

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ЗЕЛЕНІНА ОКСАНА МИХАЙЛІВНА

УДК 636.09:599.323.452:615.33 (043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ
МЕТАБОЛІЧНІ ПРОЦЕСИ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ ЗА ДІЇ
ЕНРОФЛОКСАЦИНУ, ПЕГЕЛЬОВАНОГО ПЕГ-400

09 - «Біологія»

091- «Біологія»

Подається на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О.М. Зеленіна

Науковий керівник: Влізло Василь Васильович, доктор ветеринарних наук,
професор, академік НААН

Львів - 2022

АНОТАЦІЯ

Зеленіна О.М. Метаболічні процеси в організмі щурів за дії енрофлорсацину, пегельованого ПЕГ-400. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 091 «Біологія» (09-Біологія). – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2022.

Метою роботи було вивчити новостворений пегельований антибиотик енрофлорсацин, дослідити антимікробну дію і вивчити вплив внутрішньом'язового введення лабораторним тваринам на стан гемопоезу, гемостазу, резистентності, антиоксидантної системи, рівень гепатотоксичності та нефротоксичності, порівняти з традиційним антибіотиком енрофлорсацином та ПЕГ-400, які використовували для його створення.

Для виконання поставлених завдань було проведено дослідження в декілька етапів. На початку експерименту, спільно з вченими НУ «Львівська політехніка» провели пегелювання антибіотика енрофлорсацину шляхом приєднання до кінців поліоксиетиленових гідрофільних закінчень ПЕГ-400 карбоксильних закінчень антибіотика енрофлорсацину. Утворилася біфільна макромолекула, яка здатна у водних розчинах формувати самостабілізовані дисперсії з нанометричними розмірами частинок дисперсної фази. Стабілізація таких частинок у водному середовищі зумовлена утворенням структурномеханічного бар'єру гідратованих поліоксиетиленових ланцюгів навколо ядра, в якому знаходиться антибіотик. Утворена сполука мала добру розчинність у воді та була стабільною. Високоєфективна рідинна хроматографія показала, що чистота пегельованого антибіотика енрофлорсацину становить 98–99 %.

На другому етапі досліджено *in vitro* антимікробну дію пегельованого антибіотика енрофлорсацину та традиційного антибіотика енрофлорсацину. Для вивчення антимікробної дії досліджуваних препаратів визначали мінімальну інгібуючу концентрацію до еталонних музейних штамів (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 11105) та польових (*Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter*) мікроорганізмів. Встановлено, що до *Escherichia coli* ATCC 11105 МІК за дії пегельованого антибіотика енрофлорсацину є удвічі нижчою (0,15 мкг/мл), порівняно з традиційною субстанцією (0,31 мкг/мл). Водночас, для *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P МІК антибіотика енрофлорсацину як у субстанції, так і у пегельованому стані була однаковою (0,31 мкг/мл). Також МІК антибіотика енрофлорсацину у традиційній субстанції та у пегельованій формі до польових штамів грампозитивних (*Staphylococcus epidermidis*) і грамнегативних (*Enterobacter*) мікроорганізмів не показало різниці бактерицидної активності.

На третьому етапі було досліджено вплив пегельованого антибіотика енрофлорсацину, традиційного антибіотика енрофлорсацину та ПЕГ-400 на функціональний стан і структуру органів та систем організму тварин. Для цього було створено 4 групи щурів: контрольну і три дослідні. Всім щурам, які були в експерименті, протягом чотирьох діб, щоденно внутрішньом'язово вводили 0,03 мл досліджуваних препаратів. Вміст антибіотика енрофлорсацину у пегельованій і традиційній формі у розчині складав 1,8 % (2,7 мг на 1 кг маси щура). Контрольній групі тварин проводили ін'єкцію 0,03 мл фізіологічного розчину.

Проведені клінічні дослідження лабораторних тварин протягом трьох тижнів після чотирикратного внутрішньом'язового введення пегельованого антибіотика енрофлорсацину, традиційного антибіотика енрофлорсацину та ПЕГ-400 показали відсутність видимих змін загального клінічного стану.

Ін'єкції в організм щурів антибіотика енрофлорсацину у традиційній формі, ПЕГ-400 та пегельованого антибіотика енрофлорсацину не спричиняє патологічних змін гемопоезу, оскільки показники кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну, а також величина гематокриту та індексів червоної крові знаходилися у переважної більшості тварин у межах фізіологічних коливань. У тварин, які отримували пегельований антибіотик енрофлорсацин, протягом експерименту показники індексів червоної крові були більш стабільними, порівняно з тими, які отримували традиційний антибіотик енрофлорсацин.

Введення щурам традиційної форми енрофлорсацину на 7-му добу після останньої ін'єкції препарату спричиняють зниження загальної кількості тромбоцитів у тварин. Водночас після введення пегельованого антибіотика енрофлорсацину в організм встановлено стабільні показники факторів згортання крові.

Внутрішньом'язові ін'єкції щурам ПЕГ-400, антибіотика енрофлорсацину у традиційній та пегельованій формах характеризується зниженням кількості лейкоцитів крові через 7-ім діб після останнього введення, порівняно з контрольними, але показники були у межах фізіологічних коливань. У даний період дослідження зростали у крові тварин паличкоядерні нейтрофіли і були відсутні еозинофіли. Зміни співвідношення різних видів лейкоцитів у крові щурів за ін'єкції досліджуваних речовин характеризуються реакцією-відповіддю на введення препаратів протягом перших семи діб, оскільки у наступні дослідження показники кількості лейкоцитів та лейкограма мало відрізнялися від контрольних тварин.

Протягом всього часу експерименту швидкість осідання еритроцитів у дослідних щурів була в межах фізіологічних значень, що вказує на відсутність запальної реакції в організмі.

Лабораторні дослідження крові тварин через 7-ім, 14-ть та 21-ну доби після останньої ін'єкції препаратів показали, що вміст ТБК-активних продуктів залежав від введеної речовини та часу дослідження. Встановлено,

що у крові тварин, яким проводили ін'єкцію традиційного антибіотика енрофлоксацину, кількість ТБК-активних продуктів була значно вищою від щурів, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин. Можливо тому у крові тварин, які отримували традиційний антибіотик енрофлоксацин, активність ензимів антиоксидантного захисту була найнижчою, а це є несприятливою ознакою, яка свідчить про посилення процесів ПОЛ і неадекватну реакцію з боку АОС. Водночас, за введення тваринам пегельованої форми антибіотика енрофлоксацину показники ТБК-активних продуктів у крові були найнижчими, що може вказувати на відсутність токсичного впливу на клітини організму. Активність СОД, каталази та ГПО у крові цих щурів була стабільною і відповідала утворенню продуктів ПОЛ, що свідчить про фізіологічність перебігу антиоксидантного захисту в організмі після ін'єкцій пегельованого антибіотика енрофлоксацину.

Проведені нами біохімічні дослідження крові та гістологічний аналіз тканин печінки дослідних тварин вказували, що пегельований антибіотик енрофлоксацин мав меншу гепатотоксичність, порівняно з традиційною субстанцією антибіотика енрофлоксацину. Дослідження функціонального стану печінки щурів показало, що вміст загального білірубіну у сироватці крові всіх дослідних груп був вищим від контрольних. Однак, вміст холестеролу у сироватці крові мало відрізнявся між групами. Слід відмітити, що за введення пегельованого антибіотика енрофлоксацину показники холестеролу були найвищими, а це можна розцінювати як стабільність його синтезу у клітинах печінки. Крім цього, вміст альбуміну в сироватці крові щурів, які отримували пегельований антибіотик енрофлоксацин, тримався протягом досліду на фізіологічно високому рівні, що вказує на добрий стан протеїнсинтезувальної функції печінки. Стабільними були й показники загального протеїну та глобулінових фракцій у сироватці крові, це є ознакою відсутності подразнення клітин системи мононуклеарних фагоцитів за введення препарату.

Дослідження активності АЛАТ у сироватці крові показали, що у щурів, яким проводили внутрішньом'язові ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлоксацину, показники активності ензиму були нижчими від контрольних та двох інших дослідних груп. При цьому, активність АЛАТ у крові тварин, які отримували традиційну субстанцію антибіотика енрофлоксацину, трималася високою протягом трьох тижнів, що може свідчити про ураження клітин печінки. Водночас, активність АсАТ у сироватці крові тварин протягом експерименту була вищою у дослідних груп щурів, які отримували ПЕГ-400 та пегельований антибіотик енрофлоксацин. Очевидно, що зростання активності АсАТ у сироватці крові щурів, яким вводили досліджувані речовини, може бути пов'язано з активним проникненням їх у клітини і мітохондрії, де даний ензим має високу активність. На 14-ту і 21-шу доби після останньої ін'єкції активність АсАТ у крові тварин, які отримували пегельований антибіотик енрофлоксацин, знижувалася, порівняно з тими, яким проводили ін'єкцію субстанції традиційного антибіотика енрофлоксацину. Якщо порівнювати активність ензиму у дослідних групах, то можна припустити, що енрофлоксацин у традиційній формі значно повільніше проникає з м'язової тканини (місця введення) у кров'яне русло і метаболізується в тканині печінки, порівняно з ПЕГ-400 і пегельованим антибіотиком енрофлоксацином. Встановлений факт можна характеризувати як покращення швидкості проникнення і нагромадження в клітинах антибіотика енрофлоксацину, з'єднаного з ПЕГ-400, для його транспортування. Отже, за динамікою активності АЛАТ та АсАТ в крові тварин можна зробити висновок, що у щурів, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, ураження клітин печінки можливе лише у перші дні після внутрішньом'язових ін'єкцій, а відновлення проходить швидше, порівняно зі застосуванням традиційного антибіотика енрофлоксацину.

Подібні зміни встановлено і при визначенні активності ГГТП та ЛФ у сироватці крові щурів. Так, у крові тварин, які отримували традиційний антибіотик енрофлоксацин, активність даних ензимів через 7-ім діб після останнього введення препаратів була вищою від тих, які отримували пегельований антибіотик енрофлоксацин.

При гістологічному дослідженні тканин печінки тварин, які отримували субстанцію традиційного антибіотика енрофлоксацину, протягом трьох тижнів після останнього введення препарату встановлювали ознаки зернистої дистрофії, лізису, паранекрозу, некрозу паренхіми печінки та пікноз ядер гепатоцитів. У групі щурів, які отримували пегельований антибіотик енрофлоксацин, на 7-му добу експерименту встановлено, що у полі зору зустрічаються окремі клітини печінки з ознаками атрофії, зернистої дистрофії, паранекрозу та некрозу. Однак, у цих тварин на 14-ту та 21-шу добу після останньої ін'єкції морфологічний стан печінки був без змін та ідентичний зі структурою контрольної групи.

Отже, біохімічні дослідження крові та гістологічний аналіз тканин печінки тварин вказували, що пегельований антибіотик енрофлоксацин мав меншу гепатотоксичність, порівняно з традиційною субстанцією антибіотика енрофлоксацину.

За нашими дослідженнями, протягом всього часу експерименту у сироватці крові щурів всіх груп концентрація креатиніну не виходила за верхню межу фізіологічних коливань. Однак, проведені гістологічні дослідження нирок тварин показали порушення структури. Зокрема, за внутрішньом'язових ін'єкцій традиційної форми антибіотика енрофлоксацину дослідним щурам встановлювали морфологічні зміни структури нирок протягом 21-го дня після останнього введення препарату. У щурів даної групи зареєстровано ознаки зернистої дистрофії, осередки паранекрозу та некрозу нефроцитів звивистих каналців. Чотирикратне внутрішньом'язове введення дослідним тваринам пегельованого антибіотика

енрофлоксацину спричиняло лише незначні зміни у нирках і тільки протягом перших семи діб після введення. Отже, пегелювання антибіотика енрофлоксацину веде до зменшення нефротоксичності.

Таким чином, пегілювання антибіотика енрофлоксацину збільшує розмір і молекулярну масу кон'югованих біомолекул, підвищує їх розчинність у воді, захист від ферментативної деградації, зниження гепатотоксичності та нефротоксичності, обмеження імуногенних та антигенних реакцій, не впливає на гемопоез та гемостаз. Проведені дослідження можуть бути цінними для впровадження у виробництво антибактеріальних препаратів на фармацевтичних підприємствах.

Ключові слова: щури, пегельований антибіотик енрофлоксацин, ПЕГ-400, гепатотоксичність, нефротоксичність, гематологічні та біохімічні показники, гемостаз, система антиоксидантного захисту, антимікробна активність.

SUMMARY

Zelenina O.M. Metabolic processes in the body of rats under the actions of enrofloxacin PEGylated with PEG-400.- Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Candidate of Biological Sciences (Doctor of Philosophy) in specialty 091 "Biology" (09-Biology). - Institute of Animal Biology of the National Academy of Sciences, Lviv, 2022.

The aim of the work was to study the antimicrobial effect of the PEGylated antibiotic enrofloxacin, to investigate the state of hematopoiesis, hemostasis, resistance, the antioxidant system in the body, the level of hepatotoxicity and nephrotoxicity when administered intramuscularly to laboratory animals and to compare its creation with the traditional antibiotic.

In the course of the work, research was carried out in several stages. At the beginning of the experiment, together with the scientists of Lviv Polytechnic National University, we conducted PEGylation of the antibiotic enrofloxacin by attaching the carboxyl ends of the antibiotic enrofloxacin to the ends of the polyoxyethylene hydrophilic residues of the PEG-400 nanopolymer. A biphilic macromolecule was formed, which is capable of forming self-stabilized dispersions with nanometer-sized particles of the dispersed phase in aqueous solutions. Stabilization of such particles in an aqueous environment is due to the formation of a structural-mechanical barrier of hydrated polyoxyethylene chains around the nucleus, in which the antibiotic is located. The obtained compound had good solubility in water and was stable. High-performance liquid chromatography showed that the purity of the PEGylated antibiotic enrofloxacin is 98–99%.

At the second stage, the *in vitro* antimicrobial activity of the PEGylated antibiotic enrofloxacin and the traditional antibiotic enrofloxacin was studied. To evaluate the antimicrobial action of the studied preparations, the minimum inhibitory concentration was determined for museum reference strains

(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 11105) and field strains (*Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter*) 15 µg/ml) compared with the traditional substance (0.31 µg/ml). At the same time, for *S. aureus* ATCC 6538P, the MIC of the antibiotic enrofloxacin both in the traditional and in PEGylated forms was the same (0.31 µg/ml). Also, the MIC of the antibiotic enrofloxacin in the traditional and in the PEGylated form for field gram-positive (*S. epidermidis*) and gram-negative (*Enterobacter*) microorganisms showed no difference in bacteriostatic activity.

At the third stage, the effect of PEGylated antibiotic enrofloxacin, traditional antibiotic enrofloxacin, and PEG-400 nanopolymer on the functional state and structure of organs and systems of the animal body was studied. For this, 4 groups of rats were created: a control group and three experimental ones. All rats that were in the experiment, for four days, were intramuscularly injected daily with 0.03 ml of the studied preparations. The content of the antibiotic enrofloxacin in PEGylated and traditional form in the solution was 1.8%. The control group of animals was injected with 0.03 ml of saline.

Conducted preclinical studies of laboratory animals for three weeks after four intramuscular injections of the PEGylated antibiotic enrofloxacin, traditional antibiotic enrofloxacin and PEG-400 nanopolymer showed no visible changes in the general clinical condition.

Injections into the body of rats of the antibiotic enrofloxacin in the traditional form, PEG-400 nanopolymer and PEGylated antibiotic enrofloxacin do not cause pathological changes in hematopoiesis, since the erythrocyte count and hemoglobin content fluctuate. In animals treated with the PEGylated antibiotic enrofloxacin, red blood indices were more stable during the experiment compared to those treated with the traditional antibiotic enrofloxacin.

The introduction of the traditional form of enrofloxacin to rats on the 7th day after the last injection of the drug leads to a decrease in the total number of platelets in animals. At the same time, after the introduction of the PEGylated

antibiotic enrofloxacin, stable indicators of blood coagulation factors in the body were established.

Intramuscular injections of PEG-400 nanopolymer, antibiotic enrofloxacin in traditional and PEGylated forms in rats, are characterized by a decrease in the number of blood leukocytes 7 days after the last injection compared to the control, but it was within physiological fluctuations. During this period of the study, stab neutrophils also increased in the blood of animals and eosinophils were absent. Changes in the ratio of different types of leukocytes in the blood of rats upon administration of the test substances are characterized by a response to the administration of drugs during the first seven days, since in subsequent studies, the indicators of the number of leukocytes and the leukogram differed little from control animals.

During the entire time of the experiment, the erythrocyte sedimentation rate in experimental rats was within the physiological range, which indicates the absence of an inflammatory reaction in the body.

Laboratory studies of the blood of animals on 7, 14 and 21 days after the last injection of drugs showed that the content of TBA-active products depended on the administered substance and the time of the study. It was found that in the blood of animals injected with the traditional antibiotic enrofloxacin, the amount of TBA-active products was significantly higher than in rats that were injected with the PEGylated antibiotic enrofloxacin. This may indicate an increase in the processes of lipid peroxidation. Perhaps that is why in the blood of animals treated with the traditional antibiotic enrofloxacin, the activity of antioxidant defense enzymes was the lowest, and this is an unfavorable sign indicating an increase in lipid peroxidation processes and an inadequate response from the AOS. At the same time, when the PEGylated form of the antibiotic enrofloxacin was administered to animals, the indicators of TBA-active products in the blood were the lowest, which may indicate the absence of a toxic effect on the cells of the body. The activity of SOD, catalase and GPO in the blood of these rats was stable and corresponded to

the formation of lipid peroxidation products, which indicates the physiological course of the body's antioxidant defense.

Our biochemical blood tests and histological analysis of liver tissues of research animals indicated that the PEGylated antibiotic enrofloxacin had less hepatotoxicity compared to the traditional substance of the antibiotic enrofloxacin. The study of the functional state of the liver of rats showed that the content of total bilirubin in the blood serum of all experimental groups was higher than in the control during the entire time of the study. However, serum cholesterol levels did not differ much between the groups. It should be noted that with the introduction of the PEGylated antibiotic enrofloxacin, cholesterol indicators were physiologically the highest, which can be regarded as the stability of its synthesis in liver cells. In addition, the content of albumin in the blood serum of rats treated with the PEGylated antibiotic enrofloxacin remained at a physiologically high level during the experiment, which indicates a good state of the protein-synthesizing function of the liver. It should also be noted that the content of globulin fractions in the blood serum and total protein are stable, which is a sign of the absence of cell inflammation in the reticuloendothelial system when the drug is administered.

Our studies of ALT activity in blood serum showed that rats that received intramuscular injections of the PEGylated antibiotic enrofloxacin had lower levels of enzyme activity than the control and two other study groups. At the same time, the activity of ALT in the blood of animals treated with the “pure” substance of the antibiotic enrofloxacin remained high for three weeks, which may indicate damage to liver cells. At the same time, the activity of AST in the blood serum of animals during the experiment was higher in the experimental groups of rats treated with the PEG-400 nanopolymer and PEGylated antibiotic enrofloxacin. Obviously, the increase of AST activity in the blood serum of rats that were injected with the test substances may be associated with their active penetration into cells and mitochondria, where this enzyme has a high activity. On days 14 and 21 after the last injection, the activity of AST in the blood of animals treated with PEGylated

enrofloxacin decreased compared to those that were injected with the traditional antibiotic enrofloxacin. Comparing the activity of the enzyme in the experimental groups, it can be assumed that enrofloxacin in the traditional form permeates from the muscle tissue (injection site) into the bloodstream much more slowly and is metabolized in the liver tissue compared to the PEG-400 nanopolymer and PEGylated antibiotic. The established fact can be characterized as an improvement in the rate of penetration and accumulation in cells of the antibiotic enrofloxacin, combined with the PEG-400 nanopolymer, for its transportation. Therefore, according to the dynamics of the activity of ALT and AST in the blood of animals, it can be concluded that in rats that were injected with the PEGylated antibiotic enrofloxacin, damage to liver cells is possible only in the first days after intramuscular injections, and recovery is faster compared to the traditional antibiotic enrofloxacin.

Similar changes of GGTP and LF activities were established in the blood serum of rats. Thus, in the blood of animals treated with the traditional antibiotic enrofloxacin, the activity of these enzymes 7 days after the last administration of the drugs was higher than those that received the PEGylated antibiotic enrofloxacin.

Histological examination of the liver tissues of animals treated with the traditional antibiotic substance enrofloxacin showed signs of granular dystrophy, lysis, paranecrosis, necrosis of the liver parenchyma and pycnosis of hepatocyte nuclei within three weeks after the last administration of the drug. In the group of rats treated with the PEGylated antibiotic enrofloxacin, on the 7th day of the experiment, it was found that individual liver cells with signs of atrophy, granular degeneration, paranecrosis and necrosis were found in the field of view. However, in these animals, on days 14 and 21 after the last injection, the morphological state of the liver was unchanged and identical to the structural group.

So, biochemical blood tests and histological analysis of animal liver tissues indicated that the PEGylated antibiotic enrofloxacin had less hepatotoxicity compared to the traditional form of antibiotic enrofloxacin.

According to our studies, during the entire time of the experiment, the concentration of creatinine in the blood serum of rats of all groups did not go beyond the limit of physiological fluctuations. Conducted histological studies of the kidneys of animals showed a violation of the structure. In particular, with intramuscular injections of the traditional form of the antibiotic enrofloxacin, morphological changes in the structure of the kidneys were established in experimental rats for 21 days after the last injection of the drug. In rats of this group, signs of granular dystrophy, foci of paranecrosis and necrosis of nephrocytes of the convoluted tubules were registered. Four intramuscular administrations of the PEGylated antibiotic enrofloxacin to experimental animals caused only minor changes in the kidneys and only during the first seven days after administration, and creatinine content in the blood serum did not indicate a violation of the excretory function of the kidneys. Therefore, PEGylation of the antibiotic enrofloxacin leads to a decrease of nephrotoxicity.

Thus, PEGylation of the antibiotic enrofloxacin increases the size and molecular weight of conjugated biomolecules, increases their pharmacokinetics, pharmacodynamics, water solubility, protection against enzymatic degradation, reduced hepatotoxicity and nephrotoxicity, and limitation of immunogenic and antigenic reactions. The conducted studies can be valuable for the introduction to production of antibacterial drugs at pharmaceutical enterprises.

Key words: rats, PEGylated antibiotic enrofloxacin, PEG-400, hepatotoxicity, nephrotoxicity, hematological and biochemical parameters, hemostasis, antioxidant defense system, antimicrobial activity.

Список праць, опублікованих за темою дисертації:

Статті у фахових наукових виданнях України:

1. Зеленіна О. М., Остапів Д. Д., Влізло В. В., Дронь І. А., Винницька С. І. Вміст гемоглобіну, кількість еритроцитів і лейкоцитів, лейкограма крові щурів за введення енрофлораксину у складі полімеру. Біологія тварин, 2020. Т. 22, № 1. С. 26-30. *(Здобувачка брала участь у проведенні гематологічних досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*

2. Зеленіна О. М., Остапів Д. Д., Дронь І. А., Самарик В.Я., Косенко Ю. М., Влізло В. В. Активність трансаміназ і вміст білірубину у крові щурів за введення антибіотика енрофлораксину, ПЕГ-400 та їх комплексу. Наукові доповіді НУБіП України. 2020. № 4(86). *(Здобувачка провела дослідження та підготувала статтю до публікації).*

Стаття у науковому фаховому виданні України, яке включене до міжнародної бази даних Web of Science:

3. Zelenina O.M., Vlizlo V.V., Ostapiv D.D., Samaryk V.Ja., Dron I.A., Kozak M.P., Kuzmina N.V., Chernushkin B.O., Maksymovych I.A., Leno M.I., Rusyn V.I., Prystupa O.I., Fedorovych V.L., Lukashchuk B.O., Zinko H.O. PEGylation of antibiotic enrofloxacin and its effects on the state of the antioxidant system in rats. Ukrainian Journal of Ecology. 2021. 11(1), 202-208. (Web of Science). *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*

Стаття у науковому фаховому зарубіжному виданні, яке включене до міжнародної бази даних Scopus (Q2)

4. Zelenina O.M., Vlizlo V.V, Kozak M.R., Ostapiv D.D., Samaryk V.Ja., Dron I.A., Stetsko T.I., Skrypka M.V., Tomchuk V.A., Danchuk O.V., Levchenko A.G. Antimicrobial activity of the PEGylated antibiotic enrofloxacin and its functional and structural effect on the liver in rats. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2022. 12(06). 068–075. (Scopus, Q2). *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*

Патент України на корисну модель:

5. Спосіб посилення антимікробної дії антибіотика енрофлоксацину. Патент на корисну модель № 152046 України. №u202200707 заявл. 17.02.22. опубл. 19.10.2022. Бюл. № 42. *(Здобувачка експериментально обґрунтувала спосіб посилення антимікробної дії антибіотика енрофлоксацину та підготувала матеріал для патенту).*

Тези наукових доповідей:

6. Зеленіна О., Олекса В. Біологічна дія новоствореного комплексу енрофлоксацину у складі полімерного транспортера з псевдополіамінокислот. Біологія тварин. 2018. Т. 20, № 4. С. 81-155. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку).*

7. Зеленіна О. М., Влізло В. В. Стан антиоксидантної системи у щурів за введення пегельованого енрофлоксацину. Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні епідемічні виклики в концепції «Єдине здоров'я». Тернопіль. 2021. С. 23. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку).*

8. Zelenina O., Kozak M., Ostapiv D., Vlizlo V. Protein content in rats' blood under the influence of enrofloxacin in various forms. The animal biology. 2021. Vol. 23, № 3. P. 128. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку).*

9. Vlizlo V., Ostapiv D., Samaryk V., Stegnyy B., Kozak M., Zelenina O., Dron I. PEGylation of enrofloxacin reduces minimum inhibitory concentrations and hepatotoxic effects in rats. Medical Biodefense Conference. Munich. 2021. P. 103-104. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку).*

10. Зеленіна О. М. Пегелювання антибіотика енрофлоксацину та його вплив на активність індикаторних ензимів і структуру печінки. Аграрний вісник Причорномор'я. Одеса. 2021. С. 31-34. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку).*

11. Зеленіна О. М., Козак М.Р., Остапів Д. Д., Самарик В. Я., Слівінська Л.Г., Щербатий А.Р., Леньо М.І., Влізло В. В. Функціональний стан нирок у тварин за застосування пегельованого антибіотика енрофлоксацину. II конференція «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактики у ветеринарній медицині». Львів. 2021. С. 56-57. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку).*

12. Зеленіна О.М., Влізло В.В. Кількість тромбоцитів крові тварин та їх індекси за введення різних форм антибіотика енрофлоксацину. Матеріали Міжнародної наукової конференції «Єдине здоров'я-2022». Київ. 2022. С.65-66. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	22
ВСТУП	23
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	30
1.1. Антибіотики. Стан сучасної протимікробної терапії	30
1.2. Антибактеріальні властивості фторхінолонів. Енрофлоксацин.	31
1.3. Використання поліетиленгліколю (ПЕГ) при створенні препаратів.	34
1.4. Пегелювання антибактеріальних засобів	41
1.5. Функціональний стан організму за введення антибактеріальних препаратів	46
Висновки до розділу 1	48
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	50
2.1. Об'єкти та передумови досліджень	50
2.2. Схема дослідження	51
2.3. Матеріали та обладнання	53
2.4. Методи дослідження	56
2.4.1. Фізичні дослідження крові	56
2.4.2. Морфологічні дослідження крові	56
2.4.3. Біохімічні дослідження крові	57
2.4.4. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів і ензимів антиоксидантної системи	58
2.4.5. Метод гель-електрофорезу протеїнів	60
2.4.6. Мікробіологічні методи досліджень	61
2.4.7. Гістологічні дослідження тканин	62
2.4.8. Комп'ютерне і програмне забезпечення роботи та статистичний аналіз отриманих результатів	63

РОЗДІЛ 3. АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ПЕГЕЛЬОВАНОГО ТА ТРАДИЦІЙНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ	64
3.1. МІК антибіотика енрофлорсацину у традиційній та пегельованій формах на музейних штаммах мікроорганізмів	64
3.2. МІК антибіотика енрофлорсацину у традиційній та у пегельованій формах до польових штамів мікроорганізмів	65
Висновки до розділу 3	67
РОЗДІЛ 4. ГЕМАТОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЩУРІВ ЗА ВВЕДЕННЯ ПЕГЕЛЬОВАНОГО ТА ТРАДИЦІЙНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ І ПЕГ-400	68
4.1. Кількість еритроцитів у крові щурів	68
4.2. Вміст гемоглобіну у крові щурів	70
4.3. Величина гематокриту крові щурів	72
4.4. Індеси червоної крові	73
4.4.1. Середній об'єм еритроцита крові щурів	73
4.4.2. Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті	74
4.4.3. Середній вміст гемоглобіну в еритроциті	76
4.4.4. Колірний показник	77
Висновки до розділу 4	78
РОЗДІЛ 5. КІЛЬКІСТЬ ЛЕЙКОЦИТІВ, ЛЕЙКОГРАМА ТА ШВИДКІСТЬ ОСІДАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ КРОВІ ЩУРІВ ЗА ВВЕДЕННЯ ПЕГЕЛЬОВАНОГО ТА ТРАДИЦІЙНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ І ПЕГ-400	80
5.1. Кількість лейкоцитів та лейкограма у крові	80
5.2. Швидкість осідання еритроцитів	84
Висновки до розділу 5	85
РОЗДІЛ 6. КІЛЬКІСТЬ ТРОМБОЦИТІВ КРОВІ ЩУРІВ ТА ЇХ ІНДЕКСИ ЗА ВВЕДЕННЯ ПЕГЕЛЬОВАНОГО ТА	

ТРАДИЦІЙНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ І ПЕГ-400	87
6.1. Кількість тромбоцитів	87
6.2. Тромбоцитарні індекси	88
6.2.1. Середній об'єм тромбоцитів	88
6.2.2. Ширина розподілу тромбоцитів	89
6.2.3. Величина тромбокрити крові	90
Висновки до розділу 6	91
РОЗДІЛ 7. СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У КРОВІ ЩУРІВ ЗА ВВЕДЕННЯ ПЕГЕЛЬОВАНОГО ТА ТРАДИЦІЙНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ І ПЕГ-400	93
7.1. Вміст ТБК-активних продуктів у крові	93
7.2. Активність СОД у крові	94
7.3. Активність каталази у крові	96
7.4. Активність глутатіонпероксидази у крові	98
Висновки до розділу 7	99
РОЗДІЛ 8. ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН І СТРУКТУРА ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ ЗА ВВЕДЕННЯ ПЕГЕЛЬОВАНОГО ТА ТРАДИЦІЙНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ І ПЕГ-400	101
8.1. Вміст загального білірубіну у сироватці крові	101
8.2. Вміст холестеролу у сироватці крові	102
8.3. Вміст загального протеїну у сироватці крові	104
8.4. Вміст альбуміну у сироватці крові	105
8.5. Вміст альфа-глобулінів у сироватці крові	107
8.6. Вміст бета-глобулінів у сироватці крові	109
8.7. Вміст гамма-глобулінів у сироватці крові	110
8.8. Альбуміно-глобуліновий коефіцієнт	112

8.9. Активність АлАТ у сироватці крові	113
8.10. Активність АсАТ у сироватці крові	115
8.11. Коефіцієнт де Рітіса	116
8.12. Активність ГГТП у сироватці крові	117
8.13. Активність ЛФ у сироватці крові	119
8.14. Гістологічне дослідження тканин печінки	121
Висновки до розділу 8	127
РОЗДІЛ 9. ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН І СТРУКТУРА НИРОК У ЩУРІВ ЗА ВВЕДЕННЯ ПЕГЕЛЬОВАНОГО ТА ТРАДИЦІЙНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ І ПЕГ-400	
9.1. Вміст креатиніну у сироватці крові	131
9.2. Гістологічне дослідження тканин нирок	132
Висновки до розділу 9	138
РОЗДІЛ 10. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	
ВИСНОВКИ	153
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ	156

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АлАТ	аланінамінотрансфераза;
АМП	антимікробні пептиди;
АсАТ	аспартатамінотрансфераза;
АОС	антиоксидантна система;
АФК	активні форми кисню;
ГГТП	гамма-глутамілтранспептидаза;
ГПО	глутатіонпероксидаза;
ЛФ	лужна фосфатаза;
МІК	мінімальна інгібувальна концентрація;
ПААГ	поліакриламідний гель;
ПЕГ-400	поліетиленгліколь з молекулярною масою 400 Да;
ПОЛ	пероксидне окиснення ліпідів;
СОД	супероксиддисмутаза;
ТБК	тіобарбітурова кислота;
ШОЕ	швидкість осідання еритроцитів

ВСТУП

Мікроорганізми здатні протистояти антибактеріальним препаратам завдяки швидкій еволюції генетичних механізмів, що призводить до формування резистентності. Це зумовлює необхідність переглянути стратегію й тактику застосування антибіотиків [1]. Однією із причин, що знижує ефективність антибіотиків, є недостатня бактеріальна дія внаслідок поганого проникнення через клітинні мембрани та, відповідно, низький вміст і активність у патогенних мікроорганізмах [2].

Сьогодні існує необхідність розвитку нових технологій, які дозволяють створювати високоефективні та безпечні антибактеріальні засоби для організму. Останнє десятиліття характеризується активним розвитком нанотехнологій та інноваційним підходом боротьби з антимікробною стійкістю [3-9]. Однією з найбільш перспективних технологій є розробка сполук лікарських форм антибактеріальних препаратів з нанополімерами, які виконують функцію носія антибіотиків [10-14]. Актуальним є розробка таких полімерів, які б забезпечували захист антибіотиків від несприятливих умов навколишнього середовища, стабілізували їх транспортування до органів і тканин, сповільнювали деструкцію та виведення з організму [10]. При цьому, важливим є щоб створені нові антибактеріальні засоби мали добре проникнення у вогнища патологічного процесу, що сприяло б прискоренню одужання [3, 15]. Забезпечення ефективності цільової доставки лікарських засобів веде до збільшення їх концентрації лише у місці ураження, мінімізуючи загальну токсичну дію на організм [11, 16].

Пегелювання є одним з найуспішніших шляхів поліпшення доставки лікарських препаратів [17]. ПЕГ є біодеградабельним та біосумісним, оскільки не утворює токсичних метаболітів, і є комерційно доступним [18, 19].

Важливим етапом доклінічних досліджень лікарських засобів є визначення їх токсичності [16, 20]. Серед лікарських препаратів, антибіотики мають найбільш виражені побічні реакції, що обмежує їх використання [21]. Введення в організм антибактеріальних засобів спричиняє побічні дії, які характеризуються ураженням життєво важливих органів і систем [22]. Зокрема, антибіотики стимулюють клітинне дихання з подальшим прискоренням ендogenous утворення реактивних видів Оксигену [23], що веде до розвитку оксидативного стресу [21–26]. Одними з проявів побічної дії антибіотиків є їх гепатотоксичність та нефротоксичність [27, 28, 29].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота була фрагментом планової наукової програми наукових досліджень НААН 38 «Наукове забезпечення контролю епізоотичного благополуччя тваринництва та систем біологічної і продовольчої безпеки України» (Епізоотичне благополуччя, біологічна та продовольча безпека) (2016–2020); 38.01.06.05 Ф Розроблення методології та теоретичних основ лікування і профілактики пріонних інфекцій шляхом створення препаратів нового покоління з використанням нанотехнологій № ДР 0117u001417. Програма (підпрограми) наукових досліджень НААН 34. Забезпечення стабільного епізоотичного благополуччя та продовольчої безпеки України у контексті реалізації стратегії МЕБ-ВООЗ-ФАО «Єдине здоров'я» («Єдине здоров'я, біологічна та продовольча безпека») та 34.01.05.02 П. Вплив препаратів, створених з використанням нанобіополімерних транспортерів-контейнерів, на організм та продуктивність тварин (№ ДР 0121U108681) (2021–2023 рр).

Дисертаційна робота виконана впродовж 2018–2022 років у лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН. Окремі фрагменти роботи було проведено в Багатопрофільній лабораторії ветеринарної медицини та на кафедрі нормальної і патологічної морфології та судової ветеринарії (гістологічні дослідження тканин органів) Одеського

державного аграрного університету (ОДАУ) та у Державному науково-дослідному контрольному інституті ветеринарних препаратів та кормових добавок (мікробіологічні дослідження), м. Львів. Пегелювання антибіотика енрофлоксацину полімером ПЕГ-400 проведено в лабораторії кафедри органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка».

Мета і завдання дослідження

Метою роботи було вивчити пегельований антибіотик енрофлоксацин, встановити антимікробну дію і дослідити стан метаболічних процесів в організмі, рівень гепатотоксичності та нефротоксичності за внутрішньом'язового введення лабораторним тваринам, порівняти з традиційним антибіотиком енрофлоксацином та ПЕГ-400, які використовували для його створення.

Для досягнення поставленої мети у роботі визначено такі основні завдання:

- провести пегелювання антибіотика енрофлоксацину;
- встановити *in vitro* антимікробну дію традиційного та пегельованого антибіотиків енрофлоксацину;
- вивчити вплив внутрішньом'язової ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлоксацину і речовин, які використовували для його синтезу –ПЕГ-400 та антибіотик енрофлоксацин, на гематологічні показники крові лабораторних щурів;
- дослідити кількість лейкоцитів, лейкограму та ШОЕ крові у лабораторних тварин за введення традиційного та пегельованого антибіотика енрофлоксацину і ПЕГ-400;
- визначити вміст ТБК-активних продуктів і активність ензимів антиоксидантного захисту (СОД, КАТ, ГПО) у крові за внутрішньом'язової ін'єкції щурам пегельованого та традиційного антибіотика енрофлоксацину і ПЕГ-400;

- дослідити функціональний стан і структуру печінки у щурів за внутрішньом'язового введення антибіотика енрофлоксацину у традиційній та пегельованій формах і ПЕГ-400;
- дослідити функціональний стан і структуру нирок у щурів за внутрішньом'язової ін'єкції антибіотика енрофлоксацину у традиційній та пегельованій формах і ПЕГ-400.

Об'єкт дослідження – антибактеріальні властивості пегельованого антибіотика енрофлоксацину та його вплив на гемопоез, гемостаз, резистентність, систему антиоксидантного захисту, функціональний стан і структуру печінки та нирок.

Предмет дослідження – пегельований антибіотик енрофлоксацин, антибіотик енрофлоксацин, ПЕГ-400, антибактеріальна активність, резистентність, фізичні, морфологічні та біохімічні показники крові, система антиоксидантного захисту, гістологічні дослідження органів.

Методи дослідження. У роботі використовували мікробіологічні (оцінка антимікробної дії препаратів), гематологічні, біохімічні та гістологічні методи, електрофорез в поліакриламідному гелі, статистичний аналіз.

Наукова новизна отриманих результатів

Уперше проведено пегелювання антибіотика енрофлоксацину, комплексно досліджено його вплив на мікроорганізми та організм лабораторних тварин. Отримано нові дані дії пегельованого антибіотика енрофлоксацину на метаболічні процеси в організмі лабораторних тварин і досліджено антибактеріальні властивості, проведено порівняння з традиційним антибіотиком енрофлоксацином і ПЕГ-400, які використовувалися для його створення. Вперше встановлено, що пегелювання антибіотика енрофлоксацину веде до покращення його антимікробних властивостей щодо музейних штамів мікроорганізмів *Escherichia coli* ATCC 11105. Водночас, мінімальна інгібуюча концентрація

на музейні штами мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P і польові штами грампозитивних (*Staphylococcus epidermidis*) та грамнегативних (*Enterobacter*) мікроорганізмів була однаковою для антибіотика енрофлоксацину як у традиційній субстанції, так і у пегельованій формах. Дослідження пегельованого антибіотика енрофлоксацину *in vivo* на лабораторних щурах після чотириразової внутрішньом'язової ін'єкції показало кращу біосумісність для організму, порівняно з традиційною субстанцією антибіотика енрофлоксацину. Вперше з'ясовано, що введення в організм щурів пегельованого антибіотика енрофлоксацину не спричиняє патологічних змін гемопоезу, не має негативного впливу на фактори згортання крові, не спричиняє запальної реакції, має незначну та короткотривалу дію на стан антиоксидантної системи організму, низьку гепатотоксичність та нефротоксичність, порівняно з антибіотиком енрофлоксацином у традиційній формі. Після внутрішньом'язових ін'єкцій пегельованого антибіотика енрофлоксацину незначні зміни показників крові щурів спостерігаються лише у перші доби, а за введення традиційної субстанції антибіотика енрофлоксацину – до 21-ої доби.

Практичне значення отриманих результатів

Проведені дослідження показали, що пегелювання антибіотика енрофлоксацину покращує його антимікробну дію. Чотириразові внутрішньом'язові ін'єкції тваринам пегельованого антибіотика енрофлоксацину можуть мати короткотривалий та незначний негативний вплив на організм, порівняно з введенням традиційної форми антибіотика енрофлоксацину, за якого встановлено гепатотоксичність, нефротоксичність та негативну дію на антиоксидантну систему. Проведене спільно з вченими НУ «Львівська політехніка» пегелювання антибіотика енрофлоксацину, а також вивчені нами антимікробної дії та дослідження біосумісності й токсичності його на організм тварин показало перспективність впровадження розробки у фармацевтичну промисловість України.

Результати впроваджено в навчально-педагогічний процес кафедри фізіології, патофізіології та біохімії Одеського державного аграрного університету, кафедри органічної хімії НУ «Львівська політехніка», кафедри фізіології Одеського державного медичного університету, кафедри фармакології та токсикології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, кафедри клініко-лабораторної діагностики та фармакології і кафедри генетики, фізіології рослин та мікробіології ДВНЗ «Ужгородський національний університет».

Особистий внесок здобувачки

Дисертантка самостійно провела патентно-інформаційний пошук та проаналізувала джерела літератури, виконала експериментальну частину роботи і статистичну обробку даних. Визначення мети й завдань, відбір методів дослідження, аналіз та обговорення отриманого матеріалу, підготовка рукописів статей проводилися спільно з науковим керівником док. вет. наук, професором, академіком НААН України Влізлом В.В. Гістологічні дослідження тканин печінки та нирок проведено спільно з док. вет. наук, професоркою Скрипкою М.В. з кафедри кафедри нормальної і патологічної морфології та судової ветеринарії Одеського державного аграрного університету. Мікробіологічні дослідження виконано за консультативної допомоги канд. с.-г. наук Стецька Т.І. з Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів. Усі розділи дисертації написані авторкою самостійно. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, використано фактичний матеріал досліджень автора.

Апробація результатів дисертації

Основні наукові положення дисертаційної роботи були представлені на: Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні епідемічні виклики в концепції «Єдине здоров'я» (Тернопіль, 2021); The 1st Ukrainian-

Polish Scientific forum Agrobioprospectives, Institute of animal biology NAAS (Львів, 2021); Medical Biodefense Conference (Munich, 2021); I Міжнародній науково-практичній конференції НПП та молодих науковців «Актуальні аспекти розвитку науки і освіти» (Одеса, 2021); II конференції «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактики у ветеринарній медицині» (Львів, 2021); Міжнародній науковій конференції «Єдине здоров'я-2022», Київ.

Публікації. Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у 12 наукових працях, зокрема 4 статтях, з яких 2 у фахових наукових виданнях України, що входять до категорії Б, 1 – у зарубіжному виданні, яке включене до міжнародної бази даних «Web of Science», 1 – у зарубіжному виданні, яке включене до міжнародної бази даних Scopus (Q₂), а також 7 тезах доповідей у матеріалах наукових міжнародних і вітчизняних конференцій та конгресів. Авторкою отримано один патент на корисну модель.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу й узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел літератури. Дисертацію викладено на 189 сторінках комп'ютерного тексту (основний зміст 155 сторінок), проілюстровано 47 рисунками та 3 таблицями. Список використаних джерел містить 270 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Антибіотики. Стан сучасної протимікробної терапії.

На сучасному етапі розвитку гуманної та ветеринарної медицини антибактеріальні засоби (антибіотики) є найбільш ефективними препаратами для лікування захворювань, що викликаються мікроорганізмами [30]. Антибіотики – це речовини природного чи синтетичного походження, які мають бактеріостатичну або бактерицидну дію щодо певних груп мікроорганізмів (бактерії, гриби, водорості, протозоа, віруси) або злоякісних пухлин, вибірково затримують їх ріст або повністю пригнічують розвиток [31, 32].

У біотехнологічній промисловості важливою проблемою є синтез антимікробних засобів, які здатні боротися з інфекціями, що викликаються внутрішньоклітинними збудниками. Одна з основних причин полягає в тому, що багато антибіотиків недостатньо проникають через клітинні мембрани і мають низьку активність всередині клітин, а, значить, їх дія на внутрішньоклітинні бактерії виявляється недостатньо вираженою. Крім цього, недостатня селективність дії антибактеріальних препаратів призводить до виражених побічних ефектів, що істотно лімітує їх застосування [33].

Неправильне та нераціональне використання антибіотиків призвели до того, що все більше патогенних бактерій стали резистентними до їх дії. У межах мікробної популяції ставало все більше антибіотикорезистентних штамів. Антимікробна стійкість бактеріальних збудників є проблемою, оскільки може спричиняти високу захворюваність та смертність [34-38].

Препарати, які ще декілька років тому були ефективними, сьогодні втрачають свої позиції, а їх використання вимушено обмежується. Згідно

даних Всесвітньої Організації Охорони здоров'я, швидке підвищення стійкості мікроорганізмів до антибіотиків за останні 50 років є однією з найважливіших загроз здоров'ю 21-го століття [39-42].

Антимікробна резистентність патогенів спричиняє захворюваність та смертність у всьому світі й загрожує сучасній медицині боротися з хворобами [43, 44]. Для зменшення антимікробної резистентності сьогодні рекомендується різні нові напрями синтезу та комбінації застосування антибіотиків хворим. Зокрема, розробляються підходи комбінованої терапії для зниження резистентності до антибіотиків або сенсibilізації бактерій до дії антибіотиків [45].

Еволюція бактерій, направлена на стійкість до антимікробних агентів, є неминучою, оскільки це особливий аспект природи, який не можна зупинити. Тому єдиним засобом вирішення цієї ситуації є затримати появу та подальше поширення стійких бактерій або резистентних генів [46].

Отже, пошук нових антибіотиків має бути спрямовано на розроблення препаратів, що мають змінену молекулярну структуру та цілеспрямовано діють на відповідні бактеріальні клітини, з'єднані з новою речовиною для транспортування в уражені ділянки, нечутливі до дії захисних ензимів клітин мікроорганізмів [4, 23, 47, 48].

1.2. Антибактеріальні властивості фторхінолонів. Енрофлоксацин

Фторхінолони – це єдиний клас синтетичних антимікробних лікарських засобів, який не має аналогів у природному середовищі. Це забезпечує їх високу ефективність щодо полірезистентних штамів мікроорганізмів [49-51]. Вони мають високий ступінь бактерицидної активності, широкий спектр антимікробної дії, який включає грамнегативні та грампозитивні бактерії, мікобактерії, хламідії, мікоплазми та добру переносимість препаратів, невисоку частоту побічних ефектів [49].

Фторхінолони є одним із найефективніших класів антибіотиків, як у гуманній, так і ветеринарній медицині. Завдяки їх широкому спектру дії проти різних бактерій та фізико-хімічним властивостям, їх використання у останні роки зростає [52].

Фторхінолони – це похідні 4-хінолону, які містять у положенні 7 хінолінового ядра не заміщений або заміщений піперазиновий цикл, а у положенні 6 – атом фтору [53-60]. Механізм дії фторхінолонів на мікробну клітину відрізняється від дії інших антимікробних засобів і направлений на пригнічення ДНК-гірази (топоізомерази) бактерій – ензима, який забезпечує суперспіралізацію ДНК. Це призводить до порушення біосинтезу ДНК та РНК, протеїну в мікробній клітині. Завдяки такому впливу, знижуються агресивні властивості бактерій, пригнічується індукція екзотоксинів, екзоензимів, підвищується чутливість мікроорганізмів до фагоцитозу [61, 62].

Важливим фактором є те, що фторхінолони є найменшими індукторами поширення резистентності, а частота виникнення мутацій мало залежить від частоти їх використання. Це пов'язане як зі швидким бактерицидним ефектом препаратів, що забезпечується порушенням роботи генетичного апарату бактеріальної клітини, так і малою вірогідністю виникнення подвійних мутацій, що могли б забезпечити клінічно значущий рівень резистентності [63-66]. Встановлено, що рівень резистентності кишкової палички, виділеної із молока корів, хворих на мастит, до фторхінолонів є дуже низьким, а мутації в генах мікроорганізмів не відбуваються, тому ці антибіотики ефективні [67].

Антибіотики фторхінолонового ряду швидко всмоктуються у шлунково-кишковому тракті, їх максимальна концентрація у сироватці крові спостерігається через 1-2 години після введення в організм, вони добре проникають у рідини і тканини організму, що пов'язано із невисоким ступенем іонізації їх молекул. Виводяться нирками, позанирковими

механізмами (біотрансформація в печінці, екскреція із жовчю, виведення із фекаліями тощо) [53, 61, 68, 69].

Хоча фторхінолони вже багато років залишаються одними з найперспективніших за своїми лікувальними можливостями лікарськими засобами, що становить реальний інтерес для клінічної практики, однак, при їх застосуванні можуть бути побічні реакції. Зокрема, з боку шлунково-кишкового тракту (нудота, зміни смаку, діарея, біль в епігастрії, тощо), центральної нервової системи (головний біль, запаморочення, дратівливість, порушення сну, розвиток судом), печінки (підвищення рівня печінкових трансаміназ і лужної фосфатази, розвиток гепатиту, некрозу паренхіми, печінкова недостатність, холестатична жовтяниця), а також можливі побічні ефекти у інших органах і системах організму [63, 68, 69].

Слід зазначити, що деякі сполуки фторхінолонів володіють більш специфічною антимікробною активністю, ніж субстанція [70].

Одним із представників фторхінолонів є антибіотик енрофлоксацин ((C₁₉H₂₂FN₃O₃ – 1-циклопропіл-7-(4-етилпиперазин-1-іл)-6-фторо-4-оксо-1,4-дигідрохінолін-3-карбонова кислота, EnrH) (Синоніми: Енрофлон, Каріфлор, Байтрил, Енроксил, Енрофлор, Енробіофлор). Це антимікробний засіб третього покоління, що є похідним 4-хінолону і містять у своєму складі піперазиновий цикл та атом фтору, наявність якого істотно розширює спектр його антибактеріальної дії [71]. Антибіотик енрофлоксацин відноситься до класу найуспішнішої групи синтетичних антибіотиків – фторхінолонів. Він характеризується широким спектром активності проти цілого ряду грамнегативних і грампозитивних бактерій [67, 72]. Енрофлоксацин сьогодні успішно використовується у ветеринарній медицині для лікування багатьох бактеріальних захворювань [73-75].

Енрофлоксацин першим з фторхінолонів почали застосовувати у ветеринарній медицині для лікування хворих з патологією сечової та дихальної систем організму, шкірних інфекцій домашніх і продуктивних

тварин. Зокрема, антибіотик енрофлоксацин є ефективним за лікування інфекційних захворювань свиней [73, 76, 77], коней [78, 79], а також маститу у корів [80, 81]. У м'ясному птахівництві він широко застосовується для лікування респіраторних і кишкових інфекцій [77, 82, 83]

Незважаючи на те, що енрофлоксацин відноситься до фторхінолонів третього покоління, а його використання ефективне у багатьох видах антибіотикотерапії та має малу кількість побічних ефектів, останнім часом існує занепокоєння з приводу появи стійких до енрофлоксацину штамів бактерій, а тому може розвиватися негативний ефект від надмірного використання цих антибіотиків [72]. Крім цього, енрофлоксацин мало розчинний у воді [52]. Тому це створює труднощі при отриманні оптимізованих доз розчиненої форми і обмежує біодоступність субстанції. Він гігроскопичний і має гіркий смак, який створює додаткову складність за орального вживання. Крім цього, встановлено, що енрофлоксанин може спричиняти цитотоксичний вплив на організм [84].

Тому актуальним є пошук нових сполук антибіотика енрофлоксацину з поліпшеними характеристиками.

1.3. Використання поліетиленгліколю (ПЕГ) при створенні лікарських засобів.

Полімерні наноносії – одні з найперспективніших, оскільки вони володіють цілою низкою специфічних фізико-хімічних і біологічних властивостей, які забезпечують їхню біосумісність, біодеградабельність, можливість додаткової функціоналізації спеціальними біоелементами, необхідними для доставки фармацевтичних препаратів в організмі [85-91]. Встановлено, що лікарські форми, у яких активна діюча речовина кон'югована з полімерним носієм, мають нижчу токсичність, покращені фармакокінетичні параметри і вищу ефективність терапевтичної дії [86, 92].

Найбільш перспективними носіями серед полімерів є поліетиленгліколь (ПЕГ), він служить ефективним стеричним стабілізатором для різних дисперсій, викликаючи фізико-хімічну трансформацію нативної молекули.

ПЕГ – полімер окису етилену з двома термінальними гідроксильними групами. Молекулярна маса ПЕГ може коливатися в межах 300-4000 Да, а вибудовані в ланцюзі макромолекули формують як розгалужені, так і лінійні стереохімічні структури. Саме молекулярна маса ПЕГ і його стереохімічна структура, як правило, визначають принципові властивості майбутнього лікарського препарату [93]. Поліетиленгліколь, як носій ліків, було вперше запропоновано до використання у 1990 році. Характерною особливістю ПЕГ є його добра розчинність у воді. Це пов'язано з тим, що структура водневих зв'язків у воді не змінюється від введення ПЕГ, внаслідок геометричної схожості [94]. Водночас, він полегшує подолання клітинної ліпідної мембрани [95-97].

Процес з'єднання нативної молекули лікарського препарату з ПЕГ називається пегелюванням [85-87, 98]. Пегелювання – це успішна технологія, яка допоможе вирішити багато завдань у фармакологічній промисловості. Зокрема, ця методика застосовується вже більше 25 років. У наш час ПЕГ дозволений у США організацією FDA (Food and drug administration of USA) як субстанція для виробництва ліків. Препарати, які містять ПЕГ, є нанорозмірними кон'югатами [99]. Понад 10 пегельованих терапевтичних препаратів використовують в клініці з початку 1990-х, а терміни дії патенту на ліки продовжують розширюватися [87, 88, 100-102]. У останні роки значно розширена технологія пегелювання [103-105].

ПЕГ використовується для підвищення стабільності різних переносників і перешкодження захоплення навантажених препаратом наночастинок органами системи мононуклеарних фагоцитів [106]. Пегелювання препаратів сприяє захисту від агрегації, опсонізації та

фагоцитозу, подовжуючи час циркуляції в організмі [107]. ПЕГ є біодеградабельним та біосумісним, оскільки не утворює токсичних метаболітів, а також він є комерційно доступним [18, 19].

У водних розчинах амфіфільні ПЕГ-вмісні полімери утворюють міцелоподібні структури, важливою властивістю яких є їхня здатність солюбілізувати важко розчинні речовини, зокрема ліки, підвищуючи тим самим їхню біосумісність [87, 108, 109].

Окрім цього, перебуваючи у кон'югованій міцелярній формі, молекули лікарських субстанцій захищені від можливих взаємодій із навколишнім біологічним мікросередовищем, що дозволяє їм довше перебувати в організмі, не втрачати стабільності, накопичуватись у тканині чи організмі, неспричиняючи негативні побічні ефекти [110].

Одним зі шляхів підвищення ефективності лікарських препаратів є хімічна модифікація їх молекул, що досягається приєднанням вихідної молекули до поліетиленгліколю. При цьому відбуваються значні зміни в третинній та четвертинній структурах молекул [85]. Подібна хімічна модифікація фармакологічних препаратів спрямована на покращення їх переносимості, зниження імуногенності, підвищення періоду напіввиведення препаратів [93, 111].

Молекули, модифіковані ПЕГ, стають гідрофільними і формують принципово нові фізико-хімічні властивості зміненого препарату. Велика концентрація атомів водню навіть в одній молекулі ПЕГ дає їй змогу зв'язуватися з 2–3 молекулами води. Подібна гідратація призводить до формування “водяної хмари” навколо модифікованої молекули ПЕГ+протеїн, за рахунок цього значно підвищується її гідродинамічний радіус [112, 113]. Ця гідратаційна оболонка, з одного боку, значно підвищує розчинність і біодоступність препарату, а з іншого боку – захищає молекулу від інших протеїнів (нейтралізуючі антитіла, комплемент) [114]. ПЕГ забезпечує «невидимість» для системи мононуклеарних фагоцитів і опсонізуючих

протеїнів [115-120]. Отже, поліетиленгліколь є гідрофільним полімером, який сприяє стійкості до зв'язування протеїнів плазми і перешкоджає агрегації, спричиненій солями та протеїнами сироватки крові, запобігаючи опсонізації та впізнаванню фагоцитами, уникаючи імунних реакцій.

Час циркуляції в умовах *in vivo* для наночастинок, укритих ПЕГ, збільшується від декількох хвилин до годин. З другого боку, ефективність поліетиленгліколю залежить від поверхневої густини, довжини ланцюга [121]. ПЕГ є розчинним як в органічних, так і в неорганічних субстратах. Висока поверхнева гідрофільність ПЕГ дозволяє йому кон'югувати з іншими полімерами, підвищуючи їхню розчинність [122].

Отримані біоактивні молекули (протеїнів, пептидів, ензимів, фрагментів антитіл, олігонуклеотидів, малих синтетичних препаратів тощо) мають добрі фізико-хімічні властивості *in vivo*. Після ковалентного приєднання ПЕГ молекули мають тривалий період напіввиведення, покращену розчинність, сприяють стабільності ліків та знижують імуногенність до них [123].

Завдяки пегелюванню забезпечується підвищення терапевтичного ефекту ліків, що пояснюється кращою розчинністю нерозчинних у воді сполук, зниженню токсичності, створенню бажаної фармакокінетики для посилення накопичення препарату в цільовій ділянці [124]. Завдяки пегелюванню підвищується ефективність доставки лікарських препаратів за рахунок збільшення їх концентрації в місці ураження з одночасною мінімізацією токсичної дії на організм [125-127].

Пегелювання збільшує розмір і молекулярну масу кон'югованих біомолекул, підвищує їх фармакокінетику, фармакодинаміку, розчинність у воді, захист від ферментативної деградації, зниження кліренсу у нирках і обмеження імуногенних та антигенних реакцій [128, 129]. Оскільки нирки фільтрують речовини на основі розміру, тому пегельовані молекули, які мають більшу молекулярну масу та більший гідродинамічний радіус, ніж

материнська молекула, виводяться з організму набагато повільніше. Ця знижена швидкість збільшує період напіввиведення пегельованих молекули *in vivo*.

Багато протеїнів та пептидів нативного типу також швидко руйнуються циркулюючими ензимами шляхом протеолізу. Гідратований ланцюг ПЕГ захищає кон'юговану сполуку від доступу до протеаз та пептидаз, зменшуючи неспецифічну деградацію препарату [128, 130]. Гідрофільна оболонка ПЕГ може значно підвищити час циркуляції полімерних міцел в крові [107, 131]. Пегельовані наноносії привертають все більшу увагу через зниження токсичності та подовження циркуляції в організмі порівняно з вільними препаратами [132]. Однак, окремі дослідження вказують на те, що пегельовані наноліки можуть мати несприятливий імунний вплив та викликати утворення антитіл [133].

Пегелювання лікарських препаратів пептидної природи посилюють біологічну активність, подовжують період “ефективного” напівжиття, гальмують вивільнення, знижують токсичність та імуногенність. Сучасні технології пегілювання біологічно активних пептидних молекул дозволили сформувати ряд фармакодинамічних та фармакокінетичних ефектів, поява яких для конкретного пептиду була недосяжною метою для дослідників. Така модифікація протеїнів знижує алергенність, підвищує період напівжиття, цим самим значно підвищує ефективність за лікування хворих [113, 134].

Пегельовані препарати пептидної структури застосовують в противірусній терапії. Так, модифікований -2b-інтерферон гальмує реплікацію вірусних ДНК та РНК, що обумовило його широке використання для лікування хронічних гепатитів В та С [113]. Завдяки гідрофільності модифікованих ПЕГ молекул, формуються принципово нові фізико-хімічні властивості зміненого пептиду. Велика концентрація атомів Гідрогену навіть в одній молекулі ПЕГ дозволяє їй зв'язуватися з 2–3 молекулами води, роблячи пегельовані молекули приблизно в п'ять-десять разів більшими, ніж

розчинний протеїн аналогічної молекулярної маси [113]. Розгалужена структура молекули ПЕГ формує уповільнення активного метаболізму препарату, що призводить до збільшення часу активної його циркуляції у крові [98, 135, 136].

Однією з ключових проблем доставки ліків є внутрішньоклітинний транспорт лікарських засобів. Цей процес утруднений кількома факторами: неспецифічність носіїв або їх нездатність проникнути крізь клітинну мембрану, лізосомальний гідроліз лікарських засобів (пептидів, нуклеїнових кислот), що проникли ендцитотичним шляхом. Вирішенням цієї проблеми є застосування так званих пептидів, що проникають у клітину, вперше виявлених у вірусі імунодефіциту людини. Ці пептиди здатні переносити приєднані до них молекули гідрофільних лікарських засобів через клітинну мембрану шляхом пептидної трансдукції. Для уникнення лізосомального руйнування проникаючих у клітину пептидів можливе їх ковалентне сполучення із молекулами ПЕГ, які екранують їх від зв'язування із клітинною мембраною через залишок гідразону. Гідразон при значеннях рН 5,0–6,0 руйнується, звільнюючи тим самим молекулу CPP (cell penetrating peptides) від «екрана» ПЕГ і даючи можливість взаємодіяти з клітинною мембраною. Завдяки цьому стає можливим контрольований внутрішньоклітинний транспорт лікарських засобів [137, 138].

Пегелювання ліків покращує дію препаратів за застосування хворим хіміотерапії [139]. Під час терапії раку деякі пегельовані протеїни, зокрема ензими, можуть успішно використовуватись внаслідок їх здатності зменшувати побічні ефекти хіміотерапії [140]. Завдяки полімерам поліпшується накопичення ліків у пухлині, підвищується терапевтична ефективність, зменшується токсичність. За рахунок цього збільшується час утримування терапевтичних засобів [121, 122, 141–143]. Вміст у лікарському комплексі ПЕГ перешкоджає передчасному видаленню його фагоцитуючими клітинами, зокрема макрофагами [102, 144, 145].

Отже, завдяки ПЕГ вдається досягти більш високої ефективності ліків і зменшити кількість побічних ефектів [146-149].

Найбільш вивченими колоїдними носіями лікарських речовин є ліпосоми, що представляють собою ліпідні везикули (пухирці) з мембраною, що складається з амфіфільних ліпідних молекул. Унікальна структура ліпосом – ліпідна мембрана, що оточує водну порожнину дозволяє включати як гідрофобні, так і гідрофільні антибіотики без модифікації їх хімічної структури [145]. Модифікація поверхні ліпосом поліетиленгліколем дозволяє отримати ліпосоми другого покоління – так звані «стелсліпосоми». Фрагменти молекул ПЕГ утворюють на поверхні ліпосом об'ємний гідрофільний шар, який дозволяє уповільнити розпізнавання ліпосом макрофагами системи мононуклеарних фагоцитів шляхом просторового інгібування гідрофобних і електростатичних взаємодій ліпосом з протеїнами плазми, які опосередковують захоплення колоїдних частинок макрофагами. Це дозволяє продовжити час циркуляції ліпосом в кровотоці. «Стелсліпосоми» застосовують в тих випадках, коли збудник інфекції циркулює в крові або за необхідності доставити ліки в орган за межами системи мононуклеарних фагоцитів [150].

Сьогодні пегельовані ліпосомальні препарати успішно використовуються у якості наноносіїв ліків [132]. Зокрема, високу терапевтичну ефективність встановлено за застосування антибіотика нафциліну, у якості носія якого було використано пегельовані ліпосоми [151].

Попередня обробка епітелію товстої кишки ПЕГ, під час зараження та лікування знижує прикріплення *Citrobacter rodentium* до епітелію товстої кишки, покращує клінічні ознаки захворювання [152].

У роботі Н.В. Мітіної [153] встановлено, що наявність об'ємного бічного ПЕГ ланцюга в структурі гребенеподібного поліпероксиду зумовлює зростання констант швидкості їх термічного розкладу, а також зміну

кінетичних параметрів полімеризації при досягненні певних концентрацій макроініціатора, спричинену перебігом елементарних стадій у просторово обмежених зонах, утворюваних його молекулами. Виявлено, що зв'язування протипухлинних препаратів з ПЕГ-вмісними гребенеподібними носіями суттєво зменшує прояви в експериментальних лабораторних тварин кардіо-, гепато- і нефротоксичності, що мають місце за дії цих препаратів у вільній формі. Таке комплексування протипухлинних препаратів зі створеними нанорозмірними носіями також надає їм здатності долати резистентність пухлинних клітин до ліків *in vitro* і дозволяє знизити у десятки разів їх ефективну терапевтичну дозу *in vitro* та *in vivo* [153]. На основі синтезованих кополімерів шляхом взаємодії епоксидовмісних бічних фрагментів олігомерів різного складу та мікроструктури з ПЕГ було отримано нові водорозчинні поверхневоактивні олігоперокси. Вони характеризуються важливими для носіїв властивостями: кращою проникністю через клітинну мембрану та низькою токсичністю.

Дослідження показників гострої токсичності ПЕГ-вмісного полімерного носія у білих лабораторних мишей і щурів показали, що наноносій A24PEG, за умов його очерединного введення, не має токсичного впливу. На цій підставі вказаний полімерний наноносій можна віднести до 4-го класу токсичності (малотоксичні речовини) [102].

1.4. Пегелювання антибактеріальних засобів

За допомогою синтетичних полімерів сьогодні можна вирішити багато проблем, які пов'язані зі створенням нових антибактеріальних препаратів [154]. Фармацевтичні нанотехнології відкривають нові цікаві можливості для хіміотерапії різних інфекційних захворювань. Здатність наночастинок доставляти антибіотики в клітини-мішені (макрофаги), а також в осередки інфекції дозволяє підвищити їх активність/ефективність і

селективність дії. Гнучкість технології забезпечується різноманітністю матеріалів, що застосовуються для формування нанорозмірних носіїв, включаючи природні та синтетичні полімери, ліпіди та інші речовини [155].

Полімерні кон'югати антибіотиків забезпечують більш низьку токсичність, підвищену розчинність і пролонговану активність препаратів, які мають широке застосування в багатьох галузях, зокрема при зберіганні харчових продуктів або медичних виробів [156].

Антибіотики можуть або включатися в наночастинки в процесі полімеризації, або ковалентно зв'язуватися з поверхнею наночастинок вже після утворення останніх. Численні експерименти показали, що включення різних антибіотиків в полімерні наночастинки призводить до підвищення їхньої специфічної активності. Наночастинки є ефективним засобом оптимізації як фармакокінетики, так і фармакодинаміки антибактеріальних препаратів [157, 158].

Антимікробні пептиди (АМП) мають терапевтичний потенціал, особливо при локалізованих інфекціях, наприклад легневих. Введення пегельованих АМП в дихальні шляхи мінімізує токсичність легеневої тканини, зберігаючи при цьому антимікробну активність. Пегелювання може бути засобом покращення легеневої біосумісності АМП, призначених для лікування легневих інфекцій [159]. Водночас, пероральне введення антибіотиків з ПЕГ покращує їх дію проти патогенних мікроорганізмів [160].

Застосування пегельованих антибактеріальних препаратів на основі наногелю показало низьку цитотоксичність та високу бактерицидну активність щодо грамнегативних *E. coli* та *P. aeruginosa* і грампозитивних *S. mutans* та *S. aureus* бактерій [161].

Пегелювання покращує ефективність антибіотиків, які застосовуються для лікування інфікованих ран, перешкоджаючи антибіотикорезистентності проти найбільш поширеної патогенної мікрофлори [162]. Полімерні кон'югати з антибіотиками проявляють високу активність проти

бактериальних біоплівках [163]. Біоплівки, часто непроникні для антибіотиків, є основною причиною поганого загоєння ран. Прогноз для ран з біоплівками стійких до протимікробних препаратів бактерій був нижчим до метицилін-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), метицилін-резистентного *S. epidermidis* (MRSE) і мультирезистентного *Pseudomonas aeruginosa* (MDR-PA). Резистентність перешкоджає початковому лікуванню стандартними антибіотиками. Зберігання MRSA, MRSE та/або MDR-PA часто призводить до того, що гострі інфекції переростають у хронічні ранові інфекції. Водорозчинні гідрофільні властивості низькомолекулярного (600 Да) розгалуженого поліетиленіміну (600 Да BPEI) дозволяють легко доставити ліки і використовувати в середовищі, як місцевий засіб для лікування ран. Для пом'якшення проблеми з токсичністю, було модифіковано 600 Да BPEI поліетиленгліколем. Молекули PEG–BPEI знижують резистентність до β -лактамів у MRSA, MRSE та MDR-PA, а також мають здатність розчиняти встановлені біоплівки [164]. Пегельований ауреїн виявляють потужну антибіктеріальну дію проти грампозитивних бактерій [165]. Пегелювання здатне покращувати ефективність антибіотиків проти стійких до них ізолятів, виділених від хворих *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* і *Staphylococcus epidermidis* [166], а також *B. subtilis* та *E.coli* [167].

Отримані нанорозмірні водні системи кон'югатів ПЕГ-вмісних олігомерних носіїв з антибіотиком левоміцетином показали його високу ефективність [168]. Результати досліджень свідчать, що левоміцетин, іммобілізований на ПЕГ-носії, проявляв високу антимікробну дію щодо мікроорганізмів, які були резистентні до дії вільного левоміцетину. Синтезований на основі олігопероксиду з бічними епоксидними групами ПЕГ-вмісний олігомер є водорозчинним, поверхнево-активною речовиною, здатною іммобілізувати не розчинний у воді антибіотик левоміцетин та утворювати нанорозмірні водні системи його цільової доставки, які забезпечують підвищену антимікробну активність препарату [168].

Досліджуючи механізм дії тахіплезину I, показано, що його цитотоксичність значно знижується внаслідок пегелювання, хоча антимікробна активність була ослабленою [169].

При дослідженні антибактеріальної активності та цитотоксичності пегельованих антибіотиків групи аміноглікозидів (гентаміцин, канаміцин та неоміцин), встановлено, що їх активність може знижуватися при зростанні в даних сполуках вмісту поліетиленгліколю. Так, співвідношення аміноглікозиду до ПЕГ 1 до 1 мало значно вищу активність, порівняно зі сполуками, у яких співвідношення було 1 до 2. Виявилося, що це зниження антибактеріальної активності є найбільш помітним у грампозитивних бактерій, *S. aureus*. З іншого боку, пегелювання значно знижувало цитотоксичність [170].

Було використано наночастинки, виготовлені з двох різних полімерів, а саме, полі(d,l-молочної-ко-гліколевої кислоти (PLGA) та метоксиполі (етиленгліколю)-b-полі (молочної-ко-гліколевої кислоти) (mPEG-PLGA), для підвищення ефективності доставки антибіотика офлоксацину [171]. Дані результати вказують на те, що наночастинки офлоксацин-mPEG-PLGA показали вищу антибактеріальну активність, ефективне бактеріальне поглинання, уповільнене вивільнення з організму порівняно з вільним офлоксацином. Пегелювання підвищило проникність бактеріальної мембрани, дозволяючи накопичувати наночастинки mPEG-PLGA всередині клітин більшою мірою, ніж наночастинки чистого PLGA. Наноформування також сповільнювало розвиток стійкості бактерій, порівняно з вільним препаратом. Виявлено, що сполука PEG-PLGA покращувала антибактеріальну активність, порівняно з вільним офлоксацином. Водночас, патогенні штами (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* та *S. aureus*) були також більш чутливі до пегельованого офлоксацину, порівняно з його «чистою» формою [171].

Антибіотик ципрофлоксацин був ковалентно приєднаний до кінця ланцюга полі(2-метилоксазоліну) (PMOx), полі(2-етилоксазоліну) (PEtOx) і поліетиленгліколю (PEG) і протестована протимікробна активність цих кон'югатів до *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Kleisella pneumoniae* [172]. Встановлено, що антимікробна активність кон'югатів збільшується у ряді PMOx < PEtOx < PEG.

Покращення терапевтичного потенціалу антибіотика ципрофлоксацину досягнуто шляхом інкапсуляції в покриті поліетиленгліколем з довгоциркулюючими ліпосомами з пролонгованим вивільненням [173]. Показано, що застосування ципрофлоксацину в ліпосомальній формі з ПЕГ призводило до уповільненого кліренсу ципрофлоксацину та підвищення тривалої концентрації його в крові та тканинах. Було доведено терапевтичну ефективність пегельованого ліпосомального ципрофлоксацину проти *Pseudomonas aeruginosa pneumonia*.

Показано добрий антибактеріальний ефект тобраміцину проти грамнегативних бактерій, зокрема кишкової палички (*E. coli*), якщо використання антибіотика було у комплексі з ПЕГ [174]. Пегелювання антибіотика тобраміцину вело до також покращення антимікробної активності проти *Pseudomonas aeruginosa*. Він мав кращу активність *in vitro*, порівняно з активністю «чистим» тобраміцином [175].

Створення модельної сполуки енрофлоксацину з ПЕГ-400, які ковалентно з'єднані між собою, показали високу антибактеріальну активність. На думку дослідників це може бути зумовлено тим, що ПЕГ здатний впливати на проникність мембран, збільшуючи поглинання антибактеріального препарату клітинами [100, 176, 177].

1.5. Функціональний стан організму за введення антибактеріальних препаратів

Важливим етапом доклінічних досліджень лікарських засобів є визначення їх впливу на організм лабораторних тварин [20, 178]. Лікарські засоби та їх токсичні метаболіти можуть спричиняти ураження печінки, яка є важливим органом обміну речовин [179]. Клінічні прояви медикаментозного ураження печінки зустрічаються рідко. Вони часто перебігають безсимптомно. Однак, повідомляється, що медикаментозне ураження печінки здатні викликати понад 200 потенційно небезпечних гепатотоксичних лікарських засобів [180].

Одним із проявів побічної дії ліків на організм є структурно-функціональні порушення роботи нирок, які представляють собою основну систему контролю, що підтримує гомеостаз організму [181, 182, 183]. Вони беруть участь у катаболізмі ліків, зокрема виводять продукти розпаду, які утворюються після введення лікарських препаратів в організм [182, 183]. У межах 20–30 % зареєстрованих випадків гострої ниркової недостатності та близько третини хворих з хронічною нирковою недостатністю є наслідком дії хімічних чинників, зокрема 18–27 % випадків є наслідком фармакотерапії [182].

Забезпечення профілактики та корекції побічних реакцій при застосуванні ліків – одне із завдань сучасної медицини [181]. Для вирішення цієї проблеми сьогодні ведеться розробка лікарських форм із застосуванням нанотехнологій [184, 185]. Зокрема, ефективним засобом для подолання токсичності антибіотиків є їх доставка за допомогою спеціальних нанорозмірних носіїв [185, 186].

Серед лікарських засобів, антибактеріальні препарати мають найбільш виражені побічні реакції, що обмежує їх використання [21, 186]. Одними з проявів побічної дії антибіотиків є їх гепатотоксичність [22, 27, 186, 187].

Гепатотоксичність є одним із небезпечних побічних ефектів медикаментозної терапії і становить 10 % від усіх побічних реакцій, пов'язаних із застосуванням ліків [188-190].

Суттєве значення у розвитку гепатотоксичності відіграють білки печінки, які забезпечують транспортування лікарських препаратів, органічні аніон-транспортуючі поліпептиди, протеїни, асоційовані з мультивалентною медикаментозною стійкістю, а також помпа, яка експортує жовчні солі [191].

Про рівень токсичного впливу лікарських препаратів на печінку найбільш вірогідно можна судити за показниками крові, які характеризують функціональний стан і структуру її клітин [192]. Маркерами цитолізу гепатоцитів є підвищення активності індикаторних для печінки ензимів [193].

В експериментальних дослідженнях суперпарамагнітних наночастинок оксиду феруму, покритих поліетиленгліколем-8000, показали зниження їх гепатотоксичності. Такі наноутворення показали ефективність при доставці ліків, що використовуються у терапії раку [194]. Введенні щурам наночастинок оксиду феруму, вкритих поліетиленгліколем, призводить до значного покращення біохімічних параметрів крові, які характеризують функції печінки, а також структуру органу, порівняно з препаратом без пегелювання [195]. Подібні результати було встановлено і за пегелювання препаратів наночастинок аєвруму [196].

Використання пегельованого інтерферону дає позитивний ефект за лікування фіброзу печінки та інших захворювань гепатобіліарної системи [197]. Введення пегельованого інтерферону веде до підвищення вмісту печінкових ензимів у пацієнтів за лікування хворих на гепатит С [198-201]. Вказується, що ПЕГ-400 визиває підвищення рівня печінкових ензимів (АлАТ, АсАТ) [202].

Медикаментозні ураження нирок після застосування антибіотиків займають одне з провідних місць у структурі захворюваності та смертності людей [203]. Нефротоксична дія антибактеріальних препаратів на функцію

органів видільної системи є досить серйозною проблемою, оскільки патологія проявляється різноманітною симптоматикою та часто відсутністю ефективних засобів лікування. Розуміння механізмів негативного впливу антибіотиків дає корисну інформацію при розробці ліків з терапевтичної користю зі зменшеними побічними ефектами [181], зокрема основним завданням є створення таких антибактеріальних препаратів, які б мали низьку нефротоксичну дію [204-206].

Лише розумне використання антибіотиків, що включає оптимальний вибір препарату, дози і тривалості лікування, відмова від надмірного і неналежного використання з профілактичною метою, дозволить значно зменшити розвиток небажаних ефектів антибіотикотерапії. Отже, розвиток нових технологій при створенні протимікробних препаратів повинен бути направленим на забезпечення високої терапевтичної ефективності та безпечності для організму [33].

Висновки до розділу 1

Розвиток нових технологій при створенні антибактеріальних засобів повинен бути направленим на забезпечення високої терапевтичної ефективності та безпечності для організму. Пошук нових антибіотиків має бути спрямовано на розроблення препаратів, з'єднаних з носієм для транспортування в уражені ділянки, що дало б змогу забезпечувати цілеспрямовану дію на відповідні бактеріальні клітини.

Антибіотик енрофлоксацин відноситься до класу найуспішнішої групи синтетичних антибіотиків – фторхінолонів. Він характеризується широким спектром активності проти цілого ряду грамнегативних і грампозитивних бактерій. Незважаючи на те, використання енрофлоксацину ефективне у багатьох видах антибіотикотерапії та має малу кількість побічних впливів, останнім часом існує занепокоєння з приводу появи стійких до

енрофлорсацину штамів бактерій, а тому може розвиватися негативна дія від надмірного застосування цих антибіотиків. Крім цього, енрофлорсацин мало розчинний у воді, тому це створює труднощі при отриманні оптимізованих доз і обмежує біодоступність субстанції, а також він гігроскопичний і має гіркий смак, що ускладнює його оральне вживання. Отже, актуальним є пошук нових сполук енрофлорсацину з поліпшеними характеристиками.

Аналіз літературних даних вказує на те, що впровадження у виробництво антибіотиків, з'єднаних з наноносіями, має актуальне значення для підвищення ефективності лікування людей та тварин, оскільки забезпечується цільова доставка ліків в уражені тканини та клітини-мішені, а також підвищується їх біосумісність, мінімізується побічна дія, знижується негативний вплив на організм. Полімерні наноносії – одні з найперспективніших, оскільки вони володіють цілою низкою специфічних фізико-хімічних і біологічних властивостей, які забезпечують їхню біосумісність, біодеградабельність, можливість додаткової функціоналізації спеціальними біоелементами, необхідними для доставки фармацевтичних препаратів в організмі. Найбільш перспективними носіями серед полімерів є ПЕГ, зокрема пегелювання антибіотиків. Це обумовлено тим, що ПЕГ утворює стабільні комплекси з ліками, має пролонговану циркуляцію у крові, здатний до акумуляції у зоні патологічного процесу, ефективно переносить молекули діючої речовини у клітину й окремі органели, має мінімальний негативний вплив на організм. Він здатний зберігати хімічну структуру протягом певного періоду перебування в організмі, водночас легко біодеградується та є біосумісним, оскільки не утворює токсичних метаболітів. Таким чином, актуальним є вивчення антимікробної ефективності та біосумісності в організмі новоствореного комплексу ПЕГ з антибіотиком енрофлорсацином (пегельованого антибіотика енрофлорсацину).

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти та передумови досліджень

Дисертаційна робота виконана впродовж 2018–2022 років у лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН. Окремі фрагменти роботи було проведено в Багатопрофільній лабораторії ветеринарної медицини та на кафедрі нормальної і патологічної морфології та судової ветеринарії (гістологічні дослідження тканин органів) Одеського державного аграрного університету (ОДАУ) та у Державному науково-дослідному контрольному інституті ветеринарних препаратів та кормових добавок (мікробіологічні дослідження), м. Львів. Створення та синтез ПЕГ-400 та пегельованого антибіотика енрофлоксацину проведено в лабораторії кафедри органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка».

Методологічною основою вибору напрямку дисертаційної роботи були матеріали літератури, які стосувалися зниження ефективності антибактеріальних препаратів проти основних мікроорганізмів збудників захворювань людини та тварин, а також розвиток антибіотикорезистентності – глобальної проблеми для біології, фармації, гуманної та ветеринарної медицини. У зв'язку з цим, важливим завданням для науки є створення лікарських препаратів, з'єднаних з носіями, які б мали спрямовану дію до уражених органів та систем організму. Тому наші дослідження були направлені на вивчення комплексу новоствореного носія ПЕГ-400 з антибіотиком енрофлоксацином (пегельований антибіотик енрофлоксацин) проти найбільш поширених мікроорганізмів, встановлення впливу препарату на гематологічні та біохімічні показники крові тварин, стан резистентності та

антиоксидантної систем організму, рівень його гепатотоксичності та нефротоксичності.

2.2. Схема дослідження

Для з'ясування мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) проти мікроорганізмів новосинтезованого пегельованого антибіотика енрофлорсацину та порівняння його МІК з суспензією антибіотика енрофлорсацину у традиційній формі було проведено дослідження на музейних еталонних штаммах мікроорганізмів і на польових грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмах (рис. 2.1).

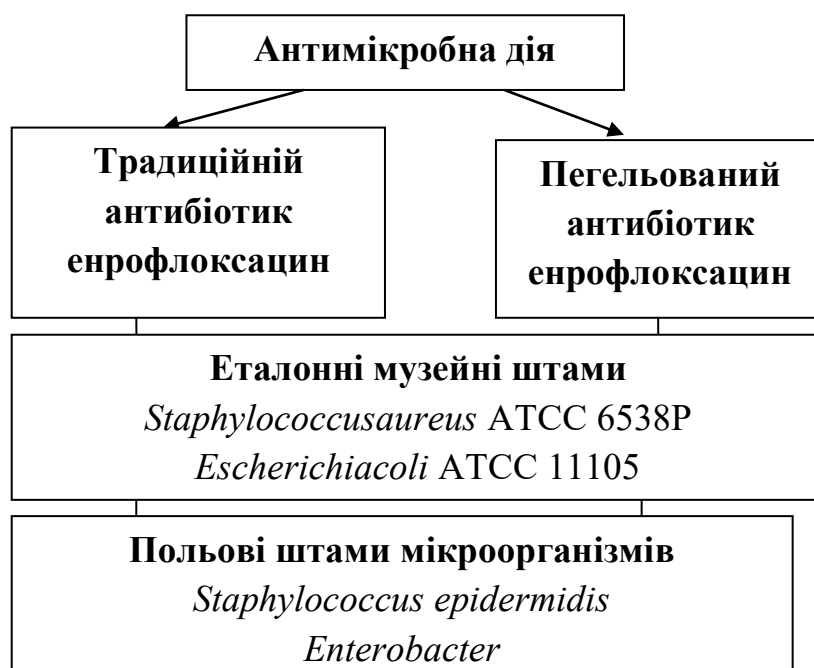


Рис. 2.1. Схема вивчення МІК

Наступним етапом роботи було вивчити вплив пегельованого антибіотика енрофлорсацину, а також ПЕГ-400 та традиційного антибіотика енрофлорсацину, які використовували для його створення, загальний клінічний стан організму тварин, основні функції та структуру печінки й

нирок для з'ясування біосумісності контрольної та дослідних груп. Для реалізації поставленої мети було проведено дослідження на чотирьох групах щурів (рис. 2.2). Тварин досліджували клінічно і проводили лабораторний аналіз крові та гістологічну структуру тканин органів (рис. 2.3).



Рис. 2.2. Схема дослідів на лабораторних щурах

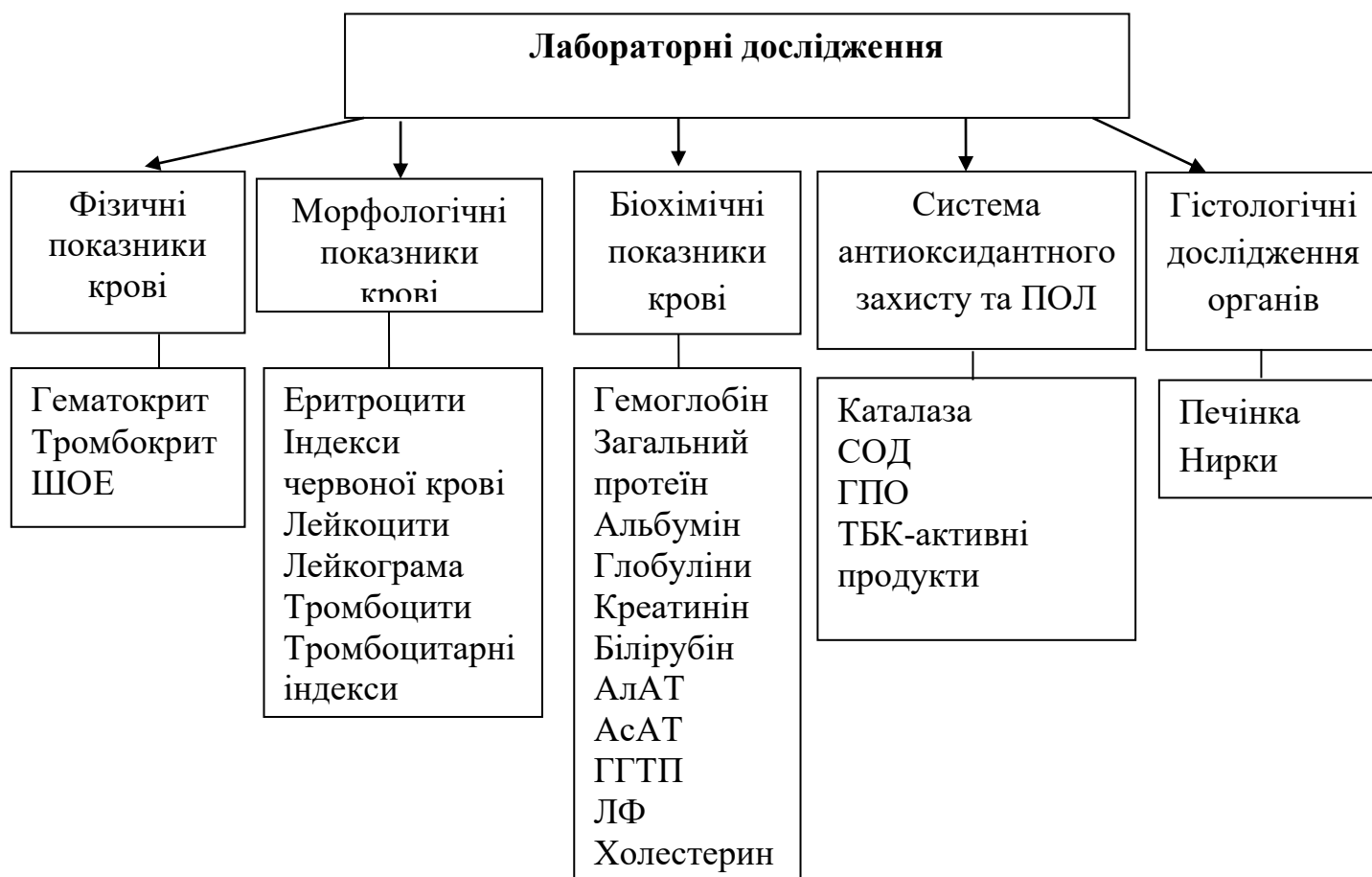


Рис. 2.3. Лабора́торні дослідження крові та тканин органів тварин

Експериментальна частина дисертаційної роботи на лабораторних тваринах (щури) виконана у віварії Одеського державного аграрного університету.

2.3. Матеріали та обладнання

Для наукових досліджень було відібрано полімер ПЕГ-400, який утворений з поліетиленгліколя [100], з молекулярною масою 400 Да (рис. 2.4).

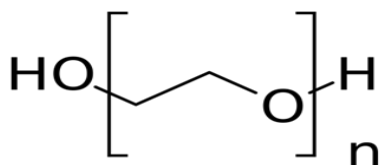


Рис. 2.4. Схема ПЕГ-400

Для утворення пегельованого антибіотика енрофлоксацину використовували антибіотик енрофлоксацин чистоти 99,5 % та ПЕГ-400 (Sigma Aldrich). З'єднання ПЕГ-400 з антибіотиком енрофлоксацином та утворення пегельованого антибіотика енрофлоксацину було проведено у лабораторії кафедри органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка» [207].

При синтезі пегельованого антибіотика енрофлоксацину брали до уваги те, що молекули антибіотика енрофлоксацину містить у своїй структурі реакційно здатні карбоксильні групи (рис. 2.5).

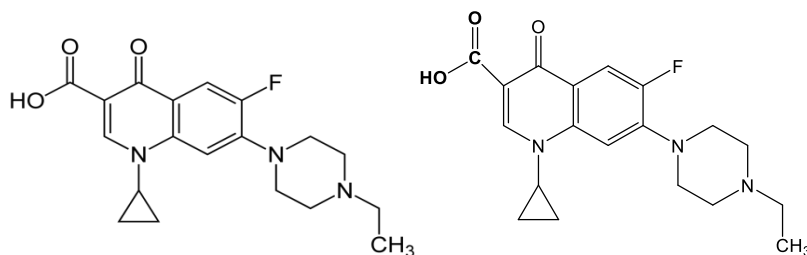


Рис. 2.5. 1-циклопропіл-6-фтор-7-(4-етил-1-піперазиніл)-1,4-дигідро-4-оксо-3-хінолін-карбонова кислота (енрофлоксацин).

Тому стало можливим до кінців поліоксиетиленового гідрофільного ланцюга ПЕГ-400 приєднати молекули антибіотика енрофлоксацину. Структурне з'єднання антибіотика енрофлоксацину з ПЕГ-400 показано на рисунку 2.6.

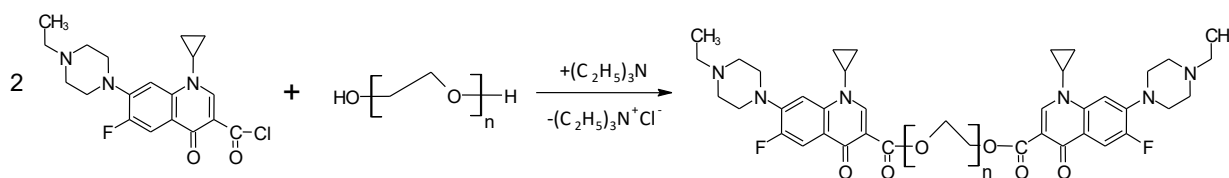


Рис. 2.6. З'єднання антибіотика енрофлоксацину з ПЕГ-400 (n=9).

Хроматографію синтезованих продуктів ПЕГ-400 та пегельованого антибіотика енрофлоксацину проводили на рідинному хроматографі Waters Alliance 2690.

Для вивчення дії пегельованого антибіотика енрофлоксацину та речовин, які були використані для його утворення – антибіотик енрофлоксацин і ПЕГ-400 на організм, було створено 4 групи щурів: контрольну і три дослідні. У кожній групі було по 12 тварин. Всім щурам, які були в експерименті, протягом чотирьох діб, щоденно однократно внутрішньом'язово вводили досліджувані препарати в м'язи стегна нижньої кінцівки. Контрольній групі тварин проводили внутрішньом'язову ін'єкцію фізіологічного розчину об'ємом 0,03 мл. Першій дослідній групі

внутрішньом'язово задавали 0,03 мл антибіотика енрофлорсацину у традиційній субстанції (традиційна форма антибіотика енрофлорсацину), другій — 0,03 мл ПЕГ-400, третій — 0,03 мл комплекс антибіотика енрофлорсацину з нанополімером ПЕГ-400 (пегельований антибіотик енрофлорсацин). Вміст антибіотика енрофлорсацину у пегельованій і традиційній формах у розчині складав 1,8 %. Доза введенного енрофлорсацину у традиційній та пегельованій формах становила 2,7 мг на 1 кг маси щура відповідала дозі для лікування тварин.

Дослідження проведені на клінічно здорових самцях щурів (лінія Wistar), віком три місяці, масою тіла 180–200 г, яких утримували в стандартних умовах віварію на загальноприйнятому раціоні.

Протягом експерименту проводили щоденний огляд тварин, звертаючи увагу на загальний стан та апетит.

Декапітацію тварин проводили зі застосуванням тіопенталового наркозу. При цьому, шляхом кардіотомії верхівки серця на сьому, чотирнадцяту, двадцять першу доби після закінчення введення препаратів у щурів контрольної та дослідних груп відбирали кров і тканини печінки та нирок для досліджень.

Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з тваринами здійснювали згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) і «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», ухваленими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти [208]. Усі дослідження відповідають вимогам норм біоетичної експертизи згідно з Наказом МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р. Проведені дослідження були затверджені на засіданні комісії з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН,

протокол № 86, від 10.09.2021 року та Одеського державного аграрного університету, протокол № 1, від 13.09.2021.

Для виконання дисертаційної роботи використано наступне обладнання: центрифуга Labofuge 200 (Thermo Scientific, Німеччина), ваги лабораторні 572-33 (Kern, Німеччина), автоматичний гематологічний аналізатор Abacus Junior vet (Diatron, Австрія), напівавтоматичний біохімічний аналізатор Evolution 3000 (Biochemical Systems International S.p.A., Італія), мікроскоп ECLIPSE 100 (Nikon, Японія), ротаційний мікромом НМ 340 Е (Microm, Німеччина), спектрофотометр СФ-46, камера для вертикального електрофорезу (Bio-Rad, США), мікроскоп Fusion FS-7630 (MICRO med, Китай).

2.4. Методи дослідження

2.4.1. Фізичні дослідження крові

На автоматичному гематологічному аналізаторі Abacus Junior vet (Diatron, Австрія) визначали показники гематокриту. Для дослідження ШОЕ використовували метод Панченкова. Для цього, кров розводили з цитратом натрію в співвідношенні 4:1, матеріал поміщали на 60 хвилин в градуйованому на 100 ділень капілярі Панченкова у вертикальний штатив. По закінченні часу визначали швидкість осідання еритроцитів за нанесеною на капіляр шкалою [209].

2.4.2. Морфологічні дослідження крові

Автоматичним гематологічним аналізатором Abacus Junior vet (Diatron, Австрія) досліджували кількість еритроцитів, індекси червоної крові,

загальну кількість лейкоцитів, кількість тромбоцитів та їх індекси (тромбокрит, середній об'єм тромбоцитів, ширина розподілу тромбоцитів).

Лейкоцитарну формулу рахували мікроскопічним методом. Мазок крові, пофарбований за Романовським-Гімза, поміщали під мікроскоп з імерсійним об'єктивом, за збільшення $\times 90$, підраховуючи різні клітини лейкоцитів (виводили лейкограму). Підрахунок клітин лейкоцитів виконували за допомогою зигзагоподібного переміщення скла, щоб двічі не брати до уваги одні й ті ж клітини. У кожній з 4-х частин мазка підраховували не менше 25 лейкоцитів. Всього у мазку підраховували 100 клітин, що давало можливість підрахунку відносного складу (у %).

2.4.3. Біохімічні дослідження крові

Дослідження сироватки крові виконували на напівавтоматичному аналізаторі Evolution 3000 (Biochemical Systems International S.p.A., Італія) з використанням стандартних наборів реактивів СпайнЛаб (Granum, Україна). У сироватці крові щурів визначали ензими: аланінамінотрансферазу (АлАТ, К.Ф.2.6.1.2) та аспартатамінотрансферазу (АсАТ, К.Ф. 2.6.1.1) за методом Райтмана-Френкеля, гамма-глутамілтранспептидазу (ГГТП, К.Ф. 2.3.2.2) кінетичною кольоровою реакцією з γ -L-(+)-глутаміл-4-нітроанлідом та лужну фосфатазу (ЛФ, К.Ф. 3.1.3.1) з р-нітрофенолом; загальний протеїн біуретовим методом, креатинін за методом Яффе, холестерин за реакцією Лібермана-Бурхарда, білірубін за методом Єндрашика і Грофа [210]. Вміст гемоглобіну у крові щурів досліджували геміглобінціанідним методом на гематологічному автоматичному аналізаторі Abacus Junior vet (Diatron, Австрія).

2.4.4. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів і ензимів антиоксидантної системи

Вміст ТБК-активних продуктів визначали реакцією між малоновим диальдегідом (МДА) і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), яка за високої температури та кислого середовища протікає з утворенням триметинового комплексу, що містить одну молекулу МДА та дві молекули ТБК [210]. До 0,5 мл плазми крові додавали 5 мл 20 % фосфорновольфрамової кислоти, пробірки закривали корками, перемішували і залишали стояти на холоді 15 хв. Центрифугували за температури $+4^{\circ}\text{C}$ протягом 15 хв при 2500 об/хв. Надосадову рідину зливали, а до осаду додавали 2 мл H_2O і 1 мл 0,8 % ТБК. Перемішували, закривали корками та інкубували одну годину на водяній бані за 100°C . Охолоджували в холодній воді. Відцентрифугувували 10 хв при 6000 об/хв. У центрифугаті вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі за довжини хвилі 535 і 580 нм, таким чином виключали поглинання зафарбованих комплексів ТБК-речовинами неліпідної природи.

Вміст ТБК-активних продуктів, виражену в нмоль/мл, розраховували за формулою: $C = 0,21 + 26,5 \times \Delta D$, де: ΔD — показник $D_{535} - D_{580}$

Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за кількістю нітроформазану, що утворюється в реакції між феназинметасульфатом та НАДН. Готували проби: до 0,05 мл зразка цільної крові додавали 0,45 мл дистильованої води, 0,25 мл $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (99 %), 0,125 мл хлороформу, 100 мг KH_2PO_4 , перемішували та центрифугували 30 хв при 4000-5000 об/хв ($t = 4^{\circ}\text{C}$). Активність СОД визначали в супернатанті за температури 25°C . До 1,5 мл інкубаційної суміші (12,4 мг ЕДТА- Na_2 , 110 мг нітротетразолію синього; Sigma, USA, N 6876, НСТ, 18,4 мг феназинметасульфату (ФМС) в 100 мл 0,15 М Na/K фосфатного буферу (pH 7,8) додавали 0,1 мл супернатанту та 0,04 мл 0,05 мМ розчину НАДН (3,1 мг НАДН розчиняли в 2 мл 1 мМ трис-ЕДТА буферу; pH 8,0). У контрольну пробу додавали 0,1 мл

дистильованої води. Через 10 хв після додавання всіх реагентів вимірювали абсорбцію контрольної та дослідної проб за довжини хвилі 540 нм на спектрофотометрі СФ-46 проти дистильованої води в кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см. Відсоток гальмування реакції утворення нітроформазану розраховували за формулою:

$$\frac{A_{\text{конт. пр.}} - A_{\text{досл. пр.}}}{A_{\text{конт. пр.}}} * 100 = \frac{\text{відсоток гальмування реакції}}{\text{утворення нітроформа зану}}; \text{ де } A - \text{абсорбція.}$$

Активність СОД визначали за допомогою калібрувальної кривої з стандартними розчинами СОД ("Sigma", США; C1345) та виражали в МО/ мг протеїну [210].

Активність каталази (КАТ) визначали методом М.А. Королук зі співавторами [211]. До 2,0 мл 0,03 % розчину H_2O_2 додавали 0,1 мл зразка та інкубували 10 хв за 25 °С. Після чого додавали 1,0 мл 4 % розчину молібдату амонію в 0,01 н H_2SO_4 та зупиняли реакцію 1,0 мл 0,1 н розчину H_2SO_4 . У контрольну пробу розчин молібдату амонію додавали перед, а в зразок – після інкубування. Після центрифугування (5 хв при 4000 об/хв) в супернатанті вимірювали інтенсивність зафарбування за 410 нм на спектрофотометрі СФ-46 проти дистильованої води. З урахуванням розведення біологічного матеріалу і коефіцієнту мілімолярної абсорбції комплексу пероксиду Гідрогену з молібдатом амонію за 410 нм – 110,6 розраховували активність ензиму в мілімоль, використаного в реакції субстрату (H_2O_2) за формулою: $\frac{\Delta A * V_1}{110,6 * t * V_2 * C} = (\text{мМ} / \text{хв} \times \text{мг протеїну})$; де ΔA – різниця абсорбцій контрольної і дослідної проб; V_1 – об'єм суміші в кюветі, мл; V_2 – об'єм зразка, мл; 110,6 – коефіцієнт мілімолярної абсорбції комплексу молібдату амонію з пероксидом Гідрогену за 410 нм; C – концентрація протеїну, мг/мл; t – час інкубації, хв.

Активність глутатіонпероксидази (ГПО) визначали з використанням реактиву Елмана. До 0,83 мл інкубаційної суміші (4,8 мМ Г-SH, 6 мМ ЕДТА-

Na₂ та 12 мМ азид натрію у 0,1 М Трис-НСІ буфері), яку готували безпосередньо перед визначенням, додавали 0,1 мл зразка та інкубували 10 хв за 37° С; додавали 0,07 мл 20 мМ розчину гідропероксиду третинного бутилу та продовжували інкубувати ще 5 хв. Реакцію зупиняли 0,2 мл 20 % розчином трихлороцтової кислоти. Центрифугували 5 хв за 4000 об/хв. До 5 мл 0,1 М Трис-НСІ буферу (рН 8,5) додавали 0,05 мл супернатанту та 0,05 мл реактиву Елмана (0,01 М розчин ДТНБК у метанолі). Через 5 хв проби фотометрували за 412 нм на спектрофотометрі СФ-46 проти дистильованої води в кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см. У контрольну пробу зразок вносили перед осадженням протеїнів. З урахуванням розведення біологічного матеріалу в пробі та коефіцієнту мікромолярної абсорбції тіонітрофенільного аніону (ТНФА) за 412 нм (11,4 см²/мкМ) розраховували активність ензиму в мікромоль використаного в реакції субстрату (Г-SH) за формулою:

$$\frac{\Delta A * V_1 * V_3}{11,4 * V_2 * V_4 * C * t} = (\text{мкМ} / \text{хв} \times \text{мг протеїну}) \text{ де: } \Delta A - \text{різниця абсорбцій}$$

контрольної і дослідної проб; V₁ – V супернатанту + V Трис/НСІбуферу + V реактиву Елману, мл; V₂ – об'єм зразка, мл; V₃ – V зразка + V інкубаційної суміші + V розчину гідроперексиду третинного бутилу + V розчину ТХО, мл; V₄ – об'єм супернатанту, мл; 11,4 - коефіцієнт мікромолярної абсорбції ТНФА за 412 нм; С – концентрація протеїну, мг/мл; t – час інкубації з реактивом Елмана, хв. [210].

2.4.5. Метод гелі-електрофорезу протеїнів

Якісний та кількісний вміст фракцій розчинних протеїнів у плазмі крові досліджували в 7,5% поліакриламідному гелі (ПААГ). Підготовка зразків для електрофорезу: 0,1 мл плазми крові розбавляли 1:12 електродним буфером (рН 8,3); 0,1 мл зразка змішували з аналогічним об'ємом 40 % сахарози, в лунки концентруючого гелю вносили 0,02 мл (~ 150 - 200 мкг протеїну).

Завершення електрофорезу контролювали за рухом маркерного барвника (0,01 %-ний розчин бромфенолового синього) в ПААГ, який додавали в електродний буфер перед розбавленням зразків. Після електрофорезу гелі фарбували 0,25 % водним розчином кумасі R-250. Кількісний аналіз і визначення вмісту протеїнів (%) проведено з використанням програмного забезпечення TotalLab TL120 [210].

2.4.6. Мікробіологічні методи досліджень

Для вивчення антимікробної дії пегельованого антибіотика енрофлоксацину та традиційної субстанції антибіотика енрофлоксацину досліджували мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) для еталонних музейних штамів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P та *Escherichia coli* ATCC 11105, а також польових штамів мікроорганізмів *Staphylococcus epidermidis* *Enterobacter*, виділених з носових виділень телят, хворих на бронхопневмонію. Для виділення та ідентифікація польових штамів бактерій роду *Staphylococcus* робили посіви у чашках Петрі. Для бактеріоскопічного дослідження з чашки Петрі відбирали 3-5 колоній з різних локалізацій. Готували мазки, зафарбовували їх за Грамом та розглядали під мікроскопом. Водночас, колонії пересіювали у пробірки зі скошеною поверхнею м'ясо-пептонного агару для отримання чистої культури. Для визначення чистоти виділених культур, що вирости на скошеному агарі, готували мазки мікроорганізмів і зафарбували за Грамом. Чистоту ізольованої культури оцінювали за допомогою мікроскопа. На основі здатності розщеплювати глюкозу в анаеробних умовах стафілококи диференціювали від мікрококів. На основі здатності розщеплювати маніт в анаеробних умовах ідентифікували *S. epidermidis*.

Для виділення та ідентифікації бактерій роду *Enterobacter* застосовували бактеріоскопічне, бактеріологічне, серологічне дослідження.

Досліджуваний матеріал (носові виділення) вносили на диференційно-діагностичні середовища з лактозою (Ендо, ЕМС). Готували мазки, фарбували за Грамом і вивчали за допомогою світлового мікроскопа.

МІК двох досліджуваних форм антибіотика енрофлоксацину для *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* і *Enterobacter* визначали методом серійних розведень в рідкому поживному середовищі (м'ясо-пептонному бульйоні). Для розчинення субстанції енрофлоксацину використовували 0,1 N розчин NaOH, а для розведення до 20 мкг/мл – фосфатний буфер, рН 8,0. З приготовленого розчину (20 мкг/мл) субстанції антибіотика енрофлоксацину та пегельованого антибіотика енрофлоксацину були приготовлені наступні розведення: 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 і 0,02 мкг/мл. При розведенні враховували встановлені критерії чутливості *Staphylococcus spp.* і *Escherichia coli* до енрофлоксацину: для *Staphylococcus spp.*: МІК енрофлоксацину ≤ 0.5 мкг/мл – мікроорганізм чутливий; 1-2 мкг/мл - мікроорганізм помірно чутливий; ≥ 4 – мікроорганізм резистентний; для *Escherichia coli*: МІК енрофлоксацину ≤ 0.25 мкг/мл – мікроорганізм чутливий; 0,5-1 мкг/мл – мікроорганізм помірно чутливий; ≥ 2 – мікроорганізм резистентний (NCCLS document M31-A2) [212, 213].

2.4.7. Гістологічні дослідження тканин

Відібрані зразки проб печінки та нирок для гістологічних досліджень фіксували в 10 % розчині формаліну, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації і заливали в парафін, після чого на санному мікротомі виготовляли зрізи товщиною 5–7 мкм. Одержані зрізи наклеювали на предметні скельця, фарбували гематоксиліном Еріха та еозином і досліджували гістологічно за допомогою світлового мікроскопа, за збільшення у 200, 400 та 640 разів [214].

2.4.8. Комп'ютерне і програмне забезпечення роботи та статистичний аналіз отриманих результатів

Статистичний аналіз показників крові проводили з використанням персонального комп'ютера і програмного забезпечення *Microsoft Excel*. Побудову графіків здійснювали за допомогою програми *Excel* відповідно до загальноприйнятих алгоритмів. У роботі наведено середні значення величин і стандартні похибки ($M \pm m$), які представлено в таблицях і на рисунках. Вірогідність відхилення значень обчислювали із використанням критерію Стьюдента. Вірогідними вважали відмінності за $P < 0,05 - 0,001$. Кількість дослідів (n) відповідає кількості тварин, досліджених у кожному випадку [215].

РОЗДІЛ 3

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ПЕГЕЛЬОВАНОГО ТА ТРАДИЦІЙНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ

3.1. МІК антибіотика енрофлорсацину у традиційній та пегельованій формах на музейних штаммах мікроорганізмів

Проведені нами дослідження антимікробної активності пегельованого антибіотика енрофлорсацину та традиційного антибіотика енрофлорсацину показали різницю їх дії на музейні штамми мікроорганізмів *Escherichia coli* ATCC 11105 (табл. 3.1). Так, мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) на мікроорганізми *Escherichia coli* ATCC 11105 за застосування субстанції традиційного антибіотика енрофлорсацину становила 0,31 мкг/мл. Водночас, за дії пегельованого антибіотика енрофлорсацину на музейні штамми мікроорганізмів *Escherichia coli* ATCC 11105 МІК була нижчою удвічі (0,15 мкг/мл). Отже, пегелювання антибіотика енрофлорсацину веде до покращення його антимікробних властивостей відносно *Escherichia coli*.

Визначення МІК на музейних штаммах мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538Р показало, що антибіотик енрофлорсацин як у традиційній субстанції, так і у пегельованій формі становив 0,31 мкг/мл (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**МІК енрофлоксацину для *Escherichia coli* ATCC 11105 та
Staphylococcus aureus ATCC 6538P**

Концентрація, мкг/мл	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11105		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	
	Антибіотик енрофлоксацин традиційний	Антибіотик енрофлоксацин пегельований	Антибіотик енрофлоксацин традиційний	Антибіотик енрофлоксацин пегельований
10	—	—	—	—
5	—	—	—	—
2,5	—	—	—	—
1,25	—	—	—	—
0,62	—	—	—	—
0,31	+	—	+	+
0,15	+	+	+	+
0,08	+	+	+	+
0,04	+	+	+	+
0,02	+	+	+	+

Примітка: «—» - ріст мікроорганізму відсутній (бульйон прозорий)

«+» - ріст мікроорганізму присутній (бульйон каламутний)

3.2. МІК антибіотика енрофлоксацину у традиційній та пегельованій формах до польових штамів мікроорганізмів

Вивчення мінімальної інгібуючої концентрації антибіотика енрофлоксацину у традиційній субстанції та у пегельованій формі до

польових штамів грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів показано у таблиці №. 3.2.

Таблиця 3.2

МІК енрофлоксацину для *Staphylococcus epidermidis* *Enterobacter*

Концентрація, мкг/мл	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Enterobacter</i>	
	Антибіотик енрофлоксацин традиційний	Антибіотик енрофлоксацин пегельований	Антибіотик енрофлоксацин традиційний	Антибіотик енрофлоксацин пегельований
32	—	—	—	—
16	—	—	—	—
8	—	—	—	—
4	—	—	—	—
2	—	—	—	—
1	—	—	+	+
0,5	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+
0,125	+	+	+	+
0,06	+	+	+	+

Примітка: «—» - відсутність росту культури – бульйон прозорий;

«+» - присутній ріст культури – бульйон каламутний.

Встановлено, що рівень МІК антибіотика енрофлоксацину як у традиційної субстанції, так і у пегельованій формі до *Staphylococcus epidermidis* становив 1,0 мкг/мл. Водночас, МІК обох форм антибіотика енрофлоксацину до *Enterobacter* була також однаковою і складала 2,0 мкг/мл. Отримані результати показали, що приєднання до антибіотика енрофлоксацину ПЕГ-400, або пегелювання енрофлоксацину, не змінює рівень його бактеріостатичної активності до польових штамів

грампозитивних (*Staphylococcus epidermidis*) та грамнегативних (*Enterobacter*) мікроорганізмів.

Висновки до розділу 3

1. Визначення МІК на музейні штами мікроорганізмів *Escherichia coli* ATCC 11105 показало, що пегелювання антибіотика енрофлоксацину веде до покращення його антимікробних властивостей.

2. МІК на музейні штами мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538Р була однаковою для антибіотика енрофлоксацину як у традиційній субстанції, так і у пегельованій формах.

3. Пегелювання енрофлоксацину не змінювало рівень його бактеріостатичної активності до польових штамів грампозитивних (*Staphylococcus epidermidis*) та грамнегативних (*Enterobacter*) мікроорганізмів.

Матеріали до цього розділу висвітлені у наукових публікаціях:

4. Zelenina O. M., Vlizlo V.V, Kozak M. R., Ostapiv D. D., Samaryk V. , Ja. Dron I. A., Stetsko T. I., Skrypka M. V., Tomchuk V. A., Danchuk O. V., Levchenko A. G. Antimicrobial activity of the PEGylated antibiotic enrofloxacin and its functional and structural effect on the liver in rats. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2022. 12(06):068–075. (Scopus, Q2).

5. Спосіб посилення антимікробної дії антибіотика енрофлоксацину. Патент на корисну модель № 152046 України. № u202200707 заявл. 17.02.22. опубл. 19.10.2022. Бюл. № 42.

9. Vlizlo V., Ostapiv D., Samaryk V., Stegnyy B., Kozak M., Zelenina O., Dron I. PEGylation of enrofloxacin reduces minimum inhibitory concentrations and hepatotoxic effects in rats. Medical Biodefense Conference. Munich 2021. P. 103-104.

РОЗДІЛ 4

ГЕМАТОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЩУРІВ ЗА ВВЕДЕННЯ ПЕГЕЛЬОВАНОГО ТА ТРАДИЦІЙНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ І ПЕГ-400

4.1. Кількість еритроцитів у крові щурів

При проведенні щоденного огляду контрольних та дослідних тварин встановлено, що під час внутрішньом'язових ін'єкцій досліджуваних речовин і протягом 21-ої доби після закінчення їх введення не спостерігали відхилень від фізіологічного стану. Зокрема, у щурів загальний стан був задовільний, вони були активними, апетит збережений.

Як показав гематологічний аналіз крові, на 7-му добу після закінчення введення досліджуваних речовин кількість еритроцитів у тварин контрольної, першої та другої дослідних груп не відрізнялися між собою і була у межах від $5,3 \pm 0,18$ до $5,7 \pm 0,13 \cdot 10^{12}/\text{л}$ (рис. 4.1). Водночас, у групі, яка отримувала пегельований антибіотик енрофлораксин, кількість еритроцитів у крові складала $4,2 \pm 0,21 \cdot 10^{12}/\text{л}$ і була нижчою на 20,8 % ($P < 0,01$), порівняно з контрольною групою.

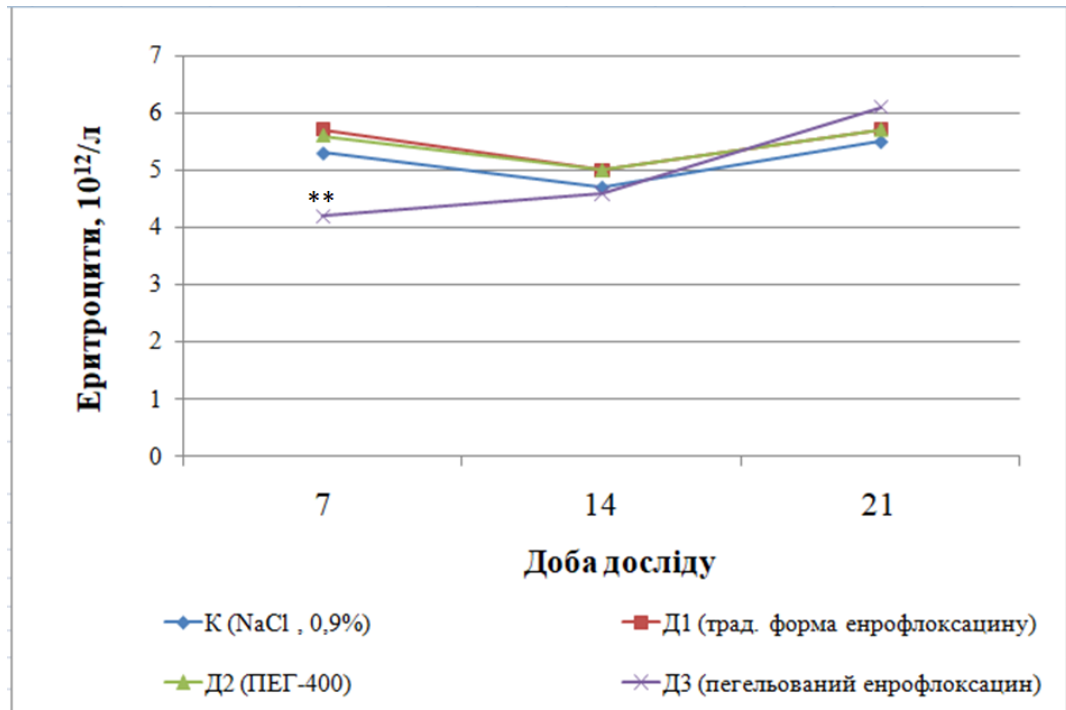


Рис. 4.1. Кількість еритроцитів у крові контрольної та дослідних груп щурів, $10^{12}/\text{л}$ ($M \pm m$, $n=4$).

Примітка. На цьому та наступних рисунках показано різницю статистичної вірогідності між контрольною та дослідними групами:

* – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$.

Через 14-ть діб після застосування препаратів у крові щурів контрольних та дослідних груп показники кількості еритроцитів були на одному рівні. Зокрема, кількість еритроцитів у крові контрольних тварин і тих, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, становила $4,7 \pm 0,33$ та $4,6 \pm 0,59 \cdot 10^{12}/\text{л}$, відповідно (рис. 4.1). Кількість еритроцитів у крові щурів, яким застосовували окремо традиційний антибіотик енрофлоксацин і ПЕГ-400, була дещо вищою ($5,0 \pm 0,22$ та $5,5 \pm 0,18 \cdot 10^{12}/\text{л}$, відповідно).

У крові тварин, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, через 21-шу добу після закінчення введення препарату показники кількості еритроцитів були найвищими $6,1 \pm 0,43 \cdot 10^{12}/\text{л}$. У крові

інших груп тварин кількість еритроцитів була дещо нижчою ($5,5 \pm 0,17 - 5,7 \pm 0,11 \cdot 10^{12}/\text{л}$), але вірогідних різниць між групами не встановлювали (рис. 4.1).

4.2. Вміст гемоглобіну у крові щурів

Як показало дослідження вмісту гемоглобіну, у крові щурів встановлено його зміни, подібні до кількості еритроцитів. Зокрема, на 7-му добу після закінчення введення препаратів між вмістом гемоглобіну крові у тварин контрольної ($125,8 \pm 2,38$ г/л), першої ($124,5 \pm 2,17$ г/л) та другої ($120,5 \pm 1,35$ г/л) дослідних груп не спостерігали змін (рис. 4.2). У третій дослідній групі, якій проводили ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлораксину, вміст гемоглобіну крові був на 12,2 % ($P < 0,001$) нижчим, порівняно з контрольною, складаючи $110,5 \pm 1,03$ г/л. Проте, слід відзначити, що за кількістю еритроцитів та вмістом гемоглобіну крові майже у всіх щурів контрольної та дослідних груп дані показники знаходилися у межах фізіологічних коливань.

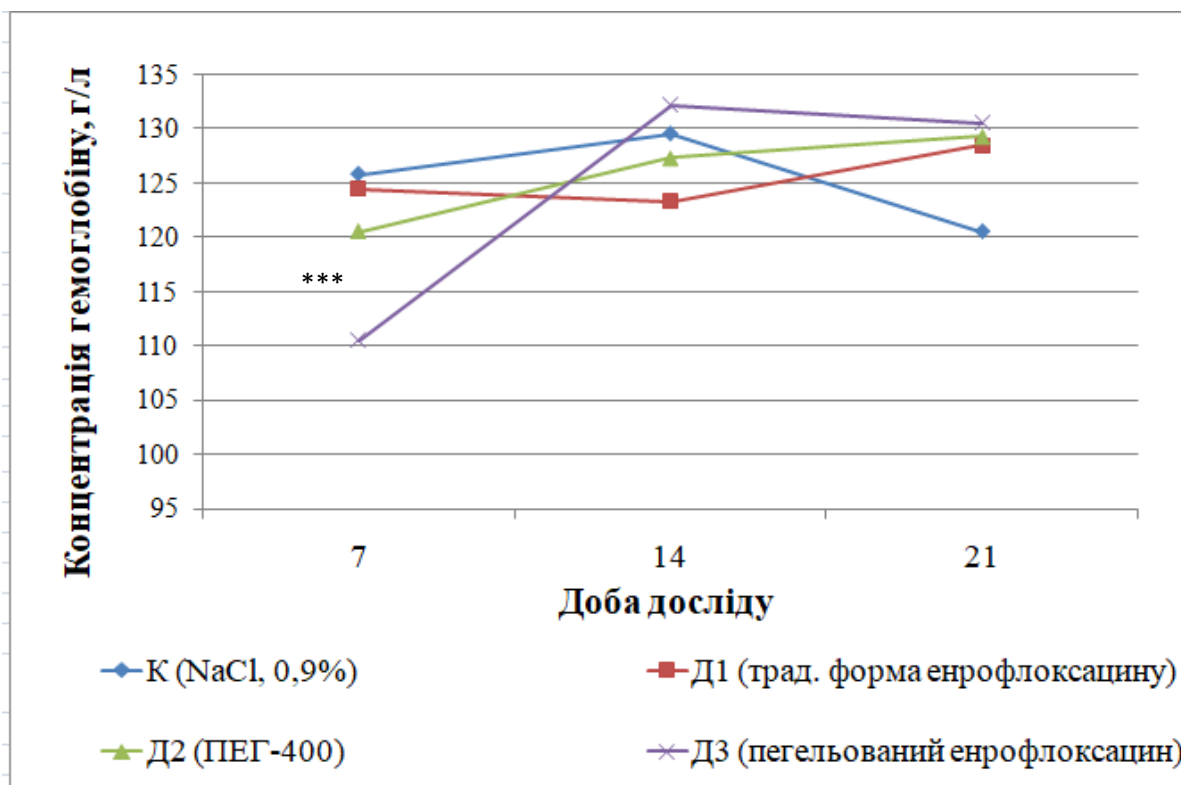


Рис. 4.2 Вміст гемоглобіну у крові контрольної та дослідних групах щурів, г/л ($M \pm m$, $n=4$).

Через 14-ть діб після останньої ін'єкції концентрація гемоглобіну у крові щурів, які отримували комплекс антибіотика енрофлоксацину з ПЕГ-400, була найвищою – $132,2 \pm 4,10$ г/л (рис. 4.2). У контрольних тварин ($129,5 \pm 5,41$ г/л), а також у інших дослідних, вміст гемоглобіну крові був нижчим, особливо у тих, яким вводили традиційну форму антибіотика енрофлоксацину ($123,3 \pm 5,99$ г/л).

Подібні показники вмісту гемоглобіну крові встановлювали і на 21-шу добу досліджень щурів контрольної та дослідних груп (рис. 4.2). Так, у крові тварин, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, вміст гемоглобіну був найвищим. При цьому, показники гемоглобіну крові даної дослідної групи тварин на 8,3 % перевищували контрольну (відповідно, $130,5 \pm 4,13$ та $120,5 \pm 6,02$ г/л).

4.3. Величина гематокриту крові щурів

На 7-му добу після закінчення введення препаратів величина гематокриту у контрольній групі, а також першій та другій дослідних знаходилася на одному рівні ($0,28 \pm 0,001$, $0,30 \pm 0,003$, $0,30 \pm 0,013$ л/л, відповідно). У тварин дослідної групи, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, показники гематокриту були нижчими ($0,24 \pm 0,017$ л/л) від контрольної групи ($P < 0,05$) на 15,9 %.

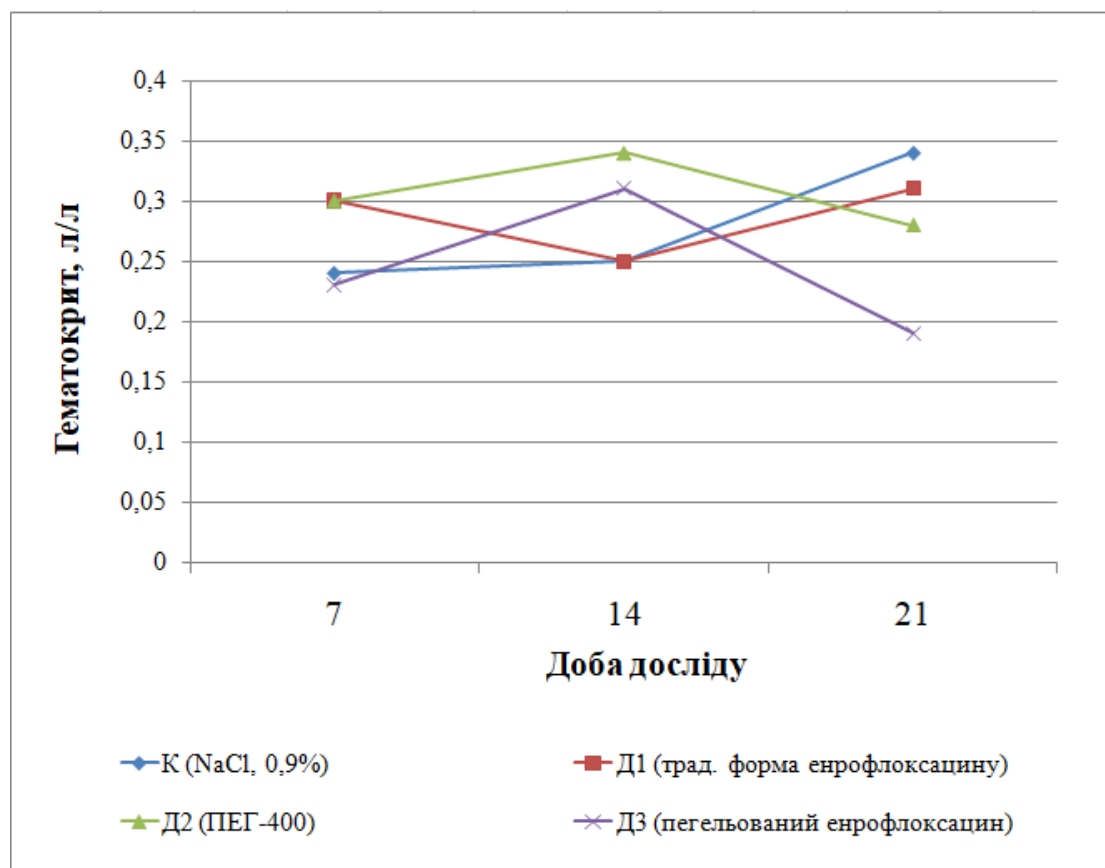


Рис. 4.3. Величина гематокриту крові щурів у контрольній та дослідних групах щурів, л/л ($M \pm m$, $n=4$).

На 14-ту добу величина гематокриту у всіх груп була майже на одному рівні ($0,25 \pm 0,010$ – $0,26 \pm 0,020$ л/л), крім дослідної групи, тварини якої

отримували ПЕГ-400 ($0,32 \pm 0,001$ л/л). У них рівень гематокриту був вірогідно ($P < 0,01$) вищим від контрольної групи на 22,8 % (рис. 4.3).

На 21-шу добу після закінчення ін'єкції препаратів показники гематокриту у групі тварин, яким вводили традиційний антибіотик енрофлоксацин, були на рівні групи контролю ($0,29 \pm 0,01$ та $0,30 \pm 0,002$ л/л, відповідно). Водночас, величина гематокриту у щурів, які отримували ПЕГ-400 та пегельований антибіотик енрофлоксацин, була нижчою (рис. 4.3).

4.4. Індекси червоної крові

4.4.1. Середній об'єм еритроцита крові щурів контрольної та дослідних груп

Через 7-м діб після закінчення ін'єкцій досліджуваних препаратів тваринам встановлено, що середній об'єм еритроцитів крові у всіх експериментальних групах був майже на одному рівні ($53,98 \pm 0,69$ – $56,03 \pm 2,13$ фл) і відповідав фізіологічним показникам (рис. 4.4).

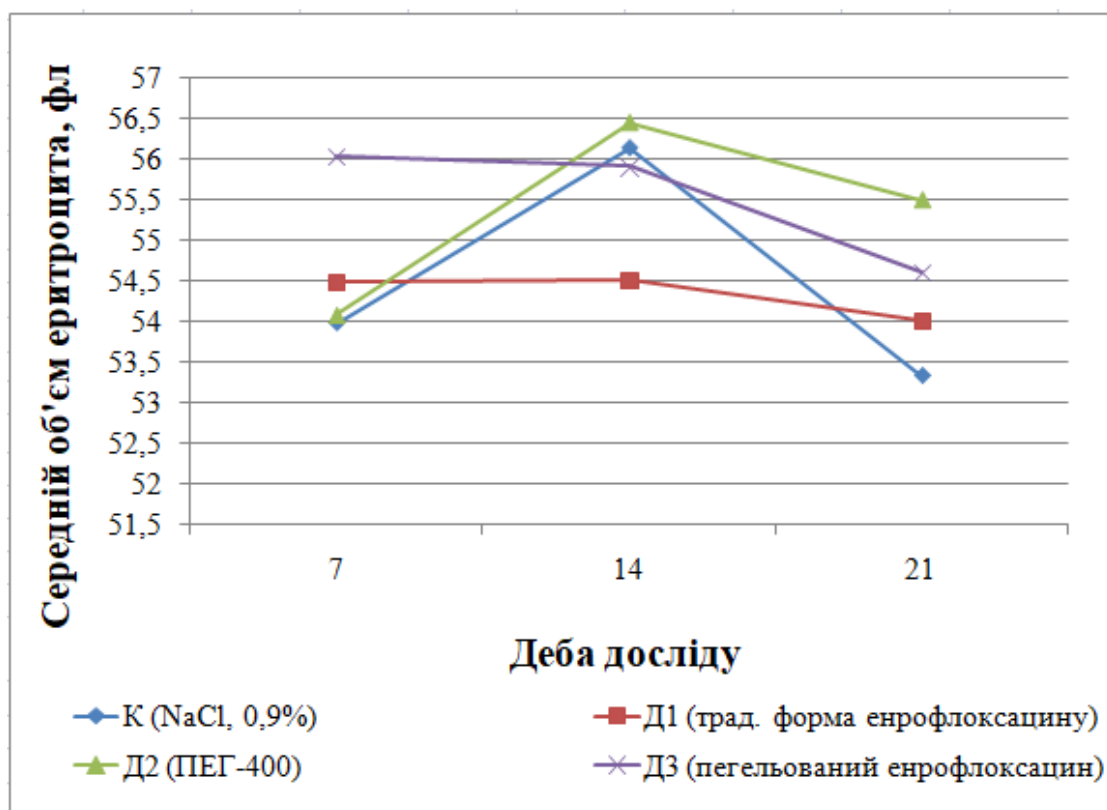


Рис. 4.4. Середній об'єм еритроцита крові щурів у контрольній та дослідних групах щурів, фл ($M \pm m$, $n=4$).

Середній об'єм еритроцита у крові як контрольних, так і дослідних щурів мало змінювався після 14-ту та 21-шу доби експерименту, порівняно з 7-ою добою, а показники були на одному рівні у різних групах (рис. 4.4).

4.4.2. Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті

При аналізі середньої концентрації гемоглобіну в еритроциті (СКГЕ) встановлено, що на 7-му добу після закінчення введення препаратів у щурів першої та другої дослідних груп тварин, яким вводили традиційну форму антибіотика енрофлоксацину та ПЕГ-400, спостерігалася вірогідне ($P < 0,01$) зниження показника на 17 % ($453,00 \pm 13,43$ г/л) та 16,1 % ($457,75 \pm 19,48$ г/л), відповідно, порівняно з контрольною групою ($545,75 \pm 15,27$ г/л). Щурі, які отримували внутрішньом'язово пегельований антибіотик енрофлоксацин,

показник СКГЕ мав вищі значення ($482,25 \pm 29,4$ г/л), ніж інші дослідні тварини і вірогідно не відрізнявся від контрольних (рис. 4.5).

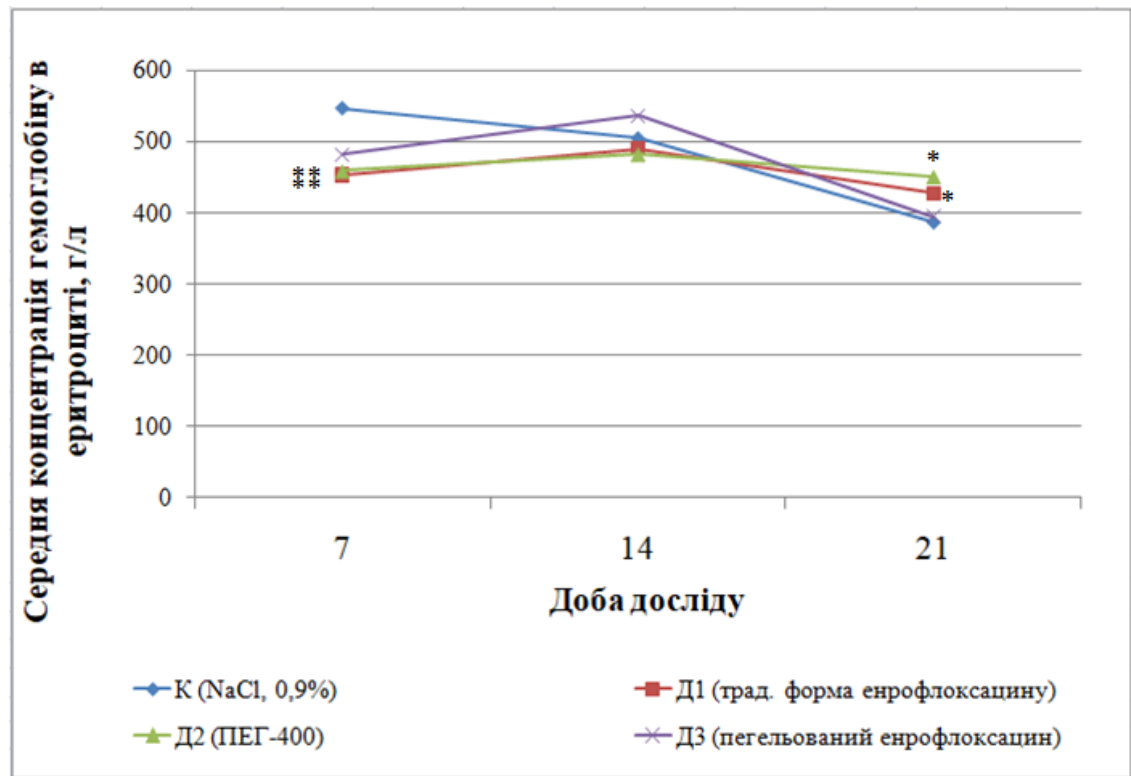


Рис. 4.5 Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті у контрольній та дослідних групах щурів, г/л ($M \pm m$, $n=4$).

На 14-му добу, порівняно з першим дослідженням, показник СКГЕ у контрольній групі знижувався, а у всіх дослідних тварин зростав. Тому, рівень середньої концентрації гемоглобіну в еритроциті не відрізнявся між контрольною та дослідними групами ($503,75 \pm 48,80$; $489,25 \pm 27,73$; $481,25 \pm 26,07$ та $535,75 \pm 30,44$ г/л, відповідно у контрольній, 1-шій, 2-ій та 3-тій дослідних групах).

На 21-шу добу у всіх дослідних групах показники СКГЕ були вищими ($427,50 \pm 11,24$; $449,75 \pm 25,30$ та $395,00 \pm 17,06$ г/л, відповідно у 1-шій, 2-ій та 3-тій) від контрольних ($386,25 \pm 13,35$ г/л). Вірогідним було зростання у тих дослідних щурів, які отримували традиційну форму антибіотика

енрофлоксацину, на 10,7 % ($P<0,05$) та ПЕГ-400 – на 16,4 % ($P<0,05$) і незначним (на 2,3 %) за введення пегельованого антибіотика енрофлоксацину (рис. 4.5).

4.4.3. Середній вміст гемоглобіну в еритроциті

Середній вміст гемоглобіну в еритроциті (ВГЕ) на 7-му добу після закінчення введення препаратів був на одному рівні у контрольних тварин ($26,35\pm0,88$ пг) і тих, які отримували ПЕГ-400 та пегельований антибіотик енрофлоксацин (відповідно, $26,10\pm1,30$ та $26,60\pm1,25$ пг). У тварин, які отримували традиційну форму антибіотика енрофлоксацину, встановлювали нижчий ВГЕ на 13,4 % ($22,83\pm0,26$ пг; $P<0,01$), порівняно з контрольною групою (рис. 4.6).

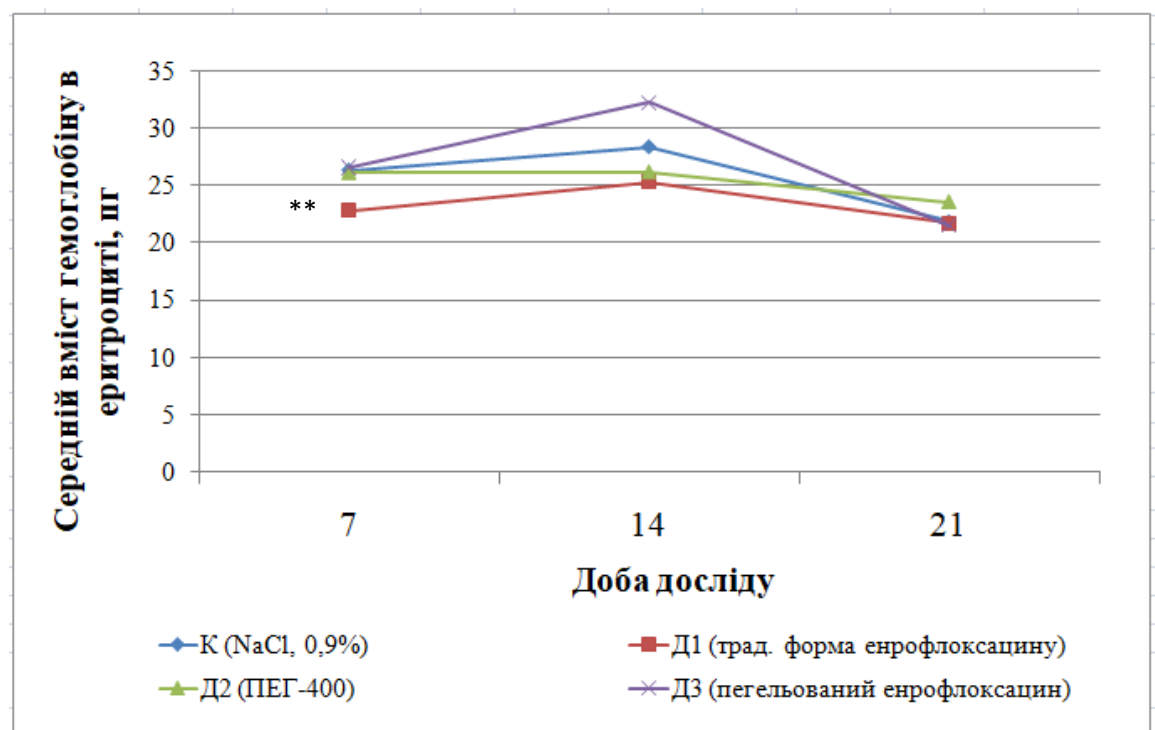


Рис. 4.6. Середній вміст гемоглобіну в еритроциті у контрольній та дослідних групах щурів, пг ($M\pm m$, $n=4$).

Показники ВГЕ не відрізнялися між групами через 14-ть діб після останнього введення препаратів ($28,35 \pm 1,74$; $25,30 \pm 1,96$; $26,15 \pm 1,66$ та $32,25 \pm 0,90$, відповідно у контрольній, 1-ій, 2-ій та 3-ій дослідних групах). Найвищі показники середнього вмісту гемоглобіну в еритроциті були у щурів, які отримували пегельований антибіотик енрофлоксацин (рис. 4.6).

Через 21-ну добу ВГЕ дещо знижувався, порівняно з попереднім дослідженням, але не відрізнявся між групами (відповідно, $21,90 \pm 1,19$ у контрольній, $21,73 \pm 0,79$ у першій, $23,55 \pm 1,64$ у другій та $21,55 \pm 0,92$ пг третій дослідних групах).

4.4.4. Колірний показник

Колірний показник (КП) через 7-м діб (рис. 4.7) після введення енрофлоксацину у традиційній формі та ПЕГ-400 були нижчими на 8,1 % ($1,14 \pm 0,02$; $P < 0,05$) та 10,5 % ($1,11 \pm 0,05$; $P < 0,01$), відповідно, порівняно з контрольною групою ($1,24 \pm 0,03$). Водночас, у третій дослідній групі, яка отримувала пегельований антибіотик енрофлоксацин, вірогідних змін з контрольними тваринами не встановлено, а показник був найвищим ($1,38 \pm 0,06$).

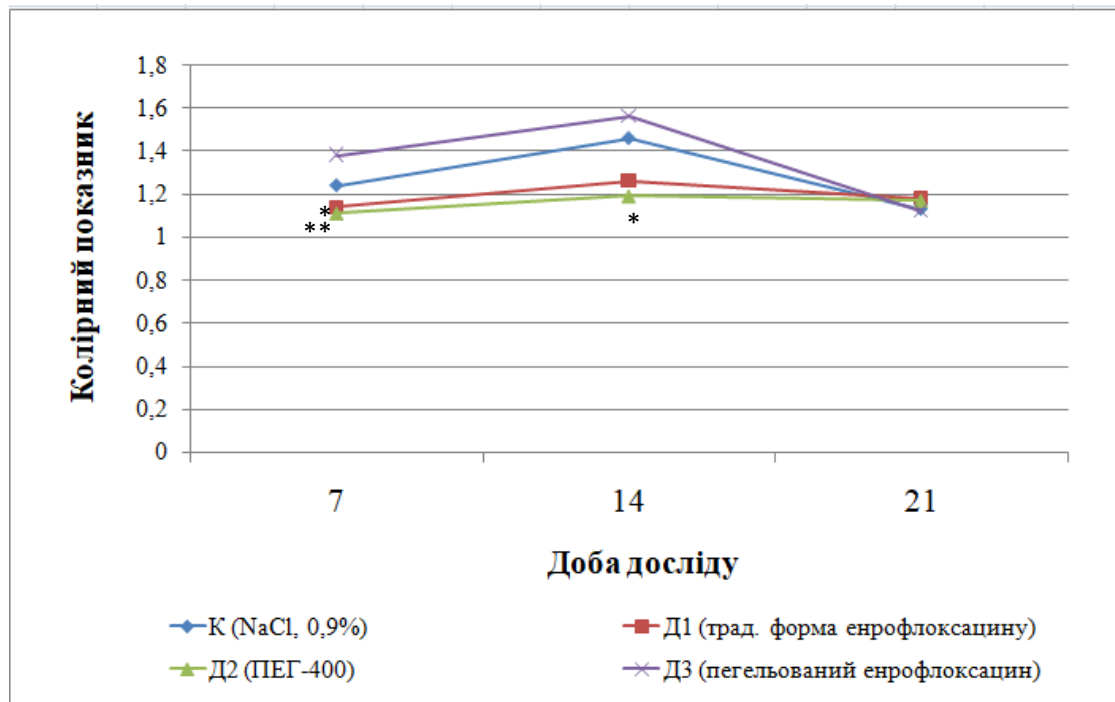


Рис. 4.7. Колірний показник у щурів контрольної та дослідних груп ($M \pm m$, $n=4$).

Через 14-ть діб після ін'єкцій тваринам препаратів відповідна тенденція зберігалася (рис. 4.7). Так, щури, які отримували ПЕГ-400, мали найнижчий КП ($1,19 \pm 0,02$; $P < 0,05$), а найвищий ті, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин ($1,56 \pm 0,13$).

Через 21-ну добу КП дещо знижувався у всіх тварин і не відрізнявся між групами (відповідно, у контрольній $1,13 \pm 0,65$; першій $1,18 \pm 0,02$; другій $1,17 \pm 0,02$ та третій $1,12 \pm 0,05$ дослідних).

Висновки до розділу 4

1. Внутрішньом'язові ін'єкції в організм щурів антибіотика енрофлоксацину у традиційній формі, ПЕГ-400 та пегельованого антибіотика енрофлоксацину не спричиняють патологічних змін гемопоезу, оскільки показники кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну, а також величина

гематокриту та індексів червоної крові знаходилися у переважної більшості тварин у межах фізіологічних коливань.

2. Зниження кількості еритроцитів і концентрації гемоглобіну, що встановлено на 7-му добу після введення пегельованого антибіотика енрофлорсацину, було незначним і дані показники зростали через 14-ть діб, а також на 21-шу добу, повертаючись до рівня контролю, і були найвищими серед всіх досліджуваних тварин. Водночас, через 7-му діб у щурів, яким вводили традиційну форму енрофлорсацину та ПЕГ-40 встановлено нижчу насиченість еритроцитів гемоглобіном. У наступні дні дослідження показники індексів червоної крові були стабільними у всіх груп тварин і мало відрізнялися між собою.

Матеріали до цього розділу висвітлені у наукових публікаціях:

1. Зеленіна О. М., Остапів Д. Д., Влізло В. В., Дронь І. А., Винницька С. І. Вміст гемоглобіну, кількість еритроцитів і лейкоцитів, лейкограма крові щурів за введення енрофлорсацину у складі полімеру. Біологія тварин. 2020. Т. 22, № 1. С. 26–30.

РОЗДІЛ 5

КІЛЬКІСТЬ ЛЕЙКОЦИТІВ, ЛЕЙКОГРАМА ТА ШВИДКІСТЬ ОСІДАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ КРОВІ ЩУРІВ ЗА ВВЕДЕННЯ ПЕГЕЛЬОВАНОГО ТА ТРАДИЦІЙНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ І ПЕГ-400

5.1. Кількість лейкоцитів та лейкограма у крові

Через 7-м діб після закінчення введення досліджуваних препаратів щурам кількість лейкоцитів у крові (рис. 5.1) дослідних груп була нижчою, порівняно з контрольною ($7,0 \pm 0,18 \cdot 10^9/\text{л}$). Із дослідних груп найнижчий показник лейкоцитів встановлений у крові тварин, яким вводили ПЕГ-400 ($4,5 \pm 0,21 \cdot 10^9/\text{л}$; $P < 0,001$), дещо вищий у тих, які отримували пегельований антибіотик енрофлоксацин ($5,4 \pm 0,20 \cdot 10^9/\text{л}$; $P < 0,001$) і найвищий – за введення антибіотика енрофлоксацину у традиційній формі ($6,0 \pm 0,12 \cdot 10^9/\text{л}$; $P < 0,01$).

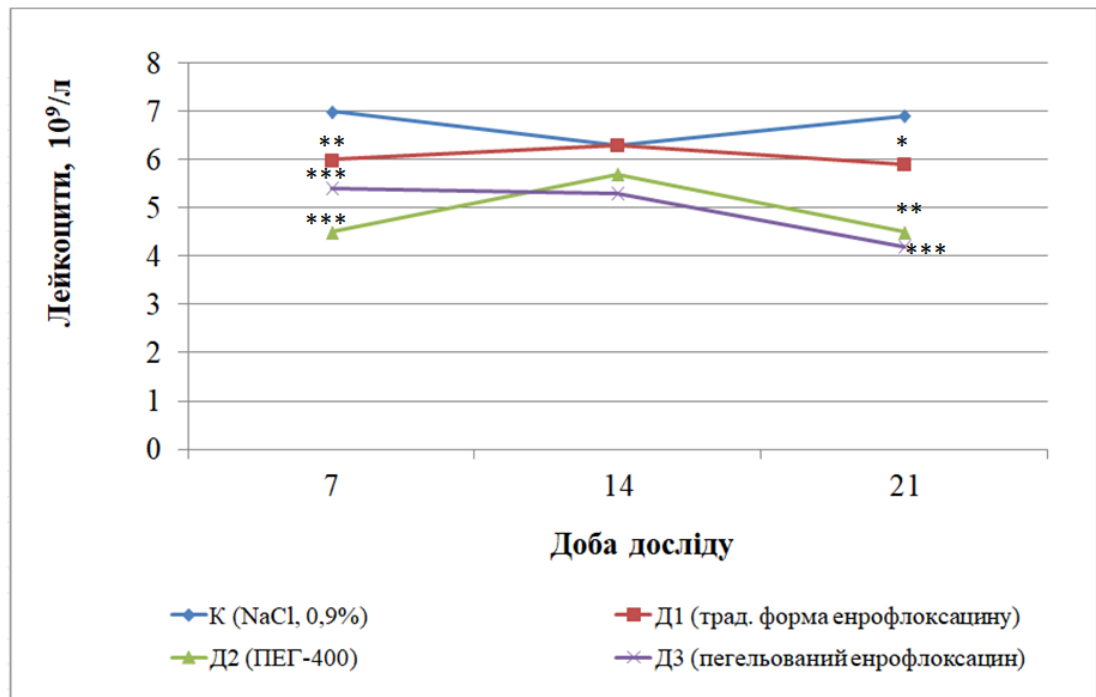


Рис. 5.1 Кількість лейкоцитів крові у контрольній та дослідних групах щурів, $10^9/\text{л}$ ($M \pm m$, $n=4$).

При дослідженні лейкограми крові щурів встановлено, що зниження загальної кількості лейкоцитів на 7-му добу після введення препаратів дослідним групам, відбувалося за рахунок лімфоцитів та нейтрофілів (табл. 5.1). Зокрема, кількість лімфоцитів знижувалася, відповідно, на 18,1 і 21,5 % ($P < 0,001$), у тварин, яким вводили антибіотик енрофлоксацин у традиційній формі та ПЕГ-400, а за дії пегельованого антибіотика енрофлоксацину – на 13,4 % ($P < 0,05$).

У першій та другій дослідних групах, які отримували антибіотик енрофлоксацин у традиційній формі та ПЕГ-400, зростала кількість нейтрофілів як сегментоядерних, так і паличкоядерних. Тварини, яким внутрішньом'язово вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, кількість сегментоядерних нейтрофілів була дещо нижчою і мало відрізнялася від контрольних. При цьому, кількість паличкоядерних нейтрофілів у даній дослідній групі була мінімальною.

Водночас, кількість моноцитів у крові дослідних тварин була вищою у 2,2–2,5 рази ($P<0,01$ – $0,001$), порівняно з контрольними.

Що стосується еозинофілів, то на сьомий день після закінчення введення препаратів вони були встановлені лише у першій дослідній групі.

Кількість лейкоцитів у крові тварин через 14-ть діб після введення препаратів вірогідно не відрізнялася між дослідними та контрольними групами ($6,3\pm0,44$ – у контрольній, $6,3\pm0,23$ – 1-ій, $5,7\pm0,31$ – 2-ій та $5,3\pm0,45$ $10^9/\text{л}$ – 3-ій дослідних).

Аналізуючи дані лейкограми через 14-ть діб, можна зробити висновок, що у другій та третій дослідних групах кількість лейкоцитів знижувалася за рахунок моноцитів та еозинофілів (табл. 5.1). Водночас, кількість нейтрофілів як сегментоядерних, так і паличкоядерних у щурів, яким внутрішньом'язово вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, не відрізнялася від контрольних і була у межах фізіологічних коливань. За введення тваринам ПЕГ-400 було встановлено вищі на 5,7 % ($P<0,05$) показники сегментоядерних нейтрофілів, порівняно з контрольними.

Таблиця 5.1

Лейкограма крові щурів контрольних та дослідних груп, %

Група тварин	Лімфоцити	Моноцити	Еозинофіли	Нейтрофіли	
				Сегментоядерні	Паличкоядерні
7-ма доба					
Контрольна	79,3±1,29	3,3±0,41	5,0±0,35	20,3±1,34	0±0
I дослідна	65,0±0,61***	7,3±0,74**	4,3±0,41	24,8±0,74*	8,8±0,74
II дослідна	62,3±1,43***	7,3±0,74**	0,0±0,0	24,5±0,90*	9,3±1,34
III дослідна	68,7±2,75*	8,4±0,74***	0,0±0,0	15,3±2,27	3,7±0,54
14-та доба					
Контрольна	75,3±2,63	2,8±0,54	4,5±0,75	17,3±1,98	1±0
I дослідна	75,5±3,44	3,0±0,00	5,3±1,24	16,5±2,14	3±0
II дослідна	73,0±2,96	2,0±0,61	1±0	23,0±1,06*	1±0
III дослідна	76,8±3,45	2,5±1,06	0±0	19,3±1,29	1±0
21-ша доба					
Контрольна	77,5±3,40	3,0±0,61	3,3±0,41	18,8±1,08	0±0
I дослідна	83,3±3,42	3,0±0,61	2,2±0,82	11,3±3,19	1±0
II дослідна	78,0±2,03	1,5±0,25	0±0	14,8±1,19	1±0
III дослідна	70,0±1,46	2,0±0,35	0±0	24,5±1,03**	0±0

Примітка. Різниця статистично вірогідна порівняно з контрольною групою –

*P< 0,05; **P< 0,01; ***P< 0,001

На 21-шу добу досліджень кількість лейкоцитів у крові щурів дослідних груп була нижчою ніж у контрольній (рис. 5.1). Так, у першій дослідній групі показник складав $5,9 \pm 0,12 \cdot 10^9/\text{л}$ ($P < 0,05$), у другій – $4,5 \pm 0,44$ ($P < 0,01$), у третій – $4,2 \pm 0,41$ ($P < 0,001$), а у контрольній – $6,9 \pm 0,29 \cdot 10^9/\text{л}$. Слід відзначити широкі коливання показників у другій та третій дослідних групах ($CV = 19,6$ та $19,4$, відповідно), що може вказувати на відсутність впливу на тварин введених речовин. Можливо інші фактори проявляли індивідуальний вплив на щурів.

При цьому, основні за кількістю клітини лейкоцитів – лімфоцити були стабільними, а їх показники не відрізнялися між групами (табл. 5.1).

Кількість сегментоядерних нейтрофілів у крові щурів першої та другої дослідних груп на 21-шу добу експерименту була дещо нижчою, ніж у контролі, зокрема на 6 % за введення антибіотика енрофлоксацину у традиційній формі. Водночас, у групі, якій вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, сегментоядерні нейтрофіли перевищували на 5,7 % ($P < 0,01$) контрольних. При цьому, кількість паличкоядерних нейтрофілів не відрізнялася між контрольними і дослідними тваринами, а їх присутність зареєстрована лише у крові щурів, яким вводили антибіотик енрофлоксацин у традиційній формі та ПЕГ-400.

Кількість моноцитів у крові тварин дослідних і контрольної груп знаходилася на одному рівні, а еозинофіли були присутні у щурів контрольної та першої дослідної груп (табл. 5.1).

5.2. Швидкість осідання еритроцитів

Протягом всього експерименту швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ) була в межах фізіологічних коливань і вірогідно не відрізнялася між групами (рис. 5.2). Через 7-ім діб після останнього введення препаратів можна відзначити дещо вищі показники у дослідних тварин ($2,50 \pm 0,25$ – у першій, $2,50 \pm 0,25$ – у другій та $3,00 \pm 0,35$ мм/год – у третій), порівняно з контрольними ($2,25 \pm 0,22$ мм/год).

Через 14-ту та 21-шу доби досліджень показник ШОЕ знижувався, порівняно з першим дослідженням, у контрольній, першій та другій дослідних груп тварин до $1,25 \pm 0,22$ мм/год, а у щурів, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, встановлено найнижчі дані ($1,00 \pm 0$ мм/год).

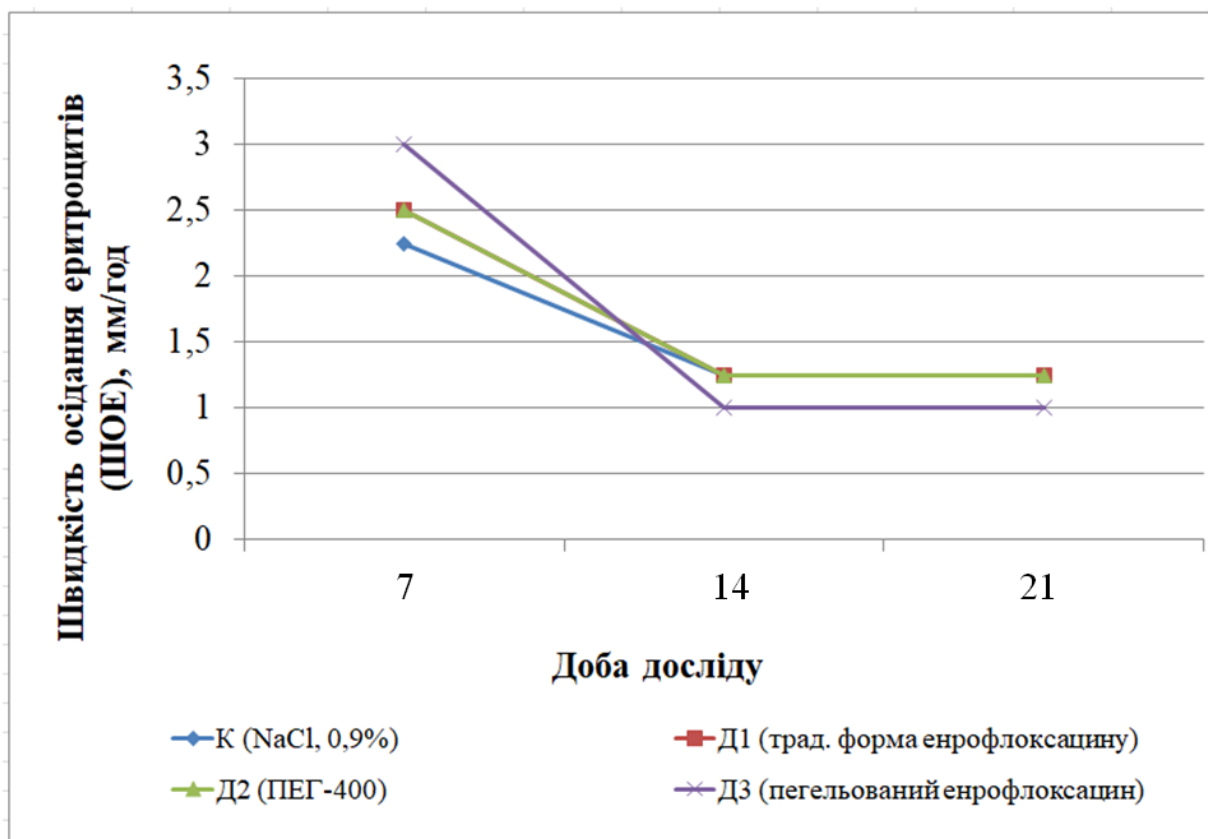


Рис. 5.2. Швидкість осідання еритроцитів крові у контрольній та дослідних групах щурів, мм/год ($M \pm m$, $n=4$).

Висновки до розділу 5

1. Внутрішньом'язове введення щурам ПЕГ-400, антибіотика енрофлоксацину у традиційній формі та пегельованого антибіотика енрофлоксацину характеризується зниженням числа лейкоцитів через сім діб після останньої ін'єкції, але показники не виходили за межі фізіологічних коливань.

2. Через сім діб після останньої ін'єкції препаратів встановлено зростання у крові дослідних тварин паличкоядерних нейтрофілів і відсутність еозинофілів. У наступні дослідження крові щурів показники лейкограми мало відрізнялися від контрольних тварин і знаходилися у межах фізіологічних коливань.

3. Протягом всього експерименту показники ШОЕ були в межах фізіологічних коливань і не відрізнялася між контрольною та дослідними групами.

Матеріали до цього розділу висвітлені у наукових публікаціях:

1. Зеленіна О. М., Остапів Д. Д., Влізло В. В., Дронь І. А., Винницька С. І. Вміст гемоглобіну, кількість еритроцитів і лейкоцитів, лейкограма крові щурів за введення енрофлорсацину у складі полімеру. Біологія тварин. 2020. Т. 22, № 1. С. 26–30.

РОЗДІЛ 6

КІЛЬКІСТЬ ТРОМБОЦИТІВ КРОВІ ЩУРІВ ТА ЇХ ІНДЕКСИ ЗА ВВЕДЕННЯ ПЕГЕЛЬОВАНОГО ТА ТРАДИЦІЙНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ І ПЕГ-400

6.1. Кількість тромбоцитів у крові тварин контрольної та дослідних груп

При підрахунку кількості тромбоцитів крові встановлено (рис. 6.1), що на сьому добу після закінченню введення препаратів, у контрольних тварин та тим, яким вводили пегельований антибіотик енрофлорксацин, показники були однаковими ($535,25 \pm 15,79$ та $512,75 \pm 35,22 \cdot 10^9/\text{л}$, відповідно).

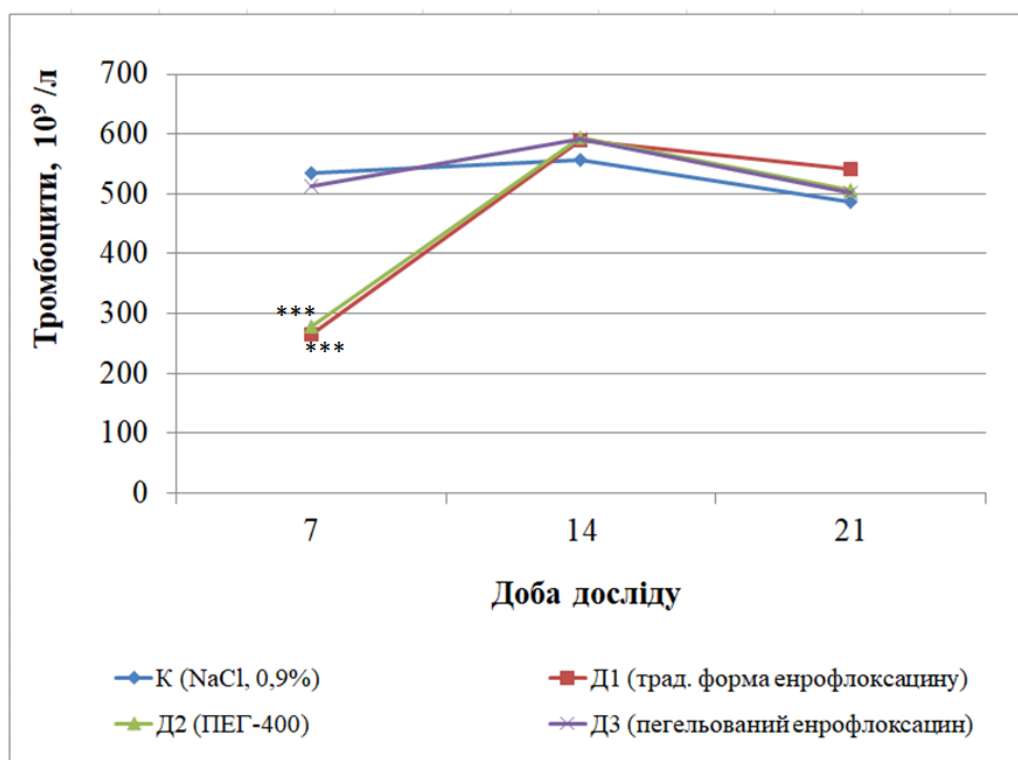


Рис. 6.1. Кількість тромбоцитів крові у контрольній та дослідних групах щурів, $10^9/\text{л}$ ($M \pm m$, $n=4$).

Водночас, кількість тромбоцитів у крові щурів, які отримували традиційну форму антибіотика енрофлорсацину та ПЕГ-400, знижувалася на 50,3 % ($266,25 \pm 9,45$; $P < 0,001$) та 47,9 % ($279,00 \pm 13,98$; $P < 0,001$), відповідно.

Через чотирнадцять діб після закінчення внутрішньом'язових ін'єкцій досліджуваних препаратів показники кількості тромбоцитів зростали у всіх групах тварин і не відрізнялися між собою ($556,25 \pm 49,01$ – у контрольній, $589,50 \pm 19,95$ – у першій, $594,05 \pm 5,12$ – у другій та $591,50 \pm 37,07 \cdot 10^9/\text{л}$ – у третій дослідних).

Через 21-шу добу кількість тромбоцитів у крові щурів як контрольної, так і дослідних груп мало відрізнялася від попереднього дослідження, а показники були майже на одному рівні (рис. 6.1).

6.2. Тромбоцитарні індекси

6.2.1. Середній об'єм тромбоцитів крові

Середній об'єм тромбоцитів у крові був стабільним протягом всього часу досліджень контрольних та дослідних тварин і показники не відрізнялися між групами (рис. 6.2).

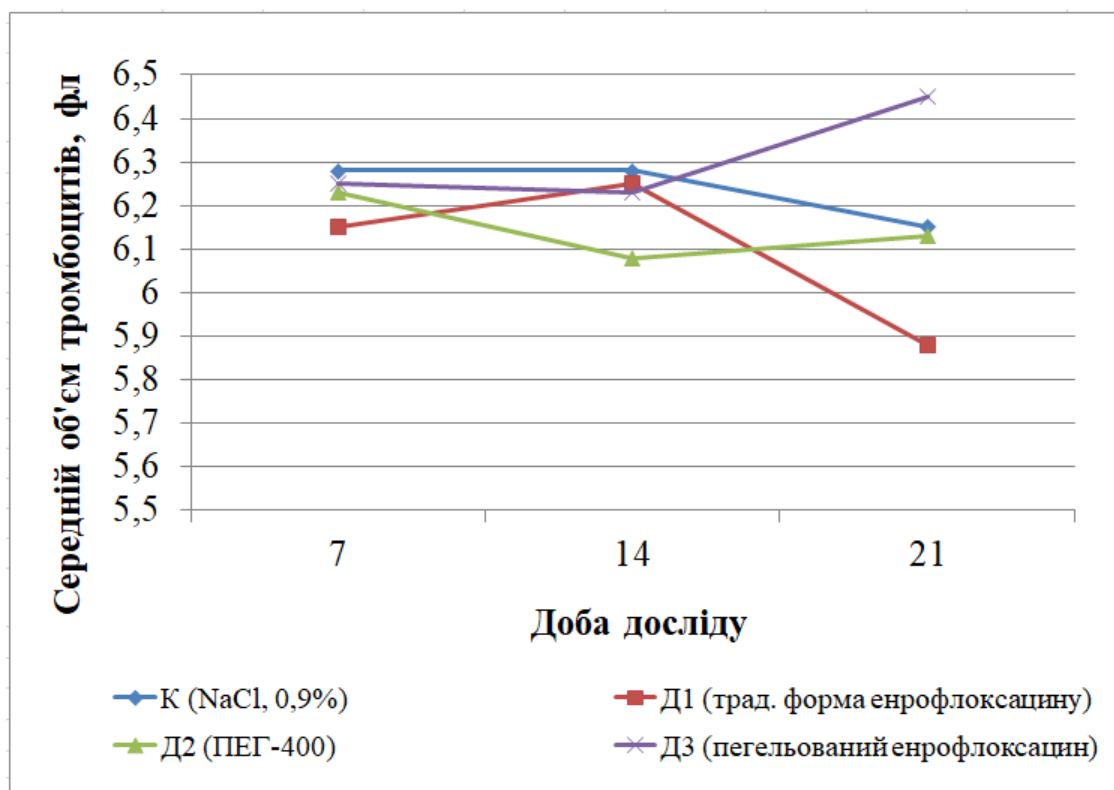


Рис. 6.2. Середній об'єм тромбоцитів крові у контрольній та дослідних групах щурів, фл ($M \pm m$, $n=4$).

6.2.2. Ширина розподілу тромбоцитів крові

Показники ширини розподілу тромбоцитів крові (рис. 6.3) через 7-ім діб після останнього введення препаратів у контрольних тварин і у тих, яким задавали традиційну форму антибіотика енрофлоксацину, були на одному рівні ($7,43 \pm 0,12$ та $7,20 \pm 0,14$ %, відповідно).

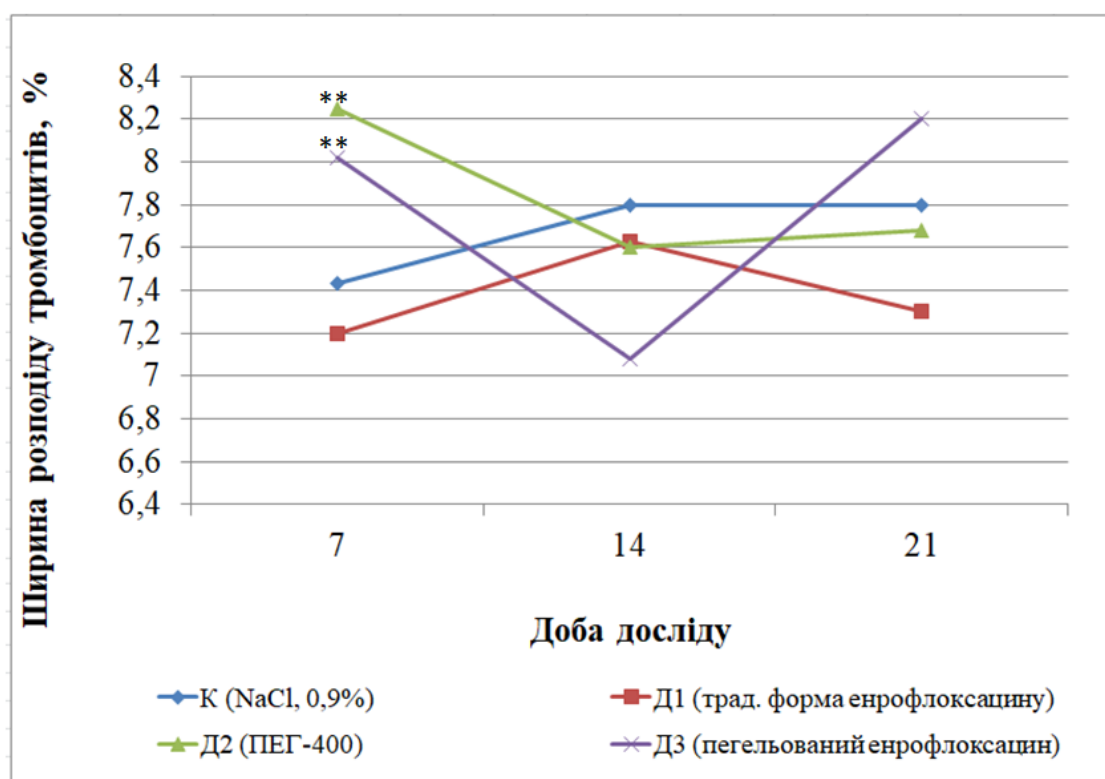


Рис. 6.3. Ширина розподілу тромбоцитів крові у контрольній та дослідних групах щурів, % ($M \pm m$, $n=4$).

Водночас, щури, які отримували ПЕГ-400 та пегельований антибіотик енрофлоксацин, мали ширину розподілу тромбоцитів вищою на 11 % ($8,25 \pm 0,18$; $P < 0,01$) та 7,9 % ($8,02 \pm 0,06$ %; $P < 0,01$), відповідно, порівняно з контрольними (табл. 6.3).

Через 14-ть та 21-ну доби після закінчення введення препаратів рівень ширини розподілу тромбоцитів крові вірогідно не відрізнявся між дослідними та контрольними тваринами.

6.2.3. Величина тромбокрити крові

Встановлено, що через 7-ім діб після закінчення введення досліджуваних препаратів величина тромбокрити у крові тварин, яким вводили антибіотик енрофлоксацин у традиційній та пегельованій формах,

була на одному рівні з контрольною (рис. 6.4). Водночас, щури, які отримували ПЕГ-400, показники тромбокриту крові були на 45,6 % ($0,18 \pm 0,01$ %; $P < 0,01$) нижчим відносно контрольних ($0,33 \pm 0,01$ %).

У наступні періоди досліджень рівень тромбокриту крові як у контрольних, так і дослідних групах щурів був на одному рівні.

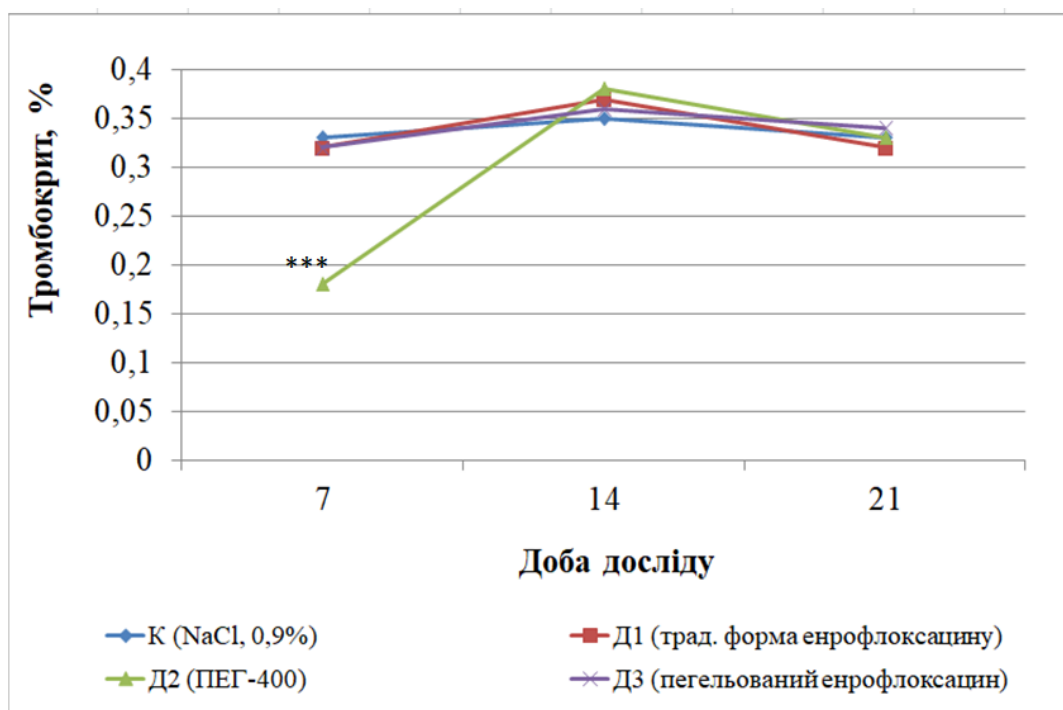


Рис. 6.4. Величина тромбокриту крові у контрольній та дослідних групах щурів, % ($M \pm m$, $n=4$).

Висновки до розділу 6

Внутрішньом'язове введення щурам традиційної форми енрофлораксацину та ПЕГ-400 спричиняє на 7-му добу після останніх ін'єкцій зниження загальної кількості тромбоцитів, а також тромбокриту за введення ПЕГ-400, при цьому рівень ширини розподілу тромбоцитів був вищим після застосування ПЕГ-400 та пегельованого антибіотика енрофлораксацину. У

наступні дослідження показники кількості тромбоцитів та їх індекси не відрізнялися між контрольними та дослідними тваринами.

Матеріали до цього розділу висвітлені у науковій публікації:

12. Зеленіна О.М., Влізло В.В. Кількість тромбоцитів крові тварин та їх індекси за введення різних форм антибіотика енрофлораксину. Матеріали Міжнародної наукової конференції «Єдине здоров'я-2022». Київ. 2022. С.65-66. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку).*

РОЗДІЛ 7

СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У КРОВІ ЩУРІВ ЗА ВВЕДЕННЯ ПЕГЕЛЬОВАНОГО ТА ТРАДИЦІЙНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ І ПЕГ-400

7.1. Вміст ТБК-активних продуктів у крові

При лабораторному дослідженні крові щурів встановлено, що на 7-му добу після закінчення введення досліджуваних речовин, вміст ТБК-активних продуктів у плазмі тварин (рис. 7.1), які отримували ПЕГ-400, та тих, яким вводили пегельований антибіотик енрофлорксацин, був нижчим на 38 % ($0,049 \pm 0,018$ нмоль/мг білка) та 42 % ($0,046 \pm 0,013$ нмоль/мг білка), відповідно, порівняно з контрольними ($0,079 \pm 0,015$ нмоль/мг білка).

Водночас, у крові тварин, яким проводили ін'єкцію традиційного антибіотика енрофлорксацину, кількість ТБК-активних продуктів була вищою на 11 % ($0,088 \pm 0,011$ нмоль/мг білка), відносно контрольних щурів. Отже, пегелювання антибіотика енрофлорксацину веде до зниження ТБК-активних продуктів, що можна розцінювати, як зменшення утворення продуктів пероксидного окиснення ліпідів.

На 14-ту добу після введенні досліджуваних речовин вміст ТБК-активних продуктів у крові всіх дослідних груп ($0,096 \pm 0,010$, $0,104 \pm 0,011$ та $0,113 \pm 0,019$ нмоль/мг білка, відповідно у першій, другій та третій), був майже на рівні контрольної ($0,102 \pm 0,021$ нмоль/мг білка).

Через 21-шу добу експерименту найвищий вміст ТБК-активних продуктів у крові спостерігали у щурів, яким вводили традиційний антибіотик енрофлорксацин (рис. 7.1). У них вміст показника був вищим від контрольних тварин на 6 % ($0,152 \pm 0,027$ нмоль/мг білка, проти $0,143 \pm 0,038$ нмоль/мг білка, відповідно). Водночас, кількість ТБК-активних продуктів у

крові щурів, яким вводили ПЕГ-400, була на 7 % ($0,134 \pm 0,028$ нмоль/мг білка) нижчою від контрольних, а в групі тварин, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, показник був нижчим на 17 % ($0,122 \pm 0,080$ нмоль/мг білка).

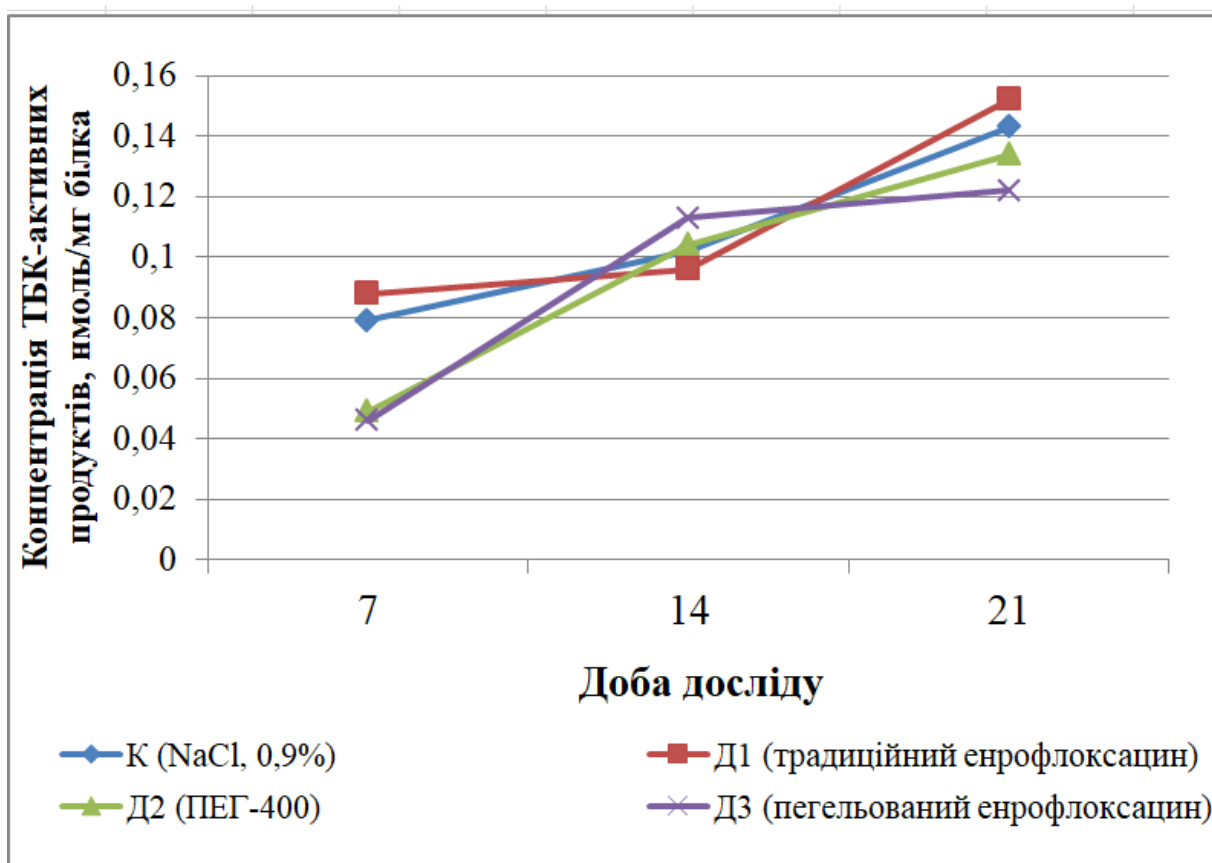


Рис. 7.1. Вміст ТБК-активних продуктів у крові контрольної та дослідних групах щурів, нмоль/мг білка ($M \pm m$, $n=4$).

7.2. Активність СОД у крові

При вивченні стану активності ензимів антиоксидантної системи у крові піддослідних тварин спостерігались зміни залежно від часу дослідження та введеної речовини. Так, активність супероксиддисмутази (СОД) у крові на 7-му добу після закінчення введення препаратів (рис. 7.2) у групі тварин, які отримували внутрішньом'язово пегельований антибіотик

енрофлоксацин, була на рівні контрольної групи ($4,91 \pm 0,43$ та $4,90 \pm 0,33$ МО/мг гемоглобіну, відповідно), а за введення окремо антибіотика енрофлоксацину та ПЕГ-400 рівень активності був нижчим ($4,45 \pm 0,46$ та $4,70 \pm 0,26$ МО/мг гемоглобіну, відповідно). За рівнем активності СОД та вмістом ТБК-активних продуктів у крові можна зробити висновок про позитивний вплив пегелювання антибіотика енрофлоксацину на антиоксидантну систему і стабільність клітини організму даних тварин.

Через 14-ть діб після застосування препаратів у крові щурів контрольних та дослідних груп активність СОД у крові мала тенденцію до зниження, порівняно з попереднім аналізом (рис. 7.2). Слід відмітити, що активність СОД у крові між щурами контрольної групи ($4,14 \pm 0,26$ МО/мг гемоглобіну) та першою ($4,18 \pm 0,45$ МО/мг гемоглобіну), другою ($4,40 \pm 0,16$ МО/мг гемоглобіну) і третьою ($3,97 \pm 0,23$ МО/мг гемоглобіну) дослідними мало відрізнялася.

Через 21-ну добу після закінчення введення препаратів активність ензиму СОД у крові щурів продовжувала знижуватися, особливо це було виражено у дослідних тварин. Так, у щурів, які отримували внутрішньом'язово традиційний антибіотик енрофлоксацин, активність супероксиддисмутази була нижчою на 62 % ($1,35 \pm 0,10$ МО/мг гемоглобіну; $P < 0,001$), за введення ПЕГ-400 – на 43 % ($2,03 \pm 0,16$ МО/мг гемоглобіну; $P < 0,001$), а у тих, яким проводили ін'єкцію пегельованого антибіотика енрофлоксацину – на 55 % ($1,59 \pm 0,09$ МО/мг гемоглобіну; $P < 0,001$), порівняно з контрольними тваринами ($3,55 \pm 0,23$ МО/мг гемоглобіну).

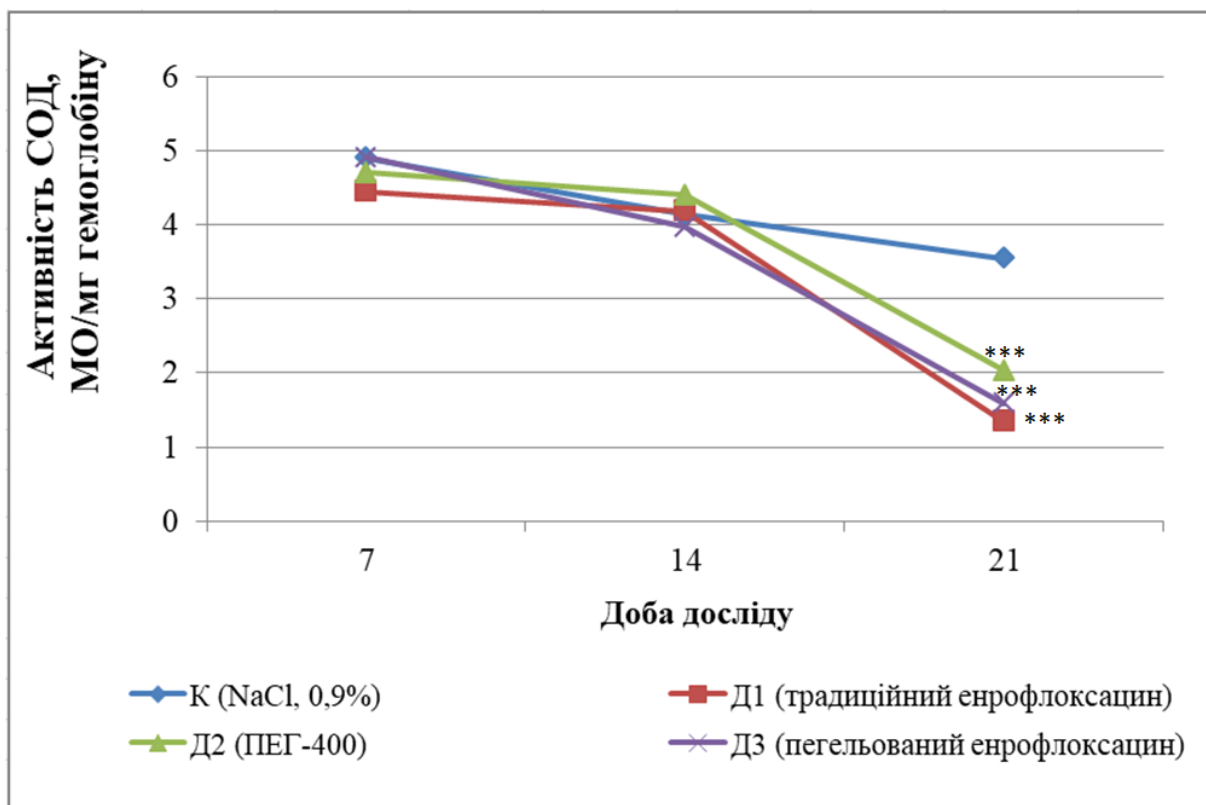


Рис. 7.2. Активність СОД у крові контрольної та дослідних груп щурів, МО/мг Нb ($M \pm m$, $n=4$).

7.3. Активність каталази у крові

При дослідженні активності каталази (КАТ) у крові піддослідних тварин встановлено (рис. 7.3), що через 7-ім діб після введення препаратів показник мало відрізнялася між групами ($1,95 \pm 0,05$ – $2,07 \pm 0,23$ кмоль/хв×мг гемоглобіну). Однак слід відзначити, що найвищою була активність у тварин, які отримували новостворений пегельований антибіотик енрофлоксацин ($2,07 \pm 0,23$ кмоль/хв×мг гемоглобіну).

На 14-ту добу після закінчення введення препаратів активність КАТ у крові щурів різних груп мало відрізнялася порівняно з попереднім дослідженням. Найвища активність каталази продовжувала реєструватися у крові третьої дослідної групи, яка отримувала пегельований антибіотик енрофлоксацин.

Проведений аналіз активності КАТ у крові щурів через 21-шу добу після дачі досліджуваних препаратів вказував на зниження активності ензиму, порівняно з попередніми дослідженнями, у всіх груп тварин (рис. 7.3). З дослідних щурів найнижчі показники встановлено у крові тварин, які отримували антибіотик енрофлоксацин у чистому вигляді ($1,31 \pm 0,12$ кмоль/хв $\times$ мг гемоглобіну) та ПЕГ-400 ($1,30 \pm 0,03$ кмоль/хв $\times$ мг гемоглобіну). У них зниження було на 11 % та 12 %, відповідно, порівняно з контрольними щурами ($1,45 \pm 0,09$ кмоль/хв $\times$ мг гемоглобіну). Водночас, рівень активності КАТ у крові щурів, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, був вищими ($1,35 \pm 0,10$ кмоль/хв $\times$ мг гемоглобіну) від інших дослідних груп.

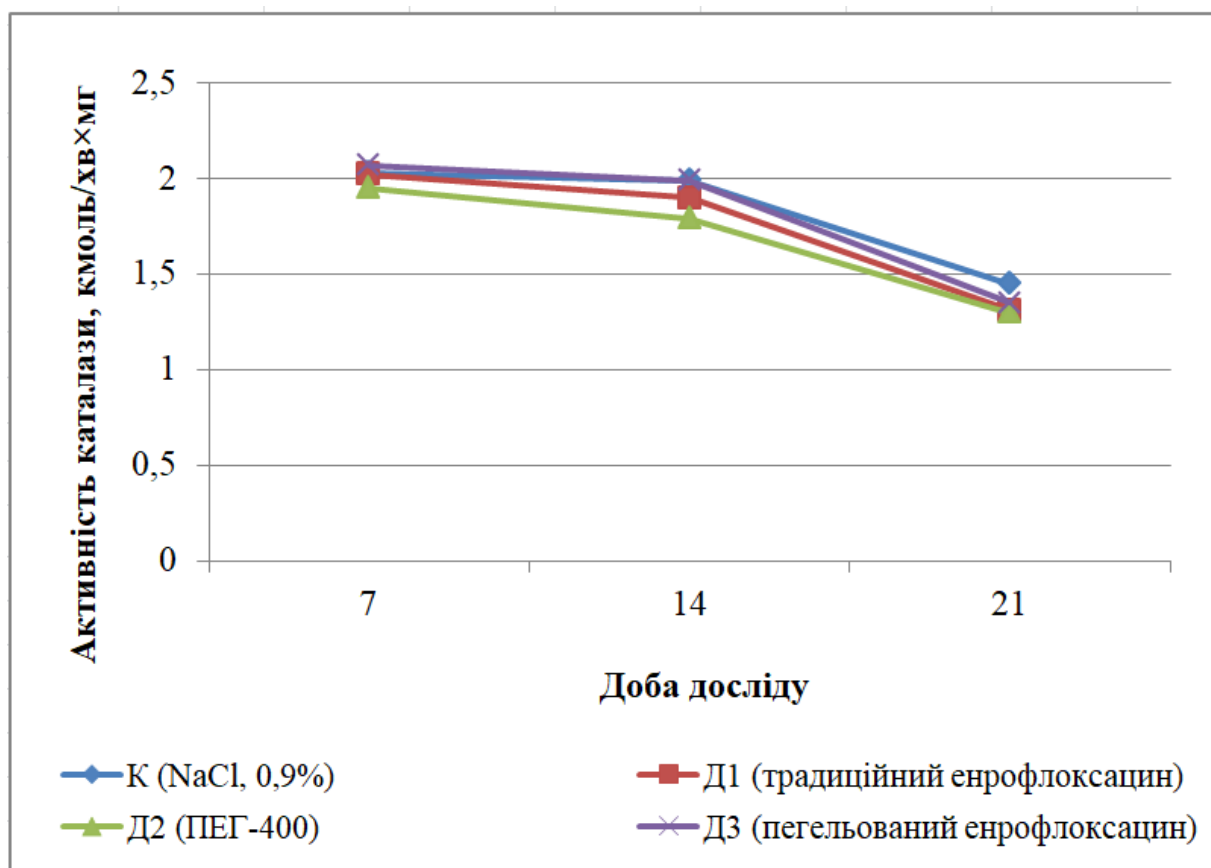


Рис. 7.3. Активність каталази у крові контрольної та дослідних груп щурів, кмоль/хв $\times$ мг гемоглобіну ($M \pm m$, $n=4$).

7.4. Активність глутатіонпероксидази у крові

При дослідженні активності глутатіонпероксидази (ГПО) у крові тварин встановлено (рис. 7.4), що на 7-му добу після закінчення введення препаратів, з дослідних груп найнижчі показники були зареєстровані у щурів, яким вводили суспензію традиційного антибіотика енрофлоксацину ($0,25 \pm 0,005$ мкмоль/хв $\times$ мгНб), а найвищі – у тих, яким задавали пегельований антибіотик енрофлоксацин ($0,31 \pm 0,011$ мкмоль/хв $\times$ мгНб).

Активність ГПО у крові всіх груп тварин на 14-ту добу дещо зростала, відносно першого дослідження, але трималася на одному рівні.

Активність глутатіонпероксидази у крові всіх груп щурів була максимальною на 21-ий день після введення досліджуваних речовин (рис. 7.4). У даний час, з дослідних груп найнижча активність ГПО була у крові тварин, яким вводили ПЕГ-400 ($0,66 \pm 0,012$ мкмоль/хв $\times$ мгНб), а найвищою – у тих, яким проводили ін'єкцію традиційного антибіотика енрофлоксацину ($0,77 \pm 0,049$ мкмоль/хв $\times$ мгНб). Активність ГПО у крові тварин, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, була на рівні контролю ($0,71 \pm 0,061$ та $0,72 \pm 0,049$ мкмоль/хв $\times$ мгНб, відповідно).

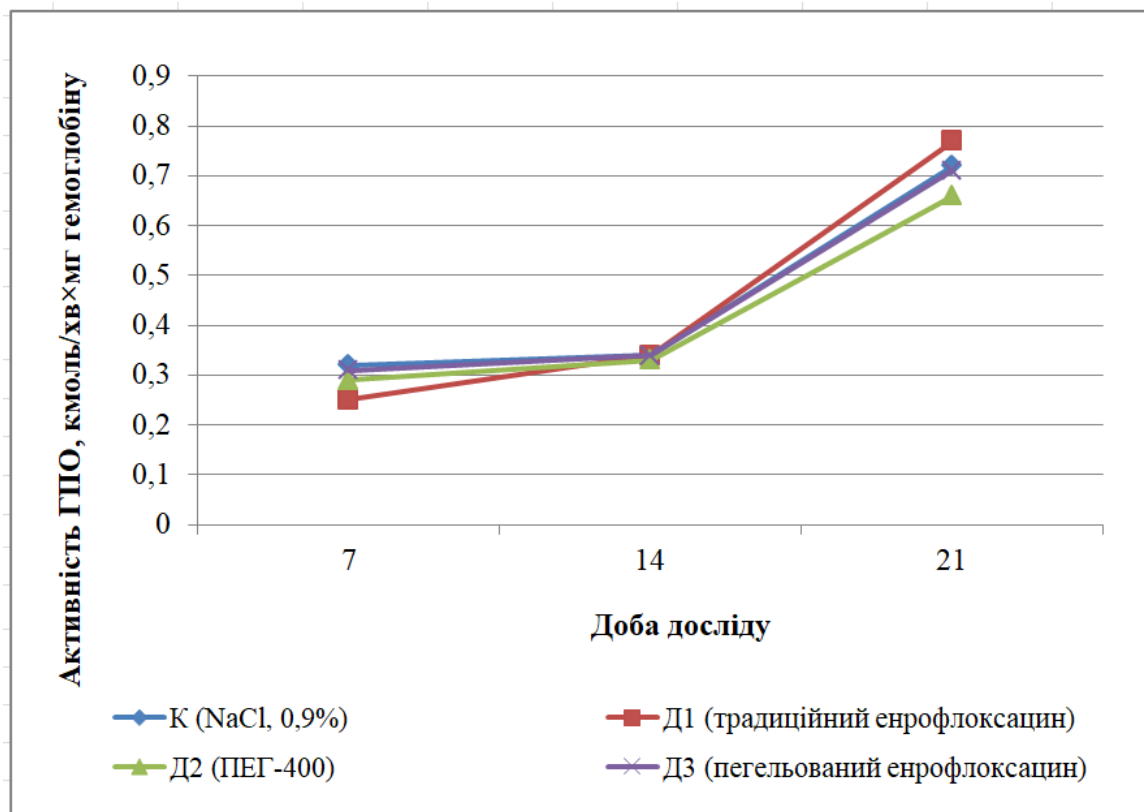


Рис. 7.4. Активність глутатіонпероксидази у крові контрольної та дослідних груп щурів, $\mu\text{моль/хв} \times \text{мг гемоглобіну}$ ($M \pm m$, $n=4$).

Висновки до розділу 7

1. Чотириразове внутрішньом'язове введення дослідним щурам антибіотика енрофлоксацину в традиційній формі сприяло накопиченню у крові вмісту ТБК-активних продуктів і зниженню активності ензимів антиоксидантного захисту (СОД, КАТ, ГПО) протягом 21-ої доби після останньої ін'єкції.

2. Пегелювання антибіотика енрофлоксацину призводило до стабілізації у крові вмісту ТБК-активних продуктів, а також активності СОД, каталази та ГПО, що слід розцінювати як гальмування процесів ПОЛ і фізіологічність перебігу антиоксидантного захисту організму.

Матеріали до цього розділу висвітлені у наукових публікаціях:

3. Zelenina, O.M., Vlizlo, V.V., Ostapiv, D.D., Samaryk, V.Ja., Dron, I.A., Kozak, M.P., Kuzmina, N.V., Chernushkin, B.O., Maksymovych, I.A., Leno, M.I., Rusyn, V.I., Prystupa, O.I., Fedorovych, V.L., Lukashchuk, B.O., Zinko, H.O. PEGylation of antibiotic enrofloxacin and its effects on the state of the antioxidant system in rats. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2021. 11(1), 202-208. (Web of Science).

7. Зеленіна О. М., Влізло В. В. Стан антиоксидантної системи у щурів за введення пегельованого енрофлоксацину. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні епідемічні виклики в концепції «Єдине здоров'я». Тернопіль. 2021. С. 23.

РОЗДІЛ 8

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН І СТРУКТУРА ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ ЗА ВВЕДЕННЯ ПЕГЕЛЬОВАНОГО ТА ТРАДИЦІЙНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ І ПЕГ-400

8.1. Вміст загального білірубіну у сироватці крові

При дослідженні крові дослідних тварин встановлено, що вміст загального білірубіну у сироватці на 7-му добу після закінчення введення досліджуваних препаратів був вищим від контрольних (рис. 8.1). Так, у контрольній групі щурів вміст загального білірубіну у крові складав $13,5 \pm 0,51$ мкмоль/л, а у дослідних, які отримували традиційний антибіотик енрофлораксин, – $16,1 \pm 0,37$ мкмоль/л і був вищим на 16 % ($P < 0,01$); у тих, яким вводили ПЕГ-400, – $17,0 \pm 0,27$ мкмоль/л, вищий на 21 % ($P < 0,001$); а за застосування пегельованого антибіотика енрофлораксину – $21,7 \pm 0,88$ мкмоль/л, або на 38 % ($P < 0,001$) перевищував контрольних.

Водночас, на 14-ту добу після останнього введення вміст загального білірубіну у сироватці крові всіх тварин, які були в експерименті, знижувався, порівняно з початком дослідження (рис. 8.1). Проте у дослідних групах ще залишався вищим, порівняно до контрольною ($5,2 \pm 0,07$ мкмоль/л), зокрема у першій ($11,7 \pm 0,17$ мкмоль/л) – на 56 % ($P < 0,001$), у другій ($12,1 \pm 0,25$ мкмоль/л) – на 57 % ($P < 0,001$) та у третій ($13,5 \pm 0,17$ мкмоль/л) на – 62 % ($P < 0,001$).

На 21-шу добу після закінчення ін'єкцій препаратів вміст загального білірубіну у сироватці крові всіх дослідних груп щурів знижувався ($P < 0,001$), порівняно з попереднім дослідженням (рис. 8.1), і був у першій ($9,0 \pm 0,13$ мкмоль/л) на 23 %, у другій ($8,3 \pm 0,19$ мкмоль/л) на 31 % і у третій

($9,2 \pm 0,14$ мкмоль/л) на 32 % вищим ($P < 0,001$), порівняно з контрольними ($6,2 \pm 0,12$ мкмоль/л).

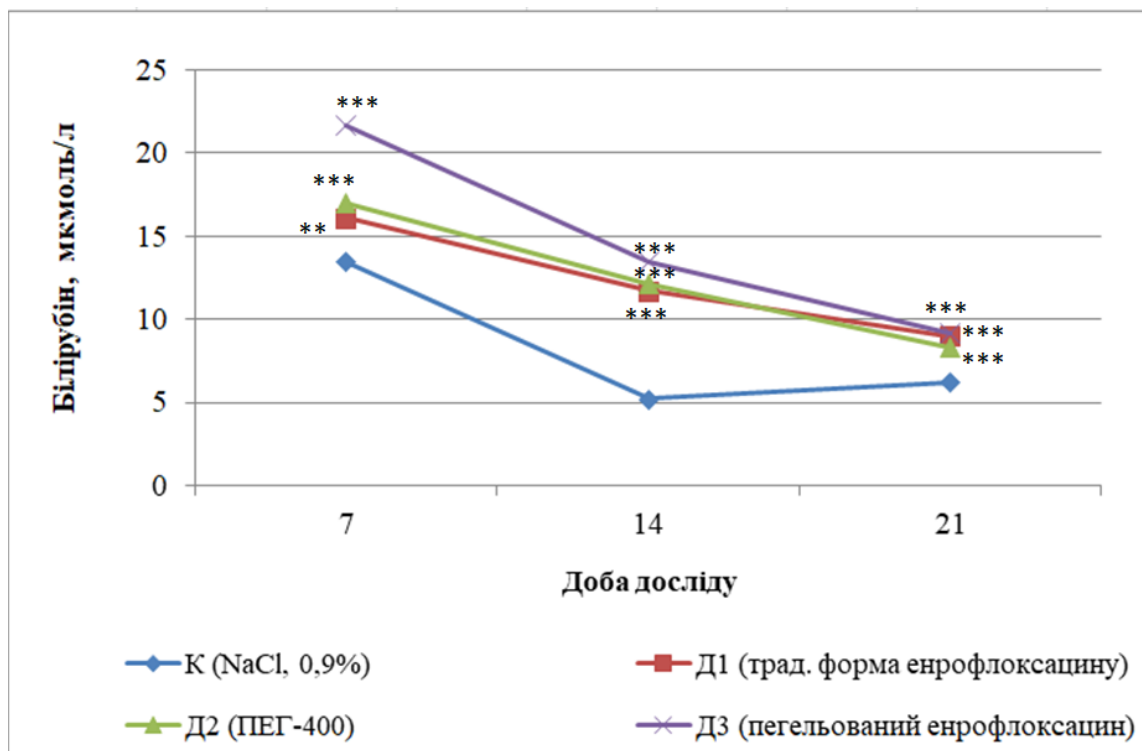


Рис. 8.1. Вміст білірубіну у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, мкмоль/л ($M \pm m$, $n=4$).

8.2. Вміст холестеролу у сироватці крові

Досліджуючи вміст холестеролу у сироватці крові піддослідних тварин, встановлено, що протягом проведення експерименту, його рівень мало відрізнявся між групами (рис. 8.2). Так, на 7-му добу після завершення введення препаратів вміст холестеролу у крові щурів перших двох дослідних груп ($2,9 \pm 0,07$ та $2,9 \pm 0,02$ ммоль/л, відповідно) був на рівні контрольної ($2,7 \pm 0,10$ ммоль/л), лише у тих, яким проводили ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлораксацину, вищим на 14,8 % ($P < 0,05$) і дорівнював $3,1 \pm 0,08$ ммоль/л.

На 14-ту та 21-шу доби по закінченню введення досліджуваних препаратів спостерігали зниження рівня холестеролу у сироватці крові всіх груп тварин, порівняно з 7-мою добою. Вміст холестеролу у крові третьої дослідної групи, яка отримувала пегельований антибіотик енрофлоксацин, на 14-ту добу був найвищим, що можна розцінювати як стабільність його синтезу у клітинах печінки [216]. Водночас, різниці показників холестеролу між іншими дослідними групами не було відмічено.

Через 21-шу добу після закінчення введення препаратів вміст холестеролу у сироватці крові не відрізнялися між тваринами, які були в експерименті, (рис. 8.2).

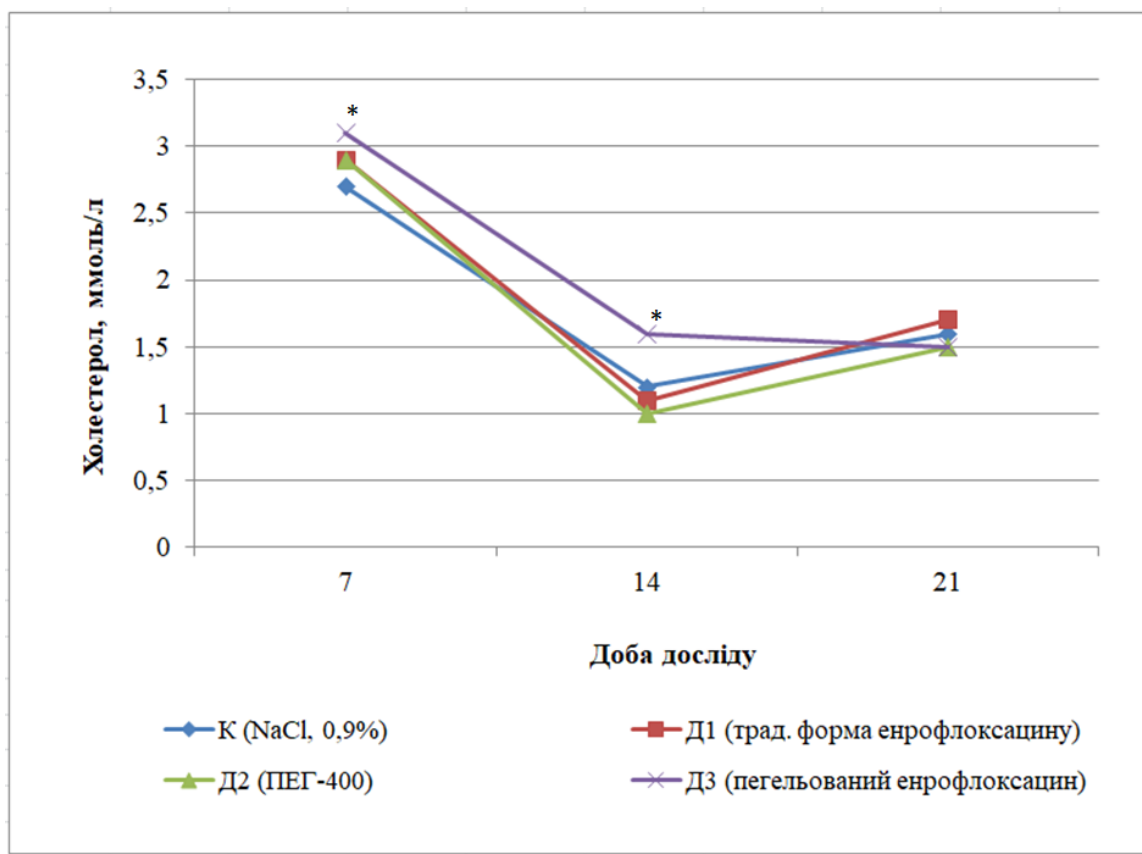


Рис. 8.2. Вміст холестеролу у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, ммоль/л ($M \pm m$, $n=4$).

8.3. Вміст загального протеїну у сироватці крові

При дослідженні вмісту загального протеїну у сироватці крові щурів встановлено (рис. 8.3), що на 7-му добу після закінчення введення антибіотика енрофлораксину у традиційній формі, він був вищим на 6,9 % ($71,6 \pm 1,64$ г/л; $P < 0,05$) від контрольних ($67,0 \pm 0,92$ г/л). У крові тварин, яким проводили ін'єкції ПЕГ-400, вміст загального протеїну був дещо нижчим ($63,4 \pm 0,68$ г/л), а у тих, яким вводили пегельований антибіотик енрофлораксин – встановлювали тенденцію до зростання ($69,3 \pm 1,02$ г/л) відносно контрольної групи.

На 14-ту добу по завершенню введення препаратів відмічено незначне підвищення вмісту загального протеїну у сироватці крові щурів, порівняно з попереднім дослідженням. Різницю з показниками контрольної групи ($72,1 \pm 0,96$ г/л) було встановлено також у тварин, яким вводили антибіотик енрофлораксин у традиційній формі ($81,6 \pm 1,15$ г/л; $P < 0,001$). У тих щурів, які отримували ПЕГ-400 ($72,2 \pm 1,17$ г/л) та пегельований антибіотик енрофлораксин ($72,9 \pm 0,76$ г/л), вміст загального протеїну був на рівні контрольних (рис. 8.3).

Через 21-ну добу після останньої ін'єкції препаратів спостерігався вірогідно ($P < 0,001$) вищий показник загального протеїну у сироватці крові всіх дослідних групах тварин ($74,7 \pm 1,26$ у першій, $74,3 \pm 0,65$ у другій та $79,4 \pm 0,88$ г/л у третій), порівняно з контрольною групою ($67,8 \pm 0,69$ г/л).

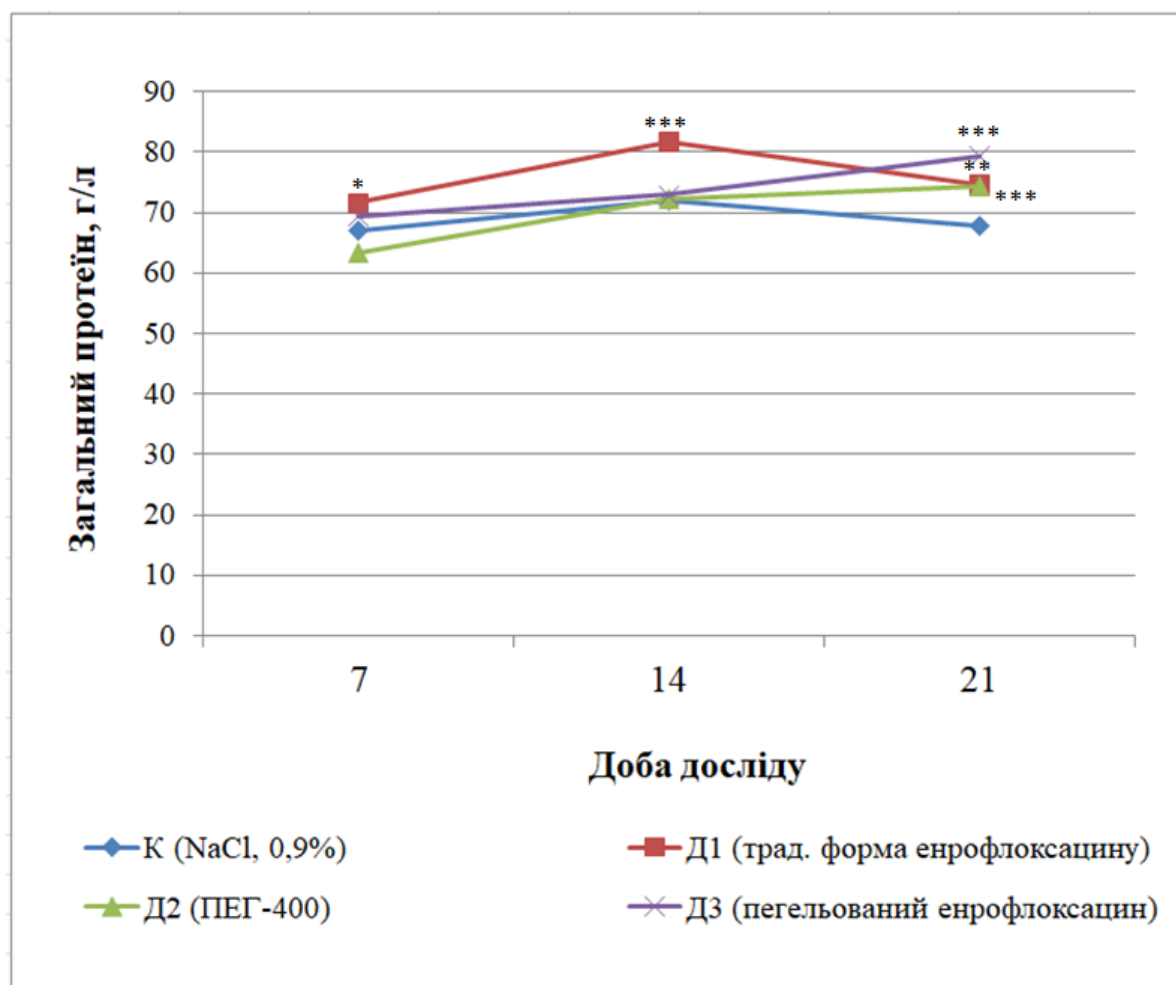


Рис. 8.3. Вміст загального протеїну в сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, г/л ($M \pm m$, $n=4$).

8.4. Вміст альбуміну у сироватці крові

Досліджуючи вміст альбуміну в сироватці крові щурів (рис. 8.4) на 7-му добу після закінчення введення препаратів, спостерігали вищі на 47,2 % ($P < 0,001$), порівняно з контрольною ($45,7 \pm 1,5$ г/л), показники у тварин, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин ($67,6 \pm 0,5$ г/л). У крові щурів, які отримували ін'єкції ПЕГ-400, вміст альбуміну ($41,5 \pm 0,7$ г/л) був нижчим на 9,2 % ($P < 0,05$), а за введення антибіотика енрофлоксацину в традиційній формі складав $48,8 \pm 0,9$ г/л і був дещо вищим, порівняно з контрольними, але нижчим показника третьої дослідної групи.

Через 14-ть діб по завершенню введення препаратів відзначено підвищення, порівняно з 7-ою добою, вмісту альбуміну у сироватці крові всіх груп тварин, крім тих, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин ($67,1 \pm 1,1$ г/л). Однак у даній групі щурів показники вмісту альбуміну у сироватці крові ще були вищими від контрольних ($52,3 \pm 1,5$ г/л) на 29,3 % ($P < 0,001$). У тварин другої дослідної групи, яка отримувала ПЕГ-400, вміст альбуміну у крові був дещо нижчим ($47,5 \pm 1,5$ г/л), а у тих, яким вводили традиційний антибіотик енрофлоксацин, – незначно вищим ($53,9 \pm 1,8$ г/л) від контрольних.

На 21-шу добу після закінчення ін'єкції препаратів спостерігали однакові показники альбуміну у сироватці крові контрольної ($47,2 \pm 1,3$ г/л), першої ($48,8 \pm 0,7$ г/л) та другої ($48,3 \pm 0,7$ г/л) дослідних труп, а у третій, яка отримувала пегельований антибіотик енрофлоксацин, його вміст був стабільним ($65,0 \pm 1,0$ г/л) і вищим на 37,7 % ($P < 0,001$), порівняно з контрольною (рис. 8.4).

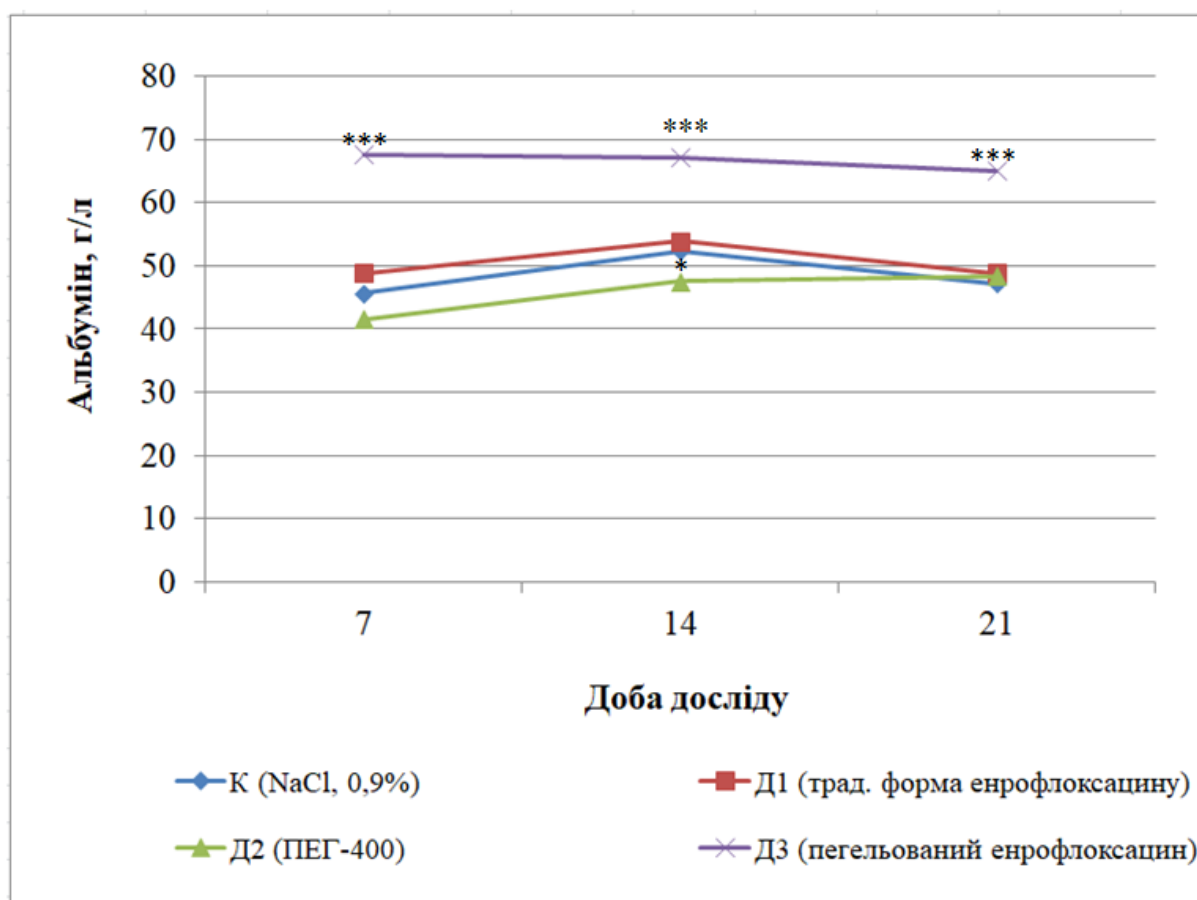


Рис. 8.4. Вміст альбуміну у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, г/л ($M \pm m$, $n=4$).

8.5. Вміст альфа-глобулінів у сироватці крові

Вміст альфа-глобулінів у сироватці крові на 7-му добу після закінчення введення препаратів у щурів контрольної групи складав $3,1 \pm 0,78$ г/л. У дослідних групах був нижчий відповідно у першій на 19,4 % ($2,5 \pm 0,19$ г/л), у другій ($1,8 \pm 0,04$ г/л) – на 41,9 % та у третій ($1,8 \pm 0,10$ г/л) – на 41,9 % (рис. 8.5).

На 14-ту добу після припинення введення препаратів вміст альфа-глобулінів у крові всіх дослідних груп був вищим від контрольної ($2,4 \pm 0,11$ г/л), зокрема у першій – на 51,2 % ($3,7 \pm 0,25$ г/л; $P < 0,01$), у другій – на 58,3 % ($3,8 \pm 0,21$; $P < 0,001$) і у третій – на 41,7 % ($3,4 \pm 0,32$ г/л; $P < 0,05$).

На 21-шу добу після останнього введення препаратів в сироватці крові щурів першої ($3,7 \pm 0,19$ г/л) та другої ($3,8 \pm 0,10$ г/л) дослідних груп вміст альфа-глобулінів залишався на 48,0 % ($P < 0,01$) і 52,0 % ($P < 0,001$) вищим, ніж в контролі ($2,5 \pm 0,22$ г/л). У сироватці крові тварин, які отримували пегельований антибіотик енрофлоксацин ($3,6 \pm 0,71$ г/л), вміст альфа-глобулінів був вищим порівняно з контрольними, але різниця між даними групами була невірогідною (рис. 8.5).

Слід зауважити, що вміст альфа-глобулінів у сироватці крові щурів з 7-мої до 21-шої доби досліджень знижувався у контрольній групі, але зростав у всіх дослідних. Зокрема, у крові тварин, яким проводили ін'єкції традиційної форми енрофлоксацину, кількість підвищувалася на 48 %, за введення ПЕГ-400 – на 111,1 % і пегельованого антибіотика енрофлоксацину – на 100 %.

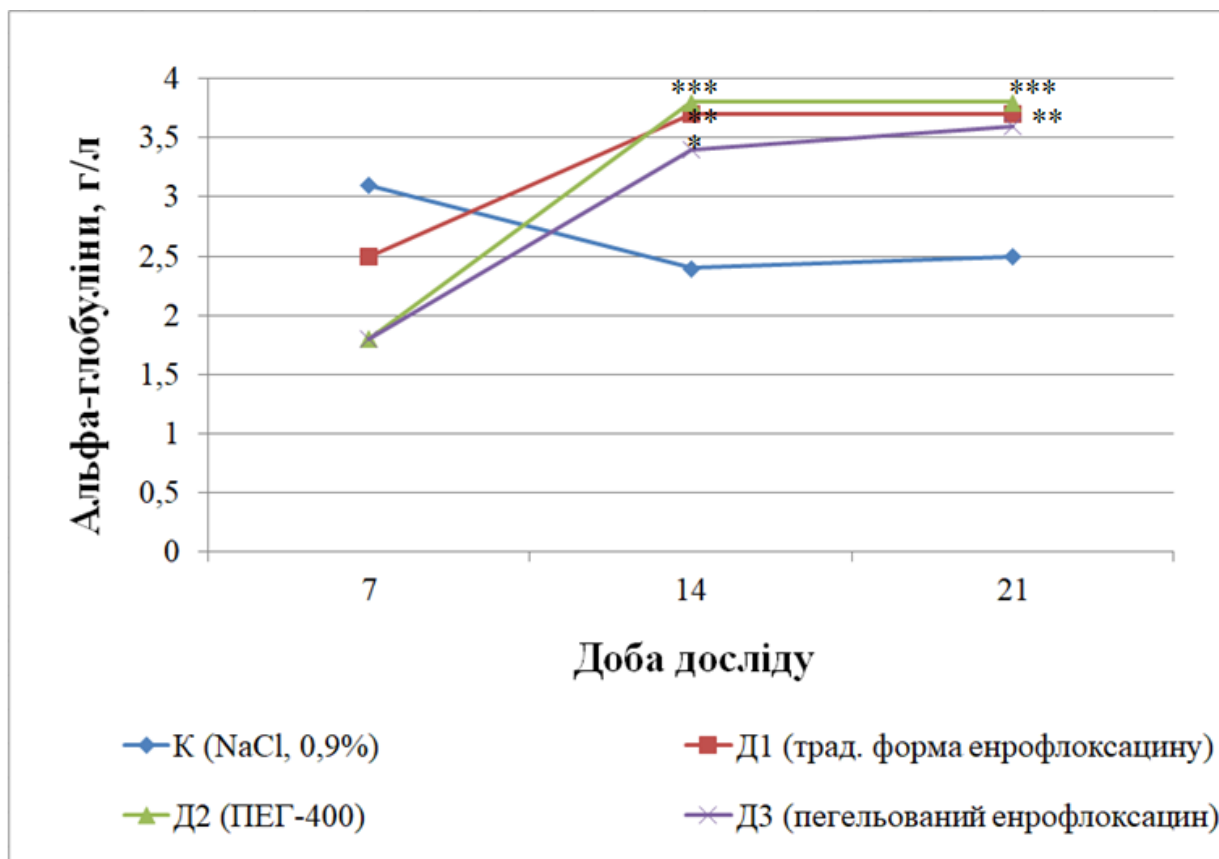


Рис. 8.5. Вміст альфа-глобулінів у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, г/л ($M \pm m$, $n=4$).

8.6. Вміст бета-глобулінів у сироватці крові

Вміст бета-глобулінів в сироватці крові щурів через 7-ім діб після введення препаратів у всіх дослідних групах був вищий, ніж у контрольній ($7,7 \pm 0,35$ г/л). Зокрема, у дослідній групі, яка отримувала традиційний антибіотик енрофлоксацин, кількість бета-глобулінів у сироватці крові дорівнювала $9,3 \pm 1,07$ г/л, у тих, яким вводили ПЕГ-400, – $8,0 \pm 0,36$, а за ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлоксацину – $8,2 \pm 0,44$ г/л, що було, відповідно, на 20,8; 3,9 та 6,5 % більше, ніж у контрольній (рис. 8.6).

На 14-ту і 21-шу доби дослідження встановлено, що у сироватці крові тварин контрольної групи вміст бета-глобулінової фракції майже не змінювався ($7,4 \pm 0,68$ – $8,2 \pm 0,78$ г/л). За введення щурам традиційної форми енрофлоксацину дослідження крові показало підвищення вмісту бета-глобулінів на 14-ту добу, порівняно з 7-ою добою, на 11,8 % ($10,4 \pm 0,45$ г/л) і ця величина майже не змінювався на 21-шу добу ($9,6 \pm 0,36$ г/л). У тварин, які отримували ПЕГ-400, зростання вмісту бета-глобулінів у сироватці крові при дослідженні на 14-ту добу було на 26,3 % ($10,1 \pm 0,51$ г/л), а у тих, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин на 25,6 % ($10,3 \pm 0,17$ г/л), порівняно з 7-ою добою.

На 21-шу добу досліджень показники вмісту бета-глобулінів у крові тварин всіх груп мало змінювалися (відповідно $8,2 \pm 0,78$ г/л у контрольній, $9,6 \pm 0,36$ у першій, $11,3 \pm 0,51$ у другій та $11,7 \pm 0,84$ г/л у третій дослідних). У вказані періоди вміст бета-глобулінів у контрольних щурів був нижчим від дослідних на 36,5–40,5 % ($P < 0,05$ – $P < 0,01$).

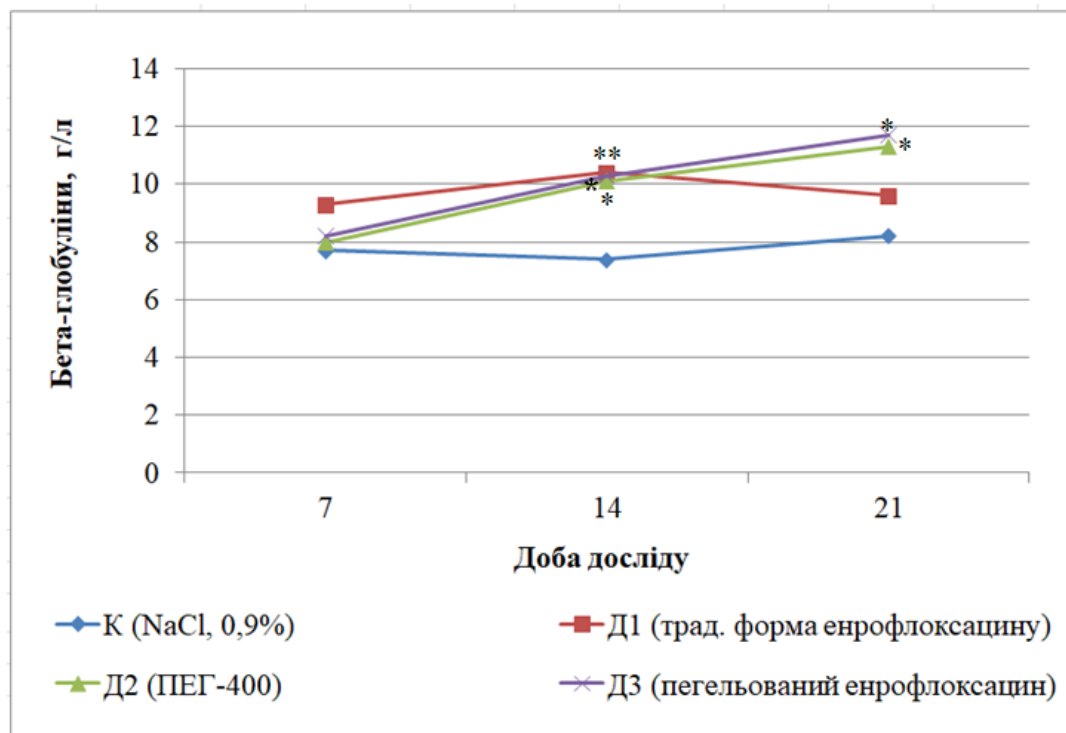


Рис. 8.6. Вміст бета-глобулінів у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, г/л ($M \pm m$, $n=4$).

8.7. Вміст гамма-глобулінів у сироватці крові

Вміст гамма-глобулінів у сироватці крові щурів через 7-ім діб після закінчення введення препаратів у контрольних тварин склав $10,5 \pm 0,41$ г/л і був на 4,8 % та 16,2 % нижчим, ніж у першій ($11,0 \pm 0,46$ г/л) та другій ($12,2 \pm 0,45$ г/л; $P < 0,05$) дослідних групах, відповідно. У тварин, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, показник дорівнював $10,5 \pm 0,41$ г/л і відповідав вмісту контрольних (рис.8.7).

На 14-ту добу досліджень у сироватці крові дослідних груп вміст гамма-глобулінової фракції був на 4,0–37,4 % вищим, порівняно з контрольною ($9,9 \pm 0,36$ г/л). При цьому, найбільший показник встановлено у тварин, які отримували традиційний антибіотик енрофлоксацин ($13,6 \pm 0,71$ г/л; $P < 0,01$).

Через 21-шу добу після введення препаратів у всіх дослідних групах тварин вміст гамма-глобулінів майже не відрізнявся та був вищим від контрольної: на 28 % у тих, яким вводили антибіотик енрофлоксацин у традиційній формі ($12,8 \pm 1,0$ г/л; $P < 0,05$), на 22 % за ін'єкції ПЕГ-400 ($12,2 \pm 0,87$ г/л) та на 25 % пегельованого антибіотика енрофлоксацину ($12,5 \pm 0,94$ г/л; $P < 0,05$).

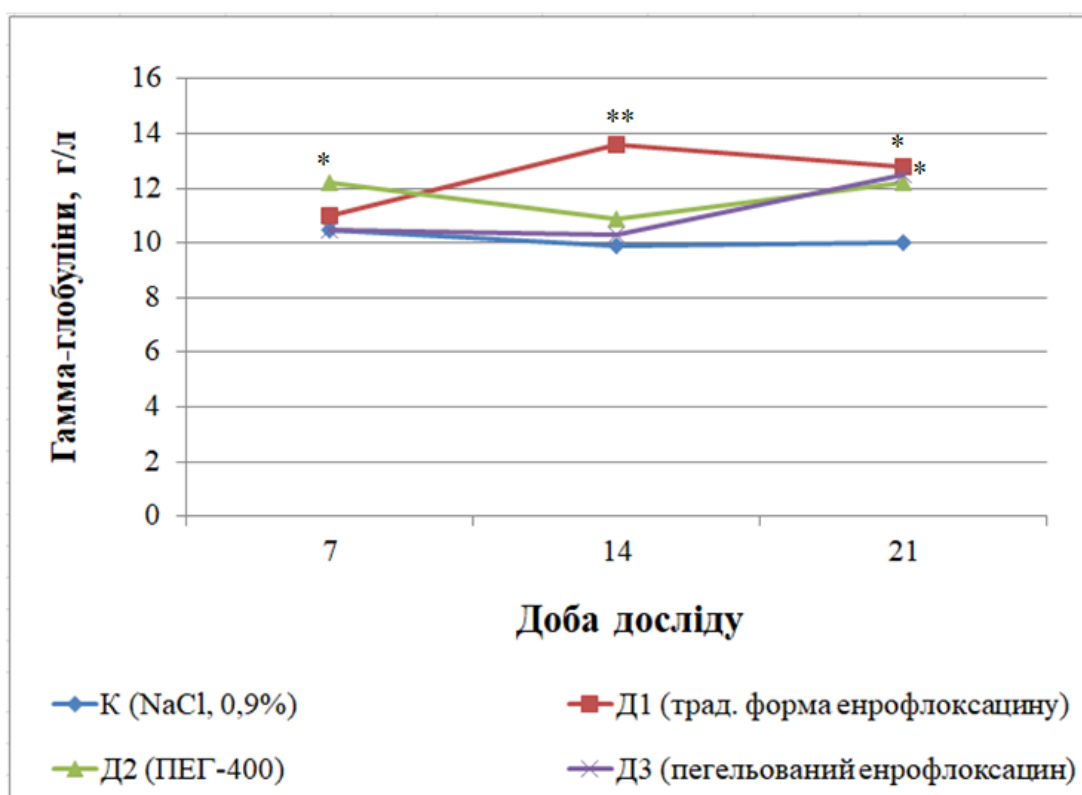


Рис. 8.7. Вміст гамма-глобулінів у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, г/л ($M \pm m$, $n=4$).

8.8. Альбуміно-глобуліновий коефіцієнт

Відношення альбумінів до глобулінів (альбуміно-глобуліновий коефіцієнт) мало відрізнялось між контрольними та дослідними тваринами на 7-му добу після останнього введення досліджуваних препаратів, коливаючись у межах від $1,9 \pm 0,01$ до $2,2 \pm 0,2$ (рис. 8.8).

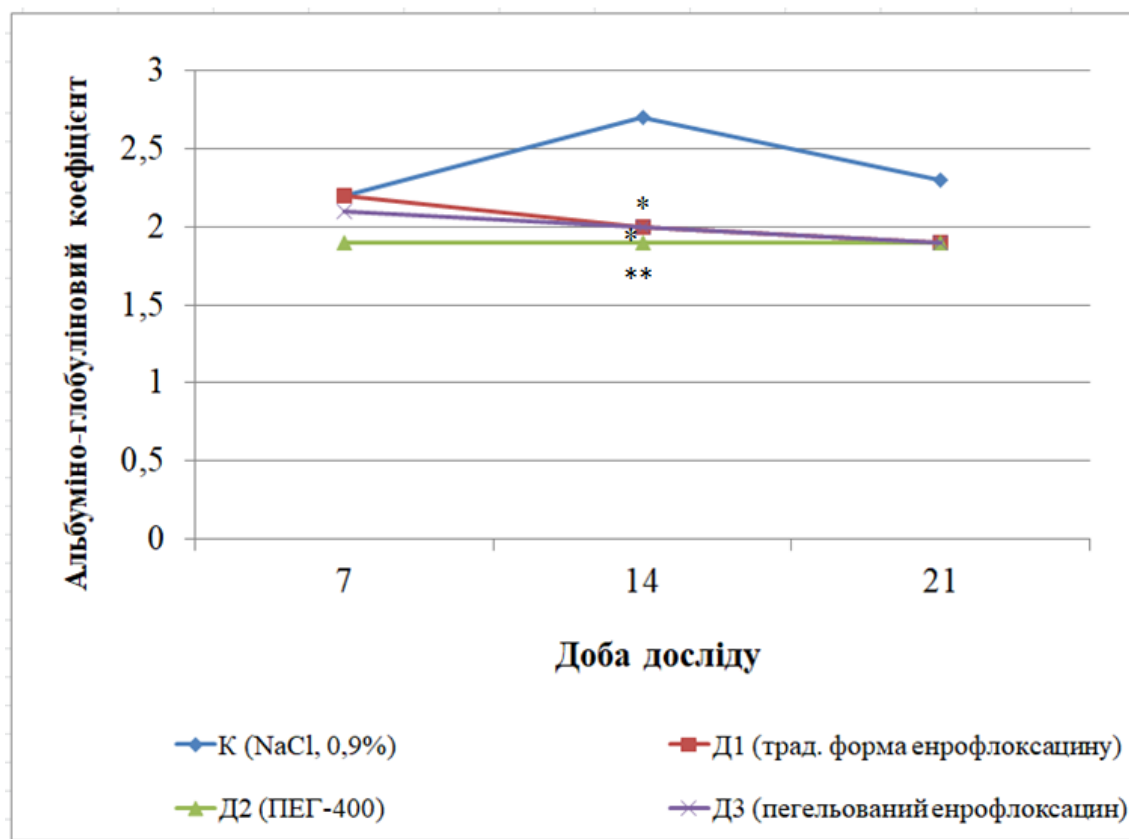


Рис. 8.8. Альбуміно-глобуліновий коефіцієнт контрольної та дослідних груп щурів ($M \pm m$, $n=4$).

На 14-ту добу досліджень відношення альбумінів до глобулінів було вищим у контрольних щурів ($2,7 \pm 0,2$), порівняно з дослідними (у першій $2,0 \pm 0,10$, $P < 0,05$; у другій $1,9 \pm 0,1$, $P < 0,01$ і у третій $2,0 \pm 0,1$, $P < 0,05$).

Альбуміно-глобуліновий коефіцієнт на 21-шу добу після закінчення введення препаратів вірогідно не відрізнявся між контрольними ($2,3 \pm 0,2$) та дослідними ($1,9 \pm 0,1$ показник на одному рівні у групах) тваринами (табл. 8.8).

8.9. Активність АЛАТ у сироватці крові

На 7-му добу після закінчення введення препаратів активність АЛАТ у сироватці крові щурів у двох перших дослідних груп ($142,0 \pm 1,10$ од/л,

149,8±1,87 од/л, відповідно), була на рівні контрольної (144,5±2,63 од/л). У тварин, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, активність АлАТ була нижчою на 9,8 % ($P < 0,01$) і складала 130,4±1,78 од/л (рис. 8.9).

На 14-ту добу після останньої ін'єкції досліджуваних речовин відмічали зниження активності АлАТ, порівняно з 7-мою добою, у контрольній групі (95,9±0,81 од/л) на 33,6 %, у другій дослідній (139,4±0,74 од/л) – на 6,9 %, у третій (86,1±0,83 од/л) – на 34,0 %. У першій дослідній групі активність ензиму у крові тварин залишилася майже на тому ж рівні (144,7±1,64 од/л). Порівнюючи показники активності АлАТ дослідних груп з контрольною, встановлено, що рівень активності ензиму у крові щурів, які отримували традиційну форму антибіотика енрофлоксацину та ПЕГ-400, був вищим ($P < 0,001$) на 51 % (144,7±1,64 од/л) та 45 % (139,4±0,74 од/л), відповідно. Водночас, в дослідній групі тварин, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, встановлено вірогідно (на 10,2 %, $P < 0,001$) нижчу активність АлАТ (86,1±0,83 од/л).

Через 21-шу добу після закінчення введення препаратів, порівняно з 14-ю добою, спостерігали зниження показника у крові всіх груп тварин (у контрольній до 74,6±0,95 од/л, або на 22,2 %; у першій дослідній до 117,8±1,06 – на 18,6 %; у другій до 133,0±0,61 – на 7,6 % та у третій до 70,50±0,56 од/л – на 18,1 %). Встановлено вірогідно вищу ($P < 0,001$) активність АлАТ у сироватці крові першої та другої дослідних груп відносно контрольної (рис. 8.9). Зокрема, у щурів, яким вводили антибіотик енрофлоксацин у традиційній формі, активність ензиму була вищою на 57,9 % (117,8±1,06 од/л), а у тих, які отримували ПЕГ-400, – на 78,3 % (133,0±0,61 од/л). У групі тварин, яким проводили ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлоксацину, активність АлАТ у сироватці крові була нижчою (70,50±0,56 од/л) на 5,5 % ($P < 0,01$) від контрольних.

При цьому, активність АлАТ у сироватці крові щурів, які отримували субстанцію традиційного антибіотика енрофлоксацину, трималася високою

протягом трьох тижнів експерименту, що може свідчити про ураження клітин печінки.

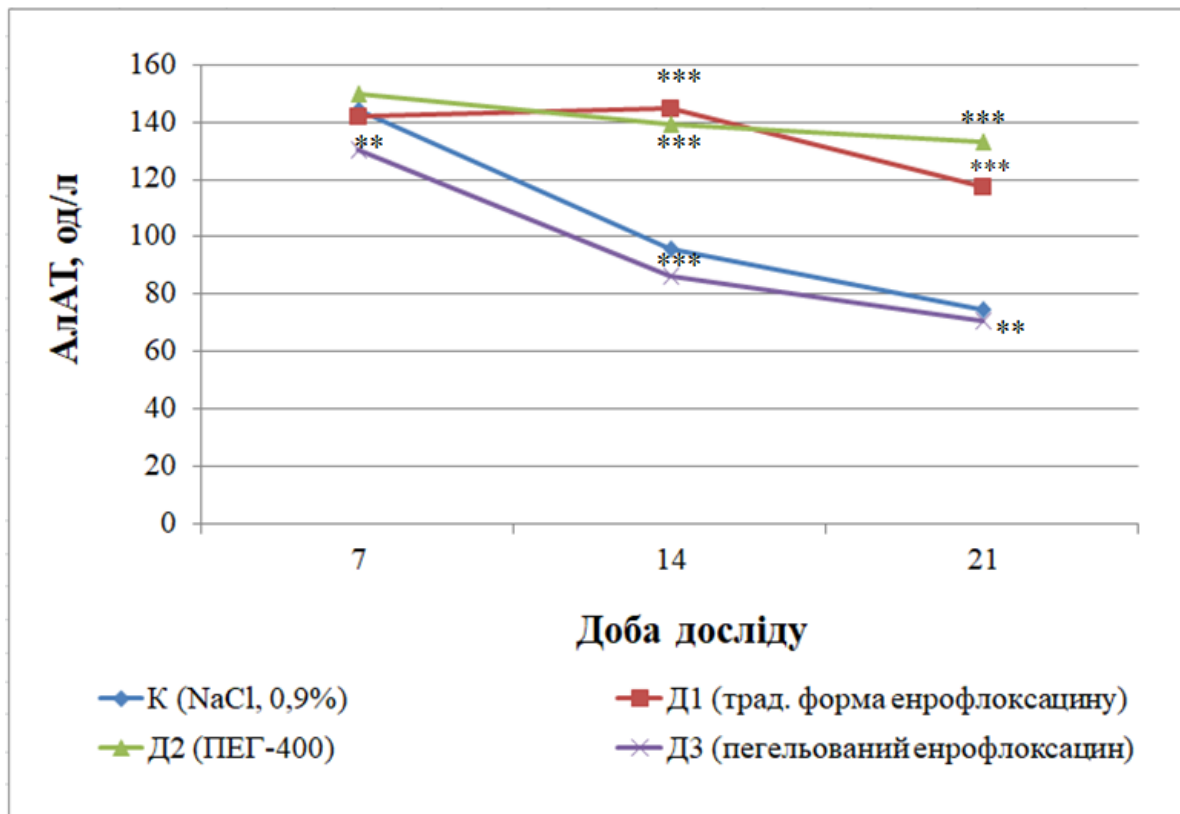


Рис. 8.9. Активність АЛАТ у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, од/л ($M \pm m$, $n=4$).

8.10. Активність АсАТ у сироватці крові

На 7-му добу після закінчення ін'єкцій досліджуваних речовин тваринам активність АсАТ у сироватці крові другої та третьої дослідних груп була вищою у ($P < 0,001$), порівняно з контрольними (рис. 8.10). Так, у крові щурів, які отримували ПЕГ-400, активність АсАТ була вищою на 24 % ($113,8 \pm 1,62$ од/л), а у тих, яким вводили пегельований антибіотик енрофлораксацин – на 27 % ($117,9 \pm 2,60$ од/л). Водночас, активність АсАТ у сироватці крові щурів, які отримували традиційний антибіотик енрофлораксацин, активність ензиму ($88,5 \pm 0,74$ од/л) була на рівні контрольної

($86,3 \pm 2,48$ од/л). Очевидно, що зростання активності АсАТ у сироватці крові щурів, яким вводили ПЕГ-400 і комплекс ПЕГ-400 з антибіотиком енрофлораксацином, може бути пов'язано з активним проникненням даних речовин у клітини і мітохондрії, де даний ензим локалізується. Відповідно, це може проявлятися підвищеним виходом АсАТ через мембрани клітин і надходженням у кров'яне русло.

Активність АсАТ у крові всіх досліджуваних тварин на 14-ту добу підвищувалась, порівняно з першим дослідженням (рис. 8.10). При цьому, максимальна величина активності встановлена за введення традиційної форми антибіотика енрофлораксацину ($153,9 \pm 1,45$ од/л), дещо нижчі та майже однакові показники були у другій ($139,1 \pm 1,65$ од/л) та третій ($137,8 \pm 1,19$ од/л) дослідних групах. Рівень активності АсАТ у сироватці крові дослідних щурів був ще вірогідно вищим ($P < 0,01 - 0,001$), порівняно з контрольними ($129,4 \pm 0,96$ од/л).

Активність АсАТ у сироватці крові на 21-шу добу після введення препаратів тваринам була максимальною за використання ПЕГ-400 ($173,5 \pm 1,44$ од/л), дещо нижча за введення традиційного антибіотика енрофлораксацину ($157,8 \pm 2,33$ од/л) і найменша за отримання пегельованого антибіотика енрофлораксацину ($149,2 \pm 1,92$ од/л).

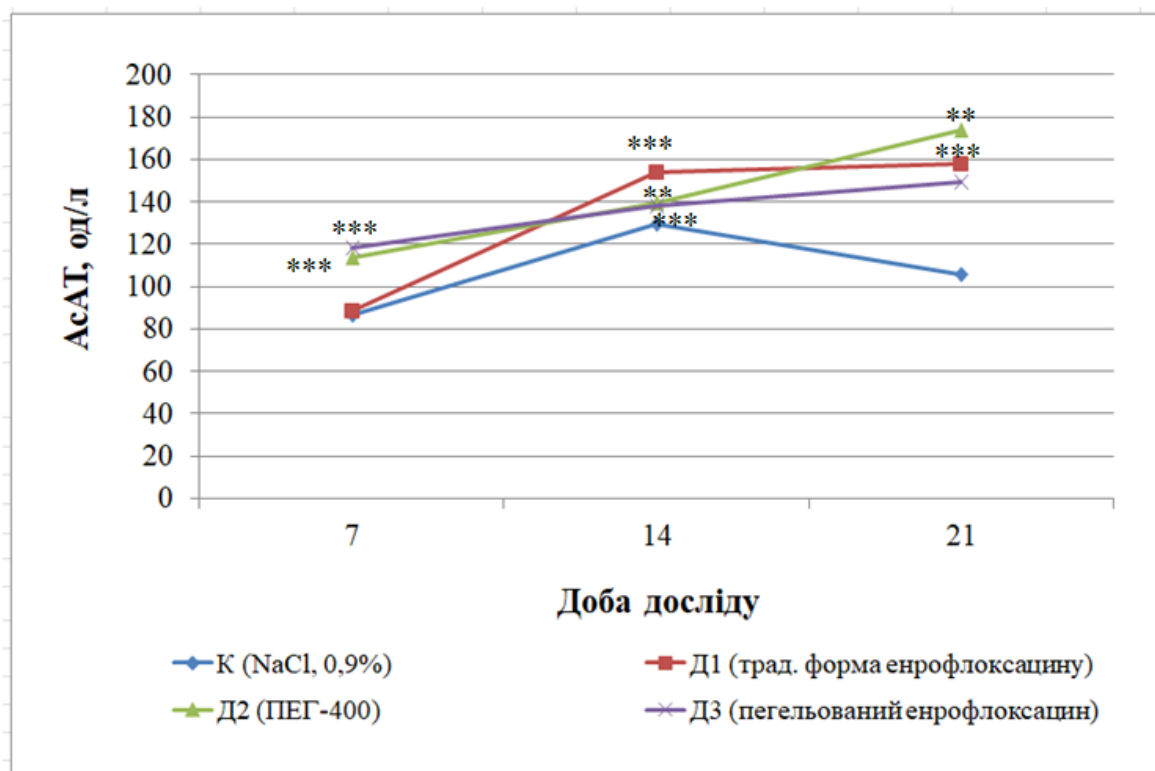


Рис. 8.10. Активність АсАТ у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, од/л ($M \pm m$, $n=4$).

За динамікою активності АЛАТ та АсАТ в крові тварин можна зробити висновок, що відновлення структури клітин печінки проходить швидше у щурів, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, порівняно з традиційною субстанцією.

8.11. Коефіцієнт де Рітиса

Нами встановлено, що коефіцієнт де Рітиса на 7-му добу після закінчення введення препаратів (рис. 8.11), був вищим ($P < 0,001$) у дослідних групах щурів (у першій на 20 %, другій на 38 %, третій на 48 %), порівняно з контрольною ($0,48 \pm 0,02$).

На 14-ту добу після початку введення препаратів у крові щурів зростала активність АсАТ та знижувалася АлАТ, тому коефіцієнт де Рітиса у всіх досліджуваних групах щурів продовжував бути високим (рис. 8.11).

Величина коефіцієнту де Рітиса на 21-шу добу дослідів була найвищою протягом досліджень тварин. У тварин першої дослідної групи груп відношення АсАТ/АлАТ становило $1,28 \pm 0,8$, у другій – $1,30 \pm 0,00$, у третій – $2,10 \pm 0,05$ проти $1,40 \pm 0,06$ у контрольній.

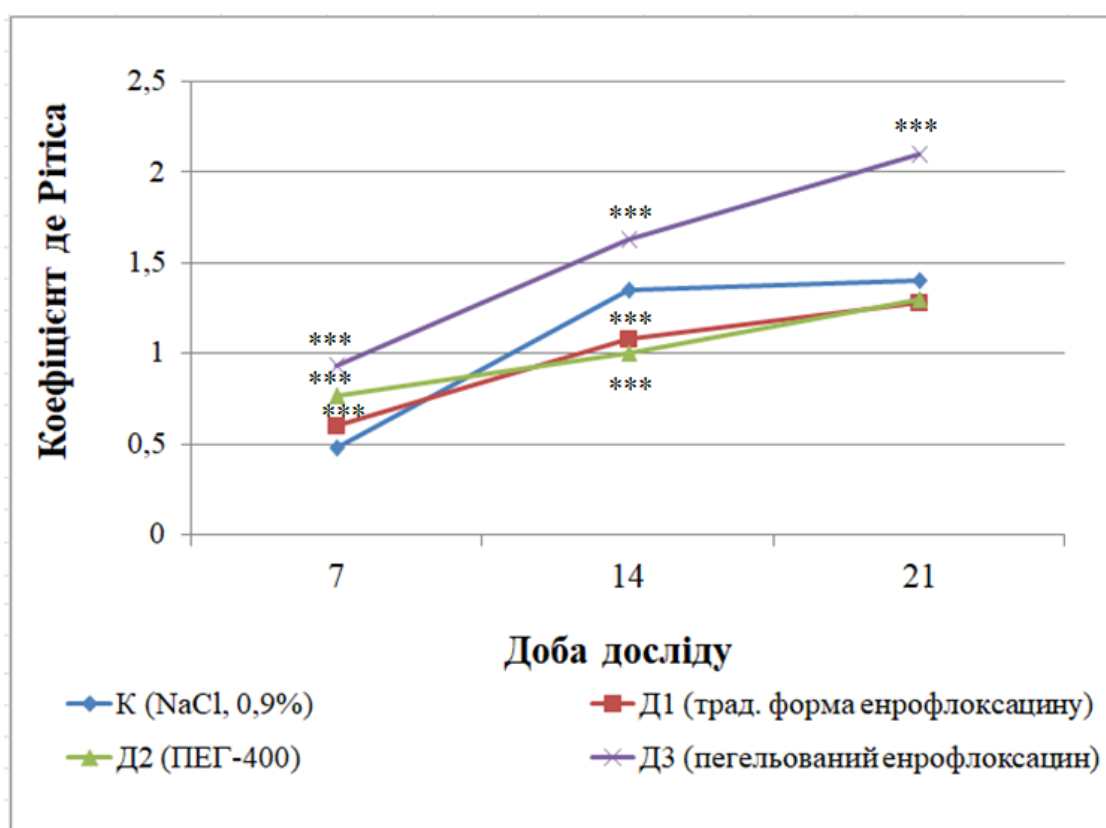


Рис. 8.11. Коефіцієнт де Рітиса у контрольній та дослідних групах щурів ($M \pm m$, $n=4$).

8.12. Активність ГГТП у сироватці крові

Через 7-му днів після останнього введення препаратів активність ГГТП у сироватці крові тварин всіх дослідних груп була вищою, порівняно з

контрольною (рис. 8.12). Зокрема, у крові тварин першої дослідної групи активність ГГТП складала $6,2 \pm 0,11$ од/л, другої – $8,9 \pm 0,24$ та третьої – $7,6 \pm 0,13$ од/л і переважала контрольну групу ($5,7 \pm 0,15$ од/л) на 8,8 % ($P < 0,05$), 56,1 % ($P < 0,001$) та 33,3 % ($P < 0,001$), відповідно.

Через 14-ту днів після закінчення введення досліджуваних речовин активність ГГТП у сироватці крові щурів, яким вводили традиційний антибіотик енрофлоксацин ($4,3 \pm 0,16$ од/л), ще була вищою на 19,4 % ($P < 0,01$) від контрольних ($3,6 \pm 0,05$ од/л). Водночас, у сироватці крові щурів, які отримували ін'єкцію ПЕГ-400, активність ГГТП у крові ($3,7 \pm 0,10$ од/л) не відрізнялася від контрольних, а у тих, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин ($1,6 \pm 0,14$ од/л) – була найнижчою ($P < 0,001$).

Через три тижні після останнього введення препаратів активність ГГТП у сироватці крові щурів дослідних груп була нижчою ($P < 0,05 - 0,001$), порівняно з контрольною ($6,3 \pm 0,17$ од/л), а найнижчий рівень активності ензиму ($P < 0,001$) встановлено за внутрішньом'язової ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлоксацину ($1,8 \pm 0,10$ од/л).

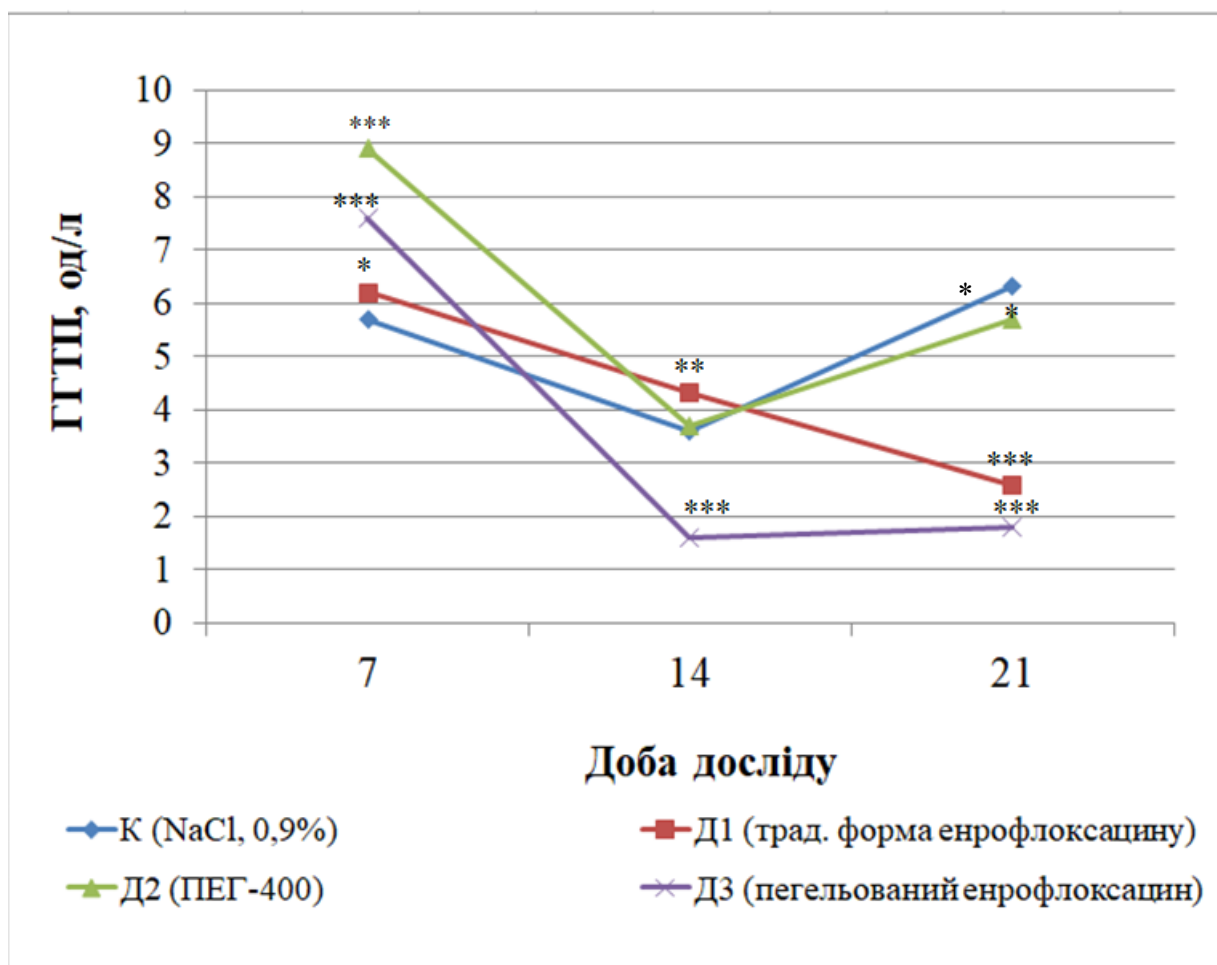


Рис. 8.12. Активність ГГТП у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, од/л ($M \pm m$, $n=4$).

8.13. Активність ЛФ у сироватці крові

На 7-му день після закінчення введення досліджуваних препаратів активність ЛФ у сироватці крові контрольних тварин ($2100,5 \pm 30,4$ од/л) була вищою ($P < 0,001$) від всіх трьох дослідних груп (рис. 8.13). Так, у крові щурів, які отримували традиційний антибіотик енрофлоксацин, активність ЛФ була нижчою на 14,7 % ($1792,0 \pm 6,8$ од/л), у тих, яким вводили ПЕГ-400, – на 24,1% ($1594,3 \pm 16,0$) і за ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлоксацину – на 13,0 % ($1827,8 \pm 13,6$ од/л).

Через 14-ть діб, порівняно з 7-мою добою, спостерігали зниження активності ензиму у крові всіх групах тварин. Показники активності ЛФ у крові тварин, які отримували традиційний антибіотик енрофлоксацин ($1118,5 \pm 14,0$ од/л) і ПЕГ-400 ($1339,3 \pm 7,7$ од/л), були вищі від контрольних ($668,8 \pm 16,0$ од/л) на 67,2 % ($P < 0,001$) та 100,3 % ($P < 0,001$), відповідно. У групі тварин, які отримували пегельований антибіотик енрофлоксацин, активність ензиму була найнижчою ($636,00 \pm 5,4$ од/л), або на 4,9 %.

На 21-шу добу після закінчення введення досліджуваних речовин, порівняно з 14-тою добою, встановлено підвищення активності лужної фосфатази у всіх груп тварин, крім тих, яким вводили ПЕГ-400 (рис. 8.13). По відношенню до групи контролю ($872,3 \pm 10,2$ од/л), показники активності ЛФ у щурів, яким вводили енрофлоксацин у традиційній формі ($1147,8 \pm 2,9$ од/л) та ПЕГ-400 ($1262,8 \pm 13,3$), були вірогідно ($P < 0,001$) вищими. Рівень активності ЛФ у крові тварин, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, був протягом дослідження на рівні контрольної групи ($849,5 \pm 14,8$ од/л) і нижчим від інших двох дослідних груп щурів.

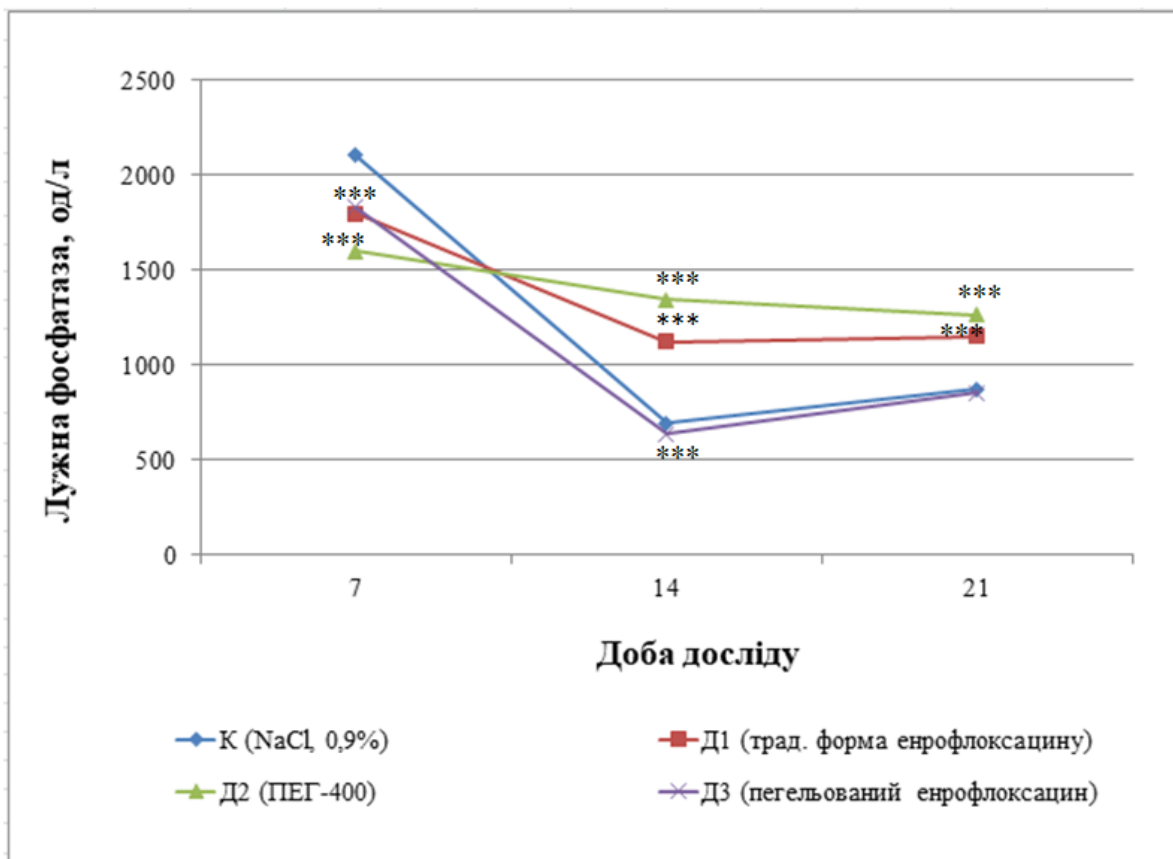


Рис. 8.13. Активність лужної фосфатази у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, од/л ($M \pm m$, $n=4$).

8.14. Гістологічне дослідження тканин печінки

При гістологічному дослідженні тканин печінки встановлено, що у щурів контрольної групи капсула була у вигляді тонкого прошарку волокнистої сполучної тканини, вкритого ззовні мезотелієм. Характерним був поділ печінки на часточки за рахунок волокнистої сполучної тканини. У міжчасточковій сполучній тканині простежувалися артерії, вени та жовчні протоки, а на окремих ділянках – лімфатичні судини. Діаметр артерій менший за діаметр вен, однак стінка артерій, за рахунок добре розвинутого м'язового шару більш товста. Синусоїдні капіляри проходили між тяжами гепатоцитів і зливалися в центральну вену. Стінка гемокапілярів була побудована з ендотеліоцитів, серед яких диференціювали зірчасті макрофаги.

Між базальним краєм ендотеліоцитів та васкулярним гепатоцитів простежували простір Діссе. Строма в середині часточок диференціювалася слабо, була побудована з пухкої сполучної тканини, в якій переважали фіброцити, фібробласти, гістіоцити та незначна кількість волокон. Гепатоцити мали характерне розташування у вигляді тяжів печінкових клітин, так званих печінкових пластинок, що радіально розходилися від центральної вени (рис. 8.14). З біліарної поверхні гепатоцити утворювали за рахунок плазмолемі жовчні капіляри. Колір цитоплазми гепатоцитів темно рожевий, у кожній клітині було добре видно одне, а інколи й два ядра округлої форми. У каріоплазмі ядра було ядерце. Крім цього, зустрічалися клітини, в яких з внутрішньої сторони оболонки ядра, а інколи й по всій каріоплазмі розташовувалися брилки гетерохроматину.

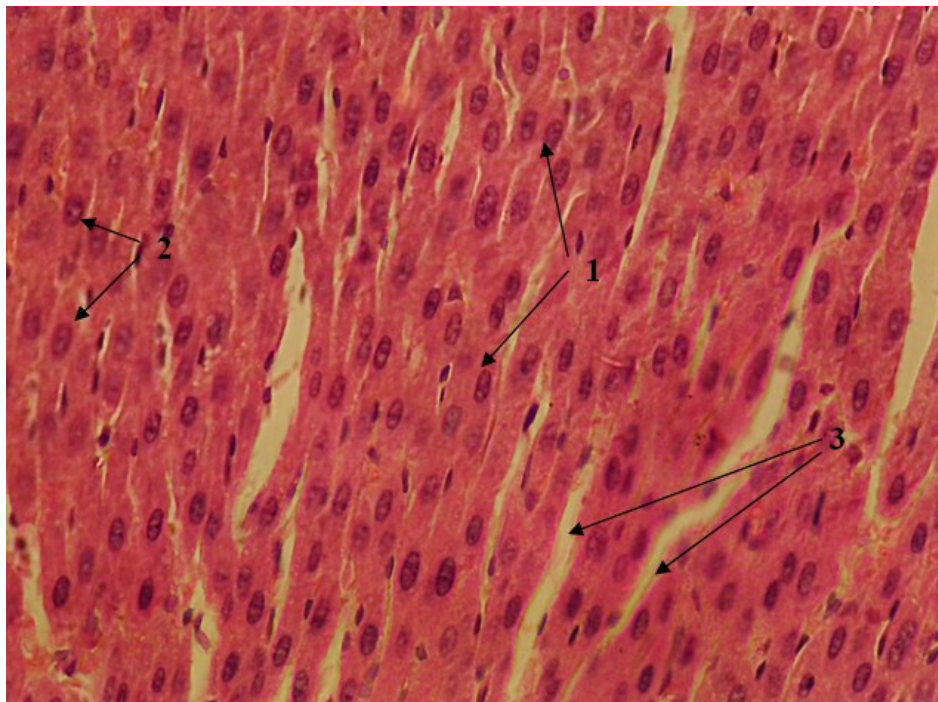


Рис. 8.14. Фрагмент гістологічного препарату печінки щура контрольної групи через 7-ім діб після введення фізіологічного розчину.

Примітки: 1 – радіальне розташування гепатоцитів; 2 – гепатоцити; 3 – просвіти синусоїдальних капілярів (гемокapілярів). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення $\times 640$.

У печінці тварин, які отримували традиційний антибіотик енрофлоксацин, на 7-му добу після закінчення ін'єкцій встановлено ділянки з ознаками зернистої дистрофії паренхіми. Гепатоцити були з ознаками дисконкомплексції – розміщені окремими групами. Встановлювали лізис та пікноз ядер, останні були менш інтенсивно забарвлені, порівняно з гепатоцитами печінки тварин групи контролю. У полі зору зустрічалися осередки, в яких контури клітин ледь простежувалися (групки до 6 гепатоцитів), ядра були у вигляді нечітких базофільних плям, або взагалі відсутні. Вище зазначені зміни характерні для паранекрозу та некрозу паренхіми печінки (рис. 8.15).

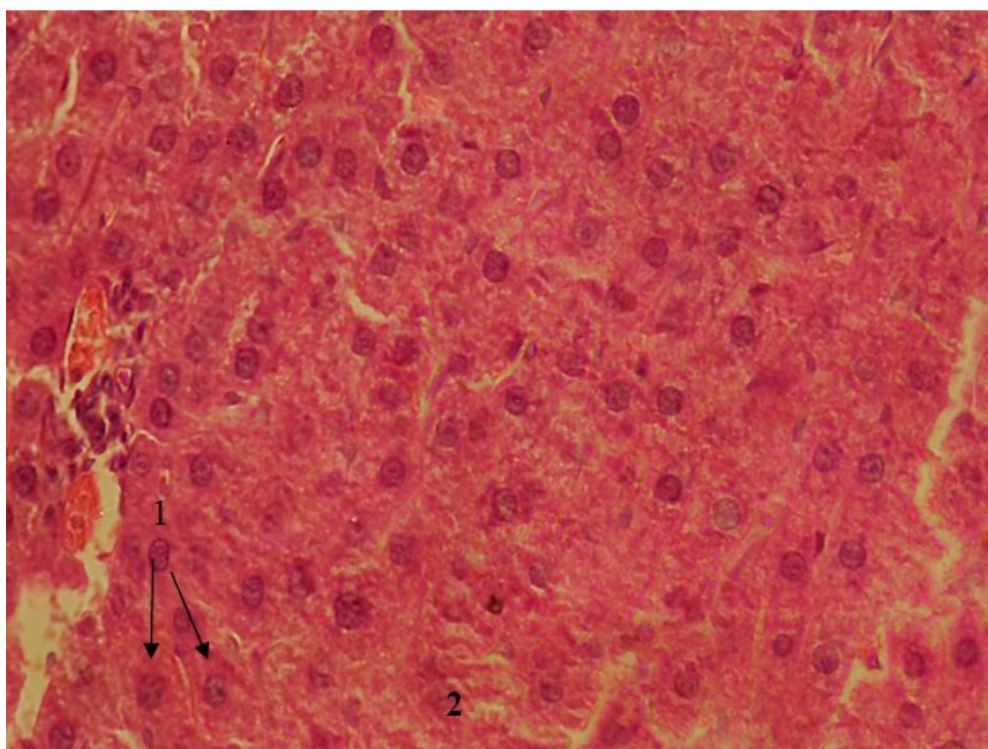


Рис. 8.15. Фрагмент гістологічного препарату печінки щура через 7-ім діб після введення традиційної форми антибіотика енрофлоксацину.

Примітки: 1 – гепатоцити з ознаками зернистої дистрофії; 2 – гепатоцити з ознаками лізису, паранекрозу та некрозу. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення $\times 640$.

На 14-тий день після закінчення введення традиційного антибіотика енрофлоксацину, крім ознак зернистої дистрофії зареєстровано мікровогнища зі змінами характерними для жирової декомпозиції гепатоцитів. Залежно від ступеня ураження клітини були збільшені в об'ємі. Патологічні зміни клітин печінки починалися з периферії часточки. Спостерігали клітини, в яких цитоплазма набувала вигляду нитчастих структур, спрямованих до центру гепатоцита, де розташовувалось ядро (рис. 8.16).

При останньому дослідженні на 21-шу добу характерними було зменшення об'єму та підвищення базофільності ядер в патологічно змінених гепатоцитах. У ділянках паранекрозу та некрозу гістоструктура та цитоархітектоніка внутрішньочасточкової будови печінки не простежувалася, контури клітин та їх ядер були мало помітні або взагалі відсутніми. Гепатоцити зливалися в конгломерати по 5–9 клітин, набували дифузного червоно-рожевого забарвлення. Площа та ступінь дистрофічних змін в різних тварин на окремих ділянках печінки мали свої відмінності.

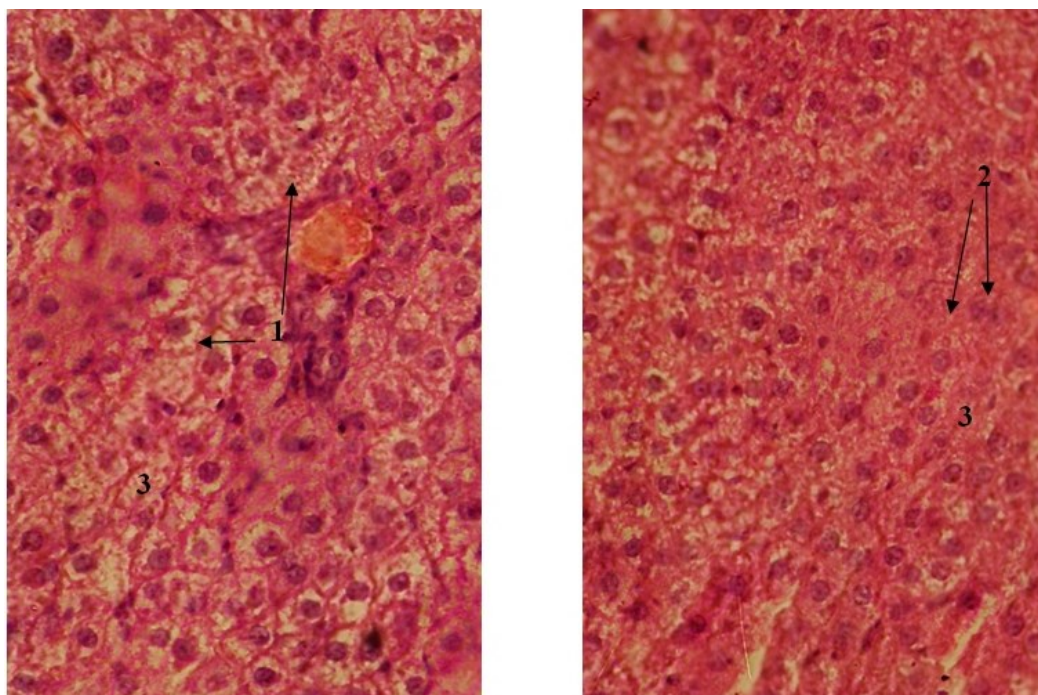


Рис. 8.16. Фрагмент гістологічного препарату печінки щура на 14-ту та 21-шу доби після введення традиційної форми антибіотика енрофлораксацину.

Примітки: 1 – гепатоцити з ознаками жирової декомпозиції; 2 – лізис гепатоцитів; 3 – гепатоцити з ознаками паранекрозу та некрозу. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення $\times 640$.

У тварин дослідної групи, яка отримувала ПЕГ-400, до морфологічних змін печінки на 7-му добу експерименту можна віднести кровонаповнення центральної вени та синусоїдальних гемокапілярів (рис. 8.17). На 14-ту та 21-шу діб експерименту структура клітин печінки була ідентичною з тваринами контрольної групи.

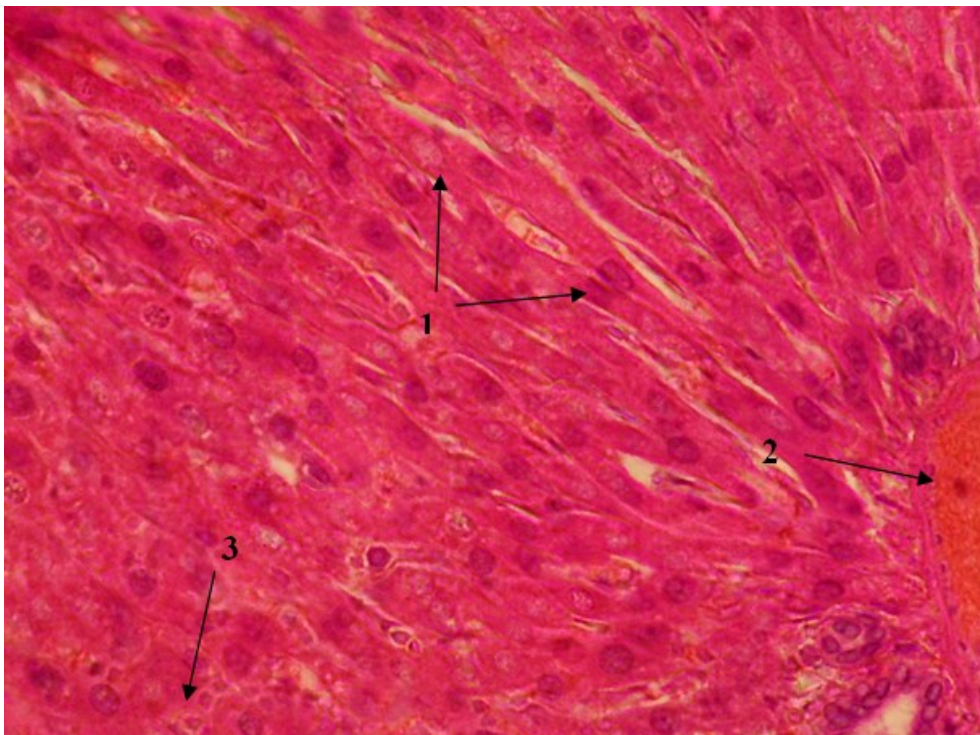


Рис. 8.17. Фрагмент гістологічного препарату печінки щура через 7-ім діб після введення ПЕГ-400.

Примітки: 1 – радіальне розташування гепатоцитів; 2 – кровонаповнення центральної вени; 3 – еритроцити в просвіті гемокапілярів. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення $\times 640$.

Дослідженням печінки у тварин, яким вводили пегельований антибіотик енрофлосацин, на 7-му добу експерименту встановлено, що в окремих ділянках органу цитоплазма гепатоцитів мала сітчасту структуру, забарвлена в темно-рожевий колір. У клітинах було добре видно одне, а інколи й два ядра з ядерцями в каріоплазмі. Крім цього, зустрічалися клітини, в яких з внутрішньої сторони оболонки ядра, а інколи й по всій каріоплазмі розташовувалися брилки гетерохроматину. У полі зору зустрічалися окремі клітини (або групи по 3–6 клітин) з ознаками атрофії, зернистої дистрофії, паранекрозу та некрозу (рис. 8.18). Навколо гепатоцитів з ознаками альтерації спостерігали зірчасті макрофаги та гістіоцити.

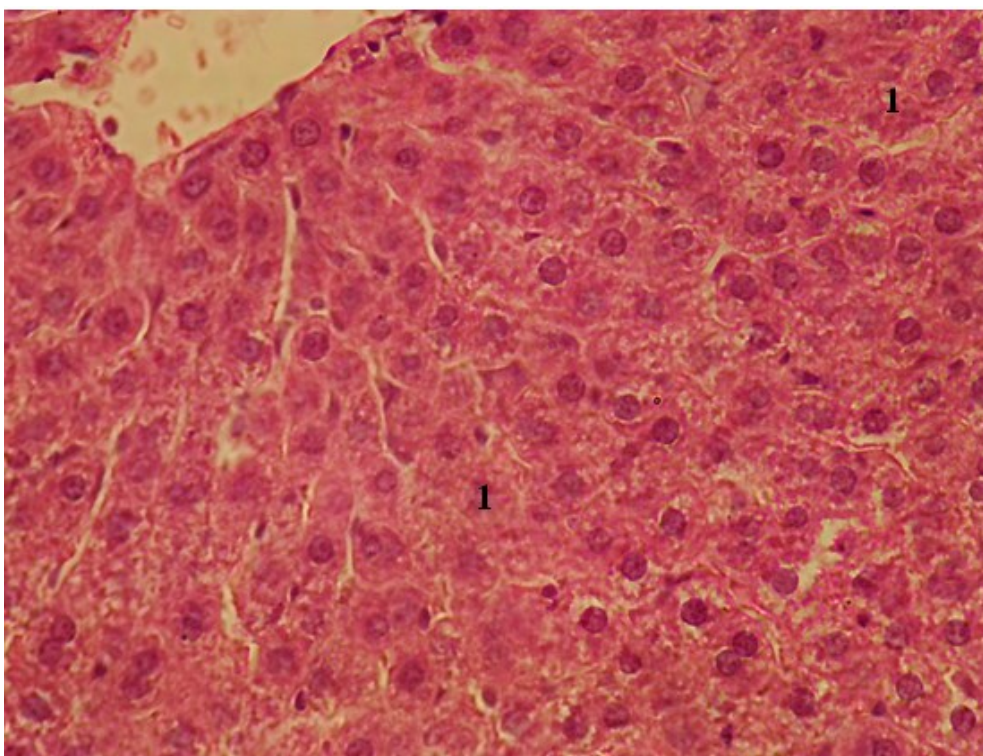


Рис. 8.18. Фрагмент гістологічного препарату печінки щура на 7-му добу після введення пегельованого антибіотика енрофлоксацину.

Примітки: 1 – ознаки дистрофії, паранекрозу та некрозу гепатоцитів, забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення x 640.

Через 14-ть та 21-ну діб після закінчення введення пегельованого антибіотика енрофлоксацина не встановлено гістологічних змін у структурі печінки дослідних щурів.

Висновки до розділу 8

1. Дослідження функціонального стану печінки щурів показало, що вміст загального білірубіну у сироватці крові дослідних груп був вищим від контрольних протягом всього часу досліджень.

2. Вміст холестеролу у сироватці крові піддослідних тварин протягом проведення експерименту мало відрізнявся між групами, однак за введення

пегельованого антибіотика енрофлорсацину показники були вищими від контрольних, що можна розцінювати як стабільність його синтезу у клітинах печінки.

3. Вміст загального протеїну у сироватці крові тварин дослідних груп тварин мало відрізнявся від контрольних. Вміст альбуміну у сироватці крові щурів, які отримували пегельований антибіотик енрофлорсацин, тримався протягом досліду на фізіологічно високому рівні, що вказує на добре функціонування протеїнсинтезувальної функції гепатоцитів. Вміст глобулінових фракцій у сироватці крові у дослідних щурів через 7-ім діб мало відрізнявся від контрольних, а у наступні дослідження їх рівень переважав контрольну групу.

4. Активність АлАТ у сироватці крові щурів, які отримували субстанцію традиційного антибіотика енрофлорсацину, трималася високою протягом трьох тижнів експерименту, що може свідчити про ураження клітин печінки. У тварин, яким вводили пегельований антибіотик енрофлорсацин, активність АлАТ була нижчою від контрольних. За динамікою активності АлАТ та АсАТ в крові тварин можна зробити висновок, що відновлення структури клітин печінки проходить швидше у щурів, яким вводили пегельований антибіотик енрофлорсацин. Через 7-ім діб після останнього введення препаратів активність ГГТП у сироватці крові тварин всіх дослідних груп була вищою, порівняно з контрольною, у наступні дослідження найнижчий рівень активності ензиму встановлено за внутрішньом'язової ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлорсацину. Рівень активності ЛФ у крові тварин, яким вводили пегельований антибіотик енрофлорсацин, був протягом дослідження на рівні контрольної групи і нижчим від інших двох дослідних груп щурів.

5. Гістологічні дослідження тканин печінки показали, що зміни структури реєструються через 7-ім діб після закінчення введення препаратів як за ін'єкції традиційної форми антибіотика енрофлорсацину, так і

пегельованої. У наступні дослідження не встановлювали змін структури після застосування пегельованого антибіотика енрофлоксацину, водночас антибіотик енрофлоксацин у традиційній формі спричиняв порушення паренхіми печінки.

6. Біохімічні дослідження крові тварин і гістологічний аналіз тканин печінки вказували, що пегельований антибіотик енрофлоксацин мав меншу гепатотоксичність, порівняно з традиційною субстанцією антибіотика енрофлоксацину.

Матеріали до цього розділу висвітлені у наукових публікаціях:

2. Зеленіна О.М., Остапів Д.Д., Дронь І.А, Самарик В.Я., Косенко Ю.М., Влізло В.В. Активність трансаміназ і вміст білірубіну у крові щурів за введення антибіотика енрофлоксацину, нанополімеру ПЕГ-400 та їх комплексу. Наукові доповіді НУБіП України. 2020. № 4(86).

4. Zelenina O.M., Vlizlo V.V, Kozak M.R., Ostapiv D.D., Samaryk V.Ja. Dron I.A., Stetsko T.I., Skrypka M.V., Tomchuk V.A., Danchuk O.V., Levchenko A.G. Antimicrobial activity of the PEGylated antibiotic enrofloxacin and its functional and structural effect on the liver in rats. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2022. 12(06). 068–075. (Scopus, Q2).

9. Zelenina O., Kozak M., Ostapiv D., Vlizlo V. Protein content in rats' blood under the influence of enrofloxacin in various forms. The 1st Ukrainian-Polish Scientific forum Agrobioprospectives, Institute of animal biology NAAS, 29–30.09.2021. The animal biology. Lviv, 2021. Vol. 23, № 3. P. 128.

10. Vlizlo V., Ostapiv D., Samaryk V., Stegnyy B., Kozak M., Zelenina O., Dron I. PEGylation of enrofloxacin reduces minimum inhibitory concentrations and hepatotoxic effects in rats. Medical Biodefense Conference. Munich 28.09.–01.10.2021. P. 103–104.

11. Зеленіна О.М. Пегелювання антибіотика енрофлоксацину та його вплив на активність індикаторних ензимів і структуру печінки. Матеріали І

Міжнародної науково-практичної конференції НПП та молодих науковців «Актуальні аспекти розвитку науки і освіти». Одеський державний аграрний університет. 13-14 квітня 2021 р. Аграрний вісник Причорномор'я. 2021. Одеса, 2021. С. 31–34.

РОЗДІЛ 9

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН І СТРУКТУРА НИРОК У ЩУРІВ ЗА ВВЕДЕННЯ ПЕГЕЛЬОВАНОГО ТА ТРАДИЦІЙНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ І ПЕГ-400

9.1. Вміст креатиніну у сироватці крові

Проведені дослідження вмісту креатиніну в сироватці крові лабораторних щурів показали, що через 7-ім діб після введення препаратів суттєвої різниці між показниками різних груп не відмічалось (рис. 9.1). Концентрація креатиніну у крові тварин всіх груп на 14-ту добу досліджень знижувалася, але мало відрізнялася між групами. На 21-шу добу рівень креатиніну у сироватці крові тварин, яким вводили традиційну форму антибіотика енрофлораксацину ($43,4 \pm 0,65$ мкмоль/л) та ПЕГ-400 ($45,4 \pm 0,54$ мкмоль/л), був нижчий на 9,2 % ($P < 0,01$) та 5,0 % ($P < 0,05$), відповідно, порівняно з контрольними ($47,8 \pm 0,63$ мкмоль/л). У крові щурів, яким проводили ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлораксацину, вміст креатиніну складав $51,8 \pm 0,61$ мкмоль/л і був вищим від контрольних на 8,4 % ($P < 0,01$). Слід відзначити, що протягом часу експерименту у крові тварин всіх груп концентрація креатиніну не виходила за верхню межу фізіологічних коливань.

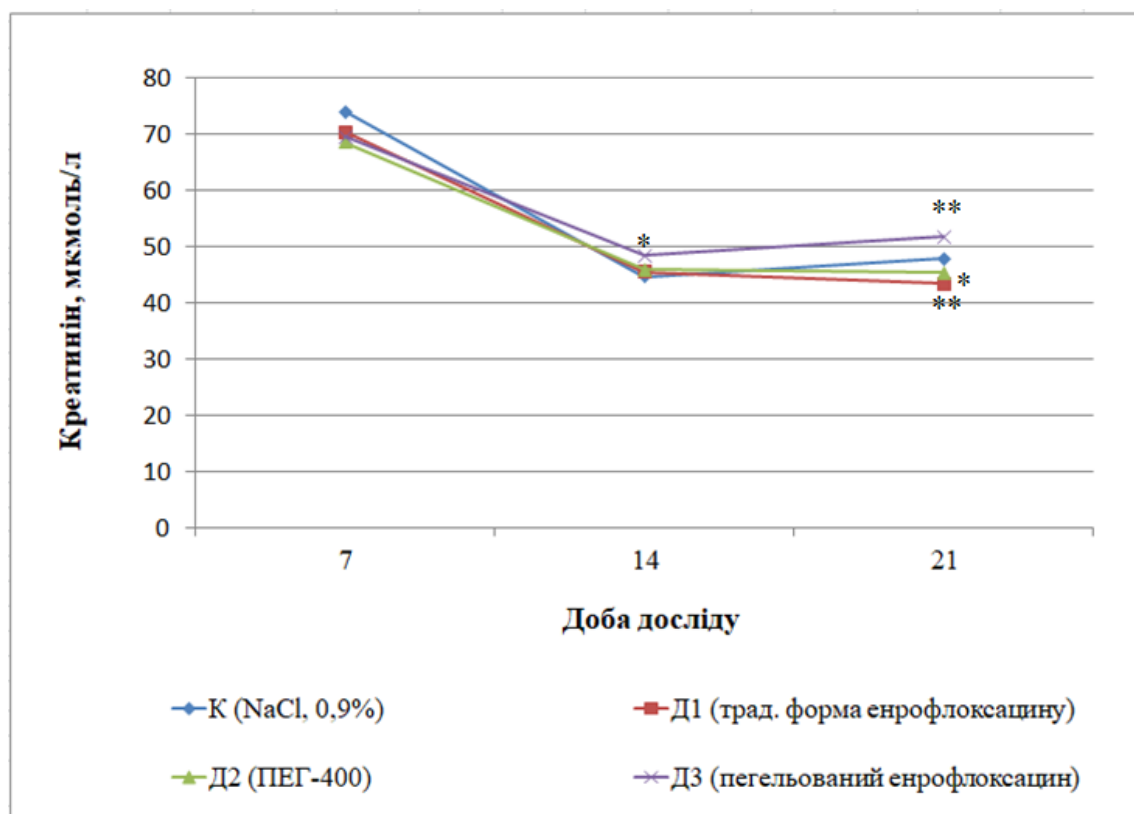


Рис. 9.1. Концентрація креатиніну у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, мкмоль/л ($M \pm m$, $n=4$).

9.2. Гістологічне дослідження тканин нирок

При гістологічному дослідженні тканин нирок контрольних щурів встановлено, що капсула складалася з прошарку волокнистої сполучної тканини вкритої ззовні мезотелієм. У кірковій зоні строми нирок простежувалися дрібні острівці з фіброцитів, фібробластів, макрофагів між стінками переважно проксимальних та меншої кількості дистальних відділів звивистих каналців нефронів. Капілярна сітка судинного клубочка, а також перитубулярна капілярна сітка та зірчасті вени були середнього кровонаповнення.

До характерної особливості можна було віднести насичене рожеве забарвлення цитоплазми нефроцитів проксимальних і менше дистальних каналців (за винятком епітелію збірних каналців) кіркової зони, помірно

виражене збільшення об'єму клітин і звуженням просвіту каналців (рис. 9.3).

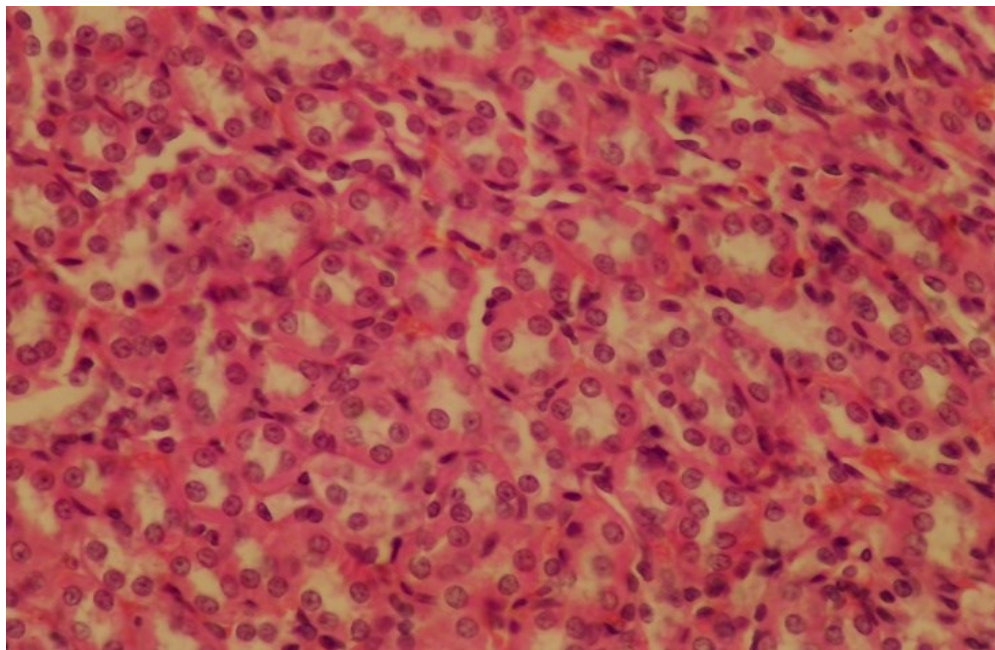


Рис. 9.3. Фрагмент гістологічного препарату нирки щура контрольної групи на 7-му добу після введення фізіологічного розчину.

Примітка. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення $\times 400$.

Якщо у контрольних тварин протягом експерименту не було встановлено змін структури нирок, то у дослідних групах щурів через сім діб після закінчення введення препаратів реєстрували гістологічні порушення. А у щурів, які отримували традиційну форму антибіотика енрофлоксацину, гістологічно встановлено патологічні зміни нирок також і на 14-ту та 21-шу доби після закінчення введення препарату, або протягом всього часу проведення експерименту. У щурів даної групи зареєстровано ознаки зернистої дистрофії, осередки паранекрозу та некрозу нефроцитів звивистих каналців (рис. 9.4). Простежували місця з вираженою зміною цитоархітектоніки епітеліоцитів. Останні не мали характерної кубічної форми. У стінці проксимальних трубочок спостерігали клітини округлої

форми, епітеліоцити мали усічений конус, спрямований верхівкою в просвіт трубочки. Для апікальної частини нефроцитів характерними були інвагінація та випинання цитоплазми з утворенням чисельних виростів. Цитоплазма у 20 % клітин мала ознаки вакуолізації. Оголення базальної мембрани стінки проксимальних трубочок та розширення їх просвіту було наслідком некрозу епітеліоцитів (рис. 9.5).

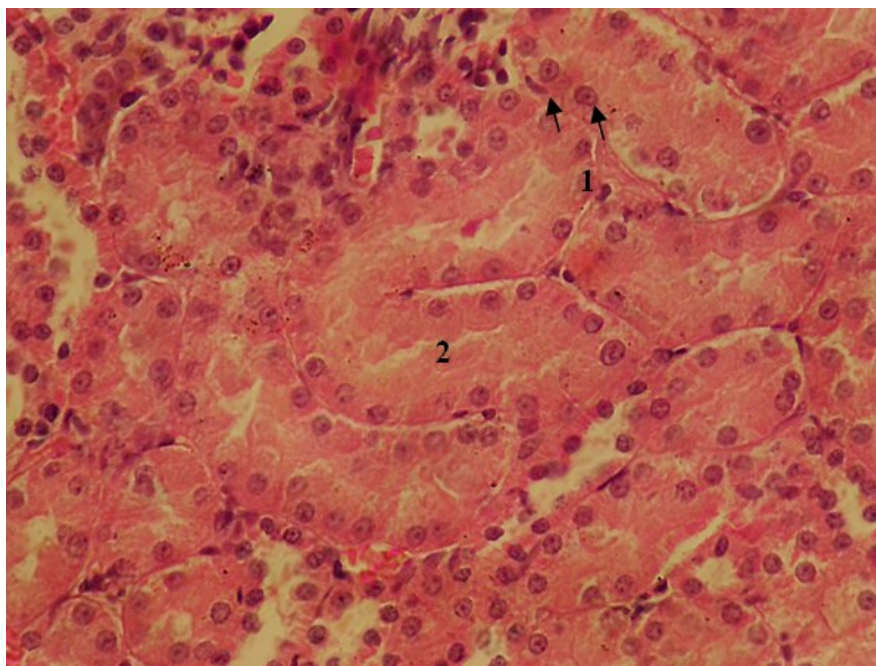


Рис. 9.4. Фрагмент гістологічного препарату нирки щура на 7-му добу після введення традиційної форми антибіотика енрофлоксацину.

Примітки: 1 – нефроцити стінки проксимальних трубочок з ознаками зернистої дистрофії та паранекрозу; 2 – первинна сеча в просвіті трубочок. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення x 400.

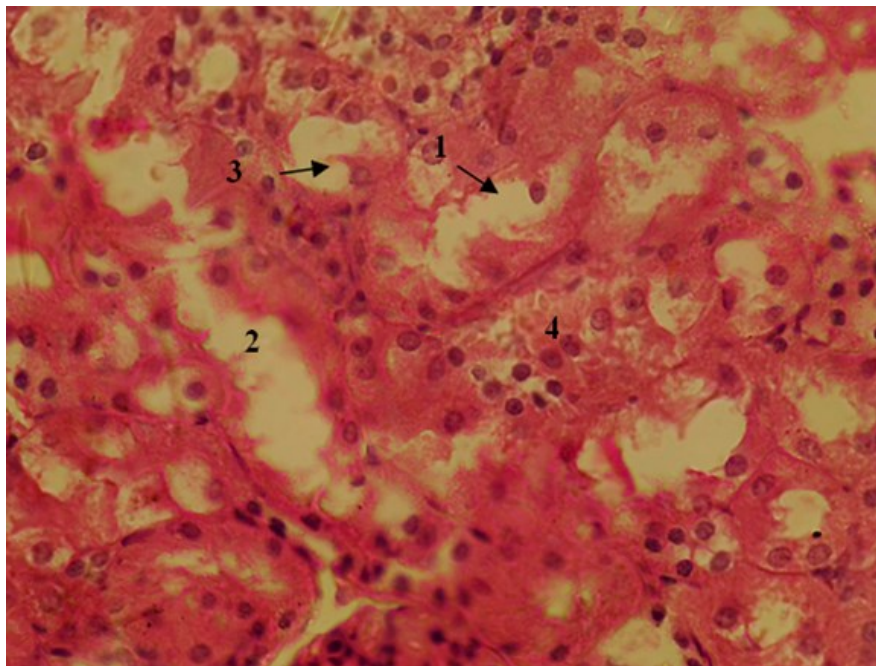


Рис. 9.5. Фрагмент гістологічного препарату нирки щура на 21-шу добу після введення традиційної форми антибіотика енрофлоксацину.

Примітки: 1 – оголення базальної мембрани стінки проксимальних трубочок; 2 – розширення просвіту трубочок; 3 – утворення виростів цитоплазми апікальної частини нефроцитів; 4 – вакуолізація цитоплазми нефроцитів.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення $\times 400$.

У тварин дослідної групи, яка отримувала ПЕГ-400, морфологічні показники нирок на 7-му добу експерименту показували виражену еозинофільність цитоплазми епітеліоцитів, що ймовірно пов'язане зі зростанням секреції сечі та, відповідно, зворотної реабсорбції первинної сечі через нефроцити проксимальних трубочок. Просвіти каналців були збережені, містили помірну кількість сечі з підвищеним вмістом протеїнових сполук (рис. 9.6). У полі зору зустрічались осередки, в яких цитоплазма нефроцитів стінки звивистих каналців мала ознаки помірно вираженої вакуолізації, просвітлення перинуклеонарної зони цитоплазми в наслідок її набряку. Спостерігали клітини з ознаками зернистої дистрофії та паранекрозу. Патологічно змінені клітини були збільшені в об'ємі, набували

округлої форми. Була помірно виражена гіперемія капілярного сплетіння судинних клубочків.

На 14-ту та 21-шу доби експерименту у щурів, які отримували ПЕГ-400, не встановлено гістологічних змін у нирках, а мікроструктура була ідентичною з контрольною.

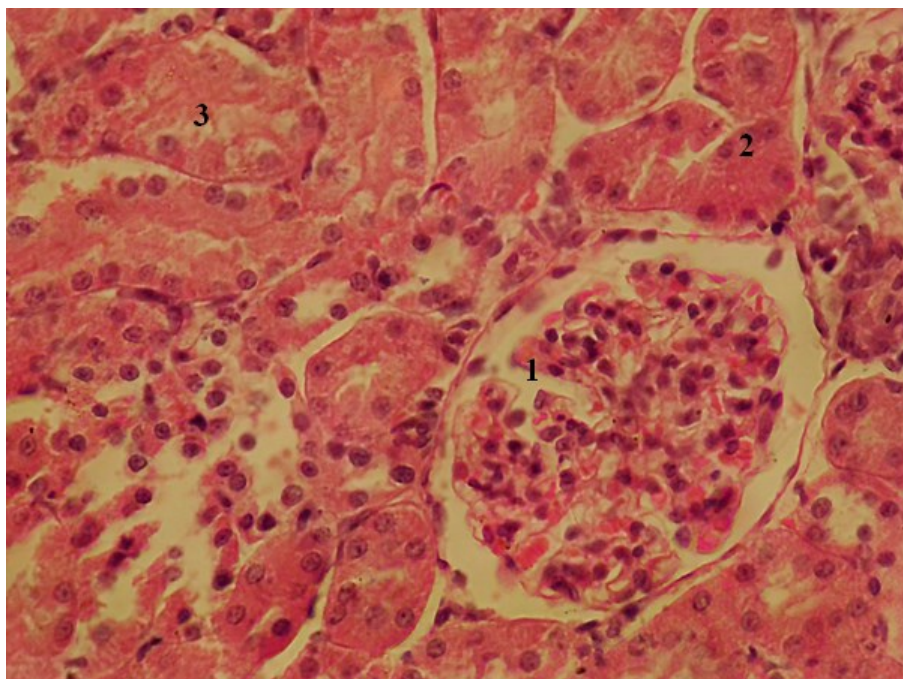
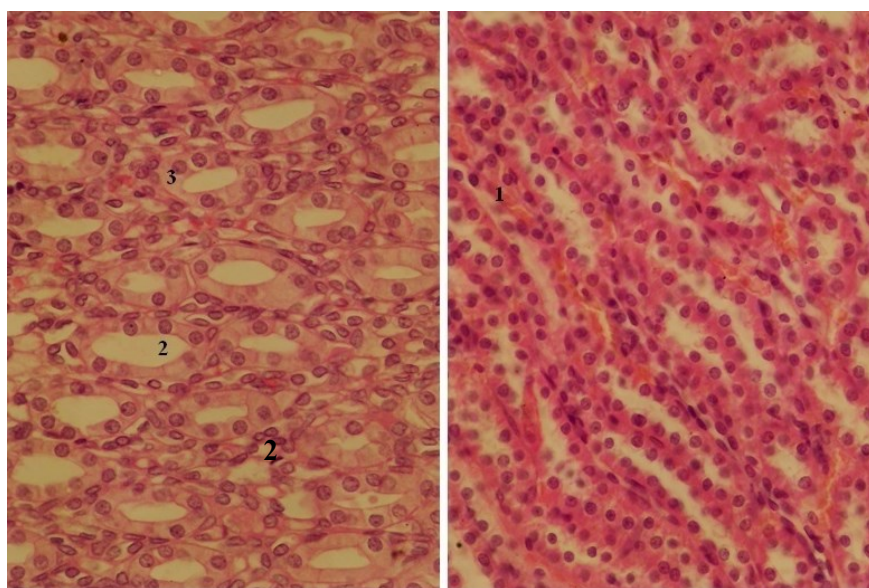


Рис. 9.6. Фрагмент гістологічного препарату нирки щура на 7-му добу після введення ПЕГ-400.

Примітки: 1 – помірне кровонаповнення капілярів судинного клубочка; 2 – нефроцити звивистих каналців з ознаками зернистої дистрофії та паранекрозу; 3 – вакуолізація цитоплазми нефроцитів з перинуклеарним набряком. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення x 400.

При дослідженні структури нирок дослідної групи тварин, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, через сім діб після закінчення ін'єкції гістологічно встановлено незначне збільшення об'єму клітин із звуженням просвіту ниркових каналців. Нефроцити проксимального відділу звивистих трубочок в окремих ділянках кіркової

зони мали нечітко окреслені контури, апікальна частина таких нефроцитів були у вигляді безформеної маси. Ядра в цитоплазмі патологічно змінених клітин не простежувалися. У полі зору зустрічалися поодинокі клітини із незначним збільшенням об'єму та напівпрозорою цитоплазмою. У мозковій зоні нирок, як і у кірковій, характерним було помірне кровонаповнення судин (рис. 9.7).



А

Б

Рис. 9.7. Фрагмент гістологічного препарату нирки щура на 7-му добу після введення пегельованого антибіотика енрофлоксацину.

Примітки: 1 – помірне кровонаповнення судин мозкової перитубулярної капілярної сітки; 2 – розширені просвіти прямих канальців; 3 – нефроцити прямих канальців.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення x 400 (А), x 200 (Б)

На 14-ту та 21-шу доби експерименту у тварин, які отримували пегельований антибіотик енрофлоксацин, не встановлено морфологічних змін у нирках, а їх структура була ідентичною з контрольною групою.

Висновки до розділу 9

За внутрішньом'язової ін'єкції щурам пегельованого антибіотика енрофлоксацину незначні зміни структури нирок можуть реєструватися протягом перших семи діб після введення, а вміст креатиніну у сироватці крові не вказував на порушення екскреторної функції нирок протягом всього часу експерименту. Водночас, внутрішньом'язові ін'єкції традиційної форми антибіотика енрофлоксацину дослідним щурам спричиняють морфологічні зміни структури нирок протягом 21-ої доби після введення препарату. Отже, пегелювання антибіотика енрофлоксацину веде до зменшення нефротоксичності.

Матеріали до цього розділу висвітлені у наукових публікаціях:

12. Зеленіна О. М., Козак М.Р., Остапів Д. Д., Самарик В. Я., Слівінська Л.Г., Щербатий А.Р., Леньо М.І., Влізло В. В. Функціональний стан нирок у тварин за застосування пегельованого антибіотика енрофлоксацину. Матеріали II конференції «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактики у ветеринарній медицині». Львів, 2021. С. 56–57. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку).*

РОЗДІЛ 10

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

При створенні протимікробних препаратів розвиток нових технологій повинен бути направленим на забезпечення високої терапевтичної ефективності та безпечності для організму. Пошук нових антибіотиків спрямовується на розроблення препаратів, що мають змінену молекулярну структуру, яка б забезпечувала цілеспрямовану дію на відповідні бактеріальні клітини, добре з'єднання з носієм для транспортування в уражені ділянки, нечутливість до дії захисних ензимів клітин мікроорганізмів.

Антибіотик енрофлоксацин відноситься до класу найуспішнішої групи синтетичних антибіотиків – фторхінолонів. Він характеризується широким спектром активності проти цілого ряду грамнегативних і грампозитивних бактерій [72, 217]. Незважаючи на те, що використання енрофлоксацину ефективне у багатьох видах антибіотикотерапії та має малу кількість побічних впливів, останнім часом існує занепокоєння з приводу появи стійких до енрофлоксацину штамів бактерій, а тому може розвиватися негативна дія від надмірного застосування цих антибіотиків [218-220]. Крім цього, антибіотик енрофлоксацин малорозчинний у воді, гігроскопічний і має гіркий смак, що обмежує його застосування [221]. Тому, актуальним є пошук нових сполук енрофлоксацину з поліпшеною терапевтичною ефективністю, мінімальною побічною дією та відсутньою резистентністю мікроорганізмів.

Аналіз літературних даних вказує на те, що впровадження у виробництво антибіотиків, з'єднаних з наноносіями, має актуальне значення для підвищення ефективності лікування людей та тварин, оскільки забезпечується цільова доставка ліків в уражені тканини та клітини-мішені, а

також підвищується їх біосумісність, мінімізується побічна дія, знижується негативний вплив на організм [19, 222-226]. Полімерні наноносії є одними із найперспективніших, оскільки вони володіють цілою низкою специфічних фізико-хімічних і біологічних властивостей, які забезпечують їхню біосумісність, біодеградабельність, можливість додаткової функціоналізації спеціальними біoeлементами, необхідними для доставки фармацевтичних препаратів в організмі [227-234]. Серед полімерів важливе місце належить ПЕГ. Як показують роботи ряду вчених, перспективним є використання антибактеріальних препаратів, з'єднаних з ПЕГ, або пегелювання антибіотиків [235-241]. Це обумовлено тим, що ПЕГ утворює стабільні комплекси з ліками, має пролонговану циркуляцію у крові, здатний до акумуляції у зоні патологічного процесу, ефективно переносить молекули у клітину й окремі органели, має мінімальний вплив на діючу речовину. Він здатний зберігати хімічну структуру протягом певного періоду перебування в організмі, водночас легко біодеградується та є біосумісним, оскільки не утворює токсичних метаболітів [18, 19, 98]. Характерною особливістю ПЕГ є його добра розчинність у воді. Це пов'язано з тим, що структура водневих зв'язків у воді не змінюється від введення ПЕГ внаслідок геометричної схожості [242]. Водночас, він полегшує подолання клітинної ліпідної мембрани [95, 96].

Молекула антибіотика енрофлоксацину містить у структурі реакційно здатні карбоксильні групи, що сприяє приєднанню інших речовин. Водночас, висока поверхнева гідрофільність поліетилегліколю дозволяє добре кон'югувати з іншими сполуками [121, 122]. Вченими НУ «Львівська політехніка» проведено пегелювання антибіотика енрофлоксацину шляхом приєднання до кінців поліоксиетиленових гідрофільних закінчень ПЕГ-400 карбоксильних закінчень енрофлоксацину [100]. ПЕГ та антибіотик енрофлоксацин ковалентно з'єднувалися між собою. При цьому, утворилася біфільна макромолекула, яка здатна у водних розчинах формувати

самостабілізовані дисперсії з нанометричними розмірами частинок дисперсної фази. Стабілізація таких частинок у водному середовищі зумовлена утворенням структурномеханічного бар'єру гідратованих поліоксиетиленових ланцюгів навколо ядра, в якому знаходиться антибіотик. Проведена високоефективна рідинна хроматографія показала, що чистота пегельованого антибіотика енрофлоксацину становить 98–99 %.

Утворений пегельований антибіотик енрофлоксацин мав добру розчинність у воді та був стабільним. Добра розчинність сполук за пегелювання сприяє ефективності доставки лікарських препаратів в ураженні органи, а також мінімізує токсичну дію на організм [125]. Водночас, встановлена висока антибактеріальна активність сполук енрофлоксацину, ковалентно з'єднаних з поліетиленгліколем, може бути зумовлена здатністю ПЕГ позитивно впливати на проникність мембран, тим самим, збільшуючи поглинання антибактеріального препарату клітинами [172]. Порівнюючи дослідження антибактеріальної дії антибіотика енрофлоксацину у традиційній формі та кон'югованій з ПЕГ-400 на музейні штами мікроорганізмів *Escherichia coli* ATCC 11105, нами встановлено кращу ефективність пегельованого антибіотика енрофлоксацину. Так, мінімальна інгібуюча концентрація на мікроорганізми *Escherichia coli* ATCC 11105 за застосування субстанції традиційного антибіотика енрофлоксацину становила 0,31 мкг/мл, а за дії пегельованого антибіотика енрофлоксацину – була нижчою удвічі (0,15 мкг/мл). Отже, як у одному, так і другому випадку *Escherichia coli* є чутливою до дії антибіотика енрофлоксацину, однак його пегелювання веде до покращення антимікробних властивостей. Про покращення антимікробної активності за пегелювання фторхінолонів вказують й інші дослідники [70, 243-245]. Водночас, визначення МІК на музейних штамах мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P не показало різниці між антибіотиком енрофлоксацином у традиційній та у пегельованій формах.

Дослідження *in vitro* показали, що пегелювання антибіотика енрофлоксацину не змінює рівень його бактеріостатичної активності й до польових штамів грампозитивних (*Staphylococcus epidermidis*) та грамнегативних (*Enterobacter*) мікроорганізмів.

В умовах *in vivo* для пегельованих сполук збільшується час циркуляції в організмі від декількох хвилин до годин [114], оскільки розгалужена структура молекули ПЕГ сприяє уповільненню активного метаболізму препарату, що й призводить до збільшення часу знаходження препарату у крові [246]. Нирки фільтрують речовини невеликих розмірів, тому пегельовані молекули, які мають збільшену молекулярну масу та збільшений гідродинамічний радіус, ніж материнська молекула, виводяться з організму набагато повільніше. Це призводить до збільшення періоду напіввиведення пегельованих молекул *in vivo* [247]. Гідратований ланцюг ПЕГ захищає кон'юговану сполуку від доступу до протеаз та пептидаз, зменшуючи неспецифічну деградацію препарату [120] і підвищуючи час циркуляції полімерних міцел в крові [100, 101]. Така хімічна модифікація фармакологічних препаратів спрямована на покращення їх переносимості, зниження імуногенності, підвищення періоду напіввиведення [93, 111, 123]. Зважаючи на це, можливо, в організмі антимікробна ефективність пегельованого антибіотика енрофлоксацину була б вищою, ніж та, що встановлена нами *in vitro*. Отже, подальші дослідження слід направити на дослідження його ефективності за лікування інфекційних захворювань тварин та людини.

У деяких дослідженнях [248] доведено, що для ефективної дії антибіотика енрофлоксацину необхідно збільшити його рекомендовану дозу в п'ять разів, але це може мати токсичний вплив на клітини організму [245]. Тому, важливим етапом доклінічних досліджень лікарських засобів є визначення їх токсичності [16, 31]. Серед ліків антибактеріальні препарати мають найбільш виражені побічні реакції, що може обмежувати їх

використання [188]. Зважаючи на це, наступною метою наших досліджень було встановити біосумісність та можливу токсичність за внутрішньом'язового введення в організм лабораторних тварин пегельованого антибіотика енрофлосацину, а також традиційної форми антибіотика енрофлосацину та ПЕГ-400, які використовували для його створення.

Проведені нами клінічні дослідження лабораторних тваринах під час чотирикратної внутрішньом'язової ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлосацину, традиційного антибіотика енрофлосацину та ПЕГ-400 протягом трьох тижнів після закінчення їх введення показали відсутність видимих змін загального фізіологічного стану. Однак морфологічні та функціональні зміни в органах, які спричиняють ліки, зазвичай проявляються себе безсимптомно або мають субклінічний перебіг [27]. Тому, для виявлення патологічних процесів, або незначних фізіологічних і біохімічних змін в організмі, спричинених дією антибіотиків, доцільно проводити лабораторні дослідження з декількох напрямків.

Проведені нами дослідження «червоної» крові показали, що внутрішньом'язове введення в організм щурів антибіотика енрофлосацину у традиційній формі, ПЕГ-400 та пегельованого антибіотика енрофлосацину не спричиняє патологічних змін гемопоезу, оскільки показники кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну, а також величина гематокриту та індексів червоної крові знаходилися у переважної більшості тварин у межах фізіологічних коливань [249]. Однак, через 7-ім діб після останнього введення традиційної форми антибіотика енрофлосацину у щурів встановлено нижчу насиченість еритроцитів гемоглобіном, що може приводити до зміни функціональної здатності еритроцитів. Зниження кількості еритроцитів і концентрації гемоглобіну, що встановлено у окремих тварин на 7-му добу після введення пегельованого антибіотика енрофлосацину, було незначним, дані показники зростали на 14-ту добу,

повертаючись до рівня контролю, і були найвищими серед всіх досліджуваних тварин. Слід відмітити, що у тварин, які отримували пегельований антибіотик енрофлосаксин, протягом експерименту показники індексів червоної крові були більш стабільними і мало відрізнялися від контрольних.

Позитивна дія пегелювання на гемопоез може бути пов'язана зі здатністю ПЕГ-400 взаємодіяти з фосфоліпідним бішаром еритроцитарних мембран та запобігати руйнації еритроцитів, що й зберігає їх популяцію [235]. Завдяки своїм антирадикальним властивостям поліетиленгліколь нейтралізує вільні радикали, що перешкоджає окисненню та деструкції гемоглобіну [250, 251].

Внутрішньом'язове введення щурам ПЕГ-400, антибіотика енрофлосаксину у традиційній та пегельованій формах характеризується зниженням кількості лейкоцитів крові через 7-ім діб після останньої ін'єкції, порівняно з контрольними. Хоча рівень лейкоцитів й знаходився у межах фізіологічних коливань. У даний період дослідження також зростали у крові дослідних тварин паличкоядерні нейтрофіли і були відсутні еозинофіли. Отже, зміни співвідношення різних видів лейкоцитів у крові щурів за введення досліджуваних речовин характеризуються реакцією-відповіддю на введення препарату, інтенсивність яких згасає через сім діб, оскільки наступні дослідження через 14-ть та 21-шу доби показники кількості лейкоцитів та лейкограма мало відрізнялися від контрольних тварин і були фізіологічними.

Вказується, що ПЕГ забезпечує «невидимість» для системи мононуклеарних фагоцитів і опсонізуючих протеїнів (імуноглобулінів і факторів комплемента) [115-120]. Пегелювання підвищує стабільність при транспортуванні діючої речовини і перешкоджає її захопленню органами системи мононуклеарних фагоцитів [106]. Крім цього, ПЕГ є гідрофільним полімером, який сприяє стійкості до зв'язування протеїнів плазми і

перешкоджає агрегації, спричиненої солями та протеїнами сироватки крові. Завдяки цьому, пегельовані пептиди більш захищені від опсонізації та активного фаго- та ендоцитозу клітинних структур макроорганізму [116, 117]. Таким чином, пегелювання запобігає опсонізації та впізнаванню фагоцитами введених антибіотиків, уникаючи імунних реакцій [115]. Можливо тому протягом всього часу експерименту швидкість осідання еритроцитів була в межах фізіологічних значень, що вказує на відсутність запальної реакції в організмі.

Рідкісним, але важливим побічним ефектом антибіотиків є їх гальмівний вплив на гемостаз і фактори згортання крові [252]. Нами встановлено, що за внутрішньом'язового введення щурам традиційної форми енрофлоксацину на 7-му добу після останньої ін'єкції препарату спостерігали зниження загальної кількості тромбоцитів у тварин. Водночас, ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлоксацину в організм не спричиняють змін показників, які відносяться до факторів згортання крові.

Введення в організм лікарських препаратів призводить до порушення антиоксидантної системи організму [22]. Зокрема, антибіотики стимулюють клітинне дихання з подальшим прискоренням ендогенного утворення реактивних видів Оксигену і стимулюють пероксидне окиснення ліпідів [23]. Підвищення в організмі активних форм Оксигену веде до розвитку оксидативного стресу [24-26]. Лабораторні дослідження крові щурів через 7-ім, 14-ть та 21-ну доби після останньої ін'єкції препаратів показали, що вміст ТБК-активних продуктів залежав від введеної речовини та часу дослідження. Встановлено, що у крові тварин, яким проводили ін'єкцію традиційного антибіотика енрофлоксацину, кількість ТБК-активних продуктів була значно вищою від щурів, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин. Це може вказувати на посилення процесів пероксидного окиснення ліпідів за введення традиційного антибіотика енрофлоксацину. Встановлено [253], що фторхінолони містять у молекулі карбокси- та оксигрупи, що спричиняє

утворення зв'язків з фосфоліпідами та глікопротеїнами і веде до порушення структур цитоплазматичної мембрани, змін її електрофізіологічних характеристик, інактивації мембранозв'язаних ензимів, порушення іонного гомеостазу і пошкодження та загибелі клітин. Можливо тому у крові тварин, які отримували традиційний антибіотик енрофлоксацин, активність ензимів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази) протягом 21-ої доби після останньої ін'єкції була найнижчою. Це є несприятливою ознакою, яка свідчить про посилення процесів ПОЛ і неадекватну реакцію з боку АОС.

Отже, чотириразове внутрішньом'язове введення дослідним щурам антибіотика енрофлоксацину в традиційній формі сприяє накопиченню у крові вмісту ТБК-активних продуктів і зниженню активності ензимів антиоксидантного захисту. Водночас, за введення тваринам пегельованої форми антибіотика енрофлоксацину показники ТБК-активних продуктів у крові були найнижчими, це може вказувати на відсутність токсичного впливу на клітини організму. Водночас, активність СОД, каталази та ГПО у крові щурів протягом експерименту у крові тварин, які отримували внутрішньом'язово пегельований антибіотик енрофлоксацин, була стабільною і відповідала утворенню продуктів ПОЛ. Таким чином, введення тваринам досліджуваного нами пегельованого антибіотика енрофлоксацину не спричиняє надмірного утворення продуктів пероксидного окиснення ліпідів та не викликає негативного впливу на антиоксидантний стан організму, що слід розцінювати як гальмування процесів ПОЛ і фізіологічність перебігу антиоксидантного захисту організму. На думку дослідників ПЕГ підвищує вплив на біологічні мембрани через посилення вільнорадикального окиснення і пероксидного окиснення ліпідів [254]. Це, в свою чергу, призводить до активації відповідних генів, які кодують антиоксидантні ензими (СОД, КАТ, ГПО), що веде до швидкої мобілізації систем антиоксидантного захисту [255].

Хоча фторхінолони вже багато років залишаються одними з найперспективніших за своїми антибактеріальними можливостями лікарськими засобами, що становить реальний інтерес для клінічної практики, однак їх застосування може спричиняти побічні реакції на життєво важливі органи [256-261]. Зокрема, з боку печінки виникають функціональні порушення та структурні зміни з розвитком гепатиту, некрозу паренхіми, холестатичної жовтяниці [68-70]. Гепатотоксичність є одним із найбільш поширених побічних впливів, пов'язаних із застосуванням ліків [22, 182]. Про рівень токсичного впливу лікарських препаратів на печінку найбільш вірогідно можна судити за показниками крові, які характеризують функціональний стан і структуру її клітин [20, 175, 188]. Проведені нами біохімічні дослідження крові та гістологічний аналіз тканин печінки дослідних тварин вказували, що пегельований антибіотик енрофлоксацин мав меншу гепатотоксичність, порівняно з традиційною субстанцією антибіотика енрофлоксацину. Дослідження функціонального стану печінки щурів показало, що вміст загального білірубіну у сироватці крові всіх дослідних груп був вищим від контрольних протягом всього часу досліджень. Однак, вміст холестеролу у сироватці крові мало відрізнявся між групами. Слід відмітити, що за введення пегельованого антибіотика енрофлоксацину показники холестеролу були фізіологічно найвищими, а це можна розцінювати як стабільність його синтезу у клітинах печінки [216]. Водночас, вміст альбуміну в сироватці крові щурів, які отримували пегельований антибіотик енрофлоксацин, тримався протягом досліду на фізіологічно високому рівні, що свідчить про добре функціонування протеїнсинтезувальної функції печінки [262].

Стабільними були й показники вмісту глобулінових фракцій у сироватці крові та загального протеїну, що є ознакою відсутності подразнення клітин системи мононуклеарних фагоцитів введенними препаратами та запальної реакції [175].

Маркерами цитолізу гепатоцитів є підвищення активності індикаторних для печінки ензимів [189]. Проведені нами дослідження активності АлаТ у сироватці крові показали, що щури, яким проводили внутрішньом'язові ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлоксацину, показники активності ензиму були нижчими від контрольних та двох інших дослідних груп. При цьому, активність АлаТ у крові тварин, які отримували «чисту» субстанцію антибіотика енрофлоксацину, трималася високою протягом трьох тижнів після закінчення ін'єкцій, що може свідчити про ураження клітин печінки. Водночас, активність АсАТ у сироватці крові тварин протягом експерименту була вищою у дослідних груп щурів, які отримували ПЕГ-400 та пегельований антибіотик енрофлоксацин. Очевидно, що зростання активності АсАТ у сироватці крові щурів, яким вводили досліджувані речовини, може бути пов'язано з активним проникненням їх у клітини і мітохондрії, де даний ензим має високу активність [175]. Відповідно, це проявляється підвищеним виходом АсАТ через мембрани клітин і надходженням у кров'яне русло. Крім цього, ПЕГ має розгалужену структуру молекули, що уповільнює активний метаболізм препарату та призводить до збільшення часу активної циркуляції пегельованого антибіотика енрофлоксацину у крові [136]. На 14-ту і 21-шу доби після останньої ін'єкції активність АсАТ у крові тварин, які отримували пегельований антибіотик енрофлоксацин, знижувалася, порівняно з тими, яким проводили ін'єкцію субстанції традиційного антибіотика енрофлоксацину. Якщо порівнювати активність ензиму у дослідних групах, то можна припустити, що енрофлоксацин у традиційній формі значно повільніше проникає з м'язової тканини (місця введення) у кров'яне русло і метаболізується в тканині печінки, порівняно з ПЕГ-400 і пегельованим антибіотиком енрофлоксацином. Встановлений факт можна характеризувати як покращення швидкості проникнення і нагромадження в клітинах антибіотика енрофлоксацину, з'єданого з ПЕГ-400 для його

транспортування. Завдяки пегелюванню підвищується ефективність доставки лікарських препаратів за рахунок збільшення їх концентрації в місці ураження з одночасною мінімізацією токсичної дії на організм [263]. Отже, за динамікою активності АЛАТ та АсАТ в крові тварин можна зробити висновок, що у щурів, яким вводили пегельований антибіотик енрофлоксацин, ураження клітин печінки можливе лише у перші дні після внутрішньом'язових ін'єкцій, а відновлення проходить швидше, порівняно з традиційним антибіотиком енрофлоксацином.

Подібні зміни встановлено і при визначенні активності ГГТП та ЛФ у сироватці крові щурів. Так, у крові тварини, які отримували традиційний антибіотик енрофлоксацин, активність даних ензимів через 7-ім діб після останнього введення препаратів була вищою від тих, які отримували пегельований антибіотик енрофлоксацин. Висока активність ГГТП у крові може свідчити про інтрапечінковий холестаз і ураження клітин печінки, які формують внутрішньопечінкові жовчні протоки [189], а ЛФ – про екстрагепатичний холестаз і ураження клітин, які формують позапечінкові жовчні протоки [175, 206]. У щурів, яким проводили ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлоксацину, активність ГГТП і ЛФ у сироватці крові була найнижчою, що вказує на відсутність токсичного впливу на клітини.

При гістологічному дослідженні тканин печінки тварин, які отримували субстанцію традиційного антибіотика енрофлоксацину, протягом трьох тижнів після останнього введення препарату встановлювали ознаки зернистої дистрофії, лізісу, паранекрозу, некрозу паренхіми печінки та пікноз ядер гепатоцитів. У тварин, які отримували PEG-400, морфологічні показники печінки на 7-му, 14-ту та 21-шу доби експерименту не показували гістологічних змін. Лише через 7-ім діб в окремих клітинах цитоплазма набувала пінистого або зернистого вигляду. У групі щурів, які отримували пегельований антибіотик енрофлоксацин, на 7-му добу експерименту встановлено, що у полі зору зустрічаються окремі клітини печінки з ознаками

атрофії, зернистої дистрофії, паранекрозу та некрозу. У цих тварин на 14-ту та 21-шу доби після останньої ін'єкції морфологічний стан печінки був без змін та ідентичний зі структурою контрольної групи.

Отже, гістологічні дослідження тканин печінки показали, що зміни структури реєструються через 7-ім діб після закінчення введення препаратів як за ін'єкції традиційної форми антибіотика енрофлоксацину, так і пегельованої. У наступні дослідження не встановлювали змін структури після застосування пегельованого антибіотика енрофлоксацину, водночас антибіотик енрофлоксацин у традиційній формі спричиняв порушення паренхіми печінки протягом трьох тижнів. Отже, за результатами біохімічних досліджень крові тварин і гістологічного аналізу тканин печінки доведено, що пегельований антибіотик енрофлоксацин має меншу гепатотоксичність, порівняно з традиційною субстанцією антибіотика енрофлоксацину.

Нефротоксичні реакції антибіотиків фторхінолонового ряду коливаються в межах від 0,2 до 0,8 % [264, 265]. За інструкцією, антибіотик енрофлоксацин не визиває нефротоксичного ефекту [266]. Однак, у тварин, яким вводили антибіотик енрофлоксацин у дозі 75 мл/кг, протягом 10 днів, спостерігались чіткі гістологічні зміни нирок. Зокрема, у експериментальних тварин встановлено у проксимальних і дистальних звивистих каналцях, що вистилають епітелій, ознаки прогресування нефротоксичного некрозу та розрив мембрани [267].

За нашими дослідженнями, протягом всього часу експерименту у сироватці крові тварин всіх груп концентрація креатиніну не виходила за верхню межу фізіологічних коливань. Слід відзначити, що креатинін сироватки крові є одним із головних біомаркерів нефротоксичності, оскільки він вільно фільтрується нирковими клубочками і, не реабсорбуючись каналцями, повністю екскретується нирками [268]. Ці властивості креатиніну зробили його важливим маркером для оцінки функціонального

стану нирок [269]. Однак, зростання вмісту креатиніну в крові відбувається за значного ураження нирок, а його нормативні показники не завжди свідчать про відсутність порушення структури нирок [170]. Це підтверджено й нашими дослідженнями. Так, проведені нами гістологічні дослідження нирок дослідних щурів показали порушення структури через 7-ім діб після закінчення введення препаратів. Слід відзначити, що за внутрішньом'язових ін'єкцій традиційної форми антибіотика енрофлоксацину дослідним щурам гістологічні зміни структури нирок встановлювали протягом 21-го дня після останнього введення препарату. У щурів даної групи зареєстровано ознаки зернистої дистрофії, осередки паранекрозу та некрозу нефроцитів звивистих каналців. На це вказують також й інші дослідники [267], які вводили тваринам енрофлоксацин у дозі 75 мл/кг, протягом 10-ти днів, і спостерігали чіткі гістологічні зміни нирок. Зокрема, у експериментальних тварин встановлено у проксимальних і дистальних звивистих каналцях, що вистилають епітелій, ознаки прогресування нефротоксичного некрозу та розрив мембрани.

Чотирикратне введення дослідним тваринам пегельованого антибіотика енрофлоксацину спричиняло лише незначні зміни у нирках і тільки протягом перших семи діб після ін'єкцій. Дослідження інших вчених також вказують на те, що ПЕГ з молекулярною масою 400 Дальтон є оптимальним для кон'югації з антибіотиками і не має побічної дії на ниркову функцію, а пегелювання не спричиняє морфологічних змін структури нирок у дослідних щурів і веде до зниження нефротоксичності антибактеріальних препаратів [270].

Таким чином, пегілювання антибіотика енрофлоксацину збільшує розмір і молекулярну масу кон'югованих біомолекул, підвищує їх фармакокінетику, фармакодинаміку, розчинність у воді, захист від ферментативної деградації, знижує гепатотоксичність та нефротоксичність, гальмує негативний вплив на гемопоез і гемостаз, обмежує імуногенні та

антигенні реакції, збалансовує пероксидне окиснення ліпідів і активність ензимів антиоксидантної системи.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вивчено біосумісність, токсичність та протимікробну дію пегельованого антибіотика енрофлорсацину і проведено його порівняння з традиційним антибіотиком енрофлорсацином та ПЕГ-400, які використовували для створення препарату; показано, що пегелювання антибіотика енрофлорсацину зменшує негативний вплив на гемостаз, резистентність та антиоксидантну систему організму, має нижчу гепатотоксичну та нефротоксичну дію.

1. Мінімальна інгібуюча концентрація на музейні штами мікроорганізмів *Escherichia coli* ATCC 11105 за дії пегельованого антибіотика енрофлорсацину удвічі нижча (0,15 мкг/мл), порівняно з традиційною субстанцією антибіотика енрофлорсацину (0,31 мкг/мл). Водночас, МІК на музейні штами мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, а також на грампозитивні (*Staphylococcus epidermidis*) та грамнегативні (*Enterobacter*) польові штами мікроорганізмів була однаковою для антибіотика енрофлорсацину як у традиційній субстанції, так і у пегельованій формі.

2. Внутрішньом'язове чотирикратне введення в організм щурів антибіотика енрофлорсацину у традиційній формі, ПЕГ-400 та пегельованого антибіотика енрофлорсацину не спричиняє патологічних змін гемопоезу; зниження кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну, а також низька насиченість еритроцитів гемоглобіном встановлено у крові дослідних тварин, порівняно з контрольними, через 7-ім діб після введення препаратів.

3. Ін'єкції щурам традиційної форми антибіотика енрофлорсацину спричиняють зниження загальної кількості тромбоцитів у крові, а за застосування ПЕГ-400 та пегельованого антибіотика енрофлорсацину у тварин зростає рівень ширини розподілу тромбоцитів і лише через 7-ім діб після закінчення введення препаратів.

4. Введення щурам ПЕГ-400, антибіотика енрофлораксацину у традиційній та пегельованій формах характеризується зниженням кількості лейкоцитів, зростанням кількості паличкоядерних нейтрофілів і відсутністю еозинофілів у крові через 7-ім діб після їх останньої ін'єкції, а у наступні дослідження (через 14-ть та 21-ну доби) кількість лейкоцитів та лейкограма мало відрізнялися від контрольних тварин і були у межах фізіологічних коливань.

5. За внутрішньом'язових ін'єкцій щурам досліджуваних речовин ШОЕ крові була в межах фізіологічних коливань і не відрізнялася між контрольною та дослідними групами, що може вказувати на відсутність запальної реакції в організмі.

6. Чотириразове внутрішньом'язове введення дослідним щурам антибіотика енрофлораксацину в традиційній формі спричиняло зростання у крові вмісту ТБК-активних продуктів і зниження активності ензимів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази) протягом 21-ної доби після останньої ін'єкції.

7. За ін'єкції тваринам пегельованої форми антибіотика енрофлораксацину, порівняно з традиційною, у крові встановлено нижчий вміст ТБК-активних продуктів і фізіологічно вищу активність СОД, каталази та ГПО, що слід розцінювати як гальмування процесів ПОЛ і стабільний перебіг антиоксидантного захисту організму.

8. Дослідження функціонального стану печінки щурів показало, що у сироватці крові дослідних груп вміст загального білірубину був вищим від контрольних, водночас вміст холестеролу та альбуміну протягом проведення експерименту мало відрізнявся між контрольними та дослідними тваринами, а за введення пегельованого антибіотика енрофлораксацину дані показники були фізіологічно вищими, що може вказувати на добру холестерол- та протеїнсинтезувальну функцію гепатоцитів.

9. У сироватці крові щурів, які отримували традиційний антибіотик енрофлоксацин, активність ензимів (АлАТ, АсАТ, ГГТП, ЛФ) трималася високою протягом трьох тижнів експерименту, водночас за введення пегельованого антибіотика енрофлоксацину показники були нижчими, а висока активність АсАТ у крові дослідних тварин протягом експерименту може бути пов'язана з активним проникненням введених речовин у клітини і мітохондрії, де даний ензим має високу активність.

10. Гістологічні дослідження тканин печінки показали, що пегелювання енрофлоксацину знижує гепатотоксичність, оскільки за застосування пегельованого антибіотика енрофлоксацину зміни структури гепатоцитів реєструються через 7-ім діб після закінчення введення, а за ін'єкції традиційної форми антибіотика енрофлоксацину морфологічні порушення паренхіми встановлювали на 7-му, 14-ту та 21-шу доби.

11. За застосування щурам традиційної форми антибіотика енрофлоксацину гістологічні зміни структури нирок встановлено протягом 21-го дня після введення препарату, водночас внутрішньом'язової ін'єкції пегельованого антибіотика енрофлоксацину спричиняли незначні зміни структури нирок і лише протягом перших семи діб, а вміст креатиніну у сироватці крові не вказував на порушення екскреторної функції нирок протягом всього часу експерименту, що вказує на позитивний вплив пегелювання на зменшення нефротоксичності антибіотика енрофлоксацину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

Методичні вказівки по визначенню бактеріостатичної та бактерицидної концентрації антибактеріальних препаратів методом серійних розведень (затверджені науково-технічною радою ДДВМ України Міністерства агрополітики України від 19.12.2002 р.) – Київ, 2007.

M31-S1 Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. – Vol. 24 – No. 17.

У цьому документі встановлені критерії інтерпретації отриманих результатів МІК.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72–80.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
2. Shaker, M. A., & Shaaban, M. I. (2017). Formulation of carbapenems loaded gold nanoparticles to combat multi-antibiotic bacterial resistance: *In vitro* antibacterial study. *International journal of pharmaceutics*, 525(1), 71–84.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.01>
3. Luo, Y., Hossain, M., Wang, C., Qiao, Y., An, J., Ma, L., & Su, M. (2013). Targeted nanoparticles for enhanced X-ray radiation killing of multidrug-resistant bacteria. *Nanoscale*, 5(2), 687–694. <https://doi.org/10.1039/c2nr33154c>
4. Andersson, D. I., Balaban, N. Q., Baquero, F., Courvalin, P., Glaser, P., Gophna, U., Kishony, R., Molin, S., & Tonjum, T. (2020). Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality. *FEMS microbiology reviews*, 44(2), 171–188. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa001>
5. Hemeg H. A. (2017). Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *International journal of nanomedicine*, 12, 8211–8225.

<https://doi.org/10.2147/IJN.S132163>

6. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам. (2001) Женева: ВОЗ. URL:

<https://apps.who.int/iris/handle/10665/91617>.

7. Chakraborty, N., Jha, D., Roy, I., Kumar, P., Gaurav, S. S., Marimuthu, K., Ng, O. T., Lakshminarayanan, R., Verma, N. K., & Gautam, H. K. (2022). Nanobiotics against antimicrobial resistance: harnessing the power of nanoscale materials and technologies. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 375.

<https://doi.org/10.1186/s12951-022-01573-9>

8. Gupta, A., Landis, R. F., & Rotello, V. M. (2016). Nanoparticle-Based Antimicrobials: Surface Functionality is Critical. *F1000Research*, 5, F1000 Faculty Rev-364. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7595.1>

9. Martinho, Nuno. (2011). Recent Advances in Drug Delivery Systems. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 02. 510–526.

<https://doi.org/10.4236/jbmb.2011.225062>.

10. Martinho, N., Damgé, C., Reis, C.P. (2011). Recent advances in drug delivery systems. *J. Biomater. Nanobiotechnol*, 2(5), 510–526.

<https://doi.org/10.4236/jbmb.2011.225062>

11. Cheng, C. J., Tietjen, G. T., Saucier-Sawyer, J. K., & Saltzman, W. M. (2015). A holistic approach to targeting disease with polymeric nanoparticles. *Nature reviews. Drug discovery*, 14(4), 239–247. <https://doi.org/10.1038/nrd4503>

12. Chen, D., Wand, L. S J. (2015). Nanofibers used for delivery of antimicrobial agents. *Nanomedicine (Lond)* , 10, 1959–1971.

13. Mignani, S., El Kazzouli, S., Bousmina, M., & Majoral, J. P. (2013). Expand classical drug administration ways by emerging routes using dendrimer drug delivery systems: a concise overview. *Advanced drug delivery reviews*, 65(10), 1316–1330. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.01.001>

14. Zhang, L., Pornpattananangku, D., Hu, C. M., & Huang, C. M. (2010). Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Current medicinal chemistry*, 17(6), 585–594. <https://doi.org/10.2174/092986710790416290>
15. Radomska, A., Leszczyszyn, J., & Radomski, M. W. (2016). The Nanopharmacology and Nanotoxicology of Nanomaterials: New Opportunities and Challenges. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*, 25(1), 151–162.
<https://doi.org/10.17219/acem/60879>
16. Chekh, B. O., Ferens, M. V., OstapiV, D. D., Samaryk, V. Y., Varvarenko, S. M., & Vlizlo, V. V. (2017). Characteristics of novel polyme rbased on pseudopolyamino acids GluLa-DPG-PEG600: binding of albumin, biocompatibility, biodistribution and potentialcrossing the blood-brain barrier in rats. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 89(4), 13– 21.
<https://doi.org/10.15407/ubj89.04.013>
17. Kanikkannan, N. (2018). Technologies to Improve the Solubility, Dissolution and Bioavailability of Poorly Soluble Drugs. *J Anal Pharm Res* 7(1), 00198. <https://doi.org/10.15406/japlr.2018.07.00198>
18. Mozar, F.S., & Chowdhury, E.H. (2018). Impact of PEGylated Nanoparticles on Tumor Targeted Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 24, 3283. <https://doi.org/10.2174/13816128246661807301617211>
19. Wang, J., Li, S., Han, Y., Guan, J., Chung, S., Wang, C., & Li, D. (2018). Poly(Ethylene Glycol)-Polylactide Micelles for Cancer Therapy. *Frontiers in pharmacology*, 9, 202. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00202>
20. Kozak, M., Mitina, N., Zaichenko, A., & Vlizlo, V. (2020). Anionic Polyelectrolyte Hydrogel as an Adjuvant for Vaccine Development. *Scientia Pharmaceutica*, 88, 56. <https://doi.org/10.3390/scipharm88040056>
21. Katarey, D., & Verma, S. (2016). Drug-induced liver injury. *Clinical medicine (London, England)*, 16(Suppl 6), s104–s109.
<https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-6-s104>

22. Chernushkin, B.O., Vlizlo, V.V., Slivinska, L.G., Gutyj, B.V., Shcherbatyy, A.R., Maksymovych, I.A., Leno, M.I., Rusyn, V.I., Lychuk, M.H., Fedorovych, V.L., Lukashchuk, B.O., Zinko, H.O., & Prystupa, O.I. (2020). Treatment strategies for sheep with acute yellow atrophy of the liver caused by the fasciolosis. *Ukrainian Journal of Ecology*, 10(2), 294–301.
https://doi.org/10.15421/2020_100.
23. Посохова, К.А., Вікторів, О.П. (2005). Антибіотики (властивості, застосування, взаємодія): Навчальний посібник. Тернопіль: ТДМУ. 2005. ISBN 966-673-056-1
24. Fruehauf, J. P., & Meyskens, F. L., Jr (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death?. *Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(3), 789–794.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2082>
25. Vlizlo, V., Iskra, R., Maksymovych, I., & Berezovsky, R. (2014). The system of erythrocyte antioxidant protection in piggery as affected by ferrous citrate. *British Journal of Science, Education and Culture*, 1(5), 44–49.
26. Vlizlo, V., Iskra, R., Maksymovych, I., Lis, M., & Niedziolka, J. (2014). Disturbance of antioxidant protection and natural resistance factors in rats with different availability of trivalent chromium (CrIII). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38, 138–144. <https://doi.org/10.3906/vet-1305-44>
27. Babak, O. (2008). Drug-induced hepatopathies: theory and practice. *Medicines of Ukraine*, 4, 83–88.
28. Яковлева, О.О., Іванова, С.А., Семененко І.Ф. та ін. (2012). Тактика вибору антибіотиків. Навчальний посібник. Вінниця: Нова книга, 220 .
29. Мамчур, В.И., Хомяк, Е. В., Опрышко В.И., Хомяк, В. И., Сквирская, К. А., Шпак, Л. И., & Бережная, Л. Б. (2012). Антибиотики: возрастные аспекты нефротоксичности. *Буковинський медичний вісник*, 16(3 (63) Р. 2), 155-156.
30. Cook MA, Wright GD. The past, present, and future of antibiotics. *Sci Transl Med*. 2022 Aug 10;14(657):eabo7793.

<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo7793>

31. Penesyan, A. et al. (2015). Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(4), 5286–98. <https://doi.org/10.3390/molecules20045286>.
32. Swamy, M. K., & Rudra murthy, G. R. (2016). Antimicrobial agents: current status and future challenges. *Austin Pharmacol Pharm*, 1(1), 1004.
33. Zong TX, Silveira AP, Morais JAV, Sampaio MC, Muehlmann LA, Zhang J, Jiang CS, Liu SK. Recent Advances in Antimicrobial Nano-Drug Delivery Systems. *Nanomaterials (Basel)*. 2022 May 29;12(11):1855. <https://doi.org/10.3390/nano12111855>
34. Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*, 10(4), 369–378.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
35. Cusimano, M. G., Schillaci, D. (2016). Time for Action in the Struggle against Antibiotic-Resistance, Let`s Start Reducing or Replacing Antibiotics in Agriculture. *J Microb Biochem Technol*, 8, 6.
<https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000334>.
36. Velez, R., & Sloand, E. (2016). Combating antibiotic resistance, mitigating future threats and ongoing initiatives. *Journal of clinical nursing*, 25(13-14), 1886–1889. <https://doi.org/10.1111/jocn.13246>
37. Akova M. (2016). Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence*, 7(3), 252–266.
<https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1159366>
38. Tacconelli, E. (2017). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development.
39. Munita, J.M., Arias, C.A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 4(2), 10.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF>

40. Padiyara, P., Inoue, H., Sprenger, M. (2018). Global Governance Mechanisms to Address Antimicrobial Resistance. *Infectious Diseases*, 11, 11.
<https://doi.org/10.1177/1178633718767887>
41. Mendelson, M., & Matsoso, M. P. (2015). The World Health Organization Global Action Plan for antimicrobial resistance. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*, 105(5), 325.
<https://doi.org/10.7196/samj.9644>
42. Ardal, C., Outtersen, K., Hoffman, S.J., Ghafur, A., Sharland, M., Ranganathan, N. et al. (2016). International cooperation to improve access to and sustain effectiveness of antimicrobials. *Lancet*, 387(10015), 296–307.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00470-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00470-5)
43. Wernli, D., Jørgensen, P. S., Harbarth, S., Carroll, S. P., Laxminarayan, R., Levrat, N., Røttingen, J. A., & Pittet, D. (2017). Antimicrobial resistance: The complex challenge of measurement to inform policy and the public. *PLoS medicine*, 14(8), e1002378. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002378>
44. Marlieke, E.A. de Kraker, Stewardson, A.J., Harbarth, S. (2016). Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Med*, 13(11), e1002184. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>
45. Gray, D.A., Wenzel, M. (2020). Multitarget Approaches against Multiresistant Superbugs. *ACS Infect. Dis.*, 6, 1346–1365.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00001>
46. Courvalin, P. (2016). Why is antibiotic resistance a deadly emerging disease? *Clin Microbiol Infect*, 22(5), 405-407. 2. Wernli, D., Carroll, S.P., Dunn, R.R., Harbarth, S., Levin, S.A. et al. (2016). Use antimicrobials wisely. *Nature*, 537(7619), 159–161. <https://doi.org/10.1038/537159a>
47. Антибіотикорезистентність. Сучасний погляд на проблему та шляхи подолання: збірник тез міжкафедральної наук.-практ. конф./за заг. ред. В.В. Мінухіна, Т.В. Звягінцевої . (2014). Х. : ХНМУ, 16.

48. Фещенко, Ю. І., Гуменюк, М. І., & Денисов, О. С. (2010). Антибіотикорезистентність мікроорганізмів. Стан проблеми та шляхи її вирішення. *Український хіміотерапевтичний журнал*, (1-2), 4-10.
49. Ezelarab, H., Abbas, S. H., Hassan, H. A., & Abuo-Rahma, G. (2018). Recent updates of fluoroquinolones as antibacterial agents. *Archiv der Pharmazie*, 351(9), e1800141. <https://doi.org/10.1002/ardp.201800141>
50. Jia, Y., & Zhao, L. (2021). The antibacterial activity of fluoroquinolone derivatives: An update (2018-2021). *European journal of medicinal chemistry*, 224, 113741. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113741>
51. Suaifan, G., & Mohammed, A. (2019). Fluoroquinolones structural and medicinal developments (2013-2018): Where are we now?. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 27(14), 3005–3060. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.05.038>
52. Troughon, T., Lefebvre, S. (2016) A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 6(2), 40-58. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2016.62006>
53. Millanao, A. R., Mora, A. Y., Villagra, N. A., Bucarey, S. A., & Hidalgo, A. A. (2021). Biological Effects of Quinolones: A Family of Broad-Spectrum Antimicrobial Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(23), 7153. <https://doi.org/10.3390/molecules26237153>
54. Alvarez, A. I., Pérez, M., Prieto, J. G., Molina, A. J., Real, R., & Merino, G. (2008). Fluoroquinolone efflux mediated by ABC transporters. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(9), 3483–3493. <https://doi.org/10.1002/jps.21233>
55. Claeys, K. C., Hopkins, T. L., Vega, A. D., & Heil, E. L. (2018). Fluoroquinolone Restriction as an Effective Antimicrobial Stewardship Intervention. *Current infectious disease reports*, 20(5), 7. <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0615-z>
56. Державний реєстр лікарських засобів України.
URL:<http://www.drlz.com.ua/>

57. Мороз, О. (2015). Останній кордон антибіотиків: помилки в призначенні фторхінолонів. *Ваше здоров'я*. URL: <https://www.vz.kiev.ua/ostannij-kordon-antibiotikiv-pomilki-vpriznachenni-ftorxinoloniv/>
58. Нетяженко, В.З., Пленова, О. М., Мальчевська, Т. Й. Особливості застосування антибіотиків у сучасних умовах та засади раціональної антибіотикотерапії. *Мистецтво лікування*. URL: <http://m-l.com.ua/?aid=114>.
59. Посохова, К.А., Вікторов, О.П., Мальцев, В.І., Шараєв М.Л. (2002). Фторхінолони (основи ефективного і безпечного застосування). *Новости медицины и фармации*, 2.
60. Чоп'як, В. В., & Федоров, Ю. В. (2005). Особливості застосування фторхінолонів у клінічній практиці. *Клиническая антибиотикотерапия*, 2, 31-33.
61. Bush, N. G., Diez-Santos, I., Abbott, L. R., & Maxwell, A. (2020). Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(23), 5662. <https://doi.org/10.3390/molecules25235662>
62. Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565–1574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
63. Березняков, И.Г. (2004). Фторхинолоны: уникальный класс антибактериальных средств. *Инфекции и антибиотики*. Харьков: Константа, 146-164.
64. Ball, P., Mandell, L., Niki, Y., & Tillotson, G. (1999). Comparative tolerability of the newer fluoroquinolone antibacterials. *Drug safety*, 21(5), 407–421. <https://doi.org/10.2165/00002018-199921050-00005>
65. Березняков, И. Г. (2004). Инфекции и антибиотики. Харьков, Константа, 447.
66. Ezelarab, H., Abbas, S. H., Hassan, H. A., & Abuo-Rahma, G. (2018). Recent updates of fluoroquinolones as antibacterial agents. *Archiv der Pharmazie*, 351(9), e1800141. <https://doi.org/10.1002/ardp.201800141>

67. Temmerman, R., Garmyn, A., Antonissen, G., Vanantwerpen, G., Vanrobaeys, M., Haesebrouck, F., & Devreese, M. (2020). Evaluation of Fluoroquinolone Resistance in Clinical Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Flanders (Belgium). *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(11), 800.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9110800>
68. Temmerman, R., Garmyn, A., Antonissen, G., Vanantwerpen, G., Vanrobaeys, M., Haesebrouck, F., & Devreese, M. (2020). Evaluation of Fluoroquinolone Resistance in Clinical Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Flanders (Belgium). *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(11), 800.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9110800>
69. Чекман, І.С., Горчакова, Н.О., Туманов, В.А. та ін. (2001). Фармакологія. Підручник. Київ. Вища шк., 598.
70. Vieira, L. M., de Almeida, M. V., Lourenço, M. C., Bezerra, F. A., & Fontes, A. P. (2009). Synthesis and antitubercular activity of palladium and platinum complexes with fluoroquinolones. *European journal of medicinal chemistry*, 44(10), 4107–4111. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.001>
71. Lizondo, M., Pons, M., Gallardo, M., & Estelrich, J. (1997). Physicochemical properties of enrofloxacin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 15(12), 1845–1849. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(96\)02033-x](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(96)02033-x)
72. Tarushi, A., Raptopoulou, C. P., Psycharis, V., Terzis, A., Psomas, G., & Kessissoglou, D. P. (2010). Zinc(II) complexes of the second-generation quinolone antibacterial drug enrofloxacin: Structure and DNA or albumin interaction. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(7), 2678–2685.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.02.021>
73. Yang, B., Li, X. D., Chen, X., Hong, J., Liu, C., Zheng, J. P., Ou, Z. Y., & Yu, D. J. (2022). PK/PD modelling of enrofloxacin against *Glaesserella parasuis* infection in pigs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 45(3), 291–300. <https://doi.org/10.1111/jvp.13055>

74. Martinez, M., McDermott, P., & Walker, R. (2006). Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 172(1), 10–28.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.07.010>
75. Dogan, H., Ocal, H., Safak, T., Kilinc, M.A., Risvanli, A. (2022). Dose related inhibitor effect of enrofloxacin on *in vitro* feline spontaneous myometrial contractility. *Animal Reproduction Science*, 239, 106972.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106972>
76. Nielsen, P., & Gyrd-Hansen, N. (1997). Bioavailability of enrofloxacin after oral administration to fed and fasted pigs. *Pharmacology & toxicology*, 80(5), 246–250. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1997.tb01967.x>
77. Messenger, K. M., Papich, M. G., & Blikslager, A. T. (2012). Distribution of enrofloxacin and its active metabolite, using an *in vivo* ultrafiltration sampling technique after the injection of enrofloxacin to pigs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 35(5), 452–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2011.01338.x>
78. Steinman, A., Britzi, M., Levi, O., Lavy, E., Lichter, A. and Soback, S. (2006). Lack of Effect of Diet on the Pharmacokinetics of Enrofloxacin in Horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29, 67–70.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2006.00717.x>
79. Bertone, A.L., Tremaine, W.H., Macoris, D.G., Simmons, E.J., Ewert, K.M., Herr, L.G. et al. (2000). Effect of Long-Term Administration of an Injectable Enrofloxacin Solution on Physical and Musculoskeletal Variables in Adult Horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217, 1514-1521.
<http://dx.doi.org/10.2460/javma.2000.217.1514>
80. Alfonseca-Silva, E., Cruz-Villa, J. C., Gutiérrez, L., & Sumano, H. (2021). Successful treatment of recurrent subclinical mastitis in cows caused by enrofloxacin resistant bacteria by means of the sequential intramammary infusion

- of enrofloxacin HCl-2H₂O and ceftiofur HCl: a clinical trial. *Journal of veterinary science*, 22(6), e78. <https://doi.org/10.4142/jvs.2021.22.e78>
81. Suojala, L., Simojoki, H., Mustonen, K., Kaartinen, L., Pyörälä, S. (2010). Efficacy of Enrofloxacin in the Treatment of Naturally Occurring Acute Clinical *Escherichia coli* Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 93, 1960-1969. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2462>
82. Otker, H. M., & Akme Mehmet-Balcioğlu, I. (2005). Adsorption and degradation of enrofloxacin, a veterinary antibiotic on natural zeolite. *Journal of hazardous materials*, 122(3), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.03.005>
83. Huff, W.E., Huff, G.R., Rath, N.C., Balog, J.M. and Donoghue, A.M. (2004). Therapeutic Efficacy of Bacteriophage and Baytril (Enrofloxacin) Individually and in Combination to Treat Colibacillosis in Broilers. *Poultry Science*, 83, 1944-1947. <http://dx.doi.org/10.1093/ps/83.12.1944>
84. Luan, Y., Chen, K., Zhao, J., Cheng, L. (2022). Comparative Study on Synergistic Toxicity of Enrofloxacin Combined with Three Antibiotics on Proliferation of THLE-2 Cell. *Antibiotics*, 11, 394. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030394>.
85. De, R., Mahata, M. K., & Kim, K. T. (2022). Structure-Based Varieties of Polymeric Nanocarriers and Influences of Their Physicochemical Properties on Drug Delivery Profiles. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 9(10), e2105373. <https://doi.org/10.1002/advs.202105373>
86. Heffeter, P., Riabtseva, A., Senkiv, Y., Kowol, C. R., Körner, W., Jungwith, U., Mitina, N., Keppler, B. K., Konstantinova, T., Yanchuk, I., Stoika, R., Zaichenko, A., & Berger, W. (2014). Nanoformulation improves activity of the (pre)clinical anticancer ruthenium complex KP1019. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(5), 877–884. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1763>
87. Riabtseva, A., Mitina, N., Boiko N. et al. (2012). Structural and Colloidal-Chemical Characteristics of Nanosized Drug Delivery Systems Based on Pegylated Comb-like Carriers. *Chemistry and Chem. Technol.*, 6(3), 291–295.

88. Li, Y., Ogris, M., Wagner E. et al. (2003). Nanoparticles bearing polyethyleneglycol-coupled transferring as gene carriers: preparation and *in vitro* evaluation . *Int. J. Pharm*, 259, 93–101. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(03\)00211-4](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(03)00211-4).
89. Panyam, J., Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55, 329–347. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00228-4](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00228-4)
90. Alvarez-Roman, R., Naik, A., Kalia, Y. N. et al. (2004). Enhancement of Topical Delivery from Biodegradable Nanoparticles . *Pharm. Res*, 21(10), 1818–1825. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000045235.86197.ef>
91. Телегєєва, П. Г., Єфременко, Д. С., Телегєєв, Г. Д., Малюта С. С.(2013). Застосування наночастинок у біомедицині. *Біотехнологія*, 6(2), 21–32. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/biot_2013_6_2_4.
92. Igarashi E. (2008). Factors affecting toxicity and efficacy of polymeric nanomedicines. *Toxicology and applied pharmacology*, 229(1), 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.02.007>
93. Yadav, D., & Dewangan, H. K. (2021). PEGYLATION: an important approach for novel drug delivery system. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 32(2), 266–280. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1825304>
94. Ensing, B., Tiwari, A., Tros, M., Hunger, J., Domingos, S. R., Pérez, C., Smits, G., Bonn, M., Bonn, D., & Woutersen, S. (2019). On the origin of the extremely different solubilities of polyethers in water. *Nature communications*, 10(1), 2893. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10783-z>
95. Webster, R., Didier, E., Harris, P., Siegel, N., Stadler, J., Tilbury, L., & Smith, D. (2007). PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 35(1), 9–16. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.012419>
96. Lentz B. R. (2007). PEG as a tool to gain insight into membrane fusion. *European biophysics journal : EBJ*, 36(4-5), 315–326.

<https://doi.org/10.1007/s00249-006-0097-z>

97. Dreborg, S., & Akerblom, E. B. (1990). Immunotherapy with monomethoxypolyethylene glycol modified allergens. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 6(4), 315–365.

98. Jevsevar, S., Kunstelj, M., & Porekar, V. G. (2010). PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnology journal*, 5(1), 113–128.

<https://doi.org/10.1002/biot.200900218>

99. Zhang, L., Gu, F. X., Chan, J. M., Wang, A. Z., Langer, R. S., & Farokhzad, O. C. (2008). Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 83(5), 761–769.

<https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100400>

100. Дронь, І. А., Винницька, С. І., Олекса, В. В., Хом'як, С. В., & Остапів, Д. Д. (2018). Синтез і дослідження антибактеріальної активності пегільованих енрофлораксацинів. *Вісник Національного університету Львівська політехніка. Хімія, технологія речовин та їх застосування*, (886), 47-51.

101. Сусол, Н., Петрух, І., Чех, Б., Остапів, Д., Влізло В. (2016). Гематологічні та біохімічні показники крові лабораторних щурів за введення ново-синтезованих полімерних носіїв олігодезоксинуклеотидів. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. Серія: Біологічні науки*, 12, 224-229.

URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nvnu_2016_12_39.

102. Кобилінська, Л. І., Патерега, І. П., Рябцева, А. О., Мітіна, Н. Є., Заіченко, О. С., Коцюмбас, І. Я., Зіменковський, Б. С., Стойка Р. С. (2014). Показники гострої токсичності пегвмісного полімерного наноносія у білих лабораторних мишей і щурів. *Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки*, 3-4, 43-48.

URL: <http://protox.medved.kiev.ua/index.php/ua/issues/2014/3-4/item/417-study-of-acute-toxicity-of-nanosized-drug-delivery-system-based-on-pegylated-comb-like-carriers-in-white-laboratory-rats-and-mice>

103. Abuchowski, A., McCoy, J. R., Palczuk, N. C., van Es, T., & Davis, F. F. (1977). Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *The Journal of biological chemistry*, 252(11), 3582–3586.
104. Abuchowski, A., van Es, T., Palczuk, N. C., & Davis, F. F. (1977). Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *The Journal of biological chemistry*, 252(11), 3578–3581.
105. Okahata, Y., Mori, T. (1997). Lipid-coated enzymes as efficient catalysts in organic media. *Trends. Biotechnol.*, 15(2), 50–54.
[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)84203-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)84203-5)
106. Moghimi, S. M., & Szebeni, J. (2003). Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progress in lipid research*, 42(6), 463–478.
[https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(03\)00033-x](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(03)00033-x)
107. Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., Ensign, L. M. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 99(Pt A), 28-51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>
108. Senkiv, Y., Ryabtseva, A., Heffeter, P., Boiko, N., Kowol, C. R., Jungwith, U., Shlyakhtina, Y., Garasevych, S. G., Mitina, N., Berger, W., Zaichenko, A., & Stoika, R. (2014). Enhanced anticancer activity and circumvention of resistance mechanisms by novel polymeric/ phospholipidic nanocarriers of doxorubicin. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(7), 1369–1381.
<https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1864>
109. Senkiv, Y., Ryabtseva, A., Heffeter, P., Boyko, N., Shlyakhtina, Y., Mitina, N., Berger, V., Zaichenko, O. S., Stoika, R. S. (2012). Immobilization of doxorubicin on oligoelectrolyte polymeric VEPGMA-PEG carrier enhances delivery of this anticancer agent in tumor cells and efficiency of its cytotoxic action. *Studia Biologica*, 6(2), 1-12.
<http://dx.doi.org/10.30970/sbi.0602.225>

110. Bharali, D. J., Khalil, M., Gurbuz, M., Simone, T. M., & Mousa, S. A. (2009). Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers. *International journal of nanomedicine*, 4, 1–7.
111. Soultan, A. H., Lambrechts, D., Verheyen, T., Gorp, H. V., Maarten B.J., Roeffaers, M. S., Wim M. De Borggraeve, Patterson, J. (2019). Nanocarrier systems assembled from PEGylated hyperbranched poly(arylene oxindole). *European Polymer Journal*, 119, 247-259.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.07.029>
112. Delgado, C., Francis, G. E., & Fisher, D. (1992). The uses and properties of PEG-linked proteins. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 9(3-4), 249–304.
113. Glue, P., Rouzier-Panis, R., Raffanel, C., Sabo, R., Gupta, S. K., Salfi, M., Jacobs, S., & Clement, R. P. (2000). A dose-ranging study of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin in chronic hepatitis C. The Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 32(3), 647–653.
<https://doi.org/10.1053/jhep.2000.16661>
114. Hershfield, M. S., Buckley, R. H., Greenberg, M. L., Melton, A. L., Schiff, R., Hatem, C., Kurtzberg, J., Markert, M. L., Kobayashi, R. H., & Kobayashi, A. L. (1987). Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase. *The New England journal of medicine*, 316(10), 589–596. <https://doi.org/10.1056/NEJM198703053161005>
115. Avgoustakis K. (2004). Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Current drug delivery*, 1(4), 321–333.
<https://doi.org/10.2174/1567201043334605>
116. Otsuka, H., Nagasaki, Y., & Kataoka, K. (2003). PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 55(3), 403–419. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00226-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00226-0)

117. Filpula, D., & Zhao, H. (2008). Releasable PEGylation of proteins with customized linkers. *Advanced drug delivery reviews*, 60(1), 29–49.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.02.001>
118. Hinds, K. D. (2005). Protein conjugation, cross-linking, and PEGylation. *Biomaterials for Delivery and Targeting of Proteins and Nucleic Acids*, 119–185.
119. Inada, Y., Furukawa, M., Sasaki, H., Kodera, Y., Hiroto, M., Nishimura, H., & Matsushima, A. (1995). Biomedical and biotechnological applications of PEG- and PM-modified proteins. *Trends in biotechnology*, 13(3), 86–91.
[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)88912-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)88912-X)
120. Sundy, J. S., Ganson, N. J., Kelly, S. J., Scarlett, E. L., Rehrig, C. D., Huang, W., & Hershfield, M. S. (2007). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous PEGylated recombinant mammalian urate oxidase in patients with refractory gout. *Arthritis and rheumatism*, 56(3), 1021–1028.
<https://doi.org/10.1002/art.22403>
121. McNeil S. E. (2009). Nanoparticle therapeutics: a personal perspective. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 1(3), 264–271.
<https://doi.org/10.1002/wnan.6>
122. Mishra, P., Nayak, B., Dey, R.K. (2016). PEGylation in anticancer therapy: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, 337–348.
<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.08.011>
123. Swierczewska, M., Lee, K. C., & Lee, S. (2015). What is the future of PEGylated therapies? *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 20(4), 531–536.
<https://doi.org/10.1517/14728214.2015.1113254>
124. Li, W., Zhan, P., Erik De Clercq, Xinyong, L., Liu, H. (2013). Current drug research on PEGylation with small molecular agents. *Progress in Polymer Science*, 38 (3–4), 2013, 421–444. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.07.006>
125. Rafiei, P., Haddadi, A. (2017). Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetic and biodistribution profile. *Int J Nanomedicine*, 12, 935–947. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121881>

126. Benincasa, M., Zahariev, S., Pelillo, C., Milan, R., Gennaro, A., Scocchi, M. (2015). PEGylation of the peptide Bac7(1–35) reduces renal clearance while retaining antibacterial activity and bacterial cell penetration capacity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 95, 210–219.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.028>
127. Manteghi, R., Pallagi, E., Olajos, G., Csóka, Ildikó. (2020). Pegylation and formulation strategy of Anti-Microbial Peptide (AMP) according to the quality by design approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 144, 105–197.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105197>
128. Milla, P., Dosio, F., & Cattel, L. (2012). PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. *Current drug metabolism*, 13(1), 105–119. <https://doi.org/10.2174/138920012798356934>
129. Omolo, C. A., Kalhapure, R. S., Jadhav, M., Rambharose, S., Mocktar, C., Ndesendo, V. M., & Govender, T. (2017). Pegylated oleic acid: A promising amphiphilic polymer for nano-antibiotic delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 112, 96–108.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.11.022>
130. Monfardini, C., Schiavon, O., Caliceti, P., Morpurgo, M., Harris, J. M., & Veronese, F. M. (1995). A branched monomethoxypoly(ethylene glycol) for protein modification. *Bioconjugate chemistry*, 6(1), 62–69.
<https://doi.org/10.1021/bc00031a006>
131. Deshmukh, A. S., Chauhan, P. N., Noolvi, M. N., Chaturvedi, K., Ganguly, K., Shukla, S. S. et al. (2017). Polymeric micelles: basic research to clinical practice. *Int. J. Pharm.*, 532, 249–268.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.005>
132. Tang, W., Zhang, Z., Li, Ch., Chu, Yu., Qian, J., Ying, T., Lu W., Zhan, C. (2021). Facile Separation of PEGylated Liposomes Enabled by Anti-PEG scFv. *Nano Lett.*, 21 (23), 10107–10113. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c03946>

133. Gabizon, A., Szebeni, J. (2020). Complement Activation: A Potential Threat on the Safety of Poly(ethylene glycol)-Coated Nanomedicines. *ACS Nano* , 14 (7), 7682–7688. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03648>
134. Scott, M. D., Bradley, A. J., & Murad, K. L. (2000). Camouflaged blood cells: low-technology bioengineering for transfusion medicine?. *Transfusion medicine reviews*, 14(1), 53–63. [https://doi.org/10.1016/s0887-7963\(00\)80115-7](https://doi.org/10.1016/s0887-7963(00)80115-7)
135. Edwards C. K., 3rd (1999). PEGylated recombinant human soluble tumour necrosis factor receptor type I (r-Hu-sTNF-RI): novel high affinity TNF receptor designed for chronic inflammatory diseases. *Annals of the rheumatic diseases*, 58 Suppl 1(Suppl 1), I73–I81. <https://doi.org/10.1136/ard.58.2008.i73>
136. Kozlowski, A., & Harris, J. M. (2001). Improvements in protein PEGylation: pegylated interferons for treatment of hepatitis C. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 72(1-3), 217–224. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00277-2](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00277-2)
137. Bareford, L. M., & Swaan, P. W. (2007). Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 59(8), 748–758. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.06.008>
138. Torchilin V. P. (2008). Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers. *Advanced drug delivery reviews*, 60(4-5), 548–558. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.10.008>
139. Xiaodong, L., Shi, W., Yuhang, D., Yafang, Z., Xin, W., Guoqing, Y., Jun, W., Rupei, T. (2021). Dynamic methotrexate nano-prodrugs with detachable PEGylation for highly selective synergistic chemotherapy. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 201, 111619. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111619>
140. Pasut, G., Sergi, M., & Veronese, F. M. (2008). Anti-cancer PEG-enzymes: 30 years old, but still a current approach. *Advanced drug delivery reviews*, 60(1), 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.018>
141. Momoh, M. A., Esimone, C. O. (2012). Phospholipon 90H (P90H)-based PEGylated microscopic lipospheres delivery system for gentamicin: an antibiotic

- evaluation. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(11), 889–894. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60248-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60248-2).
142. Mohamed, S., Parayath, N. N., Taurin, S., & Greish, K. (2014). Polymeric nano-micelles: versatile platform for targeted delivery in cancer. *Therapeutic delivery*, 5(10), 1101–1121. <https://doi.org/10.4155/tde.14.69>
143. Cheng, Y., Ji, Y. (2019). RGD-modified polymer and liposome nanovehicles: recent research progress for drug delivery in cancer therapeutics. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 128, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.11.023>
144. Zhang, J., Li, S., & Li, X. (2009). Polymeric nano-assemblies as emerging delivery carriers for therapeutic applications: a review of recent patents. *Recent patents on nanotechnology*, 3(3), 225–231. <https://doi.org/10.2174/187221009789177803>
145. Octavia, Y., Tocchetti, C. G., Gabrielson, K. L., Janssens, S., Crijns, H. J., & Moens, A. L. (2012). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 52(6), 1213–1225.
146. Zhang, Y., Huang, Y., Zhao, W., Lu, J., Zhang, P., Zhang, X. et al. (2014). Fmoc-conjugated PEG-vitamin E2 micelles for tumor-targeted delivery of paclitaxel: enhanced drug-carrier interaction and loading capacity. *AAPS J.*, 16, 1282–1291. DOI: 10.1208/s12248-014-9651-2.
147. Biswas, S., Kumari, P., Lakhani, P. M., Ghosh, B. (2016). Recent advances in polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 83, 184–202. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.031>
148. Gothwal, A., Khan, I., Gupta, U. (2016). Polymeric micelles: recent advancements in the delivery of anticancer drugs. *Pharm. Res.*, 33, 18–39. <https://doi.org/10.1007/s11095-015-1784-1>
149. Li, Y., Liu, Q., Li, W., Zhang, T., Li, H., Li, R. et al. (2016). Design and validation of PEG-derivatized vitamin E copolymer for drug delivery into breast cancer. *Bioconjug. Chem.*, 27, 1889–1899.

<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00292>

150. Yang, Q., Ma, Y., Zhao, Y. et al. (2013). Accelerated drug release and clearance of PEGylated epirubicin liposomes following repeated injections: a new challenge for sequential low-dose chemotherapy. *Int J Nanomedicine*, 8, 1257–1268. <https://doi.org/10.2147/IJN.S41701>

151. Alavi, S. E., Esfahani, M. K. M., Raza, A., Adelnia, H., Shahmabadi, H. E. (2022). PEG-grafted liposomes for enhanced antibacterial and antibiotic activities: An *in vivo* study. *NanoImpact*, 25, 100384.

<https://doi.org/10.1016/j.impact.2022.100384>

152. Qi, W., Joshi, S., Weber, C.R., Wali, R.K., Roy, H.K., Savkovic, S.D. (2011). Polyethylene glycol diminishes pathological effects of *Citrobacter rodentium* infection by blocking bacterial attachment to the colonic epithelia. *Gut Microbes*, 2(5), 267–273. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.5.18256>.

153. Мітіна, Н. Є. (2017). Синтез поліпероксидів блочної та розгалуженої будови і супрамолекулярні структури на їх основі : автореф. дис. д-ра хім.наук: 02.00.06. Львів, 40.

154. Si, Z., Zheng, W., Prananty, D., Li, J., Koh, C. H., Kang, E. T., Pethe, K., & Chan-Park, M. B. (2021). Polymers as advanced antibacterial and antibiofilm agents for direct and combination therapies. *Chemical science*, 13(2), 345–364. <https://doi.org/10.1039/d1sc05835e>

155. Cheow, W. S., Chang, M. W., & Hadinoto, K. (2010). Antibacterial efficacy of inhalable levofloxacin-loaded polymeric nanoparticles against *E. coli* biofilm cells: the effect of antibiotic release profile. *Pharmaceutical research*, 27(8), 1597–1609. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0142-6>

156. Duncan, R. et al. (2001). Polymer-drug conjugates, PDEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 74(1–3), 135–146. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00328-5](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00328-5).

157. León-Buitimea, A., Garza-Cárdenas, C. R., Román-García, M. F., Ramírez-Díaz, C. A., Ulloa-Ramírez, M., & Morones-Ramírez, J. R. (2022). Nanomaterials-Based Combinatorial Therapy as a Strategy to Combat Antibiotic Resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(6), 794.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11060794>
158. Mba, I. E., & Nweze, E. I. (2021). Nanoparticles as therapeutic options for treating multidrug-resistant bacteria: research progress, challenges, and prospects. *World journal of microbiology & biotechnology*, 37(6), 108.
<https://doi.org/10.1007/s11274-021-03070-x>
159. Morris, C.J. (2012). Pegylation of antimicrobial peptides maintains the active peptide conformation, model membrane interactions, and antimicrobial activity while improving lung tissue biocompatibility following airway delivery. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(6), 3298–3308.
<https://doi.org/10.1128/AAC.06335-11>.
160. Raza, A., Kamato, D., Sime, F.B., Roberts, J.A., Popat, A., Falconer, J.R., Kumeria, T. (2022). Influence of PEGylated porous silicon nanoparticles on permeation and efflux of an orally administered antibiotic. *Materials Today Advances*, 13, 100–210. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2022.100210>
161. Joann, G., John, R., Clegg, L. A., Heersema, N. A. (2020). Peppas, and Hugh D. C. Smyth. Optimization of Cationic Nanogel PEGylation to Achieve Mammalian Cytocompatibility with Limited Loss of Gram-Negative Bactericidal Activity. *Biomacromolecules*, 21(4), 1528–1538.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00081>
162. Lam, A.K., Moen, E.L., Pusavat, J., Wouters, C.L., Panlilio, H., Ferrell, M.J., Houck, M.B., Glatzhofer, D.T., Rice, C.V. (2020). PEGylation of Polyethylenimine Lowers Acute Toxicity while Retaining Anti-Biofilm and β -Lactam Potentiation Properties against Antibiotic-Resistant Pathogens. *ACS Omega*, 29, 5(40), 26262–26270. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04111>

163. Spellberg, B. (2004). Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38(9), 1279–1286. <https://doi.org/10.1086/420937>
164. Lam, A. K. et al. (2020). PEGylation of Polyethylenimine Lowers Acute Toxicity while Retaining Anti-Biofilm and β -Lactam Potentiation Properties against Antibiotic-Resistant Pathogens. *ACS omega*, 5(40), 26262–26270. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04111>
165. Dennison, S. R., Reddy, S. M., Morton, L. H.G., Harris, F., Badiani, K., Phoenix, D. A. (2022). PEGylation enhances the antibacterial and therapeutic potential of amphibian host defence peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1864(1), 183806. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183806>
166. Panlilio, H., Lam, A.K., Heydarian, N., Haight, T., Wouters, C.L., Moen, E.L., Rice, C.V. (2021). Dual-Function Potentiation by PEG-BPEI Restores Activity of Carbapenems and Penicillins against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *ACS Infect. Dis.*, 7(6), 1657–1665. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00863>
167. Bhattacharya, S., Sen, D., Bhattacharjee, C. (2019). *In vitro* antibacterial effect analysis of stabilized PEGylated allicin-containing extract from *Allium sativum* in conjugation with other antibiotics. *Process Biochemistry*, 87, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.09.025>
168. Рябцева, А.О., Остапчук, Ю.В., Мітіна, Н.Є., Бойко Н.М., Стойка, Р.С., Заіченко О.С. (2011). Нові поліетиленглікольовмісні олігомерні носії для доставки лікарських засобів. *Збірник тез доповідей III всеукраїнської наукової конференції студентів та аспірантів “Хімічні Каразінські читання – 2011”*. Харків, 115.
169. Imura, Y. et al. (2007). Action mechanism of tachyplesin I and effects of PEGylation. *Biochimica et biophysica acta*, 1768(5), 1160–1169. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.01.005>

170. Ahmadi, Z., Verma, G., Jha, D., Gautam, H.K., Kumar, P. (2018). Evaluation of antimicrobial activity and cytotoxicity of pegylated aminoglycosides. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 33(3), 295–309.
<https://doi.org/10.1177/0883911517739318>.
171. Marslin, G. (2015). PEGylated ofloxacin nanoparticles render strong antibacterial activity against many clinically important human pathogens. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 132, 62–70.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.050>.
172. Schmidt, M., Harmuth, S., Barth, E. R., Wurm, E., Fobbe, R., Sickmann, A., Krumm, C., & Tiller, J. C. (2015). Conjugation of Ciprofloxacin with Poly(2-oxazoline)s and Polyethylene Glycol via End Groups. *Bioconjugate chemistry*, 26(9), 1950–1962. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00393>
173. Bakker-Woudenberg, I.A. (2001). Improved efficacy of ciprofloxacin administered in polyethylene glycol-coated liposomes for treatment of *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(5), 1487–1492. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.5.1487-1492.2001>
174. Jegatheeswaran, S., & Sundrarajan, M. (2015). PEGylation of novel hydroxyapatite/PEG/Ag nanocomposite particles to improve its antibacterial efficacy. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 51, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.02.012>
175. Bahamondez-Canas, T. F., Zhang, H., Tewes, F., Leal, J., & Smyth, H. (2018). PEGylation of Tobramycin Improves Mucus Penetration and Antimicrobial Activity against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms *in Vitro*. *Molecular pharmaceutics*, 15(4), 1643–1652.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00011>
176. Chakrabarty, B., Ghoshal, A.K., Purkait, M.K. (2008). Effect of molecular weight of PEG on membrane morphology and transport properties. *Journal of Membrane Science*, 309, 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.10.027>

177. Chakrabarty, A.K., Ghoshal, M.K. Purkait M.K. Effect of molecular weight of PEG on membrane morphology and transport properties. *Journal of Membrane Science*, 309, 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.10.027>
178. Chekh, B. O., Ferens, M. V., Ostapiv, D. D., Samaryk, V. Y., Varvarenko, S. M., Vlizlo V. V. (2017). Characteristics of novel polymer based on pseudo-polyamino acids GluLa-DPG-PEG600: binding of albumin, biocompatibility, biodistribution and potential crossing the blood-brain barrier in rats. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 89(4), 13-21.
URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/BioChem_2017_89_4_4
179. Levchenko, V. I., Vlizlo, V. V. (2019). Veterinary Clinical Biochemistry. Bila Tserkva, 450 .
180. Biour, M., & Jaillon, P. (1999). Atteintes hépatiques médicamenteuses [Drug-induced hepatic diseases]. *Pathologie-biologie*, 47(9), 928–937.
181. Безопасность лекарств: руководство по фармаконадзору /под ред. А. П. Викторова, В. И. Мальцева, Ю. Б. Білоусова. (2007). К.: МОРИОН, 240 с.
182. Пентюк, О. О., Волощук, Н. І., Машевська, О. В. (2009). Нейфротоксичність лікарських засобів: клінічні прояви, патофізіологічні механізми та підходи до лікування. *Раціональна фармакотерапія*, 1. URL: <https://rpht.com.ua/ua/archive/2009/1%2810%29/pages-21-27/nefrotoksichnist-likarskih-zasobiv-klinichni-proyavi-patofiziologichni-mehanizmi-ta-pidhodi-do-likuvannya>
183. Wu, H., & Huang, J. (2018). Drug-Induced Nephrotoxicity: Pathogenic Mechanisms, Biomarkers and Prevention Strategies. *Current drug metabolism*, 19(7), 559–567.
<https://doi.org/10.2174/1389200218666171108154419>
184. Здвіжков, О.Ю., Бура, М. (2014). Особливості застосування полімерних носіїв на основі поліетиленгліколю для доставки ліків в орган-мішень. *Вісник Львівського університету. Серія Біологічна*, 64, 3-20.
URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU_biol_2014_64_3

185. Caruthers, S. D., Wickline, S. A., & Lanza, G. M. (2007). Nanotechnological applications in medicine. *Current opinion in biotechnology*, 18(1), 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.006>
187. Shehu AI, Ma X, Venkataramanan R. Mechanisms of Drug-Induced Hepatotoxicity. *Clin Liver Dis*. 2017 Feb;21(1):35–54. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.002>. PMID: 27842774
188. Garcia-Cortes, M., Robles-Diaz, M., Stephens, C., Ortega-Alonso, A., Lucena, M. I., & Andrade, R. J. (2020). Drug induced liver injury: an update. *Archives of toxicology*, 94(10), 3381–3407. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02885-1>
189. Zimmerman, H. J. (1999). Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver.
190. Temple, R. J. (2007). Hepatotoxicity through the years: impact on the FDA. URL: <http://www.fda.gov/cder/livertox/Presentations/im1389/sld002.htm>
191. Navarro, V. J., Senior, J.R. (2006). Drug – Related Hepatotoxicity. *N Engl J Med.*, 354(7), 731-739. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052270>
192. Ramadori, G., Cameron, S. (2010). Effects of systemic chemotherapy on the liver. *Annals of hepatology*, 9 (2), 133-43. [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31651-5](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31651-5)
193. Simonov, M., Vlizlo, V. Some blood markers of the functional state of liver in dairy cows with clinical ketosis. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 18 (1), 74–82. <https://doi.org/10.15547/bjvm.814>
194. Rajan, B., Sathish, S., Balakumar, S., & Devaki, T. (2015). Synthesis and dose interval dependent hepatotoxicity evaluation of intravenously administered polyethylene glycol-8000 coated ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticle on Wistar rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 39(2), 727–735. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.01.018>
195. Shakra, M. El-Soudy Abd El-Maqsood, Rawya, M. S. El-Din, Hamouda, S. Y. M., Mohammed, A. A. R., Allah R.A. Abd Al-Rahman. (2019). Hepatotoxicity

- of Bare and Polyethylene Glycol Coated Iron Oxide Nanoparticles and The Protective Role of Virgin Olive Oil in Male Albino Rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 76, 2, 3607–3617. <https://doi.org/10.21608/ejhm.2019.39169>
196. Wan-Seob, C. et al. (2008). Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and applied pharmacology*, 236(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.12.023>
197. Bansal, R., Post, E., Proost, J. H., Alie de Jager-Krikken, Poelstra, K., Prakash, J. (2011). PEGylation improves pharmacokinetic profile, liver uptake and efficacy of Interferon gamma in liver fibrosis. *Journal of Controlled Release*, 154 (3), 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.05.027>
198. Mandalou, E., Spence, E., Datta, S., Mills, P. (2013). Possible toxic hepatitis due to polyethylene glycol during treatment for chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 58, 352. [10.1016/S0168-8278\(13\)60861-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(13)60861-2)
199. Thurairajah, P. H., Thorburn, D., Hubscher, S., White, A., Lai, W. K., O'Donnell, K., & Mutimer, D. (2007). Incidence and characterization of serum transaminases elevations in pegylated interferon and ribavirin treated patients with chronic hepatitis C. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 25(11), 1293–1300. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03322.x>
200. Mishra, P., DeVoss, A., Pai, R., Hart, J., & Jensen, D. M. (2009). Marked flare in hepatic aminotransferases during treatment with pegylated interferon for chronic hepatitis C, genotype 2: a case report. *Digestive diseases and sciences*, 54(6), 1369–1372. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0476-7>
201. Caroleo, B., Gallelli, L., Staltari, O., De Sarro, G., & Guadagnino, V. (2008). Serum transaminase elevations during pegylated interferon treatment of chronic HCV hepatitis probably induced by polyethylene glycol. *Intervirology*, 51(6), 407–409. <https://doi.org/10.1159/000205266>
202. Pestel, S., Martin, H. J., Maier, G.M., Guth, B. (2006). Effect of commonly used vehicles on gastrointestinal, renal, and liver function in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 54(2), 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.02.006>

203. Kim, S. Y., & Moon, A. (2012). Drug-induced nephrotoxicity and its biomarkers. *Biomolecules & therapeutics*, 20(3), 268–272.
<https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.3.268>
204. Яковлева, О.О., Іванова, С.А., Семененко І.Ф. та ін. (2012). Тактика вибору антибіотиків. Вінниця: Нова книга, 220 .
205. Руденко, А.А., Берестовая, Т.Г. (2000). Побочные явления, связанные с особенностями действия антибиотиков в организме человека (классификация, терапия, профилактика) и новые перспективы терапевтической тактики. *Фармакологічний вісник*, 3, 17-22.
206. Morales-Alvarez, M. C. (2020). Nephrotoxicity of Antimicrobials and Antibiotics. *Advances in chronic kidney disease*, 27(1), 31–37.
<https://doi.org/10.1053/j.ackd.2019.08.001>
207. Zelenina O.M., Vlizlo V.V., Ostapiv D.D., Samaryk V.Ja., Dron I.A., Kozak M.P., Kuzmina N.V., Chernushkin B.O., Maksymovych I.A., Leno M.I., Rusyn V.I., Prystupa O.I., Fedorovych V.L., Lukashchuk B.O., Zinko H.O. (2021) PEGylation of antibiotic enrofloxacin and its effects on the state of the antioxidant system in rats. *Ukrainian Journal of Ecology*, 11(1), 202-208.
https://doi.org/10.15421/2020_32
208. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union* L276/33. 86/609/EC. 20.10.2010.
209. Мотузюк, О.П., Хмелькова, А.І., Міщенко І.В. (2017). Практикум з фізіології людини: навч. посіб. К.: Медицина, 160.
210. Влізло, В.В., Федорук, Р.С., Ратич І.Б. та ін. (2012). Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник/за ред. В.В. Влізла. Львів: Сполом, 764.
211. Королюк, М.А., Іванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е (1991). Метод определения активности каталазы, *Лаб. Дело*, 12, 16–19.

212. Методичні вказівки по визначенню бактеріостатичної та бактерицидної концентрації антибактеріальних препаратів методом серійних розведень (2007) (затверджені науково-технічною радою ДДВМ України Міністерства агрополітики України від 19.12.2002 р.), Київ.
213. M31-S1 Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, *Informational Supplement*, 24(17).
214. Horalskiy, L.P., Khomych, V.T., Kononsky, A.I. (2019) Histological techniques and morphological methods in normal and pathological conditions, Zhitomir.
215. Личковський, Е.І., Свердан, П.Л.. (2012) Вища математика. Теорія наукових досліджень у фармації і медицині. Київ: Знання, 476.
216. Janičko, M., Veselíny, E., Leško, D., & Jarčuška, P. (2013). Serum cholesterol is a significant and independent mortality predictor in liver cirrhosis patients. *Annals of hepatology*, 12(4), 581–587.
217. Wright, D. H., Brown, G. H., Peterson, M. L., & Rotschafer, J. C. (2000). Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 46(5), 669–683. <https://doi.org/10.1093/jac/46.5.669>
218. Cohn, L. A., Gary, A. T., Fales, W. H., & Madsen, R. W. (2003). Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 15(4), 338–343. <https://doi.org/10.1177/104063870301500406>
219. Cummings, K. J., Aprea, V. A., & Altier, C. (2014). Antimicrobial resistance trends among *Escherichia coli* isolates obtained from dairy cattle in the northeastern United States, 2004-2011. *Foodborne pathogens and disease*, 11(1), 61–67. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1605>
220. Pereira, R. V., Siler, J. D., Ng, J. C., Davis, M. A., Grohn, Y. T., & Warnick, L. D. (2014). Effect of on-farm use of antimicrobial drugs on resistance in fecal

- Escherichia coli* of preweaned dairy calves. *Journal of dairy science*, 97(12), 7644–7654. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8521>
221. Hewitt, M., Cronin, M. T. D., Enoch, S. J. et al. (2009). In Silico Prediction of Aqueous Solubility: The Solubility Challenge. *J. Chem. Inf. Model*, 49, 2572–2587.
222. Armstead, A. L., & Li, B. (2011). Nanomedicine as an emerging approach against intracellular pathogens. *International journal of nanomedicine*, 6, 3281–3293. <https://doi.org/10.2147/IJN.S27285>
223. Baelo, A., Levato, R., Julián, E., Crespo, A., Astola, J., Gavaldà, J. et al. (2015). Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. *J. Control. Release*, 209, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.04.028>
224. Baptista, P. V., McCusker, M. P., Carvalho, A., Ferreira, D. A., Mohan, N.M., Martins, M. et al. (2018). Nano-strategies to fight multidrug resistant bacteria–“A battle of the Titans”. *Front. Microbiol.*, 9, 1441. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01441>
225. Robinson, B., Islam, K. J., Thurecht, J., Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharm. Res.* 33, 2373–2387. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>
226. Chen, M., Xie, S., Wei, J., Song, X., Ding, Z., Li, X. (2018). Antibacterial micelles with vancomycin-mediated targeting and pH/lipase-triggered release of antibiotics. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 10, 36814–36823. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b16092>
227. Sung, Y.K., Kim, S.W. (2020). Recent advances in polymeric drug delivery systems. *Biomater Res*, 24, 12. <https://doi.org/10.1186/s40824-020-00190-7>
228. Calzoni, E., Cesaretti, A., Polchi, A., Di Michele, A., Tancini, B., Emiliani, C. (2019). Biocompatible Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications in

- Cancer and Neurodegenerative Disorder Therapies. *J Funct Biomater.*, 8, 10(1), 4. <https://doi.org/10.3390/jfb10010004>. PMID: 30626094; PMCID: PMC6463038
229. Ulery, B.D., Nair, L.S., Laurencin, C.T. (2011). Biomedical applications of biodegradable polymers. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.*, 49, 832–864. <https://doi.org/10.1002/polb.22259>
230. Makadia, H.K., Siegel, S.J. (2011). Poly lactic-*co*-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3, 1377–1397. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>
231. Letchford, K., Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: Micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 65, 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.11.009>
232. Rao, J.P., Geckeler, K.E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.*, 36, 887–913. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>
233. Joye, I.J., McClements, D.J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 19, 417–427. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.07.002>
234. Patel, J., Amrutiya, J., Bhatt, P., Javia, A., Jain, M., Misra, A. (2018). Targeted delivery of monoclonal antibody conjugated docetaxel loaded PLGA nanoparticles into EGFR overexpressed lung tumour cells. *J. Microencapsul.*, 35, 204–217. <https://doi.org/10.1080/02652048.2018.1453560>
235. Dennison, S.R., Reddy, S.M., Morton, L.H.G., Harris, F., Badiani, K., Phoenix, D.A. (2022). PEGylation enhances the antibacterial and therapeutic potential of amphibian host defence peptides. *Biochim Biophys Acta Biomembr.*, 1864(1), 183806. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183806>
236. Webber, M. J., Appel, E. A., Vinciguerra, B., Cortinas, A. B., Thapa, L. S., Jhunjunwala, S., Isaacs, L., Langer, R., & Anderson, D. G. (2016). Supramolecular PEGylation of biopharmaceuticals. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 113(50), 14189–14194.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1616639113>
237. Harris, J. M., Chess, R. B. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2, 214221.
<https://doi.org/10.1038/nrd1033>
238. Thakur, S., Kesharwani, P., Tekade, R. K., Jain, N. K. (2015). Impact of pegylation on biopharmaceutical properties of dendrimers. *Polymer*, 59, 67–92, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.12.051>
239. Wang, W., Xiong, W., Zhu, Y., Xu, H., Yang, X. (2010). Protective effect of PEGylation against poly(amidoamine) dendrimer-induced hemolysis of human red blood cells. *J. Biomed. Mater. Res.*, 93, 5964. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31558>
240. Zhang, C., Salick, M. R., Cordie, T. M., Ellingham, T., Dan, Y., Turng, L. S. (2015). Incorporation of poly(ethylene glycol) grafted cellulose nanocrystals in poly(lactic acid) electrospun nanocomposite fibers as potential scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 49, 463–471, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.024>
241. Choi, J., Choi, J. S., Suh, H., Park, J. S. (2001). Effect of Poly(ethylene glycol) Grafting on Polyethylenimine as a Gene Transfer Vector *in vitro*. *Bull. Korean Chem. Soc*, 22, 46–52. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2001.22.1.46>
242. Kim, I.W., Jang, M.D., Ryu, Y.K., Cho, E.H., Lee, Y.K., Park, J.H. (2002). Dipolarity, hydrogen-bond basicity and hydrogen-bond acidity of aqueous poly(ethylene glycol) solutions. *Anal Sci.*, 18(12), 1357–1360.
<https://doi.org/10.2116/analsci.18.1357>. PMID: 12502089.
243. Pintér, G., Horváth, P., Bujdosó, S., Sztaricskai, F., Kéki, S., Zsuga, M., Kardos, S., Rozgonyi, F., & Herczegh, P. (2009). Synthesis and antimicrobial activity of ciprofloxacin and norfloxacin permanently bonded to polyethylene glycol by a thiourea linker. *The Journal of antibiotics*, 62(2), 113–116.
<https://doi.org/10.1038/ja.2008.26>

244. Gonzalez, M., E Vaillard, S., & J Grau, R. (2011). Pegylation: An overview and recent advances reported in the patent literature. *Recent Patents on Chemical Engineering*, 4(3), 241-264. <https://dx.doi.org/10.2174/2211334711104030241>
245. Konstantinos, Z., Vardakas, M.D., Siempos, I.L., Grammatikos, A., Athanassa, Z., Korbila, I.P., Falagas M.E. (2008). Respiratory fluoroquinolones for the treatment of community_acquired pneumonia: a meta_analysis of randomized controlled trials. *CMAJ*, 179(12), 1269-1277.
<https://dx.doi.org/10.1503/cmaj.080358>
246. Gref, R., Domb, A., Quellec, P., Blunk, T., Müller, R.H., Verbavatz, J.M., Langer, R. (1995). The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv Drug Deliv Rev.*, 16(2-3), 215-233.
[https://dx.doi.org/10.1016/0169-409X\(95\)00026-4](https://dx.doi.org/10.1016/0169-409X(95)00026-4)
247. Chen, H., Kim, S., He, W., Wang, H., Low, P. S., Park, K., & Cheng, J. X. (2008). Fast release of lipophilic agents from circulating PEG-PDLLA micelles revealed by *in vivo* forster resonance energy transfer imaging. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 24(10), 5213–5217.
<https://doi.org/10.1021/la703570m>
248. Kang, J., Hossain, M.A., Park, H.C., Kim, Y., Lee, K.J., Park, S.W. (2019). Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration of enrofloxacin against Salmonella Enteritidis after administering to broiler chicken by per-oral and intravenous routes. *J Vet Sci.*, 20(2), 15.
<https://doi.org/10.4142/jvs.2019.20.e15>
249. Проданчук, Г.М. (2015). Створення історичного контролю гематологічних показників периферичної крові щурів Wistar Han. *Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки*, 4, 35-40.
250. Nadithe, V., Mishra, D., Bae, Y.H. (2012). Poly(ethylene glycol) cross-linked hemoglobin with antioxidant enzymes protects pancreatic islets from hypoxic and free radical stress and extends islet functionality. *Biotechnol Bioeng.*, 109(9), 2392-2401. <https://doi.org/10.1002/bit.24501>

251. Alomari, E., Ronda, L., Bruno, S., Paredi, G., Marchetti, M., Bettati, S., Olivari, D., Fumagalli, F., Novelli, D., Ristagno, G., Latini, R., Cooper, C.E., Reeder, B.J., Mozzarelli, A. (2018). High- and low-affinity PEGylated hemoglobin-based oxygen carriers: Differential oxidative stress in a Guinea pig transfusion model. *Free Radic Biol Med.*, 20(124), 299-310.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.018>
252. Preyer, S., & Luckhaupt, H. (1987). Antibiotika und Blutgerinnung-aktuelle Hinweise für den HNO-Arzt [Antibiotics and blood coagulation-current references for the ENT physician]. *Laryngologie, Rhinologie, Otologie*, 66(2), 107–109.
253. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5), 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049>
254. Luo, J., Borgens R., Shi, R. (2002). Polyethyleneglycol immediately repairs neuronal membranes and inhibits free radical production after acute spinal cord injury. *J Neurochem*, 83(2), 471–480.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01160.x>
255. Danchuk, V.V. (2006). Peroxide oxidation in farm animals and birds. Kamyanets-Podilsky: Abetka.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5900814/>
256. Baggio, D., Ananda-Rajah, M.R. (2021). Fluoroquinolone antibiotics and adverse events. *Aust Prescr.*, 44(5), 161–164.
<https://doi.org/10.18773/austprescr.2021.035>.
257. Daneman, N., Lu, H., Redelmeier, D.A. (2015). Fluoroquinolones and collagen associated severe adverse events: a longitudinal cohort study. *BMJ*, 5, e010077. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010077>
258. US Food and Drug Administration. FDA warns about increased risk of ruptures or tears in the aorta blood vessel with fluoroquinolone antibiotics in certain patients: FDA Drug Safety Communication. (2018). URL:

- <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-warns-about-increased-risk-ruptures-or-tears-aorta-blood-vessel-fluoroquinolone-antibiotics>.
259. Etminan, M., Forooghian, F., Brophy, J. M., Bird, S. T., & Maberley, D. (2012). Oral fluoroquinolones and the risk of retinal detachment. *JAMA*, 307(13), 1414–1419. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.383>
 260. Liu, X., Ma, J., Huang, L., Zhu, W., Yuan, P., Wan, R. et al. (2017). Fluoroquinolones increase the risk of serious arrhythmias: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 96, e8273. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008273>
 261. Gorelik, E., Masarwa, R., Perlman, A., Rotshild, V., Abbasi, M., Muszkat, M. et al. (2019). Fluoroquinolones and cardiovascular risk: a systematic review, meta-analysis and network meta-analysis. *Drug Saf.*, 42, 529-538. <https://doi.org/10.1007/s40264-018-0751-2>.
 262. Carvalho, J. R., & Verdelho Machado, M. (2018). New Insights About Albumin and Liver Disease. *Annals of hepatology*, 17(4), 547–560. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.0916>
 263. Shi, L., Zhang J., Zhao, M. et al. (2021). Effects of polyethyleneglycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanoscale*, 13, 10748–10764. <https://doi.org/10.1039/D1NR02065>
 264. Bird, S.T., Etminan, M., Brophy, J.M., Hartzema, A.G., Delaney, J.A. (2013). Risk of acute kidney injury associated with the use of fluoroquinolones. *CMAJ*, 185(10), 475–482. <https://doi.org/10.1503/cmaj.121730>.
 265. Lomaestro, B.M. (2000). Fluoroquinolone-induced kidney injury. *Drug Saf.*, 22, 479–485.
 266. Енрофлоксацин. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/sial/17849>
 267. Amal, A.A. El-Daly. (2013) Histological and histochemical effects of green tea extract on enrofloxacin-induced kidney injury in albino rats. *Egypt. J. Exp. Biol. (Zool.)*, 9, 237–245. URL: <https://www.bibliomed.org/?mno=187402>

268. Moritz, A., Bauer, N., Beelitz P. et al. (2014). Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Stuttgart: *Schattauer*, 934 .
269. Moran, S.M., Myers, B.D. (1985). Course of acuterenal of feature studied by a model of creatininekinetics. *Kidney International.*, 27, 928–937
<https://doi.org/10.1038/ki.1985.101>
270. Rafiq, K., Hirohito, M., Sherajee S. J., Hideki, K., Nishiyama, N., Nishiyama, A. (2015). Effects of Polyethylene Glycol on Renal Functional Parameters in Rats. *J Bangladesh Soc Physiol.*, 10, 61–66.
<https://doi.org/10.3329/jbsp.v10i2.27166>