

УДК: 619:616 – 085.36

DOI: 10.31073/vet_biotech34-01

ДИБКОВА С.М., канд. біол. наук, e-mail: sdybkova@gmail.com,
ТЮТЮН С.М., наук. сп., e-mail: anaerobsveta@ukr.net,
РЄЗНІЧЕНКО Л.С., канд. біол. наук, e-mail: lrieznichenko@gmail.com,
ЖОВНІР О.М., канд. вет. наук, e-mail: Zhovnir73@ukr.net,
АНДРІЯЩУК В.А., канд. вет. наук, e-mail: and_valentina@hotmail.com,
УХОВСЬКА Т.М., канд. вет. наук, e-mail: tanyavet@ukr.net,
Інститут ветеринарної медицини НААН
ГРУЗІНА Т.Г., канд. біол. наук, e-mail: tamaragruzina@gmail.com,
Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України

ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ТА ГЕНОТОКСИЧНОСТІ СТИМУЛЮЮЧОГО ТКАНИННОГО ПРЕПАРАТУ («СТП») ТА «СТП», МОДИФІКОВАНОГО НАНОЧАСТИНКАМИ ЗАЛІЗА

У статті викладений аналіз результатів оцінки in vitro безпечності стимулюючого тканинного препарату «СТП» та «СТП», модифікованого наночастинками заліза розміром 40 нм в концентрації 1,0 мг/мл за металом. In vitro виявлено стимулюючу дію досліджуваного тканинного препарату. За рівнем показників цитотоксичності та генотоксичності показано, що безпечними є як базовий препарат «СТП», так і «СТП», модифікований наночастинками заліза.

Ключові слова: стимулюючий тканинний препарат «СТП», наночастинки заліза; цитотоксичність, генотоксичність, «СТП», модифікований наночастинками заліза.

Вступ. Створення імуностимулюючих засобів для профілактики імунодефіцитів та ускладнень після щеплень у тварин є надзвичайно актуальним для сучасного тваринництва. Крім антибіотиків, за останні роки знайшли широке застосування в тваринництві такі препарати, що стимулюють ріст сільськогосподарських тварин і підвищують їх стійкість до захворювань. До таких речовин перш за все відносяться тканинні препарати. Стимулюючі тканинні препарати, прикладом якого є розроблений в Україні препарат «СТП», підвищують опірність організму завдяки активації регенеративних, імунологічних та інших систем організму, відновлюють і нормалізують обмін речовин у організмі тварин [1, 2]. Застосування нового класу речовин — наночастинок металів, а саме наночастинок заліза, для модифікації тканинних препаратів зможе суттєво підвищити їх ефективність і поширити спектр позитивної дії на організм тварин завдяки таким унікальним властивостям зазначених наночастинок, як виражена протианемічна активність, здатність стимулювати кровотворну функцію, антимікробна активність, тощо [3].

Висока біологічна активність стимулюючих тканинних препаратів та перспективи їх модифікації наноматеріалами вимагають всебічної оцінки і моніторингу безпечності таких препаратів для тварин не тільки в момент безпосереднього використання, але і з огляду на прогнозування збереження генофонду сільськогосподарських порід. Високу прогностичну значущість у

цьому руслі мають параметри цитотоксичності та генотоксичності [4].

Метою роботи було дослідження цитотоксичності і генотоксичності стимулюючого тканинного препарату «СТП» та «СТП», модифікованого наночастинками заліза.

Матеріал і методи досліджень. Експериментальні дослідження виконані у лабораторії анаеробних інфекцій ім. В.П. Риженка ІВМ НААН України та відділі колоїдної технології природних систем ІБКХ ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України.

В роботі використовували стимулюючий тканинний препарат «СТП», розроблений науковцями лабораторії анаеробних інфекцій ім. В.П. Риженка ІВМ НААН України [1]. Стимулюючий тканинний препарат «СТП» містить гідролізати тваринного та рослинного походження, екстракти лікарських рослин, продукти бджільництва, тощо. Експериментальну субстанцію наночастинок заліза (FeNP), використану для модифікації базового препарату «СТП», синтезували в ІБКХ ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України за оригінальним протоколом методом хімічної конденсації шляхом відновлення солі заліза у водному розчині [5]. У роботі використовували сферичні наночастинки заліза середнього розміру 40 нм, які були охарактеризовані як безпечні за параметрами цитотоксичності, генотоксичності, мутагенності та належать до IV класу токсичності (малотоксичні речовини) за внутрішньовенного та до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за внутрішньошлункового введення лабораторним мишам [6].

Для модифікації препарату «СТП» здійснювали змішування препарату «СТП» із стерильною водною дисперсією наночастинок заліза. Кінцева концентрація наночастинок у модифікованому препараті становила 1,0 мг/мл за металом.

Дослідження безпечності (за показниками цитотоксичності та генотоксичності) препаратів «СТП» та «СТП», модифікованого наночастинками заліза («СТП+FeNP»), проводили з використанням тестових еукаріотичних клітин – перещеплюваної культури клітин тестикул поросят (ST), які вирощували на середовищі DMEM+RPMI (Sigma, США) із 7 % вмістом FBS (фетальної бичачої сироватки; Sigma, США) у атмосфері з 5 % CO₂ при 37 °C. Оцінку цитотоксичності препаратів здійснювали *in vitro* методом оцінки життєздатності клітин із включенням вітального барвника трипанового синього [4].

Оцінку генотоксичності препаратів «СТП» та «СТП+FeNP» здійснювали методом ДНК-комет в лужних умовах [7]. Аналіз «ДНК-комет» проводили візуально. На кожен мікропрепарат аналізували 200 «ДНК-комет» без накладень «хвостів». При цьому «ДНК-комети» розподіляли на 5 умовних типів з відповідним для кожного числом від 0 до 4. Ступінь пошкодження ДНК при цьому виражали як індекс «ДНК-комет» (I_{ДНК}). Тестування генотоксичності препаратів «СТП» та «СТП+FeNP» виконували у двох паралелях. Статистичну оцінку результатів проводили, порівнюючи показники пошкодження ДНК у піддослідній та контрольній групах. Дані двох повторностей поєднували і визначали середній показник групи. Критеріями позитивного результату були статистично достовірні високі (близькі до позитивного контролю) показники пошкодження ДНК.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати досліджень цитотоксичності препаратів «СТП» та «СТП+FeNP» на культурі еукаріотичних клітин ST методом оцінки життєздатності клітин із включенням вітального барвника трипанового синього представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Показники цитотоксичності (% живих клітин) «СТП» та «СТП+FeNP» для еукаріотичних клітин ST

Розведення	Контроль	«СТП», (% живих клітин)	«СТП+FeNP», (% живих клітин)
5	79	89	81
10	81	92	89
20	84	94	92
50	86	99	99
100	90	99	99

Як видно з таблиці 1, вже при його 5-му розведенні препаратів «СТП» та «СТП+FeNP», у середовищі культивування тестових клітин лінії ST спостерігали значну кількість живих клітин, що відрізнялася від значень контролю. При аналогічному розведенні середовища культивування дистильованою стерильною водою рівень живих клітин становив 79 %. У 50-му розведенні середовища препаратом «СТП» виживаність тестових клітин становила 100 %, хоча при контрольному 50-му розведенні рівень живих клітин становив лише 86 %. Отримані дані свідчать про підвищення рівня виживаності тестових еукаріотичних клітин завдяки введенню в середовище культивування препарату «СТП». Оцінка цитотоксичності «СТП+FeNP», виявила аналогічні рівні цитотоксичності, що свідчить про його безпечність.

Виконані дослідження генотоксичності «СТП» та «СТП+FeNP» із залученням тестової культури еукаріотичних клітин лінії ST дозволяють засвідчити таке. При використанні методу ДНК-комет в лужних умовах для тестування генотоксичності ветеринарних вакцин були отримані електрофоретичні треки типу «ДНК-комет» в зразках позитивного контролю – клітинах культури ST, оброблених 1 мМ N-нітрозометилсечовини.

В таблиці 2 наведені показники генотоксичності «СТП» та «СТП+FeNP» по відношенню до тестової культури еукаріотичних клітин лінії ST та контрольних зразків.

Таблиця 2

Таблиця генотоксичності препаратів «СТП» та «СТП+FeNP» для еукаріотичних клітин ST

Препарат / КОНТРОЛЬ	Показник генотоксичності «ДНК»	Висновок про генотоксичність
Негативний контроль	0,125±0,001	Не генотоксичний
Позитивний контроль	2,07±0,01	Генотоксичний
«СТП»	0,076 ±0,001	Не генотоксичний
«СТП+FeNP»	0,091 ±0,001	Не генотоксичний

Примітка: результати вірогідні, $p < 0,05$.

Тестування генотоксичності стимулюючого тканинного препарату «СТП» методом ДНК-комет в лужних умовах показало відсутність первинних ДНК-пошкоджень в тестових клітинах культури тестикул поросят, тоді як при обробці тестових клітин відомим мутагеном N-нітрозометилсечовиною в концентрації 1 мМ протягом 18 годин показник генотоксичності (первинних ДНК-пошкоджень) «І_{ДНК}» становив $2,07 \pm 0,01$. Показник «І_{ДНК}» тестових клітин, оброблених препаратом «СТП», становив лише $0,076 \pm 0,001$, що навіть нижче рівня первинних пошкоджень інтактних клітин, для яких «І_{ДНК}» дорівнював $0,125 \pm 0,001$. Це свідчить про стимулюючу та регенераторну дію досліджуваного тканинного препарату. Оцінка генотоксичності «СТП+FeNP» виявила аналогічну картину. Отже, отримані результати свідчать про відсутність генотоксичної дії як у базового препарату «СТП», так і у «СТП+FeNP».

Висновки: *in vitro* встановлено стимулюючу дію препарату «СТП» до тестових еукаріотичних клітин лінії ST. Показано, що як «СТП», так і «СТП», модифікований наночастинками заліза розміром 40 нм в концентрації 1,0 мг/мл за металом, є безпечними за показниками цитотоксичності та генотоксичності.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні можливості досліджень модифікації «СТП» різноманітними наночастинками металів та вивченні особливостей впливу таких препаратів на організм тварин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Патент № 4626 Україна, МПК А 61 К 9/08. Стимулюючий тканинний препарат з імуностимулюючими властивостями для тварин і птиці (СТП). В.П. Риженко, В.В. Риженко, С.М. Белік, В.О. Андріяшук, О.М. Жовнір, Н.А. Теплюк, П.П. Каменчук; IBM УААН. – NU 200605687; Заявлено 24.05.2006; Опубл. 15.01.2007, Бюл. № 1. – 6 с.
2. Вплив СТП (стимулюючого тканинного препарату) на фагоцитарну активність крові у щеплених свиней / Тютюн С.М., Горбатюк О.І., Андріяшук В.О. [та ін.] // Ветеринарна біотехнологія. – 2018. – № 32(2). – С. 550–556.
3. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація. / І.С. Чекман, З.Р. Ульберг, В.О. Маланчук, Н.О. Горчакова та ін. – К.: Поліграф плюс, 2012. – 328 с.
4. Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів: методичні рекомендації / І.М. Трахтенберг, З.Р. Ульберг, І.С. Чекман та ін. – Київ, 2013. – 108 с.
5. Перцов А.В. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии. / А.В. Перцов. М.: Изд-во МГУ, 1976. – 132 с.
6. Дорошенко А.М. Дослідження гострої токсичності наночастинок заліза при внутрішньошлунковому та внутрішньовенному шляхах введення / А.М. Дорошенко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. – № 1. – С. 48–57.
7. Оцінка біобезпеки наноматеріалів органічної та неорганічної природи методом визначення генотоксичності лужним гель-електрофорезом ізольованих еукаріотичних клітин: методичні рекомендації / С.М. Дибкова, Т.Г. Грузина, З.Р. Ульберг, та ін. – К., 2010. – 24 с.

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ГЕНОТОКСИЧНОСТИ СТИМУЛИРУЮЩЕГО ТКАНЕВОГО ПРЕПАРАТА («СТП») И «СТП», МОДИФИЦИРОВАННОГО НАНОЧАСТИЦАМИ ЖЕЛЕЗА / Дыбкова С.Н., Тютюн С.Н., Резниченко Л.С., Жовнир А.М., Андріяшук В.А., Уховская Т.Н., Грузина Т.Г.

В статті изложено анализ результатов оценки in vitro безопасности стимулирующего тканевого препарата «СТП» и «СТП», модифицированного наночастицами железа размером 40 нм с концентрацией 1,0 мг / мл по металлу. In vitro обнаружено стимулирующее

действие исследуемого тканевого препарата. По уровню показателей цитотоксичности и генотоксичности показано, что безопасными являются как базовый препарат «СТП», так и «СТП», модифицированный наночастицами железа.

Ключевые слова: стимулирующий тканевый препарат «СТП»; наночастицы железа; цитотоксичность; генотоксичность; «СТП», модифицированный наночастицами железа.

ESTIMATION OF GENOTOXICITY AND CYTOTOXICITY OF STIMULATING TISSUE PREPARATION (“STP”) AND “STP” MODIFIED BY IRON NANOPARTICLES / Dybkova S.M., Tiutun S.M., Rieznichenko L.S., Zhovnir O.M., Andriyashchuk V.A., Ukhovska T.M., Gruzina T.G.

Introduction. Stimulating tissue preparations (“STP”) increase the resistance of the organism of animals. However, the modification of tissue preparations with iron nanoparticles can significantly improve their effectiveness.

The goal of the work was to evaluate genotoxicity and cytotoxicity of stimulating tissue preparation (“STP”) and “STP” modified by iron nanoparticles.

Materials and methods. Iron nanoparticles were synthesized by the F.D.Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry the NAS of Ukraine. For the modification of the STP and STP modified by iron nanoparticles (“STP+FeNP”) the drug “STP” was mixed with a sterile aqueous dispersion of iron nanoparticles. The final concentration of nanoparticles in the modified preparation was 1.0 mg/ml by metal.

The investigations of genotoxicity and cytotoxicity of the “STP” and “STP+FeNP” was performed using eukaryotic cells line ST (testicles of pigs.) The evaluation of cytotoxicity of “STP” and “STP+FeNP” was carried out in vitro by means of evaluation of vitality of cells with the inclusion of the trypan blue.

Genotoxicity estimation in vitro for “STP” and “STP+FeNP” has been analyzed by the Comet assay method.

Results of research and discussion. The obtained data indicate an increase in the survival rate of test eukaryotic cells due to the introduction of the “STP” in the culture medium. The evaluation of the cytotoxicity of “STP+FeNP” revealed similar levels of cytotoxicity.

Testing of the genotoxicity of the “STP” showed no primary DNA damage in the cells ST line. The “ I_{DNA} ” index of test cells treated with the drug ST was 0.076 ± 0.001 , which is even below the level primary damages of intact cells for which the “ I_{DNA} ” was 0.125 ± 0.001 . The evaluation of the genotoxicity of “STP+FeNP” revealed a similar picture.

Conclusions and prospects for further research. It was established that both the STP and “STP+FeN” are safe in terms of cytotoxicity and genotoxicity.

Prospects for further research are the study of the possibility of modifying the preparation “STP” with safe metal nanoparticles of various nature.

Keywords: stimulating tissue preparation “STP”, iron nanoparicles, cytotoxicity, genotoxicity, STP modified by iron nanoparticles.

REFERENCES

1. Ryzhenko, V.P., Ryzhenko, V.V., Bjelik, S.M., Andrijashchuk, V.O., Zhovnir, O.M., Tepljuk, N.A., & Kamenchuk, P.P. (2007). Stymuljujuchyj tkanynnyj preparat z imunostymuljujuchymy vlastyvostryamy dlja tvaryn i ptyci (STP) [Stimulating tissue preparation with immune stimulating properties for animals and poultry (STP)]. Patent no. 4626 of Ukraine [in Ukrainian].
2. Tiutun, S.N., Gorbatiuk, O.I., Andriyashchuk, V.A et al. (2018). Vplyv STP (stymuljujuchogoj tkanynnojo preparaty) na fagotsytarny aktyvnist krovy y sheplenych svyne [The effect of STP (stimulating tissue preparation) on the phagocytic activity of blood in vaccinated pigs]. *Veterynarna biotekhnolohiya – Veterinary biotechnology*, 32 (2), 550-556 [in Ukrainian].

3. Chekman, I.S., Ulberg, Z.R., Malanchuk, V.O., Gorchakova, N.O., & Zupanec, I.A. (2012). Nanonauka, nanobiologiya, nanopharmacia [Nanoscience, nanobiology, nanopharmacology] Kyiv: Poligraph plus [in Ukrainian].

4. Trachtenberg, I.M., Ulberg, Z.R., Chekman, I.S. et al. (2013). *Ocinka bezpeki likarskich nanopreparativ: Metodychni rekomendacii* [Safety assessment of drugs nanopreparation: Methodological guidelines] Kyiv [in Ukrainian].

5. Percov, A.V. (1976). *Metodycheskiye razrabotki k praktikumu po kolloidnoy khimii* [Methodical developmeny to the training in colloidal chemistry]. M: Izd-vo MGU [in Russian].

6. Doroshenko, A.M. (2014). *Doslydzhenna gostroi toksychnosti nanochastynok zaliza pry vnytrishnoshlynkovomy ta vnytrishnevennomy tshlachax vvedenna*. [Investigation of the acute toxicity of iron nanoparticles in the intragastric and intravenous routes of administration]. *Farmakolohiya ta likarska toksykolohiya – Pharmacology and drug toxicology*, 1, 48-57 [in Ukrainian].

7. Dybkova, S.M., Gruzina, T.G., Ulberg, Z.R. et al. (2010). *Ocinka bezpeki nanomaterialiv organichnoi ta neorganichnoi prirody metodom vyznachenna genotoksychnosti lujnim gel-electroforezom izoluovanich eukariotychnykh clityn: Metodychni rekomendacii* [Biosafety assessment of nanomaterials of organic and inorganic nature by definition of genotoxicity by alkaline gel electrophoresis of isolated eukaryotic cells: Guidelines]. Kyiv [in Ukrainian].

УДК 636.09.087.8:636.52/.58

DOI: 10.31073/vet_biotech34-02

ДОБРОЖАН Ю.В., e-mail: alamerster@gmail.com

Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

ШЕВЧЕНКО Л.В., д-р вет. наук, проф., e-mail: shevchenko_laris@ukr.net

Національний університет біоресурсів і природокористування України

ВМІСТ КОЛІСТИНУ В ПОСЛІДІ КУРЕЙ ЗА МЕЗОФІЛЬНОГО СПОСОБУ ЗБЕРІГАННЯ

Встановлено наявність колістину у посліді курей, що свідчить про застосування антибактеріальних препаратів курям промислового і ремонтного стад, що спричиняє виділення та накопичення даного протимікробного засобу в посліді курей за його мезофільного способу зберігання. Доведено, що концентрація колістину у посліді курей за мезофільного способу зберігання знижується до 12-го місяця, після чого відбувається інтенсивне підвищення рівня цього антибіотику у порівнянні із вихідною визначеною концентрацією колістину. Враховуючи, що антимікробні засоби в складі посліду вносяться у ґрунт, можна передбачати їх вплив на мікрофлору як самого посліду, так і ґрунту.

Ключові слова: антибіотики, колістин, послід, кури.

Вступ. Основними проблемами, що потребують вирішення при вирощуванні молодняку курей та виробництві харчових яєць, є профілактика інфекційних захворювань та (або) ліквідація хвороб птиці, які виникають в умовах промислової технології виробництва продукції птахівництва [1–3]. Основними причинами поширення збудників інфекційних хвороб є висока концентрація поголів'я на обмеженій території, а також стреси, які виникають у процесі утримання, ветеринарних обробок, перегрупування, зміни комбікорму