

**ВПЛИВ ПЕГІЛЬОВАНОГО АНТИБІОТИКА ЕНРОФЛОКСАЦИНУ НА ВМІСТ ПРОТЕЇНІВ КРОВІ ТА СТРУКТУРУ ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ**О.Зеленіна<sup>1</sup>, В.Влізло<sup>2</sup>, М.Скрипка<sup>1</sup>, Д.Остапів<sup>3</sup>, В.Найда<sup>1</sup>, Л. Афанасьєва<sup>1</sup>, Т. Кемаль<sup>1</sup><sup>1</sup>Одеський державний аграрний університет<sup>2</sup>Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені Степана Гжицького,<sup>3</sup>Інститут біології тварин НААН

Серед лікарських засобів антибактеріальні препарати мають найбільш виражені побічні реакції, зокрема антибіотик енрофлоксацин може спричинити токсичний вплив на організм. Актуальним є синтез нових сполук антибіотика енрофлоксацину з поліпшеною терапевтичною ефективністю та мінімальною побічною дією. Мета роботи дослідити вміст протеїнів сироватки крові та структуру печінки щурів за внутрішньом'язового введення пегільованого антибіотика енрофлоксацину і препаратів, які були використані при його створенні – традиційної форми антибіотика енрофлоксацину та полімеру ПЕГ-400. Протягом чотирьох діб, щоденно, однократно, внутрішньом'язово вводили контрольним тваринам фізіологічний розчин, а дослідним групам антибіотик енрофлоксацин у традиційній субстанції (першій групі), полімер ПЕГ-400 (другій) та пегільований антибіотик енрофлоксацин (третьої). На 7-му, 14-ту та 21-шу доби після закінчення ін'єкцій препаратів у тварин відбирали кров та проби печінки для досліджень. У сироватці крові визначали загальний протеїн і його фракції – альбумін, альфа-, бета- та гамма-глобуліни. Проби печінки досліджували гістологічно. Проведені дослідження показали, що внутрішньом'язові ін'єкції щурам пегільованого антибіотика енрофлоксацину, полімеру ПЕГ-400 та традиційного антибіотика енрофлоксацину мало впливали на вміст загального протеїну у сироватці крові щурів. Вміст альбуміну у крові тварин, які отримували пегільований антибіотик енрофлоксацин, порівняно з контрольними та іншими дослідними, тримався на фізіологічно вищому рівні, що вказує на стабільну протеїнсинтезувальну функцію печінки. Протягом перших 7-ім діб після закінчення введення препаратів у сироватці крові щурів дослідних груп вміст альфа-глобулінів був нижчим, а вискокодисперсних глобулінів (бета- та гамма-глобулінів) мало відрізнявся від контрольних. Це може вказувати на незначний вплив препаратів на клітини ретикулогістіоцитарної системи, які беруть участь в утворенні бета- та гамма-глобулінів. Гістологічні дослідження тканин печінки показали, що пегілювання антибіотика енрофлоксацину знижувало гепатотоксичність, оскільки за його застосування зміни структури гепатоцитів реєстрували лише у перші 7-ім діб, а за ін'єкції традиційної форми антибіотика енрофлоксацину морфологічні порушення паренхіми встановлювали на 7-му, 14-ту та 21-шу доби після введення. Отже, пегілювання антибіотика енрофлоксацину веде до зниження його токсичного впливу на організм, зокрема й на печінку після внутрішньом'язового застосування.

**Ключові слова:** щури, пегільований антибіотик енрофлоксацин, ПЕГ-400, енрофлоксацин, загальний протеїн, протеїнові фракції, мікроструктура печінки.

**ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ, АНАЛІЗ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ПУБЛІКАЦІЙ**

Фторхінолони вважаються найперспективнішою групою антибактеріальних препаратів, оскільки вони мають широкий спектр активності проти цілого ряду грамнегативних і грампозитивних бактерій (Wright *et al.*, 2000). До фторхінолонів відноситься антибіотик енрофлоксацин. Його антимікробні властивості описані за різних методів застосування – ентеральних, парентеральних, зовнішніх. Так, при зовнішньому місцевому застосуванні антибіотик енрофлоксацин є ефективним за лікування дерматитів (Barman *et al.*, 2023). Вказується, що він добре переноситься у різних концентраціях і є ефективним за лікування тварин з бактеріальними запаленнями вух (Clegget *et al.*, 2023) та очей (Smith *et al.*, 2001; Fuchset *et al.*, 2022). У коней, хворих на лептоспіроз, коли інфекція спричиняла важкі ураження очей антибіотик енрофлоксацин показав високий лікувальний ефект (Popp *et al.*, 2013). Застосування антибіотика енрофлоксацину показане для лікування тварин з інфекційними захворюваннями органів дихання, шлунково-кишкового тракту, сечової системи (Westropp *et al.*,

2012; Trouchon & Lefebvre, 2016). Енрофлоксацин широко використовується в птахівництві, зокрема при антибіотикотерапії бройлерів (Atef *et al.*, 2020; Temmerman *et al.*, 2022).

Однак, існують окремі труднощі при застосуванні антибіотика енрофлоксацину тваринам. Це пов'язано з тим, що енрофлоксацин малорозчинний у воді, гігроскопічний і має гіркий смак (Hewitt *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2022). Тому актуальним є пошук нових сполук енрофлоксацину, які б мали поліпшену терапевтичну ефективність, мінімальну побічну дію, а також з відсутньою до них резистентністю мікроорганізмів.

При створенні лікарських засобів важливим етапом доклінічних досліджень є визначення їх впливу на організм лабораторних тварин (Chekh *et al.*, 2017). Адже при застосуванні ліків утворюються метаболіти, які можуть спричинити токсичний вплив на органи та системи.

Серед лікарських засобів, антибактеріальні препарати мають найбільш виражені побічні реакції, що може обмежувати їх використання (Katarey *et al.*, 2016). Зокрема, проведені дослідження показали, що антибіотик енрофлоксацин може спричинити гепатотоксичність (Grabowski *et al.*, 2020; Luanet *et al.*, 2022) та нефротоксичність (Bird *et al.*; 2013; Kozak *et al.*, 2023) у тварин. Застосування енрофлоксацину у різних концентраціях та шляхах введення веде до порушення антиоксидантного статусу в організмі щурів (Srinivasu *et al.*, 2022).

Іншою важливою проблемою є глобальна загроза зростання резистентності мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів (Weese *et al.*, 2015). Стійкість мікроорганізмів до антибіотиків спричиняє значні проблеми за лікування інфекцій у тварин та людини. Повідомляється, що мікроорганізми, які були чутливими до антибіотика енрофлоксацину, все частіше стають резистентними до його дії (Piras *et al.*, 2015; Szatmári *et al.*, 2023). Щоб подолати резистентність, у останні роки створюється цілий ряд антибіотиків, з'єднаних зі сполуками, здатними покращити їх дію на мікроорганізми (Kozak *et al.*, 2023). Зокрема, проводяться роботи зі синтезу нових сполук з антибіотиком енрофлоксацином (Prakash *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2023). При цьому, активно застосовуються нанотехнології, зокрема доставка антибіотиків за допомогою спеціальних нанорозмірних носіїв (Caruthers *et al.*, 2023).

Для створення нових сполук антибіотиків перспективним є використання поліетиленгліколю (ПЕГ), як носія діючої речовини (Kumar *et al.*, 2020; Zdvizhkov *et al.*, 2014; Van Schyndel *et al.*, 2021). ПЕГ є водорозчинним, біодеградабельним та біосумісним, оскільки не утворює токсичних метаболітів, і є комерційно доступним (Wang *et al.*, 2018; Mozar *et al.*, 2018).

Процес з'єднання нативної молекули лікарського препарату з ПЕГ називається пегілюванням. Пегілювання є одним з найуспішніших шляхів поліпшення доставки лікарських препаратів до клітини (Sanchez Armengol *et al.*, 2022; Barry *et al.*, 2007). Крім цього, ПЕГ є гідрофільним полімером, який сприяє стійкості до зв'язування протеїнів плазми і перешкоджає агрегації. Завдяки цьому, пегілювані пептиди більш захищені від опсонізації та активного фаго- та ендцитозу клітинних структур макроорганізму (Otsuka *et al.*, 2003; Avgoustakis *et al.*, 2004).

Метою даної роботи було дослідити вміст загального протеїну та його фракцій у сироватці крові щурів, а також структуру печінки за внутрішньом'язового введення пегілюваного антибіотика енрофлоксацину і препаратів, які були використані при його створенні – традиційної форми антибіотика енрофлоксацину та полімеру ПЕГ-400.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для наукових досліджень було відібрано полімер ПЕГ-400, який утворений з поліетиленгліколю (Dron *et al.*, 2018), з молекулярною масою 400 Да (рис. 1).

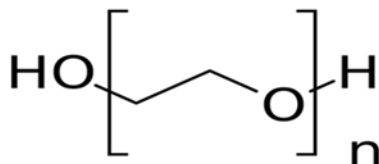
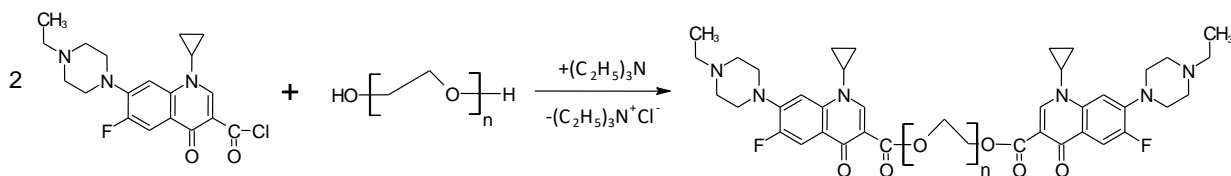


Рис. 1. Схема ПЕГ-400

Пегілюваний антибіотик енрофлоксацин створювали шляхом з'єднання антибіотика енрофлоксацину (чистота 99,5 %, фірма Sigma Aldrich) та полімеру ПЕГ-400. До кінців поліоксиетиленового гідрофільного ланцюга ПЕГ-400 приєднували молекули енрофлоксацину (рис. 2). Дані дослідження

було проведено у лабораторії кафедри органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка».



**Рис. 2.** З'єднання антибіотика енрофлоксацину з полімером ПЕГ-400.

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

Для вивчення впливу пегільованого антибіотика енрофлоксацину та речовин, які були використані для його утворення – антибіотик енрофлоксацин і полімер ПЕГ-400, на організм тварин було проведено експерименти на лабораторних щурах. Для цього було створено 4 групи тварин: контрольну і три дослідні. У кожній групі було по 12 щурів. Всім тваринам, 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. Дослідним щурам внутрішньом'язово вводили досліджувані препарати, зокрема першій задавали 0,03 мл антибіотика енрофлоксацину у традиційній субстанції (традиційна форма антибіотика енрофлоксацину), другій — 0,03 мл полімеру ПЕГ-400, третій — 0,03 мл комплекс антибіотика енрофлоксацину з полімером ПЕГ-400 (пегільований антибіотик енрофлоксацин). Вміст антибіотика енрофлоксацину у пегільованій і традиційній формах у розчині складав 1,8 %. Кількість введеного енрофлоксацину у традиційній та пегільованій формах становила 2,7 мг на 1 кг маси щура і відповідала дозі, що застосовується 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.

Проби крові та тканин печінки отримували після декапітації щурів, яку виконували зі застосуванням тіопенталового наркозу. Після цього, проводили кардіотомію верхівки серця по чотири тварини з кожної групи на сьому, чотирнадцяту та двадцять першу доби після закінчення введення препаратів.

Дослідження загального протеїну у сироватці крові виконували біуретовим методом на напівавтоматичному аналізаторі Evolution 3000 (Biochemical Systems International S.p.A., Італія) з використанням стандартних наборів реактивів СпайнЛаб (Granum, Україна).

Якісний та кількісний вміст фракцій розчинних протеїнів у сироватці крові досліджували в 7,5% поліакриламідному гелі (ПААГ). Підготовка зразків для електрофорезу: 0,1 мл сироватки 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. Кількісне визначення вмісту протеїнів проведено з використанням програмного забезпечення TotalLab TL120.

З фрагментів печінки готували препарати для гістологічного дослідження. Стан структури печінки оцінювали у полях зору мікроскопа за збільшення у 640 разів.

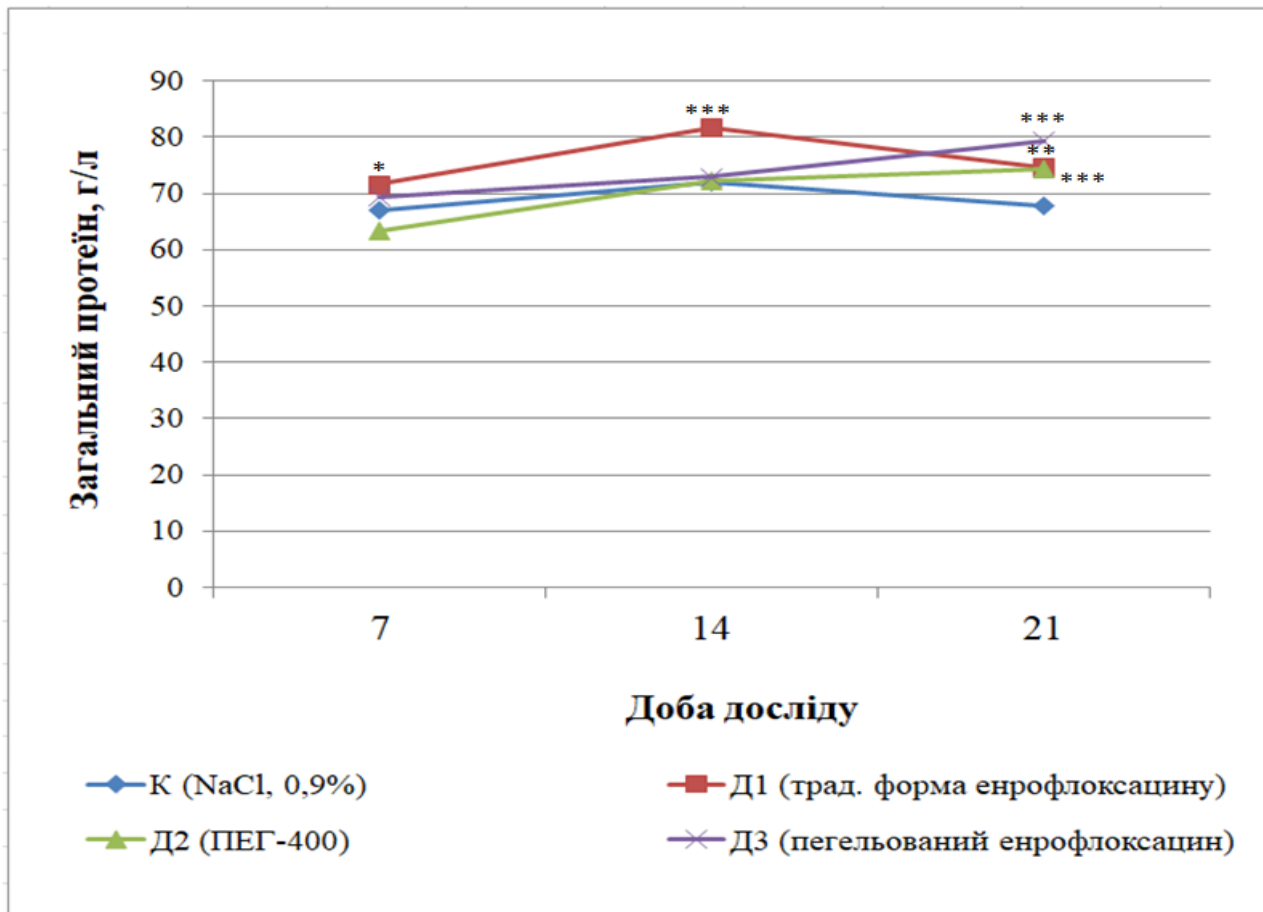
Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з тваринами здійснювали згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) і «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», ухваленими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти (Directive 2010/63/EU, 2010).

## РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Введення в організм тварин антибактеріальних препаратів з лікувальною метою веде не тільки до знищення патологічної мікрофлори, яка спричиняє розвиток хвороби, а й може негативно

впливати на органи та системи і викликати порушення окремих ділянок метаболізму (Ma *et al.*, 2020; Zelenina *et al.*, 2022). Зокрема, часто уражується печінка та знижується гуморальний захист організму. У таких випадках інформативним є дослідження протеїнів плазми крові. Адже альбумін синтезується у клітинах печінки і забезпечує транспортування антибактеріальних препаратів з кров'ю до клітин організму. Тому тривале застосування антибіотика енрофлоксацину може спричинити не лише порушення протеїноутварення, а й зменшити лікувальний ефект через відсутність засобів для надходження антибактеріального препарату з кров'ю до патологічних ділянок (Grabowski *et al.*, 2022). Проведені нами визначення загального протеїну у сироватці крові щурів показали, що на 7-му добу після закінчення введення антибіотика енрофлоксацину у традиційній формі, його вміст був вищим на 6,9 % ( $P < 0,05$ ) відносно контрольних (рис. 3). У крові тварин, яким проводили ін'єкції полімеру ПЕГ-400 та пегільованого антибіотика енрофлоксацину, кількість загального протеїну мало відрізнялася від контрольної групи.

На 14-ту добу по завершенню введення препаратів відмічено незначне підвищення вмісту загального протеїну у сироватці крові контрольних та дослідних щурів, порівняно з попереднім дослідженням. Зокрема, зростання вмісту загального протеїну було суттєвим у крові тварин, які отримували антибіотик енрофлоксацин у традиційній формі ( $P < 0,001$ ). У тих щурів, які отримували полімер ПЕГ-400 та пегільований антибіотик енрофлоксацин, вміст загального протеїну був на рівні контрольних. 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 порівняно з контрольною (рис. 3).



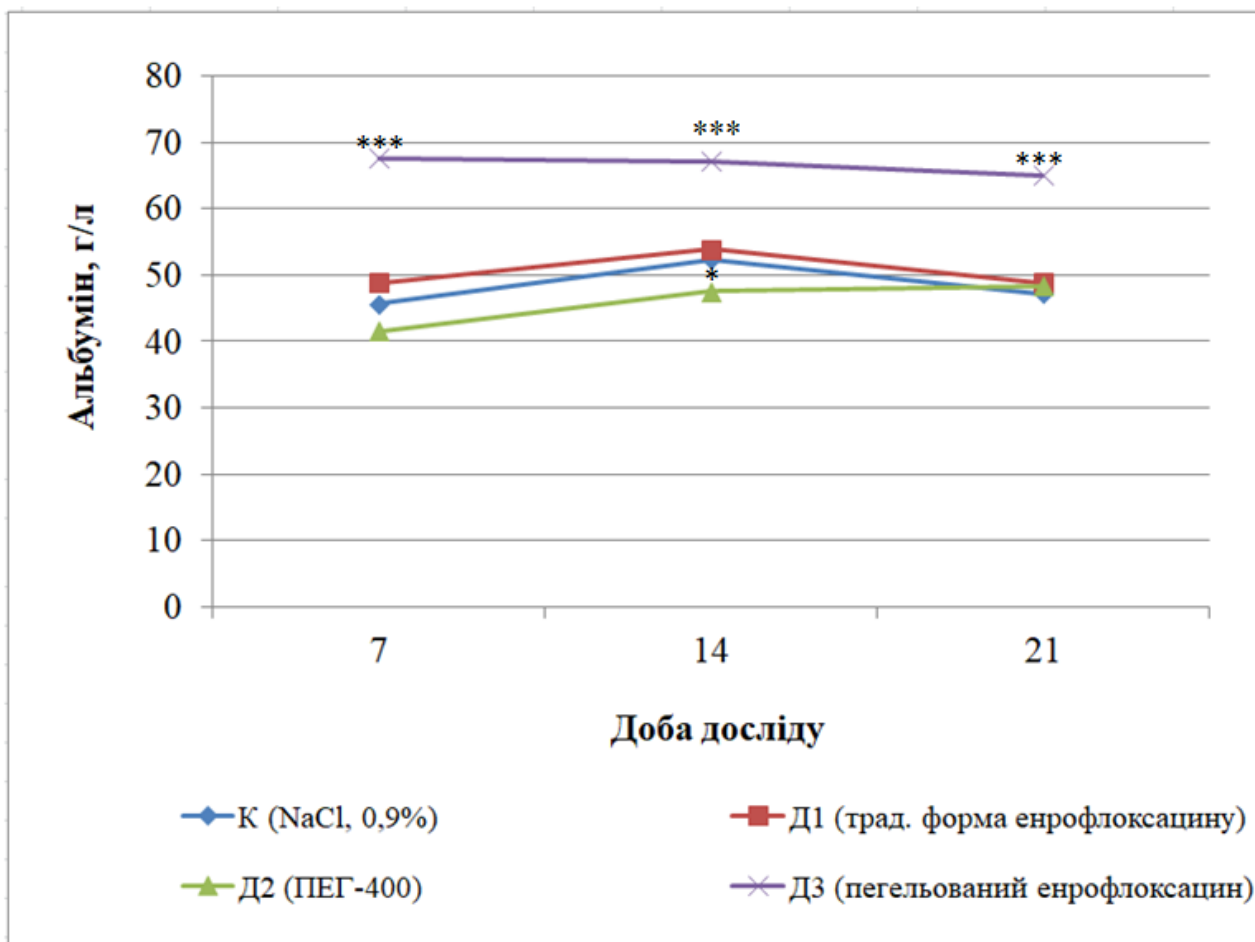
**Рис. 3.** Вміст загального протеїну в сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, г/л ( $M \pm m$ ,  $n=4$ ).

При дослідженні вмісту протеїнових фракцій у сироватці крові можна отримати більш повну інформацію про стан організму тварин. Нами встановлено, що на 7-му добу після закінчення введення препаратів вміст альбуміну був найвищим в сироватці крові щурів, яким проводили ін'єкції пегільованого антибіотика енрофлоксацину (рис. 4). У них рівень альбуміну у крові був високовірогідно вищим ( $P < 0,001$ ) як від контрольних, так й двох інших дослідних груп. Високі

показники вмісту альбуміну у сироватці крові тварин, які отримували пегільований антибіотик енрофлоксацин, може свідчити про стабільну протеїнсинтезувальну функцію печінки (Cattaneo *et al.*, 2021). Це є також позитивним з точки зору забезпечення перенесення антибіотика з кров'ю до уражених тканин організму (Tarushi *et al.*, 2010).

Через 14-ть діб по завершенню введення препаратів вміст альбуміну у сироватці крові тварин, яким вводили пегільований антибіотик енрофлоксацин, продовжував бути вищим (на 29,3 %;  $P < 0,001$ ), порівняно з контрольними, а також іншими дослідними групами. У тварин другої дослідної групи, яка отримувала полімер ПЕГ-400, вміст альбуміну у крові був дещо нижчим, а у тих, яким вводили традиційний антибіотик енрофлоксацин, незначно вищим від контрольних.

На 21-шу добу після закінчення ін'єкції препаратів спостерігали однакові показники альбуміну у сироватці крові контрольної, першої та другої дослідних груп, а у третій, яка отримувала пегільований антибіотик енрофлоксацин, його вміст був стабільним і вищим на 37,7 % ( $P < 0,001$ ), порівняно з контрольними щурами (рис. 4).



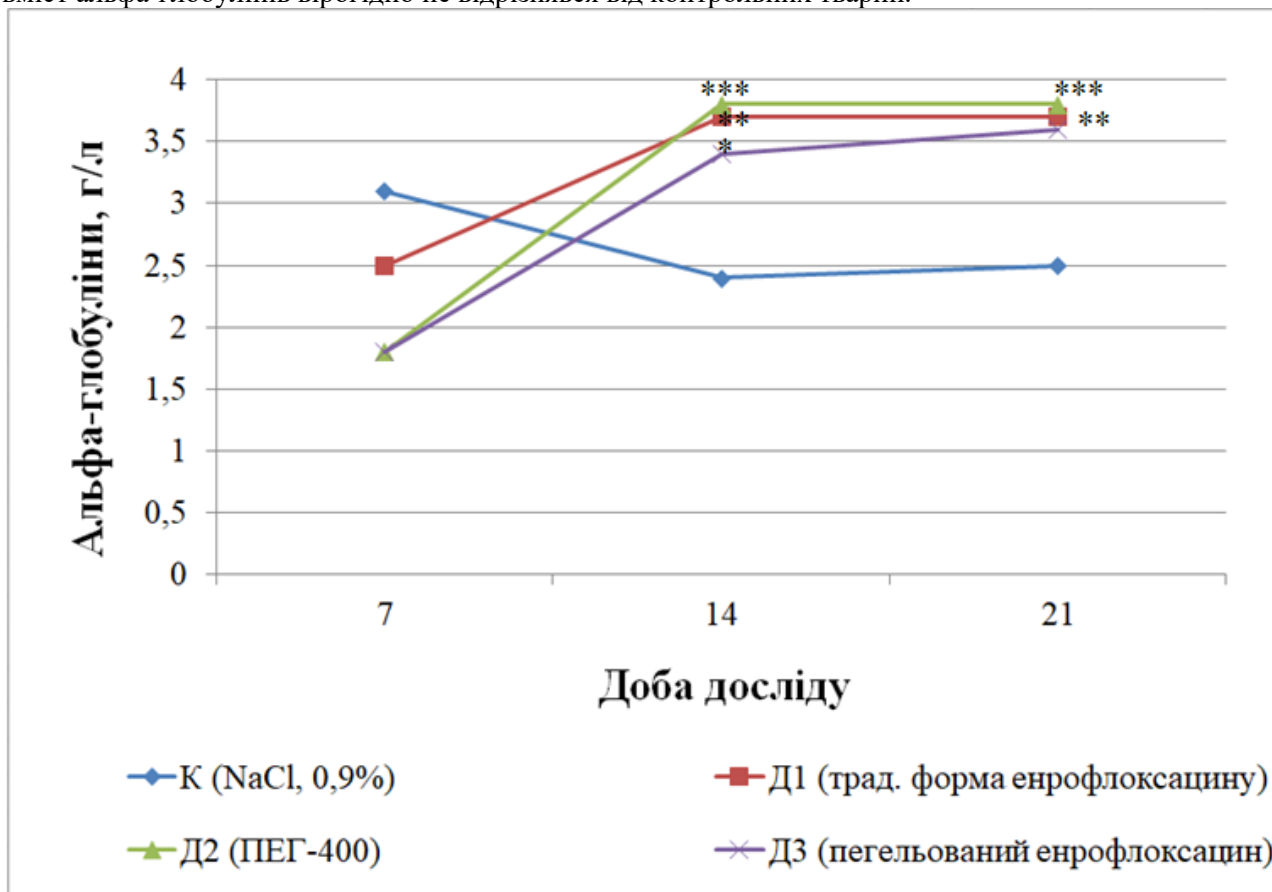
**Рис. 4.** Вміст альбуміну у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, г/л ( $M \pm m$ ,  $n=4$ ).

Вміст альфа-глобулінів у сироватці крові на 7-му добу після закінчення введення препаратів у щурів контрольної групи був вищим, порівняно з дослідними, на 19,4 % з першою, на 41,9 % – другою та на 41,9 % – третьою, відповідно (рис. 5). Альфа-глобуліни синтезуються у печінці та відносяться до протеїнів, які вказують на інтоксикацію, або гостру фазу запалення (Jain *et al.*, 2011). Тому, встановлені нами низькі показники альфа-глобулінів у крові тварин, які отримували досліджувані препарати, може вказувати на відсутність реакції організму на їх ін'єкції протягом перших семи діб.

На 14-ту добу після припинення введення препаратів вміст альфа-глобулінів у сироватці крові всіх дослідних груп зростав і був вищим від контрольної, зокрема у першій на 51,2 % ( $P < 0,01$ ), у другій на 58,3 % ( $P < 0,001$ ) і у третій на 41,7 % ( $P < 0,05$ ).

На 21-шу добу після останнього введення препаратів в сироватці крові щурів першої та другої дослідних груп вміст альфа-глобулінів залишався на 48,0 % ( $P < 0,01$ ) і 52,0 % ( $P < 0,001$ ) вищим, ніж в

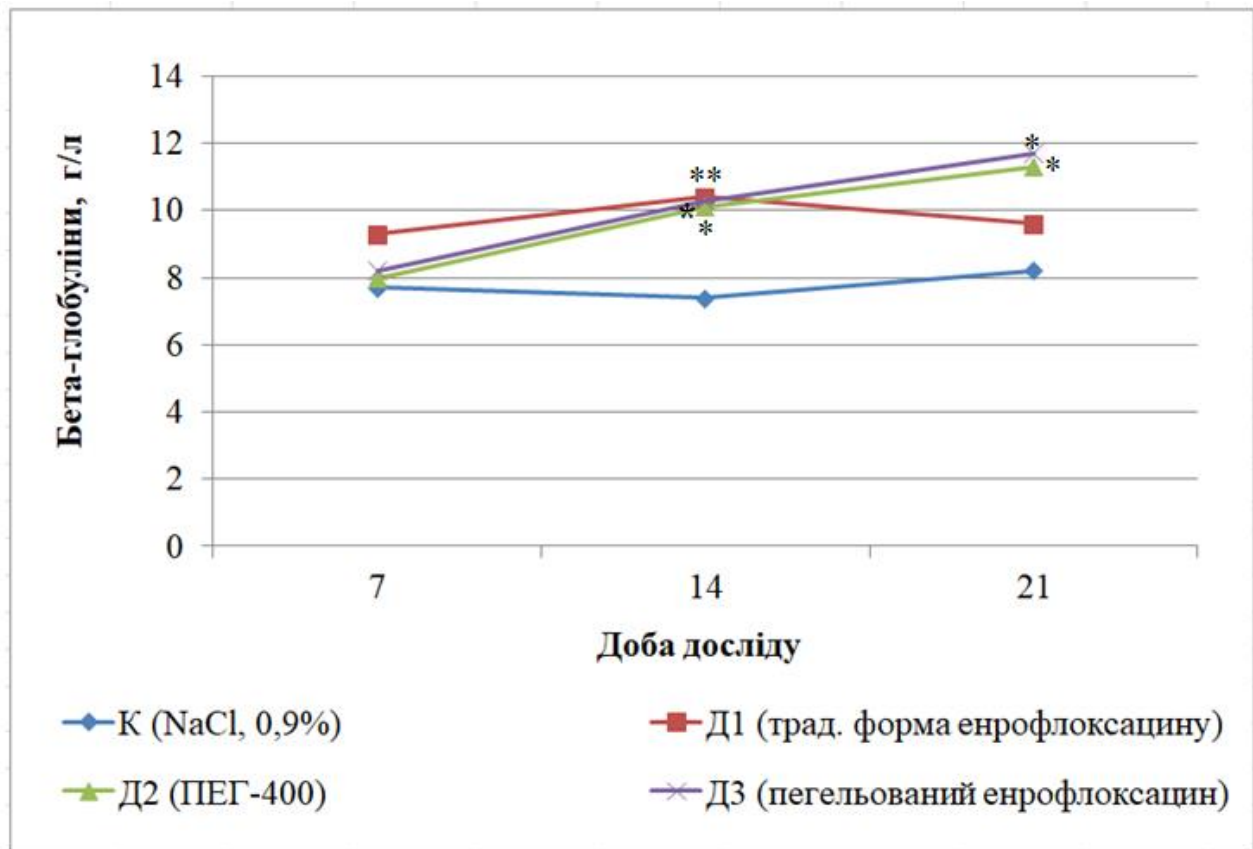
контрольній. У сироватці крові тварин, які отримували пегільований антибіотик енрофлоксацин, вміст альфа-глобулінів вірогідно не відрізнявся від контрольних тварин.



**Рис. 5.** Вміст альфа-глобулінів у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, г/л ( $M \pm m$ ,  $n=4$ ).

Вміст бета-глобулінів в сироватці крові щурів у всіх дослідних групах через 7-ім діб після закінчення введення препаратів був незначно вищим, ніж у контрольній. Зокрема, у дослідній групі, яка отримувала традиційний антибіотик енрофлоксацин, зростання було найбільш суттєвим (на 20,8%), а у тих, яким вводили полімер ПЕГ-400 та пегільований антибіотик енрофлоксацин, збільшення було лише на 3,9 та 6,5 % (рис. 6).

На 14-ту і 21-шу доби дослідження встановлено, що у сироватці крові тварин контрольної групи вміст бета-глобулінової фракції майже не змінювався. За введення щурам традиційної форми антибіотика енрофлоксацину дослідження крові показало підвищення вмісту бета-глобулінів на 14-ту добу на 11,8 %, порівняно з 7-ою добою, і ця величина майже не змінювався на 21-шу добу. У даній групі щурів рівень бета-глобулінів був вищим, ніж у контрольній ( $P < 0,01$ ). У тварин, які отримували полімер ПЕГ-400 та пегільований антибіотик енрофлоксацин, вміст бета-глобулінів у сироватці крові при дослідженні на 14-ту добу зростав ( $P < 0,05$ ) порівняно з контрольними. На 21-шу добу досліджень показники вмісту бета-глобулінів у крові тварин між групами не відрізнялися.

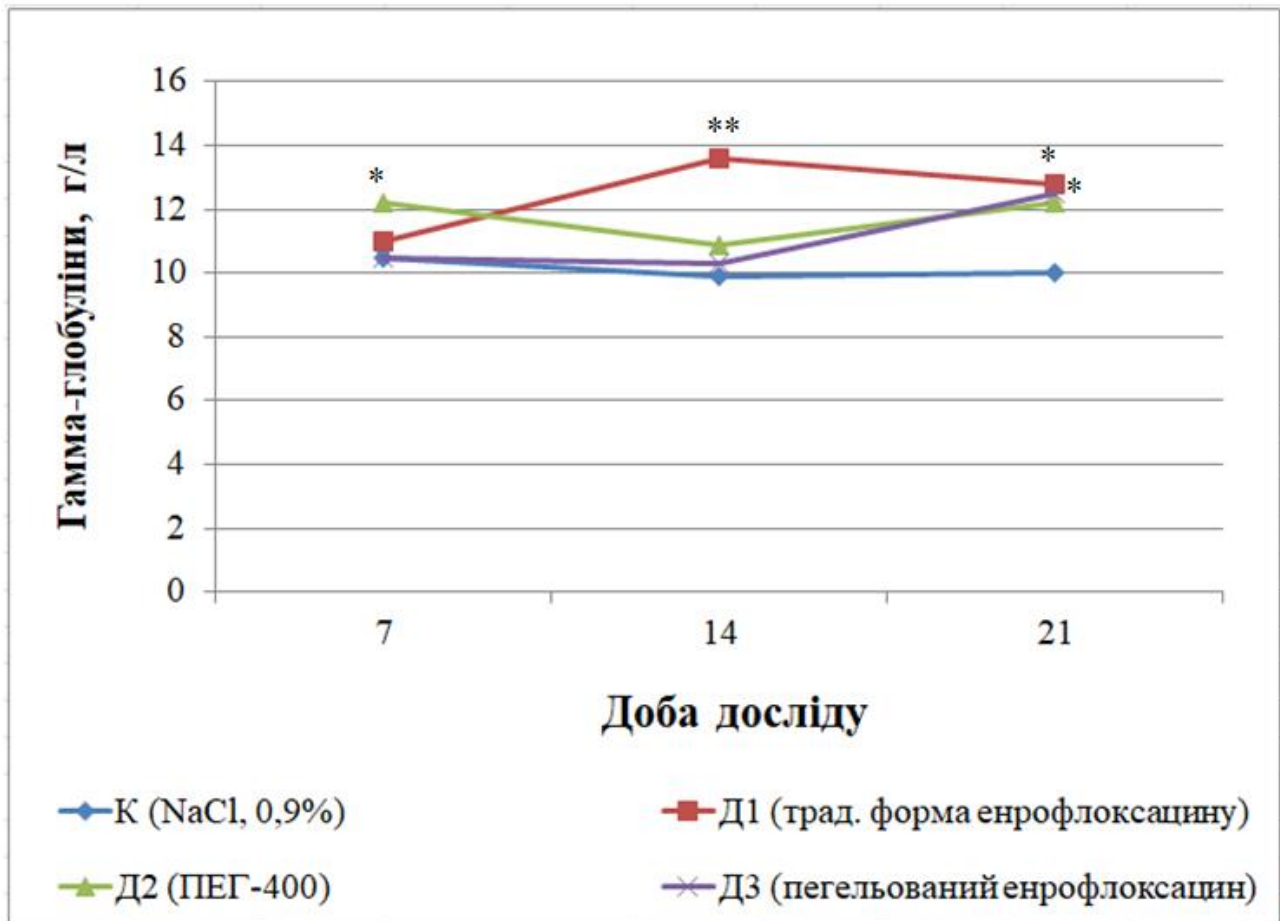


**Рис. 6.** Вміст бета-глобулінів у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, г/л ( $M \pm m$ ,  $n=4$ ).

Через 7-ім діб після закінчення введення препаратів вміст гамма-глобулінів у сироватці крові щурів зростав у першій дослідній групі на 5 %, а у другій – на 16,2 % ( $P < 0,05$ ) відносно контрольної. У тварин, яким вводили пегільований антибіотик енрофлоксацин, показники гамма-глобулінів у крові не відрізнялися від контрольних щурів (рис.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. При цьому, найвищий показник встановлено у тварин, які отримували традиційний антибіотик енрофлоксацин ( $P < 0,01$ ).

Через 21-ну добу після введення препаратів у крові всіх дослідних групах тварин вміст гамма-глобулінів майже не відрізнявся та був вищим від контрольної на 28 % ( $P < 0,05$ ).



**Рис. 7.** Вміст гамма-глобулінів у сироватці крові контрольної та дослідних груп щурів, г/л ( $M \pm m$ ,  $n=4$ ).

Відношення альбумінів до глобулінів (альбуміно-глобуліновий коефіцієнт) мало відрізнялось між контрольними та дослідними тваринами на 7-му добу після останнього введення досліджуваних препаратів. На 14-ту добу досліджень альбуміно-глобуліновий коефіцієнт у сироватці крові був у дослідних щурів вищим, ніж у контрольних ( $P < 0,05$ – $P < 0,01$ ), а на 21-шу добу після закінчення введення препаратів вірогідно не відрізнявся між різними групами тварин (рис. 8).



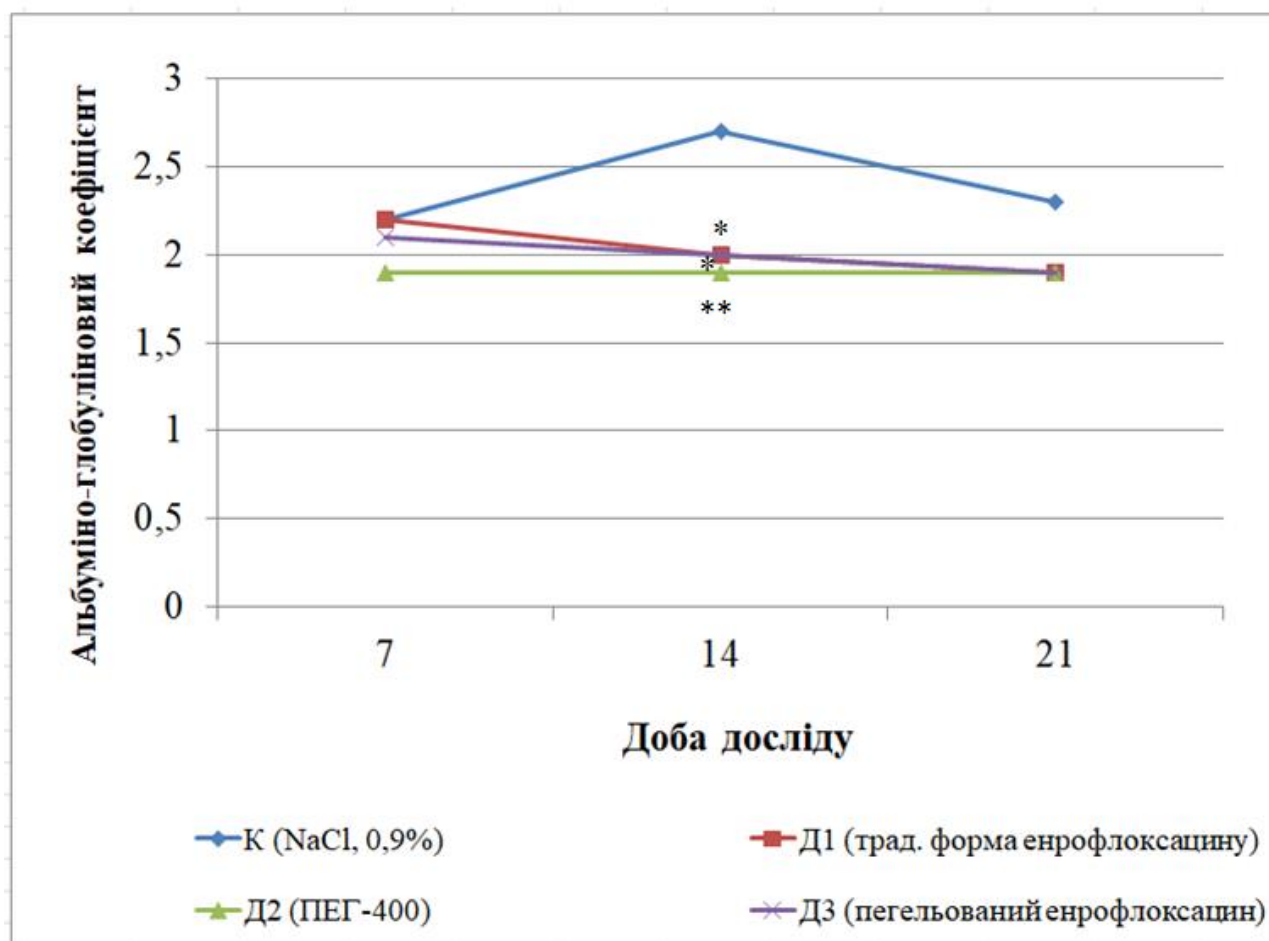
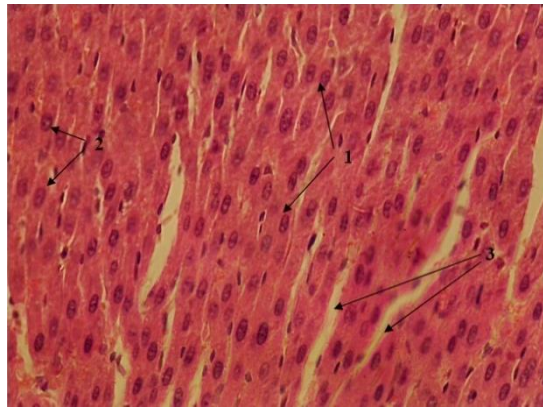


Рис. 8. Альбуміно-глобуліновий коефіцієнт контрольної та дослідних груп щурів ( $M \pm m$ ,  $n=4$ ).

Проведені дослідження показали, що введення щурам пегільованого антибіотика енрофлоксацину і речовин, які використовували для його створення – антибіотика енрофлоксацину та полімеру ПЕГ-400, мало впливало на вміст загального протеїну у сироватці крові. При цьому, кількість альбуміну у сироватці крові щурів, які отримували пегільований антибіотик енрофлоксацин, трималася протягом дослідження на фізіологічно високому рівні, що свідчить про добре функціонування протеїнсинтезувальної функції гепатоцитів. Через 7-ім діб після закінчення введення препаратів вміст альфа-глобулінів у крові дослідних щурів був нижчим, а вміст бета- та гамма-глобулінів вищим від контрольних лише у тих, які отримували традиційний антибіотик енрофлоксацин. Збільшення кількості бета- та гамма-глобулінів у сироватці крові тварин протягом дослідження може бути пов'язано з дією антибіотика енрофлоксацину на клітини ретикулоендоцитарної системи, які беруть участь у їх утворенні. Це може свідчити про реакцію імунокомпетентних клітин на введення в організм препарату (Samus *et al.*, 2010; Tothova *et al.*, 2016). Слід відзначити, що введення в організм щурів пегільованого антибіотика енрофлоксацину не призводило до змін високомолекулярних глобулінів у сироватці крові, порівняно з контрольними.

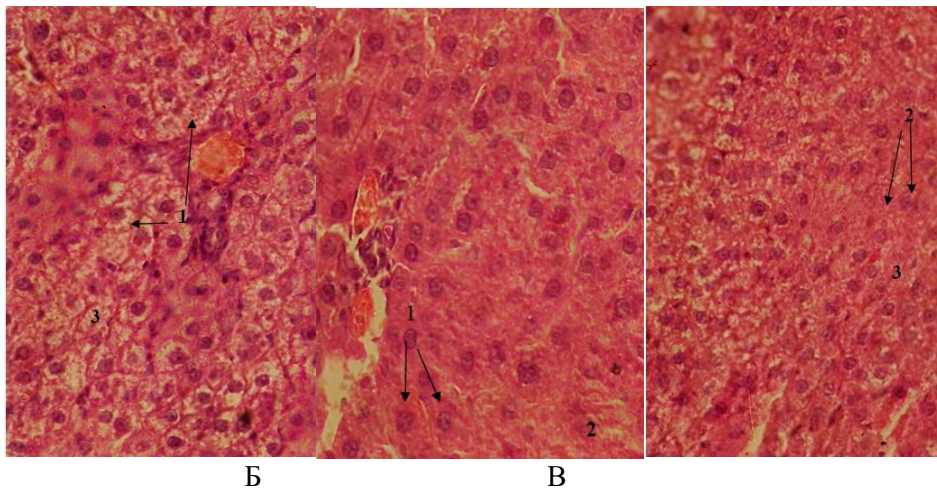
У клітинах печінки синтезується більшість протеїнів плазми крові. Від функціонального стану та структури гепатоцитів і зірчастих макрофагів залежить вміст загальних протеїнів та їх фракцій у сироватці крові (Simonov & Vlizlo, 2015). Тому важливим було вивчити стан структури паренхіми печінки. Проведені нами гістологічні дослідження тканин печінки різних груп щурів показали відмінності у структурі залежно від введеного препарату. Так, тварин контрольної групи, які отримували внутрішньом'язові ін'єкції фізіологічного розчину, не було встановлено морфологічних змін (рис. 9).



**Рис. 9.** 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  $\times 640$ .

За введення тваринам традиційного антибіотика енрофлоксацину встановлено, що на 7 добу після закінчення ін'єкцій гістологічна структура мала ознаки зернистої дистрофії, лізису та пікнозу ядер гепатоцитів (рис. 10). Зустрічалися осередки характерні для паранекрозу та некрозу паренхіми печінки. Слід відзначити, що у щурів даної групи після 14-ої та 21-ої діб експерименту патологічні зміни реєструвалися у меншій мірі, але вони ще були присутніми.

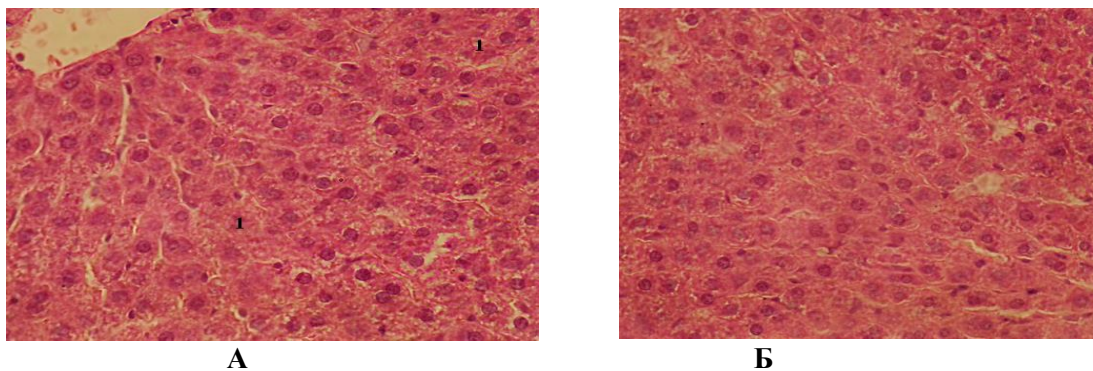


А Б В

**Рис. 10.** А) Фрагмент гістологічного препарату печінки щура через 7-ім діб після введення традиційної форми антибіотика енрофлоксацину. *Примітки:* 1 – гепатоцити з ознаками жирової декомпозиції; 3 – гепатоцити з ознаками паранекрозу та некрозу.

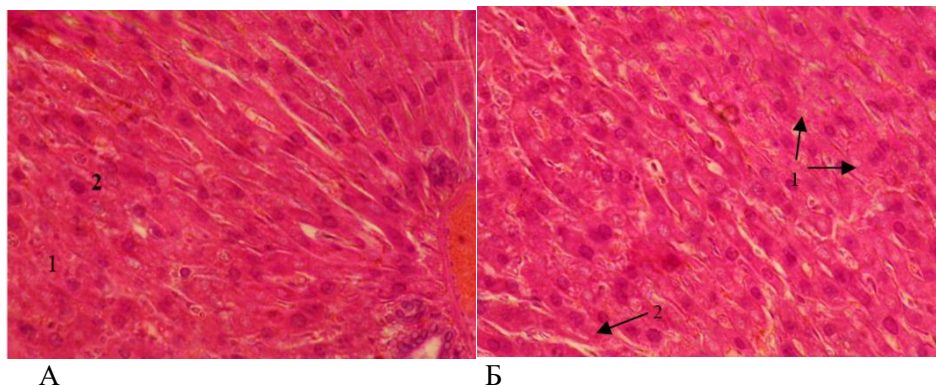
Б) Фрагмент гістологічного препарату печінки щура на 14-ту добу після введення традиційної форми антибіотика енрофлоксацину. *Примітки:* 1 – гепатоцити з ознаками зернистої дистрофії; 2 – гепатоцити з ознаками лізису, паранекрозу та некрозу. В) Фрагмент гістологічного препарату печінки щура на 21-шу добу після введення традиційної форми антибіотика енрофлоксацину. *Примітки:* 2 – лізис гепатоцитів; 3 – гепатоцити з ознаками паранекрозу та некрозу. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення  $\times 640$ .

У тварин, які отримували полімер ПЕГ-400, морфологічні зміни печінки було встановлено лише на 7 добу дослідження (рис. 11). На 14-ту та 21-шу доби після закінчення введення препарату гістологічних змін структури печінки не було виявлено.



**Рис. 11.** А) Фрагмент гістологічного препарату печінки щура на 7-му добу після введення ПЕГ-400. Примітки: 1 - ознаки дистрофії, паранекрозу та некрозу гепатоцитів. Б) Фрагмент гістологічного препарату печінки щура на 14-ту добу після введення ПЕГ-400. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення  $\times 640$

У групі щурів, які отримували пегільований антибіотик енрофлоксацин, на 7 добу експерименту встановлено у полі зору окремі клітини печінки з ознаками атрофії, зернистої дистрофії, паранекрозу та некрозу. На 14-ту та 21-шу добу після закінчення введення препарату морфологічний стан печінки був без змін (рис. 12) та ідентичний зі структурою контрольної групи.



**Рис. 12.** А) Фрагмент гістологічного препарату печінки щура через 7-му добу після введення пегільованого антибіотика енрофлоксацину. Примітки: 1 – некроз; 2 – зерниста дистрофія та паранекроз. Б) Фрагмент гістологічного препарату печінки щура через 14-ту добу після введення пегільованого антибіотика енрофлоксацину. Примітки: 1 – гепатоцити; 2 – просвіти синусоїдальних капілярів (гемокapілярів). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення  $\times 640$

Отже, гістологічні дослідження тканин печінки показали, що пегілювання антибіотика енрофлоксацину знижує гепатотоксичність, оскільки за застосування даного препарату зміни структури гепатоцитів реєструвалися лише через 7-ім дів після закінчення внутрішньом'язового введення, а за ін'єкції традиційної форми антибіотика енрофлоксацину морфологічні порушення паренхіми встановлювали на 7-му, 14-ту та 21-шу доби.

## ВИСНОВКИ

Внутрішньом'язові ін'єкції щурам пегільованого антибіотика енрофлоксацину і препаратів, які використані при його створенні – полімеру ПЕГ-400 та традиційного антибіотика енрофлоксацину, показали, що пегілювання зменшує токсичний вплив на організм, зокрема й печінку. Вміст альбуміну у сироватці крові тварин, які отримували пегільований антибіотик енрофлоксацин, протягом дослідження тримався на фізіологічно високому рівні, що є ознакою стабільної протеїнсинтезувальної функції клітин печінки. За внутрішньом'язових ін'єкцій пегільованого антибіотика енрофлоксацину вміст високомолекулярних глобулінів у сироватці крові щурів мало відрізнявся від контрольних, що можна розцінювати як незначний негативний вплив на клітини ретикулоцитотарної системи, які беруть участь в утворенні бета- та гамма-глобулінів. Гістологічні дослідження тканин печінки показали, що

пегілювання антибіотика енрофлоксацину знижує гепатотоксичність, оскільки за застосування даного препарату зміни структури гепатоцитів реєструються лише через 7-ім діб після закінчення внутрішньом'язового введення, а за ін'єкції традиційної форми антибіотика енрофлоксацину морфологічні порушення паренхіми встановлювали на 7-му, 14-ту та 21-шу доби.

У перспективі планується продовжити дані дослідження, зокрема важливо встановити вплив новоствореного пегілюваного антибіотика енрофлоксацину на залишкові продукти протеїнового обміну, а також й інші ланки метаболізму організму тварин.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- 1 Atef, M., El-Banna, H., Elzorba, H., & Soliman, A. M. (2020). Pharmacokinetics and tissue residue of enrofloxacin in healthy, *Eimeria*-infected broiler chickens and those pre-treated with amprolium and toltrazuril. *International journal of veterinary science and medicine*, 8(1), 31–38. <https://doi.org/10.1080/23144599.2020.1765720>
- 2 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>.
- 3 Barman D.A., Phukan, D.N., Kalita, T.C. Dutta, Mahato, G., P Borah, Rajkhowa, S., & Baishya, B.C. (2023). Efficacy of enrofloxacin over cefalexin in the therapeutic management of canine dermatitis. *The Pharma Innovation Journal*. 12(1), 2385–2388. <https://www.thepharmajournal.com/archives/?year=2023&vol=12&issue=1&ArticleId=18314>
- 4 Barry, R.L. (2007). PEG as a tool to gain insight into membrane fusion. *Eur. Biophys. J.*, 36(4–5), 315–326. <https://doi.org/10.1007/s00249-006-0097-z>.
- 5 Bird, S., Etminan, M., Brophy, J., Hartzema, A., & Delaney, J. (2013). Risk of acute kidney injury associated with the use of fluoroquinolones. *CMAJ: Canadian Medical Association journal*, 185(10), E475–E482. <https://doi.org/10.1503/cmaj.121730>
- 6 Camus, M. S., Krimer, P. M., Leroy, B. E., & Almy, F. S. (2010). Evaluation of the positive predictive value of serum protein electrophoresis beta-gamma bridging for hepatic disease in three domestic animal species. *Veterinary pathology*, 47(6), 1064–1070. <https://doi.org/10.1177/0300985810375946>
- 7 Caruthers, S., Wickline, S., & Lanza, G. (2007). Nanotechnological applications in medicine. *Current opinion in biotechnology*, 18(1), 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.006>
- 8 Cattaneo, L., Lopreiato, V., Piccioli-Cappelli, F., Trevisi, E., & Minuti, A. (2021). Plasma albumin-to-globulin ratio before dry-off as a possible index of inflammatory status and performance in the subsequent lactation in dairy cows. *Journal of dairy science*, 104(7), 8228–8242. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19944>
- 9 Chekh, B., Ferens, M., Ostapiv, D., Samaryk, V., Varvarenko, S., Vlizlo 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. [http://nbuv.gov.ua/UJRN/BioChem\\_2017\\_89\\_4\\_4](http://nbuv.gov.ua/UJRN/BioChem_2017_89_4_4)
- 10 Chen, M., Yang, Y., Ying, Y., Huang, J., Sun, M., Hong, M., Wang, H., Xie, S., & Chen, D. (2023). ABC Transporters and CYP3A4 Mediate Drug Interactions between Enrofloxacin and Salinomycin Leading to Increased Risk of Drug Residues and Resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(2), 403. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020403>
- 11 Clegg, J., Souza, C., & Brame B. (2023). Tolerability of Otic Solutions Containing Different Enrofloxacin Concentrations in Dogs with Healthy Ears. *J Am Anim Hosp Assoc*, 59(5), 214–218. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-7363>.
- 12 Dron, I. A., Vynnytska, S. I., Oleksa, V. V., Khom'iak, S. V., & Ostapiv, D. D. (2018). Syntez i doslidzhennia antybakterialnoi aktyvnosti pehilovanykh enrofloksatsyniv. *Visnyk Natsionalnoho universytetu Lvivska politekhniky*. 886, 47–51. [http://nbuv.gov.ua/UJRN/VNULPX\\_2018\\_886\\_9](http://nbuv.gov.ua/UJRN/VNULPX_2018_886_9)
- 13 Fuchs, K., Rinder, M., Dietrich, R., Banspach, L., Ammer, H., & Korbel, R. (2022). Penetration of Enrofloxacin in Aqueous Humour of Avian Eyes. *Veterinary sciences*, 10(1), 5. <https://doi.org/10.3390/vetsci10010005>
- 14 Grabowski, L., Gaffke, L., Pierzynowska, K., Cyske, Z., Choszcz, M., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2022). Enrofloxacin-The Ruthless Killer of Eukaryotic Cells or the Last Hope in the Fight against Bacterial Infections?. *International journal of molecular sciences*, 23(7), 3648. <https://doi.org/10.3390/ijms23073648>
- 15 Hewitt, M., Cronin, M. T., Enoch, S. J., Madden, J. C., Roberts, D. W., & Dearden, J. C. (2009). In silico prediction of aqueous solubility: the solubility challenge. *Journal of chemical information and modeling*, 49(11), 2572–2587. <https://doi.org/10.1021/ci900286s>

- 16 Jain, S., Gautam, V., & Naseem, S. (2011). Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 3(1), 118–127. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76489>
- 17 Katarey, D., & Verma, S. (2016). Drug-induced liver injury. *Clinical medicine (London, England)*, 16( 6), 104–109. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-6-s104>
- 18 Kozak, M., Stasiuk, A., Vlizlo, V., Ostapiv, D., Bodnar, Y., Kuz'mina, N., Figurka, N., Nosova, N., Ostapiv, R., Kotsumbas, I., Varvarenko, S., & Samaryk, V. Polyphosphate Ester-Type Transporters Improve Antimicrobial Properties of Oxytetracycline. *Antibiotics* 2023, 12 (3), 616. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030616>.
- 19 Kozak, M., Zelenina, O., Ostapiv, D., Skrypka, M., Samaryk, V., & Vlizlo, V. (2023). Blood creatinine content and rat kidney structure after intramuscular injection of pegylated antibiotic enrofloxacin. *Biol. Stud.*, 17(3):47–56. <https://doi.org/10.30970/sbi.1703.720>.
- 20 Kumar, S., Singh, D., Kumari, P., Malik, R. S., Poonam, Parang, K., & Tiwari, R. K. (2020). PEGylation and Cell-Penetrating Peptides: Glimpse into the Past and Prospects in the Future. *Current topics in medicinal chemistry*, 20(5), 337–348. <https://doi.org/10.2174/1568026620666200128142603>
- 21 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(3), 394. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030394>.
- 22 Ma, B., Mei, X., Lei, C., Li, C., Gao, Y., Kong, L., Zhai, X., & Wang, H. (2020). Enrofloxacin Shifts Intestinal Microbiota and Metabolic Profiling and Hinders Recovery from Salmonella enterica subsp. enterica Serovar Typhimurium Infection in Neonatal Chickens. *mSphere*, 5(5), e00725-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00725-20>
- 23 Mozar, F. S., & Chowdhury, E. H. (2018). Impact of PEGylated Nanoparticles on Tumor Targeted Drug Delivery. *Current pharmaceutical design*, 24(28), 3283–3296. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180730161721>
- 24 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).
- 25 Piras, C., Soggiu, A., Greco, V., Martino, P. A., Del Chierico, F., Putignani, L., Urbani, A., Nally, J. E., Bonizzi, L., & Roncada, P. (2015). Mechanisms of antibiotic resistance to enrofloxacin in uropathogenic Escherichia coli in dog. *Journal of proteomics*, 127(Pt B), 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.040>
- 26 Popp, M., Gerhards, H., & Wollanke, B. (2013). Enrofloxacin concentrations in the vitreous of horses with equine recurrent uveitis (ERU) after repeated intravenous administration. *Pferdeheilkunde*. 29, 574-580. <https://doi.org/10.21836/PEM20130501>
- 28 Prakash R.G., Adilaxamma, G., Srividya, T., & Madhava R. (2023). In-vitro synergistic antibacterial activity of Punganur cow urine on enrofloxacin. *Int J Vet Sci Anim Husbandry*, 8(2), 102-106. <https://doi.org/10.22271/veterinary.2023.v8.i2b.501>.
- 27 Sanchez Armengol, E., Unterweger, A., & Laffleur, F. (2022). PEGylated drug delivery systems in the pharmaceutical field: past, present and future perspective. *Drug development and industrial pharmacy*, 48(4), 129–139. <https://doi.org/10.1080/03639045.2022.2101062>
- 28 Simonov, M. & Vlizlo, V. (2015). 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>
- 29 Smith, A., Pennefather, P., Kaye, S. & Hart C. (2001). Fluoroquinolones. *Drugs*, 61, 747–761. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161060-00004>
- 30 Srinivasu, M., Singh, S., & Ahmad, A. (2022). Pathak Abhishek. Effect of enrofloxacin and ciprofloxacin on oxidative stress in rats. *Journal Of Veterinary Pharmacology And Toxicology*. 21(1), 80-82. ISSN: 0972-8872. <https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:jvpat&volume=21&issue=1&article=018>
- 31 Sztamári, V., van Dongen, A.M., Restrepo, T.M., den Toom, M.L. & Jongejan, N. (2023). Successful Clindamycin Therapy of an Infected Subcutaneous Permanent Pacing Lead in a Dog after a Failed Course with Potentiated Amoxicillin and Enrofloxacin. *Veterinary sciences*, 10(2), 93. <https://doi.org/10.3390/vetsci10020093>.
- 32 Tarushi, A., Raptopoulou, C., Psycharis, V., Terzis, A., Psomas, G., & Kessissoglou, D. (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>

- 33 Temmerman, R., Ghanbari, M., Antonissen, G., Schatzmayr, G., Duchateau, L., Haesebrouck, F., Garmyn, A., & Devreese, M. (2022). Dose-dependent impact of enrofloxacin on broiler chicken gut resistome is mitigated by synbiotic application. *Frontiers in microbiology*, *13*, 869538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.869538>
- 34 Tothova, C., Nagy, O. & Kovac, G. (2016). Serum proteins and their diagnostic utility in veterinary medicine: a review. *Veterinarni Medicina*, *61*, 475-496. <https://doi.org/10.17221/19/2016-VETMED>
- 35 Troughon, T. & Lefebvre, S. (2016) A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. *Journal of Veterinary Medicine*, *6*, 40-58. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2016.62006>.
- 36 Van Schyndel, S. J., Dubuc, J., Pascottini, O. B., Carrier, J., Kelton, D. F., Duffield, T. F., & LeBlanc, S. J. (2021). The effect of pegbovigrastim on early-lactation disease, production, and reproduction in dairy cows. *Journal of dairy science*, *104*(9), 10100–10110. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20266>.
- 37 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>.
- 38 Weese, J., Giguère, S., Guardabassi, L., Morley, P., Papich, M., Ricciuto, D., & Sykes, J. (2015). ACVIM consensus statement on therapeutic antimicrobial use in animals and antimicrobial resistance. *Journal of veterinary internal medicine*, *29*(2), 487–498. <https://doi.org/10.1111/jvim.12562>
- 39 Westropp, J. L., Sykes, J. E., Irom, S., Daniels, J. B., Smith, A., Keil, D., Settje, T., Wang, Y. & Chew, D.J. (2012). Evaluation of the Efficacy and Safety of High Dose Short Duration Enrofloxacin Treatment Regimen for Uncomplicated Urinary Tract Infections in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. *26*(3). 506-512. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00914.x>.
- 40 Wright, D., Brown, G., Peterson, M., & Rotschafer, J. (2000). Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *46*(5), 669–683. <https://doi.org/10.1093/jac/46.5.669>
- 41 Yang, S.-Y., Zhao, F.-K., Pang, H., Chen, L.-Z., Shi, R.-B. & Fang, B.-H. (2022). Pharmaceutical Cocrystals and Salts of Enrofloxacin: Structure and Properties, *Journal of Molecular Structure*, 133335, ISSN 0022-2860, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133335>.
- 42 Zdvizhkov, Yu. & Bura. M. (2014). Osoblyvosti zastosuvannya polimernykh nosiiv na osnovi polietylenhlikoliu dlia dostavky likiv v orhan-mishen. *Visnyk Lvivskoho universytetu*. *64*, 3-20. [http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU\\_biol\\_2014\\_64\\_3](http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU_biol_2014_64_3).
- 43 Zelenina, O., Vlizlo, V., Kozak, M., Ostapiv, D., Samaryk, V., Dron, I., Stetsko, T., Skrypka, M., Tomchuk, V., Danchuk, O. & Levchenko, A. 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. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2022.120607>. ISSN 2231-3354

### THE INFLUENCE OF THE PEGYLATED ANTIBIOTIC ENROFLOXACIN ON BLOOD PROTEIN CONTENT AND LIVER STRUCTURE OF RATS

O.Zelenina<sup>1</sup>, V.Vlizlo<sup>2</sup>, M.Skrypka<sup>1</sup>, D.Ostapiv<sup>3</sup>, V.Naida<sup>1</sup>, L.Afanasyeva<sup>1</sup>, T.Kemal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Odesa State Agrarian University

<sup>2</sup>Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology named after Stepan Gzhytsky,

<sup>3</sup>Institute of Animal Biology of NAAS

Among medicines, antibacterial drugs have the most distinct side reactions, in particular, the antibiotic enrofloxacin can cause a toxic effect on the body. The synthesis of new compounds of the antibiotic enrofloxacin with improved therapeutic efficacy and minimal side effects is relevant. The aim of the work is to investigate the content of blood serum proteins and the structure of the liver of rats after intramuscular injections of the pegylated antibiotic enrofloxacin and the drugs that were used in its creation - the traditional form of the antibiotic enrofloxacin and the PEG-400 polymer. For four days, daily, once a day the control animals were injected intramuscularly with a saline solution, and the experimental groups were given the antibiotic enrofloxacin in a traditional substance (the first group), the polymer PEG-400 (the second group) and the pegylated antibiotic enrofloxacin (the third one). On the 7th, 14th, and 21st days after the end of drug injections, blood and liver samples were taken from the animals for research. Total protein and its fractions - albumin, alpha-, beta-, and gamma globulins were tested in blood serum. Liver samples were examined histologically. The conducted studies showed that intramuscular injections of the pegylated antibiotic enrofloxacin, PEG-400 polymer and traditional antibiotic enrofloxacin to rats had little effect on the total

protein content in the blood serum of rats. The albumin content in the blood of animals treated with the pegylated antibiotic enrofloxacin, compared to control and other experimental animals, remained at a physiologically higher level, which indicates a stable protein synthesizing function of the liver. During the first 7 days after the end of drug treatment, the content of alpha-globulins in the blood serum of experimental group of rats was lower, and highly dispersed globulins (beta- and gamma-globulins) differed little from the control ones. This may indicate a slight effect of drugs on the cells of the reticulohistiocytic system, which are involved in the formation of beta and gamma globulins. Histological studies of liver tissues showed that pegylation of the antibiotic enrofloxacin reduced hepatotoxicity, since changes in the structure of hepatocytes were recorded only in the first 7 days of its use, and morphological disorders of the parenchyma were detected on the 7th and 14th days after the injection of the traditional form of the antibiotic enrofloxacin and 21 days after giving injections. Therefore, pegylation of the antibiotic enrofloxacin leads to a decrease of its toxic effect on the body, in particular, on the liver after intramuscular injections.

**Key words:** *rats, pegylated antibiotic enrofloxacin, PEG-400, enrofloxacin, total protein, protein fractions, liver microstructure.*