

# БІМЕТАЛІЧНІ Ag:Au НАНОЧАСТИНКИ ЯК ІНГІБІТОРИ ВІРУСУ ЕПШТЕЙНА-БАРР

ЗАТОВСЬКА Т.В., ГОЛОВАНЬ Г.В., БАРАНОВА Г.В., ХАРЧУК М.С., ЗАГОРОДНЯ С.Д.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної Академії Наук України

tzatovska@ukr.net

Вірус Епштейна-Барр (ВЕБ) - це онкогенний вірус родини *Herpesviridae*, що притаманний лише людині і має селективний тропізм до епітеліальних клітин та В-лімфоцитів. Цей вірус причетний до розвитку ряду видів раку, включаючи карциному шлунка і носоглотки, пухлини гладких м'язів, В-клітинні новоутворення, такі як лімфома Ходжкіна, дифузна велика В-клітинна лімфома, лімфома Беркітта, а також лімфоми з Т- і натуральних кілерів клітин. ВЕБ-інфекція є першим відомим фактором ризику смертності від раку в країнах, що розвиваються. На сьогоднішній день проти ВЕБ-інфекції немає ефективних лікарських препаратів та вакцин.

В останнє десятиліття нанотехнології продемонстрували свою перспективність у боротьбі з вірусами, і, зокрема, наночастинки (нч) срібла і золота привернули увагу наукової спільноти завдяки своєму широкому спектру противірусної активності та потенційному застосуванню в різних біомедичних галузях. В численних дослідженнях було показано ефективність застосування срібних та золотих наночастинок проти патогенних вірусів людини.

Біметалічні наночастинки отримували шляхом одночасного відновлення іонів металів з використанням вихідних молярних відношень металів  $Ag:Au = 3:1$ . Синтез усіх наночастинок відбувався при UV-опроміненні,  $t=25^{\circ}C$ . Концентрація металу в кінцевих розчинах становила  $C(M) \frac{1}{4} 1 \times 10^{-4}$  моль/л (100 мкМ/л), молярне співвідношення металів до триптофану для всіх колоїдів –  $m(Met):m(Trp)=1:2$ . Розмір усіх наночастинок становив 40 нм. Морфологія досліджуваних наночастинок представлена на Рис.1.

Цитотоксичність наночастинок срібла, золота та біметалеків визначали у концентраціях 10 мкМ/л, 1 мкМ/л та 0,1 мкМ/л. Усі досліджувані зразки характеризувались низькою цитотоксичністю і не викликали значної загибелі клітин при інкубації протягом 48 год (Рис. 2, 3). За результатами МТТ-аналізу (рис.2) найменш токсичними були наночастинки Au. За даними аналізу з трипановим синім (не приводяться) максимальна загибель клітин була виявлена під дією срібних нч (у концентрації 0,1 мкмоль/л) і становила 12,8%. При цьому усі наночастинки підвищували лізосомальну активність клітин (Рис. 3).

Використання металічних наночастинок має перспективи і в якості засобів проти ракових захворювань. Головними перевагами їх використання є низька токсичність до нормальних клітин, відсутність виникнення резистентності уражених клітин та напрямлена дія, оскільки наночастинки можуть накопичуватися в скупченнях ракових клітин і бути носіями специфічних речовин. Було показано, що біметалічні наночастинки, що мають у своєму складі срібло і золото, мають вищу протипухлинну та протимікробну дію, ніж моно- наночастинки.

Раніше було показано ефективну протиракову дію біметалічних наноконпозицій срібла і золота, синтезованих в Інституті хімії поверхні ім.О.О. Чуйка НАН України, як препаратів для комплексної терапії онкозахворювань [1, 2].

Метою даної роботи було визначити антивірусну дію біметалевих наночастинок Ag:Au на моделі ВЕБ-асоційованої культури клітин P3HR1 у порівнянні з монометалевими зразками наночастинок.

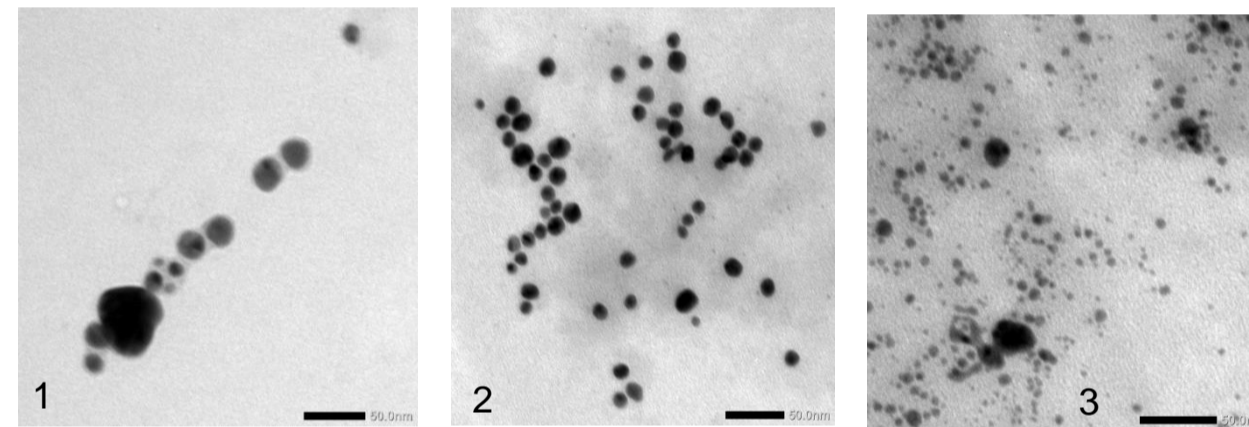


Рис.1. Наночастинки Ag UV1(1), Au UV5 (2), біметалеки Ag:Au UV2 (3)

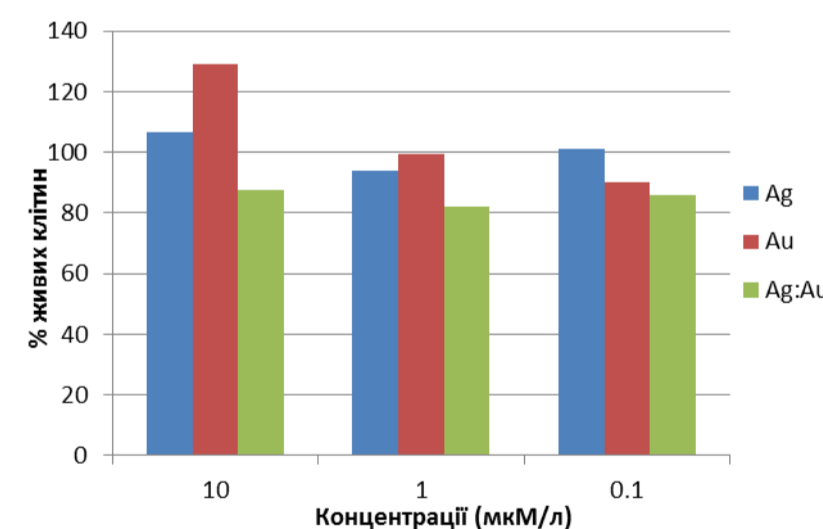


Рис.2. Цитотоксичність наночастинок Ag, Au, Ag:Au за результатами МТТ-аналізу.

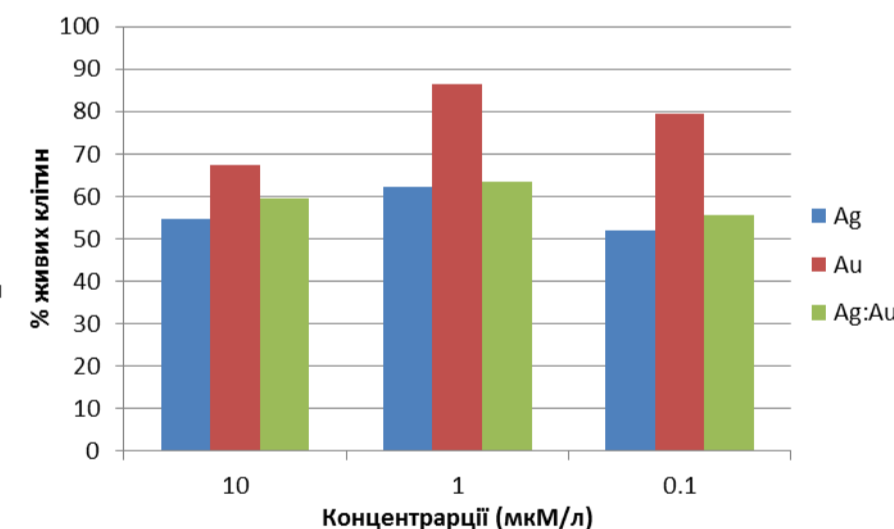


Рис.3. Цитотоксичність наночастинок Ag, Au та Ag:Au (тест з нейтральним червоним).

Досліджувані наночастинки Ag, Au та біметалічні наночастинки Ag:Au (3:1) були синтезовані в Інституті хімії поверхні ім. О.О.Чуйка НАН України. В роботі були використані клітини лінії P3HR1, що являють собою В-лімфоцити людини, трансформовані ВЕБ та продукують вірус. Визначення цитотоксичної дії наночастинок на клітини було проведено стандартними методами – за допомогою МТТ-тесту та з використанням барвників трипанового синього та нейтрального червоного.

Антивірусну активність наночастинок проти вірусу Епштейна –Барр досліджували через 48 годин контакту, після чого виділяли ДНК ВЕБ і оцінювали концентрацію методом ПЛР (RT-PCR) з застосуванням комерційних тест-систем. Аналіз морфології наночастинок та їх взаємодії з вірусними частинками було виконано за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії. При цьому використовували концентровані очищені препарати ВЕБ, одержані методом ультрацентрифугування в градієнті щільності CsCl.

Досліджували дію наночастинок на ВЕБ методом трансмісійної електронної мікроскопії. Наночастинки додавали до вірусної суспензії у співвідношенні 1 : 1 без попереднього розведення та інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі. В якості контролю були вірусні препарати без наночастинок. Результати представлені на Рис. 4. Було виявлено, що окремі наночастинки срібла сорбуються в невеликій кількості на поверхні ВЕБ, а при збільшенні їх концентрації спостерігалось руйнування вірусних частинок. При додаванні наночастинок золота спостерігали їх значну адсорбцію на поверхні вірусних частинок, проте руйнування вірусу не відбувалось. Після інкубації ВЕБ з біметалічними наночастинками Ag:Au спостерігали руйнування вірусних частинок.

Антивірусну активність наночастинок проти ВЕБ оцінювали відносно рівня ПЛР-продуктів вірусної ДНК в контрольних клітинах P3HR1, рівень яких приймали за 100%. Серед досліджуваних зразків наночастинок антивірусну дію проявляли тільки біметалічні наночастинки Ag:Au, які у концентрації 0, 1 мк моль /л пригнічували синтез ДНК ВЕБ на **53,6%**.

Таким чином, було показано, що біметалічні наночастинки Ag:Au (3:1) мають невисоку виражену противірусну активність та віруліцидну дію проти вірусу Епштейна-Барр та є ефективнішими за монометалічні наночастинки срібла і золота.

Список посилань:

1. Shmarakov O., Mukha Iu.P., Karavan V.V., Chunikhin O.Yu., Marchenko M.M. Smirnova N.P., Eremenko F.M. Tryptophan-assisted synthesis reduced bimetallic gold/silver nanoparticle cytotoxicity and improves biological activity. *Nanobiomedicine*, 2014; 1:6.
2. Mukha Iu., Vityuk N., Grodzyuk G., Shcherbakov S., Lyberopoulou A., Efstathopoulos E., Gazouli M. Anticancer effect of Ag, Au, and Ag/Au bimetallic nanoparticles prepared in the presence of tryptophan. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2017; 17(12):8987-8994.

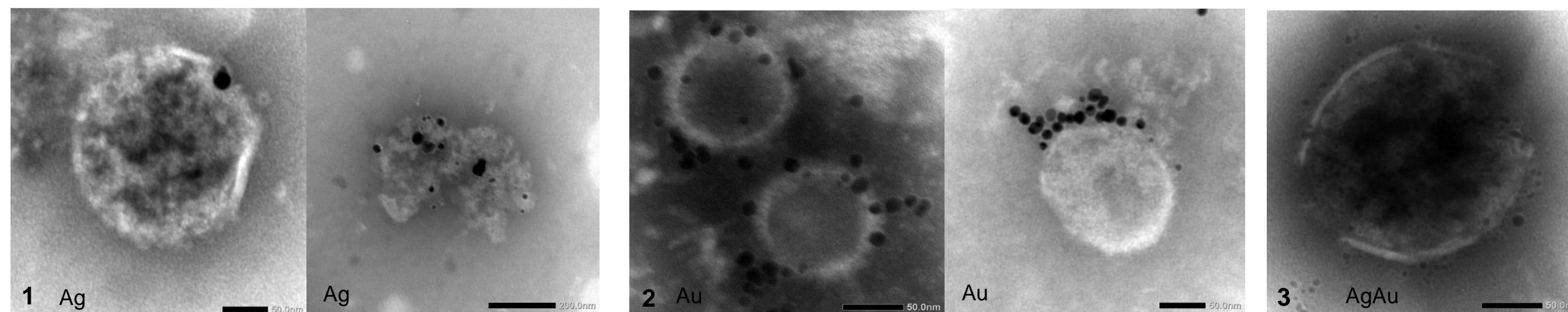


Рис. 4. Контактна взаємодія ВЕБ з наночастинками срібла (1), золота (2) і біметалічних наночастинок Ag:Au (3)