



Тваринництво, ветеринарна медицина

УДК 612.011:615.015.35

© 2021

ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ І ДЕЗІНФЕКТАНТІВ НА КУЛЬТУРИ КЛІТИН НИРКИ ТЕЛЯТИ

П.Ю. Кривошия¹, О.Г. Рудь², А.В. Лисиця³

^{1,2}кандидати ветеринарних наук

³доктор біологічних наук

¹Дослідна станція епізоотології Інституту ветеринарної медицини НААН
вул. Князя Володимира, 16/18, м. Рівне, 33028, Україна

^{2,3}Рівненський державний гуманітарний університет
вул. Степана Бандери, 12, м. Рівне, 33028, Україна

e-mail: ¹p.kryvoshiya@gmail.com, ²oleg.rud-rud1965@ukr.net, ³lysycya@ukr.net
ORCID: ¹0000-0002-8671-6442, ²0000-0003-3153-661X, ³0000-0001-9028-8412

Надійшла 14.12.2020

Мета. Дослідити цитотоксичність окремих антибактеріальних препаратів, що використовують під час лікування інфекційних хвороб сечовидільної системи, а також деяких дезінфектантів щодо культури клітин нирки теляти. **Методи.** Цитологічні, випробування токсичного впливу на первинній культурі клітин нирки теляти. **Визначення** максимально допустимих концентрацій антибіотиків, антисептиків і дезінфектантів, які ще не призводять до дегенерації клітинного моношару клітин нирки теляти. **Результати.** Випробування низки препаратів, які часто використовують у ветеринарній медицині, свідчить, що найменш токсичними для клітин нирки теляти з усіх випробуваних антибактеріальних засобів є Оксимікол 20 (діюча речовина — окситетрацикліну основа), Норсульфазол натрію та Фармазин 50 (діюча речовина — тилозин). **Висновки.** Ці препарати або аналогічні з тими самими діючими речовинами доцільно використовувати під час лікування інфекційних хвороб нирок і сечовидільної системи великої рогатої худоби та інших тварин. Показано можливість використання методу культивування і використання як тест-об'єктів первинних культур клітин еукаріот під час підбору оптимального складу лікувально-профілактичних препаратів або дезінфектантів для ветеринарної медицини. Отримані результати з цитотоксичності можуть допомагати лікарям ветеринарної медицини у виборі антимікробних засобів і дезінфектантів в умовах їх широкого асортименту на ринку.

Ключові слова: ветеринарна медицина, хіміотерапевтичні препарати, тест-культура клітин, пієлонефрит, антибіотики, полігексаметиленуанідин.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202101-05>

Актуальним питанням для ветеринарної медицини є вибір оптимальних і водночас малотоксичних препаратів для лікування різноманітних бактеріальних інфекцій. На сучасному етапі розвитку агропромислового виробництва в технологічному процесі під час вирощування тварин і птиці використовують велику кількість речовин для лікування та профілактики різних хвороб. Триває постійний пошук нових лікувальних засобів і лікарських форм. Одним з напрямів сучасної фармакології і токсикології є розробка ефективних методів біотестування, зокрема методів визначення цитотоксичного впливу препаратів на культури клітин [1]. Щороку фармацевтичні компанії реєструють і постачають на ринок велику кількість нових лікувально-профілактичних препаратів. Ці процеси регулюються кодексами якісної лабораторної (GLP), клінічної (GCP) і виробничої (GMP) практики [2]. GLP, або *good laboratory practice* (якісна лабораторна практика) регулює дослідження фармакологічних засобів — кандидатів у лікарські препарати на експериментальних тваринах для уникнення несподіваних несприятливих наслідків їх застосування. GCP, або *good clinical practice* (якісна клінічна практика) регулює ретельне дослідження фармакологічних засобів на людині з гарантією надійності та вірогідності отриманих даних із забезпеченням захисту прав людини. Нині принципи GCP поширені на клінічну практику загалом. GMP, або *good manufacturing practice* (якісна виробнича практика) забезпечує виробництво лікарських препаратів відповідно до стандартів, затверджених державними органами.

Вже давно тривають дискусії щодо використання лабораторних тварин з науковою метою, зокрема під час розробки та випробування лікарських речовин. Слід зазначити, що дослідження на тваринах, які проводять для прогнозування можливих негативних наслідків застосування лікарських речовин, досить часто зазнають критики. Це стосується як етичних норм, так і наукової ваги отриманих результатів [3, 4]. Існує думка, що за нинішнього розвитку науки досліді над тваринами можна замінити комп'ютерним моделюванням. Дійсно, певні експерименти можна проводити *in silico*,

тобто за допомогою розрахунків на суперкомп'ютерах. Але такі дослідження потребують десятків тисяч доларів для оплати часу, затраченого на ці розрахунки. Для того, щоб дослідити взаємодію лише двох–трьох молекул в умовах вакууму чи мінімального іонного оточення, необхідні місяці. У разі, якщо на якомусь етапі трапиться помилка, тоді цей процес може розтягнутися на роки. Водночас слід враховувати, що живий організм — це сукупність багатьох мільярдів клітин і трильйонів молекул, які співіснують у складних взаємовідносинах, а про структуру та функції багатьох із них й досі відомо небагато. Тому все ж таки краще проводити випробування на живих об'єктах.

Культури клітин тварин все частіше використовуються *in vitro* як біологічні системи під час визначення токсичності різних сполук завдяки можливості контролю та більшої відтворюваності порівняно з тест-системами *in vivo*. На 3-му Міжнародному Конгресі, присвяченому альтернативним методам у використанні тварин у науках про життя, подано ідею створення *Good Cell Culture Practice* (GCCP), проєкт, розроблений Європейським центром валідації альтернативних методів [1].

При визначенні цитотоксичності тих чи інших хімічних сполук можна орієнтуватися і на Регламент Ради (ЄС) № 440/2008, що встановлює методи тестування відповідно до Регламенту Європейського Парламенту та Ради (ЄС) № 1907/2006 про реєстрацію, оцінку, авторизацію й обмеження хімічних речовин і препаратів (REACH) від 30 травня 2008 року [5].

Щодо культур клітин, то на них, звісно, легше ставити експерименти, оскільки їх порівняно легко культивувати, вони мають контрольоване збалансоване середовище і загалом сукупність чинників впливу для них не така велика. Тому можна дослідити дію окремих типів молекул, цитотоксичність лікарської речовини або окремих препаратів, їх вплив на процеси мітозу, загибель клітин та ін.

Одним з актуальних питань ветеринарної медицини є лікування інфекційних хвороб сечовидільної системи, зокрема нирок (пієлонефрит). Пієлонефрит можуть викликати найрізноманітніші види патогенної

флори (бактеріальної, вірусної, грибкової) екзо- та ендогенного походження. Найчастішими збудниками пієлонефриту є *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* та ін. Основним методом лікування є антибактеріальна терапія (антибіотики, сульфаніламід, нітрофуран) [6]. При цьому, в останні десятиліття спостерігається зростання випадків стійкості багатьох патогенних мікроорганізмів, у т.ч. й кишкової палички до багатьох антибіотиків широкого спектра дії [7]. У такій ситуації важливим стає підбір оптимальних схем лікування з використанням найменш токсичних препаратів.

Як основний тест-об'єкт нами було обрано первинну культуру клітин нирки теляти (КНТ). Важливим аргументом під час вибору цього об'єкта є ще й те, що при потрапленні в кров тварини будь-якого препарату він так чи інакше взаємодіє з клітинами нирок. Крім того, вважаємо, первинна культура клітин є адекватнішим об'єктом випробувань, ніж перещеплювана (трансформована), а завдяки відсутності витрат, пов'язаних із підтримкою перещеплюваних культур клітин, знижується вартість випробувань.

Мета досліджень — дослідити цитотоксичність окремих антибактеріальних препаратів, що використовуються при лікуванні інфекційних хвороб сечовидільної системи, а також деяких дезінфектантів, щодо культури клітин нирки теляти.

Матеріали і методи досліджень. У дослідженнях використано антибактеріальні препарати (антибіотики, антисептики, дезінфектанти): Фармазин 50 (діюча речовина тилозин, антибіотик групи макролідів, BIOVET, AD, Болгарія), Тилозомікол 20 (тилозину тартрат, «ДЕВІЕ», Україна), Цефтіофуру гідрохлорид (антибіотик групи цефалоспоринових, чиста субстанція), Цефтіодев 5%-ва суспензія для ін'єкцій (цефтіофуру гідрохлорид, «ДЕВІЕ», Україна), Амоксицилін-Астрафарм (β-лактамний антибіотик амоксицилін, ТОВ «Астрафарм», Україна), Оксимікол 20%-й розчин для ін'єкцій (окситетрацикліну основа, «ДЕВІЕ», Україна), Азитроміцин Гріндекс (антибіотик азалід, групи макролідних антибіотиків), Норсульфазол натрію

(ТОВ «ПЛУТАРХ-М», Україна), Полігексаметиленгуанідину гідрохлорид (ПП «Терміт», Україна), Глутаровий альдегід (ТОВ «Руна Інтер», Україна), Спирт етиловий 96%-й («Медісепт», Україна), Формалін (розчин формальдегіду 37%), Бровадез-20 (алкілдиметилбензиламонію хлорид 20%-й, «Бровафарма», Україна), Санідез, таблетки (трихлорізоціанурова кислота — 55%; ізоціанурова кислота — 10%; допоміжні речовини: бікарбонат натрію — 30%; карбонат натрію — 5%, «Медісепт», Україна), Тіомерсал (мертіолят, ртутьорганічна сполука, 98%, Pharm grade, USP, BP).

Визначення цитотоксичного впливу проведено на первинних КНТ. Препарати перед біотестуванням перевіряли на стерильність. Дослідження проводили послідовно за етапами: приготування поживних середовищ, висів клітин на мікроплашки та інкубування до часу повного формування моношару, розведення дослідних зразків та внесення їх безпосередньо на культуру клітин у не менше як в 5–10-разовій повторюваності, інкубація впродовж 3–4-х діб та облік результатів. Первинні культури клітин готували за загальноприйнятою методикою [8]. Засів трипсинізованих клітин з органів ембріонів проводили в концентрації 4–6·10⁵ клітин на 1 см³. Концентрацію клітин у поживному середовищі визначали за власною методикою з використанням фотоелектрокалориметра КФК-3 [9]. Культивували клітини у суміші поживних середовищ 199 та Ігла (1:1) з додаванням 10% сироватки крові великої рогатої худоби, попередньо прогрітої за температури 56°C упродовж години. Для отримання суспензії клітин для подальшого пересіву використовували суміш, що складалася з 0,02%-го розчину Версену та 0,25%-го розчину трипсину у співвідношенні (3:1). Субкультури отримували способом пересіву клітин після формування моношару через 3–8 днів. Життєздатність клітин визначали за допомогою фарбування 0,2%-м розчином трипанового синього. Усі культури клітин тестували на відсутність контамінації мікроорганізмами.

Після визначення концентрації клітин та отримання посівної дози 400–500 тис. клітин/см³ способом розведення чи концентрування суспензію клітин переносили

у 96-лункові полістиролові плашки в об'ємі по 0,1 см³. Планшети поміщали в спеціальний пристрій для культивування клітин [10]. Витримували в термостаті при $t = +37^{\circ}\text{C}$ упродовж 2–3-х діб, після закінчення формування моношару в лунки для тестування додавали препарати, розведені на поживному середовищі в титрах 10^{-1} – 10^{-2} – 10^{-3} – 10^{-4} – 10^{-5} в об'ємі 0,1 см³. Для кожного розведення препарату використовували 4–10 лунок плашки. Упродовж 3–4-х днів вели спостереження способом мікроскопування та оцінювання дослідних і контрольних культур з метою встановлення прояву або відсутності цитотоксичного впливу. Ступінь цитотоксичності визначали за зміною морфології клітин (округлення, зморщування клітин, відокремлення від поверхні лунок клітин, що зазнали дегенеративних змін). За максимальну концентрацію препарату брали його найбільшу кількість, яка ще не викликала дегенерації клітин моношару. Для

отримання вірогідних результатів дотримувалися таких вимог: культура клітин була без змін зовнішньої будови клітин і моношару загалом, під час та на початку досліджень не змінювали компоненти, що входять до складу поживних середовищ, дослідження проводили на культурі клітин, отриманій з одного й того самого органа тварини.

Результати досліджень та їх обговорення. Мікроскопування та оцінювання дослідних і контрольних культур з метою встановлення прояву або відсутності цитотоксичного впливу досліджуваних антибактеріальних препаратів дало змогу визначити їх максимально допустимі концентрації (МДК) для первинної КНТ. Визначено МДК, які не призвели до дегенерації моношару клітин (табл. 1).

За МДК і нижчих концентрацій у культурах клітин через 96 год не спостерігали дегенеративних змін моношару, усі лінії клітин зберігали здатність до подальшого

1. Цитотоксичність антибактеріальних хіміопрепаратів щодо первинної культури КНТ, $n=5-10$

Препарат або його комерційна назва	Концентрація, мкг/см ³				МДК, мкг/см ³	МБК для <i>E. coli</i> , мкг/см ³
Фармазин 50	5000	500	50	5	500	≥ 14
Вплив на моношар	+	–	–	–		
Тилозомікол 20	5000	500	50	5	50	≥ 14
Вплив на моношар	±	±	–	–		
Цефтіофуру гідрохлорид	1000	100	10	1	10	1,0–1,5
Вплив на моношар	+	±	–	–		
Цефтіодев 5%	20000	2000	200	20	200	1,0–1,5
Вплив на моношар	+	±	–	–		
Амоксицилін	15000	1500	150	15	150	1,0–10
Вплив на моношар	+	±	–	–		
Оксимікол 20	10000	1000	100	10	1000	0,1–6
Вплив на моношар	+	–	–	–		
Азитроміцин	10000	1000	100	10	10	Для <i>E. coli</i> зазвичай не застосовують, для стійких штамів <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ≥ МБК = 0,5 мкг/см ³
Вплив на моношар	+	±	±	–		
Норсульфазол натрію	500	50	5	0,5	500	–
Вплив на моношар	–	–	–	–		

Примітка. «–» — моношар клітин без змін; «±» — є окремі ділянки дегенерації клітин; «+» — моношар зруйновано, загибель клітин (через 96 год); $P \leq 0,05$ (до табл. 1 і 2).

культивування. Вищі за МДК концентрації вже через 24–48 год викликали у клітинних лініях дегенерацію моношару: клітини округлювалися, відокремлювалися від поверхні лунок, кислотність середовища підвищувалася. Отже, дози, вищі МДК, виявляли ознаки цитотоксичного впливу. Найменш токсичними для КНТ з усіх випробуваних антибактеріальних засобів виявилися Оксимікол 20, Норсульфазол натрію та Фармазин 50. Антибіотики Амоксицилін і Тилозин, що є діючими речовинами

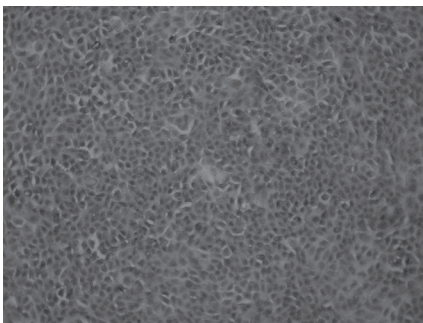
в препаратах Амоксицилін та Фармазин 50, за ступенем впливу на організм зараховано до помірно небезпечних речовин (3-й клас безпеки за ГОСТ 12.1.007). Проте їх МДК на культурі КНТ істотно відрізнялися. Так, токсичність Амоксициліну була в 3,33 раза вищою для КНТ порівняно з токсичним впливом на ці клітини Фармазину 50.

Визначено результати тестування на цитотоксичність окремих дезінфектантів та антисептиків (табл. 2).

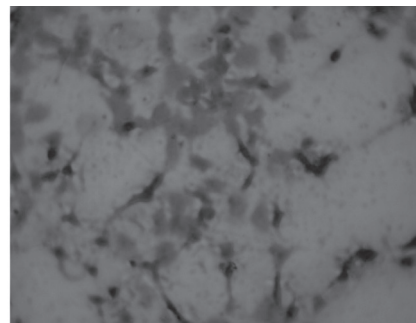
2. Цитотоксичність дезінфектантів щодо первинної культури КНТ, n=5–10

Комерційна назва препарату або діюча речовина	Концентрація препарату/стан моношару клітин через 96 год				МДК, мкг/см ³
Глутаровий альдегід, мг/см ³	2500	2,5	0,25	0,03	0,25
Вплив на моношар	+	+	–	–	
Спирт етиловий 96%-й, %	0,96	0,1	0,01	0,001	1,0
Вплив на моношар	+	–	–	–	
Бровадез-20, мкг/см ³	200000	20000	2000	200	0,2
Вплив на моношар	+	+	+	–	
Формальдегід, мкг/см ³	3700	370	37	3,7	0,004
Вплив на моношар	+	+	+	–	
Санідез, %	1	0,1	0,01	0,001	0,1
Вплив на моношар	+	+	–	–	
Тіомерсал (мертіолят), %	1	0,1	0,01	0,001	0,1
Вплив на моношар	н/д	н/д	–	–	
Полігексаметиленгуанідину гідрохлорид, %	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,001
Вплив на моношар	+	+	+	–	

Примітка. «н/д» — не досліджували.



а



б

Результат впливу на первинну культуру клітин нирки теляти: а — моношар, оброблений ПГМГ ГХ у концентрації 10⁻⁴%; б — деструкція моношару, обробленого ПГМГ ГХ у концентрації 10⁻³%, прояв цитотоксичного впливу препарату; ×400

З'ясовано, що найменш токсичними для КНТ з усіх випробуваних дезінфікувальних і антисептичних засобів виявилися спирт етиловий та глутаровий альдегід. Водночас Полігексаметиленгуанідину

гідрохлорид (ПГМГ ГХ), який є ефективним дезінфікувальним засобом [11, 12], при потрапленні всередину організму виявився досить цитотоксичним препаратом (рисунок).

Висновки

Проведеними дослідженнями встановлено, що найменш токсичними для первинної культури клітин теляти з усіх випробуваних антибактеріальних засобів виявилися Оксимікол 20 (діюча речовина — окситетрацикліну основа), Норсульфазол натрію та Фармазин 50 (діюча речовина — тилозин). Оскільки ці препарати мають достатню антибактеріальну активність, то їх використання при лікуванні інфекційних хвороб сечовидільної системи великої рогатої худоби та інших тварин є виправданим. Надалі доцільно випробувати інші засоби, що використовують для лікування пієлонефриту (триметоприм/сульфаметоксазол, ципрофлоксацин, ампіцилін та ін.).

На первинній тест-культурі клітин нирки теляти було визначено найменш токсичні антибіотики, дезінфектанти і антисептики з числа тих, що найчастіше використовуються у ветеринарній медицині. Водночас слід визнати, що жодна з виділених культур клітин не матиме такого самого оточення, як у живому організмі. Є проблема визначення системного впливу та урахування оточення. Тому неможливо

повністю відмовитися від проведення експериментів на багатоклітинному організмі, що дає набагато більше інформації, ніж експеримент на клітинах, культивованих поза організмом.

Звичайно, результати, отримані на культурах клітин, не можуть бути повністю еквівалентними процесам, характерним для цілісних організмів. Тому такі тести завжди матимуть певні розбіжності з реальністю. У цьому плані коректнішим буде використання органодів, вирощених штучно в лабораторних умовах багатоклітинних тривимірних структур (3D), які відтворюють певні властивості окремих органів (але не системи органів). Таким чином можна вивчати вплив препаратів не на окремі клітини чи поодинокі групи клітин, а на системи клітин, досліджуючи зміни у їхніх взаємодіях.

Інший можливий напрям застосування — фармацевтично-генетичний. Визначивши індивідуальну чутливість клітин, виділених з представників тих або інших порід тварин, популяцій можна підібрати найбільш адекватні і найменш шкідливі лікувально-профілактичні препарати.

Kryvoshyya P.¹, Rud' O.², Lysytsya A.³

¹Research Station of Epizootology of the Institute of Veterinary Medicine of NAAS, 16/18 Kniazia Volodymyra Str., Rivne, Ukraine, 33028, ²³Rivne State University of Humanities, 12 Stepana Bandery Str., Rivne, 33028, Ukraine; e-mail: ¹p.kryvoshyya@gmail.com, ²oleg.rud-rud1965@ukr.net, ³lysycya@ukr.net; ORCID: 10000-0002-8671-6442, 20000-0003-3153-661X, 30000-0001-9028-8412

Determination of cytotoxicity of germicides and disinfectants on the culture of kidney cells of a calf

Goal. To study the cytotoxicity of certain antibacterial preparations used in the treatment of infectious diseases of the urinary system, as well as some disinfectants for calf kidney cell culture.

Methods. Cytological, toxic effects test on primary

calf kidney cell culture. Determination of the maximum permissible concentrations of antibiotics, antiseptics, and disinfectants that do not yet lead to degeneration of the cell monolayer of calf kidney cells. **Results.** Tests of some drugs that are often used in veterinary medicine show that the least toxic to calf kidney cells of all tested antibacterial agents are Oxymicol 20 (active substance — oxytetracycline base), Norsulfazole sodium, and Farmazin 50 (active substance — tylosin). **Conclusions.** These drugs or similar with the same active substances should be used in the treatment of infectious diseases of the kidney and urinary system of cattle and other animals. The possibility of using the method of cultivation and use as test objects of primary cultures of eukaryotic cells in the selection of the optimal composition of therapeutic and prophylactic

drugs or disinfectants for veterinary medicine. The obtained results of cytotoxicity can help veterinarians in choosing antimicrobials and disinfectants in terms of their wide range on the market.

Key words: *veterinary medicine, chemotherapeutic drugs, cell culture, pyelonephritis, antibiotics, polyhexamethylene guanidine.*

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovysnyk202101-05>

Бібліографія

1. Hartung T., Gstraunthaler G., Coecke S. et al. Good cell culture practice (GCCP) — an initiative for standardization and quality control of *in vitro* studies. The establishment of an ECVAM Task Force on GCCP. *ALTEX*. 2001. № 1 (18). P. 75–78.
2. Абдуєва Ф.М., Бичкова О.Ю., Бондаренко І.О. та ін. Клінічна фармакологія: Підручник для студентів і лікарів; за ред. М.І. Яблучанського, В.М. Савченка. Харків: ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2011. 405 с.
3. Barnard N.D., Kaufman S.R. Animal research is wasteful and misleading. *Scientific American*. 1997. № 2. P. 80–82.
4. Cohen M.J., Kaufman S.K., Ruttenberg R., Fano A. A critical look at animal experimentation. *Medical Research Modernization Committee*. 1998. P. 1–15.
5. Регламент Ради (ЄС) № 440/2008 «Що встановлює методи тестування відповідно до Регламенту Європейського Парламенту та Ради (ЄС) № 1907/2006 про реєстрацію, оцінку, авторизацію і обмеження хімічних речовин та препаратів (REACH)» від 30 травня 2008 р. 3 с.
6. Шуляк О.В. Інфекції сечостатевої шляхи: пієлонефрит. *Український медичний часопис*. 2014. № 4 (102). С. 32–42.
7. Colgan R., Williams M., Johnson J.R. Diagnosis and treatment of acute pyelonephritis in women. *American family physician*. 2011. V. 84. № 5. P. 519–526.
8. *Методы и применение в биотехнологии*; под ред. Л.П. Дьяконова. Москва: Спутник+, 2009. 656 с.
9. Пат. № 62119 Україна, МПК G01N 21/00. Спосіб визначення концентрації клітин перещепленої культури трахеї теляти за допомогою фотокалориметричного приладу. П.Ю. Кривошия, Л.Б. Кот, М.С. Мандигра; заявник і патентовласник Інститут епізоотології УААН. № u2002119483; заявл. 28.11.2002; опубл. 15.12.2003; Бюл. № 12. 3 с.
10. Пат. № 67895 Україна, МПК G01N 33/00. Спосіб культивування клітин у чашках Петрі та полістиролових плашках. П.Ю. Кривошия, С.Ю. Ляш; заявник і патентовласник Інститут епізоотології НААН. № u2011109473; заявл. 28.07.2011; опубл. 12.03.2012; Бюл. №5. 3 с.
11. Лисиця А.В., Мандигра М.С., Кривошия П.Ю. та ін. Комплексна дія полімерних похідних гуанідину на клітинні культури. *Ветеринарна біотехнологія*. 2013. Вип. 22. С. 328–337.
12. Лисиця А.В., Мандигра Ю.М., Бойко О.П. та ін. Диференційна чутливість мікроорганізмів до полігексаметиленгуанідину. *Мікробіологічний журнал*. 2015. Т. 77. № 5. С. 11–19.