'я птахів. AgNPs не впливали на окислювальну деградацію ДНК у м'язах курячих ембріонів, оброблених *in ovo* наночастинами.

Про потенційні застосування наночастинок (НЧ) золота та срібла в біомедицині все частіше повідомляється через легкість синтезу, характеристики біоінертних матеріалів, оптичні властивості, хімічну стабільність, високу біосумісність та специфічність. Спектр використання таких НЧ у сучасних медичних та біологічних дослідженнях надзвичайно широкий. Зокрема, він включає геноміку, біосенсоріку, імуноаналіз, клінічну хімію, виявлення та фототермоліз мікроорганізмів та ракових клітин; цілеспрямована доставка ліків, ДНК та антигенів; оптична біовізуалізація та моніторинг клітин та тканин за допомогою сучасних систем реєстрації [28-33].

Схема можливих механізмів противірусної дії наночастинок наведено нарис. 1.6.

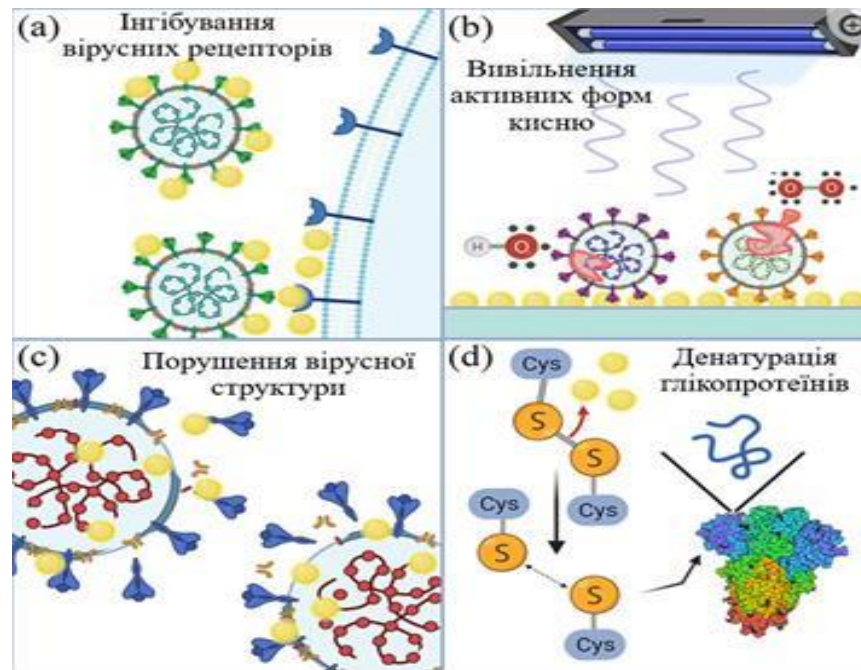


Рис. 1.6. Схема можливих механізмів протівірусної дії наночастинок

(<https://www.semanticscholar.org/paper/Antiviral-nanoparticles-for-sanitizing-surfaces:-A-Lin-Verma/3d5e81de775baa9688311a05dbc21a733d817ed4>)

(a) Наночастинки беруть участь у формуванні складних зв'язків і електростатичних взаємодіях з вірусними поверхневими білками, щоб перешкоджати прикріпленню вірусу до клітини-господаря та проникненню їх в клітину.

(b) Генерація УФ-фотокаталізом, активних форм кисню, які легко реагують з вірусними біомолекулами та пошкоджують їх.

(c) Наночастинки та отримані іони металів безпосередньо взаємодіють із оболонкою або капсидом вірусу та дифундують через нього, порушуючи його структуру.

(d) Наночастинки утворюють реакції, які розривають дисульфідні зв'язки у вірусних глікопротеїнах, денатуруючи їх, щоб зменшити інфекційність, перешкоджаючи зв'язуванню вірусу з цільовими рецепторами на клітинах-господарях.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8361009/>)

Доведено, що наночастинки срібла широкий спектр протівірусної активності, впливають на репродукцію вірусів родин *Retroviridae*, *Adenoviridae*, *Hepadnaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae*, *Orthomyxoviridae* та *Arenaviridae* [34, 35]. Також відомо, що вірусна резистентність до наносрібла розвивається повільніше, ніж до інших протівірусних лікарських засобів. Це пояснюється, зокрема, мультивалентністю чи багатогранністю взаємодії наноструктур з компонентами поверхні вірусів та рецепторами біомембрани, що призводить до запобігання проникненню збудника у клітину.

Точний механізм протівірусної активності наночастинок золота та срібла достеменно не встановлений, існують декілька поглядів на це питання. Так, наночастинки золота можуть взаємодіяти з капсидом та/чи білками поверхні вірусу, а також із компонентами клітинної мембрани, перешкоджаючи контакту вірусу з клітиною та його проникненню всередину [36, 37]. Також, наночастинки здатні вступати у реакцію з вірусним геномом всередині клітини або з вірусними та клітинними факторами, необхідними для реплікації вірусу.

Натепер відомо, що наночастинки срібла проявляють свою протівірусну та протимікробну активність завдяки своїм структурно-функціональним перевагам. По-перше, це унікальні властивості наночастинок, такі як малий розмір (що може полегшити доставку ліків в анатомічно привілейовані місця), великі співвідношення площі поверхні та об'єму (що гарантує можливість розміщення великих корисних навантажень (таких як ліки), та регульований поверхневий заряд (для полегшення проникнення до клітини через її негативно заряджену мембрану), ці всі переваги роблять наночастинки привабливими інструментами розробки препаратів для лікування захворювань викликаних вірусами та мікроорганізмами. По-друге, можливість інкапсуляції лікарських засобів, і функціоналізації шляхом утворення

стійких структур або модифікацій (з такими полімерами, як наприклад, поліетиленгліколь) може призвести до оптимізації дозування ліків та покращення їх доставки завдяки підвищенню стабільності та часу їх утримання. Нарешті, вважається, що доставку ліків можна значно покращити за допомогою модифікованих наночастинок з направленими фрагментами для збільшення специфічності до бажаних типів клітин, тканин-мішеней або субклітинних компартментів [1, 6 та 11].

. Зелений синтез наночастинок срібла (AgNPs) нещодавно набув популярності в галузі нанобіотехнологій завдяки їхнім унікальним біологічним, каталітичним, електричним і оптичним властивостям [41], [42], [43], [44]. При оціночному виробництві наносрібла в 500 тонн на рік у всьому світі, AgNP високо комерціалізовані та широко використовуються в текстильній промисловості завдяки своїм антибактеріальним властивостям, які були визнані ще з часів Стародавньої Греції [7]. Крім того, це спонукало текстильну промисловість використовувати AgNP в різних текстильних тканинах [45]. Традиційні методи отримання AgNP вимагають сильних відновників або радіації [46], [47], але методи зеленого синтезу з використанням рослинних матеріалів, мікроорганізмів і різноманітних біовідходів стали перспективним напрямком досліджень для створення наноматеріалів, які є екологічно чистими, дружній, економічно ефективний і стабільний [48], [49], [50], [51], [52].

Ксантанова камедь є типом позаклітинного полісахариду, який виділяється в процесі ферментації бактерії *Xanthomonas campestris* [53]. Його структура складається з лінійного D-глюкозного остова, з'єднаного з трисахаридним бічним ланцюгом, що містить D-маннозу з ацетильною групою, D-глюкуроною кислотою, і кінцевої одиниці D-маннози, пов'язаної з піруватною групою, D-глюкозою, D-манозою, та D-глюкоронову кислоту у співвідношенні 2:2:1 [54]. Ксантанова камедь є високостабільною в широкому діапазоні рН і температур і стійка до

ферментативного розкладання. Завдяки своїм нетоксичним і біосумісним властивостям він широко використовується в харчовій і фармацевтичній промисловості [55].

Також залишається невивченими механізми взаємодії наночастинок та клітини, тому важливим є аналіз їх потенційного шкідливого впливу на організми, включаючи визначення їх цитотоксичних та генотоксичних властивостей [13].

Зважаючи на те, що інтерес до нанотехнологій росте, важливим є поглиблення знання про взаємодію наночастинок срібла та золота з різними вірусами. Однак, з розвитком нанотехнологій металічні наночастинки широко використовується у поєднанні з іншими матеріалами, які посилюють властивості один одного, особливо в біомедичній області [14-15].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали, використані у роботі

2.1.1. Вірус

Вірус Епштейна-Барр, отриманий з клітин-продуцентів (В95-8) за стандартною методикою [37]. Вірус-вмісний матеріал зберігали в аліквотах при – 70°C. Індукцію вірусу здійснювали шляхом додавання натрій бутерату (Sigma, США) до культури клітин в кінцевій концентрації 2 мМ doi: [10.1128/JVI.00722-14](https://doi.org/10.1128/JVI.00722-14).

2.1.2. Досліджуваний зразок

1... Стабільна водна дисперсія наночастинок срібла, покрита натуральною смолою. З концентрація срібла 20 мг/мл (Noble Elements LLC (м. Шайенн, США)

2. Розчин наночастинок срібла в ксантановій (X) матриці $CAgHCl=0,046$ кг/м³(мг/мл), синтезовані в Інституті хімії високомолекулярних сполук НАН України.

2.1.3 . Культури клітин

РЗНР1 - лімфоцити В3 людини, що продукують вірус Епштейн-Барр, отримані з Банку клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (Київ, Україна).

В95-8 – лімфоцити мавп-мармазеток, які трансформовані ВЕБ та

хронічно продукують його, отримані з Банку клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (Київ, Україна).

MDCK - клітини нирки собаки, отриману з ДУ Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України (Київ, Україна).

Нер-2 – клітинна лінія гепатоцелюлярної карциноми людини, отримана з Банку клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (Київ, Україна).

2.1.4. Тест-системи, які використані для досліджень

Для виконання роботи були використані наступні комерційні матеріали:

1. Набір для виділення ДНК вірусу InnuPREP Virus DNA Kit «AnalitikJena», Німеччина);
2. Тест-системи для виявлення ДНК ВЕБ з використанням набору K013 (ТОВ «Біокорп», Україна).
3. Набори реагентів для біохімічного аналізу фірми High Technology, Inc (США).
 - Прямий Білірубін (напів-авто) Набір реагентів: Реагент1, 1x250мл + Реагент2, 1x25мл + Калібратор, 1x3мл
 - Білірубін Загальний (напів-авто) Набір реагентів: Реагент1, 1x250мл + Реагент2, 1x25мл, Калібратор, 1x3мл
 - Холестерол Набір реагентів: Реагент1, 1x125мл + Стандарт, 1x5мл
 - Сечовина Набір реагентів: Реагент1, 1x125мл + Реагент2, 1x25мл + Стандарт, 1x5мл
 - Загальний білок Набір реагентів: Реагент1, 1x125мл + Стандарт, 1x5мл

- Аланінамінотрансфераза (АЛТ) Набір реагентів: Реагент1, 1x100мл + Реагент2, 1x20мл
- Аспаратамінотрансфераза (АСТ) Набір реагентів: Реагент1, 1x120мл + Реагент2, 1x30мл
- Хімічний контроль Набір реагентів: Рівень1, 1x5мл + Рівень2, 1x5мл
- HTI Enzematic Cleaner, 1л

2.2. Методи

2.2.1. Культивування ліній клітин

Культури лімфобластоїдних клітин вирощували на поживному середовищі, що складалось з 90% середовища RPMI-1640 з L-глутаміном (2 мМ) (Sigma, США), 10% ЕТС та антибіотиком (50 мкг/мл гентаміцину), в пластикових флаконах (Sarstedt, Німеччина), при 37° С в термостаті в атмосфері 5% CO₂. Кожні три доби проводили пасажі до концентрації 5x10⁵ кл/мл. Кожні дві доби перевіряли проліферативну активність клітин за допомогою світлового мікроскопу Micromed XS-3320, Україна при збільшенні 20х. Для підрахунку клітин використовували лічильну камеру Горяєва. Для визначення кількості клітин відбирали ресуспендовану аліквоту в окрему ємність та додавали барвник трипановий синій, у співвідношенні 1:1. Підрахунок клітин проводили у 15 великих квадратах трьох незалежних площин та виводили середнє значення, яке потім перемножували на коефіцієнт 16665. У результаті отримували показник кількості клітин у мілілітрі. При підрахунку клітин був вирахований показник достовірності p<0,05.

Моношарові клітини вирощували в стерильних пластикових флаконах (Sigma, США) у поживному середовищі, що складалося з 45% ДМЕМ (Sigma, США), 45% RPMI 1640 (Sigma, США) та 10% інактивованої

прогріванням при 56°C сироватки великої рогатої худоби (Sigma, США), антибіотиків – пеніциліну та стрептоміцину (по 100 мкг/мл). Клітини пересівали при утворенні ними моношару. Кратність розсіву встановлювали після підрахунку кількості клітин у камері Горяєва за допомогою інвертованого мікроскопа Ломо (Росія) із збільшенням $\times 70$. Клітини знімали з поверхні флаконів за допомогою 0,02% розчину Версена, ресуспендували в поживному середовищі та доводили їх концентрацію у суспензії до 3×10^5 клітин/мл. Лімфобластоїдні культури клітин вирощували в ростовому середовищі, що складалось з 90% середовища RPMI 1640 (Sigma, США), 10% сироватки ембріону великої рогатої худоби (Sigma, США) і антибіотиків – пеніциліну та стрептоміцину (по 100 мкг/мл). Культивування клітин проводили у термостаті при 37 °C в атмосфері 5% CO₂.

2.2.2. Визначення цитотоксичної дії речовини колориметричним методом з використанням МТТ

МТТ метод дослідження життєздатності клітин базується на функціонуванні дигідрогеназної системи мітохондрій інтактних клітин, які в нормальних умовах переробляють штучний субстрат МТТ (3,(4,5- диметилтріазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум бромід) в формазан [38]. Продукт реакції можна визначити кількісним спектрофотометричним методом. Перетворення МТТ в формазан дозозалежно зменшується при загибелі клітин під дією досліджуваних токсичних для клітин речовин. Клітини вирощували в 96- лункових планшетах. Через 24 години росту клітин проводили заміну живильного середовища на середовище, яке містило досліджувані препарати у різних концентраціях. Для цього видаляли живильне середовище з лунок та вносили 200 мкл середовища з препаратом відповідної концентрації. В контрольних клітинах проводили заміну

середовища на свіже без додавання препарату. На кожну концентрацію препарату використовувати не менше ніж по 3-4 лунки з клітинами. Планшетиз клітинами витримували в термостаті при 37°C в 5 % CO₂ атмосфері протягом діб. Контролювали стан моношару клітин з використанням світлового інвертованого мікроскопу (окуляр 7x та об'єктив 10x).

Субстрат МТТ ("Sigma", США) розчиняли в стерильному фосфатному буфері (рН 7,2) при кімнатній температурі до концентрації 5 мг/мл. Фільтрований розчин МТТ в об'ємі 20 мкл вносили до лунки 96-лункової планшети та інкубували з клітинами протягом 2-4 год. при 37⁰ С. Після інкубації середовище видаляли, до клітин додавали по 150 мкл 96^o етанолу для розчинення кристалів формагану. Визначали оптичну щільність розчинів спектрофотометрично, використовуючи рідера для плашок Multiscan FC (ThermoFisherScientific, США) при довжині хвилі 540 нм. Визначені оптичні щільності кожної лунки порівнювали з оптичною щільністю розчинника, що служить контролем, та за формулою вираховували

% пригнічення життєздатності клітин за дії різних концентрацій сполуки:

$$\% \text{ пригнічення життєздатності} = 100 - (A/B \times 100), \quad (1.1)$$

де А - середнє значення оптичної щільності дослідних зразків для певної концентрації сполуки, В - середнє значення оптичної щільності зразків контролю клітин.

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

2.2.3. Визначення цитотоксичності речовин методом з використанням барвника нейтрального червоного

Клітини щільністю 5×10^5 кл/мл культивували в ростовому середовищі з 10% ЕТС, яке містило досліджувані речовини в різних концентраціях в 96-лункових планшетах. Контролями були клітини необроблені препаратами. Планшети з клітинами витримували в термостаті при 37°C в 5% CO_2 атмосфері протягом 48 год. Після інкубації планшет з клітинами центрифугували для осадження клітин при 1500 об/хв протягом 10 хв та видаляли надосад. Далі клітини промивали стерильним розчином ФСБ (рН 7,2), по 150 мкл у кожному лунку, центрифугували для осадження клітин при 1500 об/хв протягом 10 хв та видаляли надосад. Барвник нейтральний червоний розчиняли в стерильному середовищі RPMI 1640 з L-глутаміном (2мМ) (Sigma, США) при кімнатній температурі до концентрації 50 мг/мл. Фільтрований розчин барвника вносили по 100 мкл до лунок і інкубували протягом 3 год. при 37°C в атмосфері 5% CO_2 . Після інкубації планшет з клітинами центрифугували для осадження клітин при 1500 об/хв протягом 10 хв та видаляли надосад. Далі промивали стерильним розчином ФСБ (рН 7,2), по 150 мкл у кожному лунку, центрифугували для осадження клітин при 1500 об/хв протягом 10 хв та видаляли надосад. До осаду додавали по 150 мкл свіжо приготованого десорбуючого розчину (до 4,9 мл води додавали 5 мл 96% етанолу та 100 мкл оцтової кислоти). Після 10 хв. ретельного струшування при 37°C визначали оптичну щільність розчинів спектрофотометрично, на спектрофотометрі Multiskan FC (Thermoscientific, США) при довжині хвилі 538нм.

2.2.4. Полімеразна ланцюгова реакція

Виділення ДНК вірусів з проб проводили за допомогою комерційного набору «innuPREP Virus DNA Kit» (Analytik Jena AC, Німеччина) або «ДНК ВЕБ» (ТОВ «Біокорп», Україна) згідно інструкції

фірми-виробника. Концентрація ДНК була виміряна за допомогою Біопhotometer (“Eppendorf”, Німеччина). Ампліфікацію проводили з використанням набору K013 (ТОВ “Біокрп”, Україна) з дотриманням інструкції виробника на приладі QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.5. Трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ)

Структуру досліджуваних зразків визначали за допомогою електронного мікроскопа JEM-1400 (JEOL, Японія) при інструментальному збільшенні від 2000 до 100000 та прискорюючій напрузі 80 кВ.

Для негативного контрастування зразка для ТЕМ на поверхню сіточкинаноносили краплю приблизно 10 мкл суспензії дослідного зразка. Сіточку з боку плівки-підкладки залишали на адсорбцію з досліджуваним об’єктом на 1 хвилину. Потім зайву рідину видаляли з сітки фільтрувальним папером. Далі одразу ж на сіточку наносили краплю 1%-го водного розчину ураніацетату. Після фарбування протягом однієї хвилини зайву рідину видаляли фільтрувальним папером і сітку просушували декілька хвилин, перед тим як піддавати мікроскопіюванню. В іншому варіанті дослідження зразки у об’ємі 5 мкл наносились на попередньо підготовлені мідні сіточки з формваровим покриттям та карбоновим напиленням, адсорбція зразка на сіточку проводилась протягом 1 години. Зразки наночастинок не контрастувались та не відмивались. Зразки, що містили вірус, контрастувалися 2% водним розчином ураніацетату протягом 45-55 секунд та відмивалися у стерильному дистилаті протягом 10 секунд.

2.2.6. DPPH-тест

Антирадикальну дію зручно вивчати, застосовуючи стабільні вільні радикали, до яких належить, зокрема, DPPH – 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил радикал. Метод DPPH демонструє загальну антирадикальну активність досліджуваної речовини. Принцип методу полягає у вимірюванні інтенсивності забарвлення спиртового розчину даного стабільного радикалу до і після додавання досліджуваної речовини або суміші речовин [39]. Спиртовий розчин DPPH має пурпурно-синє забарвлення, при додаванні нього розчину речовини з радикал-поглинаючою активністю радикал відновлюється. Метод є універсальним і підходить для визначення здатності до поглинання вільних радикалів як чистих речовин, так і екстрактів різного походження. Використовували DPPH – 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил (Sigma, США). До кожного розведення дослідної речовини додавали 3 мл 0,1 мМ розчину DPPH у метанолі. Пробірки енергійно струшували і залишали на 30 хв при кімнатній температурі в темряві. Поглинання вимірювали при 517 нм. Розчинники вода – та 96% етиловий спирт. Контрольний розчин – цистеїн (Sigma, США). Оптичну щільність розчинів спектрофотометрично, на спектрофотометрі Multiskan FC (Thermoscientific, США) .

$$\% \text{ антиоксидантної активності} = [(A_c - A_s) \div A_c] \times 100$$

де: A_c —оптична щільність контролю ; A_s —оптична щільність дослідного зразка.

Дослідження *in vivo*

Експериментальні тварини - білі безпородні миші та миші лінії Balb/c утримувалися в стандартних умовах віварію Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного. Період карантину - 5 діб.

Всі експериментальні протоколи були схвалені Комісією з питань біоетики Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Проведені експерименти не суперечать чинному законодавству України (ст. 26 Закону України 5456-VI від 16.10.2012 "Про захист тварин від жорстокого поводження") та "Загальним етичним принципам експериментів на тваринах",

Визначення гострої токсичності. Внутрішньочеревне введення. Тварини - миші породи balb/c - були розподілені на 4 групи. У дослідних трьох тупах наносібло вводили внутрішньочеревно одноразово в дозах 19 ± 2 ; 63 ± 6 і 188 ± 19 мг/кг. Контрольній групі вводили 0,5 мл фізіологічного розчину також одноразово. Спостереження проводили щодня протягом 14 днів. Тварин зважували в перший день і на 14 день експерименту. На 15-й день тварин виводили з експерименту за допомогою ефірного наркозу. У мишей брали кров для подальшого визначення біохімічних показників, а також гематологічного аналізу крові.

Пероральне введення. Препарат вводили внутрішньошлунково за допомогою подовженої голки із заокругленим кінцем. У дослідженні використовували 6 груп мишей по 5 мишей у кожній. 1 група - вводили 206 мг/кг, 2 - 116 мг/кг, 3 - 56 мг/кг, 4 - 26,2 мг/кг, 5 - 13,25 мг/кг, 6 - контроль (вводили воду). За тваринами спостерігали протягом 14 днів, вимірювали вагу в день експерименту, через 1, 3, 7, 10 і 14 днів. На 15-й день тварин виводили з експерименту за допомогою ефірного наркозу. У мишей брали кров для подальшого визначення біохімічних показників.

2.2.7. Гематологічний та біохімічний аналіз сироваток крові тварин

Протоколу проведення гематологічного аналізу не існує. Відбирають кров у тварин у пробірки, оброблені ЕДТА (Sarstedt, Німеччина) для попередження згортання крові, і проводили аналіз на автоматичному

гематологічному аналізаторі MicroCC-20Plus (High Technology, Inc.).

Біохімічний аналіз сироваток проводили використовуючи напівавтоматичний біохімічний аналізатор HTI BIOCHEM SA (High Technology, Inc.).

2.2.8. Статистична обробка результатів

Для визначення показника CC_{50} застосований метод регресійного аналізу за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel, який дозволив охарактеризувати зв'язок між двома ознаками, а саме, прийнявши за основу одну, дати оцінку варіювання зв'язаного з нею іншого показника. Застосовували лінію тренда, що використовується для лінійної апроксимації даних по методу найменших квадратів у відповідності з рівнянням:

$$y = mx + b,$$

де m – кут нахилу; b – координата перетину осі абсцис.

При аналізі даних автоматично визначали R^2 – коефіцієнт детермінації. Це число від 0 до 1, котре відображає близькість значень лінії тренда до фактичних даних. Лінія тренда найбільше відповідає дійсності, коли значення R^2 близьке до 1. Визначали стандартне відхилення.

При статистичній обробці результатів антивірусної дії препаратів (IC_{50}) вираховували середнє арифметичне та стандартне відхилення, застосовували метод регресійного аналізу за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Першим етапом дослідження лікарських препаратів є оцінка токсичності сполук для культури клітин і лабораторних тварин. Токсичність – властивість хімічних елементів, сполук і біогенних речовин згубно впливати на живі організми. Залежно від діючої дози практично усі речовини в певних умовах можуть виявитися шкідливими для організму. На даний час складно виявити системні і фізіологічні ефекти токсичності *in vivo*, тому більшість досліджень ґрунтується на визначенні токсичної дії на клітинному рівні або цитотоксичності[40].

3.1. Дослідження цитотоксичної та антирадикальної наночастинок срібла в лімфобластоїдних ВЕБ-асоційованих клітинах

Дослідження спрямовані на порівняльний аналіз впливу НЧ на ряд функціональних елементів клітинного гомеостазу у ВЕБ асоційованих культурах клітин людини та мавп, у яких інфекційний вірус продукується у 10–20% клітинної популяції, інші мають інтегрований геном вірусу в епісомальній формі та перебувають у стані персистен. Відмінністю є те, що В95-8 продукує трансформуючий штам вірусу, а РЗНР1 нетрансформуючий штам. Повідомлялося про імунологічні та фенотипічні відмінності між сублініями, інфікованими цими двома штамми. Більшість цих відмінностей, якщо не всі, можна віднести до відсутності послідовностей, що кодують EBNA-2, у штамі РЗНР1.

Одним із найважливіших факторів захисту клітин від

чужорідного втручання є цитоплазматична мембрана, саме порушення її цілісності, є незворотним процесом її загибелі. Нами досліджено вплив наносрібла у полісахаридній оболонці з використанням барвника трипанового синього, який проникає у клітину через пошкоджену мембрану. Визначено, що наносрібло концентрації 200-2000 мкг/мл було токсичним для клітин обох культур (рис. 3.1.1). Визначали показник CC_{50} , концентрація, що призводить до загибелі 50% клітинної популяції, який склав для клітин B95-8 30 мкг/мл, а для P3HR1 35 мкг/мл. Тобто наносрібло виявило приблизно однаковий цитодеструктивний ефект на обидві лінії трансформованих ВЕБ-асоційованих клітин.

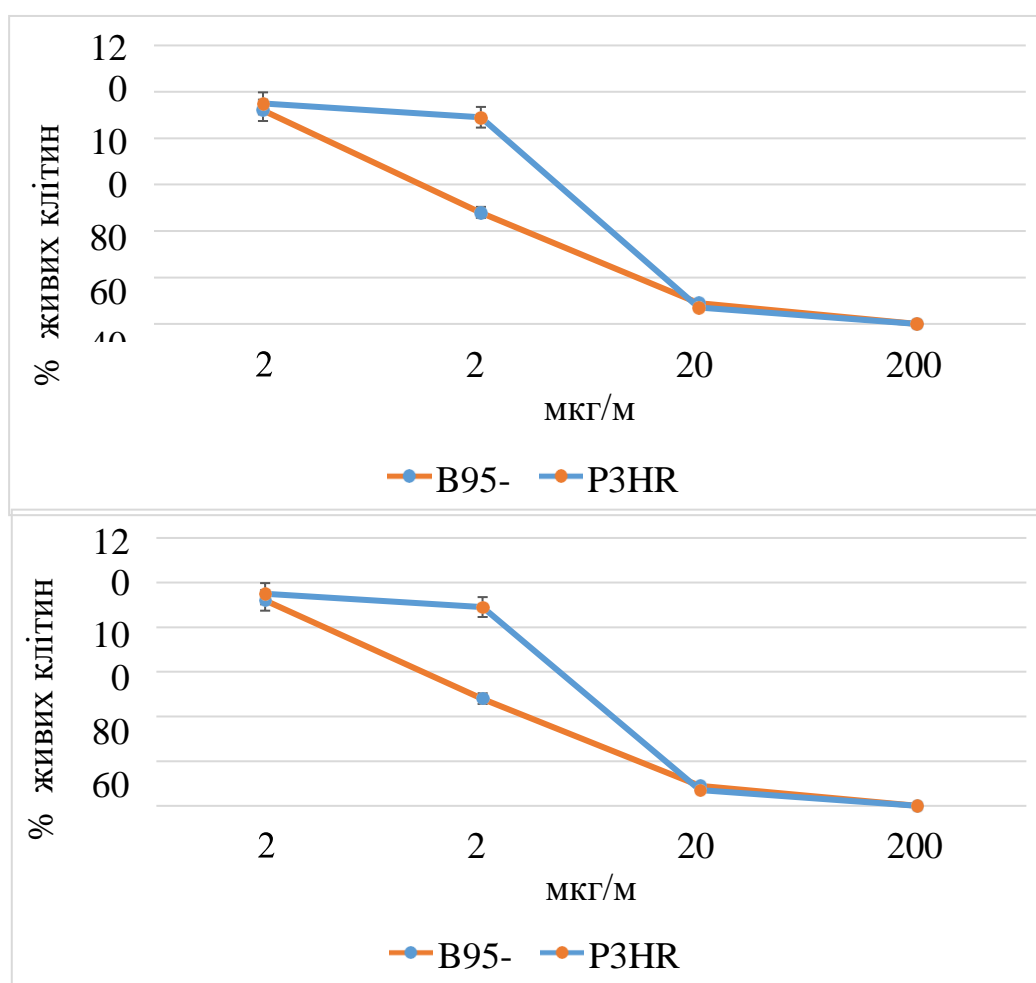


Рис. 3.1. Дозозалежний вплив наносрібла на проникність клітинної

мембрани

Наступним етапом роботи було вивчення впливу досліджуваної речовини на мітохондріальну (рис. 3.1.2). В результаті дослідження через 48 години виявили, що цитотоксична дія наночастинок срібла мала лінійний характер, тобто лінійна дозозалежність між концентрацією речовини та відсотками живих клітин. Розведення речовини, яка на 50% пригнічує життєдіяльність клітин, становить в клітинах В95-8 7,2 мкг/мл. Аналіз даних отриманих при дослідженні цитотоксичного впливу наносрібла на клітини РЗНР1 показало, що концентрація взаємозв'язок – життєздатність клітин носила логарифмічний характер. Розведення речовини, яка на 50% пригнічує життєдіяльність клітин, склало через в клітинах РЗНР1 71 мкг/мл.

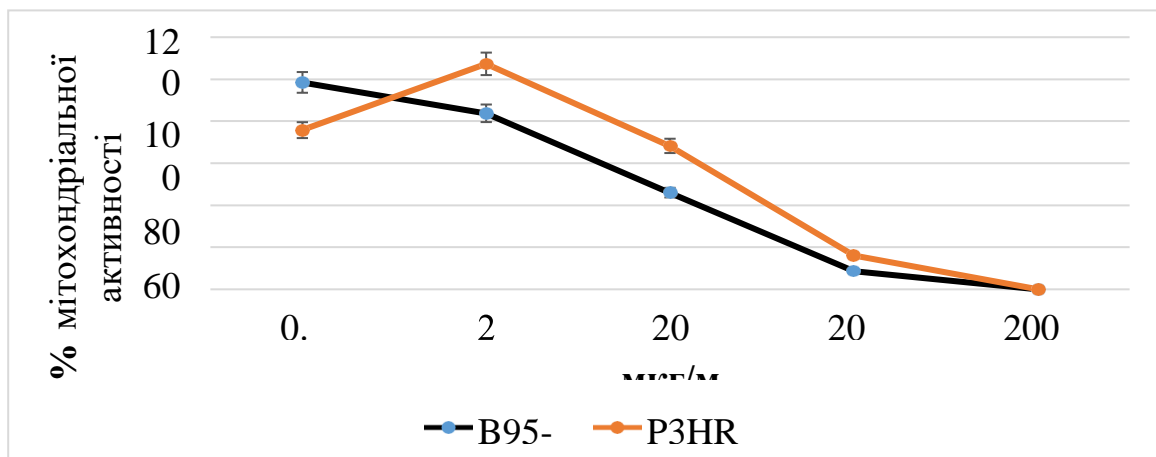


Рис. 3.2. Дозозалежний вплив наносрібла на мітохондріальну активність

Відомо, що лімфоцити, інфіковані вірусом Епштейна-Барр (EBV), здатні утворювати цитоплазматичні вакуолі, які працюють як відділення для зберігання лізосомальних кислих гідролаз. Лізосомально-асоційований мембранний білок 2 (LAMP-2), найкраще охарактеризований лізосомальний мембранний білок, виявляється на пізніх стадіях дозрівання ендосом і може використовуватися як маркер

асоційованих з лізосомами мембран. Розлади лізосомального накопичення (LSD) описуються відсутністю або дефіцитом активності гідролази, що призводить до накопичення субстрату в лізосомальних компонентах і до виникнення кількох захворювань. При аналізі лізосомальної активності, визначено, що наносрібло концентрації від 200 до 2000 мкг/мл було токсичним для клітин обох культур (рисунок 3.1.3.).

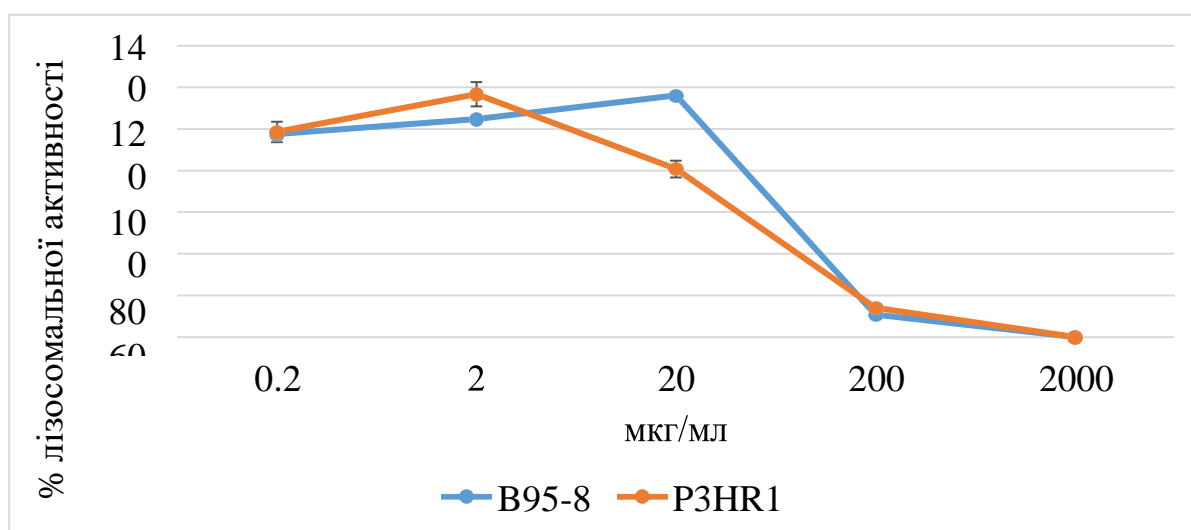


Рис. 3.3. Дозозалежний вплив наносрібла на лізосомальну у активність

У варіанті індукованих натрій бутиратом клітин B95-8, показник CC_{50} методом нейтрального червоного і трипанового синього збігається. А за МТТ-методом для індукованих клітин наносрібло менш токсичне (майже в 2 рази). Порівняння показників CC_{50} токсичності речовини виявило, що на 48 годин токсичність у клітинах B95-8 знижується. Винятком є лише вплив на мітохондрії - токсичність збільшилася в 1,5 рази у разі індукованих B95-8. Порівняно з клітинами B95-8, наносрібло для клітин P3HR1 є токсичним у всіх випадках. Показники токсичності наносрібла визначені трьома методами перебувати в межах концентрації 220 мкг/мл. При цьому для клітин P3HR1 індукованих натрій бутиратом, токсичність вища на 1,3-1,5 рази ніж індукованих. Хоча за показниками трипанового синього, однакові.

В таблиці 3.1. наведені узагальнюючі дані по цитотоксичності по трьом методам.

Таблиця 3.1.

Показники цитотоксичності (CC50) наносрібла (мкг/мл)

B95 8			P3HR1		
МТТ	Нейтральний червоний	Трипановий синій	МТТ	Нейтральний червоний	Трипановий синій
7,9	41,9	15,2	74,3	50,5	45,5
За умов стимулювання ВЕБ натрій бутиратом					
14	45	15	34	39	44

Таким чином, було показано, що наносрібло виявляє меншу токсичність у В-лімфоцитах людини, а у В-лімфоцитах мавпи тамарину цитотоксичність вища.

Особливо токсична дія відмічена на мітохондрії в клітинах B95-8. При індукції продукування вірусу знизилася токсичність наносрібла на мітохондрії, а за показниками проникності мембрани (трипановий синій) та активності лізосом (нейтральний червоний) – не змінилися через 48 годин експозиції. У клітинах P3HR1 індукція натрій бутиратом призвела до підвищення токсичності наносрібла.

Наступна культура клітин MDCK, котра була вибрана в якості неонкологічної моделі. В таблиці 3.2. наведено результати МТТ –тестування зразка наночастинок покритої оболонкою. Встановлено, що в діапазоні концентрацій 74-222 мкг спостерігалось 60 % інгібування життєздатності.

Таблиця 3.2

Дозозалежний вплив наносрібла на мітохондріальну активність МТТ-метод в культурі клітин MDCK

Концентрація препарату, мкг/мл	С.О.Щ.*	Стандарт. відхилення	Відсоток живих клітин, %	CC ₅₀ мкг/мл
Контроль клітин	1,6365	0,0459	100,000	694,46
8	1,5054	0,0894	85,3245	
24	1,3445	0,0630	82,9572	
74	0,8843	0,0482	57,0373	
222	0,9435	0,0804	57,6506	
667	0,0474	0,0532	2,8984	
2000	0,0013	0,0065	0,0815	
Відсоток живих клітин = Ощ досл. x 100 / Ощ контролю				

Також проаналізована лізосомальна активність з застосуванням фарбника нейтрального червоного. Результати представлені в таблиці 3.3. Встановлено, що в діапазоні концентрацій 8 – 222 мкг/мл рівень лізосомальної активності знижується на 11-30 %.

Отримані результати цитотоксичності в культурі клітин MDCK, котра не відноситься до клітин онкологічного профілю з встановленими показниками CC₅₀ більше 600 мкг/мл в порівнянні з показниками В-лімфомних клітин свідчить про вищу інгібуючу дію досліджуваної речовини саме на трансформовані клітини. Тому було вирішено провести дослідження цитотоксичності в клітинах Нер-2, які є клітинною лінією гепатоцелюлярної карциноми людини.

Таблиця 3.3.

Дозозалежний вплив наносрібла на лізосомальну активність

Концентрація препарату, мкг/мл	С.О.Щ.*	Стандарт. відхилення	Відсоток живих клітин, %	CC ₅₀ мкг/мл
Контроль клітин	1,1842	0,0090	100,000	676,72
8	1,0654	0,0293	89,9626	
24	0,7931	0,0875	66,9688	
74	0,9504	0,0663	80,2516	
222	0,8397	0,0571	70,9038	
667	0,4391	0,2480	37,0817	
2000	0,0234	0,0016	1,9760	
Відсоток живих клітин = Ощ досл. x 100 / Ощ контролю				

В таблиці 3.4. представлені результати тестування досліджуваної речовини на мітохондріальну активність клітин Нер-2. Встановлено, що в діапазоні концентрацій 20 – 200 мкг/мл спостерігається більше ніж 80 % інігування мітохондріальної активності, а відповідно і життєздатності клітинної популяції.

Встановлений показник CC₅₀ 8 мкг/мл, котрий є в 50 раз вищий за значення отримане в клітинах MDCK, але нижчий за B95-8 (8 мкг/мл) свідчить про вищу чутливість саме до клітин онкологічного профілю, тому можна припустити про можливий протипухлинний потенціал наночастинок срібла покритих природнім полісахаридом.

Таблиця 3.4.

**Вплив НЧ срібла на життєздатність мітохондріальну активність клітин
Нер-2**

Концентрації НЧ, мкг /мл	СОЩ	Відсоток живих клітин, %	Стандартне відхилення	CC ₅₀ , мкг/мл
200	0,0254	3,061	0,011	8
40	0,1188	14,654	0,008	
20	0,1209	14,917	0,015	
4	0,5331	65,758	0,073	
2	0,6325	78,023	0,070	
кк (Нер-2)	0,8107	100 %	0,031	

Наступним досліджуваним зразком були НЧ срібла в ксантановій матриці. Аналіз цитотоксичності проводили з використання МТТ-тесту. На рисунку 3.4. представлені результати тестування в культурах клітин В95-8 та MDCK.

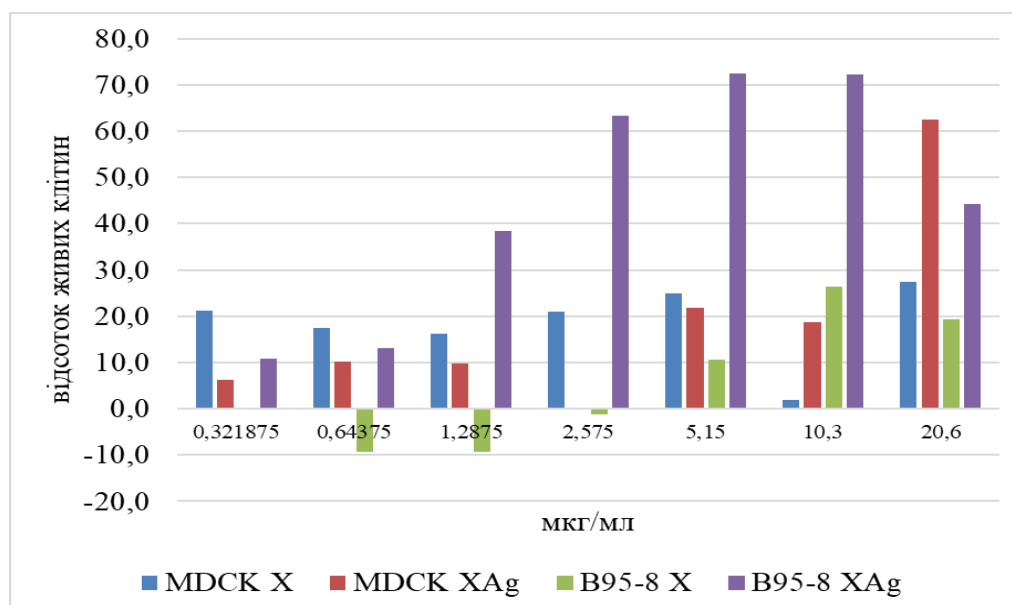


Рис. 3.4. Дозозалежний вплив наносрібла в ксантановій матриці на мітохондріальну активність.

Культура клітин В95-8 - лейкоцити мавп мармазеток, які трансформовані вірусом Епштейна-Барр (ВЕБ), хронічно продукують його та є моделлю лімфоми Беркітта виявилася найбільш чутливою до зразка ксантану з сріблом, адже вже в концентрації 0,64 мкг/мл спостерігали пригнічення життєздатності клітин на 50 %/

В таблиці 3.5. наведені показники СС50 встановлені для ксантану (показники представлені в розведенні) та срібло з ксантаном (показники в мкг/мл по вмісту срібла).

Таблиця 3.5.

Показники СС50 в культурах клітин В95-8 та МДСК

	Ксантан (X) (розведення)	XAg (ксантан срібло) (мкг/мл)
В95-8	0	0,64
МДСК	132	3,61

При дослідженні цитотоксичності срібла в ксантановій матриці МТТ методом встановлено, що ксантан є інертним щодо клітин В95-8, при цьому СС50 для клітин МДСК 1:132. При введенні в полімер срібла встановлена виражена інгібуюча дія відносно клітин лімфоми Беркітті СС50 – 0, 64 мкг/мл, МДСК – 3,6 мкг/мл. Таким чином, запропонована композиція ксантан з наночастинками срібла є перспективними для розробки інгібуючих агентів В-лімфомних клітин.

Таким чином, встановлено, що срібло має виражену протипухлинну ефективність, але потребує виваженого підходу до вибору його носія, адже незважаючи на всі позитивні моменти біологічної активності срібла, його токсикологічні характеристики свідчать про необхідність застосування покриттів для оптимального проходження ШКТ та цільової доставки.

У сучасній літературі антиоксидантна активність пов'язується, передусім, зі здатністю речовини поглинати вільні радикали. Методика тестування DPPH пов'язана з усуненням DPPH, який був би стабілізованим вільним радикалом. Вільнорадикальний DPPH взаємодіє з непарним електроном, утворюючи сильне поглинання при 517 нм, тобто фіолетовий відтінок.

Антиоксидант FRS, наприклад, реагує на DPPH з утворенням DPPH₂, який має нижчу абсорбцію, ніж DPPH, через меншу кількість водню. Він радикальний порівняно з формою DPPH-H, оскільки викликає знебарвлення або жовтий відтінок, оскільки кількість поглинених електронів збільшується. Знебарвлення істотно впливає на здатність опускання. Як тільки розчини DPPH поєднуються з джерелом атома водню, утворюється нижчий стан дифенілпікрилгідразину, який втрачає свій фіолетовий колір.

Щоб пояснити процеси, що стоять за тестами DPPH, а також їх застосування до утворюється нижчий стан дифенілпікрилгідразину, який втрачає свій фіолетовий колір.

Було проведено дослідження антирадикальної активності досліджуваного препарату. В таблиці 3.6. наведені результати тестування досліджуваного препарату. Вираженої антиоксидантної активності не виявлено, але встановлено, що 96% етиловий спирт у якості розчинника демонструє більш «рівні» результати без різких коливань.

Таблиця 3.6.

Дослідження антирадикальної активності наночастинок срібла

Розведення на воді			Розведення на спирті	
К-ція, мкг/мл	Сер.опт.г.	Антирадикальна активність, %	Сер.опт.г.	Антирадикальна активність, %
200,00	3,3845	-44,50	3,6298	-32,61
100,00	2,6336	-12,44	2,9989	-9,56
50,00	1,8667	20,30	2,6787	2,14
25,00	2,1501	8,20	2,5629	6,37
12,50	2,1988	6,12	2,4978	8,75
6,25	2,3634	-0,90	2,5315	7,51
3,13	2,4764	-5,73	2,4717	9,70
1,56	2,3942	-2,22	2,4686	9,81
0,78	1,7999	23,15	2,4868	9,15
DPPH	2,34223		DPPH	2,7372

Таким чином, було показано, що наносрібло виявляє меншу токсичність у В-лімфоцитах людини, в якому штам вірусу не має трансформуючої дії, а у В-лімфоцитах мавпи тамарину цитотоксичність вища. Антирадикальна активність досліджуваного препарату є досить низькою.

3.2. Антивірусна дія наночастинок срібла відносно вірусу Епштейна-Барр

Наступним етапом дослідження було визначення впливу досліджуваного препарату на реплікацію вірусу методом ПЛР.

Дослідження проводили в діапазоні нетоксичних концентрацій. На рисунку 3.5. представлені показники інгібування репродукції вірусу Епштейна-Барр, а саме рівня реплікації ДНК вірусу.

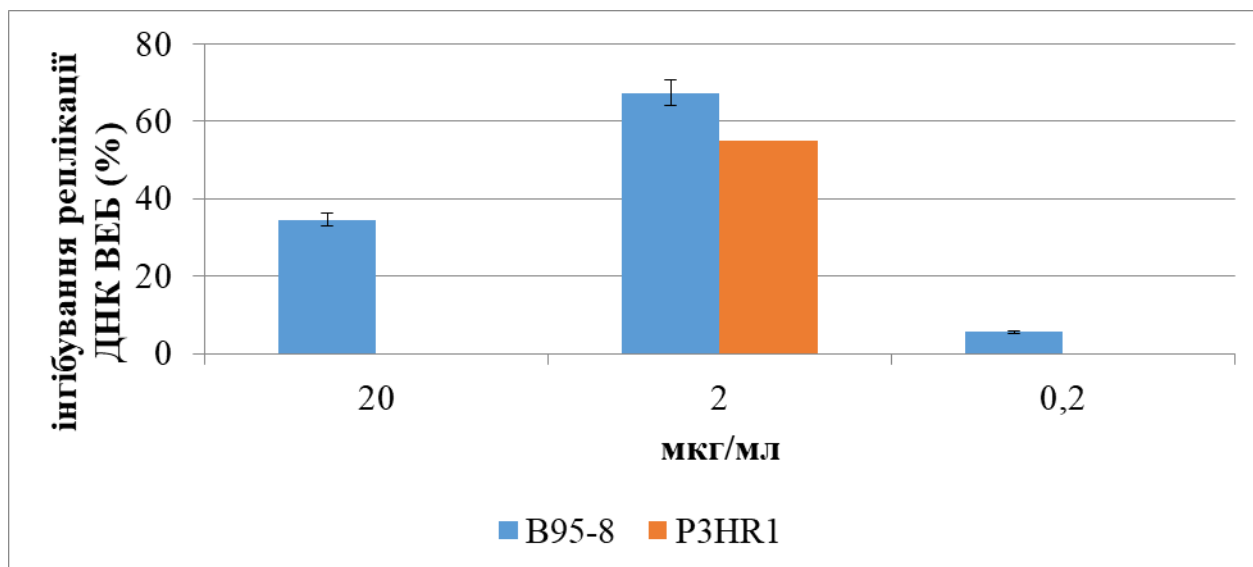
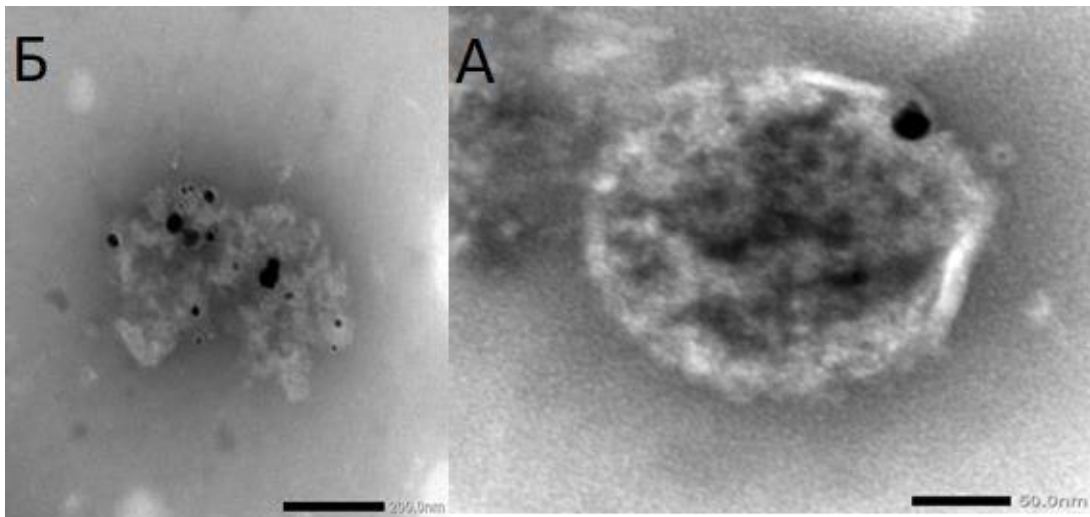


Рис. 3.5. Інгібування реплікації ДНК вірусу Епштейна-Барр

Таким чином, PCAgNPs у нетоксичних концентраціях ефективно пригнічували реплікацію ВЕБ за умов хронічної та літичної ЕБВ-інфекції в лімфобластоїдних клітинах у концентрації 2 мкг/мл.

Була проведена мікроскопія зразків наночастинок та вірусу. При інкубації протягом 1 години було відмічене поодинокі зв'язування вірусу з PCAgNPs, при цьому вірусна частинка є стабільною. Подовження інкубації до 2 годин вірусу з PCAgNPs призвела до пошкодження віронів ВЕБ (Рис.3.6.). Такі пошкодження вірусу призводять до втрати здатності інфікувати клітини.



А) 1 година інкубації; шкала відповідає 50 нм.

Б) 2 години інкубації, шкала відповідає 200 нм

Рис. 3.6. Електронно-мікроскопічне зображення взаємодії наночастинок срібла з вірусом Епштейна-Барр в залежності від часу контакту

Досліджена протівірусна дія наночастинок срібла в ксантані на жаль вірогідної інгібуючої дії відносно вірусу Епштейна-Барр не проявила, що можливо пов'язано з рівнем їх вивільнення з матриці.

Таким чином показано здатність наночастинок срібла в полісахаридній оболонці природнього походження інгібувати реплікацію вірусу Епштейна-Барр, а при тривалому контакті проявляти вірустатичний ефект.

На сьогоднішній день розроблено різні підходи до терапії ВЕБ-асоційованих захворювань, серед них тільки ганцикловір відноситься до переліку етіологічної терапії цього захворювання, але його застосування обмежене високою токсичністю та ефективністю тільки при повному циклі репродукції вірусу, але він не дозволяє елімінації вірусу в трансформованих клітинах, оскільки там в обмеженій кількості відбувається повний цикл реплікації, а його дії на ділянки вірусу, що транскрибуються, відсутні. Нові технології, зокрема нанотехнології, дозволяють сподіватися на виявлення нових потенційних засобів боротьби з вірусом асоційованими патологіями з унікальними

механізмами дії. Так як наночастки це новий рівень взаємодії з клітиною макроорганізму на атомному рівні. Срібло, що зарекомендувало себе з давніх часів, як елемент, що володіє антибактеріальними, противірусними, антифунгальними і протизапальними властивостями. Як стало відомо останніми роками властивості цієї наночастки змінюються залежно від розміру, форми, концентрації в розчині, стабілізуючих факторів, оскільки площа взаємодії, гомогенність розчину та відсутність негативних фізичних взаємодій частинок між собою дозволяють виявляти їх нові біологічні властивості. У ряді наукових публікацій для стабілізації атомів срібла застосовують оболонки з різних матеріалів, у більшості випадків полісахаридів, крім наявності оболонки, підвищує біодоступність наночастинок у макроорганізмі. У цій роботі нами представлені дослідження оригінальної наночастки срібла розміром 10 нм, покритої пористою полісахаридною мембраною, яка гарантує рівномірне виділення атомів срібла на культури ВЕБ-асоційованих клітин.

3.3 Визначення гострої токсичності наносрібла покритих природною

Гостру токсичність препарату наносрібла покритих полісахаридом природного походження вивчали на мишах породи Balb/c відповідно до вимог діючих нормативних документів, а саме препарат вводили одноразово внутрішньочеревно. Дослідження проводили в концентраціях: перша група – 200 мг/кг, друга група – 63 мг/кг та третя група – 22 мг/кг. Контрольним мишам вводили воду – четверта група. Спостереження вели протягом 14 днів. При підборі концентрацій орієнтувалися на рекомендації до їх застосування, а саме 1 крапля в день на людину середньої ваги 80 кг, це близько 50 мкл, вміст срібла 1 мкг. Тобто були використані концентрації більш ніж в 2000 разів

Наступного дня після внутрішньочеревного введення наносрібла 5 мишей із першої групи загинули. При паталогічному розтині тварин виявили стислі легені, печінку та селезінку збільшено у 2,5 рази та були чорного кольору. Наступного дня загинула остання тварина з першої групи та одна тварина у другій групі. Решта тварин до кінця спостереження залишилися живими і не виявляли ознак погіршення стану (табл. 3.7.).

Таблиця 3.7.

**Протокол результатів введення препарату наносрібла мишам
внутрішньочеревно**

доза, мг/кг	Кількість тварин у групі	кількість			всього	співвідношення		середній термін загибелі
		загиблих тварин				%		
		доба						
		1	2	3	14			
188±19	6	5	1			6	100	30
63±6	6	0	1	0	0	1	16,6	48
19±2	6	0	0	0	0	0	0	
контроль	6	0	0	0	0	0	0	

Для обробки отриманих результатів та визначення летальної 50% дози (ЛД50) використовували метод Г. Кербер. ЛД50 обчислювали за формулою

$$ЛД50 = ЛД100 - формула 1$$

Де ЛД100 – доза препарату, що спричиняє загибель всіх тварин,

D – інтервал між кожними двома суміжними дозами;

Z – середнє арифметичне серед тварин, які загинули між двома суміжними групами,

M - кількість тварин у кожній групі

Таблиця 3.8.

В таблиці наведені результати розрахунку ЛД50

Дози, мг/мл	188±19	63±6	19±2
вижило	0	5	6
загинули	6	1	0
z		3,5	0,5
d		125	44
Zd		437,5	22

$$M = 6, \text{ ЛД100} = 188, = 437,5 + 22 = 459,5$$

$$\text{ЛД50} = \text{ЛД100} - = 188 - 459,5 / 6 = 111,4 \text{ мг / кг}$$

Таким чином, при внутрішньочеревному введенні мишам препарату наносрібла ЛД50 склала 111,4 мг/кг.

3.3.2 Визначення гострої токсичності при пероральному введенні

Після введення препарату наносрібла перорально всередину шлунка тварини були неактивними, через 10-20 хвилин відновлювали активність. Спостереження вели протягом 14 днів і вимірювали вагу під час спостереження (табл. 3.9).

Внаслідок 14 денного спостереження не виявили значного коливання ваги у групах тварин. Спостерігали погіршення стану на 10-ту добу в однієї особи, яка до 14 діб загинула. Інші тварини не виявляли візуально погіршення стану.

Таблиця 3.9.

Контроль ваги тварин після перорального введення срібла

	1 група 206 мг/кг	2 група 116 мг/кг,	3 група 56 мг/кг	4 група 26,2 мг/кг	5 група 13,25 мг/кг	контроль
0 точка						
Вага , г	20,6±0,5 1	23,3±1,2	22,3±1,1	20,8±0,76	21,24±0,4 7	22,6±0,8 1
1 доба						
Вага , г	20,7± 0,85	22,7±1,35	23±0,7	21,3±0,5	21,5±0,9	22,5±0,5
3 доба						
Вага , г	20,6 ±1,16	21,8±1,9	21,5±0,7	19,16±0,4	19,68±1,4	22,3±0,3
7 доба						
Вага , г	21,8±1,0 6	22,6±2,6	23,28±0, 7	20,96±0,3 8	19,72±1,5	22,4±0,5
10 доба						
Вага, г	20,6±1,1	*22,16±3,8	23,2±1,4	20,8±2,2	19,96±2,04	23,16±0,9
14 доба						
Вага, г	21,44±0,6	**24,25±1, 9	23,1±2,3	21,1±2,8	20,1±2,7	24,28±0,7

Таким чином, при пероральному введенні наносрібла препарат не був токсичним. Після закінчення спостереження через 14 діб провели морфолого-патологічну візуальну оцінку внутрішніх органів, а також біохімічний аналіз крові.

В результаті огляду внутрішніх органів було виявлено, що у тварин першої групи печінка була нормального кольору, розмір був такий, як у контрольній групі. Селезінка теж була як у контролі. У другій групі печінку в 1,5 – 2 рази було збільшено. Селезінка була збільшена у 2-3,5 рази. У третій групі печінка була як у контрольних, селезінка у трьох мишей з 5 була як у контролю, а у двох у 3 рази більше. У четвертій групі печінка була як у контролю, а селезінка у двох мишей із 5 була збільшена в 1,5-2 рази. У п'ятій групі у 3 мишей печінка та селезінка була трохи менше ніж у контролю, що можна пояснити трохи меншою вагою тварин. В однієї миші печінка була в нормі, а селезінка вдвічі збільшена. У таблиці 3.10 наведено дані зважування тварин та органів після закінчення експерименту.

Таблиця 3.10.

Вага органів тварин після перорального введення наносрібла (14 доба)

	1 група 206 мг/кг	2 група 116 мг/кг,	3 група 56 мг/кг	4 група 26,2 мг/кг	5 група 13,25 мг/кг	Контрольна група
Вага тварин, г	21,44±0,6	24,25±1,9	23,1±2,3	21,1±2,8	20,1±2,7	24,28±0,7
	Вага, г					
Печінка	0,7155	0,955	1,0435	1,0175	1,035	1,007
Нирки	0,175	0,175	0,1425	0,148	0,1625	0,1645
Серце	0,0945	0,1155	0,1035	0,0995	0,0925	0,097
Селезінка	0,0885	0,188667	0,1645	0,1285	0,0645	0,097

Тобто, при пероральному введенні наносрібла спостерігали гіпертрофію печінки та селезінки, що може бути пов'язане з тим, що саме в цих органах наносрібло може накопичуватися. Це, у свою чергу, призводить до їх пошкодження та зміни функцій.

Для виявлення впливу наночастинок срібла на зміну біохімічних показників проаналізували кров тварин через 14 днів після закінчення експерименту (табл. 3.11).

Таблиця 3.11.

**Біохімічний аналіз крові тварин після перорального введення
наносрібла (14 доба)**

	1 група 206 мг/кг	2 група 116 мг/кг,	3 група 56 мг/кг	4 група 26,2 мг/кг	5 група 13,25 мг/кг	Контрольна група
Загальний білок, г/л	33,2	34,8	41,3	25,2	35,8	37,3
АЛТ, од/л	120	75,2	138	120	133,4	120
АСТ, од/л	388	365,4	771	876	747,2	424
Коефіцієнт де Рітца (АСТ/АЛТ)	3,2	4,8	5,58	7,3	5,6	3,5
Холестерин, ммоль/л	2,58	2,01	1,95	2,25	2,54	2,85
Сечовина, ммоль/л	0,44	0,27	0,4	0,33	0,62	0,86
Загальний білірубін, мкмоль/л	4,4	11	2,2	5	7	32
Прямий білірубін мкмоль/л	1,2	0,8	1	2,6	2,21	1,8

В результаті аналізу біохімічних показників крові тварин після одноразового введення наносрібла спостерігали зниження показників

загального білка, сечовини та загального білірубіну (для груп 1-3) порівняно з контролем. АЛТ при даному шляху введення препарату у всіх групах не сильно відрізняється від контролю, а у групі 2 спостерігали зниження цього показника у 1,5 рази. У групах 1 та 2 спостерігали зниження активності АСТ порівняно з контролем, а зі зменшенням концентрації наносрібла у групах 3-5 збільшення у 1,5-2 рази. Збільшення коефіцієнта де Рітиса в групах 2-5 порівняно з контролем вказує на пошкодження в клітинах серця, а також печінки, м'язів, селезінки.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено показники цитотоксичності наночастинок срібла в двох матрицях на життєздатність популяції клітин B95-8, P3HR1, MDCK, Нер-2. Показники CC_{50} для наночастинок в полісахаридній оболонці склали 8мкг/мл для клітин B95-8 та Нер-2, P3HR1 – 75 мкг/мл, для MDCK - 694 мкг/мл; для наночастинок в ксантановій матриці в B95-8 - 0,64 мкг/мл, MDCK – 3,6 мкг/мл. Визначений вплив наночастинок срібла в обох матрицях на культури клітин онкологічного профілю.
2. Визначений вплив наночастинок срібла на ВЕБ-асоційовані культури клітин при індукції вірусу натрій бутиратом, показник CC_{50} клітин B95-8 становив 14 мкг/мл, а P3HR1 – 34 мкг/мл
3. Показано, що наносрібло проявляє меншу токсичність у В-лімфоцитах людини, а у В-лімфоцитах мавпи тамарину цитотоксичність вища. Особливо токсичний вплив відзначено на мітохондрії в клітинах B95-8 та Нер-2
4. Виявлена антивірусна дія наночастинок срібла в полісахаридній оболонці відносно вірусу Епштейна-Барр, в концентрації 2 мкг/мл знижувала рівень ДНК вірусу на 68%. Срібло в ксантановій матриці противірусної активності не проявило.
5. Визначені показники токсичності наночастинок срібла у полісахаридній оболонці *in vivo*. LD_{50} становить 111,4 мг/кг, при пероральному введенні смертності тварин та суттєвих змін в біохімічних показниках сироваток крові не виявлено.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kanda T, Yajima M, Ikuta K. (2019) Epstein-Barr virus strain variation and cancer. *Cancer Sci.* 2019 Apr;110(4):1132-1139. doi: 10.1111/cas.13954.
2. Epstein M. A., Achong B. G., Barr Y. M. (1964) Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. (англ.) // *Lancet* (London, England). Vol. 1, no. 7335. — P. 702—703. — DOI:10.1016/S0140-6736(64)91524-7
3. Matthews, R. E. F. (1979) Classification and nomenclature of viruses. Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses : [англ.] // *Intervirology*. — ICTV 3rd Report. Vol. 12. — P. 129—296.
4. C. Tsang, G. Zhang E. Seto (2010) Epstein-Barr virus infection in immortalized nasopharyngeal epithelial cells: Regulation of infection and phenotypic characterization. *Int. J. Cancer.* P. 127.
5. Murata T, Sugimoto A, Inagaki T, Yanagi Y, Watanabe T, Sato Y, Kimura H. (2021) Molecular Basis of Epstein-Barr Virus Latency Establishment and Lytic Reactivation. *Viruses.* 2021 Nov 23;13(12):2344. doi: 10.3390/v13122344
6. Chesnokova, L.S., Nishimura, S.L. and Hutt-Fletcher, L.M. (2009). Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins $\alpha 6 \beta 6$ or $\alpha 6 \beta 1$. *Proc Natl Acad Sci U S A*, [online], Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19920174> [Accessed 1 Dec. 2009].
7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31315893/>
8. Yoshiyama H., Shimizu N., Takada K. (1995) Стійка інфекція вірусу Епштейна- Барра в Т-клітинній лінії людини: унікальна програма латентної експресії вірусу. *EMBO J.*; 14 :3706–3711. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00040.x.

9. Murata T., Sato Y., Kimura H. (2014) Способи інфікування та онкогенезу вірусом Епштейна-Барр. *Преподобний Мед Вірол.*; 24 :242–253. doi: 10.1002/rmv.1786. Альтман М., Хаммершмідт В. (2005) Вірус Епштейна-Барра забезпечує нову парадигму: вимога для негайного інгібування апоптозу. *PLoS Biol.*; 3 :e404. doi: 10.1371/journal.pbio.0030404.

10. Pareek V, Bhargava A, Gupta R, Jain N, Panwar J. Synthesis and applications of noble metal nanoparticles: a review. *Adv. Sci. Eng. Med.* 2017;9:527–544. doi: 10.1166/ asem.2017.2027.

11. Rehman S, Asiri SM, Khan FA, Jermy BR, Ravinayagam V, Alsalem Z, Jindan RA, Qurashi A. Anticandidal and in vitro anti-proliferative activity of sonochemically synthesized indium tin oxide nanoparticles. *Sci. Rep.* 2020;10:3228. doi: 10.1038/s41598-020-60295-w.

12. Vapat RA, Chaubal TV, Joshi CP, Vapat PR, Choudhury H, Pandey M, Gorain B, Kesharwani P. Огляд застосування наночастинок срібла для біоматеріалів у стоматології. *Матер. Sci. інж. С.* 2018; 91 :881–898. doi: 10.1016/j.msec.2018.05.069.]

13. Хоррамі С., Заррабі А., Халегі М., Данай М., Мозафарі М.Р. Селективна цитотоксичність зелених синтезованих наночастинок срібла проти лінії пухлинних клітин MCF-7 та їх посилені антиоксидантні та антимікробні властивості. *Міжн. Я. Наномед.* 2018 рік; 13 :8013. doi: 10.2147/IJN.S189295.

14. Ramkumar VS, Pugazhendhi A, Gopalakrishnan K, Sivagurunathan P, Saratale GD, Dung TNB, Kannapiran E. Біофабрикація та характеристика наночастинок срібла з використанням водного екстракту морських водоростей *Enteromorpha compressa* та її біомедичні властивості. *біотехнологія. Респ.* 2017; 14 :1–7. doi: 10.1016/j.btre.2017.02.001.

15. Grodzik M., Sawosz E. Вплив наночастинок срібла на розвиток курячого ембріона та морфологію бурси Фабріціуса. *Дж. Анім.*

Feed Sci. 2006 рік; 15 (Додаток 1):111–114. doi: 10.22358/jafs/70155/2006

16. Sawosz F., Pineda L., Hotowy A., Jaworski S., Prasek M., Sawosz E., Chwalibog A. Нанохарчування курячих ембріонів. Вплив наночастинок срібла та АТФ на експресію вибраних генів, які беруть участь у мітогенезі. *Арк. Анім. Nutr.* 2013 рік; 67 :347–355. doi: 10.1080/1745039X.2013.830520.

17. Fehaida A., Taniguchia A. Наночастинки срібла зменшують апоптоз, індукований фактором некрозу пухлини- α *Sci. технол. Adv. Mater.* 2018 рік; 19 :526–534. doi: 10.1080/14686996.2018.1487761.

18. Smith NA, Coleman CB, Gewurz BE, Rochford R. CD21 (Complement Receptor 2) Is the Receptor for Epstein-Barr Virus Entry into T Cells. *J Virol.* 2020 May 18;94(11):e00428-20. doi: 10.1128/JVI.00428-20.

19. Zhang H, Li Y, Wang HB, Zhang A, Chen ML, Fang ZX, Dong XD, Li SB, Du Y, Xiong D, He JY, Li MZ, Liu YM, Zhou AJ, Zhong Q, Zeng YX, Кіфф Е, Чжан З, Гевурц Б.Е., Чжао Б, Цзен М.С. (2018) Ефріновий рецептор А2 є рецептором епітеліальних клітин для проникнення вірусу Епштейна-Барр . *Nat Microbiol* 3 :164–168. doi: 10.1038/s41564-017-0080-8.

20. Wang HB, Zhang H, Zhang JP, Li Y, Zhao B, Feng GK, Du Y, Xiong D, Zhong Q, Liu WL, Du H, Li MZ, Huang WL, Tsao SW, Hutt-Fletcher L, Zeng YX, Kieff E, Zeng MS. 2015. Нейропілін 1 є фактором проникнення, який сприяє зараженню EBV епітеліальних клітин носоглотки . *Nat Commun* 6 :6240. doi: 10.1038/ncomms7240.

21. Li J, Guo Y, Deng Y, Hu L, Li B, Deng S, Zhong J, Xie L, Shi S, Hong X, Zheng X, Cai M, Li M. (2021) Subcellular Localization of Epstein-Barr Virus BLLF2 and Its Underlying Mechanisms. *Front Microbiol.* 2021 Jul 22;12:672192. doi: 10.3389/fmicb.2021.672192.

22. Young LS, Yap LF, Murray PG. Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nat Rev Cancer.* 2016 Dec;16(12):789-

802. doi: 10.1038/nrc.2016.92.

23. Kwun Y, Hong SJ, Lee JS, Son DH, Seo JJ. Chronic Epstein-Barr virus infection causing both benign and malignant lymphoproliferative disorders. *Korean Journal of Pediatrics*. 2014 Sep;57(9):420-424. DOI: 10.3345/kjp.2014.57.9.420.

24. Shimoyama Y, Oyama T, Asano N, Oshiro A, Suzuki R, Kagami Y, Morishima Y, Nakamura S. Senile Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders: a mini review. *J Clin Exp Hematop*. 2006 Mar;46(1):1-4. doi: 10.3960/jslrt.46.1.

25. Гарес В., Паніко Л., Кастань Р., Дельп'єр К., Келлі-Ірвінг М. Роль раннього соціального середовища на інфекцію вірусом Епштейна-Барр: проспективний дизайн спостереження з використанням когортного дослідження тисячоліття. *Епідеміол. Інфікувати*. 2017 рік; 145 :3405–3412. doi: 10.1017/S0950268817002515.

26. Singh L, Kruger HG, Maguire GEM, Govender T, Parboosing R. The role of nanotechnology in the treatment of viral infections. *Ther Adv Infect Dis*. 2017 Jul;4(4):105-131. doi: 10.1177/2049936117713593.

27. Saleh A, Aljada A, El-Abadelah M, Sabri S, Zahra J, Nars A et al., The pyridone-annelated isoindigo (5'-CI) induces apoptosis, dysregulation of mitochondria and formation of ROS in leukemic HL-60 cells. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(1):1958-1974. <https://doi.org/10.1159/000374004>

28. Kurokawa M, Ghosh S, Ramos J, et al. Azidothymidine inhibits NF- κ B and induces Epstein-Barr virus gene expression in Burkitt lymphoma. *Blood*. 2005;106(1):235-240. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3748

25. Drouet, C. Nanotechnologies: A Key Role in Virus Fight. *Biomed J Sci & Tech Res*. 2020; 27(2):20774 - 20782. <https://hal.science/hal-03095518/#:~:text=DOI%20%3A%2010.26717/BJSTR.2020.27.004500>

26. Dykman, L.A., Khlebtsov, N.G. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. *Acta Nature*. 2011; 3(2): 34-55. <https://research.amanote.com/publication/NJL013MBKQvf0BhiAf3i/gold->

nanoparticles-in-biology-and-medicine-recent-advances-and-prospects#:~:text=doi%2010.32607/20758251%2D2011%2D3%2D2%2D34%2D56

27. Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W. & Gurunathan, S. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17: 15-34. DOI: 10.3390/ijms17091534

28. Kinnear, C., Moore, T. L., Rodriguez-Lorenzo, L., Rothen-Rutishauser, B. & Petri-Fink, A. Form follows function: nanoparticle shape and its implications for nanomedicine. *Chem. Rev.* 2017, 117, 11476–11521. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00194

29. Huang, J. et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*. 2007; 18. DOI 10.1088/0957-4484/18/10/105104

30. M.X. Shen, N. Ma, M.K. Li, Y.Y. Liu, T. Chen, F. Wei, et al. Antiviral properties of *R. Tanguticum* Nanoparticles on Herpes Simplex Virus Type I *in Vitro* and *in Vivo*. *Front. Pharmacol.* 2019; 10: 959–972. <https://doi.org/10.1039/C2CP42181J>

31. Flores-Lopez, L.Z., Espinoza-Gomez, H. and Somanathan, R. Silver nanoparticles: Electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects. *Journal of applied toxicology*. 2019; 39(1): 16-26. <https://doi.org/10.1002/jat.3654>

32. Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z.S., Chen, G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug discovery today*. 2015; 20(5):595-601. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.014>

33. T.A.J. Souza, L.P. Franchi, L.R. Rosa, M.A.M.S. da Veiga, C.S. Takahashi, Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol.*

- Environ. Mutagen. 2016; 795: 70–83.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.11.002>
34. Loza, K., Heggen, M., Epple, M., Synthesis, Structure, Properties, and Applications of Bimetallic Nanoparticles of Noble Metals. *Adv. Funct. Mater.* 2020; 30: 1909260. <https://doi.org/10.1002/adfm.201909260>
35. Srinoi, P.; Chen, Y.-T.; Vittur, V.; Marquez, M.D.; Lee, T.R. Bimetallic Nanoparticles: Enhanced Magnetic and Optical Properties for Emerging Biological Applications. *Appl. Sci.* 2018; 8: 1106. doi:10.3390/app8071106
36. Lan K., Verma S.C., Murakami M. (2007). Epstein-Barr Virus (EBV): Infection, Propagation, Quantitation, and Storage. *Current Protocols in Microbiology*. 14. сс. 1 – 17.
37. Уоллз, Э. та Крофорд, Д. (1990). Культивування клітик В95-8 - Лімфоцити. *Методи*. Київ: Мир.
38. Berridge P.M., Herst A.S. (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotech. An. Rew*, Vol. 11 сс. 127 – 152. [http://dx.doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
39. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007;39:44–84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
40. Клімкіна, І.І., Ґрунтова, В.Ю. (2015). Основи екологічної токсикології. Методичні рекомендації до виконання практичних робіт з дисципліни студентами напряму підготовки 6.040106 Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування, Д. : НГУ.
41. Rao I. B., Tang R.C. (2017) Green synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activities using aqueous *Eriobotrya japonica* leaf extract *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.*, 8, Article 015014
42. Salunkhe N.S., Koli S.H., Mohite B.V., Patil V.S. (2022) Xanthomonadin

- mediated synthesis of biocidal and photo-protective silver nanoparticles (XP-AgNPs) Res. Chem., 4, Article 100663
43. Liu I., Sonshine D.A., Shervani S., Hurt R.H. (2010) Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces ACS Nano, 4, pp. 6903-6913
 44. Patra S., Golder A.K., Uppaluri R.V. (2023) Ultrasensitive Colorimetric Detection and Determination of Hg (II) Using Bioinspired AgNPs Synthesized from Mature Camellia Sinensis Leaves Res. Optics, 11, Article 100411
 45. Chandrakant K.T., Reddy D.S., Rohini A. (2013) Green synthesis of silver nanoparticles and their application for the development of optical fiber based hydrogen peroxide sensor Sens. Actuators B, 183, pp. 144-149
 46. Alshehri Ali H., Jakubowska M., Anna M. (2012) Enhanced Electrical Conductivity of Silver Nanoparticles for High Frequency Electronic Applications
 47. Appl. Mater. Interfaces., 4, pp. 7007-7010
 48. Ahmed T., Ogulata R.T., Gülnaz O. (2022) Recoverable antibacterial property loss of green synthesized AgNPs loaded cotton fabrics with time Res. Chem., 4, Article 100462
 49. Polte J., Tuaeov X., Wuithschick M., Fischer A., Thuenemann A.F., Rademann K., Kraehnert R., Emmerling F. (2012) Formation Mechanism of Colloidal Silver Nanoparticles: Analogies and Differences to the Growth of Gold Nanoparticles ACS Nano, 6, pp. 5791-5802
 50. Mukaratirwa-Muchanyereyi N., Gusha C., Mujuru M., Guyo U., Nyoni S. (2022) Synthesis of silver nanoparticles using plant extracts from *Erythrina abyssinica* aerial parts and assessment of their anti-bacterial and anti-oxidant activities Res. Chem., 4, Article 100402
 51. Li Y., Lin Z., Zhao M. (2016) Silver nanoparticle based codelivery of Oseltamivir to inhibit the activity of the H1N1 influenza virus through ROS-mediated signaling pathways. ACS Appl. Mater. Interfaces, 8, pp. 24385-

24393

52. . Liu Y., Chen S., Zhong L., Wu G. (2009) Preparation of high-stable silver nanoparticle dispersion by using sodium alginate as a stabilizer under gamma radiation. *Radiat. Phys. Chem.*, 78, pp. 251-255
53. Barrere G.C., Barber C.E., Daniels M.J. (1986) Molecular cloning of genes involved in the production of the extracellular polysaccharide xanthan by *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 8, pp. 372-374
54. Garcia-Ochoa F., Santos V.E., Casas J.A. (2000) Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotech Adv.*, 8, pp. 549-57955.
55. Denise F. S. Petri (2015) Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications *J. Appl. Polym. Sci.*, 132, p. 42035