

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач випускової кафедри

_____ М. М. Барановський

«__» _____ 2020 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА
ЗА СПЕЦІАЛЬНІСТЮ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»

Тема: «Технологічні аспекти отримання противірусних препаратів»

Виконавець: студентка 205-м ФЕБІТ

Шкуліпа В. М.

Керівник: д.б.н., професор кафедри біотехнології

Гаркава К.Г.

Консультант розділу «Охорона праці» :

Павлиш В.Д.

Консультант розділу

«Охорона навколишнього середовища» :

Рябчевський О.В.

Нормоконтролер:

Дражнікова А.В.

КИЇВ 2020

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність: 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач випускової кафедри

_____ М.М.Барановський

«___» _____ 2020 р

ЗАВДАННЯ З ДИПЛОМНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТА

Шкуліпи Віти Миколаївни

1. Тема роботи: Технологічні аспекти отримання протівірусних препаратів, затверджена наказом ректора від «15» вересня 2020 р. №1657/ст.
2. Термін виконання роботи: з 15 вересня 2020 р. по 23 грудня 2020 р.
3. Вихідні дані роботи: референтний штам вірусу грипу А, протівірусний препарат «Арбівір», літературні джерела щодо активності препарату «Арбівір», методи дослідження протівірусної активності речовин.
4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.
5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 5 таблиць, 10
рисуноків.

6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання
1	Обрати тему дипломної роботи та провести аналіз літературних джерел.	13.09.19-15.09.20
2	Скласти план магістерської роботи.	28.09.19-01.10.20
4	Провести експериментальні дослідження.	23.10.20-27.11.20
5	Обробити та проаналізувати отримані результати.	30.11.20
6	Підготувати розділи з охорони праці та охорони навколишнього середовища.	02.12.20
7	Сформулювати висновки.	06.12.20
8	Оформити дипломну роботу.	10.12.20
9	Захист дипломної роботи.	23.12.20

7. Консультація з окремих розділів

Назва розділу	Консультант (посада, П.І.Б.)	Дата, підпис	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці			
Охорона навколишнього середовища			

8. Дата видачі завдання: « 5 » жовтня 2020 р.

Керівник дипломної роботи: _____/Гаркава К.Г./

Завдання прийняв до виконання: _____/Шкуліна В.М./

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Технологічні аспекти отримання противірусних препаратів»: 93 с., 5 табл., 10 рис., 116 літературних джерел.

Об'єкт дослідження - технологія отримання противірусних препаратів.

Предмет дослідження - противірусні препарати («Арбівір», противірусні вакцини, противірусні препарати рослинного походження, лейкоцитарний інтерферон).

Мета роботи - полягає у проведенні порівняльного аналізу технологій отримання противірусних препаратів.

Методи дослідження - біотехнологічні, біологічні, вірусологічні, цитологічні.

ВІРУС ГРИПУ А, КУЛЬТУРА КЛІТИН, «АРБІВІР», ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ,
ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	11
1.1. Поширення особливо небезпечних вірусних хвороб людей та тварин	11
1.1.1. Деякі відомі вірусні хвороби людей	11
1.1.2. Нові та емерджентні вірусні інфекції людей та тварин.....	12
1.1.3. Відомі вірусні хвороби тварин.....	14
1.2. Сучасні уявлення про віруси, особливості їх будови та репродукції ...	16
1.3. Біологічні системи, придатні для культивування вірусів.....	19
1.4. Хіміотерапія вірусних інфекцій людини та тварин	22
1.4.1. Загальна характеристика протівірусних препаратів	22
1.4.2. Схема розробки протівірусних препаратів.....	24
1.4.3. Принципи пошуку протівірусних хіміопрепаратів.....	28
1.5. Експериментальні методи оцінки протівірусних препаратів.....	29
1.5.1. Методи вивчення цитотоксичності.....	31
1.5.2. Методи дослідження протівірусної активності речовин	32
1.6. Висновки до розділу.....	35
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	36
2.1. Активність «Арбівіру» у якості антивірусного препарату.....	36
2.2. Особливості будови коронавірусу та їх репродукція у клітинах.....	38
2.2.1. Культивування (пасажування) вірусу у культурі клітин	39
2.2.2. Титрування вірусу	39
2.3. Перещеплювана культура клітин ПТП як біологічна система для культивування вірусу.....	40
2.3.1. Культивування перещеплюваної культури клітин	40
2.3.2. Методика визначення кількості клітин у камері Горяєва.....	41
2.4. Дослідження цитотоксичної дії протівірусного препарату.....	42
2.5. Визначення протівірусної активності препарату.....	43

2.6. Електронна мікроскопія	44
2.7. Висновки до розділу.....	46
РОЗДІЛ 3 . РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	47
3.1. Визначення біологічних властивостей грипу А.....	47
3.2. Вплив противірусних речовин на культуру клітин	50
3.3 Дослідження впливу противірусного препарату «Арбівір» на вірус грипу	52
3.4. Висновки до розділу.....	54
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ.....	56
4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при роботі у вірусологічній лабораторії.....	56
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при роботі у вірусологічній лабораторії.....	58
4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки при роботі у вірусологічній лабораторії.....	64
5.1. Поняття про антибіотики, їх класифікація та механізм дії	69
5.2. Використання антибіотиків у медичній практиці.....	71
5.3. Дія антибіотиків на організм людини	73
5.4. Явища, що пов'язані з біологічною дією антибіотиків	78
5.5. Висновки до розділу.....	81
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.	84

ВСТУП

На початку III тисячоліття вірусні хвороби є однією з головних проблем людства. Викликаючи такі смертельно небезпечні хвороби, як геморагічні лихоманки, кліщові енцефаліти, сказ, атипову пневмонію, віруси відіграють важливу роль в інфекційній патології людини та тварин. Питома вага вірусних інфекцій в інфекційній патології людини зростає по мірі зниження та ліквідації бактеріальних і грибкових інфекцій.

Не дивлячись на успіхи профілактики та майже повну ліквідацію таких небезпечних інфекцій, як чорна віспа та поліомієліт, віруси залишаються причиною широко розповсюджених хвороб (герпетичні, ентеровірусні інфекції, грип та інші ГРВІ), що призводять до тимчасової втрати працездатності та іноді порушують нормальний ритм життя цілих міст або навіть країн [1-3].

Останнім часом особливо гостро постало питання емерджентних вірусних інфекцій, більшість з яких є антропозоонозними [4].

Сьогодні вже доведена вірусна етіологія багатьох неопластичних процесів, ряду аутоімунних (розсіяний склероз) та алергічних (сінна лихоманка) хвороб людини і тварин [5]. В медичній практиці встановлено, що і віруси часто є причиною внутрішньоутробної патології людини.

Віруси, внутрішньоутробно уражаючи плід, призводять до розвитку вроджених патологій. Особливу групу складають так звані повільні вірусні інфекції, інкубаційний період яких може тривати роками, та закінчуються вони тяжкими наслідками та загибеллю організму [6].

Крім того, не слід забувати, що в умовах сучасного інтенсивного рослинництва і землеробства одним з найбільш важливих факторів, лімітуючих врожайність рослин, є вірусні хвороби. Викликаючи масові епідемії, особливо в районах з теплим та помірним кліматом, віруси, як і хвороботворні агенти по шкодочинності часто виходять на перше місце, випереджуючи інші патогени.

З погляду на специфіку вірусних інфекцій за останні п'ять десятиріч в нашій країні, як і в цілому світі, виник та продовжує розвиватись новий напрямок в лікуванні вірусних інфекцій - хіміотерапія.

Проте, не дивлячись на більш ніж п'ятдесят років інтенсивних пошуків антивірусних препаратів, сьогоднішній арсенал ефективних антивірусних засобів залишається мізерним [7].

На це є багато причин і головна з них полягає в тому, що віруси є облігатними внутрішньоклітинними паразитами, тому їх реплікація тісно пов'язана з функціонуванням клітин, в яких вони паразитують [3]. Тому дуже важко знайти способи боротьби з вірусами, які б не впливали на саму клітину. Крім того, взаємодіючи з вірусом, противірусні препарати часто впливають на організм господаря. Інша причина полягає у тому, що препарат фактично повинен проявляти стовідсоткову антивірусну активність, оскільки на фоні несприйнятливості вірусів до дії антивірусного препарату відбувається селекція резистентних штамів, що зводить до нуля ефективність терапії. Не слід забувати, що багато вірусів погано або взагалі не здатні реплікуватись в культурах клітин (віруси гепатитів *B* та *C*, папіломавіруси). В результаті процес тестування та розвитку безпечних ефективних противірусних препаратів значно ускладнюється. І нарешті, багато гострих вірусних інфекцій мають короткий інкубаційний період, і, під час прояву клінічних ознак вірус не реплікується та, можливо, вже елімінувався з організму. Антивірусні препарати проти цих вірусів повинні застосовуватись на ранній стадії інфекції чи у профілактичних дозах у групах ризику. При цьому багато часу іде не тільки на ідентифікацію вірусу (препарати з широким спектром антивірусної активності відсутні), але і на раціональний вибір антивірусного препарату. Брак швидких методів діагностики гальмує розвиток препаратів проти багатьох гострих вірусних хвороб, не дивлячись на наявність ефективних схем терапії [6-8].

На сьогоднішній день для сільського господарства великою проблемою є інфекції, спричинені ентеровірусами. Ентеровірусні інфекції характеризуються різноманітністю клінічних проявів. Найбільш відомих з них у свиней належать поліенцефаломієліти з високим рівнем смертності тварин, хвороба Ташена, деякі

діареї, а також своєрідна хвороба, що характеризується народженням мертвих чи нежиттєздатних поросят, муміфікацією плоду, загибеллю ембріонів, безпліддям свиноматок - так званий синдром СМЕДІ. У зв'язку з високою стійкістю ентеровірусів до дії багатьох факторів як хімічних, так і фізичних, досить важко пригнічити репродукцію даних вірусів у клітинах хворої тварини, не спричиняючи токсичного впливу безпосередньо на організм. Крім того на сьогодні імунітет до ентеровірусу свиней, що викликає синдром СМЕДІ не вивчені, а специфічна профілактика не визначена.

Все це визначає безумовну актуальність науково обґрунтованого використання існуючих чи використання нових, антивірусних препаратів, які можна застосовувати для лікування та профілактики вище названої хвороби.

Тому вирішення даної проблематики потребує дослідження наявних препаратів та визначення їх ефективності щодо ентеровірусів свиней.

Найбільший інтерес викликає ефективність та безпечність антивірусного препарату «Арбівір», що застосовується у гуманній медицині, зокрема при лікуванні грипу типу *A* та *B* та атипової пневмонії.

Актуальність теми дипломної роботи. В умовах сьогодення проблема пошуку ефективних противірусних препаратів обумовлена високою захворюваністю та широким поширенням вірусних інфекцій, які часто супроводжуються розвитком хронічних форм або різноманітних ускладнень, що безумовно завдає значних економічних збитків. Не зважаючи на інтенсивний скринінг, що проводиться у всьому світі, кількість антивірусних препаратів при ряді інфекцій обмежена, а при деяких захворюваннях вони зовсім відсутні. Значною мірою це пояснюється особливостями репродукції вірусів, що уражають геном клітини інфікованого організму. З цим пов'язана вимога до пошуку противірусних засобів, які повинні безпосередньо діяти на сам вірус, не ушкоджуючи клітину, яку він вразив, або володіти здатністю активувати синтез ендogenous інтерферону та ін. Використання методів визначення цитотоксичності та антивірусної ефективності речовин обумовлює визначення ефективності потенційних антивірусних препаратів. Тому, проведення досліджень

щодо оцінки ефективності антивірусних препаратів у біологічній системі *in vitro*, є досить актуальним.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягає у проведенні порівняльного аналізу технологій отримання протівірусних препаратів.

Досягнення поставленої мети передбачало вирішення таких **завдань**:

1. Вивчення технології отримання протівірусної вакцини.
2. Характеристика отримання лейкоцитарного інтерферону.
3. Протівірусні рослинні препарати та технологія їх отримання.
4. Визначити протівірусну дію хімічно синтезованого препарату «Арбівір».

Об'єктом дослідження є технологія отримання протівірусних препаратів.

Предметом дослідження є протівірусні препарати («Арбівір», протівірусні вакцини, протівірусні препарати рослинного походження, лейкоцитарний інтерферон).

Методи дослідження: біотехнологічні, біологічні, вірусологічні, цитологічні.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Поширення особливо небезпечних вірусних хвороб людей та тварин

1.1.1. Деякі відомі вірусні хвороби людей

Вірусні інфекційні хвороби протягом багатьох сторіч були й залишаються найнебезпечнішими хворобами людства [6].

Незважаючи на поліпшення умов життя в економічно розвинених країнах, широкого розповсюдження щеплення й наявності ефективних лікувальних та профілактичних препаратів, інфекційні хвороби, в тому числі і вірусні, посідають чисельне місце в структурі захворюваності й смертності людей і тварин [9,10]. Віруси спричиняють до 80% інфекційних захворювань людини [8].

Кінець ХХ століття ознаменувався появою нових інфекційних хвороб, серед яких найбільшого поширення набула ВІЛ-інфекція/СНІД [11].

За даними ЮНЕЙДС, на кінець 2003 р. на земній кулі було інфіковано ВІЛ понад 40 млн чоловік, щоденно реєструвалось 15 000 нових випадків інфікування. Поширення вірусу набуло характеру пандемії, що охопила всі континенти і майже всі країни світу. За 20 років від СНІДу померли понад 25 млн чоловік; ВІЛ вражає передусім людей молодого, активного в репродуктивному та працездатному відношенні людей, серед інфікованих - 2,7 млн дітей до 15 років. Найбільш уражені ВІЛ/СНІДом країни Африки, що розташовані південніше Сахари, де інфікованість дорослого населення досягла 8,4% і лише в 2003 р. СНІД забрав життя у 2,2 - 2,4 млн африканців. На сьогодні ВІЛ/СНІД став основною причиною смертності в країнах цього регіону [12].

За даними 2004-го року в країнах Східної Європи, найбільшу загрозу представляють Україна та Росія, де інфіковано близько 1% дорослого населення.

У глобальному масштабі ВІЛ/СНІД займає четверте місце серед причин смертності [13].

Не менш актуальні у світі інфекції, спричинені вірусами з родини *Herpesviridae*. В наш час поширеність захворювань, спричинених герпесвірусами, оцінюється як пандемічна. Так, в США налічується близько 55 млн людей з генітальною герпетичною інфекцією. Герпесвірусні інфекції здебільшого викликають віруси простого герпесу першого та другого типів. За даними ВООЗ, захворювання, спричинені вірусом простого герпесу, займають друге місце у світі (15,8%) після грипу (35,8%) за частотою летальних випадків внаслідок вірусних інфекцій, а герпетичні енцефаліти складають 20% всіх вірусних інфекцій центральної нервової системи [14-16].

Патогенним та дуже небезпечним для людини є вірус віспи, що інфікує крім людини, домашніх та диких тварин, птахів. Внаслідок захворювання середньої важкості гине 10 - 15% хворих людей, в тяжких випадках - до 30% і більше. Завдяки загальній вакцинації офіційно про ліквідацію віспи в світі і про відміну вакцинації було заявлено в 1980 році на 33-й Всесвітній Асамблеї ООН (ВООЗ). Країни-члени ВООЗ прийняли рішення про знешкодження всіх ізолятів вірусів до червня 1999 року із збереженням лабораторних штамів лише в двох місцях: в США і в Росії, на випадок можливості біотероризму і необхідністю пошуку нових лікарських засобів відносно цього збудника. Тому велике значення має розробка та використання антивірусних препаратів [8,17].

1.1.2. Нові та емерджентні вірусні інфекції людей та тварин

Емерджентними інфекційними хворобами називають нові інфекції, що є результатом еволюції чи мінливості існуючого патогену або відомі інфекції, що розповсюджуються на нову географічну зону чи популяцію. Ще однією ознакою емерджентного інфекційного захворювання може бути новий, раніше невідомий агент чи захворювання, що діагностовано вперше, які спричиняють суттєвий вплив на здоров'я тварин чи людей [18].

Розвиток та використання сучасних методичних підходів у вірусології в останні роки призвело до ідентифікації «нових», раніше невідомих вірусів, включаючи HboV, HMPV, віруси грипу А - H5N1, H1N1, вірус Ніпа та інші віруси, що викликають інфекції людини [19, 20-22].

Одним з останніх доповнень до цього списку став збудник інфекції SARS - складний РНК-вмісний вірус [23].

Тяжкий гострий респіраторний синдром (ТГРС, SARS - Severe Acute Respiratory Syndrome) - або «атипова пневмонія» - нове висококонтагіозне респіраторне захворювання вірусної природи, яке вперше з'явилося восени 2002 року на території провінції Гуандун на півдні Китаю, а потім стрімко набуло пандемічного поширення на території ще 29 країн Європи, Азії, Північної та Південної Америки та Австралії. Нове вірусне захворювання вразило більше 8 тис. людей, з яких більше 700 загинуло, оскільки катастрофічно не вистачало інформації про природу збудника, не існувало відповідної вакцини та ефективної етіотропної хіміотерапії.

Ціною надзвичайних зусиль світової спільноти пандемія «атипової пневмонії» була зупинена у липні 2003 року [24].

В останні роки особливо гостро постало питання антропозоонозних вірусних інфекцій [4]. Так, з 1407 відомих патогенів людини 816 є зоонозами, що спричиняють 68-75% емерджентних хвороб людини [25]. Яскравим прикладом цього є пташиний грип, викликаний вірусом грипу типу А - штамом H5N1.

Із всіх циркулюючих серед птахів вірусів грипу, вірус H5N1 представляє найбільшу небезпеку для людини за двома причинами. По-перше, на сьогодні вже відомо, що вірус H5N1 викликав найбільшу кількість випадків найважчої хвороби людини та найбільшу кількість випадків смертності.

За останні роки вірус H5N1 подолав видовий бар'єр та інфікував людей, щонайменше, 3 рази: у Гонконзі в 1997 році (18 випадків захворювань, 6 з яких летальні), у Гонконзі в 2003 (2 випадки захворювання, один з яких з летальним кінцем) та під час спалахів у 2006 році.

По-друге, існує ризик ефективного та стійкого розповсюдження вірусу грипу H5N1 серед людей, що може викликати пандемію. Однак, пташиний грип H5N1 у

людей до тепер є рідкою, але тяжкою хворобою, яку необхідно ретельно вивчати [9, 26-28].

Ще одним високонебезпечним емерджентним захворюванням став «свинячий грип». Він неодноразово розвивався як зооноз з обмеженим і дуже рідко з широким поширенням. Періодично він виявлявся в людей, які працюють зі свинями, особливо при тривалому контакті.

Кожні два-три роки вірус зазнає незначних змін. Але з інтервалом приблизно в десять років, він перетерплює значну структурну й антигенну перебудову, що дозволяє йому легко заразити сотні мільйонів людей. Для свинячого грипу відомо, що він може змінити форму протягом досить короткого періоду часу [29].

Прикладом цього став навесні 2009 року у Мехіко зареєстрований надзвичайно великий сплеск грипоподібних захворювань, результатом якого став 81 підтверджений випадок смерті у Мексиці.

Вірус грипу А/Н1N1 швидко розповсюджувався та через два місяці епідемія вже досягла Японії, Індонезії й Австралії, а ще через місяць - більшість країн Південної півкулі, Північна Америка, Канада й Великобританія вже перебували в епіцентрі швидкого поширення вірусу А/Н1N1.

11 червня 2009 року Всесвітня організація охорони здоров'я вперше більш ніж за 40 років оголосила про введення шостого, максимального рівня погрози пандемії у зв'язку зі стрімким поширенням грипу А/Н1N1 по світу [9, 30].

У 2020 році весь світ огорнула інша пандемія коронавірусу. Віруси грипу А - це велика родина вірусів, які викликають захворювання, починаючи від звичайної застуди до більш важких захворювань.

1.1.3. Відомі вірусні хвороби тварин

Вірусні інфекції на сьогодні є однією з найбільш серйозних проблем і у ветеринарії. За результатами роботи Всесвітньої організації здоров'я тварин (ВОЗТ, раніше - Міжнародне епізоотичне бюро (МЕБ)) є створення раціональної Міжнародної класифікації заразних хвороб тварин, що складається з трьох списків в

бік зниження небезпечних хвороб. Так, до списку А відносять особливо небезпечні хвороби, в тому числі і вірусні, які мають здатність до небезпечного та швидкого розповсюдження, невідповідного до державних кордонів, які супроводжуються серйозними наслідками у галузі суспільної економіки та охорони здоров'я, мають важливе значення у міжнародній торгівлі тваринами та продуктами тваринництва [31].

Наприклад, африканська чума свиней (АЧС), відома ще з початку 20 ст., була природньо-осередковою екзотичною хворобою з циркуляцією вірусу у популяціях диких африканських свиней, яка перебігала у вигляді персистуючої толерантної інфекції. При виникненні перших випадків хвороби у домашніх (неаборігенних) свиней інфекція набула гострого перебігу з летальністю до 100%. Поступово хвороба еволюціонувала у бік самостійного антропоургічного циклу з прискоренням у південно-європейських країнах, двократним емерджентним заносом та розповсюдженням у країнах Центральної та Південної Америки. Важливою епізоотичною особливістю АЧС є надзвичайно швидка зміна форм перебігу інфекції серед домашніх свиней від гострого з 100% летальністю до хронічного та безсимптомного носійства та непередбачувального розповсюдження.

Економічні збитки, що пов'язані з африканською чумою свиней, складаються з прямих витрат внаслідок радикальної ліквідації хвороби, обмежень у міжнародній торгівлі та вимірюється у десятки млн долларів [32].

Серйозними наслідками епізоотії 1997-1998 рр. у Голландії скінчилася класична чума свиней (КЧС), що призвела до загибелі та забою у ході програми ерадикації 12 млн поголів'я свиней з втратами 2,3-3 млрд долларів [33].

Масштабними були втрати і при епізоотії на Тайвані у 1997 році ящуру, в ході якого загинуло 184 тис свиней, та внаслідок, реалізації стратегії раціонального забою, було знищено 3,85 млн поголів'я свиней. Занос ящура у Англію у 2001 році супроводжувався безпрецедентною за масштабами депопуляцією сприйнятних тварин (знищено декілька млн тварин) [31, 34].

До надзвичайно небезпечних вірусних хвороб людей та тварин відноситься і сказ. Він характеризується ознаками поліенцефаломієліту, паралічами і абсолютною

смертністю. Згідно оцінки ВООЗ сказ входить до п'ятірки найбільш небезпечних зооантропонозів, що завдають величезні соціально-економічні збитки.

На сьогоднішній день сказ зареєстровано у 113 країнах світу, через який щорічно гине понад 55 тисяч людей (в середньому одна людина кожні 10 хвилин) і більше 1 млн. тварин. Від 30 до 60% жертв укусів собак є діти віком до 15 років. В Україні в 2007 році сказ набув найбільшого поширення за останні 55 років (2393 неблагополучні пункти), зареєстровано 7 випадків захворювання людини на сказ. У всьому світі самою економічно ефективною стратегією профілактики сказу у людей є ліквідація сказу серед тварин шляхом їх імунізації [35, 36].

1.2. Сучасні уявлення про віруси, особливості їх будови та репродукції

Патогенами, що викликають вищезначені хвороби є віруси. Віруси відкриті у 1892 р. російським фізіологом рослин і мікробіологом Д.І. Івановським під час вивчення хвороби тютюну.

Віруси - це особливе царство організмів ультрамікроскопічних розмірів, що володіють тільки одним типом нуклеїнових кислот, позбавлені особистих систем синтезу білку та мобілізації енергії і тому є абсолютними внутрішньоклітинними паразитами. Вірусу мають різні розміри: від 10 до 300 нм.

Віруси складаються з компонентів (див. рис. 1.1):

- серцевина - генетичний матеріал (ДНК або РНК). Генетичний апарат вірусу кодує від декількох (вірус тютюнової мозаїки) до сотень генів (вірус віспи, більше 100 генів). Необхідний мінімум - гени, що кодують вірус-специфічну полімеразу та структурні білки.

- білкова оболонка - капсид. Оболонка часто побудована з ідентичних повторюваних субодиниць - капсомерів. Капсомери утворюють структури з високою симетрією.

- додаткова ліпопротеїдна оболонка. Ліпідна оболонка походить з плазматичної мембрани клітини-хазяїна та зустрічається в порівняно складних вірусів (вірус грипу, вірус герпесу).

Цілоком сформована інфекційна вірусна частка називається віріоном [37, 38].

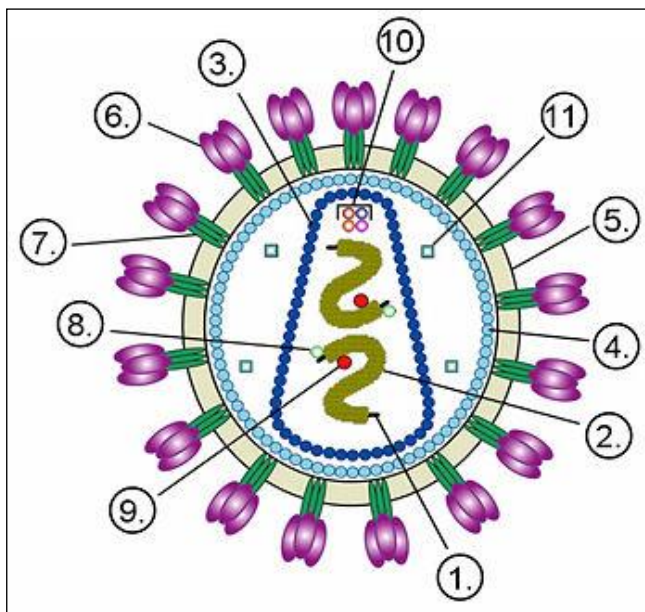


Рис. 1.1. Будова віріону: 1 - РНК-генوم віруса; 2 - нуклеокапсид; 3 - капсид; 4 - білковий матрикс; 5 - ліпідна мембрана; 6 - глікопротеїн, з чією допомогою відбувається зв'язання віруса з клітинною мембраною; 7 - трансмембранний глікопротеїн; 8-11 позначені білки, що входять до складу віріона і необхідні вірусу на ранніх стадіях інфекції

Віруси не здатні самостійно синтезувати нуклеїнові кислоти і білки, з яких вони складаються. Життєвий цикл більшості вірусів уявляє собою ряд послідовних етапів його взаємодії з чутливою клітиною-мішенню, у результаті якого генетичний матеріал вірусу проникає в середину клітини, контролюючи всі основні процеси життєдіяльності клітини, в першу чергу синтез нуклеїнових кислот та білків. В результаті, за рахунок ресурсів клітини створюються основні компоненти віріонів, які після самозбірки залишають її.

Загальновідомо процес вірусного інфікування в масштабах однієї клітини можна розбити на декілька етапів, що взаємоперекриваються:

1. Приєднання до клітинної мембрани - так звана адсорбція. Зазвичай для того, щоб віріон адсорбувався на поверхні клітини, вона повинна мати у складі своєї плазматичної мембрани білок (часто глікопротеїн) - рецептор, специфічний для

даного вірусу. Наявність рецептора нерідко визначає коло господарів даного вірусу, а також його тканинну специфічність.

2. Проникнення в клітину. Різні віруси для проникнення в клітину використовують різні стратегії: наприклад, пікорнавіруси уприскують свої РНК через плазматичну мембрану, а віріони ортоміксовірусів захоплюються клітиною в ході піноцитозу, потрапляють в кисле середовище лізосом, де відбувається їх остаточне дозрівання (депротейнізація вірусної частинки), після чого РНК в комплексі з вірусними білками долає лізосомальну мембрану і потрапляє в цитоплазму. Локалізація віріонів залежить від того, де відбувається реплікація вірусної частинки - в цитоплазмі клітини або у її ядрі.

3. Перепрограмування клітини. При зараженні вірусом в клітині активуються спеціальні механізми противірусного захисту. Заражені клітини починають синтезувати сигнальні молекули - інтерферони, які переводять навколишні здорові клітини у противірусний стан і активують системи внутрішньоклітинного імунітету. Пошкодження, що викликаються розмноженням вірусу в клітині, можуть бути виявлені системами внутрішнього клітинного контролю, і така клітина зазнає апоптозу. Від здатності вірусу долати системи противірусного захисту безпосередньо залежить його виживання. Багато вірусів (наприклад, пікорнавіруси, флавівіруси) в ході еволюції набули здатності пригнічувати синтез інтерферонів, апоптозу програму тощо.

4. Персистенція. Деякі віруси можуть переходити в латентний стан (персистенція для вірусів еукаріотів або лізогенія для бактеріофагів), і активуватися лише за певних умов. З персистенцією вірусів пов'язані деякі онкологічні захворювання

5. Створення нових вірусних компонентів. Розмноження вірусів у найзагальнішому випадку передбачає три процеси - транскрипцію вірусного геному - тобто синтез вірусної мРНК; її трансляцію, тобто синтез вірусних білків; реплікацію вірусного генома (у деяких випадках геном РНК одночасно грає роль мРНК, тоді перший процес є практично тим же, що і третій).

б. Дозрівання віріонів і вихід з клітини. Новосинтезовані геноми РНК або ДНК «вдягають» відповідні білки і виходять з клітини. Вірус, який активно розмножується, не завжди вбиває клітину-господаря. В деяких випадках (наприклад, ортоміксовіруси) дочірні віруси відгалужуються від плазматичної мембрани, не викликаючи її розриву. Таким чином, клітина може жити далі й продукувати вірус [8, 39].

В таксономії віруси відносяться до окремого таксону *Vira*, створюючий в класифікації *Systema Naturae 2000* разом з доменами *Bacteria*, *Archaea* і *Eukaryota* кореневий таксон *Biota*.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) у 1966-1971 рр. прийняв систему класифікації вірусів, яка базується на відмінностях типу нуклеїнової кислоти (РНК чи ДНК), кількості їх молекул (одно- чи дволанцюгові) та на присутності чи відсутності оболонки ядра. Система класифікації уявляє собою серію ієрархічних таксонів.

ICTV класифікація представляє собою: порядок (-virales), родина (-viridae), підродина (-virinae), рід (-virus), вид.

Останнім звітом ICTV за 2005 рік встановив 6 порядків: *Caudovirales*, *Herpesvirales*, *Mononegavirales*, *Nidovirales*, *Picornavirales*, *Tymovirales* [40].

Класифікацією вірусів активно займався лауреат Нобелівської премії Девід Балтимор. Вона побудована на типі нуклеїнової кислоти, що використовується вірусом для переносу спадкового матеріалу, та на тому, яким шляхом відбувається її експресія та реплікація [41].

На сьогодні для класифікації вірусів використовують дві системи, що доповнюють одна одну. Подальше розділення базується на таких ознаках, як структура генома (наявність сегментів, кільцева чи лінійні молекула нуклеїнової кислоти), генетична подібність з іншими вірусами, присутність ліпідної оболонки і т. д.

1.3. Біологічні системи, придатні для культивування вірусів

Для дослідження вірусів у лабораторних умовах необхідний підбір чутливих систем їх культивування та виділення, а також необхідна оцінка різних біологічних систем культивування для обрання оптимальної.

Існують декілька шляхів культивування вірусів [42, 23]:

1. Культивування в організмі природньо-сприйнятливого хазяїна;
2. Культивування в організмі лабораторних тварин;
3. Культивування у курячих ембріонах;
4. Культивування у культурі клітин;
5. Культивування у культурі тканин та органів.

Метод культивування в організмі природньо-сприйнятливого господаря знайшов обмежене використання через потенційну небезпеку поширення інфекції та економічну неефективність. Він застосовується тільки тоді, коли для вірусу, що вивчається немає придатнішої біологічної системи, у якій даний вірус успішно б репродукувався.

Нині не користуються популярністю і такі біологічні системи *in vitro*, як органна культура та культура тканин. Метод культивування вірусів в культурі органів використовують для вірусів, що персистують в організмі тварин, обумовлюючи латентні та хронічні форми інфекції (наприклад, герпетична). Для культури органів як правило використовують тканини легенів, трахеї, шкіри, кишечника, печінки, слезінки, нирки, тимусу 2-4 місячних ембріонів великої рогатої худоби, 1 -1,5 місячних ембріонів свиней та овець [44].

Частіше за все для діагностики вірусних інфекцій, а також для отримання специфічних антивірусних сироваток, накопичення вірусмісного матеріалу у великих кількостях для виготовлення інактивованих та живих противірусних вакцин, використовують метод культивування в організмі лабораторних тварин, у курячих ембріонах та у культурі клітин.

Найчастіше у вірусологічній практиці використовують білих мишей, кролів, білих щурів і морських свинок, рідше - золотистих хом'яків і тхорів, іноді як лабораторні об'єкти використовуються кури, голуби, кошенята, щенята.

Основні вимоги, які ставляться до лабораторних тварин, є такі: мають бути абсолютно здоровими; мають бути чутливими до досліджуваного вірусу (відповідного виду і віку); повинні мати стандартну чутливість до вірусу.

У вірусологічній практиці для виділення вірусів із патологічного матеріалу використовують курячі ембріони, які мають ряд істотних переваг порівняно з лабораторними тваринами. Їм властива висока чутливість до вірусів, що пояснюється недостатнім розвитком захисних механізмів. Курячі ембріони стерильні та дають більший вихід вірусу, а також економічні й доступні для будь-якої вірусологічної лабораторії. Залежно від тропізму віруси можуть репродукуватися в клітинах тіла зародка, амніона, хоріон-алантоїсній області і жовткового мішка, де нагромаджуються в найбільшій концентрації. Водночас багато вірусів здатні накопичуватися в алантоїсній та амніотичній рідинах [45].

Бурхливий розвиток багатьох напрямків біологічної науки і важливі сучасні досягнення завдячують застосуванню культур клітин *in vitro*. На теперішній час їх використовують і для генно-інженерних досліджень, а також при отриманні нових сортів і властивостей рослин, у медицині, у біотехнологічній і фармацевтичній промисловості та інших галузях [46].

Особливу роль відкриття вирощування культур клітин *in vitro* зіграло для розвитку вірусології. Культури клітин являють собою гомогенну популяцію генетично однорідних клітин, які ростуть в постійних умовах і найдосконалішою моделлю для виділення вірусів. Однією із переваг застосування культур клітин для дослідників - це можливість прижиттєвого спостереження за живими клітинами за допомогою мікроскопу, а також швидкість їх розмноження [47].

Культури клітин бувають первинні, диплоїдні та перещеплювані. Але немає єдиної культури клітин чутливої до всіх вірусів. Тому використовують кілька видів культур залежно від того, який вірус передбачається виділити.

Культури клітин використовують з метою [16, 48]:

- первинного виявлення й виділення вірусу з патологічного матеріалу;
- накопичення вірусної біомаси, що має велике значення у виробництві вакцин і діагностикумів;

- тривалого підтримання вірусних штамів у лабораторних умовах;
- титрування вірусів;
- як тест-об'єкт у реакції нейтралізації.

Для культивування деяких вірусів і до тепер не підібрано жодної чутливої культури клітин [49, 50].

Репродукція вірусів в чутливій клітині - складний процес, що відбувається за участю багатьох віріонних, клітинних, вірусіндукованих і вірусомодифікованих ензимів [51].

1.4. Хіміотерапія вірусних інфекцій людини та тварин

1.4.1. Загальна характеристика противірусних препаратів

Засоби попередження та боротьби з інфекційними хворобами умовно можна поділити на 3 групи:

- організаційні заходи, направлені на попередження розповсюдження вірусних хвороб та недопущення інфікування здорових людей;
- імунопрофілактика;
- хіміопрфілактика, хіміотерапія [52, 53].

Антивірусні хіміопрепарати входять до великої загальної групи протиінфекційних хіміопрепаратів, що становлять найбільш численну групу лікарських засобів [8].

Проблема створення ефективних і безпечних противірусних засобів є однією з найскладніших в сучасній медичній хімії і фармакології. Складність ця полягає у виявленні речовин, здатних вибірково пригнічувати репродукцію вірусів, не порушуючи процесів життєдіяльності клітин організму-господара.

Чітка спрямованість дії - один з основних критеріїв у відборі речовин з противірусною активністю. При цьому біологічними мішенями є:

- вірусний геном;
- вірус-специфічні ферменти (зворотні транскриптази, протеази, глікозидази);

- речовини, що гальмують процес дезинтеграції оболонки вірусу і перенесення його генетичного матеріалу в клітину хазяїна, ефективні тільки на початкових етапах розвитку інфекційного процесу [54].

В цілому, можна визначити, що противірусні препарати - це лікарські речовини, здатні гальмувати процеси адсорбції, проникнення і розмноження вірусів [55].

Всі противірусні хіміотерапевтичні препарати, незважаючи на їх різну хімічну структуру та механізм дії, поєднує ряд унікальних властивостей [56]:

- існуючі мішені для антивірусних препаратів знаходяться в еукаріотичній клітині - це вірусспецифічні процеси, що відбуваються на всіх стадіях репродукції вірусів в інфікованій клітині-хазяїні;

- за умови тривалого використання антивірусних препаратів їх специфічна активність може змінюватись, що пов'язано з формуванням штамів вірусів, резистентних до дії цих препаратів;

- віруси - збудники інфекційних захворювань людини та тварин, що резистентні до дії антивірусних препаратів, є небезпечними для хворого організму та інших організмів, навіть розділених часом і простором. Тому боротьба з формуванням резистентності вірусів, наприклад до протигерпетичних, антиретровірусних або протигрипозних препаратів, сьогодні має глобальні масштаби.

Існує комплекс вимог до ідеального антивірусного препарату і чим більше їм відповідає конкретний антивірусний препарат, тим він ефективніший:

- інгібування унікальної для кожного вірусу стадії репродукції та біосинтезу вірусних макромолекул (забезпечення вибіркості дії препарату);

- перетворення антивірусного препарату в активну форму має відбуватися виключно в інфікованій клітині (забезпечення низької токсичності);

- неможливість включення антивірусного препарату до складу ДНК нормальних клітин організму людини;

- нетоксичність антивірусного препарату для нормальних клітин організму;

- швидке потрапляння антивірусного препарату до інфікованих клітин;

- проникнення антивірусного препарату крізь гематоенцефалічний бар'єр;

- виділення антивірусного препарату з організму незмінним чи у вигляді нетоксичних метаболітів;

- можливість перорального використання;
- зручна схема застосування (1-2 рази на день);
- безпечність антивірусного препарату у разі короткої або тривалої схеми терапії.

Усі існуючі противірусні препарати можуть бути класифіковані за різними принципами. При цьому єдиної загальновизнаної класифікації на сьогодні ще не існує [8, 57, 58].

Відповідно до класифікації антивірусних препаратів за мішенями для їх дії всі вони поділені на 6 груп [59]:

- віруліцидні препарати або препарати з віруліцидним механізмом дії (препарати, які здатні інактивувати впливати на вірус, що знаходиться за межами клітин, тобто на віріон);

- препарати, що блокують етап адсорбції, проникнення і роздягання вірусів;
- препарати-інгібітори реплікації нуклеїнових кислот;
- препарати, що інгібують етап біосинтезу вірусних білків;
- препарати-інгібітори складання вірусу;
- препарати-інгібітори виходу вірусу з клітини.

В залежності від походження противірусні препарати поділяються на [55]:

- синтетичні сполуки,
- інтерферони і індуктори інтерферону,
- препарати рослинного походження.

1.4.2. Схема розробки противірусних препаратів

Загальна схема дослідження антивірусних сполук досить часотривалий та трудомісний процес. Потік інформації контролюється сучасними програмами по дослідженню нових антивірусних сполук. Процес починається з впізнання хвороби

чи медичної потреби та супроводжується дослідженнями молекулярної біології збудника [60].

Використовуючи різні скринінгові стратегії та експериментальні методи, можна вивчати інгібуючу чи активуючу дію будь-яких сполук на певні механізми. Після встановлення остаточної формули сполуки (сполука повинна бути водорозчинною), проводять дослідження даної сполуки на моделях тварин для встановлення різних фармакологічних параметрів, включаючи токсичність та метаболізм. Тільки після цього проводять клінічні дослідження сполуки [61].

Вартість появи нового препарату у продажу становить 100-500 мільйонів доларів [62]. За допомогою сучасних методів виявляють тисячі перспективних сполук, проте лише одиниці в подальшому стають кандидатами для антивірусного дослідження в клінічних умовах. Дослідження та ідентифікація перспективних сполук представляє тільки початок процесу продукції антивірусних препаратів. Подальша розробка антивірусного препарату включає в себе всі наступні кроки: тестування токсичності, модифікація хімічної формули, формулювання, вивчення фармакокінетики та клінічна апробація. Навіть при застосуванні найсучасніших технологій як правило цей процес тягнеться 5-10 років після первинного виявлення перспективних сполук.

Головною проблемою як при розробці вакцин, так і при розробці антивірусних препаратів є безпечність даних продуктів для здоров'я людини та тварин. Токсичність в культурах клітин та токсичність для тварин є першою ознакою того, що препарат може бути небезпечним. В найпростіших випадках сполука повинна бути більш токсичною для вірусу, ніж для клітини (чи для господаря). Цей параметр визначається як цитотоксичний індекс (для клітини) або терапевтичний індекс (для господаря). Оцінка токсичності та ефективності може бути ускладненою, оскільки багато перспективних сполук є нерозчинними у воді. Фармакологія та токсикологія препаратів повинна бути остаточно встановленою на різних видах тварин, включаючи приматів, оскільки випробування на людях можна проводити тільки після ретельної апробації на різних видах тварин. Препарати, які можуть застосовуватись для довгострокового лікування персистентних інфекцій, не повинні мати хронічної токсичності, алергічних ефектів, мутагенного, тератогенного та канцерогенного

ефектів. В більшості випадків безпечність зміщує на задній план ефективність. З іншого боку, коли не має ефективних засобів лікування, як у випадку ранньої ВІЛ інфекції, на людях можуть випробуватись навіть препарати, які викликають небажані побічні ефекти [61-63].

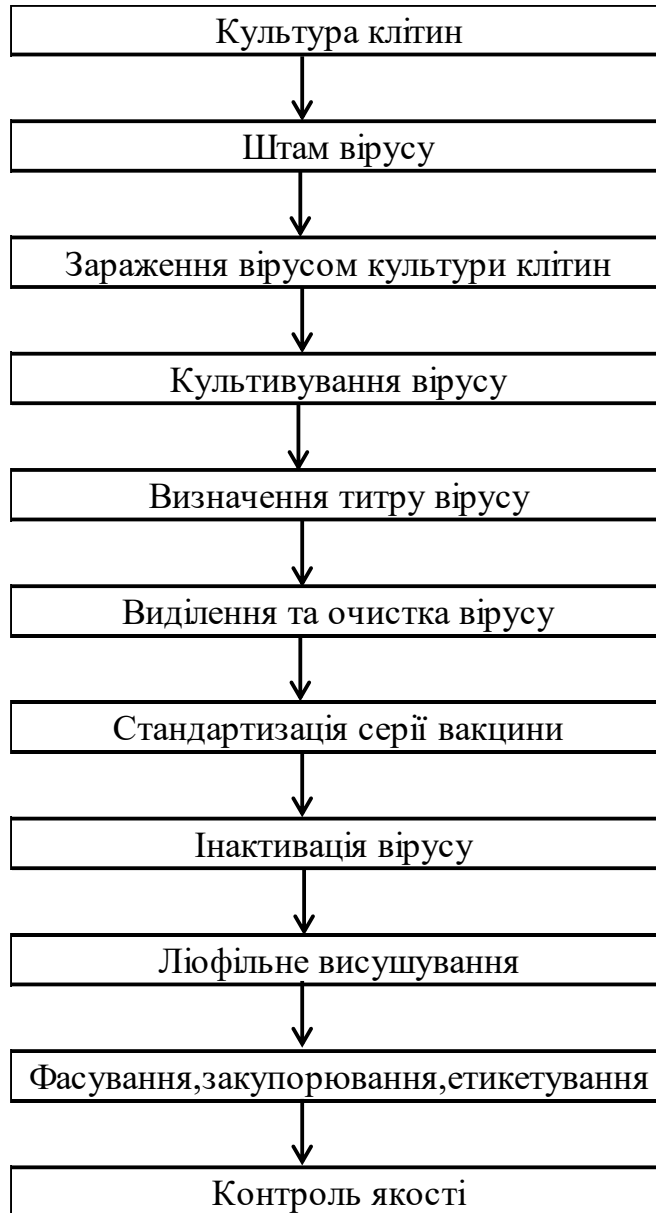


Рис. 1.2. Технологічна схема виготовлення противірусних вакцин

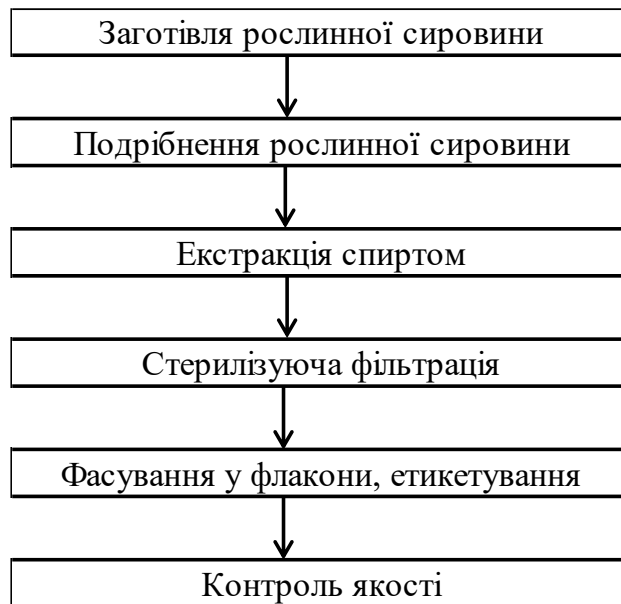


Рис. 1.3. Технологічна схема виготовлення протівірусних рослинних препаратів

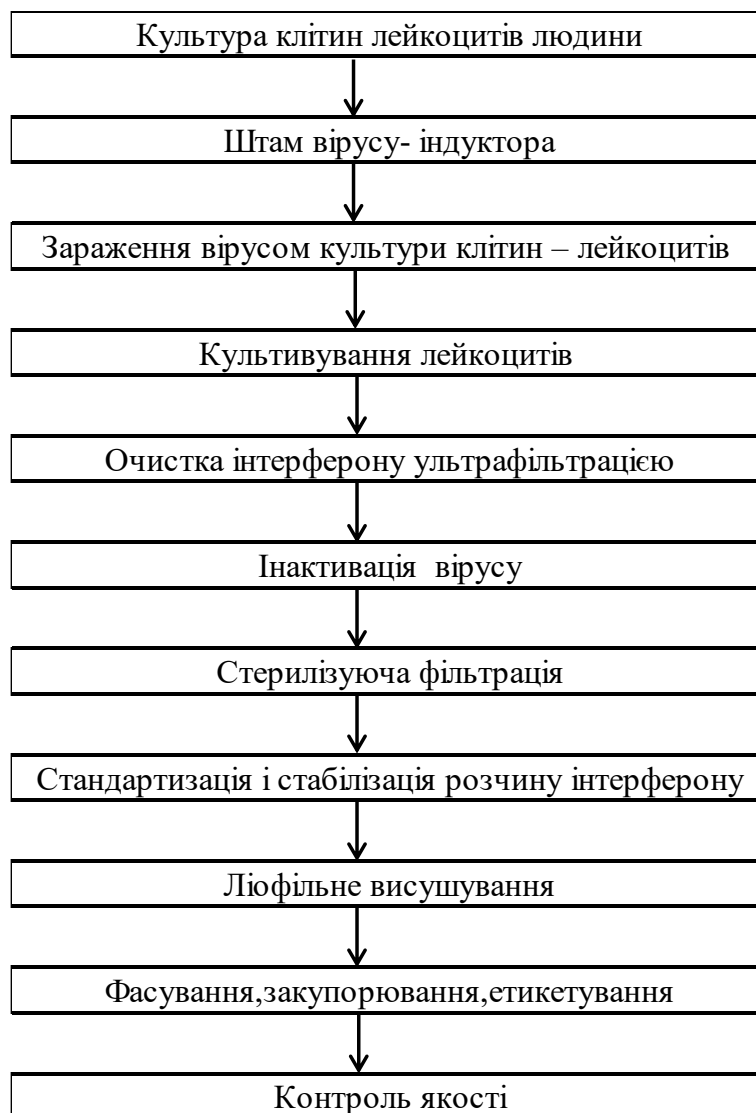


Рис. 1.4. Технологічна схема виготовлення лейкоцитарного інтерферону

1.4.3. Принципи пошуку противірусних хіміопрепаратів

Вивчення ефективності речовин та сполук з антивірусною дією починається саме з доцільного вибору досліджуваної речовини. Існує ряд методів пошуку нових речовин та сполук з антивірусною ефективністю, якими користуються на сьогодні дослідники багатьох країн, основними з яких є - сліпий скринінг, механізм-опосередкований скринінг, структура-опосередкований скринінг, високоспоріднений скринінг [64].

Одним з підходів до пошуку нових антивірусних хіміопрепаратів є традиційний сліпий скринінг, який полягає в максимально широкому скринінгу активних, інгібіторів вірусної інфекції серед сотен тисяч різноманітних хімічних сполук. Хоча методологічні засади такого пошуку є досить добре відпрацьованими, цей підхід потребує величезних матеріальних затрат та багато часу. В результаті сліпого скринінгу знайдено небагато інгібіторів вірусних інфекцій. Найбільшим досягненням в цій галузі є відкриття амантадину. Сьогодні у зв'язку з бурхливим розвитком біоінформатики, молекулярної біології та генетики вірусів, розшифровкою можливих мішеней для антивірусної дії сполук сліпий скринінг поступово відходить на 'задній план, все більше поступаючись механізм-опосередкованому скринінгу [65].

Механізм-опосередкований скринінг - ведеться пошук сполук, які можуть інгібувати відомі чи передбачувані специфічні вірускодовані ензими та молекулярні взаємодії. Так, ферменти (протеази, полімерази, нуклеази, кінази), активатори транскрипції, рецептори клітинної поверхні та іонні канали є популярними мішенями для механізм-опосередкованого скринінгу активірусних сполук, оскільки зникнення субстрату чи поява продукту може бути вивчена безпосередньо чи опосередковано.

Високоспоріднений та механізм-опосередкований скринінг дозволяють протестувати велике число сполук за допомогою автоматики. Для фармацевтичних компаній не є незвичним досліджувати більше ніж 50 000 сполук в день - норма, немислима для раних пошукачів антивірусних сполук. Сполуки, що досліджуються, зазвичай вносяться в пластикові пробірки по декілька або ще менше мікролітрів. Роботи переносять ці сполуки до інших пробірок, що містять безклітинну або

клітинну культуру. Після інкубації сигнал, що формується певним репортерським геном чи іншим продуктом, зчитується та записується. Дані зберігаються в комп'ютері для можливого відновлення та аналізу. Нумеровані дані, дані про клітину та реакцію можуть зберігатися та аналізуватися.

Дизайн антивірусних сполук на основі структури залежить від знання атомної структури молекули-мішені, яка звичайно вивчається за допомогою рентгеноструктурної кристалографії. Комп'ютерні програми, відомі та передбачені механізми дії ферментів, фундаментальна хімія відіграють важливу роль при дослідженні лігандів, що будуть зв'язуватись з активним сайтом ферменту чи іншою критичною точкою та інгібувати його активність.

Відносно новим напрямком є дослідження противірусних властивостей офіційальних лікарських препаратів. Цей підхід привабляє тим, що якщо у препараті, вже дозволеного для застосування з профілактичною або лікувальною метою, виявлена антивірусна активність, а основне призначення не протипоказане для застосування при вірусній інфекції, то одразу може бути проведена клінічна апробація, обминаючи довготривалу та дорогу стадію вивчення токсичності препаратів [62].

1.5. Експериментальні методи оцінки противірусних препаратів

Експериментальна оцінка антивірусної активності препаратів складається з двох етапів, перший з яких - це дослідження *in vitro*. Наступний етап включає дослідження *in vivo* - на лабораторних тваринах.

Культура клітин є найбільш зручною моделлю для первинної оцінки антивірусної активності препаратів. За допомогою цієї системи можна визначити прямий або опосередкований (через клітину) вірусінгібуючий ефект.

Дослідження препаратів на культурі клітин починається з порівняльної оцінки їх цитотоксичності та антивірусної дії [65].

Перспективними є антивірусні препарати які проявляють антивірусну активність в концентраціях, нетоксичних для клітини, тобто проводяться визначення

різниці між дозами препарату з цитотоксичною та антивірусною дією. В сучасній літературі з експериментальної хіміотерапії можна зустріти різні показники цитотоксичності: МДК (максимальна переносима концентрація, що не виявляє цитотоксичної активності); ІД₅₀ (інгібуюча доза, що зменшує кількість життєздатних клітин на 50%), СD₅₀ (цитотоксична доза, що зменшує ріст клітин, або синтез клітинних ДНК на 50%). Для позначення антивірусної дії препарату застосовуються показники ЕД₅₀ (50% ефективна доза) та МІК (мінімальна інгібуюча концентрація). Першою позначають концентрацію антивірусного препарату, в якій він знижує кількість бляшок чи розвиток ЦПД в інфікованій обробленій культурі на 50%. Під МІК розуміють концентрацію антивірусного препарату, яка знижує на 50% число клітин з вірусспецифічними включеннями чи скупченнями вірусного антигену, тобто за своєю суттю ці показники аналогічні. Наведені показники використовуються для визначення ХТІ (хіміотерапевтичного індексу) або ІС (індексу селективності). ХТІ обчислюється як відношення МДК до МІК. Ці індекси є основними критеріями оцінки ефективності речовин у культурі клітин та доцільності подальших досліджень. Принцип порівняння специфічної антивірусної активності та токсичності реалізується в подальшому на етапі вивчення властивостей перспективних сполук *in vivo* [60, 62].

Первинний скринінг антивірусних речовин в системі *in vitro* умовно можна поділити на декілька етапів:

1. Дослідження цитотоксичності тестованої речовини або сполуки та визначення її максимально допустимої концентрації для біологічної тест-системи (культури клітин);

2. Первинне дослідження антивірусної дії речовини та визначення її мінімально активної щодо тест-вірусу концентрації;

3. Порівняльна оцінка цитотоксичності та антивірусної дії тестованого препарату, що і визначає перспективність препаратів (які проявляють в нетоксичних для клітин концентраціях антивірусну активність), тобто проводиться визначення різниці між дозами речовини з цитотоксичною та антивірусною дією;

4. Подальше, поглиблене вивчення впливу перспективних антивірусних речовин та сполук на клітини та віруси за допомогою різних методів.

Для дослідження антивірусної активності препаратів *in vitro* застосовуються різноманітні методи. Слід зауважити, що до цього часу не існує уніфікованого методу первинної оцінки цитотоксичності та антивірусної активності, і, як правило, використовуються декілька з наведених нижче методів [4].

1.5.1. Методи вивчення цитотоксичності

Найпершим етапом оцінки будь-якої сполуки є оцінка її дії у моношарі клітин. Таким методом визначають ступінь цитотоксичності, максимально допустиму концентрацію (МДК) та 50% токсичну дозу (індекс цитотоксичності) дослідної речовини [4, 62, 65]. Суть методу полягає в тому, що тест-речовину з антивірусною активністю вносять на моношар клітин, після чого досліджують ступінь цитотоксичності, який визначають за зміною морфології клітин (округлення, зморщування клітин, відокремлення від поверхні лунок клітин, що зазнали дегенеративних змін).

Метод фарбування трипановим синім використовують для визначення кількості живих та мертвих клітин, вираженої у відсотках. Метод базується на використанні так званих вітальних барвників. Частіше всього використовують трипановий синій, але можна застосовувати також метиленовий синій або нейтральний червоний, які мають такі ж властивості.

Для оцінки цитотоксичності різноманітних препаратів широке розповсюдження отримав мікротетразолієвий тест (МТТ-тест), який базується на здатності живих клітин перетворювати водорозчинний жовтий 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-2-тетразоліум бромід (МТТ) у нерозчинні пурпурово-сині внутрішньоклітинні кристали МТТ-формазау (МТТ-ф). Нежиттєздатні мертві клітини такою здатністю не володіють. Інтенсивність перетворення МТТ у МТТ-ф відображає загальний рівень дегідрогеназної активності клітин під впливом дослідної речовини та інтактних клітин та модулюється активністю інших ферментних систем,

наприклад дихального ланцюга переносу електронів і т.д. Таким чином, даний метод дозволяє оцінити не лише життєздатність, а і метаболічну активність клітин, інтенсивність мітохондріального дихання живих клітин [60].

1.5.2. Методи дослідження протівірусної активності речовин

Метод виявлення цитопатичної дії застосовують при дослідженні вірусів, які проявляють виражену цитопатичну дію в перещеплюваних або у первиннотрипсинізованих культурах клітин ссавців (адено-, герпес-, міксо- і ін.). Описано багато методик оцінки активності антивірусних препаратів з застосуванням цього тесту при вирощуванні клітин в пробірках, на матрацах та пластикових панелях. Останнім часом застосовуються автоматичні методи оцінки ЦПД.

Ще одним з поширених при оцінці антивірусної дії препаратів у культурі клітин є метод пригнічення бляшкоутворення. В основі методу лежить одна з найбільш точних та визнаних методик кількісного визначення вірусів - методика інгібування бляшкоутворення [4, 60].

Методика зводиться до наступного: досліджуваним вірусом інокулюють моношар чутливих клітин. Моношар покривають різними концентраціями досліджуваного препарату в напіврідкому поживному середовищі (для запобігання міжклітинного розповсюдження вірусу). Кількість бляшок підраховують. Для цього необхідно спочатку пофарбувати клітини. Редукція утворення бляшок пов'язана з інгібуванням вірусу та чисельно виражається як IC_{50} та IC_{95} (концентрації препаратів, необхідні для інгібування продукції вірусу в 50% та 95% відповідно).

Імуноферментний аналіз застосовують для первинного відбору антивірусних препаратів, визначення ефективних концентрацій, а також впливу на утворення інфекційного вірусу. ІФА широко застосовується для відбору препаратів з антиВІЛ-активністю. Для цього клітини, чутливі до ВІЛ, вирощують в мікроплатах за звичайною методикою, інфікують відповідною дозою вірусу. Досліджуваний препарат додається у підтримуюче середовище. Проводять визначення вмісту вірусного білку *p24* у культуральному середовищі контрольних та обробених

антивірусним препаратом клітинних культур. За редукцією вмісту p_{24} вираховують ED_{50} [4, 66].

Оскільки для деяких вірусів, наприклад вірусу гепатиту *B*, вірусу Норволк не існує відомих культур клітин, в яких вони здатні розмножуватись, при дослідженні активності сполук проти цих вірусів застосовують або лабораторних тварин або, переважно, використовують маркери інфекційності.

Для дослідження антивірусної активності певних сполук як маркери інфекційності найчастіше застосовуватись вірусні антигени та активність різних ферментів (зокрема, полімераз). Сьогодні даний метод застосовується для дослідження антивірусної активності віруліцидних агентів. Хоч використання маркерів дає цінну інформацію, проте зниження антигенних властивостей не завжди відбивається на втраті інфекційності. Зв'язки між структурними маркерами (деградація вірусних частинок) та втратою інфекційності досліджувались за допомогою електронної мікроскопії. Проте навіть серйозні пошкодження вірусної структури не завжди зумовлюють втрату інфекційності [60].

В основі реакції гемадсорбції лежить здатність культур клітин, заражених вірусом, адсорбувати на своїй поверхні еритроцити. Найбільш чутливою ця реакція є для ортоміксо- та параміксовірусів. Вірусінгібуючий ефект препаратів оцінюють за зменшенням кількості гемадсорбованих клітин у дослідній групі у порівнянні з контролем вірусу. Слід відмітити, що реакції гемаглютинації та гемадсорбції поступово стають менш уживаними, поступаючись місцем більш сучасним методикам експериментальної оцінки противірусних агентів [4, 60, 67].

З метою діагностики та встановлення чутливості вірусів до різних препаратів були створені специфічні індикаторні клітинні лінії. Важливою перевагою даного методу є швидкість, оскільки вже через 6 годин після інокуляції інфіковані клітини стають помітними при їх вивченні за допомогою флюоресцентного мікроскопу. Аналіз за допомогою потокової цитометрії показує, що інтенсивність флюоресценції залежить від титру інокульованого вірусу [68].

В цілому методику дослідження антивірусної активності хімічних препаратів за допомогою подібних клітинних ліній можна представити наступним чином: клітини

трансформованої лінії інокулюють вірусом та культивують в присутності певної концентрації досліджуваної речовини. Після необхідного періоду культивування клітини фарбують 5-бром-4-хлор-3-індоліл- β -D-галактопіранозидом чи вивчають за допомогою флуоресцентного мікроскопу. Про активність речовини судять з кількості інфікованих клітин. Таким чином, нова методика забезпечує дослідників швидкою та зручною системою для тестування антивірусної активності різних препаратів [4, 60, 62, 65].

Потокова цитометрія - швидкий кількісний метод оцінки багатьох параметрів флуоресціюючих клітин. Принцип потокової цитометрії полягає у тому, що клітини або ядра поодиноці перетинають зфокусований світловий пучок, зазвичай лазерний. Світло певної довжини хвилі збуджує молекули флуоресціюючих барвників, зв'язаних з різними клітинними компонентами, при цьому може відбуватись збудження декількох різних барвників, що дозволяє одразу оцінити декілька клітинних параметрів. Світло, що виділяється барвниками, збирається за допомогою систем лінз та дзеркал та розкладається на компоненти. Світлові сигнали детектуються, трансформуються в електричні імпульси і потім в форму, зручну для комп'ютерної обробки та збергання інформації [55]. В умовах *in vitro* використовують мічені флуорохромом моноклональні або поліклональні антитіла, спрямовані проти певних антигенів. Таким чином, цей метод можна застосовувати для детекції клітин, інфікованих вірусом, вивчення вірусного патогенезу, для оцінки впливу антивірусних сполук на синтез вірусних антигенів та нуклеїнових кислот в інфікованих клітинах, а останнім часом цей метод почали застосовувати для тестування ефективності антивірусних препаратів [60, 69].

Електронна мікроскопія проводиться на більш пізніх етапах дослідження механізмів антивірусної активності препаратів. В більшості випадків, за допомогою цього методу встановлюють вплив антивірусних агентів на морфологію вірусних частинок. Метод електронної мікроскопії рідко застосовується для дослідження впливу сполук на репродукцію вірусів, особливо ранніх етапів (екліпс-фаза, синтез ранніх вірусспецифічних ферментів), які відбуваються без суттєвих змін ультраструктури інфікованих клітин. Найбільш ефективною в цьому випадку є

імунна електронна мікроскопія, яка дозволяє виявляти появу ранніх антигенів, а також антигенів на клітинній поверхні і вірусспецифічних рецепторних структур [70].

1.6. Висновки до розділу

У першому розділі дипломної роботи доведено необхідність розробки антивірусних препаратів для їх використання як у гуманній так і ветеринарній медицині. Даний процес потребує багато часу, зусиль та економічних витрат, він містить чимало етапів. Встановлено, що початковим етапом дослідження є оцінка антивірусної активності, що складається з визначення цитотоксичності тест - препарату та перевірки антивірусної ефективності у системі *in vitro*. Тому розглянуто сучасні уявлення про віруси та визначено оптимальну біологічну систему для їх культивування - культура клітин.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Активність «Арбівіру» у якості антивірусного препарату

Одним з найбільш перспективних противірусних препаратів широкого спектру дії є «Арбівір», який має пряму противірусну дію на віруси грипу типу *A* та типу *B* і віруси герпесу [71-73].

«Арбівір» (*Arbidolum*, хімічна назва – метилфенілтіометилдиметиламінометилгідроксіброміндол карбонової кислоти етиловий ефір) - противірусний препарат, що володіє імуномодулюючою дією. Лікарською формою є капсули по 50 або 100 мг (див. рис. 2.1) чи таблетки, що вкриті оболонкою, по 50 та 100 мг. За фізичними та хімічними властивостями «Арбівір» уявляє собою кристалічний білий порошок з зеленуватим відтінком, практично нерозчинний у воді [72, 74].

За станом на 2020 рік не має даних про доклінічні випробування у культурі клітин ПТТ та відносно ентероврусів свиней, що викликають синдром СМЕДІ [75].

Відомо, що клінічні випробування «Арбівір» підтвердили, що даний препарат володіє імуномодулюючою активністю, що виявляється у підвищенні загальної кількості *T*-лімфоцитів, в тому числі *T*-хелперів, стимуляції фагоцитарної функції нейтрофілів та індукції активності природних кіллерів. Також було встановлено, що препарат не робить імуносупресуючого ефекту на утворення специфічних антитіл до респіраторних вірусів, що вигідно відрізняє його від більшості противірусних препаратів, що використовують для профілактики та лікування грипу та ГРВІ [76].

У ході вивчення активності «Арбівір» у лабораторних умовах встановлено та підтверджено здатність препарату пригнічувати вірус грипу, тобто підтверджено пряму противірусну дію «Арбівір». При цьому було визначено, що імовірність

формування штамів, стійких до «Арбівір», значно нижче у порівнянні з препаратами ремантадін та амантадін [77].

«Арбівір» діє на ранніх стадіях вірусної репродукції, інгібує поверхневий вірусний білок гемагглютинін [77, 73] та пригнічує злиття вірусної ліпідної білкової оболонки з внутрішньоклітинними мембранами, попереджуючи проникнення вірусу у клітину. «Арбівір» за механізмом діє відрізняється від противогрипозних препаратів, що використовуються у лікуванні та профілактиці: амантадіна та ремантадіна, що є блокаторами іонних каналів, що утворюються білком *M2* вірусу грипу, та інгібіторів нейрамінідази (NA) - занамівіра та озельтамівіра. На віжміну від останніх препаратів, чий механізм дії вивчен та постадійно описан, фармакодинаміка «Арбівір» залишається нез'ясованою.

«Арбівір» також володіє інтерфероніндукуючими властивостями, стимулює гуморальні та клітинні реакції імунітету, фагоцитарну функцію макрофагів, підвищує стійкість організму до вірусних інфекцій. Попереджує позвиток постгрипозних ускладнень, знижує частоту занострень хронічних захворювань, нормалізує імунологічні показники. Розробниками пропонується використовувати «Арбівір» проти грипу *A* та *B*, ГРВІ, при вторинних імунодефіцитних станах, для терапії хронічного бронхіту, пневмонії, рецидивуючої герпетичної інфекції, гострих кишкових інфекціях ротавірусної етіології у дітей, старше 3 років.

У патенті «Лікарські засоби при лікуванні атипової пневмонії» заявлена також ефективність «Арбівір» по відношенню до коронавірусів атипічної пневмонії. При випробуванні лікарських та профілактичних властивостей «Арбівір» на біологічній моделі вірусу тяжкого гострого респіраторного синдрому (ТОРС) була виявлена ефективність препарату, що проявлялась у коефіцієнті інгібування вірусу від 78 до 80% [78-80].

Враховуючи високу захисну ефективність «Арбівіру» по відношенню до гострих респіраторних захворювань, доцільно оцінити противірусну активність препарату у культурі клітин та вивчити його противірусну активність по відношенню до коронавірусів.

2.2. Особливості будови вірусу та їх репродукція у клітинах

SARS-CoV-2 (скорочено від англ. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*)— одноланцюговий РНК-вмісний штам виду SARS-CoV роду бетакоронавірусів, що вперше був генетично виявлений 2019 року в пробі пацієнта з атиповою пневмонією.

Як і в інших коронавірусів оболонку SARS-CoV-2 утворюють 4 білки: білок «шипа», нуклеокапсидний білок, мембранний білок, білок суперкапсиду. Білок «шипа», або S-білок є тримером, тобто утворюється з 3 однаковими субодиницями. Цей тример містить 6 рецептор-зв'язувальних доменів, які призводять до зв'язування з мембранним білком АПФ-2, що є рецептором для проникнення вірусу всередину клітини. На відміну від близького вірусу SARS-CoV, цей вірус еволюціонував у бік більш щільної взаємодії з білком АПФ-2, що призводить до кращого проникнення в клітину.

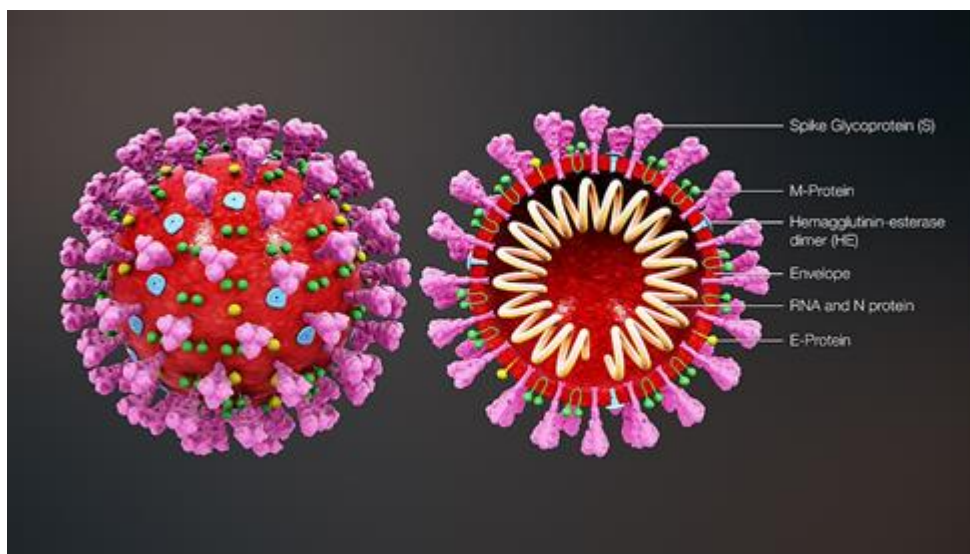


Рис. 2.1. Будова віріона SARS-CoV-2

У проведених дослідженнях був використаний референтний штам SARS-CoV-2, який викликає гострі респіраторні хвороби.

Цей штам був адаптований до перещеплюваних культур клітин CH, CHEB, ПСН (до 31 пасажу) з титром інфекційності $5,5-7,5 \lg \text{ТЦЦ}_{50} / \text{см}^3$ [81-84].

2.2.1. Культивування (пасажування) вірусу у культурі клітин

Для реплікації вірусу використовували перещеплювану культуру клітин із сформованим моношаром, який утворювався на 2-3 добу росту у культуральному посуді (культуральні флакони об'ємом 50 см³). Перед інфікуванням культуральну рідину видаляли, 2 рази промивали моношар клітин розчином Хенкса чи середовищем.

Вірусомісний матеріал (пеніцилліновий флакон) безпосередньо перед внесенням на культуру клітин розморожували у руці. Вносили вірусоміщуючу рідину, залишали для контакту (адсорбції) вірус з клітинами на 1 годину при кімнатній температурі в темряві. Після чого вносили підтримуюче середовище 199. Інфіковані культури клітин інкубували при +37°C. Цитопатичну дію вірусів визначали через кожні 6 годин за ступенем ураження клітинного моношару під малим збільшенням світлового мікроскопа. Після закінчення терміну інкубування, культуральний посуд з інфікованою культурою клітин розміщували у морозильній камері з температурою -20°C, тричі заморожували-розморожували. Одержаний матеріал центрифугували при 3000 об/хв протягом 15 хвилин для осадження клітинного детриту. Після чого обережно відсмоктували піпеткою центрифугат, що і містив вірус. Вірусомісну рідину зберігали при -20°C і використовували для подальшого інфікування клітин. Всі роботи виконували з дотриманням правил асептики і антисептики [85-88].

2.2.2. Титрування вірусу

Штам вірусу титрували в моношарі культури клітин методом кінцевих розведень за загальноприйнятими методами.

Пробірки з культурою клітин досліджували під мікроскопом при малому збільшенні, в результаті чого відбирали ті, де добре сформован моношар. З приготовлених пробірок зливали поживне середовище, промивали моношар клітин 2 рази розчином Версену. Оскільки вірусомісний матеріал містить велику кількість

вірусних частинок, перше, що необхідно зробити, беручись до будь-якого кількісного визначення, - приготувати десятикратні розведення. Десятикратні серійні розведення готували наступним чином. У ряд пробірок, на яких встановлені порядкові номери від 1 до 7, стерильно розливали по 4,5 мл середовища 199, що використовувався у якості розчинника. У першу пробірку піпеткою вводили 0,5 мл вірусу, потім цю піпетку відкладали, а вміст пробірки з номером 1 перемішували новою піпеткою 3-4 рази, набираючи та випускаючи з неї рідину, 0,5 мл цієї рідини переносили у пробірку під номером 2, піпетку знову відкладали, новою піпеткою перемішували та 0,5 мл рідини вносили у наступну пробірку і т. д. Це повторювали до тих пір, поки не отримали кінцеве розведення у сьомій пробірці. Таким чином отримали серію десятикратних розведень: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Моношарові культури клітин інфікували, вносячи по 1 мл відповідного розведення у чотири пробірки з культурою клітин. Інфіковані пробірки помічали рискою та вказували відповідне розведення вірусу, яким інфікувався моношар, та ставили на інкубацію у термостат при $+37^{\circ}\text{C}$. Через кожні 24 години пробірки перевіряли під мікроскопом на наявність цитопатичних змін. Контроль пробірок проводили до тих пір, поки не перестали з'являтися нові ознаки ЦПД вірусу. ЦПД виражали у відсотках в залежності від зруйнованості моношару (25%, 50%, 75%, 100%). Титр вірусів розраховували за методом Ріда і Менча з використанням таблиці для розрахунку титру вірусу [42, 88, 89].

2.3. Перещеплювана культура клітин ПТП як біологічна система для культивування вірусу

2.3.1. Культивування перещеплюваної культури клітин

Для досліджень було обрано перещеплювану культуру клітин ПТП (перещеплюваних тестикулів поросят). Культуру клітин пасажували у скляних культуральних флаконах, об'ємом 50 см³ та пробірках. Культура клітин підтримувалась послідовним пасажуванням, пересіви проводилися 2 рази на тиждень (через кожні 2-3 доби). Концентрація клітин, що була придатна для пересівів

визначалася за допомогою підрахунку живих клітин у гемоцитометрі, та становила 200 000 - 250 000 кл /см³ у суспензії клітин. Для тривалого зберігання культуру клітин кріоконсервували у рідкому азоті при - 196⁰С. Для культивування культури клітин ПТП використовували поживне середовище 199 з додаванням 7-10% сироватки крові ВРХ. При пересівах культури клітин використовували також розчин версену та суміш розчину версену та розчину трипсину у співвідношенні 3:1. Культуру клітин ПТП інкубували у термостаті при 37⁰ С, контролюючи моношар клітин кожні 24 години під малим збільшенням мікроскопу.

Дана клітинна лінія була досліджена на відсутність контамінації на поживному середовищі МПБ та тіо-глюколевому середовищі [42, 49, 51, 75, 86].

2.3.2. Методика визначення кількості клітин у камері Горяєва

Кількість клітин у суспензії визначали у камері Горяєва. Як правило, одночасно визначають життєдіяльність клітин методом виключення барвника (трипановий синій, ерітрозин В, нігрозин). Живі клітини не забарвлюються на відміну від мертвих. Для визначення кількості живих клітин до 1 мл відібраної суспензії клітин добавляли такий самий об'єм 0,1%-го розчину трипанового синього. Після перемішування забарвленою суспензією клітин заповнювали камеру Горяєва й підраховували усі клітини з ядром та неушкодженою цитоплазмою (тобто незабарвлені клітини) у 4 великих квадратах; якщо трапляються групи клітин із чітко окресленими контурами, їх вважають однією клітиною.

Підраховували клітини в двох камерах, знаходять середнє арифметичне для камери й визначали кількість клітин в 1 мл суспензії (X) за формулою:

$$X=(A \cdot 2 \cdot 1000) / 0,9$$

де A - середня кількість клітин в одній камері;

2 - коефіцієнт розбавлення суспензії фарбою;

1000 - кількість кубічних міліметрів у 1 см³;

0,9 - об'єм камери Горяєва, мм³.

Здебільшого при посіві у пробірки оптимальна посівна концентрація клітин становить 200 - 500 тис. клітин на 1 см³. У зв'язку з цим розраховують, скільки живильного середовища потрібно додати до суспензії клітин, щоб отримати відповідну концентрацію [4, 81, 85].

2.4. Дослідження цитотоксичної дії противірусного препарату

На сформований моношар клітин у пробірках разом з підтримуючим середовищем вносили дослідну речовину по 1 мл у різних концентраціях. Як правило досліджують десятикратні розведення препаратів, рідше двократні. Розчини препаратів були перевірені на стерильність аналогічно культурам клітин. Метод стерилізації для них обирали такий, що не змінить їх фізико-хімічні властивості, а саме - стерелізація автоклавуванням при 0,5 атм 20 хвилин. З матричного (стокового) розчину дослідної речовини готували робочі розчини з визначеними концентраціями, як правило, на підтримуючому середовищі 199 для культур клітин (без додавання сироватки великої рогатої худоби). Для оцінки цитотоксичності приготувляли серію двократних розведень, починаючи з концентрації 100 мкг/мл досліджуваної речовини. Пробірки з культурою витримували в термостаті при 37⁰С протягом 96 годин. В досліді застосовували не менше 4 пробірок з культурою клітин для кожного розведення препарату. Кожні 24 години проводили візуальне мікроскопічне дослідження дослідних (з розчинами препаратів) та контрольних культур клітин (без препаратів) для виявлення наявності або відсутності цитотоксичної дії. Ступінь цитотоксичності визначали за зміною морфології клітин (округлення, зморщування клітин, відокремлення від поверхні лунок клітин, що зазнали дегенеративних змін). Ступінь дегенерації клітинного моношару під дією тестованої речовини виражали в плюсах (++++), кожен з яких відповідає дегенерації 25% площі моношару клітин, або мінусом (-) - при відсутності ознак дегенерації моношару клітин. Можна виражати цитотоксичний ефект одразу у відсотках (0% або 25-100%) [4, 62, 64].

2.5. Визначення протівірусної активності препарату

Цей метод застосовують при дослідженні вірусів, які проявляють виражену цитопатичну дію в перещеплюваних або у первиннотрипсинізованих культурах клітин (адено-, герпес-, міксо-, параміксо-, покс-, тогавіруси і ін.). Для оцінки антивірусних речовин із застосуванням цього тесту вирощували моношар клітин у культуральному посуді (пробірках).

Для визначення антивірусної дії досліджуемого препарату спочатку готували підтримуюче середовища 199 з вмістом різних концентрацій (від МДК до нижчих концентрацій з 2-кратним розведенням) дослідного препарату. У отриманий робочий розчин додавали вірусомісний матеріал та залишали на експозицію. Через 1,5 години готували десятикратні розведення отриманої суміші як у методиці визначення титру інфекційної активності вірусу та вносили у групи пробірок з повністю сформованим моношаром клітин. Паралельно проводили контроль культури клітин та культури клітин, інфікованих вірусом без додавання протівірусного препарату.

Після цього клітини інкубували 96 годин при 37⁰С. Стан клітин та наявність цитопатичної дії контролювали кожні 24 години під світловим мікроскопом. Через 96 годин визначали титр інфекційної активності вірусів в дослідних та контрольних пробірках. Вірусінгібуючу дію препарату на вірус виражали у десяткових логарифмах або у відсотках.

Протівірусну ефективність препаратів *in vitro* оцінювали за наступними загальноприйнятими показниками: зниження рівня накопичення вірусу під впливом препарату (Δ, lg) та коефіцієнт інгібування ($Ki, \%$).

Зниження рівня накопичення вірусу під впливом препарату (Δ, lg) визначали за формулою (2.1):

$$\Delta = A_k - A_p \quad (2.1)$$

де A_k - рівень накопичення вірусу при культивуванні без внесення Арбівіру у пробірки з культурою клітин (lg ТЦД₅₀/мл);

A_0 - рівень накопичення вірусу з внесенням Арбівіру у пробірки з культурою клітин (lg ТЦД₅₀/мл).

Коефіцієнт інгібування (K_i , %) розраховують за формулою (2.2):

$$K_i = \frac{A_k - A_0}{A_k} \quad (2.2)$$

де A_k - рівень накопичення вірусу при культивуванні без внесення Арбівіру у пробірки з культурою клітин (ТЦД₅₀/мл);

A_0 - рівень накопичення вірусу з внесенням Арбівіру у пробірки з культурою клітин (ТЦД₅₀/мл) [4, 65, 71, 90].

2.6. Електронна мікроскопія

Введений Бренером і Хорном у 1959 році, метод негативного контрастування успішно використовується в електронно-мікроскопічній ідентифікації вірусів донині, оскільки за його допомогою можлива реалізація максимальної розширюючої здатності електронного мікроскопа.

Готували 2-4 % розчин молібденовокислого (амонію молібдат) в гарячій бідистильованій воді. Після охолодження визначали рН, величину якого доводили до потрібного значення 1Н розчином калію чи натрію їдкою. Використовували розчини з рН від 6,8 до 7,0, які зберігали в холодильнику, обновлюючи один раз на 2 місяці. Паралельно готували об'єктні сітки. Використовували об'єктивні сітки діаметром 3 мм. Сітки знежирювали в суміші етанолу і ефіру (1:1). В кристалізатор діаметром 20 см наливали дистильовану воду і через 20 хвилин з відстані 1-2 см випускали на його поверхню 1 краплю 0,2%-го розчину колодію в амілацетаті. Через 10 хвилин на поверхню утвореної плівки накладали сітки і знімали їх, накладаючи на сітки непроклеєний папір. Після повного намокання паперу тонким пінцетом видаляли залишки колодієвої підложки і легким рухом знімали папір з сітками з поверхні води. Сітки з нанесеною на них плівкою-підложкою висушували в сушильній шафі при +60°C. Потім сітки підложкою догори викладали на спеціальний столик, встановлений на дно кристалізатора з водою і наносили на них вуглецеву плівку, яку

отримували нижченаведеним методом. На поверхню свіжорозщепленої пластинки слюди завбільшки 5x5 см напиляли шар вуглецю завтовшки 10-12 нм, використовуючи вакуумний універсальний пристрій ВУП-4. Параметри напилення: тиск 2×10^{-6} мм ртутного стовпчика, азотна пастка, струм випаровування 80 А, сила струму 7 В. Товщину шару вуглецю контролювали за допомогою кварцового індикатора товщини КИТ-Іт.

Пластинку слюди з нанесеним на її поверхню шаром вуглецю занурювали у воду під кутом близько 30° ; при цьому плівка вуглецю легко відділялась від слюди, і залишалась плавати на поверхні води. Препарувальною голкою вуглецеву плівку встановлювали над столиком з сітками і відсмоктували воду із кристалізатора. Опускаючись на сітки, вона міцно "приклеювалась" до колодієвої підложки. Отримані плівки мали високу стійкість при опроміненні пучком електронів у вакуумі і забезпечували зручність у роботі.

Інфіковані вірусом клітини відокремлювали від скла механічно і центрифугували при 3000 g протягом 30 хвилин. Отриманий осад обробляли як зазвичай шматок тканини. Сітки з адсорбованим об'єктом поміщали на краплі контрастуючого розчину на 5-15 хвилин, знімали сітки з поверхні крапель і видаляли надлишок рідини, доторкуючись ребром сітки фільтрувального паперу. Висушували сітки на повітрі і досліджували в електронному мікроскопі. Препарати, контрастовані амонію молібдатом, дають можливість отримати більш м'яке, порівняно з фосфорно-вольфрамовою кислотою, зображення і рідше дають зернистість під електронним пучком.

Електронно-мікроскопічні дослідження проводили на вітчизняному мікроскопі ЕМВ-100 А. Ультратонкі зрізи готували на ультрамікротомах УМТП-3, УМТП-5 та Ультратомі-III на базі ІВМ НААН з допомогою, люб'язно запропанованою співробітниками інституту: З. С. Клестовою та О. С. Зоз [4, 81].

2.7. Висновки до розділу

В даному розділі дипломної роботи розглянуто характеристику будови та реплікації коронавірусу, особливості культивування коронавірусів, які викликають гострі респіраторні хвороби. Визначено доцільність тестування Арбівіру як противірусного препарату щодо хвороби, спричиненої коронавірусом. Також представлені основні методи, чітке дотримання яких необхідне для успішного проведення дослідницької роботи.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Референтний штам грипу А у перещеплюваній культурі клітин ПТП досліджували за допомогою світлового та електронного мікроскопіювання, інфекційну активність визначали методом титрування вірусу кінцевими розведеннями за загальноприйнятими методами. Титр вірусу розраховували за методом Ріда і Менча.

Цитотоксична активність обраного антивірусного препарату «Арбівір» була досліджена у перещеплюваній культурі клітин ПТП, у повністю сформованому моношарі на 2-3 добу.

Противірусна активність «Арбівіру» досліджена відносно штаму грипу, який культивувався на перещеплюваній культурі клітин ПТП.

При дослідженні інфекційних властивостей грипу було встановлено, що цитопатичні зміни у моношарі культури клітин настають вже через 18 годин.

Пасажування культури клітин, обробка культури клітин «Арбівіром», зараження їх вірусом проводилося за загальноприйнятими методиками з визначення ефективності антивірусних речовин [4].

3.1. Визначення біологічних властивостей грипу А

На першому етапі дослідження визначили цитопатичну дію, що викликає референтний штам грипу А у досліджуваній культурі клітин. Інфікування чутливої культури клітин вірусом призвело до цитопатичного ефекту, який був виражений вже через 16-18 годин після зараження. За допомогою мікроскопіювання у малому збільшенні виявлено, що ЦПД у культурі клітин ПТП проявляється у вигляді руйнування моношару - округлення клітин, відслоювання клітин від стінки культурального флакону. На рис. 3.1 та 3.2 спостерігається інтенсивність вираження цитопатичного ефекту від часу інкубації. За допомогою електронної мікроскопії

визначено, що найбільш характерною особливістю морфологічних змін, індикованих вірусом є утворення у цитоплазмі клітини так званих «кристалоїдних» сукупчень (рис. 3.3), які були безпосередньо пов'язані з морфогенезом вірусу. Вірус грипу А, отриманий з культури клітин ПТП, представлений на фотографіях, зображених на рис. 3.4.

Користуючись таблицею для розрахунку титру вірусу за методом Ріда та Менча визначаємо шуканий титр за даними, що представлені у табл. 3.1.

Таким чином, встановлено, що референтний штам вірусу грипу спричинує інфекційну дію на перещеплювану культуру клітин ПТП, що виражається у титрі інфекційності $6,32 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

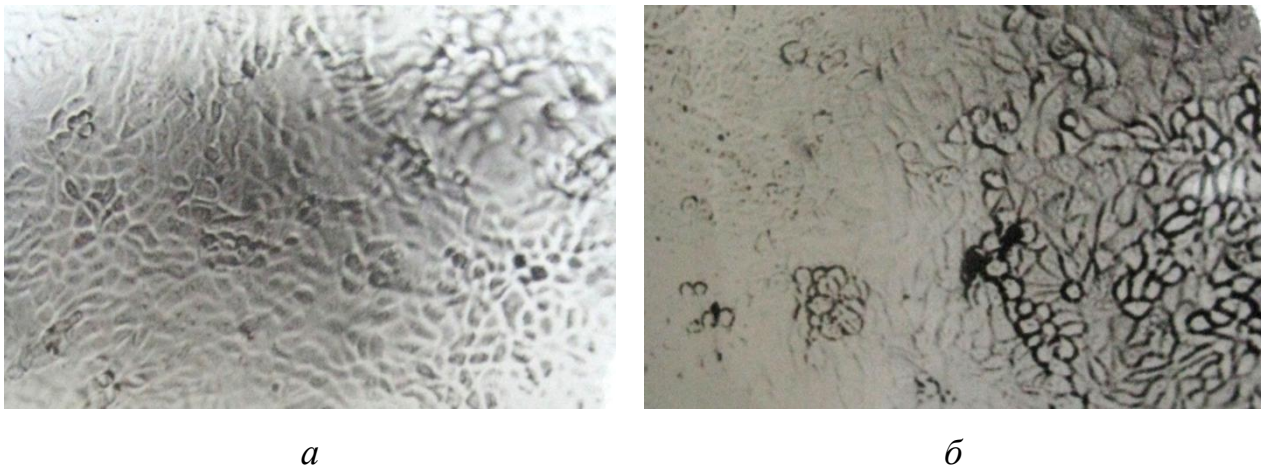


Рис. 3.1 Розвиток ЦПД вірусу у моношарі клітин ПТП:

a) контроль культури клітин ПТП; *б)* початковий етап ЦПД через 12 год після інфікування (збільшення 12,5 x 20).

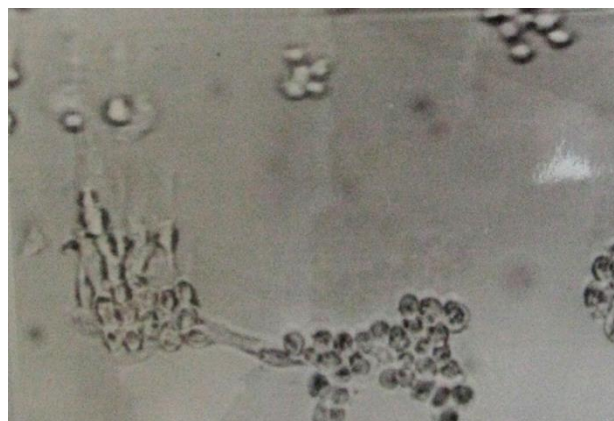


Рис. 3.2 Розвиток ЦПД вірусу у моношарі клітин ПТП через 24 години (продовження) (збільшення 12,5 x 20)

Титрування вірусу у культурі клітин ПТП

Розбавлення вірусу	Кількість пробірок, інфікованих вірусом			
	24 год	48 год	72 год	96 год
10^{-1}	4/4*	4/4	4/4	4/4
10^{-2}	4/4	4/4	4/4	4/4
10^{-3}	4/4	4/4	4/4	4/4
10^{-4}	4/1	4/1	4/4	4/4
10^{-5}	4/1	4/2	4/2	4/3
10^{-6}	4/0	4/2	4/3	4/3
10^{-7}	4/0	4/0	4/1	4/1
Контроль культури клітин	4/0	4/0	4/0	4/0

* Примітка: 4/4 - кількість заражених пробірок / кількість пробірок з вираженою ЦПД у моношарі клітин.

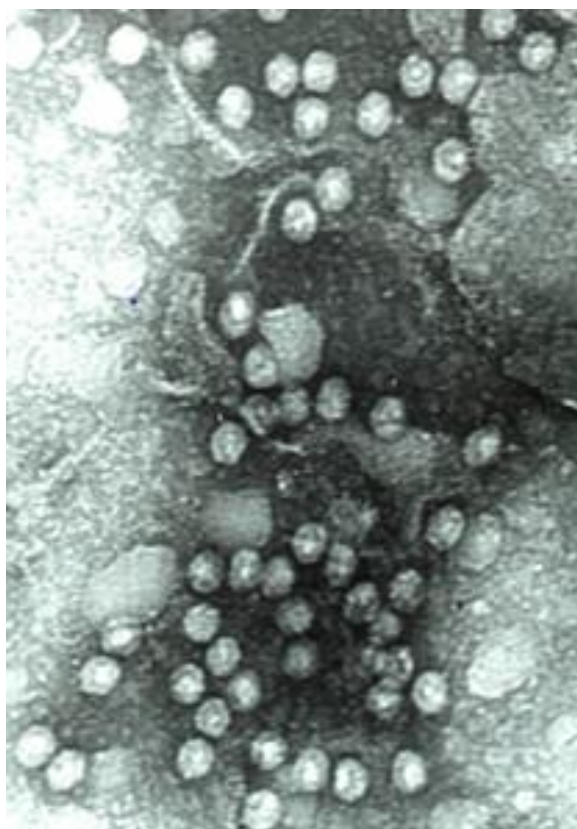


Рис. 3.3. Скупчення часточок вірусу в інфікованій клітині (збільшення x 170 000)

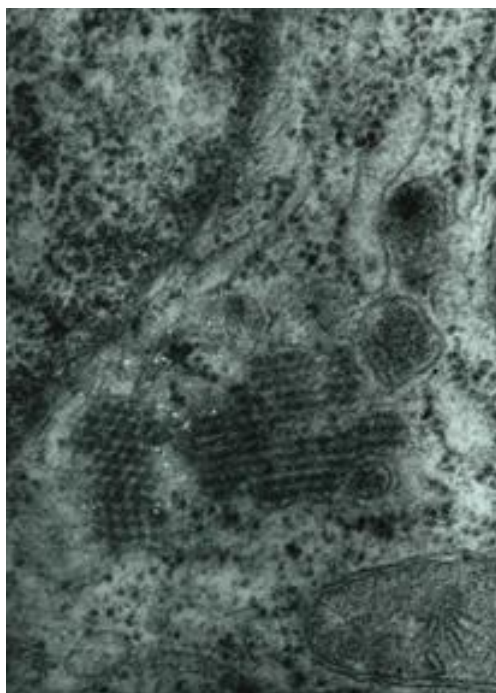


Рис. 3.4. Негативне контрастування амонію молібдатом (збільшення x 540 000)

3.2. Вплив протівірусних речовин на культуру клітин

Так як «Арбівір» не розчинний у воді, для приготування робочого розчину, що використовувався у процесі визначення цитотоксичності на культуру клітин, «Арбівір» попередньо розчиняли у мінімальному об'ємі концентрованого *DMSO*, після цього готували розведення необхідних концентрацій на 199 середовищі. Кінцева концентрація *DMSO* не перевищувала 0,01 % та була нетоксичною для культури клітин, що використовувалася у дослідженнях [71], тому безпосередній контроль *DMSO* на культуру клітин не проводили. При встановленні інтервалу дослідних концентрацій «Арбівіру» керувалися експериментальними даними, що були отримані та описані вітчизняними та зарубіжними науковцями при досліджуванні впливу «Арбівіру» на культури клітин [71].

Проведене нами дослідження впливу антивірусного препарату «Арбівір» на культуру клітин показало, що Арбівір у концентрації 100 мкг/мл руйнує моношар клітин у всіх пробірках даної групи вже через 48 годин (рис. 3.5, а) - клітини округлювались, відокремлювались від скла, змінювалось значення рН підтримуючого середовища у кислу сторону. При нижчих концентраціях, що досліджувались, - 50

мкг/мл, 25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл та 6,25 мкг/мл «Арбівір» не здійснював токсичного впливу на культуру клітин ПТП (рис. 3.5, б), що і показано у табл. 3.2. Отже максимально допустима концентрація (МДК) «Арбівір» для перещеплюваної культури клітин ПТП становить 50 мкг/мл.

Таблиця 3.2

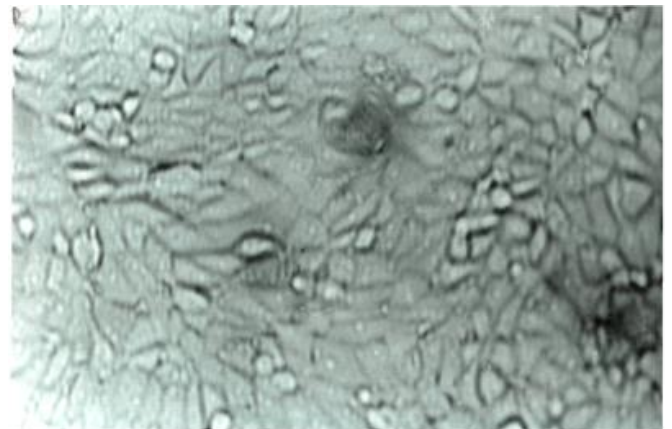
Оцінка цитотоксичності «Арбівір» у перещеплюваній культурі клітин ПТП

Тестовані концентрації, мкг/мл	Дія Арбівіру на культуру клітин у пробірках			
	24 год	48 год	72 год	96 год
100	4/2*	4/3	4/4	4/4
50	4/0	4/0	4/0	4/0
25	4/0	4/0	4/0	4/0
12,5	4/0	4/0	4/0	4/0
6, 25	4/0	4/0	4/0	4/0
Контроль культури клітин	4/0	4/0	4/0	4/0

*Примітка: 4/2 кількість пробірок, у які вносили «Арбівір» / кількість пробірок зі зруйнованим моношаром (прояв цитотоксичної дії «Арбівіру»)



а



б

Рис. 3.5 Оцінка токсичності «Арбівір» у моношарі клітин ПТП через 24 години:

а) виражена цитотоксична дія «Арбівіру» (у концентрації 100 мкг/мл); б) відсутність цитотоксичної дії «Арбівіру» (концентрація препарату 25 мкг/мл) (збільшення 12,5 x 20)

3.3 Дослідження впливу противірусного препарату «Арбівір» на вірус грипу

Так як встановлено, що МДК «Арбівір» для культури клітин ПТПП визначена та становить 50 мкг/мл, дослідження противірусної дії препарату доцільно проводити при концентраціях, що дорівнюють МДК чи нижчих за МДК.

Результати, що представлені у таблиці 3.3 та табл. 3.4 свідчать про те, що «Арбівір» знижує титр інфекційної активності вірусу. Розрахуємо противірусну активність «Арбівіру» у досліджуваних концентраціях - 50 мкг/мл та 25 мкг/мл

Таблиця 3.3

Визначення антивірусної активності «Арбівір» максимально допустимої концентрації (50 мкг/мл)

Розбавлення вірусу	Кількість пробірок, інфікованих вірусом			
	24 год	48 год	72 год	96 год
10 ⁻¹	4/4*	4/4	4/4	4/4
10 ⁻²	4/4	4/4	4/4	4/4
10 ⁻³	4/3	4/4	4/4	4/4
10 ⁻⁴	4/2	4/2	4/2	4/2
10 ⁻⁵	4/0	4/1	4/1	4/1
10 ⁻⁶	4/0	4/0	4/0	4/1
10 ⁻⁷	4/0	4/0	4/0	4/0
Контроль культури клітин+вірус	4/4	4/4	4/4	4/4
Контроль культури клітин	4/0	4/0	4/0	4/0

*Примітка: 4/4 - кількість заражених пробірок / кількість пробірок з вираженою ЦПД у моношарі клітин.

Вплив «Арбівіру» з концентрацією 25 мкг/мл на рівень накопичення вірусу у культурі клітин ПТП

Розбавлення вірусу	Кількість пробірок, інфікованих вірусом			
	24 год	48 год	72 год	96 год
10 ⁻¹	4/4	4/4	4/4	4/4
10 ⁻²	4/4	4/4	4/4	4/4
10 ⁻³	4/3	4/3	4/4	4/4
10 ⁻⁴	4/2	4/2	4/2	4/2
10 ⁻⁵	4/0	4/0	4/1	4/1
10 ⁻⁶	4/1	4/1	4/1	4/2
10 ⁻⁷	4/0	4/0	4/1	4/1
Контроль культури клітин+вірус	4/4	4/4	4/4	4/4
Контроль культури клітин	4/0	4/0	4/0	4/0

*Примітка: 4/4 - кількість заражених пробірок / кількість пробірок з вираженою ЦПД у моношарі клітин.

Система оцінки противірусної дії речовини у культурі клітин вміщувала у себе кількісне вивчення пригнічення репродукції коронавірусу безпосередньо у культурі клітин (%).

Противірусна ефективність препаратів *in vitro* становила:

1) зниження рівня накопичення вірусу під впливом препарату (Δ, lg) визначали за допомогою формули (2.1):

а) Пригнічення репродукції коронавірусу у культурі клітин ПТП при використанні «Арбівіру» у концентрації 50 мкг/мл становило:

$$\Delta=6,32lg -4,43lg$$

б) Зниження рівня накопичення коронавірусу у культурі клітин ПТП при використанні «Арбівіру» у концентрації 25 мкг/мл становила:

$$\Delta=6,32lg -5,00lg=1,32lg$$

- визначимо коефіцієнт інгібування репродукції вірусу у культурі клітин (K_i , %) за формулою (2.2):

при використанні «Арбівіру» з концентрацією 50 мкг/мл:

$$K_i = \frac{6,32lg - 4,43lg}{6,32lg} \cdot 100\%$$

при використанні «Арбівіру» з концентрацією 25 мкг/мл:

$$K_i = \frac{6,32lg - 5,0lg}{6,32lg} \cdot 100\%$$

Розраховані дані представимо у вигляді табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Противовірусна ефективність «Арбівіру» по відношенню до вірусу у перещеплюваній культурі клітин ПТП

Доза «Арбівір», мкг/мл	Рівень накопичення вірусу у культурі клітин, lg ТЦД ₅₀ /мл	Пригнічення репродукції вірусу, Δ, lg	Коефіцієнт інгібування, %
50	4, 43	1,89	98,70
25	5,00	1,32	95,20
Контроль дози вірусу (без «Арбівіру»)	6,32	-	-

3.4. Висновки до розділу

Таким чином, у культурі клітин ПТП досліджені концентрації препарату «Арбівір» виявили значну ефективність ($\geq 1,25lg$) у відношенні до вірусу грипу А, що становлять 1, 89lg та 1,32lg.

Тобто, ефективність «Арбівіру» у концентраціях 50 мкг/мл та 25 мкг/мл у вигляді пригнічення репродукції вірусу у культурі клітин склала відповідно 98,7% та 95,2%.

Необхідно відмітити, що при внесенні «Арбівіру» у культуру клітин у концентрації, що дорівнює $\frac{1}{2}$ максимально допустимої концентрації, визначено

зниження противірусної ефективності на $0,57lg$, що визначає зниження коефіцієнту інгібування на 3,5%.

У ході проведення дослідження, встановлено, що препарат «Арбівір» володіє вираженою противірусною активністю щодо грипу А. Дослідження антивірусної ефективності у системі *in vitro* проводилися у культурі клітин ПТП. Встановлено, що концентрація досліджуваного препарату, що складає 50 мкг/мл, є нетоксичною для даної культури клітин. Арбівір пригнічує репродукцію вірусу у системі *in vitro* на 98,7% та 95,2% у відповідних концентраціях 50 мкг/мл (МДК) та 25 мкг/мл (1/2 МДК). Визначено, що «Арбівір» володіє залежністю зниження противірусної ефективності від зменшення концентрації.

РОЗДІЛ 4

ОХОРОНА ПРАЦІ

4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при роботі у вірусологічній лабораторії

При виконанні дослідницьких робіт у вірусологічній лабораторії на базі Інституту ветеринарної медицини у м. Києві на працюючих можуть впливати наступні небезпечні та шкідливі виробничі фактори:

1. Підвищений рівень ультрафіолетової радіації, джерелом якої є бактерицидні кварцові лампи, спектр яких містить випромінювання діапазону довжин хвиль 205 - 315 нм. Дані електричні джерела випромінювання використовуються в вірусологічній лабораторії для створення стерильних умов в боксовому приміщенні. Інтенсивність опромінення працівника становить $0,005 \text{ Вт/м}^2$ при загальній тривалості впливу 20 хв.

2. Підвищена температура повітря робочої зони. Спиртівка, сушильно - стерилізаційна шафа, термостати, водяна баня, автоклав, газова плитка та інше обладнання, що є джерелом значних тепловиділень, підвищують температуру повітря робочої зони до 28°C у холодний період року, та до 32°C у теплий період року. Тривалість дії даного небезпечного виробничого фактору в залежності від етапу дослідження становить 2-3 години.

3. Підвищений рівень шуму на робочому місці. Даний негативний фактор виникає в лабораторії внаслідок використання системи вентиляції, стерилізаційного обладнання (сушильної шафи, автоклаву), персонального комп'ютера. Шкідливий вплив підвищеного рівня шуму (більше, ніж 50 дБА) протягом 3 годин виявляється як у вигляді специфічного ушкодження органів слуху, так і у вигляді порушень багатьох інших органів, в першу чергу центральної нервової системи.

4. Підвищений рівень електромагнітних випромінювань. Його головними джерелами в вірусологічній лабораторії є персональний комп'ютер, периферійні пристрої комп'ютера - принтер, сканер, холодильник. Дія електро-магнітного поля

на працівника з рівнем, що перевищує гігієнічну норму, триває 3 години, результатом чого можуть бути функціональні порушення нервової, ендокринної та серцево-судинної систем.

5. Гострі кромки, задири, шорсткість на поверхні інструментів, обладнання, лабораторного посуду. Травмування працівників лабораторії можливе під час використання в роботі скляного лабораторного посуду (пробірки, культуральні флакони різного об'єму, флаконів з поживним середовищем, піпеток), предметних та покривних скелець, пінцетів, ножиць, голок від шприців тощо. Тривалість дії небезпечного фактора становить від 2 до 5 годин.

6. Хімічні небезпечні та шкідливі виробничі фактори, що характеризуються токсичною (етиловий спирт, фарбники - розчин трипанового синього та метиленового синього тощо), подразнюючою (дезінфікуючі та мийні засоби), алергенною (антибіотики, розчини трипсину та версену) діями.

Велика кількість захворювань, а також отруєнь виникає через проникнення небезпечних хімічних речовин в організм людини, головним чином, через органи дихання у вигляді газів, парів, аерозолів. У шлунково-кишковий тракт потрапляють через невиконання правил особистої гігієни, наприклад, харчування або куріння на робочому місці без попереднього миття рук. Шкідливі речовини можуть потрапляти в організм людини також через шкіру при дії рідини при контакті з руками, або у випадках високих концентрацій токсичних парів і газів у повітрі на робочих місцях.

Дані небезпечні виробничі фактори діють у концентраціях, що перевищують або дорівнюють гранично допустимим концентраціям шкідливих речовин у повітрі робочої зони, протягом 5 годин.

7. Біологічно небезпечні та шкідливі виробничі фактори. Під час виконання дослідницької роботи у лабораторії вірусології доводилося мати справу з коронавірусом та перещеплюваною культурою клітин ПТП (перещеплювані тестикули поросяти). Так, концентрація культури клітин у культуральному флаконі придатна для подальшого пасажування становила 4-5 млн клітин, а у пробірках - 200-250 тис. Небезпечність перещеплюваних культур клітин пов'язана з їх властивостями та характеризується онкогенним фактором при контакті з клітинами людського

організму. У дослідженні брали участь коронавіруси, що викликають гострі респіраторні захворювання. Віруси кислотостійкі та стійкі до дії лугів (витримують діапазон рН 3,0-10,0) і термостійкі (витримують температуру до +50°C), стійкі до дії жиророзчинників, трипсину (0,5%) і сапоніну (0,5%), інактивувались протягом 30 хв при +50-60°C, 0,3%-м розчином формальдегіду, висушуванням, нагріванням, прямою дією сонячного світла. Тривалість дії біологічного небезпечного фактору складала 2-4 години [81].

8. Перенапруга зорового аналізатора. Причиною перенапруги акомодуючих м'язів райдужної оболонки очей може бути недостатня освітленість, необхідність розглядати дрібні колонії мікроорганізмів, тривала робота з мікроскопом, за комп'ютером, на що витрачається біля 5 годин робочої зміни [109-111].

4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при роботі у вірусологічній лабораторії

Експлуатація бактерицидних установок повинна здійснюватися відповідно вимогам, вказаним в паспорті на виробі і інструкції з експлуатації. Бактерицидні лампи, що відробили термін служби, повинні бути замінені новими. Для цього необхідно вести облік часу роботи опромінювачів у приміщенні. До експлуатації бактерицидних установок слід допускати тільки персонал, що пройшов необхідний інструктаж.

Знезараження повітряного середовища здійснюється тільки у відсутності людей - перед початком роботи у вірусологічному боксі, в перерві між роботою та після роботи у боксовому приміщенні.

Для захисту від надмірного ультрафіолетового випромінювання застосовують захисні екрани: хімічні (хімічні речовини, креми, що поглинають випромінювання) і фізичні (перешкоди, що поглинають або розсіюють промені). Очі слід захищати окулярами із захисним склом відповідно до ГОСТ 12.4.013-97. Повний захист від

ультрафіолетового випромінювання усіх хвиль забезпечує флінтглас (скло, що вміщує оксид свинцю) товщиною 2 мм.

Зниження інтенсивності опромінення ультрафіолетовим випромінюванням досягається також спеціальним фарбуванням приміщень, раціональним розташуванням робочих місць. Пропонується подачу і відключення живлення бактерицидних ламп від електричної мережі здійснювати за допомогою окремих вимикачів, розташованих зовні приміщення біля входних дверей [111, 112].

Щоб запобігти терморозладу, перевантаженню серцево-судинної системи іншим порушенням стану здоров'я через підвищену температуру повітря робочої зони, необхідно надлишкове тепло видаляти за допомогою вентиляції, систематичного провітрювання приміщення та раціонального використання приладів, що є джерелом значних тепловиділень. Для зниження температури поверхонь обладнання і зменшення ступеня нагріву повітря на робочих місцях слід передбачати теплоізоляційні пристрої. Автоклави, сушильно - стерилізаційні шафи встановлюють в окремих приміщеннях (автоклавних, стерилізаційних), площею не менше 10 м², які мають природне освітлення, примусову витяжну вентиляцію, фрамугу або кватирку.

Рівень шуму не повинен перевищувати рівня, передбаченого ДСН 3.3.6.037-99. Для зниження рівня шуму стіни і стеля приміщень можуть бути фанеровані звукопоглинальними матеріалами. В якості заходів щодо зменшення рівня шуму пропонується також екранування робочого місця (установлення перегородки, діафрагм), використання обладнання, що породжує мінімальний шум, раціональне планування приміщення.

Зменшення потужності електромагнітного поля на робочому місці можна досягти шляхом збільшення віддалі між джерелом випромінювання і робочим місцем; зменшенням потужності випромінювання генератора, а також розміщенням відбиваючого та поглинаючого екранів між джерелом і робочим місцем; застосуванням індивідуальних засобів захисту.

В сучасних моніторах від комп'ютерів все випромінювання відводиться вгору і частково назад. Вперед не випромінюється нічого. Тому в приміщеннях

комп'ютерну техніку розставляють уздовж стін так, щоб люди не могли знаходитися біля їх задніх стінок. Також не рекомендується нахилитися над монітором, щоб подивитися на нього зверху. Під час користування комп'ютером медики радять встановлювати монітор на відстані 50-60 см від очей.

Лікарсько-профілактичні заходи передбачають проведення систематичних медичних оглядів працівників, які перебувають у зоні дії електромагнітного поля, обмеження в часі перебування людей в зоні підвищеної інтенсивності електромагнітних випромінювань [113, 114].

При роботі з персональним комп'ютером дуже важливу роль грає дотримання правильного режиму праці і відпочинку. Не варто переобтяжувати приміщення значною кількістю робочих місць з моніторами і концентрувати на робочому місці велику кількість радіоелектронних пристроїв .

Не дозволяється користуватися надбитим або тріснутим лабораторним посудом. Скляний посуд зі звичайного скла не дозволяється нагрівати на відкритому вогні без азбестової сітки. Такий посуд належить обережно ставити на керамічну, металеву та цементну поверхню. Скло - крихкий матеріал з гострою поверхнею сколу. Слід притримуватися обережності і запобігати застосуванню сили вийманні пробок з пробірок, культуральних флаконів та іншого скляного посуду. Перед початком роботи зі скляним посудом необхідно ретельно пересвідчитись у його придатності для проведення дослідних робіт чи для їх миття та стерилізації [114].

Основою проведення заходів щодо боротьби зі шкідливими хімічними речовинами є гігієнічне нормування. Гранично допустимі концентрації шкідливих речовин в повітрі робочої зони встановлені ГОСТ 12.1.005-88. Зниження рівня дії на працівника шкідливих та небезпечних речовин або його повне усунення досягається шляхом проведення технологічних, санітарно-технічних, лікувально-профілактичних заходів, наприклад, забезпеченням спецодягом, спецвзуттям і засобами індивідуального захисту (респіратори, захисні окуляри), окремого приміщення для зберігання та приготування поживних середовищ, реактивів, робочих розчинів тощо. Коли технологічні, санітарно-технічні заходи не повністю виключають наявність шкідливих речовин в повітряному середовищі, відсутні методи і прилади для їх

контролю, проводяться лікувально-профілактичні заходи: організація і проведення попередніх і періодичних медичних оглядів, дихальної гімнастики, лужних інгаляцій, забезпечення лікувально-профілактичним харчуванням і молоком.

Так як хімічні речовини при попаданні на тіло можуть викликати хімічні опіки, а проникнення в організм людини через легені, шкіру і рот - отруєння, глибоку токсикацію, то операції з небезпечними речовинами слід проводити з використанням засобів індивідуального захисту (рукавиці, окуляри та фартух).

Переливання рідин (поживного середовища, розчинів версену, трипсину, суспензії клітин тощо) слід проводити за допомогою піпеток з гумовою грушею, забороняється набирати ці рідини в піпетки ротом. Відпрацьовані піпетки слід одразу ложити у кювету з відпрацьованим посудом [115, 110].

Роботу з культурами клітин та патологічним матеріалом проводять, дотримуючись заходів особистої безпеки, забезпечуючи чистоту посіву та запобігаючи розсіюванню збудників інфекції у навколишньому середовищі.

Безпосередньо для проведення дослідних робіт з використанням біологічного матеріалу необхідно підготувати вірусологічну лабораторію.

Одна з обов'язкових умов розміщення вірусологічної лабораторії - можливість повної ізоляції всіх її служб від інших структурних підрозділів установи для забезпечення необхідної чистоти й стерильності.

Пред опроміненням бактерицидною лампою стаціонарні, а також і звичайні бокси мають та ретельно протирають всі поверхні дезінфікуючими засобами.

У боксі і передбокснику повинні бути змонтовані опромінювачі бактерицидні стельові ОБС-300 або (і) настінні - ОБН-150, вимикачі яких повинні знаходитися, відповідно, поза боксом і передбоксником. У передбокснику розміщують медичну шафу для зберігання стерильного матеріалу та шафу для халатів і одягу.

Для виконання маніпуляцій у боксі рекомендується скласти перелік необхідного інвентарю, посуду, приладів, які переносять у бокс і опромінюють бактерицидною лампою впродовж 1 год із розрахунку 1,5-2,5 Вт на 1 м² приміщення; роботу розпочинають через 30 хв після опромінення боксу.

Робота з культурами клітин та вірусами проводиться у боксовому приміщенні вірусологічної лабораторії. Одягати санітарний одяг та проводити допоміжні роботи перед початком роботи в боксі необхідно тільки в передбокснику.

Техніка безпеки роботи у вірусологічній лабораторії передбачає дотримання правил, що запобігають можливості зараження персоналу збудником інфекції, поширенню його в навколишнє середовище, а також небезпечним впливом перещеплених культур клітин на людський організм.

Весь матеріал, що надходить у лабораторію на дослідження, необхідно розглядати як патогенний. Під час розпакування матеріалу банки слід зовні дезінфікувати й ставити на піднос або кювету з кількома шарами марлі, зволоженої 5%-м розчином хлораміну; роботу проводити в спецодязі та гумових рукавичках. Рідини, що містять віруси, переливають над кюветою із дезінфекційним розчином. Під час роботи з піпетками користуються гумовими грушами. Піпетки, предметні стекла, інший посуд знезаражують, занурюючи їх у 5%-й розчин хлораміну. У боксі належить працювати в стерильному халаті, масці, шапочці, обов'язково змінювати взуття, при безпосередній роботі з вірусвмісним матеріалом надягати гумові рукавички й окуляри. Під час роботи двері боксу та передбоксника повинні бути щільно зачинені. У цей час забороняється виходити з боксу, а також заходити до передбокснику іншим працівникам лабораторії. Після закінчення роботи в боксі руки в рукавичках промивають у банці з 5%-м розчином хлораміну, потім рукавички знімають, знезаражують їх вдруге і миють. Також наводять лад на робочому місці; стіл, кюветку та спиртівку ретельно дезінфікувати; винести відпрацьований матеріал і предмети, які не належать до боксового інвентарю, провести вологе прибирання боксу, після чого підлогу, стіни та меблі протерти дезрозчином. Після закінчення роботи і прибирання приміщення боксів їх опромінюють бактерицидними лампами протягом 30-60 хвилин. Приміщення в боксів не менше одного разу на тиждень миють гарячою водою з милом, дезінфікуючими засобами і витирають насухо. Вірусвмісний матеріал ставлять на зберігання в холодильник, який опечатують. У разі аварії негайно повідомляють про це завідувача і під його контролем проводять дезінфекцію рук, халата й робочого місця, залитого

вірусомісним матеріалом, 5%-м хлораміном чи будь-яким іншим дезінфекційним розчином. Забороняється виносити з лабораторії устаткування, інвентар і матеріали без попередньої дезінфекції їх на місці, а також виходити за межі лабораторії в халаті, спецвзутті, надягати верхній одяг на халат.

Для попередження перевтоми та пошкодження зору під час роботи з мікроскопом та іншими оптичними приладами необхідно: забезпечити правильне освітлення поля зору; проводити мікроскопію то одним, то іншим оком, не закривати непрацююче око; використовувати сучасне обладнання (мікроскопи та дисплеї комп'ютерів) з покращеними характеристиками; через кожні півгодини роботи влаштовувати перерви по п'ять хвилин.

4.2.1. Розрахунок штучного освітлення при роботі у вірусологічній лабораторії

Розрахунок освітлення лабораторії найбільш актуальний, тому що від нього залежить правильність отриманих результатів. Оскільки недостатнє освітлення збільшує ймовірність утворення похибки.

Необхідну освітленість лабораторії визначають за методом світлового потоку за формулою:

$$F = \frac{E_n \cdot S \cdot K \cdot Z}{n \cdot \eta}, \text{ лм} \quad (4.1)$$

де, F – світловий потік лампи, лм;

E_n - нормована освітлюваність, лк;

S - площа освітлювально приміщення, м²;

K - коефіцієнт запасу, що враховує зниження освітлюваності в результаті забруднення та старіння ламп;

Z - коефіцієнт нерівномірності освітлення;

n - кількість ламп у світильнику;

η - коефіцієнт використання світлового потоку.

Коефіцієнт η визначається за світлотехнічними таблицями залежно від показника приміщення i , коефіцієнтів відбиття стін та стелі. Показник приміщення i знаходять за формулою:

$$i = \frac{a \cdot b}{h_p(a+b)} \quad (4.2)$$

де, a і b - довжина та ширина приміщення, м;

h_p – висота світильника над робочою поверхнею, м.

Вихідні дані для розрахунку освітлення лабораторного приміщення:

$a=5\text{м}; b=8\text{м}; h_p=2,5\text{м}; E_n=300\text{лк}; S=40\text{м}^2; K=1,4; Z=1,1; n=12$ (шість ламп з двома світильниками); $\rho_{ст} = 0,7$ - коефіцієнт відбиття стелі; $\rho_{стн} = 0,5$ - коефіцієнт відбиття стін; $\rho_p = 0,3$ - коефіцієнт відбиття від робочої поверхні.

Визначаємо показник приміщення за формулою (4.2):

$$i = \frac{5 \cdot 8}{2,5 \cdot (5 + 8)} = 1,23$$

Тоді $\eta = 42\%$.

Знаходимо значення світлового потоку за формулою (4.2):

$$F = \frac{300 \cdot 40 \cdot 1,4 \cdot 1,1}{12 \cdot 0,42} = 3667 \text{ лм}$$

За світловим потоком $F=3667$ лм для напруги 220 В обираємо люмінесцентну лампу ЛД-65-4 потужністю 65 Вт із світловим потоком $F=3570$ лм.

4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки при роботі у вірусологічній лабораторії

Правовою основою діяльності в галузі пожежної безпеки є Конституція, Закон України «Кодекс цивільного захисту України» та інші закони України, постанови Верховної Ради України, укази і розпорядження Президента України, декрети, постанови та розпорядження Кабінету Міністрів України; рішення органів державної виконавчої влади, місцевого та регіонального самоврядування, прийняті в межах їх компетенції.

Причинами пожежі у вірусологічній лабораторії можуть бути:

- необережне поводження з вогнем;
- незадовільний стан електротехнічних пристроїв та порушення правил їх монтажу та експлуатації;
- несправність опалювальних приладів та порушення правил їх експлуатації;
- самозапалювання і самозаймання речовин і матеріалів при неправильному їхньому збереженні чи застосуванні;
- невиконання вимог нормативних документів з питань пожежної безпеки.

Пожежна безпека забезпечується проведенням організаційних, технічних та інших заходів відповідно до правил пожежної безпеки в Україні. З персоналом установи повинен бути проведений інструктаж щодо забезпечення пожежної і вибухової безпеки, вивчені характеристики пожежної небезпеки речовин, матеріалів та пожежонебезпечного технологічного устаткування, що застосовуються під час роботи.

Приміщення лабораторій повинні бути забезпечені автоматичною пожежною сигналізацією, вогнегасниками, які розташовують у добре доступних місцях. Бокс та приміщення, в яких розміщені сушильно - стерилізаційні шафи і термостати, забезпечують вогнегасником та азбестовою або вовняною ковдрою. Забороняється розміщувати на сушильно-стерилізаційних шафах і термостатах та біля них сторонні предмети, вибухонебезпечні, легкозаймисті, горючі, токсичні та агресивні речовини. Підходи до засобів пожежогасіння повинні бути вільними.

Автоклави відносяться до посудин, що працюють під тиском води з температурою вище 115⁰С. Вони представляють особливу небезпеку для людей, що працюють з ними, а також для оточуючого персоналу, будівель, споруд та ін. При недотриманні правил експлуатації цих приладів можливі вибухи та інші аварії. Основними причинами аварій і вибухів є: перевищення граничної межі тиску (найчастіше із-за неспрацювання запобіжних клапанів); зменшення рівня води, що приводить до перегріву і деформації стінок; втрата автоклавом міцності внаслідок корозії металу; недотримання режиму роботи автоклаву; низька кваліфікація обслуговуючого персоналу тощо.

Автоклави встановлюють в окремих приміщеннях (автоклавних, стерилізаційних), площею не менше 10 м², які мають природне освітлення, примусову витяжну вентиляцію, фрамугу або кватирку. Автоклав повинен мати справний манометр, опломбований організацією, що здійснює їх повірку, встановлений так, щоб його показання були легко видні працюючим. Відповідальність за безпечну експлуатацію автоклавів покладається на працівника лабораторії, який пройшов навчання та перевірку знань і має посвідчення на право роботи з автоклавом. Категорично забороняється залишати працюючий автоклав без нагляду; заливати воду в автоклав, коли він знаходиться під тиском; працювати з автоклавом, який має дефекти; допускати в автоклавну під час роботи осіб, що не мають відношення до роботи автоклава [111, 115, 116].

Для попередження виникнення пожежі забороняється:

- використовувати відкритий вогонь, палити в службових і виробничих приміщеннях, коридорах, на сходах, окрім спеціально відведених місць, класти недопалки на підлогу і інші місця приміщень;
- залишати та зберігати папір, вату, марлю, спирт та інші легкозаймісті речовини та матеріали на шафах та поза ними, на радіаторах центрального опалення, поблизу палаючих пальників, електричних проводів і приладів;
- зберігати легкозаймісті, вибухові та вогненебезпечні речовини (бензин, скипидар, ефір, фото- і кіноплівку тощо) без дотримання правил безпеки;
- нагрівати легкозаймісті речовини на відкритому вогні, електроплитах тощо;
- залишати без нагляду включені електроприлади, електричне освітлення, запалені газові пальники;
- користуватися електроплитами, електрочайниками та іншими електронагрівальними приладами там, де не передбачено технологічними процесами;
- прибирати випадково пролиті легкозаймісті речовини при запалених пальниках і включених електроприладах;
- запалювати вогонь, включати електроприлади, якщо в приміщенні відчувається запах газу;

- порушувати електропроводку, заставляти шафами, завішувати плакатами, картинами, газетами електропроводи, електровимикачі, розетки;

- захарашувати коридори, переходи, виходи, сходи і доступи до протипожежних засобів шафами, столами та іншими предметами;

- користуватися саморобними, несправними або з відкритою спіраллю електронагрівальними приладами;

- порушувати стан електропроводки, тобто: подовжувати проводку, вставляти саморобні запобіжники, обгортати і заклеювати електролампи та електропровід папером та тканиною, підвішувати на проводах будь-які предмети, закручувати або зав'язувати електропровід вузлом тощо;

- використовувати протипожежний інвентар не за призначенням [111].

В інституті розроблені загальнооб'єктова інструкція про заходи пожежної безпеки, інструкції з пожежної безпеки в лабораторії, з обслуговування установок пожежогасіння, з обслуговування установок пожежної сигналізації, план пожежогасіння, оперативні картки дій на випадок виникнення пожежі, схема евакуації людей на випадок пожежі, встановлена система оповіщення людей про пожежу, плани та графіки проведення протипожежних тренувань, навчання і перевірки знань персоналу, технічного нагляду за системами пожежного захисту, порядок проведення планово-попереджувальних ремонтів та оглядів електроустановок, опалювального, вентиляційного, технологічного та іншого інженерного обладнання тощо.

Лабораторія забезпечена первинними засобами пожежогасіння: вогнегасниками, пожежним інвентарем (пожежними щитами та стендами, пожежними відрами, діжками з водою, ящиками з піском тощо), пожежним знаряддям (пожежними ломами, баграми, сокирами тощо) та засобами зв'язку.

На випадок пожежі або вибуху терміново викликається пожежна охорона, при необхідності здійснюється евакуація людей згідно з діючим планом евакуації. Одночасно з цим організовується відключення мереж електро- і газопостачання; зупинка систем вентиляції та кондиціонування повітря і здійснення інших заходів, які сприяють запобіганню поширенню пожежі; та гасіння пожежі своїми силами з

допомогою наявних засобів пожежогасіння. Електропроводку і електроприлади, які загорілися, гасять вуглекислотними та порошковими вогнегасниками. Воду або вогнегасник з піною застосовують тільки після знеструмлення лінії електропостачання. Відповідальність за протипожежний стан приміщення і виконання вимог даних правил несе керівник виробничого підрозділу.

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1. Поняття про антибіотики, їх класифікація та механізм дії

Антибіотики належать до препаратів, які використовують для лікування інфекційних захворювань людини і тварин та в більшості розвинутих країн вони займають провідне місце за об'ємом виробництва серед всіх інших груп лікарських речовин [117].

До теперішнього часу загальноприйняте формулювання поняття «антибіотики» ще не визначене. Нині під цим терміном розуміють засоби хіміотерапії, що утворюються мікроорганізмами або одержуються з інших природних джерел, а також їх похідні, що володіють здатністю вибірково пригнічувати в організмі хворого збудників захворювань [118].

Антибіотики, як правило, є продуктами життєдіяльності мікроорганізмів або їх напівсинтетичними аналогами. Ці речовини виділяються мікроорганізмами в процесі антибіоза як результат антагоністичних взаємовідносин між видами. Ідея практичного використання антибіоза була висунута Л. Пастером і І. Мечниковим. Зокрема, І. Мечников рекомендував регулярно приймати продукти, що містять молочнокислі бактерії, для придушення гнильної мікрофлори кишечника. Сам термін «антибіотик» був запропонований З. Ваксманом в 1942 році. Проте перший антибіотик - тіротрицин - був отриманий в чистому виді Дюбо ще в 1939 році.

До теперішнього часу в біології і медицині використовується більше 800 антибіотиків, без урахування лікарських форм. Всього описано і досліджено більше 6000 різних антибіотичних речовин [119].

За Н. С. Єгоровим [120]: «Антибіотики - специфічні продукти життєдіяльності організмів або їх модифікації, що володіють високою фізіологічною активністю по відношенню до певних груп мікроорганізмів (бактерій, грибів, водоростей), вірусів або до злоякісних пухлин, затримуючи їх ріст або повністю пригнічуючи розвиток».

Специфічність вказаних продуктів обміну полягає в тому, що, по-перше, антибіотики на відміну від таких продуктів життєдіяльності, як, наприклад, спирти, органічні кислоти, перекиси і деякі інші, що також пригнічують ріст окремих видів мікроорганізмів, володіють високою біологічною активністю. По-друге, антибіотичні речовини володіють вибірковістю біологічної дії. Це означає, що не всі організми, здатні перебувати у контакті з антибіотиком, виявляються чутливими до його дії [121].

Продуктування антибіотичних речовин - це лише одна з форм прояву антагоністичних взаємовідносин в світі мікроорганізмів.

На сьогодні, згідно з літературними даними, немає єдиної загальноприйнятої класифікації антибіотиків. Існує необхідність базуватися на класичній вітчизняній літературі і думці видатних учених в області антибіотикотерапії. Найголовнішим є визначення чітких критеріїв, за якими відбувається розподіл антибіотиків на групи [117].

Так, за спектром біологічної дії антибіотики поділяються на наступні групи [1]: антибактеріальні; протигрибкові; протипухлинні антибіотики; противірусні антибіотики.

Антибіотики діють лише на певні види мікроорганізмів тому їх класифікують по спектру дії [122]:

- Антибіотики вузького спектру дії:

- ті, що пригноблюють грампозитивні бактерії і грамнегативні коки (солі бензилпеніциліна, біциліни, оксацилін, макроліди, ланкоміцин, фузидин, ванкоміцин, ристоміцин, цефалоспорини 1-го покоління);

- ті, що пригноблюють грамнегативні бактерії (поліміксини, цефалоспорини III-го і IV-го поколінь);

- На антибіотики широкого спектру дії, які діють одночасно на грампозитивні і грамнегативні мікроорганізми (ампіцилін, карбеніцилін, цефалоспорини II-го покоління, хлорамфенікол, тетрациклін, аміноглікозиди, рифаміцини).

Залежно від природи антибіотика, його концентрації, терміну дії, мікроструктури організму і зовнішніх умов - температури, рН і інших чинників

антибіотичні речовини можуть проявляти таку дію на життєдіяльність клітини, за якою їх класифікують [118]:

- цитостатичну (затримувати ріст клітин);
- цитотоксичну (вбивати клітину);

Грунтуючись на принципах класифікації антибіотиків, запропанованої Шемякіним, і враховуючи пізніше отримані дані, можна виділити наступні основні групи антибіотичних речовин за хімічною будовою [118]: антибіотики ациклічної будови (алліцин, азасерин, рафанін, ністатин, кандаміцин та ін.), антибіотики аліциклічної будови тетрацикліни, ароматичні антибіотики, антибіотики-хінони, антибіотики, що кисневмісні гетероциклічні сполуки, антибіотики-олігоміцини, антибіотики-макроліди, аміноглікозидні антибіотики, антибіотики, що містять азотвмісні гетероциклічні сполуки (β -лактами), антибіотики-поліпептиди, антибіотики-депсипептиди, актиноміцини, стрептотрицини (стрептотрицин, геоміцини, стрептоліни, вірусин, лавендулін і ін.), металовмісні сполуки.

Антибіотики за механізмом дії поділяються на п'ять груп: а) затримують синтез бактеріальної стінки; б) дезорганізують бактеріальну мембрану; в) порушують метаболізм нуклеїнових кислот; г) затримують синтез білків; д) порушують обмін бактерійної клітини [120].

Ще одним критерієм, за яким класифікуються антибіотики є три великі групи мікроорганізмів, що синтезують антибактеріальні речовини [117]: бактерії, плісняві гриби, актиноміцети. Крім того виділяють окрему групу антибіотиків, що синтезовані штучним шляхом.

5.2. Використання антибіотиків у медичній практиці

Антибіотичні препарати - це лікарські засоби, які використовують для знищення в організмі людини чужорідних клітин - збудників інфекційних та паразитичних захворювань (бактерій, найпростіших, грибків, глистів) [121]. Тобто антибіотики впливають на організм людини опосередковано, частіше за все при лікуванні від інфекційних хвороб бактеріальної природи.

Історія клінічного використання антибіотиків нараховує трохи більше 60 років. Завдяки цьому класу медикаментів були врятовані мільйони людських життів [123]. У медичній практиці використовують близько 100 антибіотиків [124].

Як, вже описано вище, однією з основних характеристик антибактеріальних препаратів, що визначає можливість їх використання у лікуванні хвороб у людей, є їх вибірковість дії. Під вибірковістю розуміють здатність антибіотиків викликати загибель певних організмів та не діяти на інших. Наприклад, антибіотик Флемінга - пеніцилін володів вибірковою руйнівною дією на бактерії та був нешкідливим для грибків, які його синтезували.

По відношенню до антибіотиків, що використовуються у лікуванні інфекційних хвороб, досліджується їх вплив на організм людини. Так, найбільшою вибірковістю - як найменшою небезпекою для людини - володіють антибіотики з групи пеніциліна та цефалоспоринів, що діють на структурні компоненти бактеріальної клітини та не мають аналогів у організмі людини [9].

Пеніциліни, наприклад, використовують при гнійних інфекціях шкіри, слизових оболонок, ангіні, дифтерії, скарлатині, пневмонії, плевриті, ендокардиті, перитоніті, сепсисі, менінгіті, гнійному запаленні захворювання вуха, горла, очей, носа, сечостатевої систем та ін. За допомогою пеніцилінів можна лікувати різні інфекції хвороби, але не завжди вони допомагають. За роки застосування пеніцилінів багато мікроорганізмів стали стійкішими до цієї групи препаратів. Тому ефективність пеніцилінотерапії зараз нижча, ніж в перші роки застосування і все знижується. Позитивні ефекти вдається підтримувати високими дозами та іншими групами антибіотичних речовин [126].

З іншого боку, група антибіотиків, що пригнічує синтез білків чи нуклеїнових кислот може спроектувати подібну дію і на організм людини, так як подібні процеси (синтез білків та нуклеїнових кислот) відбувається і в організмі людини. Низька вибірковість значно обмежує використання відповідних груп антибіотиків у медицині [127].

5.3. Дія антибіотиків на організм людини

Одна з самих актуальних та серйозних проблем сучасної хіміотерапії - побічні реакції та ускладнення, які викликані дією антибіотиків. Побічна дія препаратів стає справжньою бідною сучасної медицини. Клінічні симптоми побічної дії дуже різні та дуже небезпечні: алергічні явища, токсичні ускладнення, реакції загострення, різні форми дисбактеріозу, суперінфекції, порушення вітамінного обміну та інші. Часто ці ускладнення спостерігаються у різних комбінаціях [115].

Багаторічний досвід використання антибіотиків дозволяє зробити об'єктивне узагальнення та сформувані основні теоретичні та практичні установки характеристики побічних реакцій. Розрізняють три основні групи побічної дії антибіотиків:

- алергічні реакції;
- токсичні явища (з реакцією загострення);
- побічні явища, пов'язані з біологічною дією антибіотиків [113].

У групу побічних явищ, що властиві багатьом антибіотикам, входять різні за характером, тяжкості протікання та завершення патологічні процеси, що пов'язані зі здатністю антибіотика сенсibiliзувати організм хворого. При оцінці побічних реакцій, що виникають у процесі антибіотикотерапії, особливе значення має правильність діагностики.

Виникнення алергічних реакцій при антибіотикотерапії та їх вираженість можуть бути обумовлені різними факторами:

- властивостями антибіотика чи продуктів його розпаду та перетворення у організмі людини;
- методом введення антибіотика;
- індивідуальною чутливістю хворого, груповою чи специфічною алергією до лікарського препарату.

На першому місці серед антибіотиків за частотою розвитку алергічних ускладнень стоїть пеніцилін. Інші антибіотики викликають ці ускладнення значно

рідше. Алергічні реакції розвиваються приблизно у 10% хворих, що отримали антибіотики, але шоківі стани зустрічаються дуже рідко [80].

Наведемо коротку характеристику проявам алергічних реакцій, що можуть виникнути при антибіотикотерапії у хворого.

Анафілактичний шок, що спостерігається в окремих випадках використання пеніциліну та рідко при лікуванні іншими антибіотиками (стрептоміцин, тетрациклін, левоміцитін, ланкоміцин, ванкоміцин), є найбільш небезпечним ускладненням, що потребує швидкої діагностики та невідкладних лікарських заходів. Як правило, він розвивається дуже швидко, при чому можуть бути попередниками такі симптоми, як зуд, крапивниця, ангіоневротичний набряк. При важких формах протікання анафілактичного шоку, спостерігається шлункові кровотечі, ураження печінки, набряк головного мозку, коматозний стан.

Смерть від анафілактичного шоку може наступити у перші хвилини та часи після введення антибіотику.

Синдром, що нагадує сировоткову хворобу може спостерігатися при лікуванні пеніциліном, цефалоспорином, стрептоміцином, тетрацикліном, віоміцином тощо. Крім алергічних реакцій з боку шкіри та слизових оболонок (крапивниця, ангіоневротичний набряк), у хворих відмічають підвищення температури, біль у суглобах, спленомегалію, еозинофілію, збільшення лімфатичних вузлів.

Еозинофілія зустрічається порівняно часто у хворих при лікуванні пеніциліном, стрептоміцином та іншими антибіотиками.

Лейкопенія та агранулоцитоз алергічної природи можуть спостерігатися при використанні левоміцетина, стрептоміцину, тетрацикліна.

Ураження шкіри та слизових оболонок алергічного характеру зустрічається при використанні пеніциліну, стрептоміцину, тетрацикліну, левоміцетину, канаміцину, еритроміцину. Можуть носити різний характер - висипання, дерматити, фотодерматози, крапивниця.

Ангіоневротичний набряк (набряк Квінке) носить локалізований характер (набряк губ, повік, лиця, полових органів) чи розповсюджується на ряд областей

(гортань, трахея, легені). Ангіоневротичний набряк може бути самостійно вираженим чи бути складовою загальної алергічної реакції на введення антибіотиків.

Ураження дихальних шляхів алергічної природи (рени́ти, трахеїти, бронхіти, синусити, бронхіальна астма) частіше виникають при інгаляційному введенні пеніцилінів, стрептоміцинів.

При лікуванні пеніцилінами та стрептоміцинами також можуть виникнути такі реакції як ураження шлунково-кишкового тракту алергічної природи (стоматити, езофагіти, гастроентерити, проктити), ураження судин та міокарда (періартеріїти, міокардит) та ураження нервової системи (невріти, поліневрити, плексити, радикуліти).

Небезпечними є при використанні стрептоміцину та інших аміноглікозидів, левоміцетина, поліміксина ураження нирок (нефротичний синдром, нефріти) [90].

Алергічні явища частіше спостерігаються при повторному введенні речовин, що пояснюється сенсibilізацією. При значній сенсibilізації алергічні ускладнення можуть проявлятися при введенні навіть найменшої дози препарату, що викликав алергію.

Частіше спостерігаються алергічні реакції змішаного типу, які проявляються по черзі або одночасно. Також можливі токсико-алергічні ускладнення [76].

Токсичні реакції можуть виникати при використанні будь-якого антибіотика. Вони характеризуються досить окресленою симптоматикою та виникають значно частіше алергічних реакцій, оскільки кожен лікарський препарат, крім лікувальної дії, викликає деякі токсичні явища у хворого. На відміну від алергічних реакцій, що розвиваються навіть при використанні досить малих доз антибіотиків, вираженість токсичних реакцій знаходиться в залежності від кількості антибіотика, що використовується при лікуванні. Токсичні реакції можуть бути обумовлені самою речовиною, супроводжуваними домішками, а також продуктами розпаду антибіотиків у організмі.

Інтенсивність реакцій залежить не тільки від потенційної токсичності антибактеріальної речовини, але й від методу її введення, величини добової та

курсної дози, тривалості лікування, особливості взаємодії з іншими лікарськими препаратами, стану хворого.

Токсична дія препарату в значній мірі пов'язана зі станом організму хворого, в першу чергу з функціональним станом сечовидільних органів. Це пояснюється накопиченням антибіотику, якій приймається, в організмі хворого у значних концентраціях, що спричиняють токсичну дію. Для зменшення токсичності антибіотик призначають у мінімальних терапевтичних дозах, короткотривалими циклами (6 днів), з більш тривалими інтервалами між введення. При токсичних ускладненнях, які викликані дією антибіотиків, необхідно відмінити препарати, замінивши їх препаратами з іншим механізмом дії [87].

Як правило, препарати з однаковим механізмом дії та однаковою токсичною дією не сумісні, тому що при їх комбінації загальна токсична дія значно збільшується.

Токсична дія антибіотиків частіше всього проявляється у вигляді уражень окремих органів. Окрім загальної токсичної дії, антибіотики можуть негативно впливати на окремі тканини та органи.

Токсичні ускладнення не пов'язані з повторним введенням препарату та можуть виникати як в перші дні, так і в більш пізньому періоді терапії, тобто після накопичення препарату в організмі [89].

Токсичні явища в залежності від механізмів прояву та уражених систем поділяють на нейротоксичні, нефротоксичні, гепатотоксичні.

Нейротоксичні явища виникають після використання антибіотиків ряду груп та проявляються:

- ураженням на слухові гілки VIII пари черепних нервів (канаміцин, неоміцин, флориміцин);
 - дією на вестибулярний апарат (стрептоміцин, флориміцин, гентаміцин)
- Токсична дія стрептоміцину на VIII пару черепних нервів виявляється у втраті слуху та вестибулярних розладах;
- ураженням зорового нерву (стрептоміцин, левоміцетин, циклосерин);
 - розвитком поліневриту (стрептоміцин, поліміксін, циклосерин);

- виникненням парестезії, головних болей, запаморочень (поліміксини, циклосерин);
- розвиток різних уражень центральної нервової системи (гризеофульвін, поліміксин, циклосерин, пеніцилін, стрептоміцин);
- виникнення нервово-м'язової блокади (аміноглікозиди, поліміксин);
- прямою токсичною дією при інтралюмбальному введенні, що проявляється у вигляді галюцинацій, епілептиформних випадках, загальної гіпертензії мускулатури (пеніцилін, стрептоміцин, тетрациклін, ленкоміцин).

Нефротоксичні реакції можуть супроводжуватися лікуванням пеніцилінами, цефалоспоринами, аміноглікозидами, поліміксинами, ристоміцином, ванкоміцином.

Хворі з порушеною видільною функцією нирок особливо схильні до нефротоксичної дії антибіотиків, що пов'язано з їх кумуляцією та створенням високих концентрацій у крові внаслідок порушення виділення. При порушенні видільної функції нирок нефротоксичність багатьох препаратів підвищується з одночасним розподіленням токсичної дії на печінку.

Гепатотоксичні явища виникають в результаті того, що багато антибіотиків накопичуються у великих концентраціях у желчі (тетрацикліни, еритроміцин, рифампіцин) та можуть викликати ураження печінки.

Важкі ураження печінки у вигляді жирової інфільтрації печінкових клітин можуть спостерігатися при використанні великих доз тетрациклінів, особливо тих, що вводяться парентерально.

Токсична дія на шлунково-кишковий тракт ряду антибіотиків (тетрациклін, еритроміцин, гризеофульвін, фузидин) пов'язано з їх подразнюючою дією на слизові оболонки, проявляється у вигляді нудоти, рвоти, анорексії, поносу.

У рідких випадках, при використанні амфотерипцина *B* та левоміцетина, спостерігається пригнічення кровотворення у вигляді гіпопластичної анемії; гемолетична анемія - при використанні левоміцетина, стрептоміцина. Важкі ураження костного головного мозку спостерігаються при лікуванні левоміцетином, особливо при його тривалому використанні.

5.4. Явища, що пов'язані з біологічною дією антибіотиків

У цю групу входять обумовлені біологічною дією антибіотиків суперінфекції та внутрішньолікарняні інфекції, а також побічні явища, що пов'язані з порушенням складу так званої нормальної мікрофлори організму хворого (дисбактеріоз), балансу вітамінів, реакцією бактеріолізу (Яриша-Герксгеймера), впливом на стан імунітету хворого [93].

Антибіотики сприяють розвитку дисбактеріозу та суперінфекції при різних способах введення.

Комбінована хіміотерапія особливо часто сприяє розвитку дисбактеріозу та суперінфекцій.

Клінічна практика підтверджує, що в результаті використання різних антибіотиків в організмі хворого трапляються складні та взаємо пов'язанні процеси, які призводять до масивного розвитку різних бактерій.

Дисбактеріоз та суперінфекції тісно пов'язані з гіпер - та авітамінозом. Дисбактеріоз, викликаний антибіотиками, може призвести до порушення обміну речовин в організмі, в першу чергу до порушення балансу вітамінів.

Важливу роль у розвитку дисбактеріозу та суперінфекцій відіграють зміни, які викликані первинною інфекцією та тривалим прийомом антибіотиків.

Суперінфекція - розвиток на фоні ще незавершеного первинного інфекційного процесу нової інфекції. Тому при лікуванні хворих слід враховувати негативну дію антибіотиків на нормальну мікрофлору, яка знаходиться на поверхні слизових оболонок харчового каналу, верхніх дихальних шляхів та інших органів [100].

Суперінфекції можуть носити як екзогенний так і ендогенний характер. У процесі антибіотикотерапії, що запезпечує лікування основного процесу, одночасно пригнічується чутлива до призначених препаратів нормальна мікрофлора. Багато патогенних чи умовно-патогенних мікроорганізмів починають посилено розмножуватись та можуть стати джерелом нового захворювання (ендогенна суперінфекція).

Ендогенні суперінфекції можуть бути викликані багатьма видами мікроорганізмів - стафілококами, протеєм, ентеробактером, серраціями, кишковою паличкою, анаеробами, патогенними грибами тощо, природньо-нечутливими до даного антибіотику чи набуваючи стійкість у процесі антибіотикотерапії.

Форма протікання суперінфекцій та їх локалізація можуть бути різними: менінгіти, абсцеси мозку, ураження сечових шляхів, жовчних шляхів, шлунково-кишкового тракту, дихальних шляхів, ЛОР-органів, слизових оболонок, шкірних покривів та ін.

Екзогенна суперінфекція (у результаті вторинного інфікування) може бути обумовлена тим самим видом мікроорганізму, який викликав основний патологічний процес, але з іншим ступенем чутливості до дії антибіотиків, а також новим видом збудника. Це явище спостерігається при лікуванні дифтерії, пневмонії, туберкульозу, скарлатини та може слугувати джерелом нових ускладнень у даного хворого.

Екзогенна інфекція передається повітряним шляхом чи шляхом безпосереднього контакту. Джерелом інфекції слугує носоглотка хворих та персоналу, повітря приміщень, медичні інструменти тощо.

Кандидози - це група суперінфекцій, до якої відносять захворювання, що викликаються дріжджоподібними грибами роду *Candida*. Антибіотикотерапія (особливо використання препаратів широкого спектру дії) порушує звичайне співвідношення між різними представниками нормальної мікрофлори (пригнічує ріст бактерій та посилює розмноження дріжджоподібних грибів) та сприяє активації *Candida* та їх розповсюдженню у хворих, що знесилені.

У відповідності до класифікації А. Н. Аравійського визначають наступні основні форми кандидозів:

- кандидози зовнішніх покривів: ураження шкіри, ураження придатків шкіри, ураження слизової оболонки (ротової порожнини, слизових оболонок зовнішніх статевих органів);
- вісцеральні, системні кандидози: дихальних шляхів, шлунково-кишкового тракту, сечостатевої системи, м'язової системи, кісткової системи, серцево-судинної системи, нервової системи, системні захворювання органів;

- розповсюджені та локальні левуриди;
- кандідозні ускладнення.

До кандідозів частіше за все схильні немовлята, що не володіють достатньо розвиненими захисними реакціями організму, а також послаблені хворі з сильними порушеннями обміну речовин.

При антибіотикотерапії деяких інфекцій можливі своєрідні ускладнення, що пов'язані зі швидким руйнуванням мікроорганізмів та вивільненням великої кількості ендотоксинів. Це пов'язано з розвитком бактеріоліза або реакції Яриша - Герксгеймера. Ці явища спостерігаються звичайно на початку антибіотикотерапії при введенні великих доз бактерицидних та бактеріостатичних антибіотиків.

Вони розвиваються швидко, починаються з ознобу, лихоманки, тахікардії, великого потовиділення, діареї. У важких випадках відмічають зниження температури, колапс, втрата свідомості, анурія, при відсутності лікування може наступити смерть. Симптоми реакції бактеріоліза нагадують явища, що спостерігаються при ендотоксичному шоці.

Утворення ендотоксинів можливо для наступних збудників інфекційних захворювань: сальмонел, шигел, бруцел, кишковою палички, протей, спірохет, мікобактерій, збудника коклюшу.

Антибіотикотерапія також може вплинути і на вітамінний обмін. Дія деяких антибіотиків на обмін вітамінів носить непрямий характер, вона є наслідком припинення синтезу вітамінів кишкової мікрофлори при її пригніченні, порушення всмоктування вітамінів, що поступають з їжею, пригнічення утворення проміжних продуктів, що приймають участь у синтезі вітамінів.

У багатьох випадках при антибіотикотерапії спостерігається клінічна картина, пов'язана з нехваткою в організмі хворого певних вітамінів та проявляється у пригніченні загального стану, анорексією, у раженням шкіри, слизових ротових оболонок, шлунково-кишкового тракту, невротичними розладами.

Антибіотикотерапія робить суттєвий вплив на взаємовідношення макро- та мікроорганізмів протягом інфекційного процесу. При ранньому початку лікування (особливо бактерицидними антибіотиками) відбувається швидке вивільнення

організму хворого від збудника інфекції. Результатом цього частіше за все є одуження, яке може наступити навіть при відсутності умов та часу для формування специфічного клітинного чи гуморального імунітету. Однак (особливо при використанні бактеріостатичних антибіотиків) можливе і неповне вивільнення організму від збудника. Під впливом суббактеріостатичних концентрацій антибіотиків зменшується антигенне подразнення та знижується імунізуюча активність збудника. Наслідком недостатньої напруженості імунітету є виникнення рецидивів та вторинних інфекцій, що особливо характерно для протікання скарлатини, бруцельозу.

Деякі побічні явища, що розвиваються у процесі антибіотикотерапії, можуть бути викликані одночасно рядом факторів. Крім алергічних та токсичних реакцій, у генезі цих ускладнень грає роль пригнічення нормальної мікрофлори кишечника, суперінфекція стійкими штамми мікроорганізмів. Протікання таких реакцій ускладнюється у ряді випадків індивідуальними особливостями хворого, супроводжуваними захворюваннями, хірургічним втручанням, виснаженням.

Прикладом подібних реакцій може бути одно з найбільш важких ускладнень антибіотикотерапії - стафілококові ентероколіти [102].

5.5. Висновки до розділу

1. Антибіотичні препарати - це лікарські засоби, які використовують для знищення в організмі людини чужерідних клітин - збудників інфекційних та паразитичних захворювань (бактерій, найпростіших, грибків, глистів). Це досягається завдяки таким властивостям антибіотиків як вибірковість дії та висока біологічна активність.

2. Всі антибіотики небезпечні для організму людини. Негативна сторона антибіотикотерапії полягає у побічних реакціях та ускладненнях, які викликані дією антибіотиків, а саме: алергічні явища, токсичні ускладнення, реакції загострення, різні форми дисбактеріозу, суперінфекції, порушення вітамінного обміну. Небезпечні

наслідки прийому антибіотиків найчастіше виникають після багатоденного регулярного їх прийому.

3. Алергічні явища пов'язані зі здатністю антибіотиків сенсебілізувати організм хворого; у 10% хворих, що пройшли курс антибіотикотерапії розвиваються алергічні реакції різного ступеню тяжкості.

4. Антибіотичні препарати можуть викликати токсичні явища у хворого. Токсичні реакції обумовлені антибіотичною речовиною, супроводжуваними домішками, а також продуктами розпаду антибіотиків в організмі. Вираженість токсичних реакцій знаходиться у прямій залежності від кількості антибіотика, що використовується при лікуванні.

5. Небезпечною для організму людини є комбінована антибіотикотерапія, яка призводить до порушення нормальної мікрофлори кишечника людини, викликаючи розвиток дисбактеріозу та суперінфекції.

6. Для зменшення негативного впливу антибіотичних препаратів на організм людини рекомендовано проведення раціональної антибіотикотерапії, внесенню своєчасних корективів у схему лікування інфекційних хвороб внаслідок індивідуальної чутливості хворого до антибіотиків та призначення пробіотичних препаратів після закінчення лікування.

ВИСНОВКИ

1. В дипломній роботі проведений порівняльний аналіз технологій отримання протівірусних препаратів («Арбівір», лейкоцитарний інтерферон, протівірусної вакцини, протівірусні препарати рослинного походження).

2. Встановлено, що протівірусні вакцини використовуються для профілактики захворювання вірусних інфекцій, лейкоцитарний інтерферон використовується в перші дні захворювання на вірус, протівірусні фітопрепарати протягом 21 доби, «Арбівір» протягом 5 днів.

3. Досліджено цитотоксичну дію Арбівіру на культуру клітин та визначено, що 50 мкг/мл є максимально допустимою концентрацією (МДК) Арбівіру для даної культури клітин.

4. Доведено протівірусну активність Арбівіру щодо коронавірусу у системі *in vitro*. Встановлено, що препарат «Арбівір» пригнічує репродукцію вірусу у концентрації МДК (50 мкг/мл) на 98,7% та у концентрації $\frac{1}{2}$ МДК (25 мкг/мл) на 95,2%. Рекомендовано використовувати протівірусні препарати в залежності від вірусного захворювання.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Харіна А.В. Вступ до хіміотерапії вірусних інфекцій / А.В. Харіна, І.Г. Будзанівська, П.В. Поліщук. – К.: Фітосоціоцентр, 2003. – 144 с.
2. Юлиш Е.И. Персистирующие инфекции и человек. Стратегия взаимоотношений / Е. И. Юлиш // Здоровье ребенка. – 2009. – № 4. – С. 11-18.
3. Юлиш Е.И. Противовирусные средства в лечении и профилактике острых респираторных заболеваний у детей / Е.И. Юлиш, Б.И. Кривуцев // Здоровье ребенка. – 2009. – № 5. – С. 90-94.
4. Клестова З.С. Методичні рекомендації з визначення та контролю антивірусних властивостей речовин в системі *in vitro* / З. С. Клестова, О. С. Зоз. – К.: Центр інформаційних технологій, 2010. – 32 с.
5. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г. Н. Дранник. – К.: Полиграф – Плюс, 2006. – 481 с.
6. Хоменко А.И. Антибиотики: химиотерапия инфекционных заболеваний / А.И. Хоменко, С.К. Шадурская. - Ростов-на-Дону: «Феникс», 2002. – 192 с.
7. Кайдишев І. П. Методи клінічних та експериментальних досліджень у медицині / І. П. Кайдишев. – Полтава: Полимет, 2003. – 319 с.
8. Посібник з хіміотерапії вірусних інфекцій: навчально-методичний посібник для лікарів / [Дзюблик І.В., Дяченко Н.С., Носач Н.Н., Рибалко С.Л., Щербинська А.Н.]. – К., 2004. – 176 с.
9. Шлопов В.Г. Грип А (H1N1), «Свинячий грип»: пандемія / В.Г. Шлопов, В.Д. Казаков. - Донецьк: «Каштан», 2009. – 199 с.
10. Васильєв К.Г. Еволюція заразних хвороб людини: еволюція чи закономірність? / К.Г. Васильєв, О.В. Лопушенко, А.І. Гоженко // Інфекційні хвороби. – 2005. – № 5. – С. 68-70.
11. Sepkowitz K.A. AIDS - the first 20 years / K.A. Sepkowitz // The New England Journal of Medicine. – 2001. – № 23. – P. 1764-1772.

12. Kallings L. O. The first postmodern pandemic: 25 years of HIV/AIDS // *Journal of Internal Medicine*. – 2008. – № 263. – P. 218-243.

13. Громадський нагляд за державною політикою з ВІЛ/СНІД в Україні: цикл звітів про політику у сфері ВІЛ/СНІД у В'єтнамі, Нікурагуа, Сполучених Штатах Америки й України [Public Health Watch, Інститут відкритого суспільства]. –К., Київська типографія Міжнародний центр перспективних досліджень, 2007. – 63 с.

14. Malkin J.-E. The continuing spread of HSV-infection. *Worldwide epidemiology / J.-E. Malkin // Herpes*. – 2005. – V. 12, № 3. – P. 77-79.

15. Панченко Л.А. Возбудители герпесвирусных инфекций и наиболее важные клинические проявления у человека / Л.А. Панченко, И.И. Кириченко, Л.А. Хомак // *Провизор*. – 1999. – № 10. – С. 28-29.

16. Исаков В.А. Герпесвирусные инфекции человека. / В.А. Исаков, Е.И. Архипова, Д.В. Исаков - Санкт-Петербург: СпецЛит, 2006. – 304 с.

17. Казанцев А.Л. Справочник по инфекционным болезням / А.Л. Казанцев, В.С. Матковский - Кишинев: Картя Молдовеняска, 1989. – 320 с.

18. Fang M.J. New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy: a prospective multicenter study of 359 cases / M.J. Fang, M. Fine, J. Orloff // *Medicine*. – 1990. – № 69. – P. 307-316.

19. Жданов В.М. Заразные болезни человека / В.М. Жданов. – М.: Медицина, 1953. – 464 с.

20. Мажуль Л.А. Бокавирус человека / Л.А. Мажуль, Е.И. Исаева, В.И. Злобин, С.О. Вязов // *Вопросы вирусологии*. – 2009. – № 3. – С. 4-7.

21. Андрейчин М.А. Нові етіологічні форми інфекційних хвороб / М.А. Андрейчин // *Інфекційні хвороби*. – 2005. – № 1. – С. 59-70.

22. Васильев К.Г. История эпидемий и борьба с ними в России в XX столетии / К.Г. Васильев. – М.: Медицина, 2001. – 256 с.

23. Тартаковский И.С. Современные подходы к диагностике атипичных пневмоний / И.С. Тартаковский // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2000. – № 1. – С. 60-68.

24. Niederman M.S. Guidelines for the management of adults with community - acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention. / M.S. Niederman, L.A. Mandell, A. Anzueto et al. // *Respiratory critical care medicine*. – 2001. – № 163. – P. 1730-1754.

25. Белов А.Б. Зоонозный (птичий) грипп. Прогнозы пандемии и реальность / А.Б. Белов // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2008. – № 1. – С. 90-95.

26. Львов Д.К. Популяционные взаимодействия в биологической системе: вирус гриппа А - дикие и домашние животные - человек; причины и последствия проникновения на территорию России высокопатогенного вируса гриппа А/Н5N1 / Д.К. Львов // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2006. – № 3. – С. 96-100.

27. Варич Н.Л. Дифференцированное включение геномных сегментов в состав реассортантов вируса гриппа А при смешанной инфекции / Н.Л. Варич, А.К. Гительман, А.А. Шилов // *Вопросы вирусологии*. – 2009. – № 1. – С. 24-28.

28. Зайцев А.А. Грипп: диагностика и лечение / А.А. Зайцев, А.И. Синопальников // *Русский медицинский журнал*. – 2008. – № 22. – С. 1494-1502.

29. Казаков В.М. Грипп А (H1N1) 2009. / В.М. Казаков. – К.: Медицина, 2009. – 133 с.

30. Bose M.E. Rapid semiautomated subtyping of influenza virus species during the 2009 swine origin influenza A H1N1 virus epidemic in Milwaukee, Wisconsin. / M.E. Bose, E.T. Beck, N. Ledeboer // *Clinical microbiology*. – 2009. – № 47. – P. 79-86.

31. Макаров В.В. Международная классификация заразных болезней животных / В.В. Макаров // *Ветеринарный консультант*. – 2009. – № 19. – С. 3-7.

32. Мороз Д.С. Африканская чума свиней: трансконтинентальное заболевание / Д.С. Мороз // *Здоров'я тварин і ліки*. – 2010. – № 2. – С. 24- 25.

33. Попов В.И. Классическая чума свиней / В.И. Попов // *Ветеринарная энциклопедия*. – 1972. – № 3. – С. 409-416.

34. Шабанов А.Н. Довідник фельдшера / А.Н. Шабанов - М.: Медицина, 1984. – 560 с.

35. Чіпко М.І. Боротися зі сказом за європейською методою / М.І. Чіпко // *Ветеринарна медицина України*. – 2010. – № 8. – С. 8-9.

36. Яткевич Г.І. Боротьба зі сказом - справа державної ваги / Г.І. Яткевич // Ветеринарна медицина. – 2010. – № 7. – С. 38-39.
37. Калініна О. С. Ветеринарна вірусологія: [підруч. для студентів вищ. навч. закл.] / Калініна О. С., Панікар І. І., Скибіцький В. Г. - К.: Вища освіта, 2004. – 344 с.
38. Архипов Н.И. Патологоанатомическая диагностика вирусных болезней животных / Архипов Н.И., Н.И. Чевелев С.Ф. Брагин – М.: Агропромиздат, 1984. – 176 с.
39. Мейхи Б. Вирусология. Методы. / Б. Мейхи. – М.: Мир, 1988. – 344 с.
40. Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses eigh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses / [С. М. Fauquet, M. A. Mayo and oth.]. – California: Elsevier academic press, 2005. – 1259 p.
41. Воробьев А.А. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: [учебное пособие для студ. мед. Вузов] / А.А. Воробьев, А.С. Быков - М.: Медицинское информационное агенство, 2003. – 340 с.
42. Сюрин В.Н. Ветеринарная вирусология / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина – М.: Колос, 1984. – 376 с.
43. Вирусология: в 3 т. Ч. 3 / [Холмс К.Б., Ливингстон Д.М., Бикел И. и др.]; под ред. Б. Филдса, Д. Найла. – М.: Мир, 1989. – 452 с.
44. Клестова З.С. Культивування герпесвірусів у біологічних системах / Клестова З.С., Школьна Н.М., Зоз О.С // Бюллетень «Ветеринарна біотехнологія». - 2010. – № 17. – С. 94-105.
45. Вирусные болезни животных / [Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н. В.] - М.: ВНИТИБП, 1998. – 928 с.
46. Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы / Р. Фрешни. – М.: Мир, 1989. – 506 с.
47. Калініна О.С. Ветеринарна вірусологія: підручник / О.С. Калініна, І.І. Панікар. – К.: Вища освіта, 2004. – 432 с.
48. Коваленко А.Л. Иммуный ответ при вирусных инфекциях: Руководство для врачей / А.Л. Коваленко, С.Ю. Голубев. – Санкт-Петербург: Калининградский государственный университет, 1998. – 68 с.

49. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков / Р. Адамс. – М.: Мир, 1983. – 263 с.
50. Лефковитс И. Методы исследований в иммунологии / И. Лефковитс, Б. Пернис – М.: Мир, 1981. – 380 с.
51. Сергеев В.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии / В.А. Сергеев, Ю.А. Собко. – К.: Урожай, 1990. – 157 с.
52. Исаков В.А. Герпесвирусные инфекции человека / В.А. Исаков, Е.И. Архипова, Д.В. Исаков. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2006. – 304 с.
53. Орлов В.Д. Медицинская химия / В.Д. Орлов, В.В. Липсон, В.В. Иванов. – Харьков: Фолио, 2005. – 402 с.
54. Фармакология / Под ред. Р.Н. Аляутдина. – [2-е изд., испр.] – М.: ГЭОТАР – МЕД, 2004. – 592 с.
55. Противовирусные средства / [Ершов Ф.И., Голубев С.Ю., Коваленко А.Л., Ариненко Р.Ю.]. – Санкт-Петербург: Время, 1996. – 239 с.
56. Страчупский Л.С. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Л.С. Страчупский, Ю.Б. Белоусов, С.Н. Козлов. – М.: НИИАХ СГМА, 2002. – 586 с.
57. Ершов Ф.И. Антивирусные препараты / Ф.И. Ершов. - М.: Медицина, 1998. – 192 с.
58. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / О.К. Поздеев, В.И. Покровский. – М.: ГЭОТАР-Медицина, 1999. – 120 с.
59. Гирін В.М. Посібник з медичної вірусології / В.М. Гирін. - К.: Здоров'я, 1995. – 368 с.
60. Харіна А.В. Вступ до хіміотерапії вірусних інфекцій / А.В. Харіна, І.Г. Будзанівська, П.В. Поліщук. – К.: Фітосоціоцентр, 2003. – 144 с.
61. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак: пер. с англ. Н.В. Баскакова, О.А. Колесникова и др. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
62. Доклінічні дослідження лікарських засобів. / [Щербинська А. М., Дяченко Н. С., Рибалко С. Л. та ін.] ; под ред. К. І. Стафанова. – К.: Вища освіта, 2001. – 136 с.

63. Боренко Е.И. Изменение чувствительности вируса гриппа размножившегося в присутствии ремантадина, к противовирусным препаратам / Е.И. Боренко, Н.И. Павлова, В.И. Вотяков // Вопросы вирусологии. – 1999. – № 3. – С. 115-119.
64. Вотяков В.И. Первичное изучение антивирусных свойств синтетических и природных соединений / В.И. Вотяков, Г.А. Галегов, Е.И. Боренко. – Минск: Наука, 1986. – 106 с.
65. Чижов Н.П. Схема первичного отбора противовирусных препаратов / Н.П. Чижов, Ф.С. Носков // Молекулярная биология вирусов, химиотерапия и химиопрофилактика вирусных инфекций. – Минск, 1974. – С. 217-219.
66. Ленева И.А. Использование иммуноферментного анализа для изучения действия противовирусных препаратов на репродукцию респираторно-синцитиального вируса / И.А. Ленева, М.Б. Соколова, И.Т. Федякина и др. // Вопросы вирусологии. – 2002. – №2. – С. 25-30.
67. Вотяков В.И. Методические вопросы научной разработки противовирусных средств / В.И. Вотяков. – Минск, 1977.
68. Kinchington D. Antiviral methods and protocols / D. Kinchington, R.F. Schinazi. – NJ: Humana Press, 2005. – 381 p.
69. Harmenberg J. Influence of Cell Culture Conditions on the Inhibition of Herpes Simplex Virus Type 1 Replication by Acyclovir / J. Harmenberg, B. Wahren. // Intervirology. – 1982. – № 4. – P. 215-221.
70. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией члена-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. – [2-изд., перераб. и доп.] – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
71. Хамитов Р.А. Противовирусная активность арбидола и его производных в отношении возбудителя тяжелого острого респираторного синдрома в культурах клеток / Р.А. Хамитов, С.Я. Логинова, В.Н. Щукина и др. // Вопросы вирусологии. – 2008. – № 3. – С. 9-13.
72. Глушков Р.Г. Молекулярно-биологические особенности действия арбидола – нового противовирусного препарата / Р.Г. Глушков, Н.К. Фадеева, И.А. Ленева и др // Химико-фармацевтический журнал. – 1992. – № 2. – С. 8-15.

73. Глушков Р.Г Арбидол – новый отечественный иммуномодулятор (обзор) / Р.Г. Глушков, Т.А. Гуськова // Новые лекарственные препараты. – 1994. – № 1. – С. 9-31.

74. Гагаринова В.М. Новый химиопрепарат арбидол: профилактическая эффективность во время эпидемий гриппа / В.М. Гагаринова, Г.С. Игнатьева, Л.В. Синицкая и др. // Журнал микробиологии. – 1993. – № 5. – С. 40-43.

75. Селькова Е.П. Профилактическая и лечебная эффективность Арбидола / Е.П. Селькова, Т.А.Семененко // Эпидемиология и вакцинация. – 2005. – №4. – С. 17-24.

76. Амарян М.П. Изучение иммуномодулирующей активности арбидола / М.П. Амарян, Т.П. Готвянская, И.Ю. Грачева и др. // Русский медицинский журнал: независимое издание для практикующих врачей. – 2001. – Т. 9. – № 16-17. – С. 728-731.

77. Irina A. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol / A. Irina, A. Leneva, J. Rupert, C. Russell // Antiviral Research. – 2009. – № 81. – 132-140.

78. Учайкин В.Ф. Противовирусный препарат Арбидол как перспектива этиотропной терапии ротавирусной инфекции у детей / В.Ф. Учайкин, А.А. Новокшенов // Детские инфекции. – 2004 – № 8. – С. 34-39.

79. Львов Д.К. Действие *in vitro* противовирусных препаратов на репродукцию высокопатогенных штаммов вируса гриппа *A/H5N1*, вызвавших эпизоотию среди домашних птиц летом 2005 г. / Д.К. Львов, И.Т. Федякина // Вопросы вирусологии. – 2006. – № 2. – С. 12-18.

80. Пат. 2256451 Российская Федерация, МПК А 61 К 31/404, А 61 Р31/14. Лекарственное средство для лечения атипичной пневмонии / Глушков Р.Г., Максимов В.А., Мартыанов В.А., Хамитов Р.А., Шустер А.М.; патентообладатель ЗАО «Мастерлек». – № 2004111871/15 ; заявл. 21.04.2004 ; опубл. 20.07.2005, Бюл. № 20.

81. Клестова З.С. Теоретичне та експериментальне обґрунтування контролю геному клітин при вірусних інфекціях тварин та в процесі розробки засобів їх специфічної профілактики: дис. на здобуття н. ст. доктора вет. наук : 16.00.03 «ветеринарна мікробіологія та вірусологія» / Клестова З. С. – К., 2006. - 350 с.

82. Євтушенко О.І. Особливості патогенезу експериментальної внутрішньоутробної ентеровірусної інфекції / О.І. Євтушенко // Інфекційні хвороби. – 2005. – № 1. – С. 56-59.
83. Козлов В.Г. Цитотоксические свойства кроличьих энтеровирусных диагностических сывороток. Особенности и локализация / В.Г. Козлов, Е.Г. Викторова, П.А. Набатников // Вопросы вирусологии. – 2009. – № 1. – С. 22-27.
84. Оганесян О.Т. Вірусні інфекції і внутрішньоутробна патологія / О.Т. Оганесян, В.В. Ритова, В.В. Чеботарьов // Вопросы вирусологии. – 1969. – № 6. – С. 47 - 53.
85. Панікар І.І. Практикум з ветеринарної вірусології / І.І. Панікар, В.Г. Скибицький, О.С. Калініна. – Суми: Вища освіта, 1997. – 208 с.
86. Жуковский А.Н. Культивирование перевиваемых линий культур клеток СПЭВ-М, ПСП, КЩС, КТП: Методические рекомендации / А.Н. Жуковский, А.А. Кучерявенко. – Киев, 1987. – 26 с.
87. Троценко Н.И. Практикум по ветеринарной вирусологии / Н.И. Троценко, Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская. – М.: Колос, 1999. – 280 с.
88. Панікар І.І. Практикум з ветеринарної вірусології / І.І. Панікар. – Суми: Козацький вал, 1997. – 320 с.
89. Лярски З. Диагностика вирусных болезней животных / З. Лярски. – М.: Колос, 1980. – 400 с.
90. Вотяков В.И. Методические вопросы научной разработки противовирусных средств / В.И. Вотяков. – Минск, 1977. – 79 с.
91. Жидецький В.Ц. Основи охорони праці : [підруч. для студ. вищ. навч. закл.] / Жидецький В.Ц.; Міністерство освіти і науки України. Науково-методичний центр вищої освіти; Українська академія друкарства. – [3-є вид., перероб. та доп.] – Л.: Українська академія друкарства, 2006. – 336 с.
92. Основи охорони праці : [підручник] / [Ткачук К.Н., Халімовський М.О., Запарний В.В. та ін.] ; під ред. Ткачука К. Н. та Халімовського М. О. - [2-ге вид., допов. та перероб.] – К.: Основа, 2006. – 448 с.
93. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю : ДСП 9.9.5.-080-2002. – Офіц. вид. – К.:

ГРІФРЕ : М-во охорони здоров'я України, 2002. – 33 с. – (Державні санітарні правила та норми, гігієнічні нормативи).

94. Барановський В.А. Екологічна географія і екологічна картографія / Барановський В. А. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 252 с.

95. Грищук М.В. Основи охорони праці: [підручник] / Грищук М.В. – К.: Кондор, 2005. – 238 с.

96. Захаров Л.Н. Техника безопасности в химических лабораториях / Захаров Л.Н. – [2-е изд., перераб. и доп.] – Л.: Химия, 1991. – 336 с.

97. Желібо Є.П. Безпека життєдіяльності: [навч. посібник] / Желібо Є.П., Заверуха Н.М., Зацарний В.В. – 4-те вид. – К.: Каравела, 2005. – 344 с.

98. Гандзюк М.П. Основи охорони праці: [підруч. для студ. вищих навч. закл.] / М.П. Гандзюк, І.П. Іващенко. – К.: Вища освіта, 2001. – 356 с.

99. Промышленная микробиология : [уч. пособие для вузов по спец. «Биология» и «Микробиология»] / [З.А. Аркадьева, А.М. Безбородов, И.Н. Блохина и др.] ; под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высшая школа, 1989. – 489 с.

100. Хоменко А.И. Антибиотики: химиотерапия инфекционных заболеваний / А.И. Хоменко, С.К. Шадурская. – Ростов-на-Дону: «Феникс», 2002. – 192 с.

101. Стейниер Р. Мир микробов. / Р.Стейниер., Дж. Ингрэн. - М.: Мир, 1979. – 512 с.

102. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров - М.: Высшая школа, 1986. – 448 с.

103. Беккер М.В. Введение в биотехнологию / М.В. Беккер – М.: Пищевая промышленность, 1978. – 240 с.

104. Ходош Э.М. Очерки по клинической антибиотикотерапии: история, происхождение, природа и действие / Э.М. Ходош – Х.: Майдан, 2003. – 304с.

105. The world health report 2000: health systems: improving performance. - Geneva: WHO, 2000. – 320 p.

106. Западню В.Г. Фармакологія з рецептурою / В.Г. Западню, М.О. Гарбарець – К.: Вища школа, 1989. – 360 с.

107. Березняков И.Г. Резистентность микробов к антибиотикам. / И.Г. Березняков // Клиническая антибиотикотерапия. – 1999. – № 1. – С. 27-31.

108. Скакун М.П. Основы фармакологии с рецептурой: [підруч. для студ. мед. вузів] / М.П. Скакун, К.А. Посохова. – Тернопіль: Укрмедичина, 1999. – 508 с.
109. Катцунг Бертрам Г. Базисная и клиническая фармакология / Бертрам Г. Катцунг. – Санкт-Петербург: Диалект, 2007. – 648 с.
110. Березняков И.Г. Инфекции и антибиотики. / И.Г. Березняков. – Харьков: Константа, 2004. – 448 с.
111. Навашин С.М. Рациональная антибиотикотерапия / С.М. Навашин, И.П. Фомина – М.: Медицина, 1982. – 496 с.
112. Абдуллин И.М. Антибиотики в клинической практике / И.М. Абдуллин, Д.К. Баширова, А.В. Кузнецова, А. А. Визель. – Казань, ГП «Саламат», 1997. – 304 с.
113. Посохова К.А. Мікробіологічні та інші фармакологічні основи раціонального застосування антибіотиків: [посібник для студ. та викл. вищ. навч. закл. та лікарів] / К.А. Похосова, С.І. Клімнюк. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2005. – 131 с.
114. Березняков И.Г. Внутрибольничные инфекции. Лекция для врачей / И.Г. Березняков. – Харьков: Константа, 2001. – 103 с.
115. Яковлев С.В. Стратегия применения антибиотиков в стационаре. / С.В. Яковлев // Клиническая антибиотикотерапия. – 2001. – № 5 – 6. – С. 3-10.
116. Сиплый В.А. Антибиотики и антибактериальная терапия в хирургии / В.А. Сиплый, А.И. Дронов, Е.В. Конь, Д.В. Евтушенко. – К.: Вища школа, 2006. – 100 с.