УДК 636.09:57.083.2:578.834:546.26
УКПП 72.11.11-00.00
№ Держреєстрації 0120U105193

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ
Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів
03151, м. Київ, вул. Донецька, 30; тел./факс (044)2457608

ЗАТВЕРДЖУЮ
Заступник директора ДНКІБШМ
к. вет. н., Михайло БАБКІН
«13» грудня 2021 р.

НАУКОВИЙ ЗВІТ ПРО РЕЗУЛЬТАТИ РЕАЛІЗАЦІЇ ПРОЄКТУ №2020.01/0044

«Протикоронавірусна активність водорозчинних C_{60} фулеренів у створенні нових прототипів профілактичних і терапевтичних препаратів: *in silico, in vitro* та *in vivo* скринінги»

(заключний)

Науковий керівник, завідувачка відділом біотехнології та контролю вірусних препаратів, доктор ветеринарних наук, професор
Зінаїда КЛЕСТОВА

2021

Результати роботи розглянуто Вченою радою ДНКІБШМ, протокол №12 від 14.12.2021р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР,
Зав відділом біотехнології та
контролю вірусних препаратів,
доктор вет. наук, професор — З. С. Клестова

Відповідальні виконавці:

Завідувач лабораторії
імуноферментного аналізу, імунних
сироваток, противірусних факторів та
алергенів відділу біотехнології та
контролю вірусних препаратів
ДНКІБШМ, канд. біол.наук — А. К. Вороніна

Завідувач лабораторії стандартизації і
контролю ВІЗ відділу біотехнології та
контролю вірусних препаратів
ДНКІБШМ, канд. біол.наук — О. С. Ватліцова

Науковий співробітник
відділу біотехнології та контролю
вірусних препаратів ДНКІБШМ — А. Ю. Ющенко

Старший науковий співробітник
відділу біотехнології та контролю
вірусних препаратів ДНКІБШМ — Г. С. Кузьмич

Аспірант (науковий керівник
З.С. Клестова) — Ю. Ю. Дремух

Біолог І категорії — О. В. Сичова

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 113 с., табл. 17, рис. 15, 47 джерела, Додатків -5.

Ключові слова: C_{60} ФУЛЕРЕНИ, КОРОНАВІРУСИ, ПРОТИКОРОНАВІРУСНА АКТИВНІСТЬ, СКРИНІНГ *IN VITRO, IN VIVO, IN OVO*

Об'єкт дослідження – взаємодія C_{60} фулерену та коронавірусів тварин з чутливими біологічними системами – культурами клітин *in vitro*, курячими ембріонами *in ovo* та лабораторними тваринами – щурами та курчатами *in vivo.*

Мета роботи – підготовка біологічних систем до проведення оцінки ефективності застосування C_{60} ВРФ; оцінка ефективності протикоронавірусної та токсичної дії ВРФ C_{60} у системах *in vitro* та *in vivo*, визначення терміну придатності препарату.

Методи дослідження – вірусологічні, культуральні, токсикологічні, біохімічні, гематологічні методи, трансмісивна електронна та світлова мікроскопії.

Підготовлені до роботи чутливі культури клітин (КК). Проведене адаптування в системах *in vitro* та *in ovo* коронавірусів тварин: коронавірусу ВРХ, вірусу інфекційного бронхіту курей (ІБК), вірусу трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС). Досліджена цитопатична *in vitro* та ембріон-інфікуюча *in ovo* дія і визначена інфекційна активність модельних вірусів. Досліджено різні концентрації C_{60} ВРФ в схемах *in vitro, in ovo* та *in vivo* і визначена гранична концентрація (МДК) C_{60} ВРФ. Проведено комплекс досліджень *in vitro, in ovo* та *in vivo* з визначення віруліцидної, профілактичної і терапевтичної дії C_{60} ВРФ. Проведено токсикологічні, біохімічні та гематологічні дослідження впливу C_{60} ВРФ. Отримано позитивні результати по застосуванню C_{60} ВРФ у лікувальній схемі на різних біологічних моделях, а також доведено, що сполука є безпечною при застосування *in vivo.*

ABSTRACT

Key words: C_{60} FULLERENS, CORONAVIRUSES, ANTICORONAVIRUS ACTIVITY, *IN VITRO, IN VIVO, IN OVO* SCREENING

Research object - C_{60} fullerene – animal coronavirus interaction in sensitive biological models – cell cultures *in vitro,* chicken embryos *in ovo* and laboratory animals – rats and chicks *in vivo.*

Purpose of the research – to prepare biological systems for the evaluation of the effectiveness of C_{60}WSF; to evaluate the effectiveness of anticoronavirus and toxic effects of C_{60}WSF *in vitro* and *in vivo* and to determine an acceptable storage period needed to maintain viability of C_{60}WSF solution.

Research methods – cultural, toxicological, biochemical, hematological methods, transmissive electron and light microscopy.

Susceptible cell cultures (CC) were prepared for work. The adaptation of animal coronaviruses *in vitro* and *in ovo* systems was conducted. The following viruses were used as model objects of our research: bovine coronavirus (BCoV), chicken infectious bronchitis virus (IBV), swine transmissible gastroenteritis virus (TCoV). The cytopathic and embryo-infecting activity *in vitro* and *in ovo* was studied and the titers of the model viruses were determined. Variable concentrations of C_{60}WSF were studied *in vitro, in ovo* and *in vivo*, as well as the maximum allowable concentration (MAC) of C_{60}WSF was determined. A set of *in vitro, in ovo* and *in vivo* studies to determine the virucidal, prophylactic and therapeutic effects of C_{60}WSF. Toxicological, biochemical and hematological studies on the impact of C_{60}WSF were performed. Positive results were obtained on the use of C_{60}WSF in a treatment scheme in various biological models, and it has been proven that the C_{60}WSF compound is safe when administered *in vivo.*

ЗМІСТ

Перелік скорочень, умовних познак……	9
Вступ……	11
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури…….	15
1.1 Коронавіруси та їх значення в інфекційній патології……..	15
1.2 Інфекційний бронхіт курей (ІБК)……..	20
1.3 Трансмісивний гатроентерит свиней……	21
1.4 Коронавірус великої рогатої худоби…….....	22
1.5. Фізико-хімічні властивості вірусу ІБК……	23
ЕТАП 1 (2020 р.) ……..……	24
РОЗДІЛ 2. Матеріли та методи досліджень……..	24
2.1 Матеріали та обладнання……..	24
2.1.1 Матеріали біологічного походження ……	24
2.1.1.1 Клітинні лінії……..……	24
2.1.1.2 Тест-штами вірусів ……..……	24
2.1.2. Реактиви…….	25
2.2 Кріоконсервування та розморожування клітинних ліній……	25
2.3 Методика визначення інфекційної активності коронавірусу ВРХ, вірусу трансмісивного гастроентериту у чутливих культурах клітин……	26

2.4 Методика визначення інфекційної активності вірусу ІБК на курячих ембріонах……	27
2.5 Проведення трансмісивної електронної мікроскопії……..	30
2.6 Статистична обробка результатів досліджень…….	31
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ АНАЛІЗ…….	32
3.1 Підготовка до роботи культур клітин, наявних у депозитарії ДНКІБШМ……	33
3.2 Визначення інфекційної активності модельних коронавірусів ВРХ, ТГС та ІБК в обраних чутливих культурах клітин та курячих ембріонах……	34
3.3 Електронно-мікроскопічні дослідження коронавірусів тварин (вірусу ТГС та коронавірусу ВРХ)……	37
3.4 Дослідження токсичності в системі *in vitro*. Визначення МДК зразку C_{60} ВРФ для кожної культури клітин і курячих ембріонів…….	39
Висновки……	41
Етап 1 (2021 р.)…….	42
РОЗДІЛ 2. Матеріли та методи досліджень……..	42
2.1 Матеріали та обладнання…….	42
2.2 Матеріали біологічного походження …….	43
2.2.1 Клітинні лінії……..……	43
2.2.2 Кріоконсервування та розморожування клітинних ліній……...	43
2.2.3 Підрахунок кількості клітин ……..	44
2.2.4 Тест-штами вірусів ……..……	45
2.2.4.1 Визначення інфекційної активності вірусу в культурі клітин ….	46
2.2.5 Курячі ембріони ……...	46
2.3 Реактиви……..	46

2.4 Методика визначення інфекційної активності коронавірусу ВРХ, у чутливих культурах клітин в системі *in vitro*……..	47
2.5 Методика визначення інфекційної активності вірусу ІБК на курячих ембріонах…….	48
2.6 Віруліцидні схеми перевірки дії фулерену C_{60} …….....	51
2.7 Профілактична схема……	52
2.8 Лікувальна (терапевтична) схема……	52
2.9 Статистична обробка результатів досліджень……..	52
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ АНАЛІЗ……..	53
3.1 Дослідження в системі *in vitro* ……..	53
3.1.1 Культивування коронавірусу ВРХ у чутливій біологічній системі *in vitro*…….	53
3.1.1.1 Визначення впливу наносполуки фулерену C_{60} за застосування у віруліцидних, профілактичній та терапевтичній схемах *in vitro*.....	55
3.2 Дослідження наносполуки фулерену C_{60} в системі *in ovo* ……	58
3.2.1 Підбір ефективного штаму вірусу інфекційного бронхіту курей для перевірки властивостей наносполуки C_{60} в системі *in ovo* ……..	58
3.2.2 Перевірка впливу наносполуки фулерену C_{60} на курячі ембріони.	61
3.2.3 Перевірка дії наносполуки фулерену C_{60} в системі *in ovo* при різних схемах застосування (терапевтичній, профілактичній, віруліцидній)……..	62
Висновки……	66
Етап 2 (2021 р.)……..	68
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження……	68
2.1 Характеристика тест-системи……	68
2.2. Досліджувана речовина…….	68
2.3 Дослідження гострої токсичності……..	69

2.4 Дослідження субхронічної токсичності……	70
2.5 Визначення безпечності (токсичної дії) одноразового введення C_{60}ВРФ на 1-денних курчатах…….	73
2.6 Визначення протикоронавірусної ефективності дії C_{60}ВРФ in vivo у профілактичній та лікувальній схемах застосування на 1-денних курчатах……	73
2.7 Статистична обробка результатів досліджень…….	75
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ АНАЛІЗ……	76
3.1 Дослідження гострої пероральної токсичності C_{60}ВРФ …….	76
3.2 Дослідження субхронічної токсичності C_{60}ВРФ ……	83
3.2.1 Клінічні ознаки токсичності та виживання тварин……	83
3.2.2 Динаміка маси тіла щурів……	84
3.2.3 Реєстрація споживання корму та води……	86
3.2.4 Клініко-лабораторні дослідження……	87
3.2.5 Морфологічний аналіз внутрішніх органів щурів……	90
3.3 Визначення безпечності (токсичної дії) одноразового введення C_{60}ВРФ на 1-денних курчатах……	92
3.4 Визначення протикоронавірусної ефективності дії C_{60}ВРФ *in vivo* у профілактичній та лікувальній схемах застосування на 1-денних курчатах……	92
Висновки……	96
Узагальнення результатів……	97
Перелік джерел посилання……	103

Скорочення та умовні познаки

АГ	–	антиген
АТ	–	антитіло
АР	–	алантоїсна рідина
ВООЗ	–	Всесвітня організація охорони здоров'я
ВРЗ	–	відкрита рамка зчитування
ВРХ	–	велика рогата худоба
ВНА	–	віруснейтралізуюче антитіло
год	–	години
DMEM	–	Дюльбекко модифіковане середовище Ігла (поживне середовище для культивування культур клітин)
ДНК	–	дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕІД	–	ембріональна інфекційна доза
$ЕІД_{50}$	–	доза вірусу, що викликає патологоанатомічні зміни у 50% заражених курячих ембріонів
ЕМ	–	електронно-мікроскопічний метод
ІБК	–	інфекційний бронхіт курей
ІД	–	інфекційні дози
ІФА	–	імуноферментний аналіз
кД	–	кілодальтон
КЕ	–	курячі эмбріони
$ЛД_{50}$	-	летальна доза, що викликає загибель 50% тварин
ЗТ-ПЛР	–	зворотня полімеразна ланцюгова реакція
МЕБ	–	Міжнародне Епізоотичне бюро
м.м.	–	молекулярна масса
МПА	–	м’ясопептонний агар
МПБ	–	м’ясопептонний бульйон
МФА	–	метод флуорисціюючих антитіл

НА	–	нейтралізуючі антитіла
н/д	–	не досліджували
н.м.	–	нанометри
н.п.	–	нуклеотидні пари
НЦШМ ДНКІБШМ	–	Національний центр штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів
РГА	–	реакція гемаглютинації
РДП	–	реакція дифузної преципітації
РЗГА	–	реакція затримки (гальмування) гемаглютинації
РН	–	реакція нейтралізації
РНК	–	рибонуклеїнова кислота
РІД	–	реакція імунодифузії
РІФ	–	реакції імунофлуоресценції
РН	–	реакція вірусної нейтралізації
РНГА	–	реакція непрямої гемагглютинації
РНК	–	рибонуклеїнова кислота
РСК	–	реакція зв‘язування компліменту
рр.	–	роки
ПЛР	–	полімеразно-ланцюгова реакція
п.н.	–	полінуклеотидні пари
ТГС	–	трансмісивний гастроентерит свиней
ЦПД	–	цитопатична дія
ФБР	–	фосфатно-буферний розчин
хв	–	хвилини
C_{60}ВРФ	–	водорозчинний C_{60} фулерен
PBS	–	фосфатно-буферний розчин
USEPA	–	Агентство захисту навколишнього середовища, США

ВСТУП

Проблеми вірусних інфекцій привертають увагу людства тільки у випадках глобальних епідемій, ензоотій та пандемій, що ми і спостерігаємо нині у 2020 році з поширенням коронавірусу, який викликав пандемію Covid-19. Нажаль, тільки при значних втратах ми звертаємо увагу на проблему та усвідомлюємо можливі негативні наслідки.

Але, існування взаємодії між вірусом і його «хазяїном» триває тисячоліття, і у випадку з вірусами, можемо констатувати, що вони значно «старші» людства за віком.

Представлені вашій увазі отримані результати на модельних об’єктах, коронавірусах тварин, з якими ми провели дослідження в різних напрямках, які в ряді випадків можливо екстраполювати при вивченні коронавірусів людини, як відомих донині, так і тих, що виникли, емерджентних, таких як збудники захворювань SARS, MERS, Covid-19.

Поява нового члена родини Coronaviridae, який спричинив пандемію 2020 року, вимагає детальних досліджень еволюції коронавірусів, їх структури та властивостей, взаємодії з клітинами та різними хімічними сполуками. Сучасні нанобіотехнології можливо будуть в нагоді при вирішенні числених клінічних проблем, пов'язаних з пандемією COVID-19. Зокрема, вони можуть запропонувати нові терапевтичні підходи з використанням біосумісних наноструктур із "специфічною" противірусною активністю. Тому, молекула нанофулерену C_{60} представляє інтерес з точки зору застосування у боротьбі з коронавірусами завдяки своїй високій біологічній активності.

Спалахи інфекційних захворювань є загрозою, перед якою людство за умов глобалізації суспільства постає усе частіше. Через високу мобільність населення, сучасний розвиток транспортного сполучення, особливо небезпечні інфекційні захворювання поширюються доволі швидко. Наразі вірусні інфекції становлять переважну частину інфекційної патології людини та тварин. Щорічно вони призводять до значних втрат практично у всіх вікових і соціальних групах населення, в тваринницькій галузі. Нинішня пандемія COVID-19 спричинена

новим коронавірусом SARS-CoV-2, який відноситься до тієї ж групи, що і добре відомі SARS і MERS - збудники атипової пневмонії і близькосхідної лихоманки.

Коронавіруси - найбільша група вірусів, що належать до порядку *Nidovirales.* Їх поділяють на чотири групи: α, β, γ і Δ. Характерною рисою коронавірусів є широкий спектр їх природних господарів у поєднанні з вираженим видовим обмеженням патогенності. За здатністю вражати різні органи коронавіруси можуть бути віднесеними до пантропних вірусів - вони здатні інфікувати епітелій слизових оболонок кишечника, дихальних шляхів, нервові клітини та викликати печінкові, ентеротропні, пневмотропні та нейротропні захворювання різного ступеня тяжкості. При порівнянні коронавірусів тварин, що є представниками різних груп (вірус ТГС - TGEV, вірус ВРХ – BCoV та вірус ІБК (IBV), виявлено, що α- і β-коронавіруси (TGEV та BCoV) утворюють кластери частинок з подвійною мембраною (DMV), яка є досить консервативною серед коронавірусів, іноді це пов'язано із звивистою формою мембрани. Водночас γ-коронавірус ІБК (IBV) індукує широкі парні мембрани та менші 60-80 нм сфери на додаток до DMV. За винятком філогенезу досліджуваних коронавірусів, єдиною відомою характеристикою, яка відрізняє віруси свиней (TGEV) та великої рогатої худоби (BCoV), є їх унікальний неструктурний протеїн 1 (nsp1), різний за розміром і послідовністю, а також відсутність nsp1 у вірусу ІБК (IBV). Крім того, гомології геному BCoV порівняно з IBV та TGEV становлять лише у 48,3% та 53%, відповідно. Тому дослідження з розробки нових противірусних препаратів мають базуватися на моделях коронавірусів, що належать до різних груп. Оскільки вірус SARS-CoV-2 належить до групи бетакоронавірусів, ми вважаємо доцільним проведення досліджень в умовах лабораторій з рівнем біологічної безпеки BSL-2 на модельних апатогенних для людини вірусах тварин - прототипах збудників COVID-19, що відносяться до тієї ж генетичної групи.

Розвиток інфекційного процесу, в тому числі при вірусних хворобах – результат тривалої взаємодії двох біологічних систем – хазяїна і паразита (вірусу). В його основі лежить закон паралельної еволюції цих двох складових, відкритий ще М.І. Вавіловим. Суть закону, як відомо, полягає в тому, що популяція хазяїна і

паразита знаходиться в стані безперервної взаємодії. Причому, кожна з них виступає відносно один до одного в ролі фактора природного відбору. Тому інфекція, як біологічне явище є суб'єктом і об'єктом еволюційного процесу.

Дослідження взаємодії вірусів і клітин, а також багатоклітинних організмів, у тому числі і тварин, є одним із найактуальніших загальнобіологічних питань. Ця взаємодія складна, багатофакторна, залежить від безлічі чинників, тісно пов'язаних між собою на рівні фізичної, хімічної взаємодії, а також на рівні біологічних (біоценотичних) зв'язків та міжпопуляційних відносин.

Як відомо, ця взаємодія багато в чому залежить від виду, штаму, структури, стану вірусу, клітин і організмів, що призводить до різноманіття взаємовідносин між організмом (клітиною) хазяїна та вірусу і впливає на патогенез хвороб. Патогенез вірусних захворювань починається на клітинному рівні. Клітина - динамічна система, яка відрізняється безперервною послідовною зміною внутрішньоклітинних процесів. Інтенсивність цих процесів при впливах патогенів різко змінюється. Це призводить до різних наслідків. Особливо важливим для клітини є стабільність ядерного апарату. Він є регуляторним центром клітини і саме з його пошкодженням по'язують негативний вплив патогенів на нормальне проходження клітиною всього життєвого циклу.

Спалахи SARS, MERS та Covid-19 стимулювали до дослідження їх збудників, за результатами яких було виявлено велику кількість відповідних антивірусних мішеней, таких як вірусні протеази, полімерази та внутрішні білки коронавірусів. Вважають, що війчасті і келихоподібні епітеліальні клітини, які вкривають носову порожнину, є основними мішенями потрапляння віруса SARS-CoV-2 в організм людини. Саме ці клітини містять високий рівень білків ACE2 і TMPRSS2, на яких коронавірус адсорбується (прикріплюється) за допомогою специфічних білків оболонки. За інфікування білковий шип на поверхні віріона SARS-CoV-2 також прикріплюється до білка-рецептора клітин легені людини, зокрема ACE2, і проникає всередину органу. Віруси SARS-CoV (2002-2003рр.) та SARS-CoV-2 (2020р.) здатні проникати всередину макрофагів і дендритних клітин, однак у цьому випадку спостерігається лише абортивна інфекція. У хворих на COVID-19

виявлено аномальне зменшення кількості імунокомпетентних клітин та пригнічення їх функціональної активності. Відтак проблема нейтралізації активності коронавірусу потребує детального вивчення його структурної організації - складових частин, особливо тих, які беруть участь у взаємодії з клітинами-мішенями різних органів людей (у зв'язуванні та проникненні) та механізмах розмноження вірусу в клітині-мішені. Володіючи такою важливою інформацією, можна запропонувати ефективні профілактичні і терапевтичні препарати, які будуть перешкоджати або потраплянню коронавірусу в клітини-мішені, або його розмноженню в них. З іншого боку, можна визначити ті структурні елементи коронавірусу, які будуть найкращим чином викликати імунну відповідь в організмі людини на його проникнення, що є основою для створення ефективних противірусних вакцин.

Сучасні нанобіотехнології здатні вирішити численні клінічні та суспільні проблеми охорони здоров’я, що виникли внаслідок пандемії COVID-19. Так, вони активно сприяють розробці противірусних нанопокриттів для «пом'якшення» дії коронавірусів, повітряних фільтрів та захисних масок на основі нановолокон, які перешкоджають проникненню вірусів, принципово нових діагностичних тест-систем і таргетних наноплатформ для доставки противірусних ліків. Нарешті, вони пропонують нові терапевтичні підходи за використання біосумісних наноструктур, що володіють «специфічною» противірусною активністю. Відтак привабливою є «нобелівська» молекула C_{60} фулерену, яка містить 60 атомів вуглецю, розташованих у вершинах правильних п'ятикутників і шестикутників на її майже сферичній поверхні (діаметр 0,72 нм). Завдяки наявності у структурі подвійних хімічних електронодефіцитних зв’язків, C_{60} фулерен легко приєднує вільні радикали, тобто є потужним антиоксидантом

Нами досліджується найактуальніший для птахівництва коронавірус - вірус інфекційного бронхіту, для свинарства – коронавірус трансмісивного гастроентериту свиней та для скотарства - коронавірус ВРХ. Всі ці віруси тварин слугують апатогенними для людини модельними об’єктами, що в умовах України та лабораторії рівня BSL-2 є прийнятним для проведення досліджень антикоронавірусної дії сполуки фулерену C_{60} в умовах *in vitro.*

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Коронавіруси та їх значення в інфекційній патології

Коронавіруси (*Coronaviridae, CoVs*) - родина, що включає 46 видів вірусів, об'єднаних в 2 підродини, які здатні викликати захворювання у людей, хатніх, свійських та диких. Коронавіруси поділяють на чотири групи: альфа, бета, гамма та дельта коронавіруси. Спочатку віруси відносили до цих груп на основі серологічних даних, але тепер поділяють за філогенетичним кластеруванням.

Коронавіруси є оболонковими вірусами з одноланцюговим РНК-геномом і з нуклеокапсидом спіральної симетрії. Нуклеокапсид оточений білковою мембраною і ліпідоутримуючою зовнішньою оболонкою, від якої відходять шиповидні відрости, що нагадують корону, за що родина і отримало свою назву. Віріони кулясті, розміром приблизно 125 нм (від 60 до 220 нм.), але можуть мати плеоморфну форму, що встановлено за допомогою кріоелектронної томографії та кріоелектронної мікроскопії [1]. Найбільш видатною особливістю коронавірусів є клубоподібні шиповидні відростки, що стирчать із поверхні віріону. Ці шипи є визначальною рисою віріону і їх поява надає їм вигляду сонячної корони, що відображається в їх назві. Вірусні частинки містять чотири основні структурні білки. Це білок шипа (S), мембранний (M), оболонковий (E) та нуклеокапсидний (N) білки. Всі вони кодуються в межах 3 'кінця вірусного геному [2].

Початкове прикріплення віріона до клітини-господаря ініціюється взаємодією між S білком та його рецептором [1, 2]. Місця доменів зв'язування рецепторів (RBD) в межах S1 області протеїну коронавірусу S змінюються залежно від вірусу, при цьому деякі мають RBD на N кінці S1 (MHV), в той час як інші (SARS-CoV) мають RBD на C-кінці S1 [3, 4]. Взаємодія S-білка з рецептором клітини-мішені є визначальним фактором при інфікуванні різних видів господарів, а також регулює тканинний тропізм вірусу. Після зв'язування з рецептором вірус повинен отримати доступ до цитозолю клітини-господаря. Це як правило, здійснюється за допомогою кислотозалежного протеолітичного розщеплення білка

S катепсином, TMPRRS2 або іншою протеазою з подальшим злиттям вірусних і клітинних мембран. Розщеплення білка S відбувається на двох ділянках всередині S2 частини білка, причому перше розщеплення, важливе для поділу RBD та злиття доменів S білка [4] та по-друге важливе, для одержання пептиду злиття (розщеплення при S2′). Злиття зазвичай відбувається всередині підкислених ендосом, але деякі коронавіруси, такі як MHV (мишачий коронавірус), можуть зливатись на плазматичній мембрані.

Коронавіруси викликають велику кількість різноманітнітних захворювань у людини та тварин. Вони здатні викликати важкі хвороби великої рогатої худоби, свиней, курей, собак та котів, що призвело до більш детальних досліджень цих вірусів наприкінці XX ст. Наприклад, вірус трансмісивного гастроентериту свиней (TGEV) та вірус епідемічної діареї свиней (PEDV) викликають важкі гастроентерити у поросят молодшого віку, що призводить до значної захворюваності, смертності та врешті-решт економічних втрат [5,6]. Вірус свинячого гемаглютинируючого енцефаломієліту (PHEV) здебільшого призводить до кишкової інфекції, але має здатність також вражати нервову систему, що викликає енцефаліт, блювоту і зневоднення у свиней [5]. Кишковий коронавірус котів (FCoV) викликає легку або безсимптомну інфекцію у домашніх котів, але під час персистуючої інфекція, мутація може перетворити вірус у високо вірулентний штам FCoV (вірус інфекційного перитоніту котів (FIPV), призводить до летальних наслідків за хвороби, яка називається котячим інфекційним перитонітом (FIP). FIP має різні форми перебігу, схожі на захворювання у людини, такі як саркоїдоз. FIPV має макрофаговий тропізм, і вважається, що він викликає порушення експресії цитокінів та / або хемокінів та виснаження лімфоцитів, що призводить до летальних наслідків захворювання [7]. Коронавірус ВРХ, щурів та вірус інфекційного бронхіту курей (IBV) спричиняють легку та важку інфекцію дихальних шляхів у великої рогатої худоби, щурів та курей. Коронавірус великої рогатої худоби завдає значних втрат тваринництву. Він також поширився та інфікує різних жуйних тварин, включаючи лосів, оленів та верблюдів. На додаток до важких респіраторних захворювань, вірус викликає діарею («зимова дизентерія» та

"морська лихоманка"), що призводить до зниження ваги, зневоднення, зменшення вироблення молока та депресії [8, 9]. Деякі штами вірусу інфекційного бронхіту курей, гамма-коронавірусу, також впливають на урогенітальний тракт курей, що викликає захворювання нирок. IBV значно зменшує продукцію та вагу яєць, що щорічно спричиняє значні втрати в галузі виробництва курятини [8]. Зовсім недавно був виявлений новий коронавірус названий SW1, який виділений та ідентифікований від померлого кита белуги [10]. Окрім цього, спостерігається значний інтерес до ідентифікації нових коронавірусів кажанів, оскільки вони є ймовірним джерелом як SARS-CoV так і MERS-CoV, так і потенційним резервуаром нових вірусів [11].

До спалаху SARS-CoV коронавіруси вважали лише малозначимими патогенами, що викликають респіраторні інфекції у людини легкого ступеня тяжкості. Два з цих коронавірусів людини - це коронавіруси (HCoV-229E та HCoV-NL63), а інші два - бета-коронавіруси (HCoV-OC43 та HCoV-HKU1). HCoV-229E та HCoV-OC43 було виділено майже 50 років тому [12, 13], тоді як HCoV-NL63 та HCoV-HKU1 були лише нещодавно ідентифіковані після спалаху SARS-CoV [12, 13, 14]. Ці віруси ендемічні для популяції людини, що викликали 15–30% інфекцій дихальних шляхів щороку. Більше тяжке захворювання вони викликають у новонароджених, у людей похилого віку та у людей з іншими основними захворюваннями, у цих когортах фіксували більшу частоту інфекцій нижніх дихальних шляхів. HCoV-NL63 також пов'язаний з гострим ларинготрахеїтом (крупом) [15]. Один цікавий аспект цих вірусів - це їх відмінності в генетичній мінливості.

Ізоляти HCoV-229E з усього світу мають лише мінімальну розбіжність послідовностей (сіквенсів) [16], на відміну від ізолятів HCoV-OC43 які в різні роки демонструють значну генетичну мінливість [13]. Це, ймовірно, пояснює нездатність HCoV-229E перетнути видовий бар'єр для інфікування мишей, в той час як HCoV-OC43 і близько споріднений коронавірус великої рогатої худоби, BCoV, здатні заражати мишей та декілька видів жуйних тварин. На основі здатності MHV викликати демієлінізуючу хворобу, можна припустити, що коронавірус

людини може бути причетним до розвитку розсіяного склерозу (РС).

Вірус SARS-CoV, бета-коронавірус групи 2b, був ідентифікований як збудник спалаху захворювання тяжкого гострого респіраторного синдрому (SARS), що стався в 2002–2003 роках в Китаї, провінції Гуандун. Це одне з найважчих захворювань, що викликане коронавірусом. Протягом спалаху 2002–2003 рр. було зафіксовано приблизно 8098 випадків хвороби, 774 з яких мали летальний вихід, і, як наслідок – рівень смертності 9%. Цей показник був значно вищим у людей похилого віку, у яких рівень смертності наближався до 50% (у осіб старше 60 років). Крім того, спалах призвів до економічних збитків у розмірі майже 40 мільярдів доларів. Під час епідемії близько споріднені віруси були виділені у кількох екзотичних тварин (родини віверових, класу ссавців, роду хижі), включаючи гімалайських пальмових цівет та єнотових собак [17, 18]. Однак, було визнано, що SARS-CoV походить від кажанів [17, 18, 19]. Насправді два нових коронавіруси, пов'язані з SARS, були нещодавно виявлені, які були більш подібні до SARS-CoV, ніж будь-які інші віруси, ідентифіковані на сьогоднішній день. Було виявлено, що вони використовують той самий рецептор, що і вірус людини, ангіотензин-перетворюючий фермент 2 (ACE2), надаючи додаткові докази того, що SARS-CoV бере свій початок від кажанів [20].

Новий смертельний коронавірус людини з'явився на Близькому Сході в 2012 році і був названий коронавірусом Близько-Східного респіраторного синдрому (MERS-CoV), який виявили як збудник у ряді високопатогенних інфекцій дихальних шляхів у Саудівській Аравії та інших країнах світу Близького Сходу. Станом на 27 серпня 2014 року загалом було зареєстровано 855 випадків MERS-CoV, 333 випадки смертей і рівень смертності сягав майже 40%, за даними Європейського центру профілактики та контролю захворювань [21, 22, 23].

MERS-CoV являє собою бетакоронавірус групи 2c, що має високу спорідненість до двох раніше ідентифікованих коронавірусів кажанів, HKU4 та HKU5 [24]. Серологічними дослідженнями виявилено антитіла до MERS-CoV у одногорбих верблюдів Близького Сходу [23, 25], більш того, клітинні лінії верблюдів були пермісивними для реплікації MERS-CoV [25]. Це свідчить про те,

що одногорбі верблюди можуть бути природними господарями [26]. На сьогоднішній день залишається визначити, скільки випадків MERS-CoV можна віднести до тих, що викликані від проміжних господарів у порівнянні з випадками передачі від людини до людини.

Внаслідок унікального механізму реплікації коронавіруси мають високу частоту рекомбінації, а також високу швидкість мутації, що може призводити до швидкої адаптації до нових господарів та екологічних ніш. З цієї причини випадки, коли коронавіруси, які є патогенними для тварин, набули здатності інфікувати людей і потім поширюватися між людьми, стають непоодинокими. Зокрема, SARS, MERS і COVID-19 — приклади захворювань, спричинених коронавірусами тварин, які розширили свій спектр патогенності на людину.

На сьогоднішній день не існує противірусних терапевтичних препаратів, які спеціально спрямовані на коронавіруси людини, є лише підтримуючі методи лікування. Інтерферони (ІФН) *in vitro* лише частково ефективні проти коронавірусів. ІФН у поєднанні з рибавірином може мати підвищену активність *in vitro* відносно деяких корона вірусів, у порівнянні з дією лише ІФН. Ефективність цієї комбінації *in vivo* вимагає подальшої оцінки [27].

Існує велика кількість відповідних антивірусних мішеней, таких як вірусні протеази, полімерази та внутрішні білки. Таким чином, робота з розробки ліків, спрямованих на процеси, які здатні інгібувати вірусну реплікацію залишається високоактуальною. Для профілактики коронавірусних інфекцій доступні лише обмежені варіанти. Так, вакцини були зареєстровані для IBV, TGEV та коронавірусної інфекції собак. Більш того, повідомлялось про випадки, коли вакцинні штами беруть участь у селекції нових патогенних штамів коронавірусів шляхом рекомбінації циркулюючими штамами [27].

1.2 Інфекційний бронхіт курей (ІБК)

Інфекційний бронхіт курей (ІБК) – гостре висококонтагіозне захворювання, що уражує птицю різного віку, яке проявляється у курчат респіраторним або уремічним синдромом, у курей – враженням репродуктивних органів, що призводить до тривалого зниження несучості та суттєвого погіршення якості яєць.

До вірусу ІБК найбільш чутливими є курчата 7–45–добового віку та доросла птиця в репродуктивний період. Основним джерелом поширення інфекційного бронхіту є хворі та перехворілі тварини, які виділяють вірус у зовнішнє середовище та є вірусоносіями до 105 діб після одужання [28-30]. Крім того, контаміновані предмети, обладнання, матеріали та персонал можуть бути потенційними розповсюджувачами вірусу за непрямої передачі на значні відстані [31].

Діагноз ставлять на підставі епізоотологічних даних, клінічних ознак хвороби, патологоанатомічних змін і лабораторних досліджень, таких як: ПЛР, РДП, РІФ, РНГА, РН, ІФА та метод біопроби.

Контроль інфекційного бронхіту (ІБ) базується на щепленні птахопоголів’я з використанням живих та інактивованих вакцин різних серотипів. Однак, відсутність або низький перехресний захист від щеплення існуючими вакцинами призводить до великих труднощів у профілактиці та контролі, тому це захворювання є однією з найсерйозніших проблем та однією з основних причин величезних економічних збитків у промисловому птахівництві в усьому світі [32, 33, 34].

Висока мінливість коронавірусу птахів, постійно виникаючі нові варіанти вимагають специфічного і чутливого методу, наприклад, як ЗТ-ПЛР, що дозволяє проводити масові дослідження для контролю циркулюючих варіантів вірусу ІБК.

1.3. Трансмісивний гастроентерит свиней

Трансмісивний гастроентерит свиней — гостра висококонтагіозна хвороба, головним чином, поросят 2-тижневого віку, що характеризується катарально-геморагічним гастроентеритом і проявляється блювотою, діареєю, дегідратацією організму і високою летальністю поросят [35, 36]. Інкубаційний період триває від 12 до 36 годин в залежності від віку тварини. Смертність у деяких випадках може досягати 100% [36, 37].

Вірус ТГС вперше був виділений в 1970 році [38]. Вірус має антигенну спорідненість з гемаглютинуючим коронавірусом, що викликає енцефаломієліт у поросят, а також з коронавірусом собак і збудником інфекційного перитоніту котів. Вірус аглютинує еритроцити великої рогатої худоби, морських свинок і курчат [36].

У організм свиней різного віку вірус потрапляє головним чином фекально-оральним шляхом і, проходячи через шлунок, потрапляє в кишківник [35, 38]. В епітелії тонкого відділу кишківника він інтенсивно репродукується, викликаючи руйнування ворсинок [76]. Через декілька годин в просвіті кишки накопичується велика кількість вірусу, звідки він потрапляє в кров і в усі внутрішні органи. В епітелії легенів відбувається вторинний цикл репродукції, що призводить до істотних ушкоджень альвеолярних макрофагів і епітелію легенів [36, 38]. У результаті інтенсивного руйнування циліндричного епітелію кишок ворсинки атрофуються та заміщуються кубічним і плоским епітелієм. У 90% новонароджених поросят атрофія ворсинок відбувається впродовж перших 12-18 год. після зараження [35, 37]. Дегенерація, атрофія і десквамація епітелію кишківника і ворсинок призводять до порушення електролітно-водного балансу в організмі, ацидозу, порушенню травлення і обміну речовин, що обумовлює профузну діарею і розвиток вираженого дисбактеріозу. У травному тракті починає переважати гнильна мікрофлора [35].

1.4 Коронавірус великої рогатої худоби

Коронавірусна інфекція великої рогатої худоби (ВРХ) — хвороба, яка етіологічно зумовлюється коронавірусом ВРХ (BCoV) і характеризується здебільшого гострим перебігом з ураженням шлунково-кишкового тракту та іноді респіраторних органів [38]. Телята за відсутності колострального імунітету інфікуються з віку 10 діб до 2 міс. Захворюваність становить 40–100%, летальність — 15–20% [39]. Аналогічну патологію реєструють і серед дорослих переважно високопродуктивних тварин.

Коронавірус, що спричиняє захворювання ВРХ (BCoV) і штам ОС-43 коронавірусу людини (HCoV) характеризуються антигенною спорідненістю. Так, порівняльне вивчення їхніх 4-х головних структурних білків (gp 190, gp 140, gp 52 і gp 26) свідчить про ідентичність цих протеїнів, а ступінь гомології на рівні РНК становить понад 96% [40]. Значення коронавірусу ВРХ як причини захворювання людини нині не визначено, але потенційна небезпека цих вірусів для людей має велике епідеміологічне значення, особливо у сільській місцевості.

Коронавірус ВРХ здатний зумовлювати латентну інфекцію — клінічно здорова худоба може бути носієм вірусу, виділяючи його 3 міс. [24]. Інкубаційний період хвороби триває 18 – 24 год, у телят старше 2-місячного віку — 36–48 год. У тварин виявляють пригнічення, зниження апетиту, розрідження фекальних мас, водночас температура тіла залишається в межах фізіологічної норми або дещо нижче. Через 3–8 діб настає загибель [40, 41]. Вірус переважно розмножується в дистальній частині тонкого та товстого кишечнику, в епітеліальних клітинах слизової носової порожнини, трахеї і легень. Незважаючи на розмноження в респіраторному тракті, коронавірус майже не спричиняє респіраторних захворювань у телят. Клінічно здорова ВРХ може бути хронічним носієм вірусу [40, 42] і в період отелення виділяти вірус із фекаліями.

З метою діагностики коронавірусної інфекції ВРХ використовують серологічні методи, спрямовані на виявлення комплементзв’язувальних (реакція зв’язування комплементу — РЗК), преципітувальних (реакція дифузної

преципітації — РДП), віруснейтралізувальних (реакція нейтралізації — РН) і аглютинувальних (реакції затримки — РЗГА та непрямої гемаглютинації — РНГА) антитіл [43, 40]. Крім того, поширений метод ІФА, ПЛР, РІФ [44, 45] та тест-комплекти для експрес-діагностики (DipFit Bovine coronavirus). У лабораторних умовах коронавірус культивують у культурах клітин нирки ембріона ВРХ, коронарних судин і трахеї теляти, легень ембріона корови (після попередньої адаптації), в яких вірус спричиняє цитопатичні зміни.

Найефективнішим заходом боротьби з коронавірусом ВРХ є використання засобів специфічної профілактики, здебільшого комбінованих, до складу яких входять також ротавірус ВРХ та E. coli [46], щепленням сухостійних корів за 4–6 тижнів до отелення, що забезпечує формування у новонароджених тварин напруженого колострального імунітету [47].

1.5 Фізико-хімічні властивості коронавірусів

Щодо стійкості збудників коронавірусних інфекцій, то слід зазначити, що вірус не є стійким у зовнішньому середовищі, чутливий до більшості дезінфектантів і фізичних методів знезараження. Нагрівання до 56 ° С інактивує більшість штамів протягом 15-45 хвилин, до 45 ° - за 90 хвилин [58]. Під дією ультрафіолетових променів 10%-й розчин соди руйнує вірус упродовж 3–10 хв. Вірус більш стабільний при низьких значеннях pH, ніж при високих. Наприклад, при pH 3,0 вірус залишається стабільним 14 днів. Окрім того, коронавіруси чутливі до органічних розчинників (ефіру, хлороформу), але водночас є резистентними до дії протеаз (трипсину, пепсину, амілази) [92, 96].

ЕТАП 1

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали та обладнання

2.1.1 Матеріали біологічного походження

2.1.1.1 Клітинні лінії

У якості тест-об'єктів у дослідах *in vitro* використані перещеплювані культури клітин тварин за інкубації клітин нирки вівці (НВ), нирки свині (СНЕВ) та нирки золотистого хом'ячка (ВНК-21).Моношар клітин вирощували у пластикових культуральних флаконах об'ємом 25 та 50 $см^3$ та у 96-лункових культуральних планшетах в умовах CO_2 інкубаторуEsco(виробництва Сінгапур) за температури 37ºС, 5%-й подачі CO_2та 88%-й вологості повітря. В якості підтримуючого середовища використовували аналогічне ростовому середовище, але без додавання сироватки крові ВРХ.Культури клітин булипротестовані на відсутність контамінації сторонніми мікроорганізмами у тіогліколевому середовищі та МПБ. Зберігали культури клітин у кріосховищі ДНКІБШМ в умовах рідкого азоту (мінус 196ºС).

2.1.1.2 Тест-штами вірусів

Роботи були проведені з використанням коронавірусу великої рогатої худоби (коронавірусу ВРХ), коронавірусу інфекційного бронхіту курей (вірусу ІБК), коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней (вірус ТГС), які отримано з Національного Центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ. Зберігання вірусів у сховищі НЦШМ ДНКІБШМ за температури мінус 80 ºС, Всі експерименти проведені у відповідності до 2 рівня біологічної безпеки лабораторій.

2.1.2 Реактиви

Пересіви культур клітин здійснювали з використанням: середовища DMEM, розчину трипсин -ЕДТА, 10% фетальної сироватки крові ВРХ, з додаванням антибіотику гентаміцину:

- поживне середовище «DMEMHighGlucose», w/L – Glutamine, w/oSodiumPyruvate, SterileFiltered; виробник Biowest, серія S17885L0102, придатне до 26.07.2019, для культивування культури клітин;

- фетальну сироватку крові великої рогатої худоби «FetalBovineSerumPremium», виробник Biowest, серія S14317S181B, придатна до 28.01.2021;

- трипсин «Trypsin 0,25%», w/oCalcium, w/oMagnesium, w/oPhenolRed, SterileFiltered; виробник Biowest серія S16067L0910, придатний до 27.04.2019.

- розчин версену 0,02%, виробництва ДНКІБШМ, придатний до 27.05.2020;

- антибіотик «Гентаміцин», розчин для ін’єкцій 4%; виробник ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров’я», серія 10118, придатний до 01.2023.

Методичною основою запланованих досліджень були теоретичні загальнонаукові прийоми досліджень і методи, що ґрунтуються на сучасних наукових засадах з розробки противірусних терапевтичних, хіміопрофілактичних та інфекційних сполук та препаратів.

2.2. Кріоконсервування та розморожування клітинних ліній

Кріоконсервацію культури клітин проводили за загальноприйнятою методикою, яка включала наступні кроки: оцінка відповідності клітинної лінії критеріям заморожування (зовнішній вигляд, морфологічні характеристики, пізня фаза росту, відсутність контамінації сторонніми агентами); трипсинізація моношару клітин та підрахунок їх концентрації; центрифугування та розведення середовищем для кріоконсервування з додаванням 10 % диметилсульфоксиду; розподіл суспензії по кріовіалам; заморожування кріовіал при умові 1^{o}С/хв до температури мінус 70^{o}С з подальшим перенесенням у рідкий азот.

При розморожуванні, кріоампули з необхідним клітинними лініями вилучали з рідкого азоту та миттєво поміщували у резервуар із стерильною водою температури 37°С або у водяну баню. Після відтаювання, кріоампули оброблювали 70°С етиловим спиртом та відкривали в межах ламінарного потоку. Переносили за допомогою автоматичної піпетки покраплинно у флакон з середовищем для культур клітин, інкубували протягом доби після чого змінювали середовище.

2.3 Методика визначення інфекційної активності коронавірусу ВРХ, вірусу трансмісивного гастроентериту у чутливих культурах клітин

За добу до проведення дослідження у 96-лункові планшети вносили по 0,1 $см^3$/лунку суспензії культури клітин ПО або СНЕВ, або ВНК-21 із концентрацією 10^5 клітин/$см^3$ і витримували 24 години у CO_2-інубаторі за температури 37 °С і концентрації CO_2 – 5 % для формування моношару.

Після повного відтанення зразків вірусів їх ретельно струсили використовуючи вортекс. Після чого готували 10-кратні розведення - 9 $см^3$ середовища ДМЕМ та 1 $см^3$ відповідного тест-штаму вірусу. Після чого проводили дослідження їх інфекційної активності методом титрації у відповідних чутливих культурах клітин. Для цього з заздалегідь підготованого планшету з виповненим моношаром видаляли ростове середовище та вносли відповідні розведення в об’ємі 0,1 $см^3$ на лунку. На кожне розведення використовували по 6 лунок. Усі дослідження супроводжували контролем культури клітин.

Інокульовані плашки поміщували у вологу камеру CO_2-інкубатора за температури 37 °С і концентрації CO_2 – 5 % та інкубували 120 годин. По завершенню часу інкубації плашки за допомогою інвертованого мікроскопу дослідили на наявність цитопатичної дії вірусу (ЦПД). У випадку визначення інфекційної активнсті коронаврусу ВРХ, наявність ЦПД додатково підвержували в реакції гемаглютинації з 0,75 % суспензією еритроцитів миші. Для цього з кожної лунки планшету відбирали в окремий планшет по 50 мкл культуральної рідини та вносили по 50 мкл 0,75% еритроцитарної маси мишей відповідно, витримували 20 хв. та оцінювали реакцію гемаглютинації. Інфекційну активність розраховували

методом Кербера.

2.4 Методика визначення інфекційної активності вірусу ІБК на курячих ембріонах

Активність вірусу ІБК у вірусовмісному матеріалі визначали шляхом титрування в курячих ембріонах, що розвиваються (КЕ) 8-9-ти добового віку, з наступною індикацією за показниками загибелі КЕ у період понад 24 години після зараження та появою КЕ-карликів у кінці терміну інкубації:

– для визначення інфекційної активності вірусу відбирають добре розвинуті курячі ембріони приблизно одного розміру, масою 55±10 грам. На шкаралупі кожного ембріону олівцем відмічають місце майбутнього зараження та мітку із зазначенням досліджуваного матеріалу, рівня розведення вірусного матеріалу та номеру курячого ембріону в кожному розведенні. Оскільки вірусовмісний матеріал містить велику кількість вірусних часток необхідно готувати його розведення. Використовують для цього десятикратні серії (інтервал 1 lg) розведення фосфатно-сольовим буфером (pH 7,2) або розчином NaCl (0,85-0,9%), які містять 500 мкг стрептоміцину, 500 ОД ампіциліну та 15 мкг гентаміцину в1 $см^3$.

– десятикратні зростаючі розведення готують наступним чином: у ряд попередньо маркованих (1-е розведення, 2-е розведення і т.д.) пробірок вносять по 1,8 $см^3$ розчинника. В першу пробірку (1-е розведення вірусу) піпеткою вносять 0,2 $см^3$ вірусовмісного матеріалу, використану піпетку занурюють у дезрозчин, вміст перемішують 3–4 рази новою піпеткою, наповнюючи та випускаючи з неї рідину, 0,2 $см^3$ рідини 1-го розведення вірусу переносять в другу пробірку, що відповідає 2-му розведенню (10^{-2}), піпетку занурюють у дезрозчин. Новою піпеткою перемішують вміст пробірки і 0,2 $см^3$ рідини переносять у наступну пробірку. Описану процедуру повторюють послідовно до отримання необхідного найвищого розведення (наприклад: від 10^{-1} до 10^{-9}). Обов'язковою вимогою є постійна заміна піпеток. У процесі переносу вірусної суспензії в наступну пробірку піпетка не повинна торкатись рідини та стінок пробірки, оскільки надлишок вірусу, що

знаходиться на стінках піпетки змивається і може спотворити справжнє його розведення. Для визначення титру інфекційної активності ВІБ-вмісного матеріалу використовують його робочі розведення від 10^{-4} до 10^{-9}.

– після закінчення серій розведень (не менше 3 на один матеріал) проводять зараження КЕ шляхом введення матеріалув об'ємі0,1–0,2 $см^3$ в алантоїсну порожнину КЕ. Кожним розведенням матеріалу заражають не менш ніж по 4КЕ.В якості контролю залишають 10 і більше не заражених КЕ.

– для зараження використовують разові стерильні інсулінові шприци з голками.

– після введення вірусного матеріалу, отвори на шкаралупі ембріонів заклеюють парафіном або клеєм ПВА.

– заражені ембріониінкубують за температури 37±0,5°С протягом 10 діб. Поворотний механізм інкубатора вимикають. Овоскопіюзаражених ембріонів проводять двічі на добу.

– загибель ембріонів у перші 24 після зараження вважають неспецифічною і в обрахунках не враховують. Загибель КЕ після 24 год вважають специфічною (внаслідок дії вірусу ІБК).

– після закінчення терміну інкубації (10 діб) всі ембріони, що залишились живими, охолоджують за температури 2-8°С упродовж 16–18 годин.

– дослідні та контрольні КЕ зважують і заносять показники до таблиці (додаток А). Потім проводять розтин КЕ, зважують власне ембріони та знову вносять значення у відповідні графи. Визначають середнє арифметичне значення ваги яйця та власне ембріону контрольної (не зараженої) групи.

– визначають коефіцієнт карликовості КЕ контрольної групи якспіввідношення середньої арифметичної маси власне ембріона до середньої арифметичної маси цього ж яйця .

– індивідуально визначають показник КК дослідних ембріонівяк співвідношення маси власне ембріона до маси цього ж яйця.

– визначають індекс карликовості дослідних КЕ за співвідношенням КК дослідного ембріону до КК контрольної (не зараженої) групи КЕ.КЕ які мають показник ІК нижче ніж 0,87 (за рівня вірогідності 95%) або 0,82 (за рівня 99%) вважають карликами.

– Проводять обробку результатів. Позитивними реагуючими вважають КЕ, які загинули в період понад 24 год після зараження та ембріони-карлики після закінчення терміну інкубації. На основі цього розраховують титр інфекційної активності вірусу за методомКербера в модифікації Ашмаріна і виражають в $ЕІД_{50}$ за наступною формулою:

$$Lg\ ЕІД/_{0,1см}{}^{3} = lgDm - \Omega\ (\sum\mu - 0,5), \qquad (2.1)$$

де $ЕІД/_{0,1см}{}^{3}$- титр вірусу в об’ємі 0,1 $см^3$, здатний викликати інфікування 50% заражених КЕ;

Dm – максимальна доза,що досліджується;

Ω – логарифм розведення (в нашому прикладі 10-ти кратне розведення),

$\Omega = 1$;

μ– відношення числа КЕ в досліджуваних розведеннях, які дали позитивний, до загального числа заражених;

$\sum\mu$– сума значення μ, знайдена у всіх досліджених розведеннях.

2.5 Проведення трансмісивної електронної мікроскопії

Електронну мікроскопію вірусних суспензій проводили в. Інституті ботаніки ім. Холодного НАН України на просвічувальному електронному мікроскопі (ТЕМ; JEM-1230, Японія) з роздільною здатністю 0,2 нм та діапазоном збільшення 50-600 000. Для електронної мікроскопії суспензію, що містить вірус, попередньо концентрували з використанням ПЕГ-6000 (поліетиленгліколь 6000). Для осадження клітинного детриту вірусвмісну суспензію центрифугували 7 хв при 1000 g. До суспензії супернатанту додавали 8% ПЕГ з pH 7,4 і залишали на 16 год при плюс 4 ^{o}C. Потім суміш центрифугували протягом 20 хв при 16000g, після чого осад розчиняли у фосфатному буфері 1/100 від початкового об'єму вірусної суспензії.? Фіксацію матеріалу проводили 3% глутаральдегідом при 0,1 М натрій-какодилатного буфера при pH 7,2, залишали на 3 год. Після вакуумної інфільтрації промивали натрій-какодилатним буфером 2 рази протягом 15 хв. Додатково фіксували (постфіксаця) чотири оксидом осмію, який одночасно фарбував клітинні структури. Залишали на 1 год при кімнатній температурі, а потім - на 14 год при 4 ^{o}C. Після цього його промивали буфером і зневоднювали етиловим спиртом у зростаючій концентрації (30^{o}– 50^{o}- 70^{o}– 80^{o}– 96^{o}), додаючи краплі нітрату урану. Потім зневоднювали100% етиловим спиртом, 100% ацетоном і 100% спиртом у співвідношенні 1:1. Зневоднений матеріал заливали синтетичними епоксидними смолами: 5 крапель DDSA, 3 краплі Epon-812, 2 краплі Araldite®, 10 крапель DMP. Розрізи досліджуваного матеріалу проводили на спеціальному пристрої - ультратомі - за допомогою скляних ножів. Товщина отриманих надтонких зрізів становила 30-50 нм. Фарбування (контрастування) зрізів виконувалось солями важких металів (свинцю, осмію, урану тощо), які по-різному асоціюються з окремими структурними компонентами, надаючи їм різну електронну щільність. Пофарбовані надтонкі скибочки клали на металеву підкладку та досліджували за допомогою ТЕМ, що дозволило детально вивчити морфологічну структуру вірусу, його морфогенез в зараженій клітині та в майбутньому перевірити дію водорозчинних наночастинок фулерену C_{60} на структуру вірусу.

2.7 Статистична обробка результатів досліджень

Статистичну обробку результатів здійснено за допомогою програми MSExcel.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ АНАЛІЗ

(Етап 1 2020 рік)

В даний час вірусні інфекції є переважною частиною інфекційної патології у людей та тварин, призводячи щорічно до значних втрат майже у всіх вікових та соціальних групах населення, негативно впливають на галузь тваринництва і економіку.

Патогенез вірусних захворювань починається на клітинному рівні, але слід враховувати, що родина *Coronaviridae* містить подібні, але не однакові віруси. Вони складні за своєю антигенною структурою, тому антигенна гетерогенність визначає високу частоту повторних заражень іншими серологічними варіантами коронавірусів. Отже, для досліджень нами були обрані різні за антигенною стркутурою коронавіруси тварин, що слугували в якості моделей апатогенних для дослідників. Для досліджень процесів взаємодії коронавірусів з чутливою клітиною нами проведені досліди *in vitro* (у культурах клітин тварин) та *in ovo* (в 9-10 денних курячих ембріонах).

Завдання організації-партнера (ДНКІБШМ) на 2020 рік:

1. Визначити та підготувати до роботи культури клітин, наявні в депозитарії культур клітин ДНКІБШМ (освіження після зберігання у кріосзовищі, проведення не менше трьох послідовних пасажів, визначення потенціалу росту та інших характеристик, притаманних цим культурам клітин).
2. Культивування чутливих перещеплюваних культур клітин тварин з колекції ДНКІБШМ для модельних досліджень invitro із коронавірусами тварин.
3. Провести адаптування *in vitro* модельних коронавірусів, наявних в колекції ДНКІБШМ до чутливих біологічних систем з метою підвищення їх інфекційних властивостей.
4. Визначити інфекційну активність модельних коронавірусів ВРХ та ІБК в обраних культурах клітин та курячих ембріонах.
5. Дослідити токсичність в системі *in vitro* та визначити МДК зразку C_{60} ВРФ для кожної культури клітин і курячих ембріонів.

3.1 Підготовка до роботи культур клітин, наявних у депозитарії ДНКІБШМ

Даний етап досліджень включав освіження клітинних ліній після кріозберігання шляхом проведення трьох послідовних пасажів з паралельною морфологічною оцінкою та визначенням потенціалу росту.

Для проведення досліджень, запланованих проектом, нами було обрано три перещеплювані культури клітин тварин: культура клітин нирки вівці, культура клітин СНЕВ та ВНК-21, які зберігаються кріосховищі депозитарію культур клітин ДНКІБШМ у рідкому азоті (мінус 196^{o}С) в сосудах Дюару.

Всі дослідні культури клітин були перевірені на відсутність контамінації сторонніми патологічними агентами як шляхом висіву на специфічні середовища, так у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР).Всі необхідні клітинні лінії були вільні від сторонньої мікрофлори та придатні до проведення подальших досліджень в умовах *in vitro*. Кожну культуру клітин після вилучення із кріосховища культивували не менше ніж протягом 3-х послідовних пасажів з визначенням морфологічних характеристик, швидкості росту та проліферації. Досліджувані перещеплювані культури клітин у вигляді моношару, що сформувався на 24 год. представлені на рис.1, 2, 3.

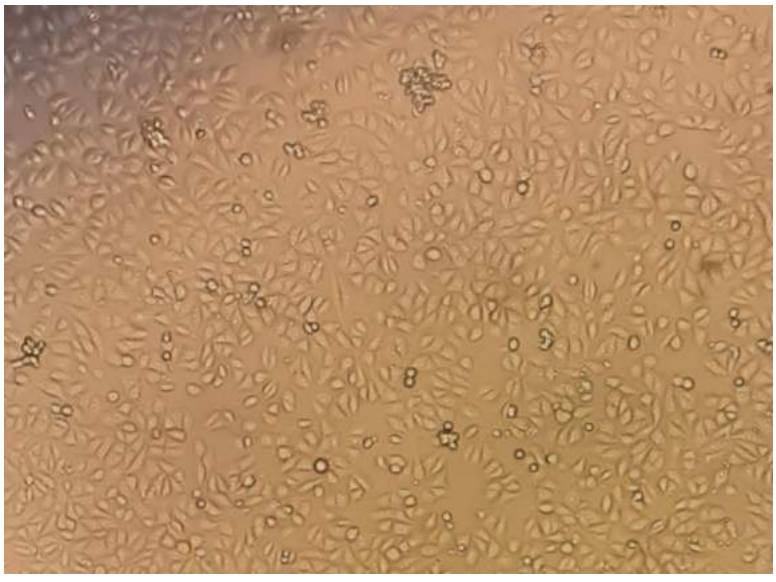


Рис.1. Перещеплювана культура клітин нирки вівці через 24 год. культивування. Збільшення х200.

Рис.2. Перещеплювана культура клітин свиної нирки ембріональної версенної лінії (СНЕВ) через 24 год. культивування.Збільшення х200.

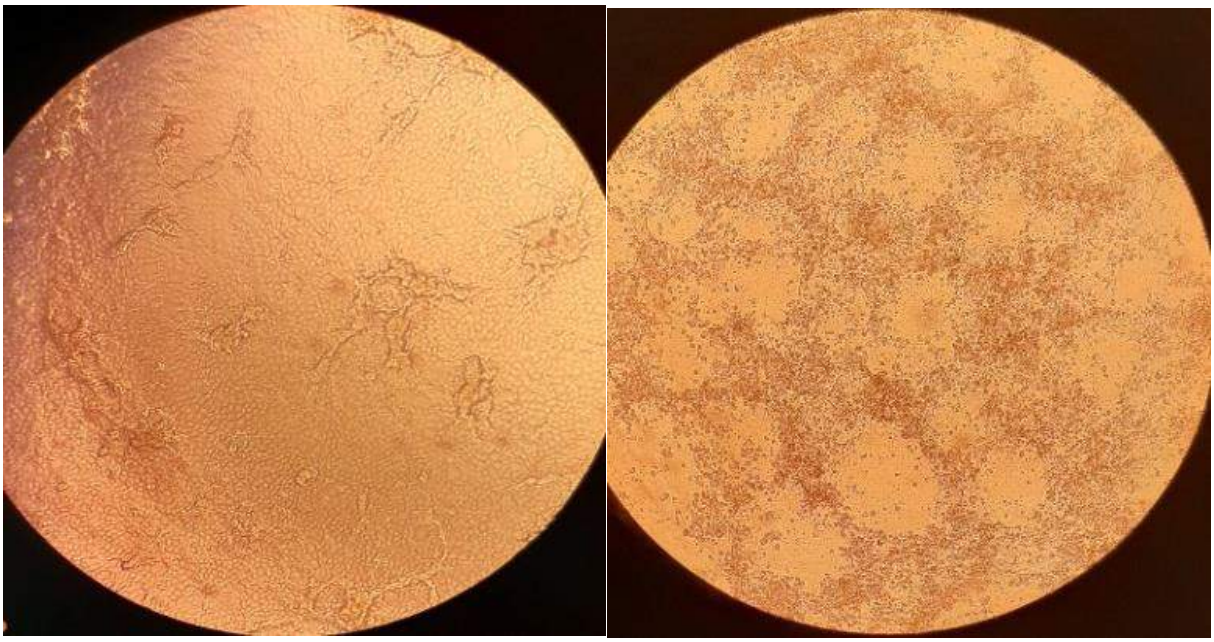
Рис.3. Перещеплювана культура клітин новонародженого сирійського хом'ячка (ВНК-21) через 24 год. культивування. Збільшення х200.

3.2 Визначення інфекційної активності модельних коронавірусів ВРХ, ТГС та ІБК в обраних чутливих культурах клітин та курячих ембріонах

Для адаптування *in vitro* модельних коронавірусів, наявних в колекції ДНКІБШМ до чутливих біологічних систем, провели їх послідовне культивування у чутливих культурах клітин, а саме: коронавірус ВРХ культивували у перещеплюваній культурі клітин нирки вівці, коронавірус трансмісивного

гастроентериту свиней – у культурах клітин нирки свині СНЕВ та нирки ВНК-21, вірус інфекційного бронхіту курей – в системі *in ovo*, а саме у курячих ембріонах 9-10 добового віку.

Вірус трансмісивного гастроентериту свиней (вірус ТГС) легко адаптується і розмножується в цитоплазмі первинних та перещеплюваних культур клітин органів свині. Цитопатичну дію вірусу ТГС у культурах клітин СНЕВ та ВНК-21 на 24 год. культивування при 37°С та 5% подачі CO_2 представлено на рис. 4.



A B

Рис 4. Клітинна лінія ВНК-21: А - контроль; В - цитопатична дія вірусу ТГС через 24 год. Культивування.Зібльшення 200.

Визначення інфекційної активності вірусу ТГС проводили загальноприйнятим методом десятикратних розведень у культурі клітин на 96-лункових планшетах.Було встановлено, що на 55 пасажі у культурі клітин ВНК-21 титр інфекційної активності вірусу ТГС за методом Ріда та Менча становив 7,50 ± 0,22 lg TCD_{50} / $см^3$ до зберігання та 7,50 ± 0,22 lg TCD_{50} / $см^3$ після рекультивування у культурі клітин СНЕВ.Також, вірус ТГС був типізований у реакції нейтралізації

із специфічною сироваткою свиней. Підтверджено наявність в матеріалі вірусу ТГС.

Коронавірус ВРХ культивували у перещеплювальній культурі клітин нирки вівці (ПО). Визначили титр його інфекційної активності, що складав 7,5 $lgTCID_{50}/см^3$.

Вірус інфекційного бронхіту курей штами QX та H120 культивували в системі *inovo* у 9-10 денних курячих ембріонах з наступним визначенням титрів.

Визначили інфекційну активність даного вірусу шляхом титрування його в курячих ембріонах 9-ти добового віку, що розвиваються. З цією метою робили десятикратні розведення вірусу та інфікували по 4 курячі ембріони (КЕ) в алантоїсну порожнину. 4 КЕ – контроль (не інфіковані). За 8 діб культивування при 37 °С усі ембріони охолодили та провели їх розтин. Облік результатів провели враховуючи патологоанатомічні зміни ембріонів під дією вірусу, що проявлялись ефектом карликовості, скрюченості та недорозвиненості зародків. Встановлено, що титр вірусу становить 6,7 lg $ЕІД_{50/см^3}$ при розрахунку його за методом Ріда та Менча.

Також в звітний період нами були проведені роботи по можливій реізоляції вірусу ІБК, шт. «QX» з комерційної вакцини шляхом інфікування первинних культур клітин. З цією метою були отримані первинні культури нирки ембріонів курей (НЕК) та фібробластів ембріонів курей (ФЕК). Проведено три «сліпі» послідовні пасажі в культурі клітин спочатку на НЕК (один) та ФЕК (2 пасажі). Вірус викликав цитопатичну дію в зазначених біологічних системах. Отже, процедура реізоляції вірусу з комерційної вакцини шляхом інфікування первинних культур клітин дала позитивний результат. Виявлено цитопатичну дію вірусу в моношарі клітин, зроблено фото ЦПД. Після 3 пасажу в КК заражались КЕ, але характерних змін в ембріонах не відмічалось.

Провели роботу по визначенню інфекційної активності вірусовмісної рідини отриманоїз комерційної вакцини проти інфекційного бронхіту курей (ІБК), шт.«QX», яку було закладено на довготривале зберігання при мінус 78 °С.

Титр вірусу визначали з використанням КЕ, що розвиваються 9-ти добового віку. Інфекційна активність вірусу склала 6,87 lg ЕІД $_{50/см}{}^{3}$ при розрахунку за методом Ріда та Менча. Встановлено, що при зберіганні вакцинного вірусу ІБК, шт.«QX» протягом 4-х місяців за температури мінус 78 ^{o}C, титр його не знизився і становив 6,7 lg ЕІД $_{50/см}{}^{3}$.

Рис. 5 Патологоанатомічні зміни в курячих ембріонах (КЕ) під дією вірусу бронхіту курей. Зверху на фото контрольні КЕ, що не заражались в експерименті. Нижній ряд – КЕ «карлики», заражені вірусом ІБК шт.QX.

3.3 Електронно-мікроскопічні дослідження коронавірусів тварин (вірусу ТГС та коронавірусу ВРХ)

Для підтвердження присутності вірусу ТГС проведено метод трансмісивної електронної мікроскопії (ТЕМ).

На зображеннях можна побачити лізис клітин під впливом вірусу ТГС; масовий вихід вірусних частинок у міжклітинний простір супроводжується максимальною інфекційною активністю (рис. 5).

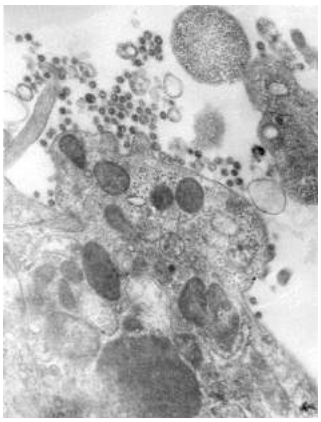


Рис. 5. Вірус ТГС у позаклітинному просторі після вивільнення з клітини (збільшення × 165 000)

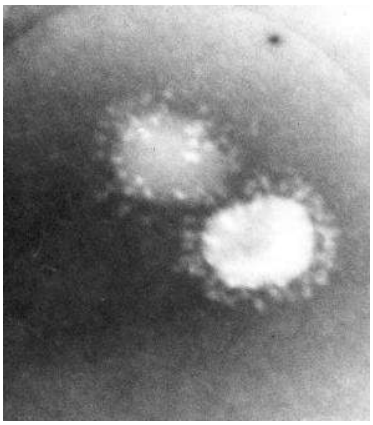


Рис. 6. Два коронавірусні віріони вірусу ТГС (2% обробка водним розчином молібденової амонійної кислоти з pH 6,55; збільшення × 540 000).

Також, методом електронної мікроскопії було досліджено наявність коронавірусу великої рогатої худоби у вірусумісному матеріалі (Рис.7,8).

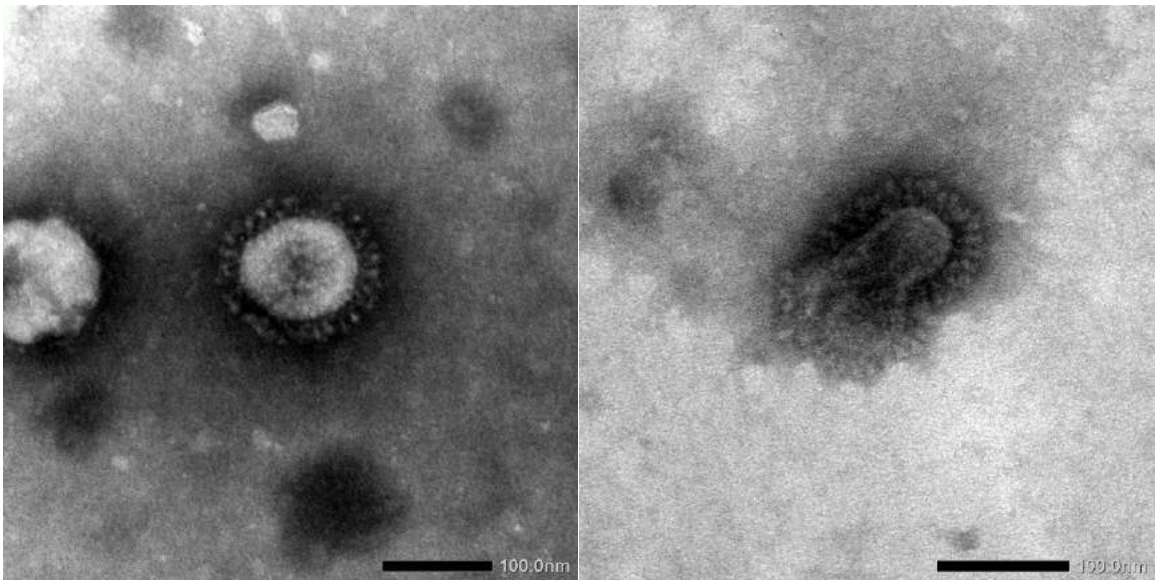


Рис.7. Коронавірус ВРХ.

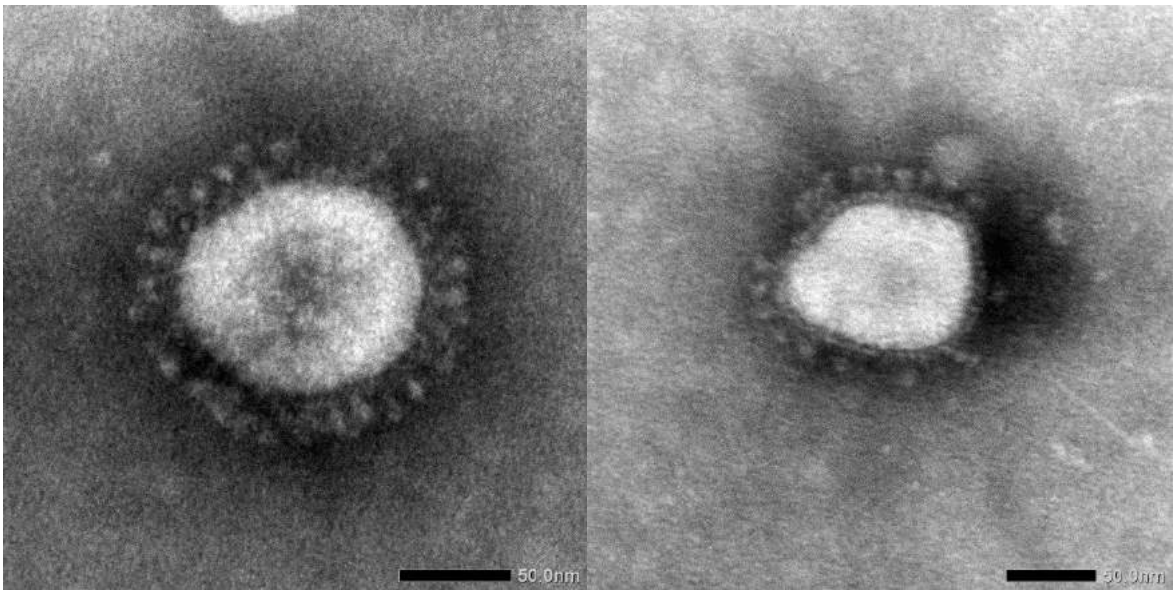


Рис. 8 Коронавірус ВРХ.

3.4 Дослідження токсичності в системі *in vitro*. Визначення МДК зразку C_{60} ВРФ для кожної культури клітин і курячих ембріонів

Оскільки разом із широкою перспективою використання фулерену C_{60} для профілактики та лікування різних захворювань є потенційні ризики його токсичного впливу на біологічні об'єкти, ми досліджували його цитотоксичність для подальшого використання *in vitro*. Тому, наступним етапом досліджували цитотоксичну дію водного розчину фулерену C_{60} у культурі клітин ВНК-21 та нирки вівці (НВ).

Під час експериментіву культурі клітин ВНК-21ми використовували десять повторень для кожної концентрації наносполуки фулерену C_{60} (150; 75; 37,5; 19; 9; 5, 3,6 мкг/мл). Визначено гранично допустиму цитотоксичну концентрацію фулерену C_{60}, у культурі клітин ВНК-21, яка становила 37,5 ± 3,0 мкг / мл.

У культурі клітин нирки вівці перевірені наступні концентрації фулерену C_{60}: 150; 75; 40; 37,5; 35; 30; 25; 20; 18,75; 9,4 мкг/мл. Визначено гранично допустиму цитотоксичну концентрацію фулерену C_{60}, у культурі клітин нирки вівці, яка становила 37,5 мкг/мл.Важливо зазначити, що фулерен C_{60} є відносно безпечною речовиною: експерименти *in vitro* довели відсутність токсичної дії

фулерену C_{60} у концентраціях (37,5 ± 3,0 мкг / мл), використовуючи його у формі водного колоїдного розчину.

Визначення МДК фулерену C_{60} у курячих ембріонах знаходиться в процесі виконання (зроблене замовлення та закладка курячих ембріонів в інкубаторії постачальника), визначення МДК в даній системі заплановано на 3 грудня 2020 року. Концентрації фулерену C_{60}:75; 40; 37,5; 35; 30; 25; 20; 18,75; 9,4 мкг/мл. не викликають місцево-подразнюючої дії в КЕ. Для визначення максимально переносимої дози в КЕ вводили по 150 мкг/мл на ембріон.

ВИСНОВКИ

1.Успішно підготовлені для роботи в умовах *in vitro* три перещеплювані культури клітин тварин: свиної нирки ембріональна версенна лінія (СНЕВ), нирка вівці (НВ) та нирка сирійського новонародженого хом'яка (ВНК-21), які у культуральному посуді формували клітинний моношар на 24 год. за збереження морфологічних характеристик, притаманних даним клітинам.

2. Проведений цикл робіт з адаптування коронавірусів тварин в умовах *in vitro ma in ovo.* Віруси викликали характерну цитопатичну дію в культурі клітин, та вірус ІБК – в курячих ембріонах.

3. Визначена інфекційна активність коронавірусів тварин відповідно до чутливих систем культивування. Титр інфекційної активності вірусу ТГС, визначений у культурах клітин ВНК-21 та СНЕВ становив 7,50 ± 0,22 lg TCD_{50} / $см^3$ (за методом Ріда та Менча). Коронавірус ВРХ культивований у перещеплюваній культурі клітин нирки вівці (НВ), встановлений титр його інфекційної активності, що складав 7,5 lg $TCID_{50}/см^3$. Визначено титр вірусу ІБК, що стновив 6,7 lg ЕІД $_{50}/см^3$ при розрахунку за методом Ріда та Менча. За реізолювання вірусу ІБК штаму «QX» з комерційної вакцини визначена інфекційна активність вірусу, що склала 6,87 lg ЕІД $_{50}/см^3$. Встановлено, що зберігання вірусу ІБК, шт.«QX» за температури мінус 78ºС, достовірно не впливав на титр інфекційної активності, що становив 6,7 lg ЕІД $_{50}/см^3$.

4. Перевірено широкий діапазон концентрацій водорозчинного фулерену С60 *in vitro* для визначення максимально допустимих концентрацій: у культурі клітин ВНК-21 - 150; 75; 37,5; 19; 9; 5, 3,6 мкг/мл, у культурі клітин нирки вівці 150; 75; 40; 37,5; 35; 30; 25; 20; 18,75; 9,4 мкг/мл. Максимально допустима концентрація (МДК) в обох культурах клітин становила 37,5 ± 3,0 мкг / мл. Таким чином, обидві біологічні системи (культури клітин, отриманих з різних видів тварин) однаково чутливі до наносполуки фулерену $С_{60}$. Концентрації фулерену $С_{60}$: 75; 40; 37,5; 35; 30; 25; 20; 18,75; 9,4 мкг/мл не викликають місцево-подразнюючої дії в КЕ.

Етап 1 (2021 р.)

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали та обладнання

- Обладнані боксові приміщення для вірусологічної роботи;
- Термостат та інкубатор з температурою 37-38^0 С;
- Рефрижератор;
- Темна кімната;
- Овоскоп;
- Ваги,
- Ламінарна шафа 2АА;
- Інвертований світловий мікроскоп;
- Вортекс,
- Автоматичні піпетки на 20-200 мкл
- Автоматичні піпетки на 100-1000 мкл

Інші матеріали

- 8 - денні SPF курячі ембріони (КЕ), або комерційні курячі ембріони з білою шкаралупою;
- 0,75 % суспензія еритроцитів миші
- Стерильні плоскодонні колби (50 – 250 см^3);
- Пастерівські піпетки;
- Градуйовані піпетки (1 – 10 см^3);
- Штативи;
- Вигнуті ножиці;
- Хірургічні пінцети;
- Металічні та пластмасові лотки для КЕ;
- Емальовані кювети;
- Йодний спиртовий розчин,
- 70% розчин спирту,
- Гентаміцин 500 ОД,
- Флакони пеніцилінові,
- Наконечники стерильні на 20-200 мкл,
- Наконечники стерильні на 100-1000 мкл,
- Фарфорова та скляна кружка;
- Шприці для ін’єкцій об’ємом 1 см^3;
- Стерильні ватні тампони;
- Дезрозчин (2%-ний розчин NaOH чи хлораміну);
- Парафінові свічки;
- Пробійник» - цілісний шліфований стрижень з нержавіючої сталі з загостреним до 2-3 мм кінцем, призначений для створення отворів в шкаралупі яєць;

- Флакони (R10, R50, R100);
- Плоский контейнер з замороженим холодоагентом;
- Контейнер і пакети для відпрацьованого матеріалу;
- Одноразові рукавички;
- Захисний одяг та захисні окуляри і маски.
- Досліджувані зразки наносполуки фулерену С60, що являли собою водорозчинну форму сполуки світло коричньового кольору, з утворенням чорного осаду при зберіганні в спокійному стані, без збовтувань; зберігання за умов +4 °С, як свіже приготованого, так і за тривалого зберігання протягом 2-х років.

2.2 Матеріали біологічного походження

2.2.1. Клітинні лінії

У якості тест-об’єктів у дослідах *in vitro* використана перещеплювана культура клітин нирки вівці (НВ). Моношар клітин вирощували у пластикових культуральних флаконах об’ємом 25 та 50 $см^3$ та у 96-лункових культуральних планшетах в умовах CO_2 інкубатора Esco (виробництва Сінгапур) за температури 37ºС, 5%-й подачі CO_2 та 88%-й вологості повітря. В якості підтримуючого середовища використовували аналогічне ростовому середовище, але без додавання сироватки крові ВРХ. Культури клітин були протестовані на відсутність контамінації сторонніми мікроорганізмами у тіогліколевому середовищі та МПБ. При роботі, кожен пасаж культур клітин був перевірений на відсутність контамінації сторонніми патологічними агентами, як шляхом висіву на специфічні середовища, так і у полімеразній ланцюговій реакції (ПЦР). Клітинні лінії були вільні від сторонньої мікрофлори та придатні до проведення досліджень в умовах *in vitro*.

Зберігали культури клітин у кріосховищі НЦМ ДНКІБШМ в умовах рідкого азоту (за мінус 196ºС) та за мінус 80 ºС.

2.2.2 Кріоконсервування та розморожування клітинних ліній

Кріоконсервацію культури клітин проводили за загальноприйнятою методикою, яка включала наступні кроки: оцінка відповідності клітинної лінії критеріям заморожування (зовнішній вигляд, морфологічні характеристики, пізня

фаза росту, відсутність контамінації сторонніми агентами); трипсинізація моношару клітин та підрахунок їх концентрації; центрифугування та розведення середовищем для кріоконсервування з додаванням 10 % диметилсульфоксиду; розподіл суспензії по кріовіалам; заморожування кріовіал при умові 1°С/хв до температури мінус 70°С з подальшим перенесенням у рідкий азот.

При розморожуванні, кріоампули з необхідним клітинними лініями вилучали з рідкого азоту та миттєво поміщували у резервуар із стерильною водою температури 37°С або у водяну баню. Після відтаювання, кріоампули оброблювали 70°С етиловим спиртом та відкривали в межах ламінарного потоку. Переносили за допомогою автоматичної піпетки покраплинно у флакон з середовищем для культур клітин, інкубували протягом доби після чого змінювали середовище.

2.2.3 Підрахунок кількості клітин

Кількість клітин у суспензії підраховували у камері Горяєва (гемоцитометрі). До 200 мкл супензії додавали 800 мкл 0,5%-ого водного розчину трипанового синього і ретельно перемішували. Барвник фарбує тільки мертві клітини, а живі клітини з непошкодженою мембраною залишаються незафарбованими. Через 5 хвилин пофарбованою суспензією клітин заповнювали лічильну камеру і підраховували кількість живих клітин при малому збільшенні мікроскопа (×200) у двох і більше сітках по всій площині камери Горяєва. Кількість клітин в 1 см3 суспензії визначали за формулою:

$$X=\frac{a \cdot n}{0,9} \cdot 1000,$$

де X – кількість клітин в 1 см³ суспензії,

A – середня кількість клітин в одній сітці,

n – кратність розведення концентрованої клітинної суспензії,

1000 – кількість кубічних міліметрів в 1 см³,

0,9 – об'єм сітки Горяєва в кубічних міліметрах.

2.2.4 Тест-штами вірусів

Роботи були проведені з використанням коронавірусу великої рогатої худоби (коронавірусу ВРХ), коронавірусу інфекційного бронхіту курей (вірусу ІБК, штаму «М-41»), які отримано з Національного Центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ. Зберігання вірусів у сховищі НЦШМ ДНКІБШМ за температури мінус 80ºС та рідкого азоту за мінус 196 ºС. Всі експерименти проведені у відповідності до 2 рівня біологічної безпеки лабораторій BSL-2.

Використано: вакцинний штам культурального коронавірусну великої рогатої худоби (*Bovine coronavirus*) з роду *Betacoronavirus*, з родини *Coronaviridae*. Геном вірусу представлений одноланцюговою (+) РНК. Нуклеокапсид оточений білковою мембраною і ліповмісною зовнішньою оболонкою; оскільки цей вірус апатогенний для людини, що спрощує лабораторному персоналу роботи з ним та відноситься до тієї ж бета-групи коронавірусів, що і збудник SARS-Cov-2, він може слугувати в якості вірусу аналога для досліджень при проведенні випробувань в системі *in vitro y* перещеплюваній культурі клітин нирки вівці (де модельний вірус культивується).

Використаний вакцинний штамм «М-41» вірусу інфекційного бронхіту курей (у вигляді алантоїсної рідини), що зберігався в умовах рідкого азоту за мінус 196ºС. Представник роду *Gammacoronavirus* з родини *Coronaviridae*. Вірус ІБК є висококонтагіозним збудником хвороби птиці, характеризується величезною мінливістю за рахунок змін геному шляхом мутацій та рекомбінацій. Захворюваність може сягати 100%, а рівень смертності варіює в залежності від штаму, віку при інфікуванні, умовах утримання та від можливості розвитку коінфекції. Однак, даний збудник є апатогенним для людей, тому є зручним тест-об’єктом для дослідження впливу фулеренів на реплікацію вірусів *in ovo*.

2.2.4.1 Визначення титру інфекційної активності вірусу в культурі клітин

Титрування коронавірусу ВРХ проводили за методом визначення інфекційної активності в перещеплюваній культурі клітин НВ у 96-ти плоскодонних стерильних планшетах (з кінцевою концентрацією 200000 кл./см^3), спостерігаючи цитопатичний ефект (ЦПЕ) та визначаючи 50%-у тканинну цитопатичну дозу (ТЦД$_{50}$/см^3). Для визначення ТЦД$_{50}$ готували ряд 10-разових розведень вірусу на поживному середовищі для культивування клітин. Кожним розведенням вірусу в об'ємі 150 мкл заражали клітини в 4-ох лунках та інкубували в CO_2 інкубаторі при 37^{0}С упродовж 5 днів. Враховували результати цитопатичної дії (ЦПД) кожен день та розраховували титр вірусу за статистичним методом Ріда і Менча.

2.2.5 Курячі ембріони

Для проведення дослідів *in ovo* були використані курячі ембріони від курей породи леггорн, постачальник- ПП «Інкубаційна станція Птахи України», м. Черкаси. За допомогою овоскопу були проекзаменовані та ретельно відібрані рухливі ембріони восьмиденного віку з добре розвинутими судинами. Відмічали межі повітряної камери, місце розташування ембріона та місце інокуляції. Дезинфекцію шкарлупи проводили йодним спиртовим розчином безпосередньо перед введенням дослідних зразків. КЕ інкубували 8 діб за температури 37^{o}С і відносній вологості 50-52%. Ембріони в процесі інкубації овоскопували двічі на день.

2.3 Реактиви

Пересіви культури клітин НВ здійснювали з використанням: середовища DMEM, розчину трипсин -ЕДТА, 10% фетальної сироватки крові ВРХ, з додаванням антибіотику гентаміцину:

- поживне середовище «DMEM High Glucose», w/L – Glutamine, w/o Sodium Pyruvate, Sterile Filtered; виробник Biowest, серія S17885L0102, для культивування культури клітин;

- фетальну сироватку крові великої рогатої худоби «Fetal Bovine Serum Premium», виробник Biowest, серія S14317S181B;

- трипсин «Trypsin 0,25%», w/o Calcium, w/o Magnesium, w/o Phenol Red, Sterile Filtered; виробник Biowest серія S16067L0910,

- розчин версену 0,02%, виробництва ДНКІБШМ,

- антибіотик «Гентаміцин», розчин для ін'єкцій 4%; виробник ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», серія 10118, придатний до 01.2023,

- фосфатно-буферний розчин (ФБР) з pH 7,2.

Методичною основою запланованих досліджень були теоретичні загальнонаукові прийоми досліджень і методи, що ґрунтуються на сучасних наукових засадах з розробки противірусних терапевтичних, хіміопрофілактичних та інфекційних сполук та препаратів.

2.4 Методика визначення інфекційної активності коронавірусу ВРХ у чутливих культурах клітин в системі *in vitro*

За добу до проведення дослідження у 96-лункові планшети вносили по 0,1 $см^3$/лунку суспензії культури клітин НВ із концентрацією 10^5 клітин/$см^3$ і витримували 24 години у CO_2-інубаторі за температури 37 ^oC і концентрації CO_2 – 5 % для формування моношару.

Після повного відтанення зразків вірусів їх ретельно струсили, використовуючи вортекс. Після чого готували 10-кратні розведення - 9 $см^3$ середовища ДМЕМ та 1 $см^3$ відповідного тест-штаму вірусу. Після чого проводили дослідження їх інфекційної активності методом титрації у відповідній чутливій культурі клітин. Для цього з заздалегідь підготованого планшету з виповненим моношаром видаляли ростове середовище та вносли відповідні розведення в об'ємі 0,1 $см^3$ на лунку. На кожне розведення використовували по 4 лунки. Усі дослідження супроводжували контролем культури клітин.

Інокульовані плашки помістили у вологу камеру CO_2-інкубатора за температури 37 °С і концентрації CO_2 – 5 % та інкубували 120 годин. По завершенню часу інкубації плашки за допомогою інвертованого мікроскопу дослідили на наявність цитопатичної дії вірусу (ЦПД). У випадку визначення інфекційної активнсті коронаврусу ВРХ, наявність ЦПД додатково підвержували в реакції гемаглютинації з 0,75 % суспензією еритроцитів миші. Для цього з кожної лунки планшету відбирали в окремий планшет по 50 мкл культуральної рідини та вносили по 50 мкл 0,75% еритроцитарної маси мишей відповідно, витримували 20 хв. та оцінювали реакцію гемаглютинації. Інфекційну активність розраховували методом Ріда і Менча.

2.5 Методика визначення інфекційної активності вірусу ІБК на курячих ембріонах

Активність вірусу ІБК у вірусовмісному матеріалі визначали шляхом титрування в курячих ембріонах, що розвиваються (КЕ) 8-ми добового віку, з наступною індикацією за показниками загибелі КЕ у період понад 24 години після зараження та появою КЕ-карликів у кінці терміну інкубації (на 8 добу після зараження)

– для визначення інфекційної активності вірусу відбирали добре розвинуті курячі ембріони приблизно одного розміру, масою 55±10 грам. На шкаралупі кожного ембріону олівцем відмічали місце майбутнього зараження та мітку із зазначенням досліджуваного матеріалу, рівня розведення вірусного матеріалу та номеру курячого ембріону в кожному розведенні. Оскільки вірусовмісний матеріал містить велику кількість вірусних часток готуватли його розведення. Використовували для цього десятикратні серії (інтервал 1 lg) розведення фосфатно-сольовим буфером (pH 7,2) або розчином NaCl (0,85-0,9%), які містять 500 мкг стрептоміцину, 500 ОД ампіциліну та 15 мкг гентаміцину в 1 $см^3$.

– десятикратні зростаючі розведення готували наступним чином: у ряд попередньо маркованих (1-е розведення, 2-е розведення і т.д.) пробірок вносили по 1,8 $см^3$ розчинника. В першу пробірку (1-е розведення вірусу) піпеткою вносили

0,2 см^3 вірусовмісного матеріалу, використану піпетку занурювали у дезрозчин, вміст перемішували 3–4 рази новою піпеткою, наповнюючи та випускаючи з неї рідину, 0,2 см^3 рідини 1-го розведення вірусу переносили в другу пробірку, що відповідає 2-му розведенню (10^{-2}), піпетку занурювали у дезрозчин. Новою піпеткою перемішували вміст пробірки і 0,2 см^3 рідини переносили у наступну пробірку. Описану процедуру повторювали послідовно до отримання необхідного найвищого розведення (наприклад: від 10^{-1} до 10^{-9}). Обов'язковою вимогою є постійна заміна піпеток. У процесі переносу вірусної суспензії в наступну пробірку піпетка не торкались рідини та стінок пробірки, оскільки надлишок вірусу, що знаходиться на стінках піпетки змивається і може спотворити справжнє його розведення. Для визначення титру інфекційної активності ІБК-вмісного матеріалу використовували його робочі розведення від 10^{-4} до 10^{-9}.

– після закінчення серій розведень (не менше 3 на один матеріал) проводили зараження КЕ шляхом введення матеріалу в об'ємі 0,2 см^3 в алантоїсну порожнину КЕ. Кожним розведенням матеріалу заражали не менш ніж по 4 КЕ. В якості контролю залишали 10 і більше не заражених КЕ.

– для зараження використовували разові стерильні інсулінові шприци з голками.

– після введення вірусного матеріалу, отвори на шкаралупі ембріонів заклеювали парафіном або клеєм ПВА.

– заражені ембріони інкубували за температури 37±0,5° С протягом 8 діб. Овоскопію заражених ембріонів проводили двічі на добу.

– загибель ембріонів у перші 24 після зараження вважали неспецифічною і в обрахунках не враховували. Загибель КЕ після 24 год вважали специфічною (внаслідок дії вірусу ІБК).

– після закінчення терміну інкубації (8 діб) всі ембріони, що залишились живими, охолоджували за температури 2-8° С упродовж 16–18 годин.

– дослідні та контрольні КЕ зважували і заносили показники до таблиці. Потім проводили розтин КЕ, зважували власне ембріони та знову вносили

значення у відповідні графи. Визначали середнє арифметичне значення ваги яйця та власне ембріони контрольної (не зараженої) групи.

– визначали коефіцієнт карликовості КЕ контрольної групи як співвідношення середньої арифметичної маси власне ембріона до середньої арифметичної маси цього ж яйця .

– індивідуально визначали показник КК дослідних ембріонів як співвідношення маси власне ембріона до маси цього ж яйця.

– визначали індекс карликовості дослідних КЕ за співвідношенням КК дослідного ембріону до КК контрольної (не зараженої) групи КЕ. КЕ які мали показник ІК нижче ніж 0,87 (за рівня вірогідності 95%) або 0,82 (за рівня 99%) вважали карликами.

– Проводили обробку результатів. Позитивними реагуючими вважали КЕ, які загинули в період понад 24 год після зараження та ембріони-карлики після закінчення терміну інкубації. На основі цього розраховували титр інфекційної активності вірусу за методом Кербера в модифікації Ашмаріна і виражали в $ЕІД_{50}$ за наступною формулою:

$$Lg\ ЕІД/_{0,1см^3} = lgDm - \Omega\ (\sum\mu - 0,5), \qquad (2.1)$$

де ЕІД/0,1см3 - титр вірусу в об’ємі 0,1 см3, здатний викликати інфікування 50% заражених КЕ;

Dm – максимальна доза, що досліджується;

Ω – логарифм розведення (в нашому прикладі 10-ти кратне розведення), $\Omega = 1$;

μ – відношення числа КЕ в досліджуваних розведеннях, які дали позитивний, до загального числа заражених;

$\sum\mu$ – сума значення μ, знайдена у всіх досліджених розведеннях.

Дослідження проводили з дотриманням правил асептики і антисептики в три етапи:

- перший етап визначення віруліцидної дії наносполуки фулерену C_{60} у перещеплюваній культурі клітин нирки вівці;

- другий етап: випробування при використанні у застосуванні в профілактичній схемі,

- третій етап: випробування при використанні у лікувальній схемі. Дослідження проведені за нормативно-методичними документами: *«Методичні вказівки з комплексної оцінки визначення противірусних властивостей сполук, нових препаратів, їх ефективності та безпечності (для ветеринарної медицини)*», розглянуті, схвалені і прийняті до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (протокол № 2 від 23 квітня 2020 р.); «*Методичні рекомендації з визначення віруліцидної активності та контролю дезінфікуючих засобів у ветеринарній галузі*», схвалені на засіданні Науково-методичної ради Держпродспоживслужби (Протокол № 3 від 04.10.2020 р.); *«Методичні рекомендації з визначення та контролю антивірусних властивостей речовин in vitro»,* затверджені Методичною комісією Інституту ветеринарної медицини НААН (протокол 5 від 22.10.09), та Науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України (протокол №1 від 23-24 .12.2009).

2.6. Віруліцидні схеми перевірки дії фулерену C_{60}

Віруліцидна схема № 1 – експозиція нативної вірусної суспензії та подвійної МДК дослідної речовини протягом 30 та 60 хвилин у співвідношенні 1:1, після чого з 1 по 8 десятикратне розведення отриманої суспензії та внесення по 150 мкл на лунку (4 лунки на розведення) з моношаром клітин.

Віруліцидна схема № 2 – експозиція подвійної МДК дослідної речовини з 1 по 8 десятикратне розведення нативної вірусної суспензії протягом 30 та 60 хвилин у співвідношенні 1:1, після чого внесення отриманої суспензії по 150 мкл на лунку (4 лунки на розведення) з моношаром клітин.

Стан клітин на наявність цитопатичної дії контролювали кожні 24 години в інвертованому мікроскопі, а через 120 годин визначали титр інфекційної активності вірусу в дослідних та контрольних лунках.

2.7. Профілактична схема

Профілактична схема – в ряди лунок культурального планшету (по 4 лунки на розведення) з моношаром клітин вносили по 150 мкл МДК дослідної сполуки на лунку, експозиція - 24 години, після чого розчин видаляли та вносили з 1 по 6 десятикратне розведення вірусної суспензії в об'ємі 150 мкл у ці ж лунки.

2.8 Лікувальна (терапевтична) схема

Лікувальна схема – в ряди лунок культурального планшету (по 4 лунки на розведення) з моношаром клітин вносили з 1 по 6 десятикратне розведення вірусної суспензії в об'ємі 150 мкл на лунку. Після експозиції протягом 1 година з культури клітин видаляли, нанесену раніше вірусну суспензію в різних концентраціях, і вносили в ряди лунок з культурою клітин по 150 мкл МДК дослідної сполуки.

Параметри токсичності хімічних речовин визначали за отриманими в досліді значеннями максимально допустимої концентрації (МДК) та мінімально активної концентрації (МАК) (Вотяков, 1986, Burleson F.G., 1989; Kinchington D.,2005 і ін.). Противірусну дію дослідних хімічних речовин вивчали за допомогою мікрометоду скринінгу сполуки із визначенням хіміотерапевтичного індексу (Вотяков, 1986, Burleson F.G., 1989; Kinchington D.,2005 і ін.).

2.9 Статистична обробка результатів досліджень

Статистичну обробку результатів здійснено за допомогою програми MS Excel та за методом Стьюдента.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ АНАЛІЗ (ЕТАП 1, 2021 р.)

В даний час вірусні інфекції є переважною часткою інфекційної патології у людей та тварин, що призводять щорічно до значних втрат майже у всіх вікових та соціальних групах населення, негативно впливають на галузь тваринництва і економіку.

Патогенез вірусних захворювань починається на клітинному рівні, але слід враховувати, що родина *Coronaviridae* містить подібні, але не однакові віруси. Вони складні за своєю антигенною структурою, тому антигенна гетерогенність визначає високу частоту повторних заражень іншими серологічними варіантами коронавірусів. Отже, для досліджень нами були обрані різні за антигенною стркутурою коронавіруси тварин, що слугували в якості моделей апатогенних для дослідників. Для досліджень процесів взаємодії коронавірусів з чутливою клітиною нами проведені досліди *in vitro* (у культурі клітин тварин) та *in ovo* (в 8 - денних курячих ембріонах).

Завдання організації-партнера (ДНКІБШМ) на перший етап 2021 року:

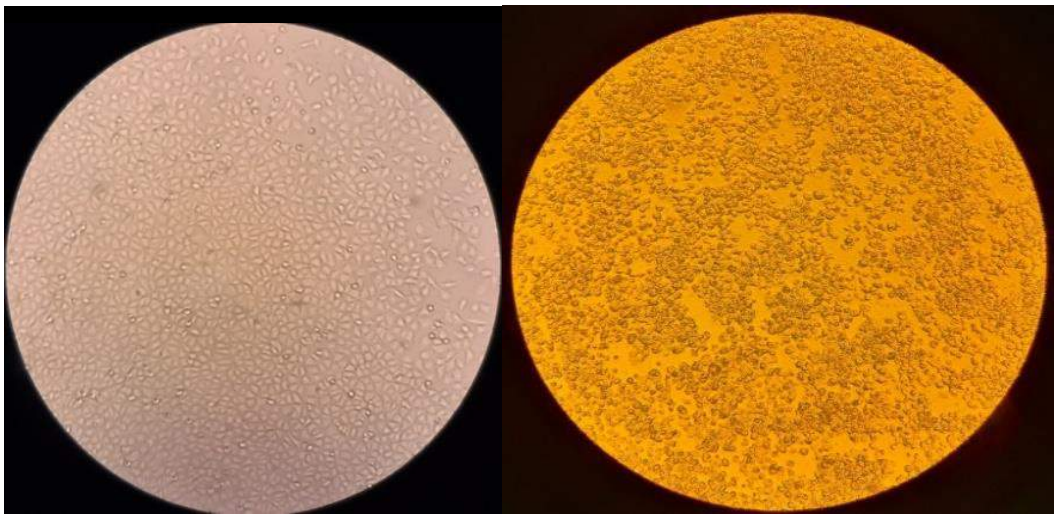
- Визначити ефективність віруліцидної дії C_{60}ВРФ *in vitro* з коронавірусами ІБК та ВРХ.
- Визначити ефективність дії зразків C_{60}ВРФ *in vitro* у профілактичній та терапевтичній схемах застосування з коронавірусами ВРХ (у культурах клітин тварин) та ІБК (у курячих ембріонах).
- Визначити мінімально активну концентрацію (МАК) та хіміотерапевтичний індекс (ХТІ) зразків C_{60} ВРФ *in vitro*.

3.1 Дослідження в системі *in vitro*

3.1.1. Культивування коронавірусу ВРХ у чутливій біологічній системі *in vitro*

Протикоронавірусну дію водорозчинної наносполуки C_{60} перевіряли щодо бета коронавірусу великої рогатої худоби за культивування у чутливій перещеплюваній культурі клітин нирки вівці, де вірус проявляв цитопатичну дію (Рис.9). Визначено

інфекційну активність коронавірусу ВРХ, титр інфекційної активності складав 7,5 ± 0,22 lg $ТЦД_{50}/см^3$.



А – контроль Б – цитопатична дія коронавірусу ВРХ

Рис.9. А - перещеплювана культура клітин нирки вівці через 24 год. культивування, Б- цитопатична дія коронавірусу ВРХ через 36 год , збільшення х100.

Підтверджено методом електронної мікроскопії морфологічні характеристики коронавірусу великої рогатої худоби у вірусумісному культуральному матеріалі (Рис. 2).

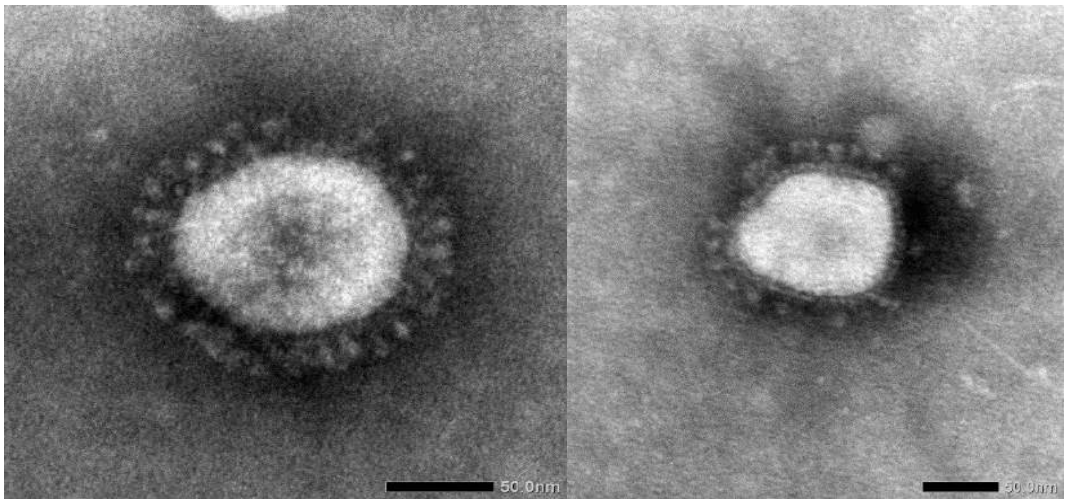


Рис. 10. Коронавірус ВРХ (ЕМ).

3.1.1.1. Визначення впливу наносполуки фулерену C_{60} за застосування у віруліцидних, профілактичній та терапевтичній схемах *in vitro*

Проведені дослідження впливу наносполуки фулерену C_{60} у віруліцидних схемах застосування №1 та №2 щодо коронавірусу великої рогатої худоби у культурі клітин НВ, за застосування сполуки у максимально допустимій концентрації (37,5 мкг/см^3) за двох експозицій: 30 та 60 хв. при використанні зразків фулерену після двохрічного зберігання. Дані представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Визначення протикоронавірусної дії МДК наносполуки фулерену C_{60} у віруліцидних схемах застосування *in vitro*

ВІРУЛІЦИДНА СХЕМА № 1 (експозиція із фулереном C_{60} - 30 хв) (n=3)			
N п/п	Титр вірусу в контролі (lg ТЦД$_{50}$/см^3) M ± m	Титр вірусу + Фулерен (lg ТЦД$_{50}$/см^3) M ± m	Вірогідність різниці в титрах інфекційної активності коронавірусу P
1	4,9 ± 1,16	3.92 ± 1,27	≥ 0,5
ВІРУЛІЦИДНА СХЕМА № 1 (експозиція із фулереном C_{60} - 60 хв) (n=4)			
2	5,34 ± 0,96	4,88 ± 0,92	≥ 0,5

Таким чином, застосування зразків наносполуки фулерену C_{60} (після їх дворічного зберігання) щодо коронавірусу ВРХ в системі *in vitro* за використання віруліцидної схеми №1 в експозиціях 30 та 60 хвилин не виявило вірогідно значимого протикоронавірусного ефекту, хоча знижувало титр інфекційної активності вірусу на 0,44-0,98 lg ТЦД$_{50}$/см^3, що є недостатнім.

Досліджено дію МДК наносполуки фулерену C_{60} в системі *in vitro* щодо протикоронавірусної активності (до коронавірусу ВРХ) при застосуванні у

віруліцидній схемі №2 при взаємодії протягом 30 та 60 хв, результати представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

Визначення протикоронавірусної дії МДК наносполуки фулерену C_{60} у віруліцидній схемі застосування *in vitro*

ВІРУЛІЦИДНА СХЕМА № 2 (експозиція із фулереном C_{60} - 30 хв) (n=3)			
N п/п	Титр вірусу в контролі (lg $ТЦД_{50}/см^3$) M ± m	Титр вірусу + Фулерен (lg $ТЦД_{50}/см^3$) M ± m	Вірогідність різниці в титрах інфекційної активності коронавірусу P
1	6,29 ± 0,17	4,9 ± 0,09	≤ 0,003
ВІРУЛІЦИДНА СХЕМА № 2 (експозиція із фулереном C_{60} - 60 хв) (n=4)			
2	6,16 ± 0,16	4,74 ± 0,37	≤ 0,03

Таким чином, виявлено, що застосування водорозчинної форми наносполуки C_{60}, яка зберігалась протягом двох років, у віруліцидній схемі № 2 за взаємодії із коронавірусом ВРХ протягом 30 та 60 хвилин у системі *in vitro* вірогідно знижувало інфекційну активність вірусу в обох випадках (P≤ 0,03), але не знищувало вірус повністю.

Досліджено дію фулерену C_{60} у системі *in vitro* за застосування у лікувальній схемі із коронавірусом ВРХ, результати представлені у таблиці 3.

Таблиця 3

Визначення протикоронавірусної дії МДК наносполуки фулерену C_{60} у терапевтичній схемі застосування *in vitro (n=4)*

N п/п	Титр вірусу в контролі (lg $ТЦД_{50}/см^3$) M ± m	Титр вірусу + Фулерен (lg $ТЦД_{50}/см^3$) M ± m	Вірогідність різниці в титрах інфекційної активності коронавірусу P
1	5,69 ± 0,18	3,41 ± 0,26	≤ 0,004

Застосування водорозчинної форми наносполуки фуллерену C_{60} у МДК у терапевтичній схемі в системі *in vitro,* через 1 год після інфікування чутливої біологічної системи коронавірусом ВРХ, знижувало титр інфекційної активності вірусу достовірно (P≤ 0,004).

Хіміотерапевтичний індекс (XTI) фулерену С60 визначали за титром коронавірусу ВРХ по ЦПД в культурі клітин НВ, який становив 4,9-6,20 ± 0,17 lg $ТЦД_{50}$/мл. XTI визначали шляхом встановлення співвідношення МДК до мінімально активної концентрації (МАК), яка являла собою мінімальну кількість сполуки, що гальмувала розвиток вірусспецифічного ЦПД на 50 %. Для визначення МАК коронавірус в дозі 100 $ТЦД_{50}$/мл вносили в культуру клітин НВ, інкубували протягом 1 год при 37°С в темноті. Після адсорбції вирусу на клітинах його видаляли і клітини відмивали поживним середовищем ДМЕМ, після чого в підтримуюче середовище (ДМЕМ + 2% фетальної сиворотки) вносили розведення фулерену С60, що відповідало дозам 40,0 – 5,0 мкг/мл (40,0; 37,5; 19,0; 9,5; 5,0). Визначили, що МАК становила 9,5 мкг/мл.
Таким чином, визначили XTI, який становив 3,95, що є достатнім. Відповідно до методичних керівництв, речовину вважають активною при зниженні репродукції вірусу на 2,0 lg і більше. Зниження титру інфекційної активності вірусу в досліді на ≥2,28 lg $ТЦД_{50}/см^3$ через 1 год ми спостерігаємо при застосуванні сполуки у лікувальній схемі.

При дослідженні тестованої сполуки фуллерену C_{60} у МДК, застосовуючи у профілактичній схемі в системі *in vitro* достовірного впливу не виявлено (табл. 4).

Таблиця 4

Визначення протикоронавірусної дії МДК наносполуки фулерену C_{60} у профілактичній схемі застосування *in vitro* (n = 3)

N п/п	Титр вірусу в контролі (lg $ТЦД_{50}/см^3$) M ± m	Титр вірусу + Фулерен (lg $ТЦД_{50}/см^3$) M ± m	Вірогідність різниці в титрах інфекційної активності коронавірусу P
1	6,21±0,199	6,10±0,147	0,679

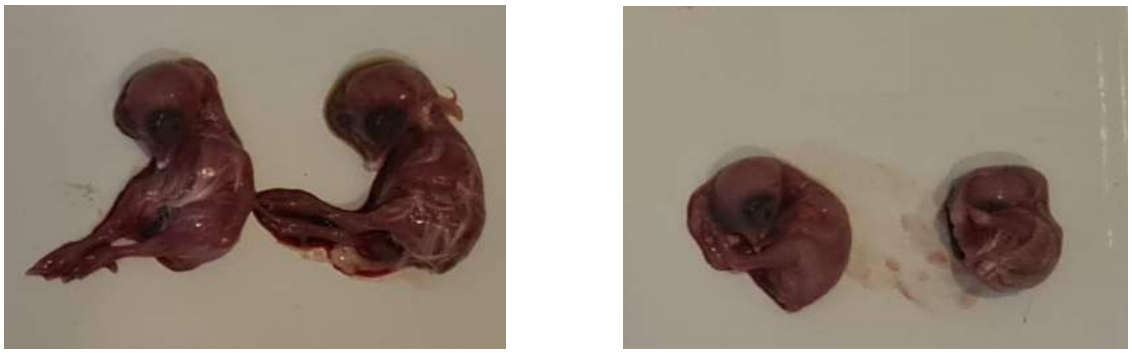
3.2 Дослідження наносполуки фулерену C_{60} в системі *in ovo*

3.2.1 Підбір ефективного штаму вірусу інфекційного бронхіту курей для перевірки властивостей наносполуки C_{60} в системі *in ovo*

Для проведення досліджень в курячих ембріонах необхідною умовою був підбір найбільш придатного штаму вірусу інфекційного бронхіту курей з найвищою інфекційною активністю. Для цього було визначено інфекційну активність п”яти штамів вірусу інфекційного бронхіту курей, які були передані з колекції НЦШМ ДНКІБШМ. Підбір оптимального штаму для дослідження здійснювався при інокуляції 8-денних КЕ у об”ємі 0,2 $см^3$ вірусвмісного матеріалу за умови дотримання правил асептики і антисептики. Спостереження проводили протягом 8 діб, облік результатів обраховували на 8 добу.

В досліді були задіяні 5 зразків (штамів) вірусу ІБК: “М 41”, вакцинний штам “1/96”, “QX”, “Ma5”, “4-91”. Отримали наступні результати з визначення інфекційної активності вірусу: для штаму “М 41” – 6,7 lg $ЕІД_{50}/см^3$; для штаму “1/96” – < 3,2 lg $ЕІД_{50}/см^3$; для штаму “QX” – < 3,2 lg $ЕІД_{50}/см^3$; для штаму “Ма 5 “– 5,95 lg $ЕІД_{50}/см^3$; для “4-91” – 4,95 lg $ЕІД_{50}/см^3$. На Рис.11 представлені фото

контрольних, інтактних КЕ та дослідних - за дії вірусу ІБК. Вірус викликав карликовість інфікованих курячих ембріонів. На Рис.12 представлена дія штаму “QX” вірусу ІБК.



А – контрольні інтактні ембріони Б – ембріони, інфіковані штамом «М41»

Рис.11 Вплив вірусу ІБК на інфіковані курячі ембріони через 8 діб

Рис. 11а. Вплив вірусу ІБК на інфіковані курячі ембріони через 8 діб

Рис.12 Дія штаму “QX” вірусу ІБК та патологоанатомічні зміни в курячих ембріонах (КЕ), викликаних ним. Верхній ряд — інтактні, контрольні КЕ. Нижній ряд – КЕ «карлики», інфіковані штамом “QX” вірусу ІБК

Таким чином, всі перевірені штами у дослідженні 2021 року виявились активними, але найбільш ефективним (найбільш інфекційно активний) виявився штам “ М 41”, який було і відібрано для подальших досліджень.

Крім цього, поза завданням проекту першого етапу 2021 року, виявлено додатково цікавий факт щодо порівняння змін інфекційних властивостей коронавірусу ІБК за його зберігання протягом 10 місяців (з 2020 р., у дослідах, які були проведені в рамках виконання проекту НФД минулого року). Так, вірус інфекційного бронхіту курей штамів “QX” та “H120”, що були використані у дослідженнях 2020 року і культивували в системі *in ovo* у 8 денних курячих ембріонах з наступним визначенням інфекційної активності. Через 8 діб культивування штаму “H120” при 37^{o}C усі ембріони були охолоджені, проведений їх розтин та проведений облік результатів, враховуючи патологоанатомічні зміни ембріонів під дією вірусу, що проявлялись ефектом карликовості, скрюченості та недорозвиненості зародків. Встановили, що титр вірусу становив 6,7 lg ЕІД $_{50/см^3}$ при розрахунку його за методом Кербера.

Також в звітний період у 2020 році були проведені роботи по реізоляції вірусу ІБК, штаму «QX» з комерційної вакцини шляхом інфікування первинних культур клітин нирки ембріонів курей (НЕК) та фібробластів ембріонів курей (ФЕК).

Провели три «сліпі» послідовні пасажі в культурі клітин спочатку на НЕК (один) та ФЕК (2 пасажі). Вірус викликав цитопатичну дію в зазначених біологічних системах. Процедура реізоляції вірусу з комерційної вакцини шляхом інфікування первинних культур клітин була успішною. Виявили цитопатичну дію вірусу в моношарі клітин. Після 3 пасажу в КК заражали КЕ, але характерних змін в ембріонах не відмічалось.

Визначено було у 2020 році інфекційну активність вірусу інфекційного бронхіту курей (ІБК) цих двох штамів. Інфекційна активність вірусу штаму "Н120" склала 6,87 lg ЕІД $_{50/см^3}$, а штаму «QX» - склала 6,7 lg ЕІД $_{50/см^3}$, при розрахунку за методом Ріда та Менча. Штам «М41», що ми використовуємо, зберігається при -196 ºС. За 10 місяців зберігання титри вірусу впали, порівнюючи із початковими значеннями: у штаму вірусу ІБК "QX" він став < 3,2 lg ЕІД $_{50}$/см^3 проти 6,7 lg ЕІД $_{50/см^3}$, яким був 10 міс раніше; у штаму вірусу "Н120" титр зовсім не визначався, проти попереднього дослідження, де він був 6,87 lg ЕІД $_{50/см^3}$.

Таким чином, слідує два дуже важливих висновки про те, що штами коронавірусу ІБК не стабільні і різні за чутливістю до зберігання в умовах мінусових температур, за якими зберігаються стандартно інші віруси. Можливо припустити, що існування широкої серологічної мінливості вірусу інфекційного бронхіту курей має відношення і до збереження біологічних властивостей різних штамів за умов кріовпливу.

По-друге, при дослідженнях із штамами вірусу інфекційного бронхіту курей необхідно до проведення основних дослідів обов'язкове контролювання в короткі терміни до дослідів рівня інфекційної активності вірусу, що виражається у титрах вірусу. Без такого контролю є вірогідність використати інактивований фізичним впливом вірус, наприклад, довготривалою дією мінусових температур.

3.2.2 Перевірка впливу наносполуки фулерену C_{60} на курячі ембріони

Перевірили дію сполуки фулерену C_{60} у концентрації 37 мкг/мл та 150 мкг/мл, зразка який зберігався два роки, вводивши її різними способами та у різних об'ємах на один КЕ (0,1 см^3, 0,2 см^3, 0,5 см^3 та 1 см^3). Наприклад, введення

0,1 $см^3$ та 0,2 $см^3$ в алантоїсну порожнину КЕ 8-ми денного віку протягом періоду спостереження 8 діб, не виявило токсичного впливу на курячі ембріони.

Крім того, в доступній нам літературі ми не знайшли відомостей про максимальний об'єм сторонньої рідини, який можливо ввести в один ембріон, не викликаючи токсичного ефекту. Тому, була перевірена методика введення водорозчинної форми сполуки у варіаціях: в бік по 0,5 $см^3$, через повітряну камеру по 0,5 $см^3$; паралельно вбік по 0,5 смЗ + через повітряну камеру по 0,5 $см^3$ (всього разом 1,0 $см^3$), та по 1,0 $см^3$ через повітряну камеру. Виявилось, що не спостерігали ознак токсичного впливу навіть за максимального навантаження у 1,0 $см^3$, незважаючи на спосіб введення.

Таким чином, встановлено, що сполука фулерен С60 є безпечною для застосування in ovo навіть у максимальному об'ємі введення — по 1,0 $см^3$ на КЕ (і не залежало від місця введення). Це є дуже важливим моментом, оскільки у спеціальній літературі максимальним об'ємом за методиками є об'єм - 0,2 $см^3$.

Таким чином, ми отримали нові наукові дані, що надають можливість проводити експерименти з більшою кількістю тестової сполуки у чутливих моделях *in ovo*. Дані експерименти проведені поза планом проекту першого етапу, але відповідь на поставлені питання є запорукою ефективних подальших досліджень.

3.2.3 Перевірка дії наносполуки фулерену $С_{60}$ в системі *in ovo* при різних схемах застосування (терапевтичній, профілактичній, віруліцидній)

Перевірка дії наносполуки фулерену $С_{60}$ в системі in ovo при застосуванні у терапевтичній схемі

Для перевірки дії тестованої сполуки у терапевтичній схемі, проводили наступні маніпуляції.

Відібрані для досліджень рухливі з добре розвинутими судинами курячі ембріони (з відміченими межами повітряної камери, місцем розташування ембріона та місцем для інокуляції), які були інокульовані відповідно до розведення вірусу (ряд десятикратних розведень вірусу від 10-1 до 10-6 на ЗФР, перемішаних

для використанням за допомогою вортексу). Вводили по 0,2 $см^3$ розведення вірусу в алантоїсну порожнину КЕ, по 4 ембріони на кожне розведення від 10^{-1} до 10^{-6}. Процедуру повторювали у двох повторах, один з яких використати як контроль вірусу. КЕ інкубували 8 діб за температури 37°С і відносній вологості 50-52%. Дослідили застосування фулерену С60 через 1, 2, 4, 6 год після інфікування КЕ коронавірусом ІБК, внесенням його МДК у КЕ. В якості контрольних використали КЕ, яким було інокульовано ЗФР. Ембріони в процесі інкубації овоскопували двічі на день. За отриманими результатами виявлено, що при внесенні фулерену через 1 та 2 год інфікування КЕ коронавірусом ІБК, титр інфекційної активності вірусу зменшився на однакову величину і склав 5,45 lg ЕІД $_{50/см^3}$ у досліді, проти значення 6,7 lg ЕІД $_{50/см^3}$ — у контролі.

При внесенні фулерену С60 у інфіковані КЕ через 4 год інфікування коронавірусом ІБК титр інфекційної активності знизився і склав 4,45 lg ЕІД $_{50}/см^3$ у досліді, проти значення 6,7 lg ЕІД $_{50/см^3}$ — у контролі. При застосуванні фуленену С60 через 6 год після інфікування коронавірусом ІБК КЕ титр інфекційної активності складав 6,45 lg ЕІД $50/см^3$, проти значення 6,7 lg ЕІД $_{50/см^3}$ — у контролі.

Таким чином, з отриманих даних можливо прийти до висновку, що фулерен С60 знижує інфекційну активність коронавірусу при його застосуванні через 1, 2, 4 год у інфіковану коронавірусом чутливу біологічну систему. Можливо припустити, що через 1-2 год внесення фулерену до інфікованої чутливої біологічної системи відбуваються однакові або подібні внутрішньоклітинні процеси взаємодії, оскільки титр вірусу знизився на однакову величину у порівнянні із контролем. Але, найбільшого ефекту досягнуто при застосуванні (введенні) дослідної сполуки через 4 год після інфікування (зниження інфекційної активності на 2,25 lg ЕІД $_{50}/см^3$, що є значимим показником). При застосуванні через 6 год після інфікування достовірного протикоронавірусного ефекту не виявлено. Таким чином, через 6 год після інфікування чутливої системи коронавірусом сполуку не варто застосовувати, бо, очевидно, що стадія реплікації вірусу у клітині, яка була чутлива до дії сполуки, вже завершилась.

Отримані дані особливо важливі, вони свідчать про те, що сполука діє на вірус у його ранніх стадіях реплікації (1-4 год) у чутливій біологічній системі. Тому, це дуже важливо врахувати для обов'язкового вивчення молекулярних механізмів взаємодії вірусу-клітини-фулерену С60 як в теоретичному, так і в практичному плані. Крім того, отримані перші пілотні дані, які важливі для відпрацювання подальшої оптимальної терапевтичної схеми при визначенні строків застосування сполуки у протикоронавірусному препараті. Ці дослідження потребують продовження у доклінічних та клінічних дослідженнях.

Перевірка дії наносполуки фулерену C_{60} в системі in ovo при застосуванні у віруліцидній схемі

Застосували віруліцидну схему №1 для перевірки противірусної активності наносполуки фулерену C_{60} за введення 0,2 $см^3$ на КЕ комплексу з розведень вірусу та фулерену (1:1) у МДК 37 мкг/мл, при 1 год контакту в захищеному від сонця та світла місці; розведення з 10^{-1} по 10^{-7}, по 4 КЕ на розведення. Спостереження протягом 8 діб.

Встановлено, що титр вірусу ІБК штаму "М 41" при застосуванні фулерену в МДК у віруліцидній схемі №1 станровить 6,45 lg ЕІД $_{50/см^3}$, у контролі вірусу — титр є 7,2 lg ЕІД $_{50/см^3}$.

За застосування більшої дози наносполуки фулерену у віруліцидній схемі №1 у співвідношенні до вірусу у два рази (0,2 $см^3$ вірус та 0,4 $см^3$ фулерену) при спостереженні протягом 8 діб виявило, що інфекційна активність вірусу ІБК при застосуванні фулерену становила 5,7 lg ЕІД $_{50}/см^3$, а у конролі — 6,7 lg ЕІД $_{50}/см^3$.

Таким чином, різниця в інфекційній активності є незначною та не вірогідною. Даний експеримент підтвердив аналогічні результкати в системі in vitro. Наносполука фулерен C_{60} не проявляє достовірну противірусну дію за застосування у віруліцидній схемі №1 навіть у подвійній дозі.

Перевірка дії наносполуки фулерену C_{60} в системі in ovo при застосуванні у профілактичній схемі

Для перевірки противірусної активності у профілактичній схемі в алантоїсну порожнину дослідних КЕ вводили фулерен в об'ємі 0,4 $см^3$ і концентрації 150 мкг/мл. Ембріони інкубували протягом години у термостаті при 37°С і відносній вологості 50-52%. Після цього, вводили вірусвмісну рідину у розведеннях, що містять 10, 100 і 1000 ЕІД $_{50/см^3}$ в об'ємі 0,2 $см^3$. Тобто співвідношення фулерен-вірус складає 2:1. Усього брали по 4 КЕ на розведення. Після інокуляції вірусу, КЕ інкубувались протягом 8 діб за температури 37°С і відносній вологості 50-52%. По закінченню терміну інкубації, КЕ ставили у холодильник при +4°С на 16-18 год, після чого проводили їх розтин з дотриманням асептичних умов. Зразки алантоїсної рідини з усіх ембріонів одного розведення були відібрані у центрифужні пробірки, центрифуговані при 3000 об. 15 хв і зберігались при -67°С для подальшого визначення титру. Готували 10-ти кратні розведення алантоїсної рідини на ФБР і вводили по 0,2$см^3$ в алантоїсну порожнину, по 4 КЕ на розведення з 10^{-3} по 10^{-6}. Ембріони інкубувались протягом 8 діб за температури 37°С і відносній вологості 50-52%. По закінченню терміну інкубації, КЕ ставили у холодильник при +4°С на 16-18 год, проводили їх розтин і порівнювали з контролем.

Встановлено, що при введенні фулерену з дозою вірусу 100 ЕІД титр склав 5,2 lg ЕІД $_{50/см^3}$, тобто спостерігаємо зниження титру на 2 lg ЕІД $_{50/см^3}$ порівняно з контролем, що становить 7,2 lg ЕІД $_{50/см^3}$.

ВИСНОВКИ

1. Застосування водорозчинної форми наносполуки фулерену C_{60} у МДК в терапевтичній схемі в системі *in vitro,* через 1 год після інфікування чутливої біологічної системи коронавірусом ВРХ, знижувало титр інфекційної активності вірусу достовірно ($P \leq 0,004$). МАК становила 9,5 мкг/см^3, а ХТІ -3,95.

2. Використання зразків наносполуки фулерену C_{60} (після їх дворічного зберігання) щодо коронавірусу ВРХ в системі *in vitro* за взаємодії у віруліцидній схеми №1 в експозиціях 30 та 60 хвилин не виявило вірогідно значимого протикоронавірусного ефекту, хоча знижувало титр інфекційної активності вірусу на 0,44-0,98 lg $ТЦД_{50}$/см^3, що є недостатнім.

3. Застосування водорозчинної форми наносполуки C_{60}, яка зберігалась протягом двох років, у віруліцидній схемі № 2 за взаємодії із коронавірусом ВРХ протягом 30 та 60 хвилин у системі *in vitro* вірогідно знижувало інфекційну активність вірусу в обох випадках ($P \leq 0,03$), але не знищувало вірус повністю.

4. Найбільш ефективною водорозчинна форми наносполуки фулерену C_{60} у МДК в системі *in vitro* виявилась при застосуванні у терапевтичній схемі, через 1 год після інфікування чутливої біологічної системи коронавірусом ВРХ, зниження титру інфекційної активності вірусу достовірно ($P \leq 0,004$).

5. При дослідженні в системі *in vitro* сполуки фулерену C_{60} у МДК при використанні у профілактичній схемі достовірного впливу не виявлено.

6. Штами коронавірусу ІБК не стабільні і різні за чутливістю до зберігання в умовах мінусових температур. Перевірка рівня інфекційної активності вірусу обов'язкова безпосередньо перед проведенням дослідів.

7. Встановлено, що сполука фулерен C_{60} є безпечною для застосування в системі *in ovo* навіть при максимальному об'ємі введення — по 1,0 см^3 на КЕ (і не залежало від місця введення).

8. Фулерен C_{60} *in ovo* знижує інфекційну активність коронавірусу при його застосуванні у терапевтичній схемі через 1, 2, 4 год у інфікованій вірусом чутливій біологічній системі. Таким чином, сполука діє на вірус у його ранніх стадіях реплікації (1-4 год) у чутливій біологічній системі.

9. Максимальний противірусний ефект досягнуто у терапевтичній схемі *in ovo* при введенні дослідної сполуки через 4 год після інфікування (зниження інфекційної активності на 2,25 lg ЕІД $_{50/см}{}^{3}$, що є значимим показником), а також у профілактичній схемі з дозою вірусу 100 ЕІД (зниження інфекційної активності на 2 lg ЕІД $_{50/см}{}^{3}$).

10. При застосуванні сполуки *in ovo* у терапевтичній схемі через 6 год після інфікування достовірного протикоронавірусного ефекту не виявлено.

11. В обох системах: *in vitro* та *in ovo* при застосуванні фулерену C_{60} у віруліцидній схемі №1 (навіть за введення подвійної дози сполуки) та при використанні у профілактичній схемі *in vitro* не виявили достовірну противірусну дію, різниця в інфекційній активності була незначною та не вірогідною.

Етап 2 (2021 р.)

РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження

2.1 Характеристика тест-системи

Дослідження проводили на білих щурах (*Rattus norvegicus*) обох статей. Щури є загальновизнаним видом гризунів, що використовуються для вивчення токсичності речовин.

Гостру токсичність досліджували з використанням білих щурів самців і самиць з масою тіла 170 – 180 г. Дослідження субхронічної токсичності проводили на білих щурах самцях масою тіла на момент отримання 160 - 180 г.

Після отримання кожна тварина була оглянута з метою визначення стану її здоров‘я та відповідності вимогам до біологічних моделей в токсикологічному експерименті та придатності для даних досліджень. Період акліматизації тривав 5 днів.

Тварини утримувались у полікарбонатних клітках розміром 550х320х180 мм з кришками із оцинкованої сталі розміром 660х370х140 мм та скляними поїлками. У клітці розміщали не більш ніж по 5 щурів. Клітка мала етикетку із зазначенням дослідження, виду, статі, номерів тварин та дози.

В приміщенні для утримання тварин підтримувались наступні умови: температура - 20-24°С, вологість - 30-70%, цикл освітлення – 12 годин світло/12 годин темрява. Всім тваринам згодовували стандартний раціон для лабораторних тварин і воду із міської водопровідної мережі (після знезараження) давали тваринам ad libitum. У якості підстилки використовували стружку вільхи (Alnus glutinosa).

Після акліматизації усі щури були рандомізовані по масі тіла і послідовно пронумеровані.

2.2. Досліджувана речовина

Готовий розчин водорозчинного C_{60} фулерену (концентрація - 0,15 мг/мл).

2.3 Дослідження гострої токсичності

Дослідження гострої токсичності тест-зразка проводили за лімітуючим тестом відповідно до OECD 420 [102] та наказом МОЗ України від 14.12.2009 № 944 [103].

Після акліматизації було відібрано 6 самців і 6 самок щурів. Тварини були ідентифіковані за допомогою індивідуальних міток і рандомізовані по масі тіла.

Нумерація самиць та самців наведено нижче:

Об'єм, мл/кг	№ тварин	
	самці	самиці
20,0	1	2
	3	5
	4	6
	7	10
	8	11
	9	12

Дози і режим введення.

Досліджувану речовину C_{60} фулерен уводили щурам у шлунок одноразово за допомогою металевого зонда в об'ємі 20,0 мл/кг маси тіла. При введенні препарату в шлунок дотримувались техніки введення і враховувались дані про кількість рідини, яку допустимо вводити тваринам в залежності від шляху введення, їх виду та маси тіла [104, 105]. Уведення більших об'ємів може викликати біль, збудження, зміни фізіологічних параметрів (наприклад: електролітний дисбаланс у сироватці крові, підвищення артеріального тиску, збільшення частоти дихання і т.д.), а також призвести до порушення всмоктування досліджуваного тест-зразка.

Кількість препарату, що вводилася кожній тварині була розрахована на підставі початкових індивідуальних значень маси тіла безпосередньо перед введенням.

Індивідуальні дози були розраховані в мл для кожної тварини, враховуючи масу її тіла у день введення після голодування протягом ночі.

За 16 годин до експерименту харчування тварин припинялося, напування зберігалося. C_{60} фулерен уводили однократно о $11^{00} – 12^{00}$ годині ранку, харчування відновлювалося через 3 години після введення.

Спостереження, дослідження, тести, вимірювання.

У перший день після введення тетс-зразка щурам протягом першої години безперервно, а потім через 3, 5 годин здійснювався контроль за виникненням клінічних ознак токсичності та/або смерті. Протягом наступних 13 діб кожна тварина обстежувалась двічі на день (близько 10^{00} і о 17^{00}). Реєструвались час загибелі тварин, виникнення та зникнення клінічних ознак токсичності.

До початку досліду, на 7 добу і в кінці 14-денного періоду спостережень, визначали масу тіла і проводили розрахунок приросту маси тіла тварин в кінці експерименту. По закінченню 14-денного спостереження проводили макроскопічне обстеження внутрішніх органів тварин.

2.4 Дослідження субхронічної токсичності

Дослідження токсичності за повторних уведень проведене відповідно до *„Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів”* [103].

При проведенні дослідження субхронічної токсичності тварини були послідовно марковані і розсаджені у клітки по 5 особин - відповідно до дозових рівнів. У кожній експериментальній групі було по 5 щурів.

Розподіл тварин на групи в залежності від дози при дослідженні субхронічної токсичності наведено нижче:

Експериментальна група	Номери тварин
C_{60} фулерен – 20 мл/кг	1-5
C_{60} фулерен – 5 мл/кг	6-10
Контроль	11-15

Дози і режим введення.

C_{60} фулерен внутрішньошлунково вводили один раз на добу о $11^{00} – 12^{00}$ годині ранку в 2-х дозових рівнях 0,75 і 3 мг/кг маси тіла (відповідає об’ємам 5 і 20 мл/кг

маси тіла) і перераховували індивідуальні об’єми для введення після зважування раз на тиждень.

Спостереження, дослідження, тести, вимірювання

За тваринами вели спостереження протягом усього періоду експозиції тест–зразка: здійснювали моніторинг клінічних ознак інтоксикації, маси тіла, споживання корму та води. Усі помітні ознаки незадовільного стану здоров‘я та відхилень у поведінці реєстрували щоденно між 10^{00} год та 12^{00} год. Фіксували терміни початку, тривалості та ступеня вираженості будь-яких відхилень від норми.

Індивідуальну маса тіла тварин реєстрували відразу після отримання, перед першим уведенням, 2 рази на тиждень у ранкові часи, протягом усього періоду дослідження, обраховували приріст маси тіла щурів усіх експериментальних груп. Визначення споживання корму і води проводилось 2 рази на тиждень індивідуально для кожної тварини протягом усього періоду експозиції C_{60} фулерен.

Через 24 год після останнього введення тест-зразка щури були піддані евтаназії (цервікальна дислокація) під легким ефірним наркозом. Протягом ночі перед евтаназією всі тварини голодували, за день до евтаназії проводилось обстеження тварин. У них були відібрані зразки крові для гематологічного дослідження у пробірки для гематології з калієм ЕДТА (KABE Labortehnik) та біохімічного аналізу сироватки крові. Здійснювався розтин, проводили макроскопічні дослідження.

Зразки крові були досліджені у день отримання за допомогою автоматичного гематологічного аналізатора.

Методи, показники та одиниці вимірювання, що були використані у гематологічних тестах:

Показник	Одиниці вимірювання
Гемоглобін	г/дл
Еритроцити	10^6/мл
Гематокрит	%
Лейкоцити	10^3/мл
Лейкоцитарна формула (нейтрофіли, лімфоцити, еозинофіли, базофіли, моноцити)	%
Тромбоцити	10^3/мл

Біохімічні показники сироватки були досліджені у день отримання за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора.

Показники, методи, обладнання та одиниці вимірювання наведені нижче:

Показник	Одиниці вимірювання
Аланінамінотрансфераза	МО/л
Аспартатамінотрансфераза	МО/л
Лужна фосфатаза	МО/л
Білірубін (загальний)	мг/дл
Амілаза	МО/л
Холестерин	ммоль/л
Тригліцериди	ммоль/л
Сечовина	ммоль/л
Креатинін	мкмоль/л
Глюкоза	ммоль/л
Загальний білок	г/л

Показник	Одиниці вимірювання
Альбумін	г/л

По закінченню дослідження проводили макроскопічне обстеження внутрішніх органів тварин.

2.5 Визначення безпечності (токсичної дії) одноразового введення C_{60}ВРФ на 1-денних курчатах

Матеріали: десять 1-денних курчат породи леггорн, водний розчин фулерену C_{60} (0,15мг/мл), водний розчин фулерену C_{60} розведений навпіл дистильованою водою (1:1), дистильована вода, піпетки Пастера.

Групи :

- група 1: 2 курчат, яких випоювали одноразово у кількості 1,0 мл дистильованою водою;
- група 2: 4 курчат, яких випоювали одноразово у кількості 1,0 мл нативного C_{60} ВРФ;
- група 3: 4 курчат, яких випоювали одноразово у кількості 1,0 мл розведеного навпіл водою для ін'єкцій C_{60} ВРФ (1:1).

Спостереження проводили протягом 14 діб на предмет прояву несприятливих реакцій.

2.6 Визначення протикоронавірусної ефективності дії C_{60}ВРФ *in vivo* у профілактичній та лікувальній схемах застосування на 1-денних курчатах

Матеріали: тридцять 1-денних курчат породи леггорн, водний розчин фулерену C_{60} (0,15мг/мл), дистильована вода, піпетки Пастера, штам інфекційного бронхіту курей VAR2/V2 (вакцина Полімун ІБК ВАР 2).

Курчат було розподілено на наступні групи:

- Г1:профілактика – 8 курчат: птахів інокулювали водним розчином фулерену пероральним шляхом у дозі 1 мл щоденно протягом 4 діб (D0, D1, D2, D3) включаючи день контрольного зараження (D3);
- Г2:лікування – 8 курчат: проводили контрольне зараження птахів (D3), після чого інокулювали водним розчином фулерену пероральним шляхом у дозі 1 мл щоденно протягом 4 діб (D3, D4, D5, D6), включаючи день контрольного зараження;
- Г3: контроль вірусу – 8 курчат: проводили контрольне зараження птахів (D3);
- Г4: контроль C_{60}ВРФ – 3 курчат: птахів інокулювали водним розчином фуллерену (0,15мг/мл) пероральним шляхом у дозі 1 мл щоденно протягом 7 діб (D0, D1, D2, D3, D4, D5, D6);
- Г5: контроль – 3 курчат: замість ВРФ птахів випоювали дистильованою водою у дозі 1 мл щоденно протягом 7 діб (D0, D1, D2, D3, D4, D5, D6).

Птахів утримували в стандартних умовах віварію, кожну групу в окремому боксі з доступом до води та корму ad libitum.

Для контрольного інфікування використовували вакцинний штам інфекційного бронхіту курей VAR2/V2 у 20-кратній дозі. Спосіб введення: 0,05 мл інтраназально та 0,05 мл інтраокулярно.

Спостереження проводили щоденно протягом 14 діб. Особливу увагу приділяли можливим клінічним симптомам інфекційного бронхіту курей (ІБК) (апатія, окуло-назальні виділення, респіраторні ускладнення на предмет важкого та/або частого дихання), загибель. На D0, D3, D5, D7, D10 добу птахів зважували. Статистичний аналіз розподілу тварин між групами виявив однорідність та відсутність відмінностей між тваринами в усіх групах згідно мас перед початком дослідження.

2.7 Статистична обробка результатів досліджень

Одержані експериментальні дані були піддані статистичній обробці з використанням t-критерію Стьюдента [106]. Проводили розрахунок середньої арифметичної (M), похибки репрезентативності (m). Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні $p < 0,05$. Розрахунки проводили на персональному комп'ютері за допомогою програми Excel.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ АНАЛІЗ

(ЕТАП 2, 2021 рік)

3.1 Дослідження гострої пероральної токсичності C_{60} фулерену на щурах

При дослідженні гострої токсичності встановлено, що при пероральному введенні C_{60} фулерену в об'ємі 20,0 мл/кг клінічних симптомів інтоксикації не виявлено. Загибелі тварин не відмічалося.

Індивідуальні дані щоденних спостережень за тваринами представлені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

Індивідуальні дані спостережень за тваринами після гострого перорального введення C_{60} фулерену

№ тварини	Доба після введення речовини																
	Години			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	1	3	5														
Група 1 – 20,0 мл/кг - Самці																	
1 ♂	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н
3 ♂	Н	Н	Н	Н	Н	Н	-	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н	Н	Н
4 ♂	Н	Н	Н	Н	Н	Н	-	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н	Н	Н
7 ♂	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н
8 ♂	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н
9 ♂	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н
Група 2 – 20,0 мл/кг - Самиці																	
2 ♀	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н
5 ♀	Н	Н	Н	Н	Н	Н	-	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н	Н	Н
6 ♀	Н	Н	Н	Н	Н	Н	-	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н	Н	Н
10 ♀	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н
11 ♀	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н
12 ♀	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н	Н	Н	Н	Н	-	-	Н

Примітка: Н – без клінічних ознак, «-» - дні, в які спостереження не проводили

З наведених даних видно, що протягом періоду спостереження у всіх тварин, які вижили, відмічався приріст маси тіла. Маса тіла та її приріст у самців і самок після перорального введення C_{60} фулерену були на рівні фізіологічної норми для даного виду тварин. Середній приріс маси тіла тварин за 14 днів становив 69 г для самців і 24,5 г для самок, узагальнені і індивідуальні дані динаміки маси тіла і приросту маси тіла щурів наведені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Динаміка масси тіла та приріст маси тіла щурів

№ тварини	Початкова маса тіла (г)	Маса тіла (г)			Приріст маси тіла (г)
		День 3	День 7	День 14	
Група 1 – 20,0 мг/кг – Самці					
1 ♂	180	199	214	255	75
3 ♂	183	198	216	263	80
4 ♂	175	191	209	248	73
7 ♂	185	191	204	240	55
8 ♂	173	193	207	215	42
9 ♂	174	191	213	263	89
M ± m	178,33±1,94	193,83±1,41	210,50±2,12	247,33±8,47	69,00±8,29
Група 2 – 20,0 мг/кг - Самиці					
2 ♀	171	177	182	198	27
5 ♀	178	182	187	201	23
6 ♀	181	186	201	205	24
10 ♀	181	183	194	199	18
11 ♀	176	181	192	203	27
12 ♀	173	184	188	201	28
M ± m	176,66±1,76	182,17±1,59	190,67±3,35	201,17±1,23	24,50±1,76

При макроскопічному обстеженні самців і самиць щурів в кінці експерименту (на 14 добу) макроскопічних змін внутрішніх органів не встановлено. Індивідуальні дані макроскопічних досліджень внутрішніх органів самців та самиць представлені в таблицях 3.3 – 3.4.

Таблиця 3.3 Індивідуальні дані макроскопічного обстеження внутрішніх органів самців щурів

№ щурів	Причина виведення із досліду	День	Внутрішні органи	Виявлені зміни
1	Закінчення експерименту	14	легені серце печінка нирки наднирники селезінка тимус	не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено
3	Закінчення експерименту	14	легені серце печінка нирки наднирники селезінка тимус	не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено
4	Закінчення експерименту	14	легені серце печінка нирки наднирники селезінка тимус	не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено
7	Закінчення експерименту	14	легені серце печінка нирки наднирники селезінка тимус	не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено

Таблиця 3.3 (продовження). Індивідуальні дані макроскопічного обстеження внутрішніх органів самців щурів

№ щурів	Причина виведення із досліду	День	Внутрішні органи	Виявлені зміни
8	Закінчення експерименту	14	легені серце печінка нирки наднирники селезінка тимус	не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено
9	Закінчення експерименту	14	легені серце печінка нирки наднирники селезінка тимус	не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено

Таблиця 3.4 Індивідуальні дані макроскопічного обстеження внутрішніх органів самиць щурів

№ щурів	Причина виведення із досліду	День	Внутрішні органи	Виявлені зміни
2	Закінчення експерименту	14	легені серце печінка нирки наднирники селезінка тимус	не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено
5	Закінчення експерименту	14	легені серце печінка нирки наднирники селезінка тимус	не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено
6	Закінчення експерименту	14	легені серце печінка нирки наднирники селезінка тимус	не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено
10	Закінчення експерименту	14	легені серце печінка нирки наднирники селезінка тимус	не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено

Таблиця 3.4 (продовження). Індивідуальні дані макроскопічного обстеження внутрішніх органів самиць щурів

№ щурів	Причина виведення із досліду	День	Внутрішні органи	Виявлені зміни
11	Закінчення експерименту	14	легені серце печінка нирки наднирники селезінка тимус	не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено
12	Закінчення експерименту	14	легені серце печінка нирки наднирники селезінка тимус	не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено не виявлено

Таким чином, величина $ЛД_{50}$ для щурів самців і самиць C_{60} фулерену (концентрація розчину - 0,15 мг/мл) при пероральному шляху введення в організм щурів більше 20 мл/кг маси тіла.

3.2 Дослідження субхронічної токсичності фулерену на щурах

3.2.1 Клінічні ознаки токсичності та виживання тварин

За тваринами протягом всього періоду експозиції C_{60} фулерену велись спостереження і фіксували всі клінічні ознаки інтоксикації.

Результати спостережень щодо виживання щурів за повторних уведень C_{60} фулерену наведені в табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Токсичність C_{60} фулерену за внутрішньошлункових повторних уведень щурам самцям протягом 35 днів (n = 5)

Група	Дозовий рівень	Загибель / всього тварин у групі
1	Контроль (дистильована вода)	0/5
2	C_{60} фулерен 0,75 мг/кг	0/5
3	C_{60} фулерен 3 мг/кг	0/5

Так при внутрішньошлунковому введенні C_{60} фулерену в дозі 0,75 мг/кг маси тіла протягом 35 днів усі тварини мали охайний вигляд, рівне блискуче хутро, шкіру без слідів розчухування та облисіння. Щури були активні, протягом всього періоду спостереження активно споживали корм і воду.

Клінічна картина при внутрішньошлунковому введенні C_{60} фулерену у дозі 3 мг/кг маси тіла мала динаміку, подібну до тієї, що спостерігалась і при введенні дози 0,75 мг/кг.

3.2.2 Динаміка зміни маси тіла щурів

Індивідуальну масу тіла тварин реєстрували відразу після отримання, перед уведенням C_{60} фулерену та, починаючи від першого дня введення тест-зразка два рази на тиждень у ранкові часи протягом усього періоду спостережень (табл. 3.6).

Щури, які отримували C_{60} фулерен у дозі 0,75 мг/кг маси тіла за показником приросту маси тіла практично не відрізнялися від тварин контрольної групи.

Статистична обробка результатів зважування щурів показала, що самці, які отримували C_{60} фулерен у дозі 3 мг/кг маси тіла, починаючи з 14 дня від початку уведення тест-зразка і до закінчення дослідження, набирали вагу повільніше, ніж тварини контрольної групи і їх маса тіла до кінця дослідження знизилась в межах 11 % відносно контрольної групи і тварин, які отримували C_{60} фулерен у дозі 0,75 мг/кг (див. табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Динаміка маси тіла (г) щурів за умов внутрішньошлункового введення C_{60} фулерену протягом 35 днів (M ± m, n = 5)

Дні	Контроль	C_{60} фулерен	
		0,75 мг/кг	3 мг/кг
1	168,58±1,7	165,416±3,74	162,28±1,56 *
4	176,45±1,23	176,39±5,87	168,46±3,00
7	184,00±2,96	188,24±6,56	174,96±4,91

10	187,76±2,58	190,51±6,53	175,78±5,28
14	191,66±1,92	192,44±7,28	177,00±5,48 *
17	196,84±3,10	195,00±7,52	180,66±5,66 *
21	201,84±3,53	197,97±7,38	185,3±5,61 *
24	202,47±2,99	198,72±8,31	184,72±6,14 *
28	204,51±3,68	202,82±8,08	186,2±6,15 *
31	208,69±4,72	203,56±8,37	187,06±6,78 *
35	211,53±4,8	210,20±7,79	187,32±6,97 *

Тут та далі в таблицях: * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем

Таблиця 3.7

Приріст маси тіла (г) щурів за умов внутрішньошлункового введення C_{60} фулерену протягом 35 днів (M ± m, n = 5)

Дні	Контроль	C_{60} фулерен	
		0,75 мг/кг	3 мг/кг
4	7,87±0,83	10,97±2,57	6,18±2,74
7	7,55±1,92	11,86±1,42	6,5±2,70
10	3,76±1,68	2,26±0,49	0,82±0,51
14	3,90±1,59	1,94±1,05	1,22±0,26
17	5,17±1,74	2,56±1,03	3,66±0,52
21	5,01±1,00	2,97±2,25	4,64±0,75
24	0,62±1,19	0,75±1,84	0,58±0,76
28	2,05±0,86	4,10±0,77	1,48±1,31
31	4,18±1,42	0,73±0,7	0,86±0,82
35	2,84±0,42	6,64±0,83 *	0,26±0,24 *

3.2.3 Реєстрація споживання корму та води

Індивідуальне споживання щурами корму (г) та води (г) реєстрували два рази на тиждень, статистична обробка даних представлена в таблицях 3.8 та 3.9.

Таблиця 3.8

Споживання корму (г) щурами за умов внутрішньошлункового введення C_{60} фулерену протягом 35 днів (M ± m, n = 5)

Дні	Контроль	C_{60} фулерен	
		0,75 мг/кг	3 мг/кг
1	20,32±0,58	19,82±0,57	18,22±0,35
4	20,3±0,44	19,8±0,56	17,8±0,21
7	19,76±0,41	18,1±0,18	19,2±0,31
10	20,68±0,32	19,56±1,37	17,52±0,32
14	22,12±1,01	20,1±0,34	17,9±0,62
17	22,26±0,73	20,18±0,79	20,34±0,58
21	21,86±0,67	20,32±0,30	21,14±0,78
24	22,96±0,73	21,78±1,10	19,22±0,54
28	23,3±0,52	21,72±0,48	19,3±0,62
31	24,00±0,73	22,47±0,79	18,08±0,36
35	24,22±0,47	18,66±0,54	18,66±0,54

Таблиця 3.9

Споживання води (г) щурами за умов внутрішньошлункового введення C_{60} фулерену протягом 35 днів (M ± m, n = 5)

Дні	Контроль	C_{60} фулерен	
		0,75 мг/кг	3 мг/кг
1	20,36±0,58	27,7±0,69	20,36±0,58
4	21,92±0,43	28,28±0,51	21,92±0,43

7	24,58±0,68	24,18±0,64	24,58±0,68
10	20,6±0,51	27,22±1,01	20,6±0,51
14	20,26±0,5	24,66±0,93	20,26±0,50
17	20,48±0,45	23,97±0,58	20,48±0,45
21	23,24±0,24	24,32±0,35	23,24±0,24
24	22,02±0,62	24,78±0,46	22,02±0,62
28	19,96±0,44	26,16±1,22	19,96±0,44
31	21,64±0,63	26,36±1,17	21,64±0,63
35	23,8±0,45	24,94±0,42	23,8±0,45

За результатами споживання щурами корму та води не виявлено суттєвих відмінностей між контрольною групою і тваринами, які отримували C_{60} фулерен у дозах 0,75 та 3 мг/кг маси тіла.

3.2.4 Клініко-лабораторні дослідження

Гематологічні показники. Наведені у таблиці 3.10 результати дослідження гематологічних показників свідчать, що на тлі введення як дози 0,75 мг/кг маси тіла, так і дози 3 мг/кг, у крові щурів відсутні достовірні зміни кількості тромбоцитів, лейкоцитів та лейкоцитарної формули крові. Показники червоної крові також були на тому ж рівні, що й у тварин контрольної групи.

Таблиця 3.10

Гематологічні показники венозної крові щурів за умов внутрішньошлункового введення C_{60} фулерену протягом 35 днів

(M ± m, n = 5)

Показники	Контроль	C_{60} фулерен	
		0,75 мг/кг	3 мг/кг
Лейкоцити,10^3мкл	8,33±1,07	6,8±0,4	6,93±1,23
Лімфоцити, %	73,23±5,31	71,34±1,37	67,03±4,38
Моноцити, %	6,67±3,0	6±0,63	4,68±0,23
Нейтрофіли, %	15,33±1,83	17,14±1,15	20,76±3,36
Еозинофіли, %	0,27±0,04	0,82±0,45	0,82±0,2
Базофіли, %	4,5±0,49	4,7±0,66	5,36±1,01
Еритроцити,10^6мкл	8,91±0,21	7,994±0,54	8,68±0,15
Гемоглобін,г/дл	14,9±0,12	13,26±1,03	14,28±0,17
Гематокрит, %	48,37±0,84	43,6±3,19	46,66±0,73
Тромбоцити,10^3мкл	894,33±51,23	713,4±91,61	749,8±74,98

Біохімічні показники сироватки крові. У таблиці 3.11 наведені дані дослідження біохімічних показників сироватки крові щурів, яким протягом 35 днів внутрішньошлунково вводили водний розчин C_{60} фулерену.

Показники сироватки крові, що характеризують структурно-функціональний стан нирок, печінки, вуглеводний, білковий та ліпідний обмін у піддослідних щурів не залежно від дози уведеної сполуки, не відрізнялися від контрольних значень та не виходили за межі фізіологічної норми для щурів [107, 108, 109].

Таблиця 3.11

Біохімічні показники сироватки крові щурів за умов внутрішньошлункового введення C_{60} фулерену протягом 35 днів (M ± m, n = 5)

Показники	Контроль	C_{60} фулерен	
		0,75 мг/кг	3 мг/кг
Альбумін, г/л	44,70±0,73	45,32±1,02	45,72±0,97
Загальний білок, г/л	56,92±0,17	57,06±0,19	57,00±0,15
Сечовина, ммоль/л	7,58±0,15	7,24±0,39	7,22±0,49
Глюкоза, ммоль/л	8,73±0,34	8,45±0,49	8,54±0,41
Загальний холестерин, ммоль/л	2,24±0,04	2,18±0,14	1,98±0,16
Тригліцериди, ммоль/л	0,97±0,07	0,97±0,06	0,88±0,10
Загальний білірубін, мкмоль/л	2,15±0,26	2,12±0,21	2,01±0,21
Активність АлАТ, Од/л	65,74±1,83	58,18±1,95	57,28±3,75
Активність АсАТ, Од/л	137,55±5,9	137,68±9,09	146,66±10,11
Активність ЛФ, Од/л	324,73±35,19	270,66±23,12	314,82±25,94
Активність амілази, Од/л	1102,25±74,18	1227,40±109,64	1295,4±34,76
Креатинін, ммоль/л	63,95±0,30	65,38±1,33	67,55±0,99

Отже, згідно результатів клініко-лабораторних досліджень крові тварин, яким повторно протягом 35 днів уводили C_{60} фулерен у дозі 0,75 мг/кг та 3 мг/кг маси тіла, не виявлено порушень біохімічних параметрів сироватки крові, що характеризують стан печінки та нирок, а також білковий, вуглеводний та ліпідний метаболізм в організмі щурів і гематологічних показників периферичної крові.

3.2.5 Морфологічний аналіз внутрішніх органів щурів

Проведено макроскопічне дослідження внутрішніх органів білих щурів-самців після внутрішньошлункового введення водного розчину C_{60} фулерену у дозі 0,75 мг/кг та 3 мг/кг маси тіла щоденно протягом 35 днів.

Проводили патологоанатомічний розтин тварин, макроскопічно обстежували органи грудної і черевної порожнини та малого тазу.

При зовнішньому огляді контрольних і експериментальних тварин стан їх задовільний. Тварини активні, патологічних змін на шкірі, видимих слизових оболонках не спостерігалось. Шерстний і шкіряний покрови чисті, ознак ушкоджень та гіперпластичних процесів не відмічалось.

На розтині серозні оболонки грудної, навколосерцевої та черевної порожнини гладенькі, блискучі, без проявів патологічних змін, кількість вільної серозної рідини в порожнинах не збільшена. Органи грудної, черевної порожнини, малого тазу розташовані без відхилення від норми, колір і консистенція їх не змінені.

Серце звичайної форми та розмірів, стінки шлуночків та між шлункові перегородки не потовщені. Міокард пружно-еластичної консистенції, на розтині однорідний темно-червоний. Ендокард передсердь та шлуночків гладенький, блискучий, трабекулярний рельєф порожнини шлуночків чіткий.

Клапани серця тоненькі. Стінка аорти тонка, з блискучою інтимою білуватого кольору.

Тканина легень однорідна, пухкої консистенції, на розтині блідо-рожевого кольору. Вогнищевих ущільнень, нерівномірного кровонаповнення судин, ділянок ателектазу паренхіми легень не виявлялось. Поверхня слизової оболонки трахеї і великих бронхів не змінена, рожева, вкрита незначною кількістю слизу, просвіт їх вільний.

Печінка звичайних розмірів, капсула її не пошкоджена, на розрізі коричнювато-червоного кольору.

Нирки бобовидної форми, розмір їх не змінений, зовні вкриті щільною сполучнотканинною капсулою, яка легко відокремлюється від паренхіми органу. Тканина нирок пружної консистенції, без ознак патологічних змін, на розтині чітко виділяється периферійна темніша кіркова зона і світліша мозкова зона, яка розширена в центральній частині і має вигляд піраміди. Стінка сечового міхура щільна, еластична, слизова оболонка блідо-рожева, в порожнині його знаходиться незначна кількість прозорої сечі.

Таблиця 3.12

Дані макроскопічного обстеження внутрішніх органів щурів за умов внутрішньошлункового введення C_{60} фулерену протягом 35 днів (M ± m, n = 5)

Показники	Контроль	C_{60} фулерен	
		0,75 мг/кг	3 мг/кг
Серце	змін не виявлено	змін не виявлено	змін не виявлено
Нирки	змін не виявлено	змін не виявлено	змін не виявлено
Наднирники	змін не виявлено	змін не виявлено	змін не виявлено
Печінка	змін не виявлено	змін не виявлено	змін не виявлено

Легені	змін не виявлено	змін не виявлено	змін не виявлено
Сім'яники	змін не виявлено	змін не виявлено	змін не виявлено
Селезінка	змін не виявлено	змін не виявлено	змін не виявлено
Тимус	змін не виявлено	змін не виявлено	змін не виявлено

Отже, за даними макроскопічного аналізу пероральне введення C_{60} фулерену у дозі 0,75 мг/кг (5 мл/кг) та 3 мг/кг (20 мл/кг) маси тіла щоденно протягом 35 днів не приводило до деструктивних змін у внутрішніх органах тварин. Не спостерігалось дистрофічних змін та ознак запальної реакції у серці, легенях, печінці, підшлунковій залозі, наднирниках, тимусі та селезінці.

3.3 Визначення безпечності (токсичної дії) одноразового введення C_{60}ВРФ на 1-денних курчатах

При визначенні безпечності одноразового введення C_{60}ВРФ на 1-денних курчатах жодного несприятливого ефекту не відмічали протягом 14 діб спостереження, як в дослідних групах, так і у контрольній. Курчата були активними, споживання корму відповідало нормі, розладу з боку шлунково-кишкового тракту або інші симптоми інтоксикації не спостерігались.

3.4 Визначення протикоронавірусної ефективності дії C_{60}ВРФ *in vivo* у профілактичній та лікувальній схемах застосування на 1-денних курчатах

При визначення протикоронавірусної ефективності дії C_{60}ВРФ *in vivo* у профілактичній та лікувальній схемах застосування на 1-денних курчатах було продемонстровано, що при застосуванні профілактичної схеми в групі 1 (Г1) було на 12,5% більше птахів з симптоматикою коронавірусної інфекції порівняно з групою 2 (Г2), в якій було застосовано лікувальну схему введення

C_{60}ВРФ, – 37,5 % та 25 % відповідно (χ^2=0,29; p=0,59). У групі 2 (Г2) кількість птахів з маніфестацією інфекції на кінець дослідження була статистично значима (χ^2=4,00; p=0,046), що на 50% менше ніж в контрольній групі інфікування Г3 (25 % та 75% відповідно). Також, в Г1 спостерігалась менша кількість птахів з симптомами інфекції на 37,5% відносно контрольної групи інфікування Г3 (χ^2=2,29; p=0,13), а саме 37,5 % та 75 % відповідно (таблиця 1).

Таблиця 3.13

Прояв клінічних ознак ІБК серед дослідних груп курчат

№ досліду	Група	Клінічні прояви ІБК	
		Так/Загальна кількість	Відсоток, %
1	Г1	3/8	37,5
1	Г2	2/8	25
1	Г3	6/8	75
1	Г4	0/3	0
1	Г5	0/3	0

Крім того, при спостереженні за тривалістю симптомів ІБК у тварин, було відмічено, що в групах Г1 та Г2 симптоми ІБК зникали на 4± 0,5 добу. В той час як у контрольній групі інфікування (Г3) згасання симптомів захворювання на ІБК відбувалось на 6± 0,75 добу після інфікування.

Відмічена позитивна динаміка приросту маси тіла птахів, яким уводили 1 мл (0,15мг/мл) C_{60}ВРФ порівняно з контрольною групою інфікування.

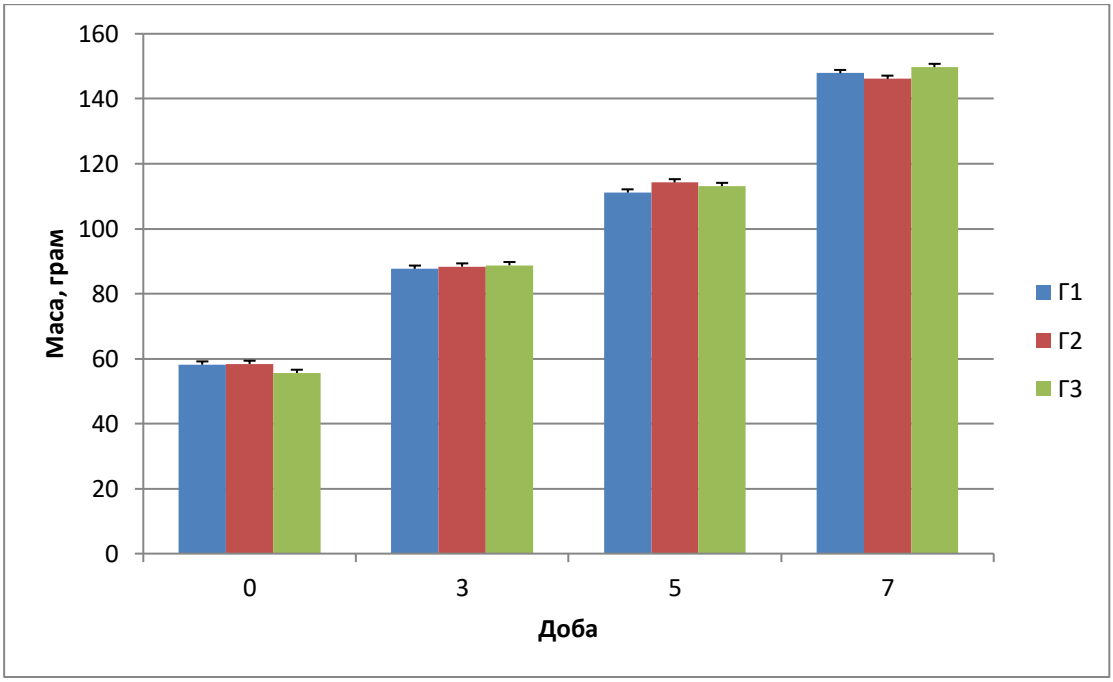


Рис. 1 Динаміка змін приросту маси птахів у дослідних групах протягом 7 діб спостереження.

Згідно з отриманими даними на 10 добу дослідження було відмічено позитивну динаміку приросту маси тіла в усіх групах спостереження відносно початкового стану. Проведений статистичний аналіз отриманих даних згідно парного t-критерію Ст'юдента. Найбільший статистично значимий $p<0,05$ приріст маси тіла спостерігався в групі, що отримувала C_{60}ВРФ згідно з лікувальною схемою (Г2).

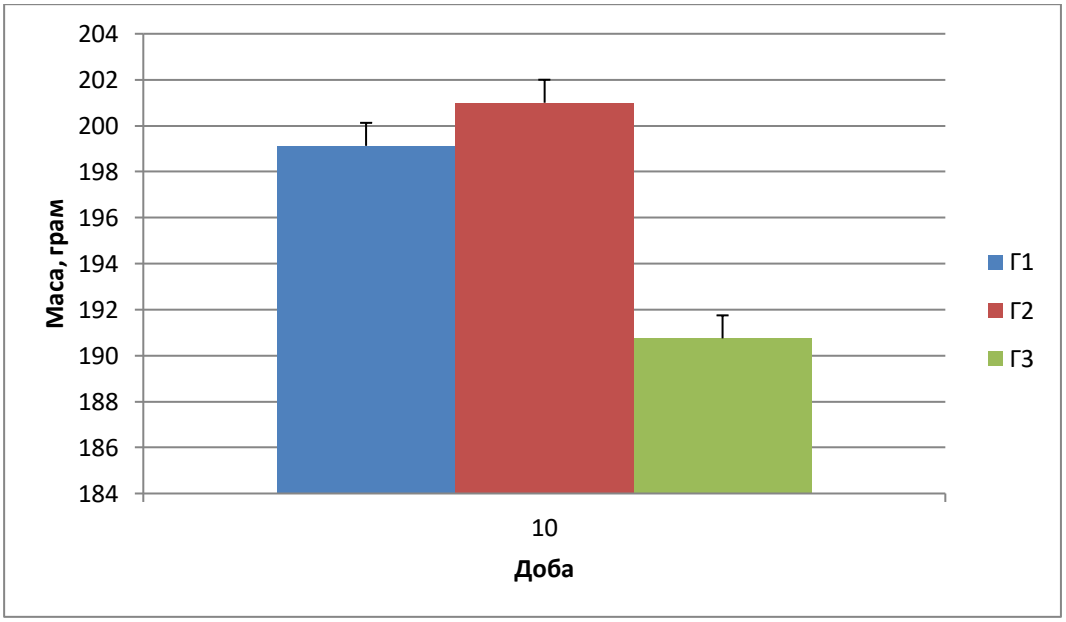


Рис. 2 Динаміка змін приросту маси тварин у дослідних групах на 10 добу.

ВИСНОВКИ

1. За даними вивчення гострої токсичності у дослідах на білих щурах за перорального введення C_{60} фулерену (концентрація розчину - 0,15 мг/мл) величина $ЛД_{50}$ для самців і самиць складає більше 20 мл/кг маси тіла. Клінічних ознак інтоксикації не виявлено, загибелі не раєстрували.

2. Повторні внутрішньошлункові введення C_{60} фулерену щурам самцям протягом 35 днів у дозі 0,75 мг/кг маси тіла не вплинули на інтегральні показники стану тварин, а також дані клініко-лабораторного аналізу (біохімічні параметри сироватки крові та сечі, що характеризують стан печінки та нирок, білковий, вуглеводний та ліпідний метаболізм в організмі, гематологічні показники периферичної крові), не призвели до макроскопічних змін внутрішніх органів.

3. У дозі 3 мг/кг маси тіла водний розчин C_{60} фулерену, уведений щурам протягом 35 днів, не призводив до будь-яких порушень зазначених вище показників за виключенням того, що тварини цієї групи повільніше набирали вагу і маса тіла в кінці експозиції у досліджуваної групи була нижча на 11 % порівняно з тваринами інших експериментальних груп.

4. Визначено протикоронавірусну ефективність C_{60} фулерену у профілактичній та лікувальній схемах застовування на курчатах. Результати дослідження *in vivo* продемонстрували, що відсоток тварин з клінічними проявами ІБК був менший порівняно з контрольною групою інфікування, на 50 % в лікувальній схемі за застосування C_{60}ВРФ і на 37,5 % у профілактичній схемі. Важливо, що клінічні ознаки захворювання на ІБК у групі тварин, які отримували C_{60} ВРФ, зникали на ранніх етапах спостереження. Відмічено позитивну динаміку приросту маси тіла птахів, яким уводили 1 мл (0,15мг/мл) C_{60}ВРФ порівняно з контрольною групою інфікування.

Узагальнення результатів

На початку наших досліджень з метою підготовки біологічних систем до проведення оцінки ефективності антикоронавірусної та токсичної дії водорозчинного фулерену C_{60} нами були підготовлені перещеплювані культури клітин (нирки вівці (НВ), свиної нирки ембріональної версенної лінії (СНЕВ) та новонародженого сирійського хом'яка (ВНК-21)), які зберігались у кріосховищі НЦШМ ДНКІБШМ. Отримали первинну культуру клітин курячих ембріонів із статусом ВПФ. Моношар клітин виповнювався через 24 год. із збереженням морфологічної характеристики, притаманної даним культурам клітин. Після перевірки на відсутність сторонніх агентів всі культури клітин були придатні до подальших досліджень і використовувались.

Також нами були адаптовані *in vitro* та *in ovo* коронавіруси тварин: коронавірусу великої рогатої худоби, вірусу інфекційного бронхіту курей (ІБК), вірусу трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС). Всі дослідження проведені з дотриманням правил біологічної безпеки роботи в лабораторіях рівня BSL2. Нами була досліджена цитопатична дія *in vitro* (з вірусом ВРХ) та ембріотоксична дія (з вірусом ІБК) *in ovo* на 9 - 10 добових курячих ембріонах та їх клітинах: нирки (НЕК) та фібробластах (ФЕК).

У культурі клітин ВНК-21 досліджено десять повторень для кожної концентрації наносполуки фулерену C_{60} (150; 75; 37,5; 19; 9; 5, 3,6 мкг/мл). Визначено гранично допустиму цитотоксичну концентрацію (МДК) фулерену C_{60}, яка становила 37,5 ± 3,0 мкг/мл. У культурі клітин нирки вівці перевірено діапазон наступних концентрацій фулерену C_{60}: 150; 75; 40; 37,5; 35; 30; 25; 20; 18,75; 9,4 мкг/мл. Визначено також МДК, яка становила 37,5 мкг/мл. Таким чином, обидві біологічні системи (культури клітин, отриманих з різних видів тварин) однаково чутливі до наносполуки фулерену C_{60}. Отже, водорозчинний фулерен C_{60} є відносно безпечною речовиною, при використанні його у формі

водного колоїдного розчину: експерименти *in vitro* довели відсутність токсичної дії фулерену C_{60} у концентраціях (37,5 ± 3,0 мкг / мл) і нижче.

У курячих ембріонах концентрації C_{60} ВРФ: 75; 40; 37,5; 35; 30; 25; 20; 18,75; 9,4 мкг/мл не викликають місцево-подразнюючої дії. Для визначення МДК в курячі ембріони вводили по 150 мкг/мл на ембріон, в результаті МДК у КЕ складає > 30 мкг/мл.

Титр інфекційної активності вірусу ТГС, визначений у культурі клітин ВНК-21 за методом Ріда та Менча становив 7,50 ± 0,22 lg $ТЦД_{50/см3}$ до зберігання в колекції НЦШМ ДНКІБШМ та не змінився після рекультивування у культурі клітин СНЕВ (7,50 ± 0,22 lg $ТЦД_{50/см3}$). Коронавірус ВРХ культивували у перещеплювальній культурі клітин нирки вівці (НВ), було встановлено титр його інфекційної активності, що складав 7,5 lg $ТЦД_{50/см3}$. Також було встановлено титр вірусу ІБК, який склав 6,7 lg $ЕіД_{50/см^3}$. Визначена інфекційна активність штаму вірусу ІБК «QX», що склала 6,87 lg $ЕІД_{50/см^3}$. Наявність вірусу у дослідному матеріалі підтверджена, окрім серологічних реакцій, ТЕМ.

Перевірена, визначена інфекційна активність 5 штамів вірусу ІБК (та відібрані три штами, перспективні для проведення робіт). Підібраний оптимальний для досліджень штам вірусу інфекційного бронхіту курей: «М-41», титр якого був найвищим і склав 6,7 lg $ЕІД_{50}/см^3$ (у порівнянні із іншими штамами: для штаму "1/96" – < 3,2 lg ЕІД $50/см^3$; для штаму "QX" – < 3,2 lg ЕІД $50/см^3$; для штаму "Ма 5 "– 5,95 lg ЕІД $50/см^3$; для штаму "4-91" – 4,95 lg ЕІД $50/см^3$). Наявність вірусу у дослідному матеріалі підтверджена, окрім серологічних реакцій, ТЕМ. Коронавірус ВРХ адаптований та культивувався нами у перещеплювальній культурі клітин нирки вівці, титр його інфекційної активності досягав 7,5 ± 0,22 lg $TCID_{50}/см^3$

В чутливій біологічній системі *in vitro* проведений комплекс досліджень з визначення віруліцидної, профілактичної та терапевтичної дії сполуки фулерену C_{60} щодо бета коронавірусу ВРХ. Встановлено відсутність вірогідно значимого ($P \geq 0,5$) протикоронавірусного ефекту в системі *in vitro* при застосуванні зразків наносполуки фулерену C_{60} (після їх дворічного зберігання) за використання у віруліцидній схемі №1 в експозиціях 30 та 60 хвилин. Зниження титру інфекційної активності вірусу становило 0,44-0,98 lg $ТЦД_{50}/см^3$, що є недостатнім. C_{60}ВРФ проявляє противірусну активність у віруліцидній схемі № 2. При виявленні дії водорозчинної форми наносполуки C_{60}, яка зберігалась протягом двох років, у віруліцидній схемі № 2 за взаємодії із коронавірусом ВРХ протягом 30 та 60 хвилин (у системі *in vitro)* встановлено вірогідне зниження інфекційної активності вірусу в обох випадках ($P \leq 0,03$), навіть при експозиції вірусу 30 хв, але не призводило до знищення вірусу повністю. Зниження інфекційної активності після експозиції з досліджуваною речовиною протягом 30 хв і 60 хв на ≥ 1,4 lg ТЦД50/см3.

При застосуванні у терапевтичній схемі (в системі *in vitro)* водорозчинної форми наносполуки фуллерену C_{60} у МДК 37,5 мкг/мл через 1 год після інфікування чутливої біологічної системи коронавірусом ВРХ, встановлено достовірне ($P \leq 0,004$) зниження титру інфекційної активності вірусу на 2,28 lg $ТЦД_{50}/см^3$, що є обнадійливим для подальшого використання сполуки в доклінічних та клінічних випробуваннях.

Визначено МАК, що склало 9,5 мкг/мл та ХТІ, який 3,95.

Застосування сполуки фуллерену C_{60} в МДК (в системі *in vitro)* у профілактичній схемі виявилось не ефективним, достовірного впливу на бетакоронавірус не виявлено ($P \geq 0,5$).

Проведений також комплекс досліджень з наносполукою фулерену C_{60} в системі *in ovo* (на курячих ембріонах) з вірусом інфекційного бронхіту курей в

різних схемах застосування проти коронавірусу. Вивчена дія C_{60} ВРФ на коронавірус інфекційного бронхіту курей у терапевтичній схемі застосування через 1, 2, 4, 6 годин на КЕ. Встановлено зниження титру інфекційної активності вірусу через 1 год $\geq$ 1,25 lg ЕіД $_{50}$/см^3, через 4 год - $\geq$ 2,25 lg ЕіД $_{50}$/см^3. Встановили у віруліцидній схемі № 1 на КЕ зниження титру інфекційної активності вірусу $\geq$ 0,75 ЕіД $_{50}$/см^3.

Виявлено, що штами коронавірусу ІБК не термо стабільні і різні за чутливістю до зберігання в умовах мінусових температур (мінус 78^{o}С -80^{o}С), за якими стандартно зберігають інші віруси. Встановлена необхідність обов'язкової перевірки активності штамів ІБК після зберігання безпосередньо перед проведенням досліджень з визначенням титру інфекційної активності вірусу.

Встановлено, що сполука фулерен C_{60} є безпечною для застосування *in ovo* навіть у максимальному об'ємі введення — по 1,0 см^3 на КЕ (що не залежало від місця введення сполуки), не викликала загибелі чи уражень у КЕ.

Отримані результати досліджень в курячих ембріонах, підтвердили результати досліджень в системі *in vitro*, що сполука фулерену C_{60} знижує інфекційну активність бета коронавірусу при його застосуванні через 1, 2, 4 год після інфіковування чутливої біологічної системи. Отримані дані особливо важливі, вони свідчать про те, що сполука діє на вірус у його ранніх стадіях реплікації (1-4 год) у чутливій біологічній системі. Найбільшого ефекту досягнуто при застосуванні (введенні) дослідної сполуки через 4 год після інфікування (зниження інфекційної активності на 2,25 lg ЕІД $_{50/см^3}$, що є значимим показником). Однак, встановлено, що при застосовуванні сполуки фулерену C_{60} вже через 6 год після інфікування чутливої біологічної системи виявляється запізно, достовірного протикоронавірусного ефекту не виявлено. Таким чином, сполука є інгібітором коронавірусу на ранніх стадіях його

реплікації і може використовуватись на початку розвитку інфекційного процесу, так званим першим ешелоном протидії вірусній агресії.

Встановлено підтвердження в системі *in ovo* отриманих результатів досліджень в системі *in vitro*, щодо неефективності застосування фулерену C_{60} у віруліцидній схемі (№1) та профілактичній схемах. Ріізниця в інфекційній активності є незначною та не вірогідною. Наносполука фулерену С60 навіть у подвійній дозі застосування не проявила достовірної противірусної дії за застосування у віруліцидній схемі (№1).

На останньому етапі дослідження нами було визначено протикоронавірусну ефективність C_{60} фулерену у профілактичній та лікувальній схемах застовування на курчатах. Результати дослідження *in vivo* продемонстрували, що відсоток тварин з клінічними проявами ІБК був менший порівняно з контрольною групою інфікування, на 50 % в лікувальній схемі застосування C_{60}ВРФ і на 37,5 % у профілактичній схемі. Важливо, що клінічні ознаки захворювання на ІБК у групі тварин, які отримували C_{60}ВРФ, зникали на ранніх етапах спостереження. Відмічено позитивну динаміку приросту маси тіла птахів, яким уводили 1 мл (0,15мг/мл) C_{60}ВРФ порівняно з контрольною групою інфікування. Встановлено, що за перорального введення C_{60}ВРФ у максимально допустимому об’ємі самцям та самицям щурів клінічних симптомів інтоксикації не виявлено, загибелі тварин не реєстрували. Згідно результатів клініко-лабораторних досліджень крові тварин за перорального введення C_{60} ВРФ (3 і 0,75 мг/кг маси тіла) упродовж 35 діб не виявлено порушень біохімічних параметрів сироватки крові, що характеризують стан печінки та нирок, білковий, вуглеводний та ліпідний метаболізм в організмі щурів, а також змін гематологічних показників периферичної крові. Макроскопічні

дослідження внутрішніх органів щурів показали відсутність патологічних змін за перорального введення C_{60} ВРФ.

При дослідженні субхронічної токсичності при внутрішньошлунковому введенні C_{60} фулерену щурам самцям протягом 35 днів у дозі 0,75 мг/кг маси тіла не вплинули на інтегральні показники стану тварин, а також дані клініко-лабораторного аналізу (біохімічні параметри сироватки крові та сечі, що характеризують стан печінки та нирок, білковий, вуглеводний та ліпідний метаболізм в організмі, гематологічні показники периферичної крові), не призвели до макроскопічних змін внутрішніх органів. У дозі 3 мг/кг маси тіла C_{60} фулерен, уведений щурам протягом 35 днів, не призводив до будь-яких порушень зазначених вище показників, проте тварини цієї групи повільніше набирали вагу порівняно з тваринами інших експериментальних груп.

Аналіз результатів проведених досліджень свідчить про перспективність використання досліджуваного C_{60}ВРФ при створенні прототипу антивірусного препарату для застосування в противірусній терапії коронавірусної інфекції.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Neuman BW, Adair BD, Yoshioka C, Quispe JD, Orca G, Kuhn P, Milligan RA, Yeager M, Buchmeier MJ. Supramolecular architecture of severe acute respiratory syndrome coronavirus revealed by electron cryomicroscopy. //J. virol.- 2006.- 80(16).-P.7918–7928.

2. Risco C. The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins / C. Risco // Prod. Anim. Zootehn. Med. Vet. – 1988. – Vol. 38. – 11. – P. 39–44.

3. Barcena M, Oostergetel GT, Bartelink W, Faas FG, Verkleij A, Rottier PJ, Koster AJ, Bosch BJ. Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirion. //Proc. Nat. Acad. of Sci. USA.- 2009.-106(2).-P.582–587.

4. Kubo H, Yamada YK, Taguchi F. Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. //J Virol. – 1994.- 68.-P.5403–5410.

5. Ястребов А. С. Вирусные гастроэнтериты свиней / А. С. Ястребов // Минск: Хата. — 1999. — 80 с.

6. Travis Clement. Measurement of neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in sow serum, colostrum, and milk samples and in piglet serum samples after feedback ./Travis Clement, MS; Aaron Singrey, MS; Steven Lawson, PhD; Faten Okda, MS; Julie Nelson, MS; Diego Diel, DVM, PhD, MS; Eric A. Nelson, PhD; Jane Christopher-Hennings, DVM, MS. / J. of Swine Health and Production.-2016.-v.24.-N3.-P.147-1532.

7. Murphy F. A. Coronaviridae / F. A. Murphy, E. P. J. Gibbs, M. C. Horzinek [et al.] // In: Veterinary Virology, 3rd ed. Academic Press, San Diego, Ca. – 1999. – P. 495–508.

8. Otsuki, K. Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV). I. Resistance of IBV to chemical and physical treatments / K.Otsuki, H.Yamamoto, M.Tsubokura, // Arch Virol. – 1979. – Vol.60 (1). – P. 25-32.

9. Сюрин В. Н. Руководство по ветеринарной вирусологии / В. Н. Сюрин // М.: Колос. —1986. — С. 286—295.

10. Mihindukulasuriya KA, Wu G, St Leger J, Nordhausen RW, Wang D. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. //J. of virol.- 2008.-82(10).-P.5084–5088.

11. Patrick C. Y. Woo, a,b,c,d Susanna K. P. Lau, a,b,c,d Carol S. F. Lam, et all. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus // J. of Virol. – 2012. V.86.-#7.- P. 3995–4008.

12. Gaunt ER, Hardie A, Claas EC, Simmonds P, Templeton KE. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. //J. clinic. Microb.- 2010.-48(8).- P. 2940–2947.

13. Vijgen L, Keyaerts E, Lemey P, Moes E, Li S, Vandamme AM, Van Ranst M. Circulation of genetically distinct contemporary human coronavirus OC43 strains. //Virology. - 2005.- 337(1).-P.85–92.

14. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY. Characterization andcomplete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia.// J. of virol.- 2005.-79(2).-P.884–895.

15. Van der Hoek L, Sure K, Ihorst G, Stang A, Pyrc K, Jebbink MF, Petersen G, Forster J, Berkhout B, Uberla K. Croup is associated with the novel coronavirus NL63. //PLoS Med. – 2005.-2(8).-P.240.

16. Chibo D, Birch C. Analysis of human coronavirus 229E spike and nucleoprotein genes demonstrates genetic drift between chronologically distinct strains. //J Gen Virol. – 2006.-87(Pt 5).- P.1203–1208.

17. Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, Chan KS, Hung IF, Poon LL, Law KI, Tang BS, Hon TY, Chan CS, Chan KH, Ng JS, Zheng BJ, Ng WL, Lai RW, Guan Y, Yuen KY. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. //Lancet. - 2003.- 361(9371).-P.1767–1772

18. Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, Luo SW, Li PH, Zhang LJ, Guan YJ, Butt KM, Wong KL, Chan KW, Lim W, Shortridge KF, Yuen KY, Peiris JS, Poon LL. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. //Science. -2003.-302.-P.:276–278.

19. Tsang, T. SARS- Environmental Issues.// In: WHO Conference on Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). 2003. - Kuala Lumpur, Malaysia.– June 17-18.

20. Ge XY, Li JL, Yang XL, Chmura AA, Zhu G, Epstein JH, Mazet JK, Hu B, Zhang W, Peng C, Zhang YJ, Luo CM, Tan B, Wang N, Zhu Y, Crameri G, Zhang SY, Wang LF, Daszak P, Shi ZL. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. //Nature. - 2013.-503 (7477).-P.535–538.

21. Meyer B, Muller MA, Corman VM, Reusken CB, Ritz D, Godeke GJ, Lattwein E, Kallies S, Siemens A, van Beek J, Drexler JF, Muth D, Bosch BJ, Wernery U, Koopmans MP, Wernery R, Drosten C. Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels, United Arab Emirates, 2003 and 2013.// Emerging infectious diseases. -2014.-20(4).-P.552–559.

22. Shehata M., Gomaa M., Ali., Kayali G. Middle East respiratory syndrome coronavirus: a comprehensive review // Front Med. 2016.- 10(2).-P. 120–136.

23. Azhar EI, El-Kafrawy SA, Farraj SA, Hassan AM, Al-Saeed MS, Hashem AM, Madani TA. Evidence for Camel-to-Human Transmission of MERS Coronavirus.// The New England J. of medicine.- 2014.

24. Valarcher J.-F., H gglund S. Chapter 46. Bovine coronavirus. Infectious and parasitic diseases of livestock; ed. P. Lef vre et al. Paris: Lavoisier, 2010. V. 1. P. 545–552.

25. Eckerle I, Corman VM, Muller MA, Lenk M, Ulrich RG, Drosten C. Replicative Capacity of MERS Coronavirus in Livestock Cell Lines. //Emerging infectious diseases. - 2014.-20(2).-P.276–279.

26. Memish ZA, Cotten M, Meyer B, Watson SJ, Alsahafi AJ, Al Rabeeah AA, Corman VM, Sieberg A, Makhdoom HQ, Assiri A, Al Masri M, Aldabbagh S, Bosch BJ, Beer M, Muller MA, Kellam P, Drosten C. Human Infection with MERS Coronavirus after Exposure to Infected Camels, Saudi Arabia, 2013. //Emerging infectious diseases. -2014.- 20(6).-P.1012–1015.

27. Umar, S. Infectious bronchitis virus: evolution and vaccination / S.Umar,M. A. A.Shah, M. T.Munir, U.Ahsan, K.Kaboudi // World's Poultry Science Journal. – 2016. – Vol.72. – N. 1. – P. 49-60.

28. Абдуллоев, Х.С. Иммунобиологические свойства вируса инфекционного бронхита кур генотипа QX: автореф. дис. канд. вет. наук: 06.02.02 / Абдуллоев Хушбахт Сатторович. – Владимир, 2015. – 24 с.

29. Сидорчук А.А. Инфекционные болезни животных: учебник, под ред. А.А. Сидорчука. – М.: Колос, 2007. – С. 448 – 453.

30. Zhang, T. Serotype shift of a 793/B genotype infectious bronchitis coronavirus by natural recombination / T.Zhang, Z.Han, Q.Xu // Infect Genet Evol. – 2015. – Vol.32. – P. 377-387.

31. Bande, F. Pathogenesis and Diagnostic Approaches of Avian Infectious Bronchitis / F.Bande, S. S.Arshad, A. R.Omar [et al.] // Adv Virol. – Vol.2016. – 11 p.

32. Немашкало А.Ю. Виділення QX-подібного ізоляту вірусу інфекційного бронхіту курей. / А.Ю. Немашкало. – Матеріали наук.- практ. конф. молодих вчених, 26 черв. 2014 р. – К. : КОМПРИНТ, 2014. – С. 10 – 12.

33. Otsuki, K. Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV). I. Resistance of IBV to chemical and physical treatments / K.Otsuki, H.Yamamoto, M.Tsubokura, // Arch Virol. – 1979. – Vol.60 (1). – P. 25-32.

34. Berry, D.M. The morphological and biological effects of various antisera on avian infectious bronchitis virus / D.M.Berry, J.D.Almeida // J Gen Virol. – 1968. – Vol. 3(1). – P. 97-102.

35. Stone S.S., Kemeny L.J., Jensen M.T. Partial characterization of the principal soluble antigens associated with the coronavirus of transmissible gastroenteritis by complement fixation and immunodiffusion // Infect. Immun.– 1976. – Vol. 13, № 2. – P. 521 – 526

36. Вирусные болезни животных / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьев [и др.] // – М.: ВНИТИБП, — 1998. — 928 с.

37. Конопаткин А. А. Вирусный (трансмиссивный) гастроэнтерит / А. А. Конопаткин // Эпизоотология и инфекционные болезни с/х животных. М. — 2004. —С. 363—369.

38. Мищенко В.А., Думова В.В., Гетманский О.И. и др. Коронавирусная инфекция взрослого крупного рогатого скота. Ветеринарная патология. 2005. № 3. С. 31–34.

39. Urie N. J., Lombard J. E., Shivley C. B. et al. Preweaned heifer management on US dairy operations: Part V. Factors associated with morbidity and mortality in preweaned dairy heifer calves. J. of Dairy Science. 2018. V. 101, № 10. P. 9229–9244. doi: 10.3168/jds.2017-14019

40. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. Москва: ВНИТИБП, 2001. 928 с.

41. Bidokhti M.R.M. A study of bovine coronavirus (BCV) and bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infections in dairy herds in Sweden. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2008. 41 p.

42. Oma V.S., Tr v n M., Alenius S. et al. Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission. Virology J. 2016. V. 13, № 1. P. 100. doi: 10.1186/s12985-016-0555-x

43. Батомункуев А.С., Евдокимов П.И., Мельцов И.В. Рота- и коронавирусные инфекции крупного рогатого скота в Иркутской области. Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. 2019. № 2(55). С. 41 – 46. doi: 10.34655/bgsha. 2019.55.2.006

44. Калініна О.С. Лабораторна діагностика асоційованих респіраторно-кишкових інфекцій телят. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Ґжицького. 2013. Т. 15, № 3(1). С. 126–129.

45. Brownlie J., Whittaker G. Chapter 24. Coronaviridae. Fenner’s Veterinary Virology; ed. N.J. Maclachlan, E.J. Dubovi. London: Academic Press, 2017. P. 435–461. doi: 10.1016/B978-0-12- 800946-8.00024-6

46. Горбатов А.В., Соколова Н.А., Лощинин М.Н. и др. Вакцинопрофилактика диареи новорожденных телят вирус-бактериальной этиологии. Ветеринария и кормление. 2018. № 5. С. 27–28. doi: 10.30917/ATT-VK-1814- 9588- 2018-5-9

47. Горячева М.М., Ганьшина М.В. Эффективность и особенности применения ассоциированных вакцин в США и России для профилактики короновирусной инфекции телят. Аллея Науки. 2018. Т. 8. № 5(21). С. 710 – 714. URL: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=35233346

Додаток 1

Публікації за проектом:

1. Монографія З.С. Клестової «Коронавіруси тварин-нові перспективи для досліджень коронавірусів людини»/ вид-во: «Спринт-Сервіс» , 2020.- 257с.
2. «МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ з комплексної оцінки визначення противірусних властивостей сполук, нових препаратів, їх ефективності та безпечності (для ветеринарної медицини)», затверджені Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (протокол № 2, 2020 р.) /З.С.Клестова/вид-во: «Спринт-Сервіс», 2020. - 92с.
3. Опубліковано у англомовній книзі вилавництва Elsevier главу "Anticoronavirus activity of water-soluble pristine C 60 fullerenes: in silico and in vitro screening" / *Vasyl Hurmach[1], Maxim Platonov[2], Svitlana Prylutska[1], Vsevolod Cherepanov[4], Zinaida Klestova[3], Yuriy Prylutskyy[1], and Uwe Ritter[5]* /[1]Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine; [2]Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, Kyiv, Ukraine; [3]State Scientific-Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv, Ukraine; [4]Institute of Physics of NASU, Kyiv, Ukraine; [5]Technical University of Ilmenau, Ilmenau, Germany.
4. Zinaida Klestova, Yuriy Prylutskyy, Svitlana Prylutska,Vasyl Hurmach, Maxim Platonov, Vsevolod Cherepanov, Uwe Ritter, Alla Voronina, Olga Vatlitsova. Search for new alternatives to prevent the spread of coronaviruses in the environment //International Forum on Virology & Rare Diseases Lisboa, Portugal.- 19 - 20, August, 2021 (перенесено на березень 2022).
5. Zinaida Klestova, Yuriy Prylutskyy, Svitlana Prylutska,Vasyl Hurmach, Maxim Platonov, Vsevolod Cherepanov, Uwe Ritter , Alla Voronina, Olga Vatlitsova, Alla Yuschenko. Пошук альтернативи вакцинним препаратам, застосування водорозчинного С60 фулерену //2021, DTRA Intern. Biothreat reduction Symposium.-Kyiv, 29 June-2 July.
6. Zinaida Klestova, Yuriy Prylutskyy, Alla Voronina. Application of C_{60} fullerene water solutionfor distribution for anticoronavirus drug // 5^{th} International Conference on Scientific Research, Nakhchivan State Univercity, Azerbaijan. – 5 – 6 November, 2021.

Додаток 2

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

This is to certify that

Zinaida Klestova

was a Presenting Author at the

2021 DTRA INTERNATIONAL BIOTHREAT REDUCTION SYMPOSIA

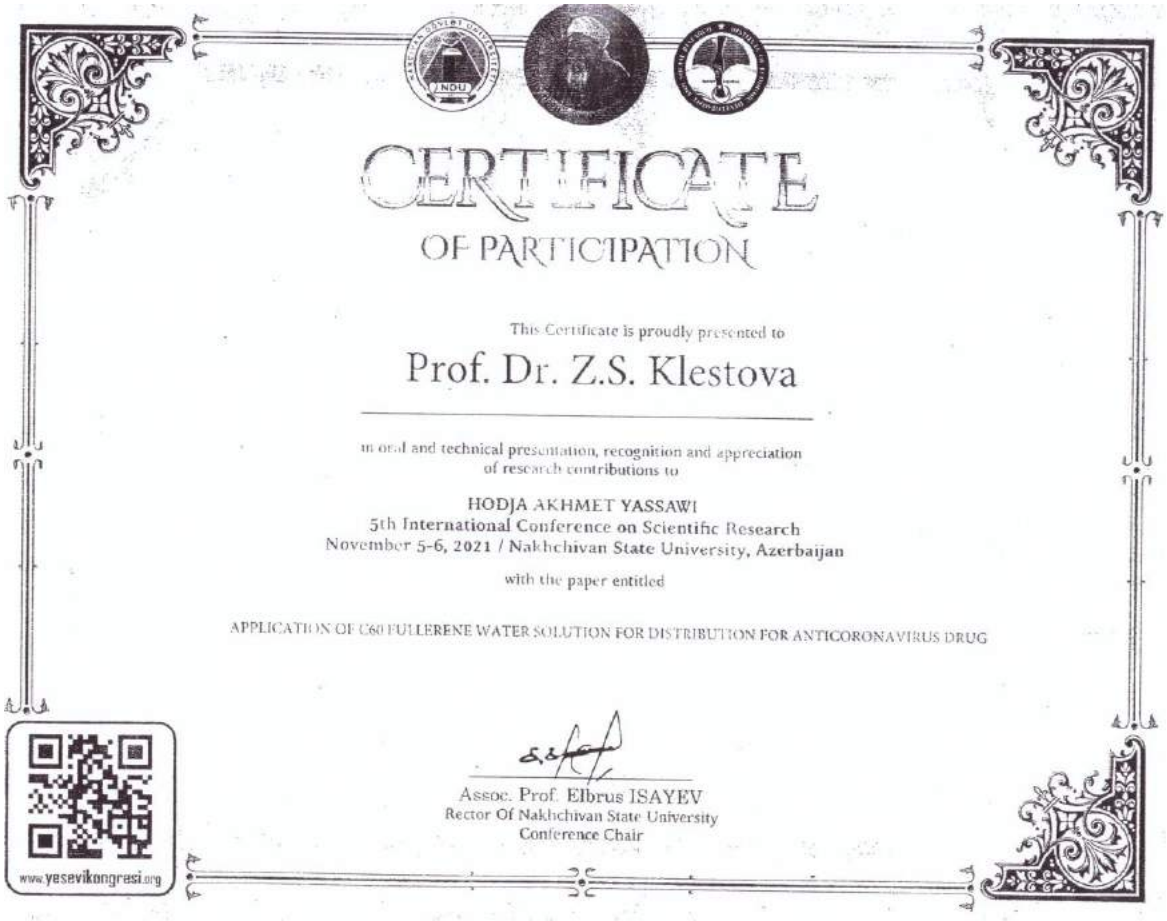
29 June – 2 July 2021
Virtual Event

Brandt Siegel
International Project Manager, Ukraine
Biological Threat Reduction Program
Defense Threat Reduction Agency

David Smith
Program Director
CH2M Hill

ch2m

Додаток 3



CERTIFICATE

OF PARTICIPATION

This Certificate is proudly presented to

Prof. Dr. Z.S. Klestova

in oral and technical presentation, recognition and appreciation of research contributions to

HODJA AKHMET YASSAWI
5th International Conference on Scientific Research
November 5-6, 2021 / Nakhchivan State University, Azerbaijan

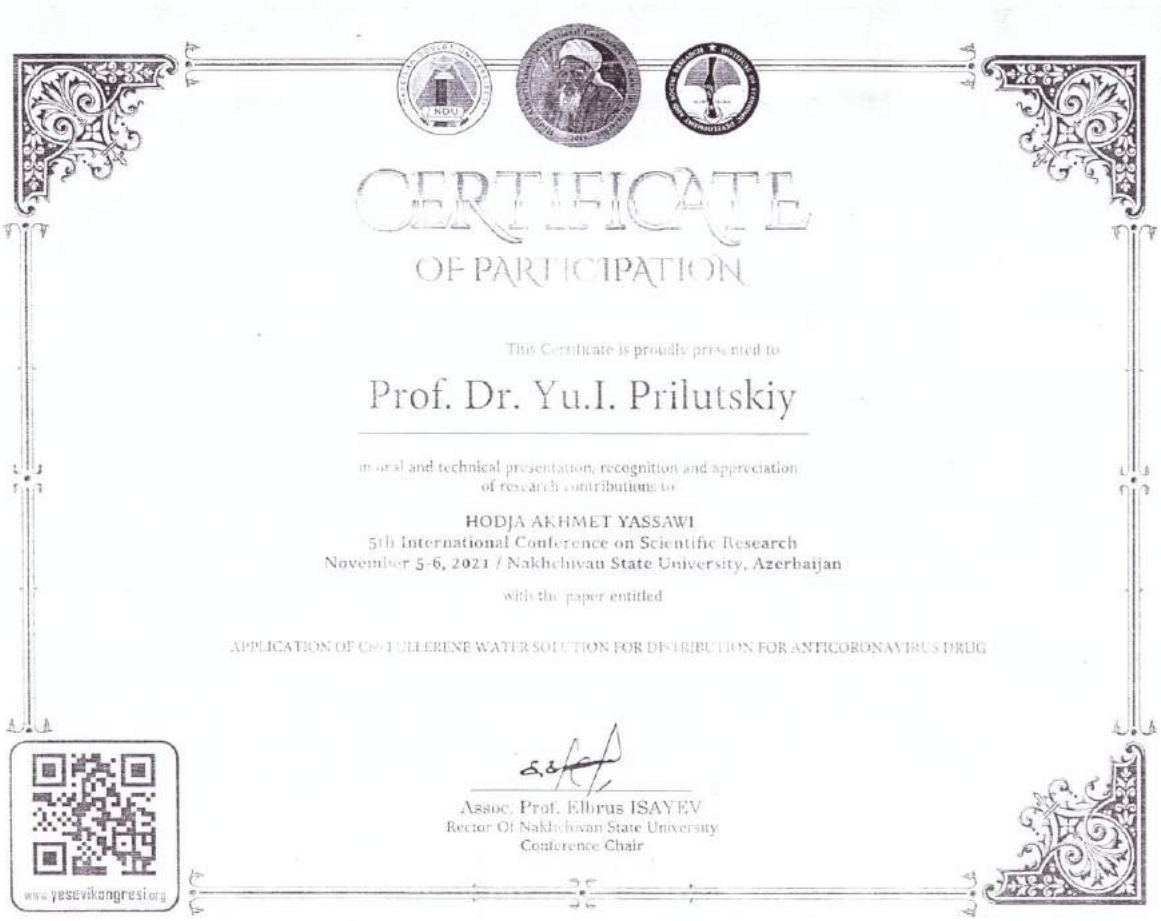
with the paper entitled

APPLICATION OF C60 FULLERENE WATER SOLUTION FOR DISTRIBUTION FOR ANTICORONAVIRUS DRUG

Assoc. Prof. Elbrus ISAYEV
Rector Of Nakhchivan State University
Conference Chair

www.yesevikongresi.org

Додаток 4



CERTIFICATE

OF PARTICIPATION

This Certificate is proudly presented to

Prof. Dr. Yu.I. Prilutskiy

in oral and technical presentation, recognition and appreciation of research contributions to

HODJA AKHMET YASSAWI
5th International Conference on Scientific Research
November 5-6, 2021 / Nakhchivan State University, Azerbaijan

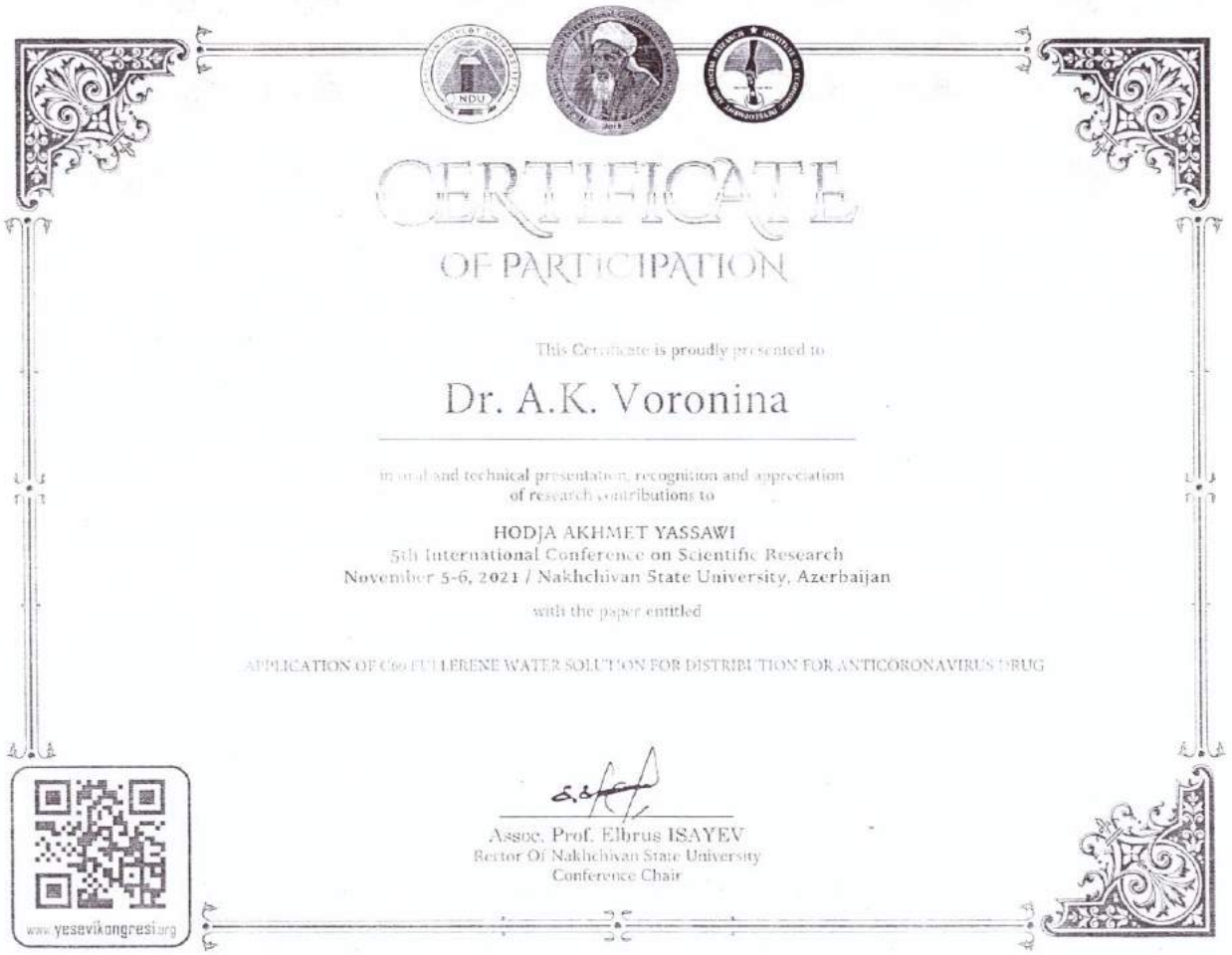
with the paper entitled

APPLICATION OF C_{60} FULLERENE WATER SOLUTION FOR DISTRIBUTION FOR ANTICORONAVIRUS DRUG

Assoc. Prof. Elbrus ISAYEV
Rector Of Nakhchivan State University
Conference Chair

www.yesevikongresi.org

Додаток 5



CERTIFICATE

OF PARTICIPATION

This Certificate is proudly presented to

Dr. A.K. Voronina

in oral and technical presentation, recognition and appreciation
of research contributions to

HODJA AKHMET YASSAWI
5th International Conference on Scientific Research
November 5-6, 2021 / Nakhchivan State University, Azerbaijan

with the paper entitled

APPLICATION OF C60 FULLERENE WATER SOLUTION FOR DISTRIBUTION FOR ANTICORONAVIRUS DRUG

Assoc. Prof. Elbrus ISAYEV
Rector Of Nakhchivan State University
Conference Chair

www.yesevikongresi.org