дані дають можливість передбачити злоякісне переродження еукаріотичних клітин, а в разі змін ДНК у статевих клітинах тварин і небезпеку для здоров’я нащадків. Метою роботи була оцінка генотоксичності in vitro препаратів ветеринарних вакцин «Колісан», «Колісан +AgNP», «Актиноколісан Надія», «Актиноколісан +AgNP», «Вельшиколісан», «Вельшиколісан +AgNP», «Актиносан», «Актиносан +AgNP», «Мультибовісан», «Мультибовісан +AgNP (1%)», «Мультибовісан +AgNP(0,5%)». Оцінку генотоксичності препаратів ветеринарних вакцин здійснювали in vitro методом ДНК-комет в лужних умовах із застосуванням еукаріотичних клітин ліній IMR-32 (нейробластоми) та МДВК (культури клітин нирки теляти). Для реєстрації дії прямих і непрямих мутагенів, активність яких пов’язана з утворенням генотоксичних метаболітів, проводили також тестування з використанням метаболічної активації в присутності мікросомальної фракції S9. Методом ДНК-комет в лужних умовах показана відсутність генотоксичної дії досліджуваних ветеринарних вакцин «Колісан», «Колісан +AgNP», «Актиноколісан Надія», «Актиноколісан+AgNP», «Вельшиколісан», «Вельшиколісан+AgNP», «Актиносан», «Актиносан +AgNP», «Мультибовісан», «Мультибовісан+AgNP(1%)», «Мультибовісан +AgNP(0,5%)». Досліджувані ветеринарні вакцини є не генотоксичними також і в експериментах, наближених до умов in vivo, за використання системи метаболічної активації. Досліджені ветеринарні вакцини є біобезпечними за показником генотоксичності. Виконані дослідження відкривають перспективи подальшого удосконалення системи оцінки безпечності вітчизняних імунобіологічних препаратів за показниками їх впливу на генетичний апарат тварин.

Ключові слова: *генотоксичність, ветеринарні вакцини, метод ДНК-комет, культура клітин, біобезпека.*

УДК 577.32.576

RYZHENKO G.F., PhD, associate, e-mail: anaerob12@ukr.net
GORBATYUK O.I., PhD, associate, e-mail: anaerob12@ukr.net
ANDRIYASCHUK V.A., PhD, associate, e-mail: anaerob12@ukr.net
ZHOVNIR O.M., researcher, e-mail: anaerob12@ukr.net
Institute of Veterinary Medicine NAAS
DYBKOVA S. M., PhD, senior research scientist, e-mail: sdybkova@gmail.com
RIEZNICHENKO L.S., PhD, e-mail: reznichenko_ls@mail.ru
GRUZINA T.G., PhD, senior research scientist, e-mail: tgruzina@mail.ru
F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry of NAS of Ukraine

EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF VETERINARY VACCINES “Colisan”, “Colisan+AgNP”, “Velshicolisan”, “Velshicolisan+AgNP”, “Actinosan”, “Actinosan+AgNP”, “Multibovisan”, “Multibovisan +AgNP (1%)”, “Multibovisan +AgNP (0,5%)”

Research efforts regarding veterinary vaccines “Colisan”, “Colisan+AgNP”, “Velshicolisan”, “Velshicolisan+AgNP”, “Actinosan”, “Actinosan+AgNP”, “Multibovisan”, “Multibovisan +AgNP (1%)”, “Multibovisan +AgNP (0,5%)” showed a low level of their cytotoxic effect. The results of cytotoxicity testing of vaccines regarding parameters of viability of passaged eukaryotic cells of line L929. Using microscopic analysis of cell

monolayer with crystal violet staining and the level of mitochondrial activity in the MTT assay. Shown the comparative results to determine the cytotoxicity of veterinary vaccines by MTT assay and crystal violet method with high sensitivity of MTT assay was proved. The present results analysis of experimental studies regarding of the cytotoxicity of veterinary vaccines which contain various concentration of silver nanoparticles and demonstrated absence of concentration dependens of the levels of cytotoxic effects.

***Keywords**: cytotoxicity, veterinary vaccines, cells culture, MTT assay, crystal violet.*

Introduction. Cytotoxicity test is one of the most important methods of biological analysis *in vitro*, which is used to assess the degree of safety of substances to different types of tissue cells. Study of cytotoxicity allows determining several parameters such as membrane integrity, cellular metabolism, mitochondrial activity and cell proliferation, using a single sample of cells. Evaluation of cytotoxicity allows one to distinguish between the live and dead cells that is the integral characteristic of both the integrity of test cells and the level of inhibition of their growth [1, 2].

Determination of cytotoxicity is carried out according to the indicators of sustainability of eukaryotic cultures inoculated at the microscopic analysis of a monolayer of cells stained with some dye (crystal violet, neutral red) and also according to the level of mitochondrial activity in the MTT assay. MTT method is based on the ability of the enzyme of the succinate dehydrogenase mitochondrial membrane to reduce a yellow salt of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to its insoluble formazan crystals of violet color that are accumulated as a result of this reaction in the living cells. The level of mitochondrial respiration of the cells which is a measure of their viability, can thus be judged from the intensity of accumulating the formazan crystals in the cytoplasm. The amount of formazan formed in the cell monolayer is proportional to the current number of live cells [3, 4].

The goal of the work was to evaluate the cytotoxicity *in vitro* of veterinary vaccines “Colisan”, “Colisan+AgNP”, “Velshicolisan”, “Velshicolisan+AgNP”, “Actinosan”, “Actinosan+AgNP”, “Multibovisan”, “Multibovisan+AgNP (1%)”, “Multibovisan +AgNP (0,5%)” by methods of assessing the viability of the cells with crystal violet and in MTT assay.

Materials and methods of research. The veterinary vaccines include “Colisan”, “Colisan+AgNP”, “Velshicolisan”, “Velshicolisan+AgNP”, “Actinosan”, “Actinosan+AgNP”, “Multibovisan”, “Multibovisan+AgNP (1%)”, “Multibovisan +AgNP (0,5%)”were tested. A series of dilutions of different concentrations of veterinary vaccines (8 concentrations in total) were prepared in a nutrient medium for the incubation of cells at a 1.5-fold step.

Evaluation of cytotoxicity of veterinary vaccines *in vitro* by the method for assessing cell’s viability with crystal violet and MTT assay was performed using eukaryotic cells line L929 (fibroblast from mouse) from the collection of R. E.

Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine.

L929 cells culture was grown in 96-well plates (“Costar’, UK) by incubating in an incubator in a water-saturated atmosphere of 5% CO_2 at 37 ° C in 199 medium (SDM “Bio-Test Lab”, Ukraine), which contained 4 mmol/L L-glutamine (“SIGMA”, USA), 10% fetal bovine serum (“SIGMA”, USA), 40 mg/ml of gentamicin in an atmosphere of 5% CO_2 at 37^0C to a monolayer density of 1.0 X 10^4 cells/cm^2.

The appropriate dilution of the vaccine was then brought into each well, using at least 3 parallels for each dilution. Similar amounts of culture medium without any vaccine were introduced in control wells.

The plates were incubated in a CO^2 incubator for 18 hours at 37°C. Then, the cells were stained with a crystal violet solution and the optical density of the content of holes at a wavelength of 540 nm was determined using a multi-hole spectrophotometer (ELISA reader) [2].

Evaluation of the cytotoxicity of vaccines in MTT assay was performed by similar procedures with crystal violet staining cells until the stage of the cell staining. In MTT-test, use was made of a salt of 3-(4.5-dimethylthiazol-2-yl)-2.5-diphenyltetrazolium bromide. The optical density of the content of the wells was determined at 540 nm wavelength with the help of a multi-hole spectrophotometer [1].

The number of viable cells (%) was calculated from the formula (OD_{CC} – OD_{EC})/OD_{EC} x 100%, where OD_{CC} is the optical density in wells with control cells and OD_{EC} is the optical density in wells with experimental cells.

The cytotoxic effect of the vaccine dilutions investigated was determined by the dilution IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) that caused the death of 50% of the cells. 100% cell viability in the experimental samples provides evidence for the absence of cytotoxicity [3].

The experiments have been done in two parallels. The differences $p < 0.05$ were considered as significant.

Results of research and discussion. The results of the study of the veterinary vaccine cytotoxicity with the culture L929 in the test with the crystal violet are presented in table 1.

As seen in the table, the vaccine “Colisan” is cytotoxic with IC_{50} at a 20-fold dilution. The lack of any cytotoxic effect was observed at a 30-fold dilution.

For vaccines “Colisan+ AgNP”, IC_{50} was observed at a 4-fold dilution, but at 6-, 9-, 13- and 20-fold dilutions the cell death exceeds 50%.

Vaccines “Velshicolisan” and “Velshycolisan + AgNP” modified by silver nanoparticles showed no cytotoxic effect at a 68-fold dilution, while IC_{50} for these vaccines was found to be the 9-fold for “Velshycolisan” and the 6-fold for “Velshycolisan + AgNP”.

In tests for the membrane integrity vaccines “Actinosan” and “Actinosan + AgNP” were characterized by similar values of cytotoxicity, namely, 100% cell survival at a 45-fold dilution and IC_{50} at a 6-fold dilution.

Table 1

Viability of eukaryotic cells line L929 in the test with crystal violet, %

Dilution	“Colisan”	“Colisan+AgNP”	“Velshicolisan”	“Velshicolisan +AgNP”	“Actinosan”	“Actinosan+AgNP”	“Multibovisan”	“Multibovisan +AgNP(1%)”	“Multibovisan +AgNP(0,5%)”
4-fold	52.12	53.06	61.43	56.63	66.70	67.83	69.14	70.08	67.64
6- fold	35.17	43.89	52.27	50.09	**52.79**	**50.70**	63.18	63.44	63.09
9- fold	42.21	26.36.	**51.81**	40.31	53.08	44.75	**56.79**	74.00	62.05
13- fold	24.37	23.67	43.67	49.52	18.69	17.38	57.21	72.93	53.01
20- fold	56.77	38.45	31.23	19.04	24.82	35.11	44.13	41.06	42.60
30- fold	**102.10**	**101.53**	43.85	**50.05**	75.50	88.66	62.82	**54.53**	**53.86**
45- fold	86.12	89.34	87.59	91.45	**99.08**	**91.91**	**94.49**	86.67	80.06
68- fold	94.41	96.69	**97.00**	**93.48**	93.69	91.10	88.41	**92.34**	**94.20**

Vaccines **“**Multibovisan” and modified silver nanoparticles **“**Multybovisan + AgNP (1%)” and **“**Multybovisan + AgNP (0.5%)” showed a tendency to 100% cell survival only at a 45-fold dilution. IC_{50} was observed at a 9-fold dilution for **“**Multybovisan” and at a 30-fold dilution for **“**Multybovisan + AgNP (1%)” and **“**Multybovisan + AgNP (0.5%)”.

The results of investigation of the cytotoxicity of veterinary vaccines in MTT-test are shown in table 2.

Vaccines “Colisan” and “Colisan+ AgNP” demonstrated IC_{50} at a 13-fold dilution, while a tendency to a 100% survival was observed at a 68-fold dilution for “Colisan” and at a 45-fold dilution for “Colisan+ AgNP”.

100 % cell survival was not reached with all dilutions of the vaccines “Velshycolisan”, “Velshycolisan + AgNP”, “Actynosan”, “Actynosan + AgNP”, “Multybovisan” “Multybovisan + AgNP (1%)**”** and “Multybovisan + AgNP (0.5%)**”**. IC_{50} was at a 20-fold dilution for each of them.

The results of comparative study of the cytotoxicity of veterinary vaccines by MTT assay and the method of crystal violet are shown in table 3.

In assessing the cytotoxicity of the veterinary vaccines, MTT assay showed a greater sensitivity compared to the test on the integrity of the membranes with crystal violet. MTT-test revealing the key metabolic violations under the influence of a used vaccine appears to be decisive in assessing the cytotoxicity of immunological drugs.

Table 2

Viability of eukaryotic cells line L929 in the MTT assay, %

Dilution	“Colisan”	“Colisan+AgNP”	“Velshicolisan”	“Velshicolisan +AgNP”	“Actinosan”	“Actinosan +AgNP”	“Multi bovisan”	“Multibovisan +AgNP(1%)”	“Multibovisan +AgNP(0,5%)”
4-fold	23.85	21.95	22.49	23.04	24.39	22.22	24.66	25.20	24.12
6- fold	25.99	25.42	26.27	24.86	26.27	27.12	26.27	26.84	27.12
9- fold	66.95	64.97	24.86	25.42	25.99	27.12	25.71	27.12	27.12
13- fold	**44.74**	**44.15**	67.54	65.50	29.24	36.26	63.16	32.16	60.23
20- fold	73.68	68.14	**50.97**	**49.58**	**46.26**	**54.85**	**52.35**	**49.61**	**50.14**
30- fold	80.06	74.79	62.88	63.43	61.77	65.65	64.82	62.88	69.81
45- fold	84.85	**90.08**	65.01	74.66	70.52	67.22	65.56	67.49	67.22
68- fold	**92.23**	85.79	74.80	76.94	68.63	67.02	75.87	69.17	71.85

The difference in cytotoxicity values obtained by the two methods can readily be explained by the presence of a preservative in the studied vaccine drugs that can combine with proteins and prevent the infiltration of crystal violet into the cell.

Table 3

Summary table of the cytotoxicity of tested veterinary vaccines

Vaccine	Test on the integrity of cell membranes (with crystal violet)		MTT assay	
	IC_{50}	100 % survival	IC_{50}	100 % survival
“Colisan”	20-fold dilution	30-fold dilution	13-fold dilution	68 -fold dilution
“Colisan+AgNP”	4-fold dilution	30-fold dilution	13 -fold dilution	45 -fold dilution
“Velshicolisan”	9-fold dilution	68-fold dilution	20 -fold dilution	–
“Velshicolisan+AgNP”	6-fold dilution	68-fold dilution	20 -fold dilution	–
“Actinosan”	6-fold dilution	45 -fold dilution	20 -fold dilution	–
“Actinosan+AgNP”	6-fold dilution	45-fold dilution	20 -fold dilution	–
“Multibovisan”	9-fold dilution	20 -fold dilution	20 -fold dilution	–
“Multibovisan+AgNP (1%)”	30-fold dilution	45-fold dilution	20 -fold dilution	–
“Multibovisan+AgNP (0,5%)”	30-fold dilution	45-fold dilution	20 -fold dilution	–

Conclusions and prospects for further research. The full set of experimental investigations of veterinary vaccines “Colisan”, “Colisan+AgNP”, “Velshicolisan”, “Velshicolisan+AgNP”, “Actinosan”, “Actinosan+AgNP”, “Multibovisan”, “Multibovisan+AgNP (1%)”, “Multibovisan +AgNP (0,5%)” showed the low level of their cytotoxic effect.

Modification of the vaccine “Kolisan” with silver nanoparticles enhances the viability of eukaryotic cells, thereby increasing a level of its safety. Modification of the vaccine “Multybovisan” with silver nanoparticles does not decrease its cytotoxic effect.

There wasn’t registered correlation of the levels of cytotoxicity to their concentration for all investigated vaccines.

Separate determination of the cytotoxicity of the components of these vaccines is strongly desirable in order to improve their safety to the animal organism.

REFERENCES

1. Test Method Protocol for the NHK Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay Phase III - Validation Study: November 4, 2003 – 20 p.

2. Cell Culture Systems and In Vitro Toxicity Testing / A Report of the CAAT Technical Workshop of June 13-15 1990 - 1990. - http://caat.jhsph.edu/publications/tech_reports/4.html.

3. Safety assessment of drugs nanopreparation: Methodological guidelines –Kyiv, 2013. AgNP 108 p.

4. Methods of cell culture // Edited by G.P. Pinaev- L.: Nauka, 1988. – 313 p.

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ВЕТЕРИНАРНЫХ ВАКЦИН: «КОЛИСАН», «КОЛИСАН+AGNP», «ВЕЛЬШИКОЛИСАН», «ВЕЛЬШИКОЛИСАН+AGNP», «АКТИНОСАН», «АКТИНОСАН+AGNP», «МУЛЬТИБОВИСАН», «МУЛЬТИБОВИСАН+AGNP(1%)», «МУЛЬТИБОВИСАН +AGNP(0,5%)» / Рыженко Г.Ф., Горбатюк О.И., Андриящук В.А., Жовнир А.М., Дыбкова С.Н., Резниченко Л.С., Грузина Т.Г.

Проведенный комплекс исследований по цитотоксичности ветеринарных вакцин «Колисан», «Колисан+AgNP», «Вельшиколисан», «Вельшиколисан+AgNP», «Актиносан», «Актиносан+AgNP», «Мультибовисан», «Мультибовисан+AgNP (1%)», «Мультибовисан +AgNP(0,5%)» показал низкий уровень их цитотоксического действия. Представлены результаты тестирования цитотоксичности вакцинних препаратов по показателям жизнеспособности эукариотических клеток перевиваемой культуры линии L929 (фибробласты мышей) при проведении микроскопического анализа монослоя клеток с окраской кристаллическим фиолетовым и по уровню митохондриальной активности в МТТ тесте. Показаны сравнительные результаты по определению цитотоксичности ветеринарных вакцин в МТТ тесте и методом с кристаллическим фиолетовым, доказана большая чувствительность МТТ теста. Представлен анализ результатов экспериментальных исследований по оценке цитотоксичности ветеринарных вакцин, в состав которых входят различные концентрации наночастиц серебра и доказано отсутствие концентрационной зависимости уровней цитотоксического воздействия.

Ключевые слова: *цитотоксичность, ветеринарные вакцины, культура клеток, МТТ-тест, кристаллический фиолетовый.*

ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ПРЕПАРАТІВ ВЕТЕРИНАРНИХ ВАКЦИН: «КОЛІСАН», «КОЛІСАН +AGNP», «ВЕЛЬШИКОЛІСАН», «ВЕЛЬШИКОЛІСАН +AGNP», «АКТИНОСАН», «АКТИНОСАН +AGNP», «МУЛЬТИБОВІСАН»,

«МУЛЬТИБОВІСАН +AGNP (1%)», «МУЛЬТИБОВІСАН +AGNP(0,5%)» / Риженко Г.Ф., Горбатюк О.І., Андріящук В.А., Жовнір О.М., Дибкова С.М., Рєзніченко Л.С., Грузіна Т.Г.

Тест на цитотоксичність - один з найважливіших методів аналізу in vitro, що використовується для оцінки безпечності речовин по відношенню до еукаріотичних клітин. Оцінку цитотоксичності in vitro ветеринарних вакцин «Колісан», «Колісан+AgNP», «Вельшиколісан», «Вельшиколісан+AgNP», «Актиносан», «Актиносан+AgNP», «Мультибовісан», «Мультибовісан +AgNP (1%)», «Мультибовісан+AgNP(0,5%)» здійснювали методом оцінки цілісності мембран з кристалічним фіолетовим та в МТТ – тесті із застосуванням еукаріотичних клітин лінії L929. Виконаний комплекс експериментальних досліджень свідчить про відсутність концентраційної залежності рівнів цитотоксичного впливу тестованих вакцин. Показано, що модифікація вакцини «Колісан» наночастинками срібла підвищує життєздатність еукаріотичних клітин, а отже підвищує рівень її безпечності. Вакцина «Колісан» є не цитоксичною в 68-му розведенні, а «Колісан+AgNP » не цитоксична у 40-му розведенні. Модифікація вакцини «Мультибовісан» наночастинками срібла не знижувала її цитотоксичну дію. Так, вакцина «Мультибовісан» виявилася не цитотоксичною в 20-му розведенні, а модифіковані сріблом «Мультибовісан + AgNP(1%)» і «Мультибовісан+AgNP (0,5%)» лише в 45-му. Ветеринарні вакцини «Вельшиколісан» та «Вельшиколісан+AgNP» не цитотоксичні в 68-му розведенні при оцінці цитотоксичності в тесті на цілісність мембран. Показано, що ветеринарні вакцини «Актиносан» та «Актиносан+AgNP» не цитотоксичні в 45-му розведенні при оцінці цитотоксичності в тесті на цілісність мембран, а їх IC_{50} в МТТ-тесті на рівні 20-го розведення. Проведений комплекс досліджень щодо цитотоксичності ветеринарних вакцин «Колісан», «Колісан+AgNP», «Вельшиколісан», «Вельшиколісан+AgNP», «Актиносан», «Актиносан+AgNP», «Мультибовісан», «Мультибовісан+AgNP (1%)», «Мультибовісан+AgNP (0,5%)» показав низький рівень їх цитотоксичної дії.

Ключові слова: *цитотоксичність, ветеринарні вакцини, культура клітин, МТТ-тест, кристалічний фіолетовий.*

УДК 636.09:[616.98+579.834]:636.2

UKHOVSKYI V.V., PhD
Institute of Veterinary medicine NAAS
ALEKSEEVA G.B.,
State Scientific-Research Institute of the Laboratory Diagnostic and Veterinary-Sanitary Expertise
BEZIMENNYY M.V.,
KULYKOVA V.V., PhD
Institute of Veterinary medicine NAAS

ANALYSIS OF THE CIRCULATION OF PATHOGENS ON LEPTOSPIROSIS IN CATTLE IN UKRAINE USING GIS-TECHNOLOGY

Analysis of the circulation basic diagnostic serogroup Leptospira among cattle and statistical evaluation of enzootic areas on leptospirosis of this species in