Влияние мирамистина на пролиферацию клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 и репродукцию вируса ящура в них

М. И. Доронин¹, Д. А. Лозовой², В. В. Пронин³, Д. В. Михалишин⁴, В. А. Стариков⁵, А. В. Борисов⁶, А. А. Шишкова⁷

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-5983-7062, e-mail: lozovoy@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-6240-3062, e-mail: pronin@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov@arriah.ru

⁷ e-mail: shishkova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В настоящее время в ветеринарной практике применяется препарат мирамистин (бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил] аммоний хлорид моногидрат), обладающий широким бактерицидным действием. Данный антисептик активен против большинства вирусов, микоплазм, бактерий, грибов и простейших. По параметрам токсикометрии мирамистин классифицируется как малоопасное вещество. Использование клеточных структур в качестве тест-систем для оценки токсичности фармакологических веществ вместо классических тестов на экспериментальных животных позволяет лучше прояснить возможный механизм действия исследуемого вещества. Поскольку многие виды микоплазм поражают органы мочеполовой системы, для оценки цитотоксичности мирамистина в качестве тест-систем можно использовать клетки почек разных млекопитающих, в частности новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21), сибирского горного козорога (ПСГК-30) и другие. Показана возможность применения монослойных клеточных ВНК-21 и ПСГК-30 в качестве тест-систем для оценки базовой цитотоксичности мирамистина. В процессе исследования токсичности препарата изучали влияние его различных концентраций на морфологию клеток, определяли количество жизнеспособных клеток и содержание общего белка как показателя прироста клеточной массы. Результаты цитоморфологического исследования свидетельствуют о том, что предельной допустимой концентрацией мирамистина для монослойных клеточных линий ВНК-21 и ПСГК-30 является 25 мкг/см³. Применение данного антибактериального препарата в больших концентрациях вызывало появление и нарастание признаков эндогенной интоксикации и дегенерации. При оценке пролиферативной активности клеток под влиянием антибиотика мирамистина в разных концентрациях выявлено, что увеличение дозы препарата до 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³ приводит к снижению кратности прироста клеток по сравнению с контролем. Содержание в ростовой среде мирамистина в количестве до 25 мкг/см³ не влияло на интенсивность синтеза протеинов. Наличие в культуральной среде мирамистина в предельно допустимой концентрации вызывает незначительное снижение репродукции вируса ящура в культурах клеток ВНК-21 и ПСГК-30 на 4,5 и 4,0% соответственно по сравнению с контролем без антибиотика. Поскольку микоплазмы являются наиболее распространенными контаминантами клеточных культур, дальнейшие исследования будут направлены на изучение возможности применения мирамистина для деконтаминации монослойных клеточных линий ВНК-21 и ПСГК-30.

Ключевые слова: мирамистин, монослойные клеточные линии ВНК-21, ПСГК-30, микоплазма.

Для цитирования: Доронин М. И., Лозовой Д. А., Пронин В. В., Михалишин Д. В., Стариков В. А., Борисов А. В., Шишкова А. А. Влияние мирамистина на пролиферацию клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 и репродукцию вируса ящура в них. *Ветеринария сегодня*. 2020; 1 (32): 17–24.

DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-17-24.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: doronin@arriah.ru.

Miramistin effect on BHK-21 and PSGK-30 cell line proliferation and FMD virus reproduction in these cells

M. I. Doronin¹, D. A. Lozovoy², V. V. Pronin³, D. V. Mihalishin⁴, V. A. Starikov⁵, A. V. Borisov⁶, A. A. Shishkova⁷

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-5983-7062, e-mail: lozovoy@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-6240-3062, e-mail: pronin@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov@arriah.ru⁷ e-mail: shishkova@arriah.ru

SUMMARY

At present, Miramistin drug (benzylidimethyl [3-(myristoylamino) propyl] ammonium chloride monohydrate), which has a broad bactericidal effect, is used in veterinary practice. This antiseptic is active against most viruses, mycoplasmas, bacteria, fungi and protozoa. According to toxicometric parameters, Miramistin is classified as a low-hazard substance. Use of cell structures as test systems for assessing the toxicity of pharmacological substances instead of conventional tests on experimental animals allows us to better clarify the possible mechanism of the effect of the investigated substance. Since many types of mycoplasmas affect the genitourinary system organs, to assess the cytotoxicity of Miramistin kidney mammalian cells of various mammals can be used as test systems, in particular, the newborn Syrian hamster (VNK-21), Siberian mountain ibex (PSGK-30), and others. The possibility of using BHK-21 and PSGK-30 cell monolayer as test systems for assessing the baseline cytotoxicity of Miramistin was shown. When studying toxicity of the drug, the effect of its various concentrations on the cell morphology was studied, the number of viable cells and the total protein content were determined as an indicator of the cell mass increase. The results of a cytomorphological study indicate that the Miramistin maximum permissible concentration of for BHK-21 and PSGK-30 cell monolayer is 25 µg/cm³. The use of this antibacterial drug in higher concentrations caused the appearance and increased signs of endogenous intoxication and degeneration. When evaluating the proliferative activity of cells under the influence of the Miramistin antibiotic in different concentrations, it was found that increasing the dose to 50, 75, 100, 125, 150 µg/cm³ leads to decrease in the rate of cell growth compared to the control. The Miramistin content in the growth medium in an amount of up to 25 µg/cm³ did not affect the intensity of protein synthesis. Presence of Miramistin in the culture medium at the maximum permissible concentration causes a slight decrease in the reproduction of foot and mouth disease virus in BHK-21 and PSGK-30 cell cultures by 4.5 and 4.0%, respectively, compared with the control without antibiotic. Since mycoplasmas are the most common contaminants of cell cultures, further studies will be aimed at exploring the possibility of using Miramistin for decontamination of BHK-21 and PSGK-30 cell monolayers.

Key words: Miramistin, BHK-21 and PSGK-30 cell monolayers, Mycoplasma.

For citation: Doronin M. I., Lozovoy D. A., Pronin V. V., Mikhailishin D. V., Starikov V. A., Borisov A. V., Shishkova A. A. Miramistin effect on BHK-21 and PSGK-30 cell line proliferation and FMD virus reproduction in these cells. *Veterinary Science Today*. 2020; 1 (32): 17–24. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-17-24.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Maksim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: doronin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Микоплазмозы животных – группа инфекционных заболеваний, вызываемых микроорганизмами типа *Tenericutes*, класса *Mollicutes*, семейства *Mycoplasmataceae*, рода *Mycoplasma*. Микоплазмы являются наиболее распространенными контаминантами клеточных культур. Данные прокариотические микроорганизмы плотно прилегают к клеточной мембране, получают из нее различные питательные вещества и ростовые факторы. Метаболиты микоплазм, в том числе перекись водорода и аммиак, накапливаются в культуральной среде и могут оказывать выраженное цитопатическое действие [1, 2, 3]. Микоплазмы вызывают существенные метаболические нарушения в клетках, следствием этого могут быть изменения уровня синтеза РНК и белков, состава клеточной мембраны, появление хромосомных aberrаций, индукция или активация экспрессии цитокинов, резкое снижение пролиферативной активности [4]. Необратимые изменения в клетках, вызываемые влиянием микоплазм и продуктов их жизнедеятельности, приводят к искажению результатов лабораторных исследований, в которых клеточные линии применяют в качестве тест-систем.

Микоплазмы устойчивы к сульфониламидам, пенициллинам, стрептомицину, но чувствительны к антибиотикам тетрациклинового ряда, макролидам и фторхинолонам [1, 3]. В настоящее время в ветеринарной практике применяется препарат мирамистин (бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил] аммоний хлорид моногидрат), обладающий широким бактерицидным действием. Лекарственный препарат относится

к группе катионных поверхностно-активных веществ, а именно к четвертичным аммониевым соединениям. По параметрам токсикометрии мирамистин классифицируется как малоопасное вещество¹. Препарат активен против большинства вирусов, бактерий, грибов и простейших. Механизм действия мирамистина проявляется в процессе активного взаимодействия данного соединения с липидами и полисахаридами цитоплазматической мембраны микоплазм, приводящего к их гибели [2, 5].

Анализ способности микроорганизмов размножаться и расти на средах, содержащих уменьшающуюся концентрацию лекарственного вещества, позволяет определить минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) антибиотика², угнетающую жизнь микоплазм *in vitro*. По данным А. М. Дунаевского и соавт., МИК для мирамистина составляет 10–100 мкг/см³ [6].

Исследование биологической активности антибиотиков предполагает оценку их цитотоксичности, которая проявляется в возникновении патологических изменений в клетках [1]. В зависимости от концентрации действующего вещества и восприимчивости клеточных рецепторов возможен широкий спектр изменений на уровне клетки, которые могут проявляться в виде цитостатического эффекта либо в форме цитотоксического действия, вызывающего ее гибель [4].

¹ ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. М.: Стандартинформ; 2007. 5 с.

² Арфьев В. А., Лисовенко Л. А. Англо-русский толковый словарь генетических терминов. М.: ВНИРО; 1995. 407 с.

Для оценки токсичности фармакологических веществ в настоящее время вместо классических тестов на экспериментальных животных широко применяют тест-системы с использованием монослойных культур клеток [5, 7, 8]. Поскольку большое количество видов микоплазм поражают органы мочеполовой системы, для оценки цитотоксичности мирамистина в качестве тест-систем используют клетки, полученные из почек разных млекопитающих, в частности новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21), сибирского горного козерога (ПСГК-30) и другие. Для исследования цитотоксичности антибиотиков в культуре клеток применяют широкий спектр методов, в том числе определение количества жизнеспособных клеток, колониеобразование, измерение концентрации общего клеточного белка, оценку морфологических изменений клеток и другие [8].

Цель данного исследования заключалась в оценке влияния мирамистина на пролиферацию клеток ВНК-21 и ПСГК-30, а также на репродукцию вируса ящура в них.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антибиотик. Для анализа применяли антибиотик мирамистин (ООО «Скандия Эко», Россия) с концентрациями в культуральной среде 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125 и 150 мкг/см³. В работе использовали 4 контроля: № 1 – тетрациклин (5 мкг/см³); № 2 – спирамицин (10 мкг/см³); № 3 – ципрофлоксацин (18 мкг/см³) [9]; № 4 – контроль, представляющий собой клеточную суспензию в ростовой среде без внесения антибиотиков.

Тест-системы. Для оценки базовой цитотоксичности мирамистина в качестве тест-системы применяли монослойные культуры клеток ВНК-21 и ПСГК-30, свободные от микоплазмы.

Количественный метод оценки действия мирамистина на культуры клеток. Действие мирамистина на монослойные клеточные линии ВНК-21 и ПСГК-30 оценивали по жизнеспособности клеток на протяжении трех последовательных пассажей. Анализ заключался в подсчете количества живых и мертвых клеток после диспергирования монослоя смесью трипсина и версена (1:1) при температуре 37 °С. Интенсивность роста оценивали по кратности прироста (K_{np}), используя формулу:

$$K_{np} = a/b,$$

где a – концентрация живых клеток через 48 ч после посева;

b – посевная концентрация.

Если $K_{np} > 1$, то отмечается клеточный прирост, при $K_{np} = 1$ пролиферации клеток не наблюдается, при $K_{np} < 1$ наблюдается гибель клеток.

Спектрофотометрический метод оценки пролиферации клеток с использованием генцианвиолета. Клетки ВНК-21 и ПСГК-30 высевали в 96-луночные культуральные планшеты в количестве 250–300 клеток на лунку. Мирамистин в заданных концентрациях добавляли в ростовые среды во время посева клеток. Контролем служили клетки без антибиотиков, а также клетки с тетрациклином, спирамицином и ципрофлоксацином в указанных выше концентрациях. Через 48 ч культивирования клетки фиксировали 70%-м раствором этанола и окрашивали 0,1%-м раствором генцианвиолета. Для экстрагирования красителя из клеток использовали 7%-й раствор уксусной кислоты в объеме 200 мкл на лунку. Интенсивность пролиферативной ак-

тивности клеток определяли по значению оптической плотности для суспензии генцианвиолета, связанного с клеточными протеинами, при длине волны 570 нм.

Качественная оценка жизнеспособности клеток заключалась в прижизненном визуальном наблюдении под инвертированным микроскопом за морфологическим состоянием клеток спустя 2 сут культивирования с использованием изотонического 0,4%-го водного раствора трипанового синего.

Вirus. Матовый вирус ящура штамма А/Забайкальский/2013, полученный в культуре клеток ПСГК-30 на 5-м пассаже, использовали в качестве посевного материала для заражения представленных монослойных клеточных линий в дозе 0,05 ТЦД₅₀/кл. Репродукцию вируса проводили в течение 15–17 ч до появления 95–100%-го цитопатического действия.

Определение концентрации 146S компонента вируса ящура. Количество 146S частиц вируса ящура в инактивированном материале определяли с помощью количественного варианта реакции связывания комплемента [10].

Статистическая обработка данных. Исследование проводили в трех повторностях. Полученные данные статистически обрабатывали, вычисляя средние арифметические значения, степень достоверности статистической разницы между средними величинами, определенными по разностному методу Стьюдента-Фишера. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования оценивали базовую цитотоксичность мирамистина в монослойных клеточных линиях ВНК-21 и ПСГК-30, которые широко применяются в качестве диагностических тест-систем в ветеринарной практике. Выбор концентрации антибиотика для эксперимента базировался на данных его клинических испытаний [2, 3], а также на результатах анализа МИК мирамистина в отношении микоплазм, которая находится в диапазоне 10–100 мкг/см³ [2, 3, 6]. Исходя из этого, были подобраны следующие тестируемые концентрации мирамистина: 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³. Культивирование клеток с представленными количествами данного препарата осуществляли в течение трех последовательных пассажей.

Проводили оценку цитоморфологических различий в контрольных и опытных образцах. Клетки без антибиотиков, а также выращенные в средах с тетрациклином (5 мкг/см³), спирамицином (10 мкг/см³), ципрофлоксацином (18 мкг/см³) имели выраженную цитоплазматическую мембрану, четкую оболочку ядра, прозрачную гомогенную цитоплазму (рис. 1). Через 48 ч после посева по итогам каждого пассажа в контрольных образцах клеточные клоны были плотными и образованы более 100 клетками. Наиболее близким к контролю по данным морфологическим признакам были клетки ВНК-21 и ПСГК-30 с содержанием в среде мирамистина 5, 10 и 25 мкг/см³. Для данных вариантов клоны были плотными и сформированы из 85–100 клеток. Клоны клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 в результате культивирования в среде с мирамистином в концентрациях 50, 75, 100, 125 мкг/см³ по сравнению с контролем без антибиотика имели более рыхлое строение и состояли из 65–75, 45–60, 25–40, 15–25 клеток соответственно.

Рис. 1. Морфология клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 в клонах, образовавшихся через 48 ч культивирования в среде с мирамистином в различных концентрациях

Fig. 1. Morphology of BHK-21 and PSGK-30 cell lines in clones, formed in 48 hours of cultivation in the medium supplemented with different Miramistin concentrations

При использовании 150 мкг/см³ мирамистина клоны были сформированы из единичных клеток, характеризующихся значительной гранулярностью и повышенным количеством лизосом. Представленные морфологические изменения были результатом локальной цитоплазматической дегенерации, развивающейся в клетке под влиянием такого токсического фактора, как избыточное количество мирамистина. Иными словами, результаты цитоморфологического исследования свидетельствуют о том, что предельной допустимой концентрацией мирамистина для монослойных клеточных линий ВНК-21 и ПСГК-30 является 25 мкг/см³. Применение данного антибактериального препарата в больших концентрациях вызывало появление и нарастание признаков эндогенной интоксикации и дегенерации.

Проводили исследование влияния мирамистина в тестируемых концентрациях на кратность прироста клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 по итогам трех последовательных пассажей в сравнении с контролями. Полученные результаты отражены в таблице и на рисунке 2.

Из данных, представленных в таблице, следует, что кратность прироста клеток линии ВНК-21 в контроле без антибиотика составляла $2,18 \pm 0,16$, в контролях с антибиотиками – $2,17 \pm 0,19$ – $2,18 \pm 0,17$. При применении мирамистина в количествах 5–25 мкг/см³ данный показатель соответствовал значениям $2,17 \pm 0,19$ – $2,18 \pm 0,16$. Увеличение дозы препарата до 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³ приводило к снижению кратности прироста клеток по сравнению с контролем в 4,6; 5,4; 7,5; 10,9 и 21,7 раза соответственно. При наличии в ростовой среде 150 мкг/см³ данного антибиотика отмечали заметную клеточную гибель. Таким образом, в результате исследования пролиферации клеток ВНК-21 определили, что мирамистин в концентрациях до 25 мкг/см³ не провоцирует возникновения цитотоксических проявлений.

Для клеток линии ПСГК-30 кратность прироста в контроле без антибиотика составляла $2,00 \pm 0,15$, в среде с контрольными антибиотиками – $1,88 \pm 0,15$ – $1,97 \pm 0,14$. Пролиферативный потенциал у клеток ПСГК-30 при использовании мирамистина в концентрациях 5–25 мкг/см³ находился на уровне контроля и был равен $1,93 \pm 0,18$ – $1,97 \pm 0,15$. При содержании данного антибиотика в среде в количествах 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³ кратность прироста клеток по сравнению с контролем снижалась в 4,9; 5,3; 6,8; 10,0 и 21,1 раза соответственно. При наличии в ростовой среде 150 мкг/см³ мирамистина наблюдали гибель клеток. Таким образом, при оценке кратности прироста в сравнении с контрольными показателями выявлено, что выращивание монослойной клеточной линии ПСГК-30 в среде с содержанием мирамистина до 25 мкг/см³ не оказывало цитотоксического действия.

Оценку пролиферации клеток проводили также по относительному определению количества общего клеточного белка спектрофотометрическим методом. Результаты исследования представлены на рисунке 3, из которого следует, что содержание протеинов клеток ВНК-21, выращенных в среде с 5, 10, 25 мкг/см³ мирамистина, соответствовало контрольным показателям оптической плотности и составило 0,57–0,59. При наличии указанного антибиотика в среде в концентрациях 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³ количество клеточных протеинов по сравнению с контролем снижалось в 4,3; 5,1; 8,0; 11,2 и 18,7 раза соответственно (оптическая плотность

Таблица
Оценка пролиферативной активности клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 под влиянием антибиотика мирамистина в разных концентрациях ($n = 3, p < 0,05$)

Table
Assessment of BHK-21 and PSGK-30 cell line proliferative activity influenced by different Miramistin concentrations ($n = 3, p < 0,05$)

Клеточная линия	Номер пассажа	Кратность прироста клеток											
		в среде с мирамистином с разными концентрациями (мкг/см ³)								контроль			
										с антибиотиками			б/а
		5	10	25	50	75	100	125	150	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
ВНК-21	1	2,21 ± 0,15	2,17 ± 0,17	2,22 ± 0,14	0,45 ± 0,15	0,40 ± 0,14	0,31 ± 0,13	0,22 ± 0,13	0,10 ± 0,15	2,22 ± 0,16	2,20 ± 0,17	2,22 ± 0,20	2,23 ± 0,19
	2	2,18 ± 0,15	2,20 ± 0,20	2,10 ± 0,15	0,47 ± 0,17	0,40 ± 0,14	0,29 ± 0,14	0,20 ± 0,12	0,09 ± 0,14	2,20 ± 0,20	2,22 ± 0,20	2,10 ± 0,13	2,10 ± 0,15
	3	2,15 ± 0,18	2,15 ± 0,21	2,20 ± 0,14	0,49 ± 0,11	0,40 ± 0,11	0,29 ± 0,11	0,18 ± 0,11	0,11 ± 0,11	2,12 ± 0,19	2,10 ± 0,19	2,20 ± 0,20	2,20 ± 0,14
	$M \pm m$	2,18 ± 0,16	2,17 ± 0,19	2,17 ± 0,14	0,47 ± 0,14	0,40 ± 0,14	0,29 ± 0,13	0,20 ± 0,13	0,10 ± 0,12	2,18 ± 0,17	2,17 ± 0,19	2,17 ± 0,17	2,18 ± 0,16
ПСГК-30	1	1,90 ± 0,14	2,01 ± 0,15	1,95 ± 0,12	0,37 ± 0,18	0,35 ± 0,18	0,30 ± 0,18	0,18 ± 0,18	0,10 ± 0,16	1,80 ± 0,17	2,03 ± 0,15	1,95 ± 0,14	1,95 ± 0,14
	2	1,98 ± 0,17	1,90 ± 0,21	2,00 ± 0,15	0,39 ± 0,21	0,34 ± 0,17	0,28 ± 0,16	0,19 ± 0,12	0,09 ± 0,17	2,00 ± 0,15	1,81 ± 0,20	2,06 ± 0,16	2,05 ± 0,15
	3	2,02 ± 0,17	1,88 ± 0,17	1,90 ± 0,16	0,40 ± 0,17	0,39 ± 0,17	0,27 ± 0,17	0,20 ± 0,12	0,09 ± 0,13	1,92 ± 0,14	1,80 ± 0,17	1,90 ± 0,14	2,00 ± 0,15
	$M \pm m$	1,97 ± 0,15	1,93 ± 0,18	1,95 ± 0,15	0,39 ± 0,19	0,36 ± 0,16	0,28 ± 0,13	0,19 ± 0,11	0,09 ± 0,13	1,91 ± 0,15	1,88 ± 0,15	1,97 ± 0,14	2,00 ± 0,15

№ 1 – тетрациклин (5 мкг/см³), № 2 – спирамицин (10 мкг/см³), № 3 – ципрофлоксацин (18 мкг/см³), № 4 – без антибиотика (б/а).

составляла 0,13; 0,11; 0,07; 0,05; 0,03). Таким образом, по итогам определения количества общего клеточного белка относительно контроля выявлено, что выращивание монослойной клеточной линии ВНК-21 в среде с содержанием мирамистина до 25 мкг/см³ не снижало интенсивности синтеза протеинов.

Количество синтезированного общего белка клеток ПСГК-30, выращенных в среде с 5, 10, 25 мкг/см³ мирамистина, находилось на уровне контрольных значений (оптическая плотность составляла 0,58–0,60). При со-

держании в среде указанного антибиотика в концентрациях 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³ количество клеточного белка по сравнению с контролем снижалось в 4,8; 5,3; 7,3; 9,7 и 19,3 раза соответственно (оптическая плотность составляла 0,12; 0,11; 0,08; 0,06; 0,03). Иными словами, по итогам анализа содержания клеточного белка относительно контроля определено, что культивирование монослойной клеточной линии ПСГК-30 в среде с содержанием мирамистина до 25 мкг/см³ не снижало интенсивности трансляции.

Рис. 2. Оценка кратности прироста клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30, выращенных в среде с разным количеством мирамистина (5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³)

К б/а – контроль без антибиотика;
K1 – среда с тетрациклином (5 мкг/см³);
K2 – среда со спирамицином (10 мкг/см³);
K3 – среда с ципрофлоксацином (18 мкг/см³).

Fig. 2. Assessment of proliferation rate of BHK-21 and PSGK-30 cell lines cultivated in the medium with different Miramistin concentrations (5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 μg/cm³)

К б/а – control without antibiotics;
K1 – tetracycline-supplemented medium (5 μg/cm³);
K2 – spiramycin-supplemented medium (10 μg/cm³);
K3 – ciprofloxacin-supplemented medium (18 μg/cm³).

По результатам оценки цитотоксического потенциала мирамистина выявлено, что данный антибактериальный препарат не оказывает разрушительного влияния на монослойные клеточные линии ВНК-21 и ПСГК-30 в концентрации до 25 мкг/см³. При этом из литературных источников [2, 3, 6] известно, что представленные концентрации антибиотика входят в диапазон МИК в отношении представителей рода *Mycoplasma*, и, следовательно, мирамистин в указанных количествах позволяет обеспечить профилактику контаминации микоплазмами клеточных линий ВНК-21 и ПСГК-30.

На следующем этапе работы исследовали влияние мирамистина на чувствительность монослойных клеточных линий ВНК-21 и ПСГК-30 к репродукции вируса ящура на примере штамма А/Забайкальский/2013. Для заражения использовали клетки, выращенные в питательной среде с 25 мкг/см³ мирамистина. В среде для культивирования вируса содержались те же количества антибиотика, которые были добавлены в ростовую среду. Результаты исследования отражены на рисунке 4.

Из представленных на рисунке 4 данных следует, что в результате культивирования вируса ящура штамма А/Забайкальский/2013 в клетках линии ВНК-21, выращенных с добавлением мирамистина, концентрация 146S компонента в суспензии составляла $0,64 \pm 0,05$ мкг/см³. Указанное содержание полных частиц вируса ящура коррелирует с данными для контроля без антибиотика ($0,67 \pm 0,05$ мкг/см³) и для контролей с тетрациклином ($0,62 \pm 0,05$ мкг/см³), спирамицином ($0,63 \pm 0,06$ мкг/см³) и ципрофлоксацином ($0,63 \pm 0,05$ мкг/см³). Следовательно, применение мирамистина в концентрации 25 мкг/см³ не снижает чувствительность монослойной клеточной линии ВНК-21 к заражению и репродукции вируса ящура.

При репродукции вируса ящура штамма А/Забайкальский/2013 в клетках линии ПСГК-30, культивирование которых осуществляли в среде с мирамистином, количество 146S частиц составляло $0,48 \pm 0,05$ мкг/см³. Полученные значения коррелируют с данными для контроля без антибиотика ($0,50 \pm 0,06$ мкг/см³) и для контролей с тетрациклином ($0,46 \pm 0,07$ мкг/см³), спирамицином ($0,48 \pm 0,05$ мкг/см³) и ципрофлоксацином ($0,46 \pm 0,08$ мкг/см³). Таким образом, мирамистин в количестве 25 мкг/см³ не снижает чувствительность монослойной клеточной линии ПСГК-30 к заражению и репродукции вируса ящура.

Результаты проведенных исследований подтверждают, что наличие антибиотика мирамистина в представленных выше предельно допустимых количествах в ростовой и поддерживающей средах не вызывает снижения концентрации 146S компонента вируса ящура по сравнению с другими препаратами против микоплазм и контролем без антибиотиков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало возможность использования монослойных клеточных линий ВНК-21 и ПСГК-30 в качестве тест-систем для оценки базовой цитотоксичности мирамистина.

По результатам оценки цитотоксического потенциала данного антибактериального препарата при анализе морфологического состояния и кратности прироста клеток, а также количества синтезированных клеточных белков выявлено, что мирамистин не оказывал токсического влияния на монослойные клеточные линии ВНК-21 и ПСГК-30 в максимальной дозе 25 мкг/см³. Применение мирамистина в больших концентрациях вызывало появление и нарастание признаков эндогенной интоксикации, что проявлялось в изменении морфологии клеток, появлении грану-

Рис. 3. Гистограммы оценки протеинов клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 через 48 ч культивирования в среде с разным количеством мирамистина (5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³)

К б/а – контроль без антибиотика;

К1 – среда с тетрациклином (5 мкг/см³);

К2 – среда со спирамицином (10 мкг/см³);

К3 – среда с ципрофлоксацином (18 мкг/см³).

Fig. 3. Assessment of BHK-21 and PSGK-30 cell line proteins in 48 hour cultivation in the medium with different miramistin concentrations (5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 µg/cm³)

К б/а – control without antibiotics;

К1 – tetracycline-supplemented medium (5 µg/cm³);

К2 – spiramycin-supplemented medium (10 µg/cm³);

К3 – ciprofloxacin-supplemented medium (18 µg/cm³).

Рис. 4. Концентрация 146S компонента вируса ящура штамма А/Забайкальский/2013 в инактивированных суспензиях после репродукции в клетках линий ВНК-21 и ПСГК-30, культивируемых в среде с мирамистином, в сравнении с контролями

1 – среда с мирамистином;
 2 – среда с тетрациклином (5 мкг/см³);
 3 – среда со спирамицином (10 мкг/см³);
 4 – среда с ципрофлоксацином (18 мкг/см³);
 5 – контроль без антибиотика.

Fig. 4. Concentration of 146 S component of FMDV strain A/Zabaikalsky/2013 in inactivated suspensions after reproduction in BHK-21 and PSGK-30 cell lines cultivated in the Miramistin-supplemented compared with the controls

1 – Miramistin-supplemented medium;
 2 – tetracycline-supplemented medium (5 µg/cm³);
 3 – spiramycin-supplemented medium (10 µg/cm³);
 4 – ciprofloxacin-supplemented medium (18 µg/cm³);
 5 – control without antibiotics.

лярности и повышении количества лизосом, а также в снижении кратности прироста клеток и синтезированных ими протеинов.

Обнаружено, что наличие 25 мкг/см³ мирамистина в ростовой и поддерживающей среде не вызвало снижения концентрации 146S компонента при репродукции вируса ящура по сравнению с применением других антибиотиков против микоплазм и без них. В результате культивирования штамма А/Забайкальский/2013 вируса ящура в клетках линии ВНК-21, выращенных в среде с 25 мкг/см³ мирамистина, концентрация 146S компонента составляла $0,64 \pm 0,05$ мкг/см³, что на 4,5% ниже по сравнению с контролем без антибиотика, на 3,2; 1,6 и 1,6% выше в сравнении с тетрациклином, спирамицином и ципрофлоксацином. При репродукции вируса ящура в клетках линии ПСГК-30, культивирование которых также осуществляли в среде с 25 мкг/см³ мирамистина, количество 146S частиц составляло $0,48 \pm 0,05$ мкг/см³, что на 4,0% ниже по сравнению с контролем без антибиотика, на 4,3% выше в сравнении с тетрациклином и ципрофлоксацином и равно для среды со спирамицином.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение возможности применения мирамистина для де-контаминации монослойных клеточных линий ВНК-21 и ПСГК-30 от микоплазм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 1, 2, 3 см. REFERENCES)

- Полянская Г. Г. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных линиях: автореф. ... д-ра биол. наук. СПб.: 2000. 38 с. Режим доступа: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01000255531#?page=1>.
- Еропкина М. Ю., Еропкина Е. М. Культура клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. СПб.: МОРПАВ; 2003. 239 с.

- Дунаевский А. М., Кириченко И. М. Клиническое обследование использования препарата Мирамистин в терапии инфекционно-воспалительных заболеваний респираторной системы. Обзор литературы. Поликлиника. 2013; 5: 6–12. eLIBRARY ID: 23245010.

- Романова М. А., Додонова А. Ш. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток. Молодой ученый. 2016; 18 (122): 110–114. Режим доступа: <https://moluch.ru/archive/122/33642/>.

- Zurlo J. Токсикологические анализы *in vitro*. Режим доступа: <http://base.safework.ru/iloenc?print&nd=857400333&spack=110LogLength%3D0%26LogNumDoc%3D857000927%26listid%3D01000000100%26listpos%3D2%26lsz%3D4%26nd%3D857000927%26nh%3D1%26>.

- Доронин М. И., Шишкова А. А., Ключкина Н. Д., Лозовой Д. А., Михалишин Д. В. Использование ампициллина, ципрофлоксацина, цефотаксима и полимиксина В для профилактики микробной контаминации клеточной линии ВНК-21/2-17. Труды Федерального центра охраны здоровья животных. 2016; 14: 159–176. eLIBRARY ID: 30095811.

- Бондаренко А. Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков. Суздаль; 1994. 92 с.

REFERENCES

- Fischer O., Hájková M., Hořínová Z., Jurmanová K., Zendulková D. The use of ciprofloxacin for decontamination of LSCC-H 32 cell line of chicken embryonal fibroblasts contaminated by *Mycoplasma arginini*. Acta Vet. Brno. 1992; 61: 51–56. DOI: 10.2754/avb199261010051.
- Mycoplasma – The Disaster of Cell Culture. Available at: <https://www.capricorn-scientific.com/lp/mycoexpert-nl/> (date of access: 12.06.2019).
- Waites K. B., Taylor-Robinson D. *Mycoplasma and Ureaplasma*. In: Manual of Clinical Microbiology. Eds. P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, F. C. Tenover. 7th ed. Washington: ASM Press, 1999: 782–794.
- Polyanskaya G. G. Patterns of karyotypic variability in cell cultures during prolonged cultivation in different lines [Zakonomenosti kariotipicheskoy izmenchivosti v kletochnykh kul'turakh pri dlitel'nom kul'tivirovanii v raznykh liniyakh]: Author's abstract. Dr. Biol. Sciences. SPb.; 2000. 38 p. Available at: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01000255531#?page=1>. (in Russian)
- Yeropkin M. Yu., Yeropkina Ye. M. Cell culture as a model system for studying toxicity and screening of cytoprotectants [Kul'tura kletok kak model'naya sistema issledovaniya toksichnosti i skringinga citoprotekturnykh preparatov]. Saint Petersburg: MORSAR AV; 2003. 239 p. (in Russian)
- Dunayevsky A. M., Kirichenko I. M. Clinical trials of Miramistin use in treatment of infectious and inflammatory respiratory diseases. Literature

review [Klinicheskoe obsledovanie ispol'zovaniya preparata Miramistin v terapii infekcionno-vospalitel'nyh zabolevanij respiratornoj sistemy. Obzor literatury]. *Poliklinika*. 2013; 5: 6–12. eLIBRARY ID: 23245010. (in Russian)

7. Romanova M. A., Dodonova A. Sh. Studying cytotoxicity of biologically active compounds in cell culture [Izuchenie citotoksichnosti biologicheskii aktivnykh soedinenij na kul'ture kletok]. *Young Scientist*. 2016; 18 (122): 110–114. Available at: <https://moluch.ru/archive/122/33642/>. (in Russian)

8. Zurlo J. *In vitro* toxicological analyzes [Toksikologicheskie analizy *in vitro*]. Available at: <http://base.safework.ru/iloenc?print&nd=857400333&spack=110LogLength%3D0%26LogNumDoc%3D857000927%26listid%3D010000000100%26listpos%3D2%26lsz%3D4%26nd%3D857000927%26nh%3D1%26>. (in Russian)

9. Doronin M. I., Shishkova A. A., Klyukina N. D., Lozovoy D. A., Mikhali-shin D. V. Use of ampicillin, ciprofloxacin, cefotaxime and polymyxin B for prevention of BHK-21/2-17 cell line microbial contamination. *Proceedings of the Federal Center for Animal Health*. 2016; 14: 159–176. eLIBRARY ID: 30095811. (in Russian)

10. Bondarenko A. F. Qualitative and quantitative immunochemical analysis of virus proteins [Kachestvennyj i kolichestvennyj immunohimicheskij analiz virusnykh belkov]. Suzdal; 1994. 92 p. (in Russian)

Поступила 21.10.19

Принята в печать 16.12.19

Received on 21.10.19

Approved for publication on 16.12.19

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Лозовой Дмитрий Анатольевич, доктор ветеринарных наук, доцент, заместитель директора по НИР и развитию ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Пронин Валерий Васильевич, доктор биологических наук, профессор, руководитель центра доклинических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Михалишин Дмитрий Валерьевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Стариков Вячеслав Алексеевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Борисов Алексей Валерьевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Шишкова Анжела Алексеевна, кандидат ветеринарных наук, главный технолог ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Maxim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry A. Lozovoy, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Deputy Director for Research and Development, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Valery V. Pronin, Doctor of Science (Biology), Professor, Head of the Centre for Preclinical Studies, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry V. Mikhali-shin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of the Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Vyacheslav A. Starikov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Aleksey V. Borisov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Anzhela A. Shishkova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Chief Technologist, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.