

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Зав. кафедри професор Будзанівська І. Г.

Протокол № _____ засідання кафедри

Від «__» _____ 2025 р.

**АНТИАДЕНОВІРУСНА ДІЯ СПИРТОВИХ ВИТЯЖОК З РОСЛИН
ЧОРНОБРИВЦІВ (TAGETES)**

Випускна кваліфікаційна робота
магістра денної форми навчання за
спеціальністю 091 «Біологія та Біохімія»
Герасименко Арсенія Сергійовича

Науковий керівник від кафедри
д.б.н., проф. Будзанівська І.Г.

Робота виконана на базі відділу репродукції вірусів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного під керівництвом старшого наукового співробітника, кандидата біологічних наук Повниці Ольги Юріївни

Оцінка захисту роботи

Київ - 2025 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

hAdV	Аденовірус людини;
hAdV-2	аденовірус людини, тип 2;
ЦПД	цитопатична дія;
ЕТС	ембріональна сироватка теляти;
МТТ	3-(4-5 диметилтриазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум бромід;
CC ₅₀	цитотоксична концентрація речовини, що зменшує життєздатність клітин на 50% ;
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота;
ЦПЕ	цитопатичний ефект
ТЦД ₅₀	50% тканинна цитопатична доза

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	2
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Аденовіруси та їхній вплив на організм людини	7
1.2. Огляд сучасних антиаденовірусних препаратів	14
1.3. Антивірусна активність біологічно активних речовин природного походження.....	16
1.4. Витяжки з чорнобривців (<i>Tagetes</i>) та їх властивості.....	19
1.5. Біологічно активні речовини витяжок чорнобривців.....	21
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	24
2.1. Вірус.....	24
2.2. Культура клітин	24
2.3. Досліджувані витяжки рослин чорнобривців	25
2.4. Підготовка витяжок до дослідження	27
2.5. Визначення цитотоксичної дії витяжок за кількістю живих клітин колориметричним методом з використанням МТТ	28
2.6. Дослідження протиаденовірусної дії витяжок за профілактичною схемою внесення	30
2.7. Дослідження противірусної дії витяжок за терапевтичною схемою внесення.....	32
2.10. Статистична обробка результатів.....	38
2.11. Фотодокументація результатів досліджень	39
РОЗДІЛ 3 ЦИТОТОКСИЧНА ДІЯ ТА АНТИАДЕНОВІРУСНА АКТИВНІСТЬ ВИТЯЖОК.....	40
3.1. Цитотоксична дія витяжок чорнобривців	40

3.2. Антивірусна активність витяжок чорнобривців	46
3.4. Аналіз результатів титрування зразків відібраних при терапевтичному застосуванню витяжок чорнобривців.	50
3.5. Аналіз результатів титрування зразків відібраних при профілактичному застосуванню витяжок чорнобривців.	52
3.6. Аналіз віруліцидної дії витяжок чорнобривців	54
ВИСНОВКИ	57
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	58

ВСТУП

Аденовіруси людини (HAdVs) — це ДНК вмісні віруси, які зазвичай викликають легкі інфекції з ураженням верхніх або нижніх дихальних шляхів, шлунково-кишкового тракту або кон'юнктиви. Рідкісні прояви HAdV-інфекції включають геморагічний цистит, гепатит, геморагічний коліт, панкреатит, нефрит або менінгоенцефаліт. Інфекції HAdV частіше зустрічаються у дітей раннього віку, внаслідок відсутності гуморального імунітету. Можливі епідемії інфекції у здорових дітей або дорослих у закритих або багатолюдних приміщеннях (особливо військових). Хвороба протікає важче, і дисемінація більш імовірна у пацієнтів з порушеннями імунітету (наприклад, реципієнти трансплантованих органів, інфекція вірусу імунодефіциту людини). Летальність від важкої пневмонії HAdV або дисемінованого захворювання може перевищувати 50%. Ідентифіковано більше 100 типів HAdV. Різні типи виявляють різний тканинний тропізм, що корелює з клінічними проявами інфекції. Переважаючі типи, що циркулюють у певний час, відрізняються в різних країнах або регіонах і змінюватися з часом. Може відбуватись передача нових штамів між країнами або між континентами та заміна домінуючих вірусів новими штамми. Лікування аденовірусної інфекції є суперечливим, на сьогодні цидофовір є препаратом вибору для важких інфекцій HAdV. Високоєфективні живі пероральні вакцини для зниження ризику респіраторної інфекції HAdV і регулярно використовуються в армії Сполучених Штатів, але наразі недоступні для цивільних громадян [1]. Проблема антиаденовірусної терапії полягає не лише в невеликій кількості препаратів, представлених на світовому ринку, але й у відсутності сполук із сильною антиаденовірусною дією на стадії розробки [2, 3].

Останні дослідження засвідчують значний потенціал біологічно активних речовин рослин у розробці нових противірусних засобів [4]. Зокрема, представники роду *Tagetes* (чорнобривці) відомі своїм багатим хімічним

складом, що включає флавоноїди, терпеноїди та ефірні олії, які мають антимікробну, протизапальну та противірусну дію [5,6].

У зв'язку з цим дослідження антиаденовірусної активності спиртових витяжок з чорнобривців є важливим напрямом сучасної фармакогнозії та вірусології. Робота спрямована на оцінку ефективності таких витяжок проти аденовірусів, що може стати основою для розробки нових противірусних засобів на основі природних сполук.

Тому метою моєї роботи було дослідження антивірусної та віруліцидної дії спиртової витяжок чорнобривців відносно аденовірусу серотипу 2.

Для досягнення поставленої мети вирішувалися наступні завдання:

1. Отримати спиртові витяжки з чорнобривців різних видів.
2. Вивчити вплив витяжок чорнобривців на культуру клітин, чутливу до аденовірусу серотипу 2.
3. Визначити антивірусну активність витяжок чорнобривців відносно аденовірусу.
4. Проаналізувати титри зразків вірусних матеріалів відібраних при терапевтичному та профілактичному застосуванню витяжок чорнобривців.
5. Дослідити віруліцидну активність спиртових витяжок чорнобривців відносно аденовірусу.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Аденовіруси та їхній вплив на організм людини

Аденовіруси – це дволанцюгові ДНК-вмісні віруси, які не мають зовнішньої ліпопротеїдної оболонки [7]. Генетичний матеріал представлений лінійною дволанцюжковою ДНК, оточеною ікосаедричним капсидом діаметром 90-100 нм, що містить три основні капсидні білки: гексон, білок основи пентону та фібрили, а також вісім ядерних і цементних білків.

Згідно систематики Міжнародного комітету з класифікації вірусів ICTV, належать до родини *Adenoviridae* (включає 5 родів). Лише один із них, *Mastadenovirus*, містить види, патогенні для людини. На сьогодні понад 100 типів роду *Mastadenovirus*, містить види, патогенні для людини, визначені за допомогою біоінформативного аналізу повних геномних послідовностей та позначені послідовними номерами у порядку відкриття (52, 53, 54, тощо), описані та класифіковані в межах 7 видів (HAdV-A до HAdV-G [7]). Види А, В, С, D, Е і F циркують по всьому світу і причетні до спалахів інфекції у людей. Різні типи геному (або геномні варіанти) можна виділити в межах одного серотипу за допомогою рестриктазного аналізу геномної ДНК. Приблизно одна третина описаних серотипів пов'язані із захворюваннями людини. Різні серотипи демонструють різні тканинні тропізми, які корелюють з клінічними проявами інфекції [8]. До 70% людей в Європі та Північній Америці є серопозитивними до аденовірусів. Аденовіруси є частою причиною сезонних респіраторних інфекцій. Серед них найважчий перебіг мають епідемічні кератокон'юктивіти, найчастіше серед дітей. Значно рідше фіксуються такі захворювання як вірусні гастроентерити, особливо у дітей [9], геморагічні цистити, в рідкісних випадках гепатити, міокардити, менінгоенцефаліти та нефрити [9]. Такий особливо тяжкий перебіг аденовірусних захворювань спостерігається у людей із імуносупресивними станами: спадковими чи набутими [10]. Це люди зі спадковим імунодефіцитом; пацієнти, які

приймають імуносупресивну терапію після трансплантації органів; ВІЛ-позитивні особи. Для дітей із вищезазначених груп смертність складає 83% [11]. Як бачимо, розробка специфічних антиаденовірусних препаратів, особливо для дітей та людей з імуносупресивними станами, є актуальною проблематикою.

Гексон є найбільшим і найпоширенішим білком у структурі капсиду (приблизно 100 кДа). Він взаємодіє з пентонними білками, утворюючи зв'язки з корецепторами у кожному з 12 вершин ікосаедра, від яких відходять тримерні фібрили. Довжина цих фібрил значно варіюється залежно від належності до одного з семи видів HAdV і завершується специфічною рецептор-зв'язуючою доменною ділянкою. Повністю сформовані віріони HAdV мають ікосаедричну форму з розмірами 70-90 нм. Капсид складається з 252 білкових структурних одиниць, з яких 240 – це гексони, а 12 – пентони, розташовані на вершинах ікосаедра. Від цих вершин відходять фібрили довжиною від 9 до 77,5 нм, залежно від типу вірусу [13].

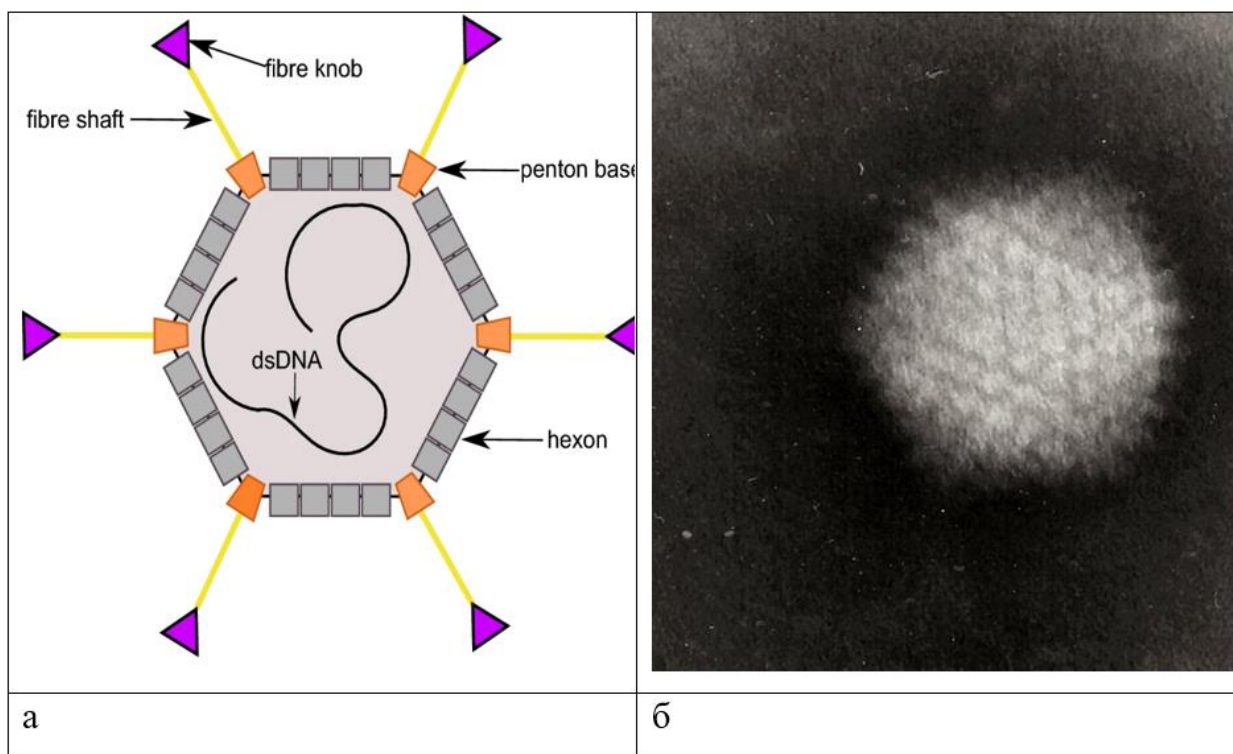


Рис. 1.1. Схема будови капсиду аденовірусу (а) та електронна мікрофотографія аденовірусу (б) [14, 15]

Транскрипція локалізується у ядрі і відбувається у дві фази: спершу синтез ранніх, а тоді пізніх білків. Гени ранніх білків розташовані по краях геному (E1A, E1B) та кодують білки, задіяні в реплікації та регуляції клітинних факторів. Гени пізніх білків (E2, E3 та E4) розташовані посередині молекули ДНК. Це місця зчитування для синтезу структурних білків та тих, що беруть участь у збірці віріонів (рис. 1.2). Всі гени транскрибуються клітинною РНК-полімеразою II. За рахунок альтернативного сплайсингу і використання різних поліА сайтів із відносно невеликого числа генів утворюється порядка 40 білків різного розміру.

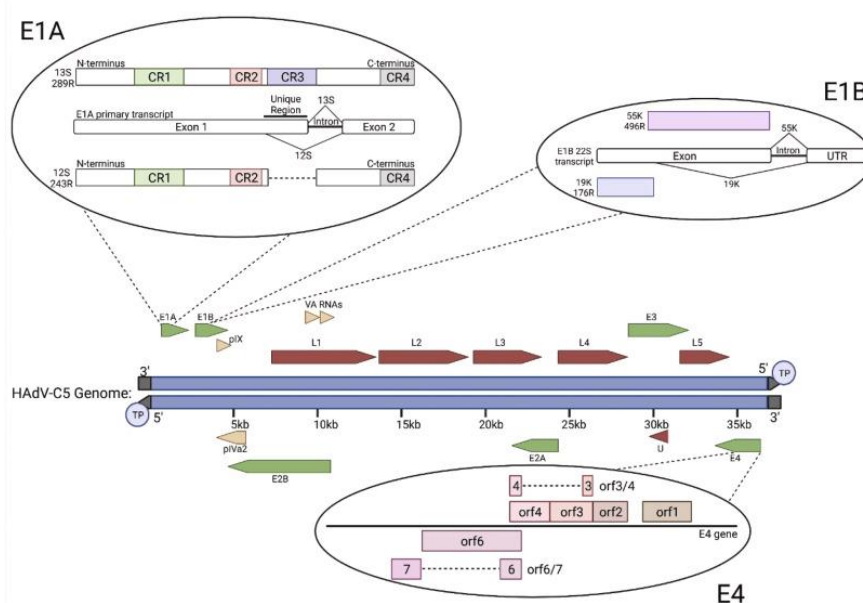


Рис. 1.2. Локалізація генів у геномі аденовірусу людини [16].

Цитотоксична дія аденовірусів - зміна форми клітин пов'язана з активністю вірусної протеази, яка розщеплює кератини цитоскелету, зокрема K7 та K18. Оскільки вірус не впливає на білки міжклітинних зв'язків, то спостерігається утворення конгломератів. Округлі клітини, з'єднані між собою та нагадують грона винограду [17].

Серотипи HAdV 40 та 41 є значущими патогенами, які часто викликають важкі захворювання у пацієнтів з ослабленим імунітетом, зокрема у дітей та

осіб після трансплантації органів. У цієї групи хворих нерідко розвивається дисемінована форма аденовірусної інфекції (АДВІ), що може мати летальні наслідки [18].

Вперше аденовіруси були ідентифіковані у 1953 році В.П. Роу та його колегами під час дослідження хірургічно видалених піднебінних мигдаликів та аденоїдів у здорових дітей, у клітинах яких спостерігали специфічну дегенерацію. На сьогодні сімейство *Adenoviridae* включає близько 130 видів аденовірусів, які були виділені від ссавців, птахів та холонокровних тварин. Для людини патогенними є 88 серотипів HAdV. Віруси цієї групи класифікуються на сім основних груп (A–F), що ґрунтується на їхній здатності до аглютинації еритроцитів, трансформації клітинних культур, онкогенності, а також на аналізі геномної послідовності. У кожній групі ідентифіковано приблизно 90 генотипів з геномною довжиною 34-36 кДа [14, 15, 16]. Аденовіруси групи F були вперше виявлені у 1975 році за допомогою електронної мікроскопії. Завдяки їхній високій тропності до шлунково-кишкового тракту (ШКТ) вони отримали назву «кишкових» аденовірусів [9]. У 1999 році HAdV офіційно був віднесений до родини *Mastadenovirus* Міжнародним комітетом з таксономії вірусів [19].

Захворювання, спричинені HAdV, можуть мати різноманітний перебіг – від легких форм до тяжких уражень дихальної системи, шлунково-кишкового тракту (ШКТ) та очей, зокрема викликаючи епідемічний кератокон'юнктивіт [20].

HAdV вважається умовно-патогенним вірусом людини, що найбільш поширений у країнах, що розвиваються. За результатами досліджень, проведених у Нігерії, серотипи HAdV 40 і 41 виявлялися у 23% зразків від пацієнтів із гострими кишковими інфекціями (ГКІ), а також у 17,6% випадків серед осіб контрольної групи, які не мали жодних клінічних проявів захворювання. Це вказує на широке поширення аденовірусів серед населення. Найбільш уразливою віковою категорією для HAdV-гастроентериту є діти віком від 6 до 36 місяців. Характерною особливістю цієї інфекції є затяжний

перебіг діареї, що однією з основних причин смертності серед дітей до 5 років, госпіталізованих із тяжким гастроентеритом у Південній Африці, є саме гастроентерит, викликаний HAdV 40 і 41 серотипів. Загалом, аденовірусна інфекція посідає третє місце серед найпоширеніших причин небактеріальної діареї у дітей та є важливим етіологічним фактором розвитку інвагінації кишечника, спричиненої вірусними агентами [21].

На відміну від інших кишкових вірусів, для аденовірусних ГКІ не характерні виражені сезонні спалахи, а випадки АДВІ реєструються протягом усього року. Незначне зростання захворюваності спостерігається у періоди лютий-березень та липень-вересень [22].

Дослідження впливу кліматичних факторів (температури повітря, вологості) на частоту виявлення антигенів HAdV 40 і 41 серотипів у дітей віком до 5 років, хворих на гастроентерит, показало, що зміна погодних умов та пов'язані з цим коливання активності населення не мали істотного впливу на рівень поширення HAdV-інфекцій [23].

Хоча основними клінічними проявами ГКІ аденовірусної етіології є діарея та блювота, механізми їх патогенезу досі залишаються недостатньо вивченими. Це зумовлено, перш за все, відсутністю адекватної тваринної моделі, що ускладнює детальне дослідження молекулярних механізмів інфекційного процесу [24].

Інфекції, спричинені HAdV, зазвичай мають спорадичний характер і не демонструють сезонності. Однак спалахи реєструються у різних країнах, переважно в організованих колективах, де люди змушені тривалий час перебувати у закритих або переповнених приміщеннях – гуртожитках, медичних установах тощо [25].

У розвинених країнах випадки захворювань, спричинених HAdV-F (40 і 41 серотипів), фіксувалися як у вигляді поодиноких інцидентів, так і у вигляді масових спалахів серед пацієнтів стаціонарних і амбулаторних медичних закладів. Найбільш вразливою групою є діти до 5 років, у яких хвороба часто має тяжкий перебіг і може призводити до летальних наслідків [26].

Основними серотипами, що спричиняють гастроентерити, є HAdV 40 та 41. Вони характеризуються підвищеною стійкістю в довкіллі, що перевищує виживаність поліовірусу, вірусу гепатиту А та ентеробактерій. HAdV також мають високу резистентність до ультрафіолетового випромінювання. Саме тому моніторинг контамінації об'єктів довкілля та поверхонь у лікувальних установах є важливим для оцінки поширеності вірусу, управління епідемічними ризиками та запобігання спалахам інфекції. У природних водоймах концентрація HAdV зазвичай становить 10^1 – 10^4 вірусних копій (ВК) на літр, тоді як у стічних водах після очищення цей показник зростає до 10^3 – 10^5 ВК/л. Це свідчить про необхідність використання методів концентрування проб для ефективного виявлення вірусу [27].

Сучасні високочутливі методи молекулярної діагностики довели вагому роль HAdV 40/41 у виникненні дитячих діарейних захворювань. Водночас, епідемічний процес (ЕП) аденовірусних інфекцій (АДВІ) залишається недостатньо вивченим. Інші типи HAdV також можуть спричиняти спалахи кишкових інфекцій у дітей, які відвідують організовані колективи, проте їх реєстрація є обмеженою. Це ускладнює оцінку їхнього реального епідеміологічного значення. Для повноцінної характеристики ЕП АДВІ необхідне генотипування не лише HAdV 40/41, а й інших геноваріантів, що виявляються у хворих на ГКІ. Серотипи, що належать до підгруп А, В і С, також виявлялися як етіологічні чинники гастроентериту серед немовлят і дітей раннього віку. Дослідження носійства HAdV у здорових дітей показали, що за аналізом змивів із кон'юнктиви та зразків фекалій було ідентифіковано 11 серотипів, які належать до чотирьох різних видів [28].

У рамках багатоцентрового дослідження AdVance була оцінена поширеність HAdV серед пацієнтів 50 центрів трансплантації кісткового мозку у 7 європейських країнах: Великобританії, Франції, Німеччині, Італії, Іспанії, Нідерландах і Чехії. Ретроспективний аналіз частоти виявлення HAdV у реципієнтів трансплантатів показав наявність вірусу у 32,03% клінічних

зразків фекалій серед 1736 дітей (95% довірчий інтервал (ДІ): 30,9%–33,4%) та у 6% із 2540 обстежених дорослих (95% ДІ: 4,7%–6,4%) [29].

Дослідження сезонної динаміки норовірусної та аденовірусної інфекцій в Україні показало, що з 24 дітей, хворих на гастроентерит, які знаходилися на стаціонарному лікуванні в період з квітня по листопад 2014 року, випадки аденовірусної інфекції реєструвались значно частіше ($p < 0,005$) восени (77,8%) порівняно з літнім періодом (22,2%). Крім того, випадки одночасного виявлення обох вірусів також здебільшого припадали на осінь, що свідчить про більш високу частоту інфікування норовірусом та аденовірусом у літньо-осінній період [30].

Отже, аденовіруси кишкового та некишкового типів мають суттєве значення серед інших збудників, що здатні викликати гострі кишкові інфекції (ГКІ), особливо у дітей молодших вікових груп. За результатами досліджень, проведених у багатьох країнах з різним рівнем розвитку, встановлено широке поширення аденовірусних інфекцій, які часто асоціюються з кількома видами HAdV або з іншими збудниками, зокрема норовірусом, ротавірусом та іншими кишковими вірусами, у вигляді коінфекції. Встановлено важливе епідеміологічне значення HAdV як етіологічного чинника ГКІ у сучасний період, що потребує подальшого вивчення цієї проблеми та розробки вакцинних препаратів, особливо для дітей до п'яти років, які проживають у країнах з низьким рівнем економічного розвитку. Це дозволить зменшити показники дитячої смертності від ГКІ аденовірусної етіології, яка займає одне з провідних місць серед вірусних кишкових інфекцій. Перспективи подальших досліджень передбачають вивчення молекулярно-генетичних особливостей циркулюючих на півдні України аденовірусів з подальшим визначенням домінуючих штамів збудника та генетичного розмаїття виявлених ізолятів.

1.2. Огляд сучасних антиаденовірусних препаратів

Варто зазначити, що проблема антиаденовірусної терапії полягає не лише в невеликій кількості препаратів, представлених на світовому ринку, але й у відсутності сполук із сильною антиаденовірусною дією на стадії розробки. На сьогодні не існує затверджених специфічних антиаденовірусних препаратів [2]. Найбільшою групою сполук з антиаденовірусною активністю є аномальні нуклеотиди та нуклеозиди. Використання таких сполук показало ефективність проти ДНК-вмісних вірусів. Тому більшість сполук, про які далі піде мова, відомі як засоби проти захворювань, викликаних іншими вірусами. Механізм дії аномальних нуклеозидів полягає в тому, що після розпізнавання клітинними кіназами та 1 чи 2 циклів фосфорилування вони перетворюються на альтернативний субстрат для аденовірусної ДНК-полімерази. Таким чином вони вбудовуються в новосинтезований ланцюжок ДНК та інгібують її роботу. Цікаво те, що спорідненість до вірусної ДНК-полімерази зазвичай вища, ніж спорідненість до клітинних полімераз (I, II і III) [31]. «Золотим стандартом» серед антиаденовірусних сполук є ганцикловір. Це аналог гуаніну, похідне ацикловіру.

З аналогів аденіну можна назвати (S)-HPMPA [(S)-9-(3-гідрокси-2-фосфонометоксипропіл)аденін та USC-187 (алкіл тирозинамідний естер HPMPA). Також в літературі присутні згадки про відарабін (Vira-A), однак інформація про його тестування доволі суперечлива. Суперечлива інформація щодо трифлюоридину (3FT) – похідного тиміну [32].

Серед аналогів цитозину антиаденовірусну активність проявляють цидофовір (S)-1-(3-гідрокси-2-фосфонометоксипропіл)цитозин, його похідне брінцикловір (гексадецилоксипропіл-цидофовір) [21] та зальцитабін (2'3'-дидеоксицитидин, ddC) [33].

Слабкою антиаденовірусною активністю характеризується (S)-HPMPO-DAPy [2,4-діаміно-6-[3-гідрокси-2-(фосфонометокси)-пропокси]піримідин. Ефект поступається такому для цидофовіру та HPMPA. Натомість

дія пурину [2-аміно-7-(1,3-дигідрокси-2-пропоксиметил)] характеризується вищим індексом селективності, аніж для цидофовіру [34].

Ще одна сполука, для якої спостерігався антиаденовірусний ефект – рибавірин (1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамід). Щоправда, ефект спостерігався не в усіх культурах клітин, на яких проводилося дослідження. Показана антиаденовірусна активність 6-азацитидину та його аналогів [35].

Попри те, що антиаденовірусних сполук відомо багато, стадії клінічних випробувань досягли лише чотири препарати: цидофовір, бринцикловір, ганцикловір під торговою маркою ZIRGAN та абітилгуанід під торговою маркою ADENOSTATIN COLLYRIUM. Всі вони при використанні у вигляді очних крапель виявляють високу ефективність, пригнічують прогресування захворювання, попереджають поширення на інше око та запобігають розповсюдженню інфекції. Для цидофовіру та бринцикловіру проводилися також випробування на імунокомпромісних пацієнтах. Було показано, що його використання орально супроводжується низькою біодоступністю, має нетривалу дію та значну нефротоксичність, що проявляється у вигляді некрозу трубчастих клітин в канальцях нирок [34].

Серед нунуклеотидних сполук з антиаденовірусною дією виділяють Абітилгуанід (N'N'-ангідро-біс(β -гідрокси-етил)бігуанід-HCl), він інгібує широкий спектр як лабораторних субтипів, так і субтипів, виділених від пацієнтів, хворих на епідемічний кератокон'юктивіт. Найбільш значна дія спостерігається проти вірусів субтипу С. Інгібує приріст вірусного потомства на експоненційній фазі росту, тому припускають, що інгібуюча дія спричинена зв'язуванням абітилгуаніду з одним чи кількома капсидними білками аденовірусів. Відомо, що цистеїнова протеаза бере участь в процесингу багатьох вірусних білків, в тому числі структурних. Оскільки взаємодія проходить між вірусними білками без участі клітинних, а концентрація структурних білків вища в порівнянні з іншими, то пошук методів переривання цього етапу є найбільш пріоритетним. Відомо, що білки, в яких

присутні фторовані амінокислоти, стають нечутливими до протеаз. Тому фторовані амінокислоти розглядаються як потенційно активні антиаденовірусні речовини [35].

Класичними модельними об'єктами для дослідження аденовірусної інфекції є різні культури клітин в дослідженнях *in vitro* та *in vivo*: вірус-індуковані кератокон'юктивіти у новозеландських кроликів, бавовняних щурів, пневмонії, спричинені аденовірусами типу В і С зареєстровані на мишах і бавовняних щурах та генералізована інфекція на сирійських хом'яках, тож можуть бути використані як модельні системи для *in vivo* аналізу китайські землерийки та миші [36].

1.3. Антивірусна активність біологічно активних речовин природного походження

Вірусна інфекція має величезні соціальні та економічні наслідки, але поки що існує доступних препаратів для лікування. Крім того, лікування стає все більш важким через мутації вірусів. Використання рослинної сировини у створенні протівірусних лікарських препаратів є одним з основних шляхів розвитку сучасної фармакології. Близько половини всіх впроваджених у медичну практику препаратів за останні 25 років пов'язані з природними з'єднаннями. Натуральні продукти з протівірусними властивостями мають переваги мінімальних побічних ефектів, низької токсичності та м'якої дії за допомогою різних механізмів. Європейський ринок протівірусних препаратів на основі рослинної сировини на даний момент вважається єдиним найбільшим у світі комерційним ринком лікарських рослин і фітопрепаратів. У Франції, Німеччині, Італії, Швеції, Швейцарії та Великій Британії такі препарати використовують як доповнення до лікування синтетичними препаратами. У Центральній та Східній Європі їх цінують як альтернативу дорогим лікам [37].

Дія сучасних противірусних фітопрепаратів може бути спрямована як на макроорганізм, так і на мікроорганізм: це підвищення неспецифічної резистентності організму людини до вірусів (стимулювання синтезу ендогенного інтерферону) або специфічне інгібування розвитку вірусу в організмі. Наприклад, препарат Протефлазід («ЕКОФАРМ», Україна) створений на основі витяжок трави щучки дернистої (*Deschampsia caespitosa* L.) та війника наземного (*Calamagrotis epigeios* L.) використовується в офіциналній медицині з противірусною активністю, діючими речовинами є флавоноїдні глікозиди [38]. Протефлазід здатний пригнічувати вірус специфічні ферменти тимідинкіназу та ДНК-полімеразу в клітинах, інфікованих вірусом простого герпесу 1 і 2 типу (*Herpes simplex*), що призводить до зниження або повного блокування реплікації вірусних білків та перешкоджає розмноженню вірусів. Препарат рекомендований для використання при інфекціях, зумовлених вірусами гострих респіраторних інфекцій (зокрема грипу та SARS-CoV-2), а також вірусами простого герпесу, папіломи людини, гепатитів (В і С) та при змішаних формах вірусно-бактеріальних інфекцій [39]. Препарат Неофлазід («ЕКОФАРМ», Україна) повністю пригнічує репродукцію аденовірусу людини, впливаючи на пізні етапи, ймовірно збірку вірусного капсиду [40]. Дослідження віруліцидної та противірусної дії водно-спиртових витяжок з листя подорожника великого (*Plantago major* L.), подорожника ланцетовидного (*Plantago lanceolata* L.), малини дикої і садової (*Rubus idaeus* L.) та їх ферментованих варіантів щодо аденовірусів людини 3, 5, 7 серотипів (HAdV3, HAdV5, HAdV7) показали значну антивірусну активність витяжок при внесенні їх після адсорбції вірусів за терапевтичною схемою. Витяжка з листя подорожника великого у концентрації 3 мг/мл пригнічувала репродукцію HAdV5 на 83%, HAdV3 на 55%, а HAdV7 на 11%. Витяжка з листя малини дикої в діапазоні концентрацій 0,06-3 мг/мл інгібувала репродукцію HAdV5, HAdV3 та HAdV7 на 65-89%, 41-84% та 22-59%, відповідно. Активність витяжок з листя подорожника ланцетовидного та листя малини садової була незначною, максимальне

пригнічення репродукції HAdV3 на 34% показане для витяжки з листя малини садової в концентрації 0,38 мг/мл, репродукція інших аденовірусів пригнічувалась лише на 4-22%. Досліджували вплив витяжок на інфекційність аденовірусів. Показано, що витяжки з листя подорожника великого та малини дикої значно впливали на утворення інфекційного вірусного потомства, а саме: витяжки з подорожника великого (ферментована та не ферментована) пригнічували репродукцію аденовірусу в середньому на 1,5 lg. Ферментована, і неферментована витяжка з листя малини пригнічували репродукцію аденовірусу на 1,45 lg - 1,6 lg. Дослідження хроматографічних профілів витяжок подорожників показали відмінності у складі фенолів, таких як кофеїнова та хлорогенова кислоти. Витяжка листя *Plantago major* L. містить плантамайозид - похідне кофеїнової кислоти, що володіє високою біологічною активністю. Хроматограми витяжок листя сортової та дикої малини мали значні відмінності у загальному вмісті флавоноїдів [41].

Екзополісахариди, що продукуються молочнокислими бактеріями родів *Pediococcus*, *Leuconostoc* і *Lactobacillus*, виявляли активність проти HAdV5 *in vitro*. Серед шести використаних штамів виділено один штам LAB (*Lactobacillus* sp.), який продукував EPS 26а, що пригнічує вихід повноцінних вірусних частинок [42].

В світовій літературі є багато публікацій щодо протимікробних, противірусних, апоптоз- та імуномодулюючих властивостей речовин, отриманих із вищих рослин, токсинів членистоногих та гідробіонтів [43]. Наприклад, препарат Ломагерпан (Lomaherpan) (Німеччина), до складу якого входить сухий екстракт з листя меліси лікарської (*Melissa officinalis* L.) сімейства губоцвіті (*Lamiaceae*). Противірусна активність обумовлена кавовою, розмариновою та феруловою кислотами, які належать до групи фенілпропаноїдів. Дія здійснюється за рахунок блокування рецепторів на клітинній мембрані та на зовнішній оболонці вірусу, що призводить до неможливості проникнення вірусу в клітину. Препарат також виявляє протизапальні властивості. Ломагерпан має активність щодо вірусу простого

герпесу (*Herpes simplex*) [44]. Випускається у формі мазі для зовнішнього застосування (1%). Протипоказаний для дітей віком до 18 років, не рекомендується в період вагітності та лактації. Препарат Ломагерпан виробляється в Німеччині з листя меліси лікарської, яка росте на півдні європейської частини СНД, Кавказі та в Центральній Азії, а також добре культивується.

Ефірна олія, одержана в процесі обробки квіток чорнобривців *Tagetes minuta* L., знаходить застосування в парфумерно-косметичній промисловості. Для профілактики вірусних інфекцій та гострих респіраторних захворювань застосовують гомеопатичний препарат на основі олії – «Тагетон». У ряді країн настої суцвіть чорнобривців (1:10) широко використовуються як тонізуючий, протівірусний, протизапальний та гепатозахисний засоби, при лікуванні головного болю, захворювань шлунково-кишкового тракту. Екстракти застосовують у терапії виразкової хвороби шлунку та дванадцятипалої кишки [45]. У науковій медицині застосовують такі препарати чорнобривців, як «Алфавіт 50+» «Вітрум Віжн» (таблетки, вкриті оболонкою №10, Unipharm, Inc., США), «Лютеїн Преміум» (таблетки, вкриті оболонкою 500 мг, таблетки жувальні 500 мг, капсули 200 мг, Фарм), Лютеїн (Lutein, капсули 0,41 г, Nahrin, Швейцарія), Віталюкс Плюс (капсули 669 мг, Catalent Pharma Solutions, Італія), комплекс для очей Лютеїн-Максимум (капсули 450 мг, Yunako Company, Японія) та ін.

1.4. Витяжки з чорнобривців (*Tagetes*) та їх властивості

Витяжки з чорнобривців (*Tagetes*) отримують із представників роду *Tagetes*, який належить до родини айстрових (*Asteraceae*), роду *Tagetae*. Цей рід походить із Центральної Америки й налічує майже 56 видів і понад 600 форм і сортів, поширених по всьому світу. Найбільш популярними видами для отримання екстрактів є *Tagetes patula* L. (розлогі) та *Tagetes erecta* L. (прямоходячі).

Для виробництва витяжок зазвичай використовують однорічні трав'янисті форми рослин, які можуть досягати висоти 20–60 (100) см. Витяжки з чорнобривців прямостоячих великоквіткових отримують із однорічних, малокущистих рослин із висотою від 50 до 150 см, що мають прямостояче стебло, розгалужене від середини, з нечисленними, спрямованими вгору гілками [46].

Останніми роками значно зросла зацікавленість у дослідженні хімічного складу та біологічної активності витяжок з чорнобривців роду *Tagetes L.*. Було виявлено, що вони містять понад 100 біологічно активних вторинних метаболітів, зокрема фенольні сполуки, фенілпропаноїди, похідні тіофену та бензофурану, тритерпеноїди, стероїди, алкалоїди, флавоноїди, каротиноїди тощо [47].

Витяжки з чорнобривців містять широкий спектр біологічно активних речовин, зокрема каротиноїди, флавоноїди, ефірну олію, гідроксикоричні кислоти, вітаміни та полісахариди. Ці компоненти зумовлюють виражені антиоксидантні, протизапальні, ранозагоювальні, протимікробні, цукрознижувальні та сечогінні властивості [6]. Рослини роду *Tagetes L.*, з яких отримують витяжки, широко використовуються у медицині та народному господарстві. Вони відомі як природні лікарські засоби із вираженою ранозагоювальною, гепатопротекторною, холеретичною та адаптогенною дією. Крім того, витяжки є цінним джерелом ефірної олії, що має інсектицидні властивості та використовується у парфумерній і харчовій промисловості. Висока концентрація каротиноїдів у витяжках робить їх перспективними для застосування у фармацевтичній та косметичній галузях [48].

У науковій медицині застосування витяжок з чорнобривців пояснюється високим вмістом біологічно активних сполук, зокрема каротиноїдів, флавоноїдів та ефірних олій. На основі цих компонентів створені препарати Лютеїн, Лютеїн Форте, Лютеїн Комплекс, Лютеїн для очей та Окювайт лютеїн, які широко використовуються в офтальмології. Вони сприяють підвищенню

гостроти зору, нормалізації функцій органу зору та покращенню здатності до розрізнення кольорів [49].

У традиційній медицині витяжки з чорнобривців застосовують для лікування різноманітних захворювань, зокрема патологій шлунково-кишкового тракту, шкірних захворювань, порушень функцій печінки тощо. Настої з цих рослин проявляють тонізуючу, протівірусну, протизапальну, цукрознижувальну, жовчогінну та гепатопротекторну дію. Їх також використовують для лікування застуди, головного болю, менструальних болів та шлунково-кишкових розладів [44]. Екстракти витяжок активно застосовують при лікуванні виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки..

Таким чином, витяжки з чорнобривців є багатофункціональними природними засобами з широким спектром корисних властивостей, що робить їх перспективними для застосування в медицині, фармацевтиці, косметології та інших галузях промисловості.

1.5. Біологічно активні речовини витяжок чорнобривців

Останнім часом у різних країнах активно проводяться дослідження щодо хімічного складу та біологічної активності представників роду Чорнобривці. У складі цих рослин виявлено понад сотню біологічно активних речовин, серед яких фенілпропаноїди, похідні тіофену та бензофурану, тритерпеноїди, стероїди, алкалоїди, флавоноїди, каротиноїди, кумарини та інші [50].

Наукова література містить найбільше даних про вивчення ефірної олії чорнобривців у різних їхніх видах. Встановлено, що її основними компонентами є оцимен (до 50 %), який проявляє виражені антисептичні та антимікробні властивості, а також лімонен, терпінен, мірцен (монотерпенові вуглеводні), тагетон, дигідротаетон, тагетенон (ациклічні монотерпенові кетони). Водночас для чорнобривців золотистих і чорнобривців тонколистих характерне домінування фенілпропаноїдів – метилевгенолу, метилхавіколу,

анетолу, що відрізняє ці види від інших представників роду *Tagetes L.* Крім того, ефірна олія чорнобривців містить сесквітерпени, сесквітерпенові спирти, складні естери, монотерпеноїди та ароматичні сполуки [51].

За результатами досліджень Salvaña встановлено, що найбільший вміст ефірної олії накопичується у фазі цвітіння рослин: у надземній частині – 0,30–0,55 %, у листках – 0,5–0,7 %, у суцвіттях – 0,1–0,2 %, у стеблах – 0,05 %. Значне накопичення ефірної олії також спостерігається у фазі бутонізації, коли її вміст у надземній частині сягає 0,22–0,30 % [52].

Крім того, у представників роду *Tagetes L.* виявлено гідроксикоричні кислоти, флавоноїди та їхні глікозиди (апигенін, гіперозид, ізокверцетин), кумарини, полісахариди, жирні кислоти, амінокислоти тощо [53].

Згідно з дослідженнями Salvaña F. R. у складі *T. lucida Cav.* ідентифіковано вторинні метаболіти, зокрема алкалоїди. Фітохімічний аналіз методами тонкошарової хроматографії (ТШХ) та ультрависокоєфективної рідинної хроматографії (УВЕРХ), дозволив виявити у водному екстракті чорнобривців золотистих низку кумаринових сполук. В інших дослідженнях було підтверджено наявність умбеліферону, герніарину та скопарону серед інших представників класу кумаринів [52].

Крім того, у складі *T. lucida* було ідентифіковано низку флавоноїдів, зокрема кверцетин, патулетин, рутин, ізорамнетин, кверцетагетин і нарингенін. У гексановому екстракті *T. lucida Cav.* було виокремлено п'ять кумаринів – 7-О-пренілскополетин, скопарон, диметилфраксетин, герніарин і 7-О-пренілумбеліферон, а також рутин, які вважаються перспективними протинейрозапальними сполуками [54].

Дослідження ефірних олій *T. lucida*, що зростає в різних кліматичних зонах, продемонстрували значні відмінності у компонентному складі. В ефірній олії, отриманій з надземної частини *T. lucida*, культивованої в Коста-Ріці, було ідентифіковано 30 сполук, основною з яких (95–97 %) є метилхавікол, також відомий як естрагон. Додатково були виявлені анетол,

ліналоол, метилевгенол і евгенол. Подібні результати отримані для ефірної олії *T. lucida*, зібраної в Колумбії та на Кубі [55].

Отже, проведений огляд літератури засвідчив, що чорнобривці (*Tagetes*) є перспективними рослинними об'єктами для вивчення як хімічного складу, так і біологічної активності. У їхньому складі вже ідентифіковано широкий спектр біологічно активних речовин, зокрема фенілпропаноїди, кумарини, флавоноїди, каротиноїди, гідроксикоричні кислоти, ефірні олії та алкалоїди, які обумовлюють їхні антимікробні, протизапальні, антиоксидантні та противірусні властивості.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Вірус

Використовували еталонний штам аденовірусу серотипу 2 (HAdV-2), одержаний із колекції Інституту мікробіології Будапештського медичного університету. Вірус зазвичай культивували в культурі клітин HeLa чи Нер-2, використовуючи методи очистки та зберігання, які описані раніше [56,57].

2.2. Культура клітин

Для накопичення вірусного матеріалу та подальшої оцінки антивірусної активності досліджуваних сполук використано лінію клітин Vero, яка має високу чутливість до аденовірусів. Ці клітини отримано з ниркового епітелію африканської зеленої мавпи (*Cercopithecus aethiops*). Ця клітинна культура широко використовується у вірусологічних дослідженнях через свою сприйнятливості до багатьох вірусів людини, у тому числі аденовірусів [58]. Клітинну лінію було одержано з банку клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України.

Культивування клітин відбувалося за стандартних умов, у пластикових культуральних флаконах. Температура підтримувалася на рівні 37 °С, атмосфера була збагачена 5% CO₂. Живильне середовище складалося з: 45% RPMI 1640 (Sigma), 45% DMEM (Sigma), 10% інактивованої сироватки ембріонів великої рогатої худоби (FBS, Sigma), яку попередньо прогрівали (56°C, 30 хв), гентаміцину, що використовувався як антибактеріальний компонент, у концентрації 100 мкг/мл.

Через 4–5 діб після посіву, клітини формували моношар. Візуальний контроль за станом моношару та морфологією клітин здійснювався за допомогою інвертованого світлового мікроскопа. Після підтвердження однорідності моношару, живильне середовище зливали, а клітини двічі промивали стерильним розчином Версену, щоб від'єднати їх від поверхні. Після видалення розчину, перевіряли округлість клітин, що є критичним показником їх готовності до ресуспендування.

У кожен флакон додавали 5 мл свіжого живильного середовища та піпетували суспензію до утворення гомогенної клітинної маси. Для визначення концентрації клітин, підраховували кількість клітин у камері Горяєва, використовуючи 0,1 мл отриманої суспензії. Для подальших експериментів, включно з інфікуванням аденовірусом, клітини висівали у 96-лункові планшети з розрахунковою щільністю 2×10^5 клітин/мл, що гарантувало рівномірне формування моношару в кожній лунці.

2.3. Досліджувані витяжки рослин чорнобривців

У ході експерименту задля отримання рослинних витяжок, було обрано три різновиди чорнобривців (*Tagetes spp.*). Ці види демонстрували відмінності у морфологічних особливостях та хімічному складі. Сировиною стали квіткові кошики (суцвіття) та зелена надземна частина кожного з видів, що дозволило зібрати широкий перелік біологічно активних сполук (табл. 2.1). Відтак, було створено шість окремих витяжок: по два з кожного виду рослини.

Таблиця 2.1

Види чорнобривців відібрані для екстракції

Вид чорнобривця	Частина рослини, використана для екстрагування	Номер екстракту
<i>Tagetes lucida</i>	Квіти	1
	Зелена маса	4
<i>T. tenuifolia</i>	Квіти	2
	Зелена маса	5
<i>T. patula</i>	Квіти	3
	Зелена маса	6

Збір рослинної сировини здійснювався у природно-культурному середовищі Національного ботанічного саду імені М. М. Гришка Національної академії наук України впродовж літніх місяців — липня та серпня 2023 року, у період активного цвітіння та вегетації. Це дозволило забезпечити максимальний вміст вторинних метаболітів, зокрема флавоноїдів, каротиноїдів та ефірних олій, які є потенційно активними проти вірусних агентів.

Після збору зразки сировини піддавали первинному очищенню. Для цього квіти та надземну частину промивали під проточною водопровідною водою. Це робилося з метою видалення пилу, механічних домішок та інших поверхневих забруднень. Очищені зразки висушували у тіні при кімнатній температурі, яка підтримувалась на рівні близько 25 °С. Сушіння тривало до досягнення стабільної маси та вологості, що забезпечувало запобігання мікробіологічному псуванню та збереження цілісності термолабільних сполук [59].

Для екстрагування біологічно активних речовин застосовували класичний метод мацерації з використанням водно-спиртового розчинника середньої полярності. Свіжу рослинну сировину подрібнювали до часток розміром 2–3 мм, після чого у фарфоровій або скляній ступці перетирали 10 г зразка до утворення однорідної напівпастоподібної маси. Отриману масу

заливали 100 мл 70% етилового спирту. Такий розчинник забезпечує ефективне вилучення як полярних, так і частково ліпофільних компонентів, таких як фенольні сполуки, флавоноїди, терпеноїди тощо.

Мацерацію проводили у темному прохолодному приміщенні при температурі 18–22 °С протягом 3 діб. Процес супроводжувався періодичним струшуванням, що сприяло рівномірному розподілу екстрагента та покращенню дифузійних процесів. Після завершення екстракції отриману рідину фільтрували через фільтрувальний папір, щоб видалити рослинні залишки. Очищені витяжки розливали у стерильні темні скляні ємності. Ці ємності зберігали при температурі 4–6 °С у захищеному від світла місці до моменту використання в біологічних експериментах [60].

Застосований підхід дозволив отримати стандартизовані спиртові витяжки з кожної рослинної частини, які містять широкий спектр фітокомпонентів для подальшого аналізу їх потенційної антивірусної активності.

2.4. Підготовка витяжок до дослідження

Для вивчення цитотоксичності та протівірусної дії рослинних витяжок, їх поступово розводили двократно у спеціальному живильному середовищі. Цей спосіб дав змогу виявити безпечні для клітин концентрації витяжок, а також визначити ефективні дози, які могли б пригнічувати розмноження вірусу, не завдаючи шкоди клітинній культурі [56].

Двократні робочі розведення готували безпосередньо перед дослідженням, суворо дотримуючись стерильності. Для їхнього приготування використовували середовище, яке складалося з рівних частин (1:1) двох поширених середовищ для культивування клітин: 50% RPMI-1640 з L-глютаміном (виробництво «Sigma», США), 50% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, «Sigma», США). Поєднання цих середовищ забезпечувало оптимальний баланс поживних речовин, буферних систем та амінокислот, що

є критично важливим для підтримки життєздатності та метаболічної активності клітинної лінії Vero протягом усього часу експерименту зразками.

2.5. Визначення цитотоксичної дії витяжок за кількістю живих клітин колориметричним методом з використанням МТТ

Метод МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) є широко застосовуваним способом для оцінки життєздатності клітин *in vitro*. Він ґрунтується на визначенні біохімічної активності мітохондріальних дегідрогеназ у інтактних, тобто життєздатних, клітинах [61]. За нормального метаболізму ці ферменти здатні перетворювати жовтий субстрат тетразолію МТТ у нерозчинний фіолетовий кристал — формазан (рис. 2.1). Кількість сформованого формазану безпосередньо пропорційна числу метаболічно активних клітин, що дає змогу кількісно визначати його за допомогою спектрофотометричного методу. У випадках загибелі клітин, викликаній токсичними речовинами або досліджуваними препаратами, активність дегідрогеназ знижується, що веде до зменшення утворення формазану. Таким чином, метод дозволяє оцінювати не тільки загальну життєздатність клітин, а й потенційну токсичність речовин у різних концентраціях.

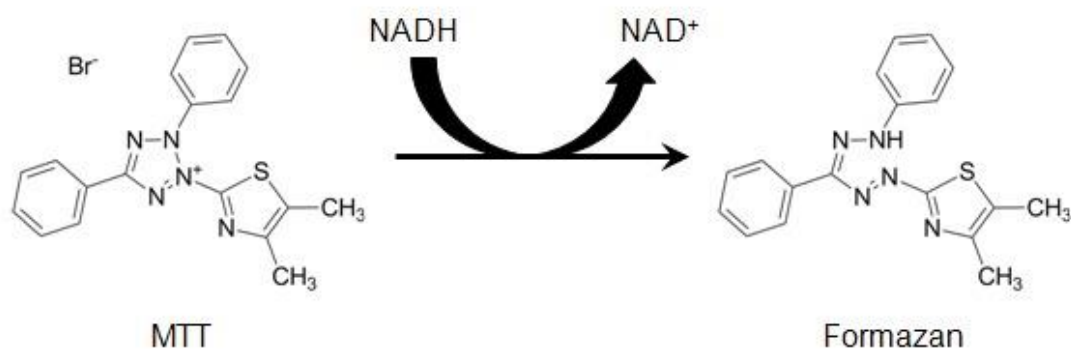


Рис. 2.1. Перетворення субстрату МТТ в інтактних клітинах

У дослідженні клітинну лінію Vero культивували в 96-лункових планшетах, що сприяло проведенню паралельних вимірювань за різних умов обробки. Через 24 години після посіву клітин, коли формувався щільний моношар, живильне середовище з лунок видаляли та замінювали на нове середовище, що містило тестовані витяжки в різних концентраціях. Для цього готували серію двократних послідовних розведень кожної витяжки на середовищі без додавання сироватки, що забезпечувало максимальну чутливість клітин до можливої дії біоактивних компонентів.

Для кожної концентрації витяжки використовували мінімум 3 технічні повтори (лунки), що гарантувало надійність статистичної обробки результатів. Для контролю життєздатності використовували лунки з клітинами, в які вносили свіже живильне середовище без екстракту чорнобривців. Планшети з клітинами інкубували при температурі 37 °C у вологому середовищі з 5% CO₂ протягом 72 годин. Упродовж цього періоду здійснювався щоденний візуальний контроль стану клітинного моношару за допомогою інвертованого світлового мікроскопа (окуляр 7x, об'єктив 10x), що дозволяло своєчасно виявляти ознаки цитопатичного ефекту або порушення морфології клітин.

Після закінчення інкубації в кожен лунку додавали по 20 мкл реагенту МТТ («Sigma», США), попередньо розчиненого у стерильному фосфатно-сольовому буфері (PBS, pH 7,2) до концентрації 5 мг/мл. Інкубацію з МТТ проводили протягом 2–4 годин при 37 °C, після чого живильне середовище з залишками реагенту ретельно видаляли. Для екстракції кристалів формазану до кожної лунки додавали 150 мкл 96% етанолу, після чого ретельно перемішували до повного розчинення осаду.

Вимірювання оптичної щільності (ОЩ) розчиненого формазану проводили за допомогою планшетного спектрофотометра Multiskan FC (Thermo Scientific, США) при довжині хвилі 540 нм. Отримані дані вносили в електронні таблиці Microsoft Excel, де за допомогою статистичних методів

визначали концентрацію препарату за якої життєздатність клітин зменшувалася на 50% порівняно з контролем (CC_{50}) [62].

Застосований підхід дав змогу не тільки кількісно оцінити цитотоксичність рослинних витяжок, а й обрати концентрації для подальшого тестування їх противірусної активності в біологічних моделях.

2.6. Дослідження протиаденовірусної дії витяжок за профілактичною схемою внесення

Для визначення противірусної активності за профілактичною схемою внесення рослинних витяжок експеримент проводили на клітинній лінії Vero, засіваючи її у 96-луночні планшети, використовуючи щільність 2×10^4 клітин на лунку. Клітини вирощували в середовищі для росту з дотриманням стандартних умов інкубації: температура 37°C , вологе середовище з 5% CO_2 , упродовж 24 годин. Це забезпечувало формування цілісного моношару клітин із конфлюентністю в діапазоні 90–100%.

Після того, як сформувався моношар, живильне середовище обережно видаляли, а в лунки вносили розведення витяжок, підготовлені заздалегідь, у нетоксичних концентраціях. Для кожної конкретної концентрації було передбачено принаймні три технічні повтори. Інкубацію клітин з витяжками здійснювали протягом 1–2 годин, підтримуючи температуру 37°C та наявність 5% CO_2 . Даний протокол базувався на методичних вказівках Носач Л. М. та Повниці О. Ю. щодо доклінічного вивчення специфічної антивірусної дії медичних препаратів у культурах клітин [56].

Після закінчення інкубації з витяжками, середовище повністю видаляли. Клітини тричі промивали стерильним розчином Хенкса (Hanks' Balanced Salt Solution), що дозволяло прибрати залишки препаратів, здатні впливати на подальший процес інфікування. У кожному лунку додавали по 50 мкл робочого розведення аденовірусу та інкубували ще годину при 37°C у середовищі з 5% CO_2 , для забезпечення ефективної адсорбції вірусу на клітинній мембрані.

Коли етап інфікування завершувався, вірусний інокулят прибирали, і в лунки додавали підтримуюче середовище, вільне від сироватки, створюючи умови для розмноження вірусу. Для контролю якості експерименту паралельно використовували:

- вірусний контроль – клітини, які були інфіковані вірусом, але не піддавались обробці витяжками;
- клітинний контроль – неінфіковані, необроблені клітини, що дозволяло оцінити базову життєздатність клітин.

Планшети інкубувались протягом 5–7 діб при 37 °С у стандартних умовах CO₂-інкубації, після чого проводили кількісне визначення противірусної активності, використовуючи метод МТТ.

У кожен лунку 96-луночного планшета додавали по 20 мкл розчину МТТ (концентрація 5 мг/мл), попередньо розчиненого у стерильному фосфатно-сольовому буфері. Інкубацію з МТТ проводили протягом 3–4 годин, витримуючи температуру 37 °С в атмосфері з 5% CO₂. Після того, як утворився формазан (нерастворний продукт відновлення МТТ дегідрогеназами життєздатних клітин), середовище з планшета видаляли. Далі, у кожен лунку додавали по 100–150 мкл 96% етанолу для екстракції формазану в рідку фазу.

Ощдз-Ощкв

$$\% \text{ інгібування} = \frac{\text{Ощдз} - \text{Ощкв}}{\text{Ощкк} - \text{Ощкв}} \times 100 ,$$

Ощкк-Ощкв

де:

ОЩ (досл) — середнє значення оптичної густини в лунках із зразком, який вивчають;

ОЩ (контр. вірусу) — показник оптичної густини у вірусному контролі (клітини, що заразилися, але не оброблялися);

ОЩ (контр. клітин) — показник оптичної густини в клітинному контролі (незаражені клітини).

2.7. Дослідження протівірусної дії витяжок за терапевтичною схемою внесення

Для вивчення специфічної антивірусної дії рослинних витяжок за терапевтичною схемою внесення на прикладі інфікування клітинної культури аденовірусом було застосовано стандартну методику, пристосовану згідно з порадами Носач Л.М. та Повниці О.Ю. [56]. На першому етапі сформований моношар клітин Vero, вирощений у 96-лункових планшетах, інфікували, додаючи по 50 мкл вірусної суспензії в кожен лунку. Інкубацію здійснювали протягом години при температурі 37 °С в атмосфері з 5% CO₂. Цей часовий проміжок був достатнім для адсорбції вірусу на поверхні клітин та початку інфекційного процесу.

По завершенню інкубації надлишок вірусного інокуляту старанно прибирали шляхом аспірації, щоб зменшити неспецифічний вплив вільного вірусу. Поверхню клітинного моношару промивали один раз стерильним розчином Хенкса для усунення залишків вірусу. Далі у кожен лунку додавали заздалегідь підготовлені розведення досліджуваних витяжок у нетоксичних концентраціях, що були визначені на попередніх етапах дослідження. Кожну концентрацію вводили щонайменше у трьох повторах (технічних репліках), що забезпечувало достовірність отриманих результатів.

Планшети з обробленими клітинами інкубували впродовж 5–7 діб при температурі 37 °С у вологому середовищі з 5% CO₂. Протягом цього часу відбувалася активна реплікація вірусу в клітинах контрольної групи, тоді як у дослідних зразках оцінювали потенційну гальмівну дію витяжок на розмноження вірусу та захист клітин від цитопатичного впливу.

До складу експерименту обов'язково включали:

вірусний контроль — інфіковані клітини без обробки витяжкою (для оцінки максимальної ЦПД);

клітинний контроль — неінфіковані, необроблені клітини (для встановлення базового рівня життєздатності).

Після закінчення інкубації культуральне середовище (супернатант) з кожної лунки відбирали для подальшого визначення титру новоутвореного вірусу за відповідними методами вірусного титрування (наприклад, TCID₅₀ або ПЛР за необхідності). Після відбору супернатанту клітини знову промивали стерильним PBS для видалення залишків середовища. Далі у кожен лунку додавали по 20 мкл розчину МТТ (5 мг/мл), що давало змогу провести кількісне визначення життєздатності клітин методом метаболічної активності.

Інкубацію з МТТ проводили при 37 °С у CO₂-інкубаторі з одночасним струшуванням на шейкері протягом 5 хвилин, що забезпечувало рівномірний контакт субстрату з клітинами. Після утворення кристалів формазану середовище видаляли, кристали розчиняли у 100–150 мкл 96% етанолу, й оптичну густину отриманих розчинів вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 540 нм за допомогою планшетного рідера Multiskan FC (Thermo Scientific, США). На підставі отриманих значень ОГ обчислювали відсоток пригнічення репродукції вірусу за аналогічною формулою:

$$\% \text{ інгібування} = \frac{\text{Ощдз} - \text{Ощкв}}{\text{Ощкк} - \text{Ощкв}} \times 100, \text{ де:}$$

ОЩ (дослід) — середня оптична щільність в експериментальній групі (обробленій витяжкою),

ОЩ (вірус. контр.) — оптична щільність у вірусному контролі,

ОЩ (клітин. контр.) — оптична щільність у клітинному контролі.

Окрім того, обчислювали концентрацію, за якої репродукція вірусу зменшувалась на 50% порівняно з вірусним контролем (EC₅₀). Для цього будували криву "доза-відповідь", що давала змогу встановити ефективну концентрацію препарату.

Оцінку ефективності витяжок здійснювали відповідно до критеріїв, запропонованих у статті Kohn et al. (2015). Згідно з цією шкалою:

зменшення титру вірусу на ≥ 2 lg (тобто $\geq 99\%$) вказує на виражену протівірусну дію;

пригнічення на рівні 97–99% свідчить про помірну активність;

рівень інгібування нижче 97% інтерпретується як слабка дія .

Відтак, комплексна оцінка впливу рослинних витяжок на аденовірус в клітинній культурі дозволила визначити як профілактичний (за попередньої обробки клітин), так і терапевтичний потенціал сполук за низкою біологічних показників — цитопротекторною дією, активністю мітохондрій та ступенем зменшення вірусного навантаження [63].

2.8. Визначення інфекційного титру новоутвореного вірусу

Клітини оброблялися відповідно до раніше встановлених процедур інфікування та інкубації, із використанням досліджуваних витяжок. По завершенні періоду експозиції (5–7 днів) з кожної лунки 96-лункової планшети обережно відбирали супернатант – культуральне середовище, яке містило вільно циркулюючі віріони знову утвореного вірусу. Для подальшої оцінки інфекційної активності вірусу в даних зразках, визначали його титр, шляхом інфікування нової культури клітин.

Перед використанням, супернатанти тричі піддавали циклам заморожування-розморожування, для руйнування клітинних структур та вивільнення внутрішньоклітинного вірусу, що збільшувало точність визначення загального вірусного навантаження. Після цього, зразки послідовно розводили десятикратно у стерильному середовищі, готуючи серію розведень для титрування.

Клітини лінії Vero попередньо вирощували у 96-лункових планшетах з плоским дном до утворення щільного моношару. Надалі, в кожному лунку додавали по 50 мкл відповідного розведення супернатанту. Інкубацію проводили впродовж 1,5 години при температурі 37 °C у середовищі з 5% CO₂, з метою забезпечення повноцінної адсорбції вірусу на поверхні клітин.

Після завершення адсорбційного етапу, в кожному лунку додавали 150 мкл підтримуючого середовища без сироватки, що сприяло підтримці метаболізму клітин, без додаткових факторів росту, які могли б вплинути на реплікацію вірусу. Лунки, в які не вносили вірус, використовували як негативний контроль, що демонструвало нормальну життєздатність неінфікованих клітин. Як позитивний контроль застосовували супернатанти з попередніх досліджень, в яких клітини були інфіковані відомою кількістю вірусу, без впливу досліджуваних речовин.

Через 7 днів після інфікування, проводили оцінку життєздатності клітин. Кожну лунку промивали стерильним фосфатно-сольовим буфером (PBS) для видалення залишків середовища та неклітинного сміття, після чого вносили по 20 мкл розчину МТТ (концентрація 5 мг/мл) для візуалізації активності мітохондрій клітин. Після інкубації та розчинення кристалів формазану, як було описано в попередніх розділах, вимірювали оптичну густину (ОГ) отриманих розчинів при довжині хвилі 540 нм, використовуючи планшетний спектрофотометр Multiskan FC (Thermo Scientific, США).

Для оцінки інфекційної активності вірусу, визначали інфекційний титр, тобто розведення, при якому оптична щільність у зразках знижувалася на 50% в порівнянні з клітинним контролем. Результат виражали в TCID₅₀/мл (50% Tissue Culture Infectious Dose на 1 мл), що є загальноприйнятим кількісним показником титру інфекційного вірусу в культурі тканин.

Противірусну дію витяжок оцінювали за рівнем зменшення титру вірусу в експериментальних зразках у порівнянні з вірусним контролем. Для цього використовували таку формулу: контролем. Результат виражали у TCID₅₀/мл (50% Tissue Culture Infectious Dose на 1 мл), що є стандартизованим кількісним показником титру інфекційного вірусу в культурі тканин.

Противірусну дію витяжок оцінювали за величиною зниження титру вірусу в дослідних зразках у порівнянні з вірусним контролем. Для цього застосовували таку формулу:

зниження інфекційного титру $Ig = A - B$, де A – титр вірусу у контролі, а B – титр вірусу у досліді.

Відповідно, здобуті результати дали можливість не тільки визначити кількісно противірусну дію кожної витяжки, а й зіставити їх між собою, враховуючи силу впливу та можливу терапевтичну цінність.

2.9. Визначення віруліцидної дії (на позаклітинний вірус)

З метою дослідження прямої дії біологічно активних сполук рослинних витяжок на віріони вірусу *in vitro* було проведено оцінювання їхньої віруліцидної здатності. Методика базувалася на змішуванні однакових об'ємів вірусної суспензії та розчинів досліджуваних речовин у заздалегідь встановлених нетоксичних концентраціях, які не викликають цитопатичного ефекту на клітинну культуру.

Підготовлену суміш інкубували за температури 37 °C у вологому середовищі, насиченому 5% CO₂, впродовж трьох проміжків часу: 5, 15, 30 або 60 хвилин. Метою було змодельовати різний ступінь безпосереднього контакту

активних сполук з вірусними частинками задля подальшого порівняння рівня їх дезактивації.

По закінченню інкубації суміш піддавали десятикратному серійному розведенню в середовищі, придатному для інфікування клітинної культури. Отримані розведення об'ємом 50 мкл вносили в лунки 96-лункових планшетів з попередньо сформованими моношарами клітин лінії Vero, що характеризуються високою чутливістю до аденовірусів. Планшети інкубували ще 1 годину при 37 °С у присутності 5% CO₂ для забезпечення адсорбції залишкового активного вірусу.

Паралельно були включені два контрольні зразки:

вірусний контроль — клітини, інфіковані вірусом без обробки витяжками (визначає 100% інфекційності);

клітинний контроль — неінфіковані клітини, що дозволяє оцінити базову життєздатність.

Після адсорбції зразків живильне середовище з вірусом видаляли, і до кожної лунки вносили 150 мкл підтримуючого середовища, яке містило: 49% середовища DMEM (Biowest, Франція), 49% RPMI-1640 (Biowest, Франція), 2% інактивованої сироватки великої рогатої худоби (Biowest, Франція), гентаміцин у концентрації 100 мкг/мл.

Через визначений період реплікації проводили оцінку цитопатичної дії шляхом фарбування. Для цього використовували два методи: фарбування кристалічним фіолетовим (у випадку грипозного вірусу) або МТТ-тест — стандартний метаболічний тест життєздатності клітин.

На основі отриманих значень оптичної густини визначали титр залишкового вірусу методом розрахунку 50% інфікуючої дози в культурі тканин (TCID₅₀/мл), згідно із загальноприйнятими методичними рекомендаціями. Подальше визначення віруліцидної активності досліджуваних речовин здійснювали за такою формулою:

$Ig = A - B$, де A — титр вірусу у вірусному контролі (інфіковані, необроблені клітини), B — титр вірусу у дослідному зразку (інфіковані клітини, оброблені витяжками).

Різниця між цими значеннями демонструє ступінь прямої дезактивації вірусу під впливом досліджуваної речовини, без залучення клітинних механізмів. Отримані дані давали змогу об'єктивно оцінити потенціал речовини як віруліциду, тобто агента, здатного інактивувати віріони поза клітиною.

2.10. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку експериментальних даних було здійснено для кількісної оцінки протівірусної активності спиртових витяжок з рослин роду *Tagetes*. Ключовим показником, який аналізували, був вірусний титр ($TCID_{50}/мл$), отриманий після зараження клітинної культури Vero супернатантами з дослідних зразків. Всі дослідження було проведено не менше ніж у трьох повторах, що гарантувало статистичну вірогідність результатів.

Оцінювання протівірусної дії було засновано на визначенні ступеня зменшення вірусного титру у дослідних зразках у порівнянні з вірусним контролем. [64].

Усі обчислення, включаючи середні арифметичні та стандартні відхилення, були проведені в середовищі Microsoft Excel. Це ж програмне забезпечення було застосовано для створення графічного відображення динаміки вірусного титру в залежності від концентрації витяжок.

Цей метод дозволив визначити загальну тенденцію дозозалежного пригнічення розмноження вірусу та провести порівняльну оцінку активності досліджуваних зразків.

2.11. Фотодокументація результатів досліджень

Для документування візуальних змін морфології клітин, визначення проявів цитопатичної дії вірусів, а також для оцінки загального вигляду клітинних культур після інкубації з тестованими зразками, застосовувалося цифрове фотографування. Зокрема, було використано цифрову фотокамеру Canon Digital IXUS 80 IS, яка забезпечувала необхідну роздільну здатність для отримання високоякісних, деталізованих зображень при роботі з клітинними культурами в мікроскопічному режимі. Фотознімки виконувалися безпосередньо через окуляр інвертованого мікроскопа. Це дозволило зафіксувати зміни в морфології клітин, щільність клітинного шару, а також зареєструвати присутність або відсутність цитопатичних ефектів (ЦПЕ), викликаних вірусною інфекцією або дією досліджуваних витяжок.

Подальша обробка отриманих зображень здійснювалася за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office Picture Manager, адаптованого для використання на платформі Pentium Pro. У цій програмі проводилося базове редагування параметрів зображень: корекція яскравості та контрасту, кадрування, а також збереження файлів у форматах, що підходять для включення у звітну документацію та графічні матеріали до магістерської роботи.

РОЗДІЛ 3 ЦИТОТОКСИЧНА ДІЯ ТА АНТИАДЕНОВІРУСНА АКТИВНІСТЬ ВИТЯЖОК

3.1. Цитотоксична дія витяжок чорнобривців

Першим кроком дослідження було вивчення цитотоксичної дії спиртових витяжок з рослин чорнобривців (*Tagetes*) на культуру клітин Vero. Для цього витяжки додавалися до складу підтримуючого середовища у вигляді двократних серійних розведень, що дозволяло отримати діапазон розведень від 1:10 до 1:1600. Кожне розведення тестувалося в чотирьох повторах з обов'язковим включенням контрольних зразків, у які витяжки не додавалися, що забезпечувало коректність отриманих результатів і можливість об'єктивного порівняння.

Після внесення витяжок клітинні культури інкубувалися в стандартних умовах при температурі 37 °C у середовищі з 5% вмістом вуглекислого газу протягом трьох діб. По завершенні інкубації до кожної лунки вносилися розчин тетразолію – МТТ (метилтіазолілдифенілтетразолій бромід), який дозволяє оцінити життєздатність клітин шляхом вимірювання метаболічної активності. Методом спектрофотометрії визначалася оптична густина в кожній із лунок, що містили різні концентрації витяжок.

Перед проведенням спектрофотометричного дослідження виконувалася візуальна інспекція зразків з метою візуальної оцінки цитопатичності та перевірки на контамінацію. Еталонною вважалася лунка без витяжки, в якій видно сформований моношар, ядро чітко окреслене та округле, чітко розташовано по центру клітини, як на рисунку 3.1.



Рис. 3.1. Моношарова культура клітин Vero (збільшення x70)

У витяжки з суцвіть *Tagetes tenuifolia* у найменших розведеннях (1:50 та 1:100) відмічався чітко виражений цитотоксичний вплив, який проявлявся у порушенні структури моношару, виникненні вакуолізованих та заокруглених клітин, вказуючи на втрату зчеплення з поверхнею планшета (рис 3.2). При використанні розведень 1:200 і 1:400 токсичний ефект поступово знижувався, хоча й залишався видимим. У більших розведеннях (1:800 та 1:1600) морфологія клітин майже не відрізнялася від контролю клітин, що вказує на відсутність токсичної дії за низьких концентраціях речовини.

Ефект витяжки суцвіть *Tagetes patula* загалом нагадує характер дії витяжки з суцвіть *Tagetes tenuifolia*. Найбільш помітні пошкодження клітин були зафіксовані при розведеннях 1:50 та 1:100, клітини втрачали свою щільність, формувалися просвіти, збільшувалася кількість округлих клітин.

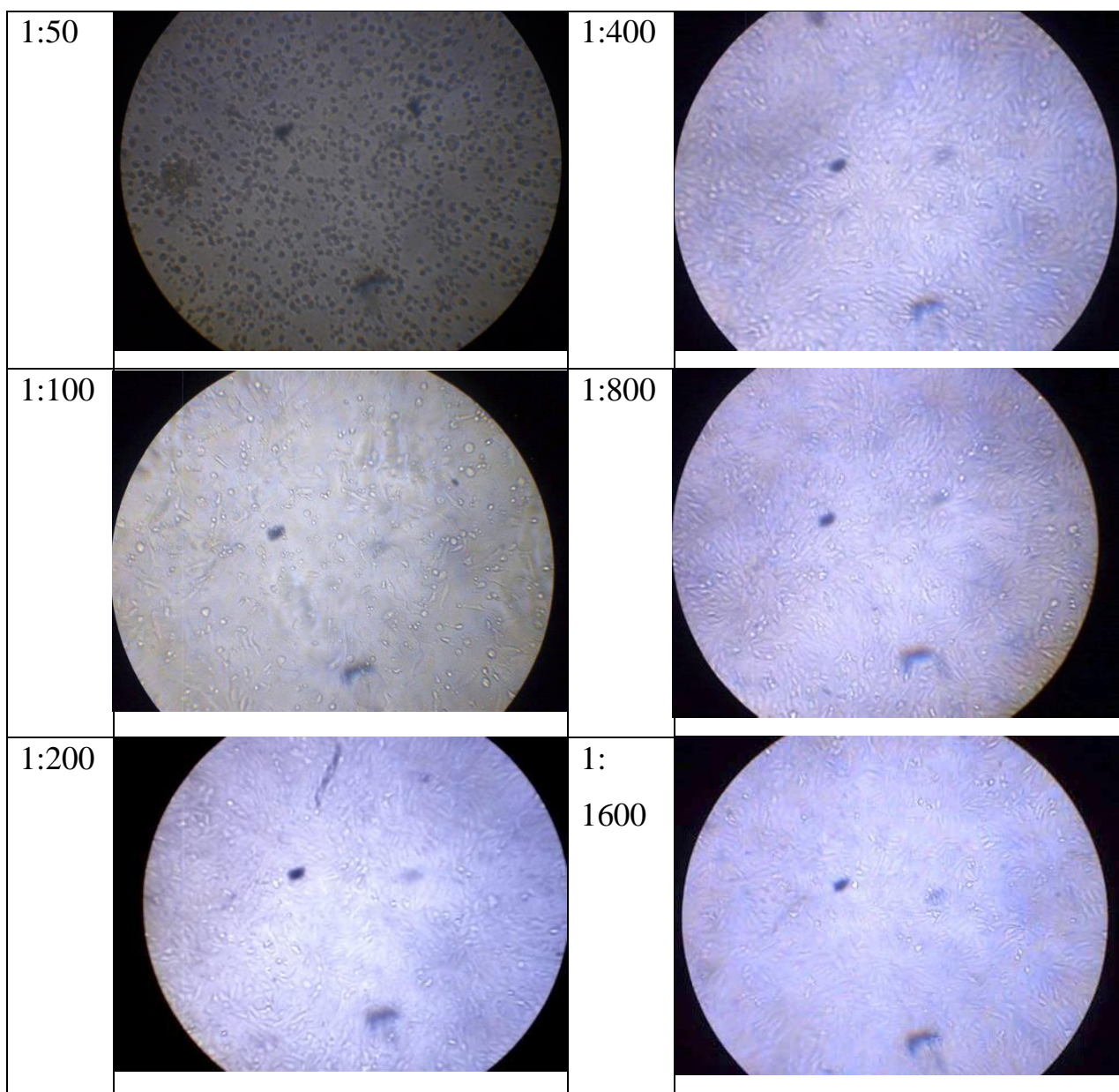


Рис. 3.2. Цитопатичний вплив різних розведень витяжок суцвіть *Tagetes tenuifolia* L.

При розведеннях 1:200 та 1:400 токсичність була помірно виражена, у той час як при 1:800 та 1:1600 клітини не демонстрували ознак пошкодження, що свідчить про залежність токсичного впливу від концентрації речовини.

Витяжка зеленої маси *Tagetes lucida* демонструвала найнижчу цитотоксичність серед усіх досліджених. Навіть у концентрованому вигляді (1:50 та 1:100) пошкодження клітин були мінімальними або помірними — зберігалася щільність, форма клітин лише незначно відрізнялася від контролю.

У розведеннях 1:200 і більше повністю зберігалася характерна морфологія клітин.

Витяжка зеленої маси *Tagetes patula* була найменш токсичний з усіх досліджених зразків. Навіть у високих концентраціях (1:50 та 1:100) спостерігалися лише незначні ушкодження клітин, або їх не було взагалі – щільність моношару лишалася високою, а форма клітин мало відрізнялася від контрольної групи. У розведеннях 1:200 структура клітин повністю зберігалася, що вказує на її безпечність при використанні у біомедичних дослідженнях.

На наступному етапі проводили спектрофотометричне дослідження. Як еталон брали оптичну густину клітин у контрольних зразках, яку приймали за 100% життєздатності. Порівнюючи ці дані з показниками лунок, у які були додані витяжки, ми розраховували відсоткове співвідношення життєздатних клітин для кожного конкретного розведення.

Отримані результати свідчать про те, що спиртові витяжки з чорнобривців дійсно чинять цитотоксичну дію, яка виявляється в залежності від концентрації. На рисунку 3.3 наочно представлено ступінь зниження життєздатності клітин у присутності різних розведень витяжок, що дозволяє простежити характерну дозозалежну відповідь клітинної культури. За результатами спостережень можна зробити висновок, що досліджувані витяжки демонстрували різний ступінь токсичності, що в подальшому є важливим фактором для визначення допустимих концентрацій при оцінці їх противірусної активності проти аденовірусів.

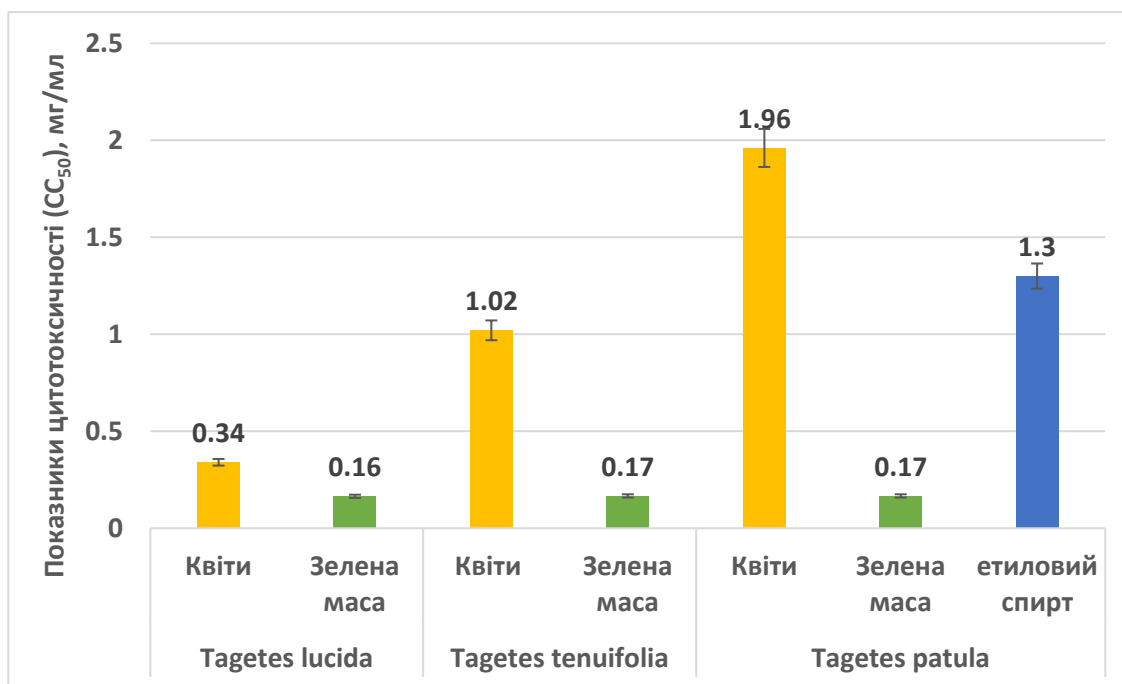


Рис. 3.3. Цитотоксична дія витяжок в культурі клітин Vero через 3 доби після внесення, визначена МТТ аналізом.

Результати, що презентовані на рисунку 3.3 беззаперечно підкреслюють суттєву відмінність у показниках цитотоксичності між витяжками, отриманими з квіткових частин та вегетативних (зелених) частин рослин роду *Tagetes*. Згідно з отриманими результатами, витяжки, виготовлені з суцвіть, загалом демонструють більш виражений цитотоксичний потенціал, що проявляється у зниженні життєздатності клітин навіть при менших концентраціях зразків. На противагу цьому, витяжки із зеленої маси тих самих видів характеризуються меншою токсичністю, що дає підстави розглядати їх як менш ризиковані для застосування у біологічних тест-системах.

Виявлена різниця між типами витяжок підтверджує припущення про визначальну роль ботанічного джерела сировини у формуванні біологічних властивостей препарату. Імовірно, хімічний склад суцвіть рослин збагачений сполуками з вираженою біологічною активністю (зокрема, ефірними оліями, терпеноїдами, фенольними кислотами), які можуть проявляти як протівірусну, так і цитотоксичну дію.

Отже, у процесі подальших досліджень противірусної активності рослинних витяжок є необхідним обов'язково враховувати не тільки вид рослини, а й тип використаної сировини (суцвіття чи зелена маса). Це дасть змогу збільшити точність оцінки біологічної дії препаратів, зменшити ймовірність небажаних наслідків та забезпечити відтворюваність результатів. У контексті пошуку фітопрепаратів із селективною противірусною дією, першорядним є вибір такої концентрації витяжки, що гарантує максимальний противірусний ефект за мінімального пошкодження клітинної культури.

У ході проведеного дослідження встановлено, що серед усіх проаналізованих спиртових витяжок суцвіть найвищий рівень цитотоксичності продемонструвала витяжка, отримана з квітів *Tagetes lucida*. Її токсична дія була вираженою при менших концентраціях порівняно з іншими представниками роду *Tagetes*, про що свідчить значення показника CC_{50} , яке становило 0,34 мг/мл. Ще більш токсичною виявилася витяжка, отримана з вегетативної (зеленої) маси цього ж виду, її CC_{50} склала 0,16 мг/мл. Ці результати свідчать про більшу токсичність екстрактів *Tagetes lucida* у досліджуваній клітинній моделі, зокрема в культурі Vero. Проаналізовані дані дозволяють зробити висновок, що рівень цитотоксичності рослинних екстрактів визначається не лише ботанічним видом чорнобривців, а й конкретною частиною рослини, з якої було виготовлено витяжку. Так, витяжки з суцвіть *Tagetes patula* виявили відносно нижчий токсичний ефект, зокрема щодо морфологічного стану клітин та збереження їх функціональної активності.

Витяжки, отримані із зеленої маси всіх видів чорнобривців, виявилися більш токсичними. Вони пригнічували не лише загальну життєздатність клітин, але й негативно впливали на мітохондріальну, що є свідченням глибших змін у метаболічних процесах клітинної культури. Для таких витяжок рівень CC_{50} був найнижчим серед усіх досліджених зразків і варіювався в межах від 0,16 до 0,17 мг/мл.

3.2. Антивірусна активність витяжок чорнобривців

Наступним кроком проводилось дослідження антиаденовірусної активності спиртових витяжок з рослин *Tagetes* було здійснено первинне тестування нових речовин у культурі клітин з використанням вірусочутливих клітинних ліній. На цьому етапі визначальною умовою є застосування стандартизованих вірусних штамів, для яких заздалегідь встановлено інфекційний титр, а також відома кратність інфікування клітин. Такий підхід забезпечує відтворюваність та об'єктивність результатів при оцінці протівірусної дії речовин.

У вірусологічній практиці основним критерієм наявності активного інфекційного вірусу вважається його здатність спричинити помітні морфологічні зміни в клітинній культурі. Ці зміни проявляються у вигляді цитопатогенного ефекту, що включає дегенерацію або руйнування моношару клітин, характерну для взаємодії з вірусом, як це відображено на рисунку 3.4. Окрім цього, для візуалізації вірусної інфекції часто використовують метод утворення бляшок: у середовище додається агаровий шар, під яким вірус здатен індукувати формування локалізованих зон руйнування клітин — так званих фокусів деградації, які чітко помітні при мікроскопічному аналізі, як представлено на рисунку 3.5.

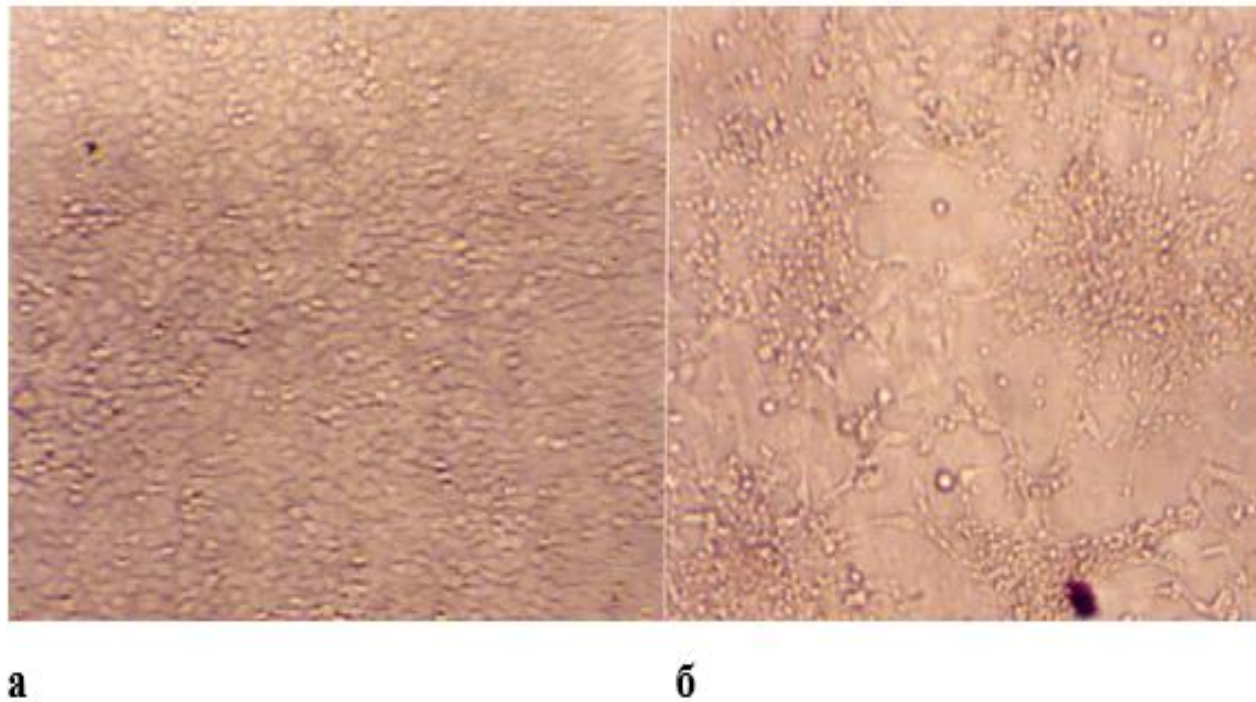


Рис. 3.4. Деструкція моношару клітин Vero за репродукції аденовірусу: а) неінфіковані клітини; б) утворення «грон винограду» через 5 діб після інфікування клітин аденовірусом людини 2 серотипу

Таким чином, проведення первинної оцінки протівірусної активності базується на інтеграції морфологічних спостережень за станом клітинного моношару після дії як вірусу, так і досліджуваної речовини, що дозволяє встановити не лише ефективність, а й потенційну токсичність зразків до початку подальших глибших аналізів. Інші методи визначення інфекційного вірусу ґрунтуються на виявленні інфікованих клітин за наявності в них вірусного антигену (рис. 3.5) або внутрішньоядерних вірусних тілець-включень чи вірусної нуклеїнової кислоти (рис.3.6).

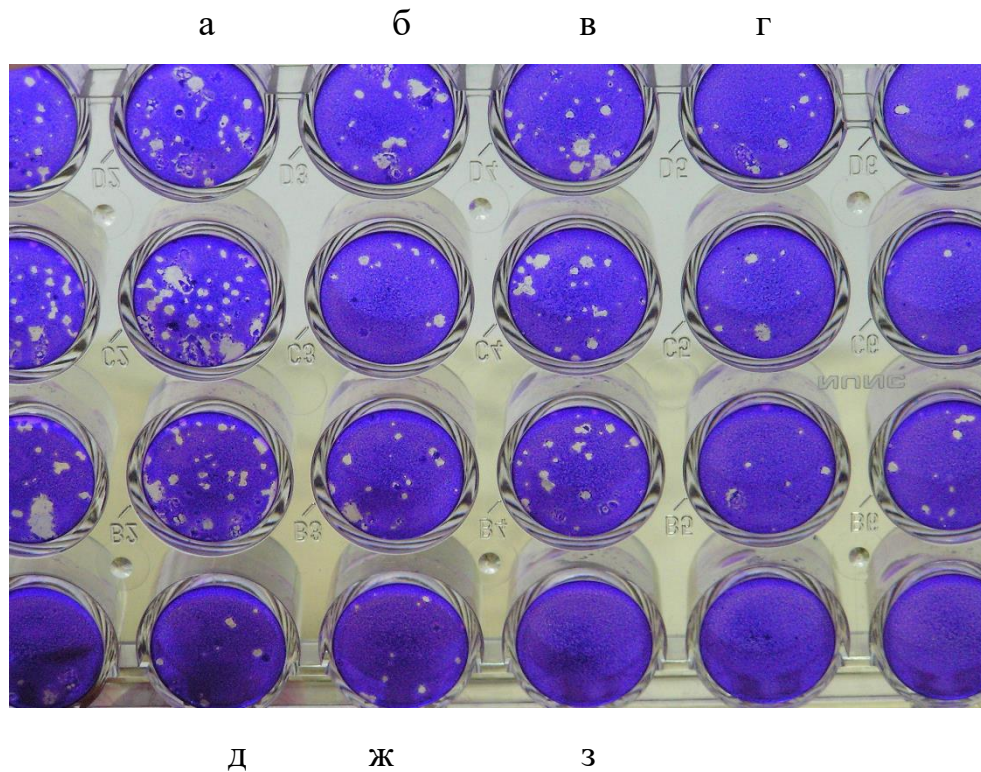


Рис. 3.5. Утворення бляшок під 0,5% агаровим покриттям через 120 год після інфікування аденовірусом моношару клітин. Розведення вірусу по вертикалі в трьох повторах: а) 10^{-1} , б) 10^{-2} , в) 10^{-3} , г) 10^{-4} , д) 10^{-5} , е) 10^{-6} , по горизонталі: ж) 10^{-7} , з) неінфіковані клітини.

У світовій практиці дослідження антивірусної активності речовин на першому етапі зазвичай проводять в культурі клітин, застосовуючи методи, такі як редукція бляшок. Цей метод, подібно до визначення цитопатогенного ефекту (ЦПД), ґрунтується на спостереженні за дегенерацією моношару клітин, інфікованих вірусом. Однак на відміну від методу ЦПД, метод бляшок є кількісним, що дозволяє оцінити вплив досліджуваних речовин на репродукцію вірусу, визначаючи зменшення кількості бляшок у відсотковому співвідношенні.

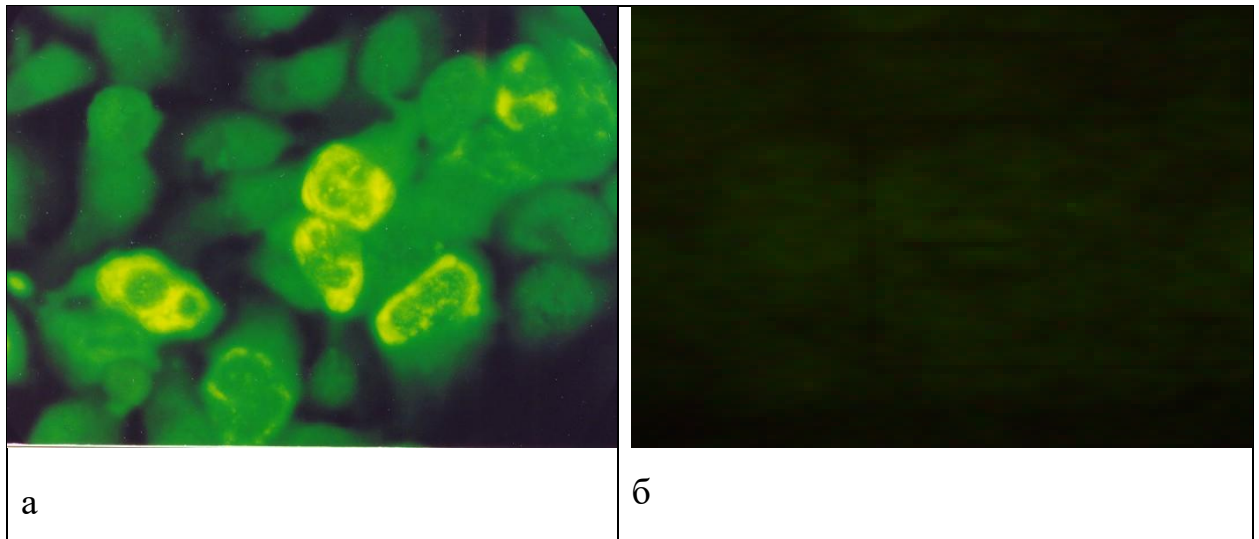
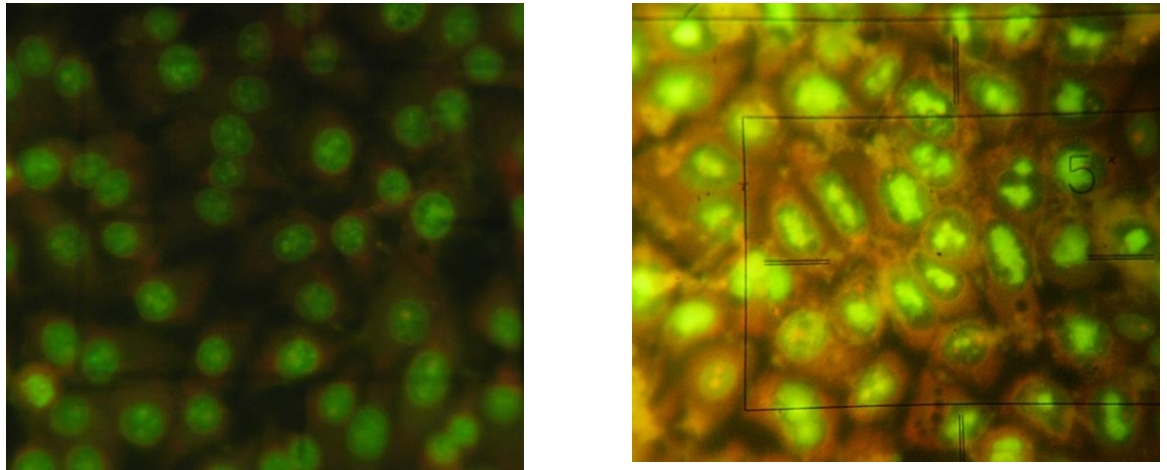


Рис. 3.6. Виявлення антигену гексону в інфікованих аденовірусом клітинах через 48 год після інфікування: а - антиген в ядрах інфікованих клітин, оброблених сироваткою кроля проти гексону аденовірусу та антисироваткою до імуноглобулінів кроля, міченою FITC; б - контроль неінфікованих клітин. Непрямий МФА (280х).

У рамках дослідження в Інституті мікробіології та вірусології НАН України застосовується цитоморфологічний метод для виявлення інфікованих клітин, що полягає в фарбуванні фіксованого моношару клітин за допомогою акридинового оранжевого (АО). Цей метод дає змогу виявляти вірусні ДНК-вмісні включення в ядрах інфікованих клітин, що є специфічними для вірусної інфекції. Водночас цей метод є кількісним і за своєю природою відповідає методу бляшкоутворення, що дозволяє точно визначати ступінь впливу вірусу та ефективність різних речовин у боротьбі з вірусною інфекцією. Метод є кількісним та відповідає методу бляшкоутворення (рис.3.7).



а

б

Рис. 3.7. ДНК-вмісні вірусні включення в ядрах інфікованих аденовірусом людини 2 серотипу клітин (через 48 год після зараження): а - не інфіковані та б – інфіковані вірусом клітини. Люмінісцентна мікроскопія флюорохромованих 0,01% розчином акридинового оранжевого клітин (280х).

В дослідженнях антивірусної активності витяжок чорнобривців ми використали метод виявлення вірусної ЦПД, оснований на дегенерації моношару інфікованих клітин з використанням МТТ аналізу для кількісного визначення оптичної щільності клітин. Результати дії витяжок виражались в зниженні титру вірусу (\lg ТЦД₅₀/мл) при різних розведеннях витяжок (від 1:50 до 1:1600).

3.4. Аналіз результатів титрування зразків відібраних при терапевтичному застосуванню витяжок чорнобривців.

Вивчення протівірусної активності витяжок з чорнобривців за терапевтичним протоколом починалося з інфікування клітинної культури Vero аденовірусом 2 серотипу у розведенні 1:10. В кожную лунку вводили по 50 мкл вірусного інокуляту, після чого проводили адсорбцію протягом 1,5 години при температурі 37 °С в атмосфері 5% CO₂. По завершенні адсорбції, у відповідні лунки додавали заздалегідь приготовані розведення спиртових екстрактів

(1:50–1:1600) з концентрацією 2-0,25 мг/мл, виготовлених на основі 70% етанолу. Кожен зразок виконувався в трьох повторах. Через 5 діб інкубування суспензії клітин з лунок відбирали для подальшого титрування вірусу, що дало можливість оцінити ступінь пригнічення реплікації вірусу.

Оцінку протівірусного впливу проводили через 120 години після зараження. Аналіз клітинної морфології показав виражений захисний ефект деяких екстрактів, особливо №2 (квіти *T. tenuifolia*) та №4 (зелена маса *T. lucida*), які зменшували прояви цитопатичних змін порівняно з вірусним контролем. Відмічене часткове збереження моношару клітин та зменшення ступеня округлення та деструкції клітин. Це може вказувати на здатність певних компонентів рослинних екстрактів гальмувати розмноження вірусу вже після його проникнення в клітини.

Результати титрування показали, що обробка клітин Vero спиртовими витяжками з рослин чорнобривців призвела до значного зменшення титру вірусу в порівнянні з контрольними зразками. Зокрема, спостерігалось зниження титру вірусу в межах від 2,5 до 4,9 lg ТЦД₅₀/мл. Як видно з графіку на рисунку 3.8 більш виражену активність продемонстрували витяжки з зеленої маси чорнобривців, коли їх вводили одразу після адсорбції вірусу. Найзначніше зниження титру вірусу було зафіксовано у зразку №5 з зеленої маси *T. tenuifolia*, де титр вірусу зменшувався до 4,9 lg ТЦД₅₀/мл в концентраціях 1 та 0,5 мг/мл. Досить виразну активність також виявив зразок №6 з зеленої маси *Tagetes patula*, особливо в концентрації 0,5 мг/мл. Інші зразки продемонстрували помірну активність, що виражалось у зниженні титру вірусу на рівні від 0,2 до 2,9 lg ТЦД₅₀/мл, в залежності від концентрації.

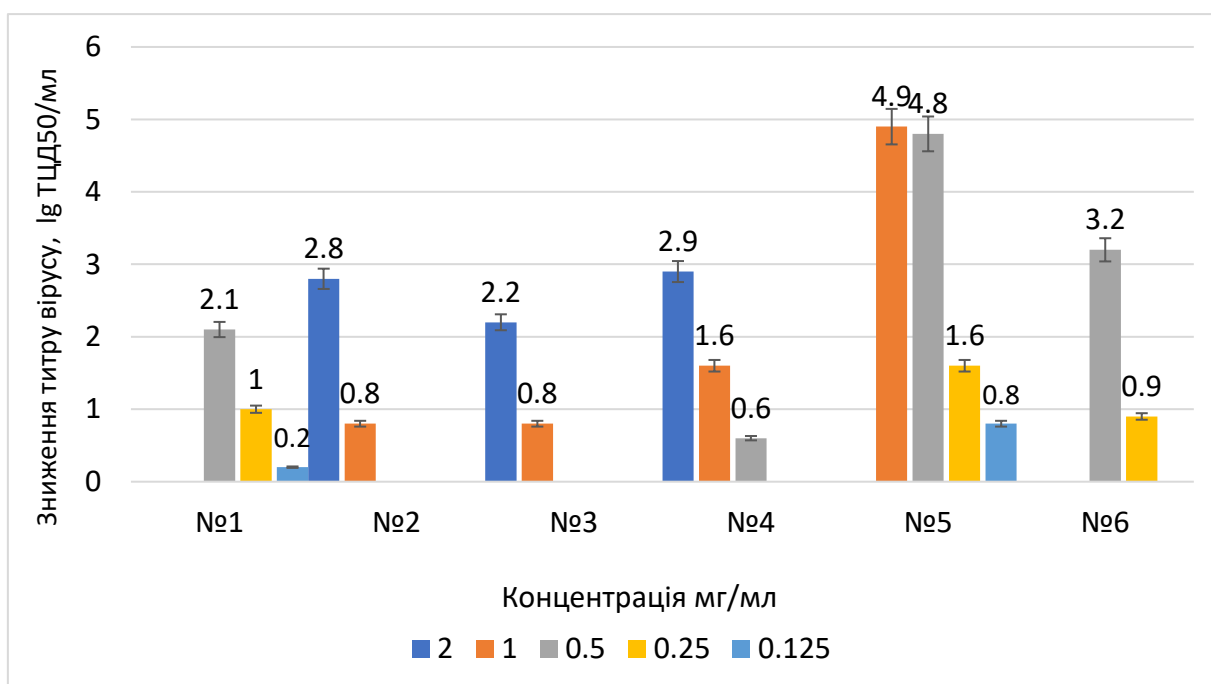


Рис. 3.8. Зниження титру вірусу в зразках відібраних при терапевтичному застосуванні витяжок чорнобривців.

Таким чином, застосування спиртових витяжок з чорнобривців для лікувальних цілей ефективно знижує титр аденовірусу в культурі клітин Vero, що свідчить про їх потенційну противірусну активність.

3.5. Аналіз результатів титрування зразків відібраних при профілактичному застосуванні витяжок чорнобривців.

При вивченні противірусної активності за профілактичним протоколом, екстракти вводили до клітинної культури за 24 год до зараження. Заздалегідь приготовані розведення екстрактів додавали до клітин Vero об'ємом 200 мкл/лунку. Інкубацію здійснювали в стандартних умовах (37 °C, 5% CO₂) протягом 24 годин. Через добу екстракти видаляли, а клітини інфікували HAdV-2 у розведенні 1:10 (по 50 мкл/лунку), адсорбція тривала півтори години. Після чого в кожен лунку додавали 150 мкл підтримуючого середовища.

Суспензії клітин з лунок відбирали для подальшого титрування вірусу, що дало можливість оцінити ступінь пригнічення реплікації вірусу екстрактами для профілактики.

Для цього використовувався визначення зниження титру вірусу, який виражався в логарифмічному значенні \lg ТЦД₅₀/мл. Такий підхід дозволяє оцінити ефективність пригнічення вірусу під впливом рослинних екстрактів і визначити оптимальні концентрації для їх профілактичного використання. Результати експерименту показали, що всі досліджені витяжки мали певну противірусну активність, яка залежала від концентрації.

Найбільше зниження титру вірусу спостерігалось при використанні витяжок вищих концентрацій. Водночас було виявлено закономірність: зниження концентрації екстракту призводило до значного зменшення противірусної активності в більшості зразків, що ілюструється на рисунку 3.9.

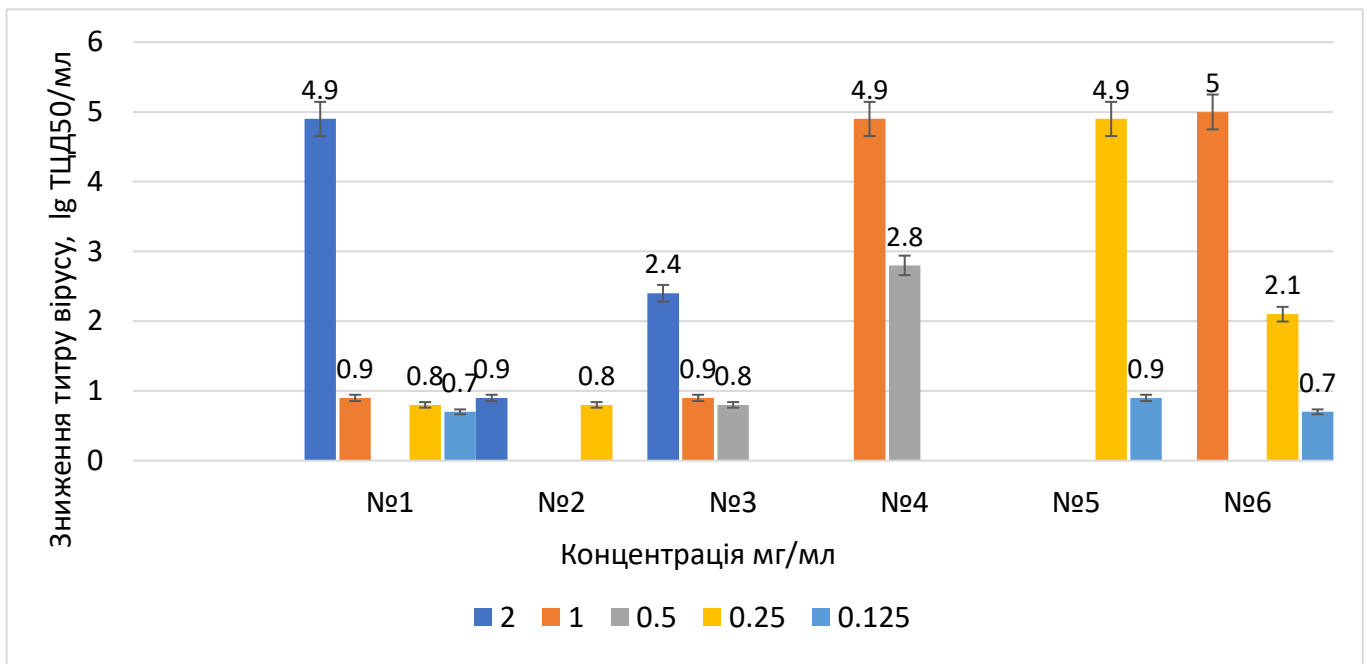


Рис. 3.9. Зниження титру аденовірусу в зразків відібраних при профілактичному застосуванні витяжок чорнобривців.

Найбільш виражену ефективність виявили витяжки зразків №5 та №6 (зелена маса *T. tenuifolia* та *T. patula.*), які в концентраціях 0,25 та 1 мг/мл

знижували титр вірусу на 4,9-5 lg ТЦД₅₀/мл, що свідчить про значну антивірусну активність цих екстрактів.

Трохи менший, але все одно значущий ефект спостерігався зразку №4 (зелена маса *T. lucida*), особливо в концентраціях 1 мг/мл, де титр вірусу знижувався більше ніж на 4 lg ТЦД₅₀/мл. Зразки №2 та №3 продемонстрували помірну антивірусну активність, хоча при високих концентраціях, також спостерігалось значне зниження вірусного навантаження. Це може свідчити про менший вміст біологічно активних речовин у цих екстрактах або відсутність якогось з метаболітів. Загалом, аналіз результатів підтверджує, що профілактичне застосування витяжок чорнобривців має виражений противірусний ефект, оскільки спостерігається значне зниження титру вірусу в клітинних культурах. Висока противірусна активність цих витяжок, ймовірно, зумовлена наявністю біологічно активних сполук, таких як флавоноїди, терпеноїди та інші метаболіти, які мають антивірусні властивості.

Отже, отримані дані підтверджують перспективність використання витяжок чорнобривців у профілактичних схемах для боротьби з вірусними інфекціями. Оптимальними концентраціями для профілактичного застосування витяжок з квітів виявились 2 та 1 мг/мл, оскільки вони забезпечують найбільше зниження титру вірусу. Для застосування витяжок з зеленої маси ефективна концентрація дещо нижче – від 0,25 мг/мл. Це відкриває нові можливості для подальших досліджень, спрямованих на розробку фітопрепаратів на основі чорнобривців, які можуть бути використані для профілактики вірусних захворювань.

3.6. Аналіз віруліцидної дії витяжок чорнобривців

Оцінювання прямої інактивації вірусу (віруліцидного ефекту) здійснювали шляхом інкубації однакових об'ємів вірусної суспензії HAdV2 і розведень рослинних екстрактів (1:10, 1:50, 1:100) в нетоксичних концентраціях. Експозиція тривала 60 хвилин за температури 37 °C у

зволоженому середовищі з 5% CO₂. По завершенні інкубації суміш піддавали десятикратним серійним розведенням та вносили у лунки з моношаром клітин Vero (по 50 мкл/лунку), з наступною адсорбцією протягом 1 години при 37 °С. Після адсорбції до лунок додавали підтримуюче середовище (без сироватки) об'ємом 150 мкл та інкубували 5–7 діб. По завершенні інкубації оцінювали залишкову життєздатність клітин за допомогою МТТ-тесту. Дослідні значення відсотку живих клітин зіставляли з контролем: вірусним (інфіковані, але необроблені) та клітинним (неінфіковані).

Основним критерієм ефективності засобів з віруліцидною дією є їх здатність за короткий час контакту з вірусом повністю блокувати його репродукцію або знижувати інфекційний титр тестового вірусу на не менше ніж 2 lg ТЦД₅₀/мл у порівнянні з контролем. Визначали інфекційний титр вірусу (lg ТЦД₅₀/мл) та результати порівнювались з титром контролю вірусу. Усі витяжки, отримані з чорнобривців, продемонстрували певну віруліцидну дію. Найбільшу здатність знижувати титр вірусу виявили екстракти №4 з зеленої маси *T. tenuifolia* та №5 з квітів *T. patula*, які зменшували вірусний титр до 1,6 lg ТЦД₅₀/мл. Цей результат свідчить про середню ефективність екстрактів нейтралізувати аденовірус, що наочно продемонстровано на рисунку 3.10.

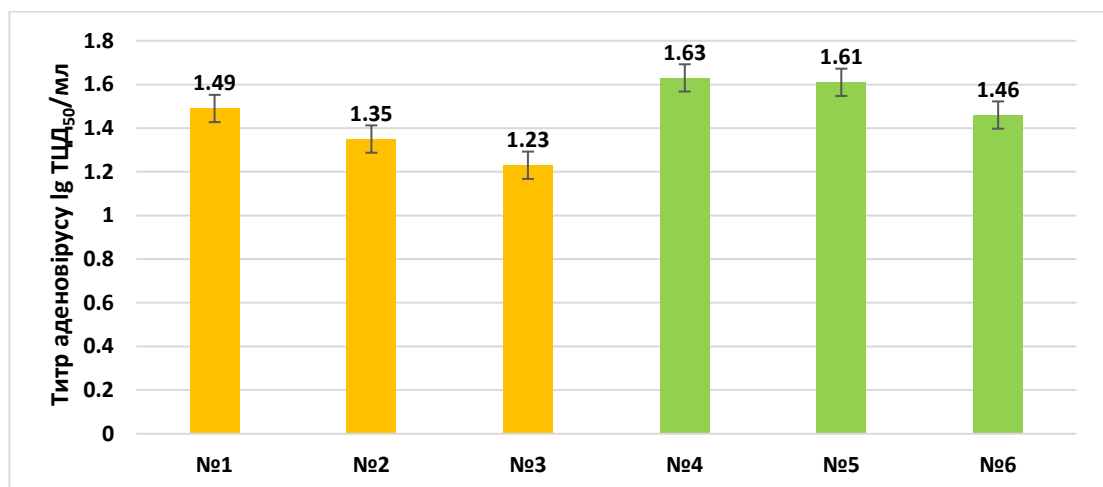


Рис. 3.10. Віруліцидна дія витяжок чорнобривців за 1 год контакту з аденовірусом (титр у контролі вірусу становив $5,67 \lg$ ТЦД₅₀/мл).

Таким чином, витяжки чорнобривців інактивували позаклітинний аденовірус людини 2 серотипу за 1 год контакту з ним, а зразки №4 (зелена маса *T. lucida*) і №5 (зелена *T. tenuifolia*) виявилися найбільш ефективними.

ВИСНОВКИ

1. Отримано спиртові витяжки з суцвіть та зеленої маси чорнобривців різних видів (*T. lucida*, *T. tenuifolia*, *T. patula*) та досліджено їх вплив на морфологію та мітохондріальну активність культури клітин Vero.
2. Виявлено, що цитотоксичність витяжок чорнобривців залежить не лише від їх виду, а і від частини рослини, з якої отримано. Так, витяжки з суцвіть чорнобривців мали нижчий токсичний вплив як на морфологічні, так і на функціональні властивості клітин (показник CC_{50} , був у межах $<0,34$ мг/мл – $1,96$ мг/мл). Витяжки з зеленої маси чорнобривців всіх видів були більш токсичні (показник CC_{50} становив $0,16$ - $0,17$ мг/мл).
3. Показано, що при профілактичній схемі внесення найвищу ефективність продемонстрували зразки *T. patula*, які в концентрації $0,25$ мг/мл знижували титр аденовірусу на 4.9 lg ТЦД₅₀/мл. Інші витяжки також мали значний протиаденовірусний ефект.
4. Встановлено, що спиртові витяжки проявляють антиаденовірусну активність за терапевтичної схеми внесення. Витяжки з зеленої маси *T. tenuifolia* показали найвищу антивірусну активність за терапевтичною схемою, особливо в концентраціях, де титр вірусу знизився на 4.8 lg ТЦД₅₀/мл. Це вказує на значний противірусний ефект.
5. Встановлено, що спиртові витяжки чорнобривців проявляють помірну віруліцидну дію відносно вірусу аденовірусу 2 типу і знижують його інфекційний титр на $1,2$ – $1,6$ lg ТЦД₅₀/мл у порівнянні із контролем вірусу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Lynch Joseph P., Kajon A. E. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2016; 37(4): 586-602.
2. Galabov, A.S. Chemotherapy of Adenovirus Infections. 2019 / In book: *Adenoviruses*//Ed. Desheva Yu. P. 68–74.
3. Waye, M.M.Y., Sing, C.W. Anti-Viral Drugs for Human Adenoviruses. *Pharmaceuticals*. 2010; 3(10): 3343–3354.
4. Singh R., Kaur H., Kumar B. Therapeutic potential of *Tagetes erecta* against Influenza A virus via IL-6 inhibition: In vitro and in silico study.. 2023;38(5): 735-740.
5. Bahrami A., Rezaei M., et al. Anti-HSV activity of *Tagetes minuta* root extract. *Journal of Arak University of Medical Sciences Zhang Dis*. 2021;21(1):213.
6. Zygadlo J.A., et al. (2014). Essential oil composition and bioactivity of *Tagetes minuta* from different regions.
7. Gallardo J, Pérez-Illana M, Martín-González N, San Martín C. Adenovirus Structure: What Is New? *Int J Mol Sci*. 2021 May 15;22(10):5240
8. Lynch JP 3rd, Kajon AE. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin Respir Crit Care*
9. Shieh WJ. Human adenovirus infections in pediatric population - An update on clinico-pathologic correlation. *Biomed J*. 2022;45(1):38-49.
10. Cederwall S., Pålman L.I. Respiratory adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised adult patients. *Epidemiol Infect*. 2020 Jan
11. Beby-Defaux A, Maille L, Chabot S, Nassimi A, Oriot D, Agius G. Fatal adenovirus type 7b infection in a child with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Virol*. 2001;65(1):66-9..
12. Stasiak, A.C., Stehle, T. Human adenovirus binding to host cell receptors: a structural view. *Med Microbiol Immunol*. 2020; 209: 325–333

13. Pedro J de Pablo, Carmen San Martín, Seeing and touching adenovirus: complementary approaches for understanding assembly and disassembly of a complex virion, *Current Opinion in Virology*, Volume 52, 2022
14. Lenaerts L, Naesens L. Antiviral therapy for adenovirus infections. *Antiviral Research*. 2006;71:172-180
15. Аденовирус, клетка, организм / Дяченко Н.С., Нас И., Беренчи Д., Носач Л.Н., Ванцак Н.П., Тарасишин Л.А., Адам Е / Отв. Ред. Смирнов В.В. – Киев: Наук. думка, 1988.-232 с.
16. Akello, J.O., Kamgang, R., Barbani, M.T. et al. Genomic analyses of human adenoviruses unravel novel recombinant genotypes associated with severe infections in pediatric patients. *Sci Rep* 11, 24038 (2021).
17. Toth K., Spencer J.F., DDhar D., Sagartz J.E., Buller R.M., Paiter G.R., Wold W.S. Hexa-decyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus-induced mortality in a permissive immunosuppressed animal model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008
18. Murughan K, Chang G, Ngai M, Tang S, MacLaren G, Ramanathan K. Disseminated adenoviral disease in immunocompetent adults supported with extracorporeal membrane oxygenation. *J Thorac Dis*. 2020;12(5):2812-2819.
19. van Raaij MJ, Mitraki A, Lavigne G, Cusack S. A triple beta-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature*. 1999.
20. Radke JR, Cook JL. Human adenovirus infections: update and consideration of mechanisms of viral persistence. *Curr Opin Infect Dis*. 2018
21. van der Zalm MM, Sam-Agudu NA, Verhagen LM. Respiratory adenovirus infections in children: a focus on Africa. *Curr Opin Pediatr*. 2024
22. Dey SK, Shimizu H, Phan TG, et al. Molecular epidemiology of adenovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. *Infect Genet Evol*. 2009;9(4):518-522.

23. Guga G, Elwood S, Kimathi C, et al. Burden, Clinical Characteristics, Risk Factors, and Seasonality of Adenovirus 40/41 Diarrhea in Children in Eight Low-Resource Settings. *Open Forum Infect Dis.* 2022;
24. Tsoukas, R.L.; Volkwein, W.; Gao, J.; Schiwon, M.; Bahlmann, N.; Dittmar, T.; Hagedorn, C.; Ehrke-Schulz, E.; Zhang, W.; Baiker, A.; et al. A Human In Vitro Model to Study Adenoviral Receptors and Virus Cell Interactions. *Cells* 2022,
25. Celik, C., Gozel, M. G., Turkay, H., Bakici, M. Z., Güven, A. S., & Elaldi, N. (2015). Rotavirus and adenovirus gastroenteritis: Time series analysis. *Pediatrics International*, 57(4), 590-596. <https://doi.org/10.1111/ped.12592>
26. Guga G, Elwood S, Kimathi C, et al. Burden, Clinical Characteristics, Risk Factors, and Seasonality of Adenovirus 40/41 Diarrhea in Children in Eight Low-Resource Settings. *Open Forum Infect Dis.* 2022;9(7):ofac241. Published 2022 May 13. doi:10.1093/ofid/ofac241
27. Fong T, Phanikumar MS, Xagorarakis I, Rose JB 2010. Quantitative Detection of Human Adenoviruses in Wastewater and Combined Sewer Overflows Influencing a Michigan River. *Appl Environ Microbiol* 76:. <https://doi.org/10.1128/AEM.01316-09>
28. Qiu, Fz., Shen, Xx., Li, Gx. et al. Adenovirus associated with acute diarrhea: a case-control study. *BMC Infect Dis* 18, 450 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3340-1>
29. Paolino K, Sande J, Perez E, Loechelt B, Jantaussch B, Painer W, Anderson M, Tippin T, Lanier ER, Fry T, DeBiasi RL. Eradication of disseminated adenovirus infection in a pediatric hematopoietic stem cell transplantation recipient using the novel antiviral agent CMX001. *Journal of Clinical Virology.* 2011;50:167-170
30. Nezhoda, I. I., Asaulenko, A. A., & Kniazeva, V. I. (2016). ОСОБЛИВОСТІ КЛІНІЧНОГО ПЕРЕБІГУ НОРОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ДІТЕЙ. *Інфекційні хвороби*, 1(3), 47–50. <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2016.3.6889>
31. Naesens L, Lenaerts L, Andrei G, Snoeck R, Van Beers D, Holy A, Balzarini J, De Clercq E. Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and

- nucleotide analogues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49:1010-1016
32. Whitley RJ, Tucker BC, Kinkel AW, et al. Pharmacology, tolerance, and antiviral activity of vidarabine monophosphate in humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980;18(5):709-715. doi:10.1128/AAC.18.5.709
33. Toth K., Spencer J.F., DDhar D., Sagartz J.E., Buller R.M., Paiter G.R., Wold W.S. Hexa-decyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus-induced mortality in a permissive immunosuppressed animal model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:7293-7297
34. De Clercq E, Andrei G, Balzarini J, et al. Antiviral potential of a new generation of acyclic nucleoside phosphonates, the 6-[2-(phosphonomethoxy)alkoxy]-2,4-diaminopyrimidines. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2005;24(5-7):331-341. doi:10.1081/ncn-200059772
35. Galabov AS, Vassileva V, Karabasheva V. Inhibitory Effect of Abitylguanide on Adenovirus Replication. *Drug Res (Stuttg)*. 2017;67(10):583-590. doi:10.1055/s-0043-111014
36. Bertzbach L.D., Ip W.-H., Dobner T. Animal Models in Human Adenovirus Research. *Biology* 2021, 10, 1253. <https://doi.org/10.3390/biology10121253>
37. Ali S.I., Sheikh W.M., Rather M.A., et al. (2021). Medicinal plants: Treasure for antiviral drug discovery. *Phytotherapy Research*, 35(7), 3447–3483.
38. Повниця О. Ю., Білявська Л. О., Паньківська Ю. Б., Науменко К. С., Зелена Л. Б., Загородня С. Д., Атаманюк В. П. Протиаденовірусна активність препарату неофлазид *in vitro*. *Мікробіологічний журнал*. 2018; 80(5): 98-109. <https://doi.org/10.15407/microbiolj80.05.098>
39. ПРОТЕФЛАЗІД®: клінічний досвід / Науковий редактор Гриневич О. Й. – Київ. – 2024. – 478 с.
40. Повниця О. Ю., Білявська Л. О., Паньківська Ю. Б., Науменко К. С., Зелена Л. Б., Загородня С. Д., Атаманюк В. П. Протиаденовірусна активність препарату неофлазид *in vitro*. *Мікробіологічний журнал*. 2018;

41. Povnitsa O, Bilyavska L., Pankivska Yu., Likhanov A. , Dorovskyh A. , Lysenko V., Lokshin M., Zahorodnia S. In vitro Antiviral activity of leaf extracts *Plantago major*, *Plantago lanceolata*, *Rubus idaeus*. *Microbiological journal*. 2022; 1: 49-62. <https://doi.org/10.15407/microbiolj84.01.044>
42. Bilyavska L., Pankivska Yu., Povnitsa O, Zahorodnya S. Antiviral Activity of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria of the Genera *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* against Human Adenovirus Type 5. *Medicina*. 2019; 55: 519.
43. Rushikesh S, Pravin P, Seetharama J. Peptides, Peptidomimetics, and polypeptides from marine sources: A wealth of natural sources for pharmaceutical applications. *Mar. Drugs*. 2017; 15: 124-61.
44. Garber A, Barnard L, Pickrell C. Review of Whole Plant Extracts With Activity Against Herpes Simplex Viruses In Vitro and In Vivo. *J Evid Based Integr Med*. 2021; 26: 2515690X20978394. doi:10.1177/2515690X20978394
45. Березовський В. А. Чорнобривці у народній і науковій медицині / В. А. Березовський, М. А. Ляшенко // Фітотерапія. Часопис. – 2019. – № 4. – С. 45–50.
46. Tian W.-J., Wang X.-J. Broad-Spectrum Antivirals Derived from Natural Products. *Viruses*. 2023; 15: 1100. <https://doi.org/10.3390/v15051100>
47. Костишин Л. В. Фітохімічне та фармакологічне обґрунтування використання мильнянки лікарської та чорнобривців золотистих як сечогінних засобів: дис. канд. мед. наук / Л. В. Костишин. – Тернопіль, 2023
48. Панченко Л. М. Фітотерапевтичні властивості рослин / Л. М. Панченко. — Київ : Наукова думка, 2016. — 290 с.
49. Singh, Prashant & Mishra, Dilip & Singh, Shashikant. (2024). Theurapeutic benefits and processing of marigold (*Tagetes species*): a review. *Indian Journal of Health Care Medical & Pharmacy Practice*.
50. Regalado, Erik & Fernández, Miguel & Pino, Jorge & Mendiola Martínez, Judith & Echemendia, Olga. (2011). Chemical Composition and Biological Properties

- of the Leaf Essential Oil of *Tagetes lucida* Cav. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. 23. 63-67. 10.1080/10412905.2011.9700485.
51. Пирогова Н. О. Рослини, що містять флавоноїди: перспективи використання / Н. О. Пирогова. — Харків : Фоліо, 2015. — 220 с
52. Tian W.-J., Wang X.-J. Broad-Spectrum Antivirals Derived from Natural Products. *Viruses*. 2023; 15: 1100. <https://doi.org/10.3390/v15051100>
53. Salvaña, Florence Roy. Morphological and Histochemical Characterization of Callus from Leaf Explant of *Tagetes lucida* Cav. (Asteraceae). (2019) 172-178
54. Малюгіна О. О. Визначення кількісного вмісту флавоноїдів у суцвіттях чорнобривців розлогих і прямостоячих / О. О. Малюгіна, О. В. Мазулін, Г. В. Мазулін . — 2013. — № 6 (81). — С.
55. Regalado, Erik & Fernández, Miguel & Pino, Jorge & Mendiola Martínez, Judith & Echemendia, Olga. (2011). Chemical Composition and Biological Properties of the Leaf Essential Oil of *Tagetes lucida* Cav. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. 23. 63-67. 10.1080/10412905.2011.9700485.
56. Дяченко Н.С., Нас И., Беренчи Д., Носач Л.Н., Ванцак Н.П. Тарасишин Л., Адам Е. Аденовирус, клетка, организм. Киев: Наук. думка, 1988. 232 с.
57. Носач Л.М., Повниця О.Ю. Доклінічне дослідження специфічної антивірусної дії лікарських засобів в культурі клітин на моделі аденовірусу. Методичні рекомендації. *Вісник фармакології та фармацевції*. 2007; 9: 52-64
58. Shen CF, Guilbault C, Li X, et al. Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines. *Vaccine*. 2019;37(47):6996-7002. doi:10.1016/j.vaccine.2019.07.00
59. Лавринович О. С. Технологія приготування спиртових витяжок з рослин / О. С. Лавринович. — Київ : Політвидав, 2016. — 210 с
60. Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Yoga Latha, L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*. 2011; 8(1): 1–10.

- 61.Chelliah, R., Oh, DH. (2022). Screening for Anticancer Activity: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium (MTT) Assay. In: Dharumadurai, D. (eds) Methods in Actinobacteriology
- 62.Riss T.L., Moravec R.A. and Niles A.L. Cell Viability Assays. [online] Nih.gov. 2016. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- 63.Kohn L.K., Foglio M.A., Rodrigues R.A., Sousa I.M., Martini M.C., Padilla M.A. et al. In Vitro antiviral activities of extracts of plants of the Brazilian
- 64.Лопач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. Киев: Морион, 2001. 408 с.