

УДК 616.98:579.873.21+614.48

В.В. Зажарський, П.О. Давиденко, О. М. Кулішенко  
к.вет.н.; к.вет.н.; к.вет.н.

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет

**ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА КУЛЬТУРАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ  
M. BOVIS ЗА ДІЇ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ПГКП-135 ТА ІЗОНІАЗИДУ**

**Анотація.** Метою роботи було дослідити вплив різних концентрацій препаратів ПГКП-135 та ізоніазиду на культивування патогенних штамів *M. bovis* за температури 37 °С за різних рН середовища.

За всіма дослідними (0,1, 0,5 та 1,0%) концентрацій препарату ПГКП-135 відмічена відсутність росту патогенного штаму *M. bovis* 100 пасажу протягом всього періоду спостереження (90 діб). Препарат ПГКП-135 активно впливає на культуральні властивості патогенного штаму *M. bovis*, культивованих на середовищі з рН 6,5 та 7,1 за температури 37 °С, стримуючи ріст і розвиток, володіючи туберкулостатичною дією. Низька концентрація (0,1 та 0,5%) препарату ізоніазид на середовищі з рН 6,5 та 7,1 за температури 37°С ріст патогенного штаму *M. bovis* 100-го пасажу не стримує.

**Ключові слова:** туберкульоз, *M. bovis*, тинкторіальні властивості, морфологічні ознаки, препарат ПГКП-135, ізоніазид.

Туберкульоз є соціальною проблемою, що відображує насамперед соціально-економічний рівень життя населення країни, а також ступінь розвитку охорони здоров'я. Всесвітня організація охорони здоров'я постійно стежить за ситуацією за епідемічними та соціально значущим захворюванням у світі. Особливо пильна увага приділяється туберкульозу. В останнє десятиліття ВОЗ була розроблена та з успіхом застосовується в світі так звана стратегія DOTS. Суть DOTS (Directly Observed Treatment Short-course) - суворо контрольоване лікування коротким курсом хіміотерапії [1-4].

Вираженою активністю відносно *M. bovis* володіє значна кількість препаратів, різних за походженням, хімічною структурою і механізмом дії. Протитуберкульозні лікарські препарати не тільки пригнічують розмноження і розвиток мікобактерій туберкульозу, а й призводять до їх загибелі.

Проблема побічної дії ксенобіотиків та протидії їх токсичним проявам залишається вкрай важливою. Проблема лікування хворих на туберкульоз має значну наукову та соціальну значимість в умовах глобальної епідемії цього захворювання в світі, в тому числі і в Україні [5]. Резистентний туберкульоз є серйозною проблемою охорони здоров'я населення у багатьох країнах, що розвиваються [6]. Лікування такого туберкульозу займає більше часу та потребує більш дорогих ліків. Multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) – це туберкульоз, на який не діють два найбільш ефективні лікарські засоби: рифампіцин та ізоніазид [7].

Сучасний стан виробництва протитуберкульозних препаратів в Україні далеко не ідеальний, тому необхідно розширювати виробництво вітчизняних протитуберкульозних препаратів.

З огляду на вищевикладене, можна сказати, що головним завданням пошуку нових протитуберкульозних препаратів є створення високоактивних і малотоксичних препаратів, позбавлених побічних ефектів. Також дуже важливо, щоб резистентність до них мікобактерій туберкульозу розвивалася якомога повільніше. Такі препарати повинні бути доступні для масового застосування (в тому числі і за вартістю).

Медико-соціальна програма боротьби з туберкульозом, що розробляється в Україні, повинна включити в себе не тільки ефективну хіміотерапію, а й цілий комплекс заходів з профілактики, своєчасної діагностики цього захворювання, соціальної реабілітації хворих. Ця програма обов'язково повинна передбачати розвиток ринку виробників вітчизняних протитуберкульозних препаратів, а також державну підтримку науково-дослідних розробок з лікування туберкульозу. Цілеспрямований синтез нових ефективних синтетичних молекул серед похідних 1,2,4-тріазолу, які потенційно можуть впливати на життєдіяльність мікобактерії, є актуальним, науково обґрунтованим та своєчасним напрямом пошукових досліджень.

**Мета роботи:** дослідження впливу різних концентрацій препаратів ПГКП-135 та ізоніазиду на культивування патогенних штамів *M. bovis* за температури 37 °С при різних рН середовища.

**Матеріал і методи.** Дослідження проводилися в лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин факультету ветеринарної медицини Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету та кафедри токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медичного університету протягом 2015-2016 р.

Культивування та накопичення біомаси досліджуваних штамів *M. bovis* проводили на яєчному живильному середовищі, яке за складом було ідентичним стандартному, виготовленому ДП «Ветеринарна медицина» (м. Харків, Україна). До середовища додавали препарат ПГКП-135: (2-((5-((Теофілін-7'-іл)метил)-4-метил-4Н-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)-N'-(4-(диметиламіно) бензіліден)-ацетогідразид) для отримання концентрацій 0,1%; 0,5%; 1%. Дослідження проводили зі встановленням двох рівнів рН: 6,5 та 7,1. Відмірювання необхідної кількості препарату проводили згідно з ГОСТ 27025-86. Розчини готували згідно методик, описаних у ГОСТ 4212-76 та ГОСТ 4517-87.

У виділених та накопичених мікобактерій вивчали тинкторіальні властивості, морфологічні ознаки, а також строки появи первинного росту, його інтенсивність і характер субкультури. Аналіз та оцінку колоній проводили за кількістю, величиною, формою, поверхнею, консистенцією, пігментоутворенням, прозорістю, блиском та емульгованістю у фізіологічному розчині (В. М. Манченко, З. Р. Троценко, М. С. Павленко та ін., 1994; О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Зажарський, Л. О. Ковальова, 2010). Тинкторіальні властивості мікобактерій визначали, готуючи мазки із колоній (культур), зафарбованих за методом Ціля–Нільсена та досліджуючи їх під імерсією мікроскопа SUNNY серії XS із цифровим мікроскопічним комплексом «Микмед-2-1600». Морфологію мікобактерій визначали за: довжиною, товщиною, формою, характером кінців клітин, зернистістю та розташуванням.

**Результати досліджень.** На початку дослідження виявляли вплив концентрації препарату та рН середовища на інтенсивність росту культури за температури 37°C. Для цього відбирали *M. bovis* 100 пасажу, який культивували за температури 37 °С на середовищі з препаратом ПГКП-135 у зазначених концентраціях у термостаті протягом трьох місяців на середовищі з рН 6,5 та 7,1 (в кількості десять пробірок із кожною концентрацією препарату). В якості контролю використовували *M. bovis* 100 пасажу без додавання до середовища препарату ПГКП-135.

Після закінчення цих термінів так само, як і після культивування за температури 37°C, проводили облік й характеризували ріст колоній мікобактерій (культур) [8, 9].

У підсумку були одержані дані впливу концентрацій препарату ПГКП-135 на культивування *M. bovis* за температур 37 °С на середовищі з різним рН на інтенсивність росту культури.

У таблиці 1 систематизовано дані про культуральні властивості *M. bovis* 100 пасажу, який культивували на середовищі з рН 7,1, що додатково містить препарат ПГКП-135 у трьох концентраціях.

До 7 доби дослідження ріст культури 100 пасажу *M. bovis* в контрольній групі на середовищі з рН 7,1 за температури 37 °С не відмічався.

Таблиця 1

**Характеристика культуральних властивостей *M. bovis* 100 пасажу, культивованих на середовищі з рН 7,1 за температури 37 °С**

7-а доба дослідження			
Контроль	Концентрація препарату ПГКП-135		
	0,1%	0,5%	1%
Шорсткий наліт	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
14-а доба дослідження			
Контроль	Концентрація препарату ПГКП-135		
	0,1%	0,5%	1%
Шорсткий наліт та поодинокі білі колонії за лінією посіву	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
30-а доба дослідження			
Контроль	Концентрація препарату ПГКП-135		
	0,1%	0,5%	1%
Суцільний ріст. Гладенькі, дрібні колонії білуватого кольору	Без змін	Без змін	Без змін
60-а доба дослідження			
Контроль	Концентрація препарату ПГКП-135		
	0,1%	0,5%	1%
Суцільний ріст. Гладенькі, дрібні колонії білуватого кольору	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
90-а доба дослідження			
Контроль	Концентрація препарату ПГКП-135		
	0,1%	0,5%	1%
Суцільний ріст	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній

Результати, наведені в табл. 1, засвідчили відсутність росту культури *M. bovis* 100 пасажу за усіх (0,1, 0,5 та 1%) концентрацій препарату ПГКП-135

впродовж усього періоду спостереження (90 діб), що свідчить про туберкулоостатичну його дію.

У таблиці 2 систематизовано дані щодо культуральних властивостей *M. bovis* 100 пасажу, який культивували на середовищі з рН 6,5, яке додатково містило препарат ПГКП-135 у трьох концентраціях.

До 7-ї доби досліду ріст культури 100 пасажу *M. bovis* на середовищі з рН 6,5 за температури 37 °С не відмічався.

Таблиця 2

**Характеристика культуральних властивостей *M. bovis* 100 пасажу, культивованих на середовищі з рН 6,5 за температури 37 °С**

7-а доба досліду			
Контроль	Концентрація препарату ПГКП-135		
	0,1%	0,5%	1%
Поодинокі колонії за лінією посіву	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
14-а доба досліду			
Контроль	Концентрація препарату ПГКП-135		
	0,1%	0,5%	1%
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
30-а доба досліду			
Контроль	Концентрація препарату ПГКП-135		
	0,1%	0,5%	1%
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
60-а доба досліду			
Контроль	Концентрація препарату ПГКП-135		
	0,1%	0,5%	1%
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
90-а доба досліду			
Контроль	Концентрація препарату ПГКП-135		
	0,1%	0,5%	1%
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній

За результатами досліду видно, що дія препарату за різних концентрацій на середовищі з рН 6,5 не відрізняється від рН 7,1. За всіма дослідними (0,1, 0,5 та 1,0%) концентрацій препарату ПГКП-135 нами відмічена відсутність росту патогенного штаму *M. bovis* 100 пасажу протягом всього періоду спостереження (90 діб). Таким чином, можна зробити висновок, що 0,1, 0,5% та 1,0% концентрації препарату ПГКП-135 активно впливають на культуральні властивості патогенного штаму *M. bovis*, культивованих на середовищі з рН 6,5 за температури 37 °С, стримуючи ріст і розвиток, володіючи туберкулоостатичною дією.

Використовувався класичний туберкулоостатичний препарат ізоніазид за різних концентрацій, рН середовища та температури 37 °С. Ізоніазид, згідно класифікації протитуберкульозних препаратів міжнародної спілки боротьби із

туберкульозом, відноситься до I групи - препарати високої ефективності. В якості контролю використовували *M. bovis* 100 пасажу без додавання до середовища препарату ізоніазид.

Для цього відбирали *M. bovis* 100 пасажу, який культивували за температури 37 °С на середовищі з препаратом ізоніазид у зазначених концентраціях у термостаті протягом трьох місяців на середовищі з рН 6,5 та рН 7,1 (в кількості десять пробірок із кожною концентрацією препарату).

У виділених мікобактерій вивчали строки появи первинного росту, його інтенсивність і характер субкультури.

У таблиці 3 систематизовано дані про культуральні властивості *M. bovis* 100 пасажу, який культивували на середовищі з рН 7,1, що додатково містить препарат ізоніазид у трьох концентраціях.

До 7-ї доби досліді ріст культури 100 пасажу *M. bovis* на середовищі з рН 7,1 за температури 37 °С не відмічався.

Таблиця 3

**Характеристика культуральних властивостей 100 пасажу *M. bovis*, культивованих на середовищі з рН 7,1 за температури 37 °С**

7-а доба досліді			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1%	0,5%	1%
Слизовий наліт	Слизовий наліт жовтуватого кольору	Слизовий наліт	Ріст відсутній
14-а доба досліді			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1%	0,5%	1%
Без змін	Без змін	Поодинокі гладенькі колонії	Ріст відсутній
30-а доба досліді			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1%	0,5%	1%
Численні колонії білого кольору	Поодинокі колонії білуватого кольору	Дрібні колонії білого кольору	Ріст відсутній
60-а доба досліді			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1%	0,5%	1%
Суцільний ріст. Гладенькі, дрібні колонії білуватого кольору	Дещо збільшилася кількість поодиноких дрібних колоній	Дрібні колонії білого кольору	Ріст відсутній
90-а доба досліді			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1%	0,5%	1%
Суцільний ріст	Суцільний ріст	Дещо збільшилася кількість поодиноких дрібних колоній	Ріст відсутній

Характеризуючи отримані дані, що наведені в таблиці 3 нами визначена відсутність росту культури *M. bovis* 100 пасажу за 1% концентрації препарату ізоніазид. На сьому добу досліді за 0,1% концентрації виявлений слизовий

наліт жовтуватого кольору, на 30-у добу з'являються поодинокі дрібні білуватого кольору, на 60-добу їх кількість збільшується і на 90-у добу визначаємо суцільний ріст, як і в контролі.

За використання 0,5% концентрації препарату ізоніазид на 7-у добу виявлений слизовий наліт, на 14 добу досліду з'являються поодинокі гладенькі колонії, на 30 та 60 добу – дрібні колонії білого кольору. На 90 добу збільшилася кількість поодиноких дрібних колоній.

Аналізуючи 1% концентрацію препарату ізоніазид нами визначено відсутність росту патогенного штаму *M. bovis* 100 пасажу протягом усього періоду досліду (90 діб), що свідчить про туберкулостатичну дію препарату.

Культуральні властивості *M. bovis* 100 пасажу, накопиченого та культивованого на середовищі з рН 6,5 за температури 37 °С з препаратом ізоніазид у трьох концентраціях представлені в таблиці 4.

Таблиця 4

**Характеристика культуральних властивостей 100 пасажу *M. bovis*,  
культивованих на середовищі з рН 6,5 з препаратом ізоніазид за  
температури 37 °С**

7-а доба досліду			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1%	0,5%	1%
Слизивий наліт	Поодинокі колонії білуватого кольору	Шорсткий наліт	Ріст відсутній
14-а доба досліду			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1%	0,5%	1%
Поодинокі колонії білуватого кольору	Без змін	Поодинокі гладенькі колонії	Ріст відсутній
30-а доба досліду			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1%	0,5%	1%
Численні колонії білого кольору	Поодинокі колонії білуватого кольору	Дрібні колонії білого кольору	Поодинокі дрібні колонії за лінією посіву
60-а доба досліду			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1%	0,5%	1%
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Ріст білуватих, поодиноких гладеньких колоній	Ріст білуватих, поодиноких гладеньких колоній	Без змін
90-а доба досліду			
Контроль	Концентрація препарату ізоніазид		
	0,1%	0,5%	1%
Суцільний ріст. Колонії дрібні, білі, гладенькі	Збільшилася кількість поодиноких дрібних колоній	Збільшилася кількість поодиноких дрібних колоній	Збільшилася кількість поодиноких дрібних колоній

До 14 доби досліджу ріст культури 100 пасажу *M. bovis* на середовищі з рН 6,5 за температури 37 °С не відмічався.

Аналізуючи результати досліджу, що наведено в табл.4, нами визначені відмінності дії 1% концентрації препарату ізоніазид на середовищі з рН 6,5, ніж за рН 7,1. Якщо на середовищі з рН 7,1 ріст культури *M. bovis* 100 пасажу протягом 90 діб культивування не спостерігався, то на середовищі з рН 6,5 з 30 доби з'являються поодинокі дрібні колонії, кількість яких на 90 добу збільшувалась.

0,1% концентрація препарату ізоніазид незначно впливає на ріст *M. bovis* – вже на 7 добу виявлені поодинокі колонії білуватого кольору, кількість яких поступово збільшується з терміном спостереження.

За 0,5% концентрації препарату ізоніазид ріст колоній відмічається на 14 добу – колонії дрібні, гладенькі, білого кольору, кількість яких має тенденцію до збільшення протягом терміну спостереження.

Отже, проведені дослідження засвідчили, що препарат ізоніазид за 1% концентрації пригнічує ріст і розвиток патогенного штаму *M. bovis*, культивованого на середовищі з рН 7,1 за температури 37 °С, що свідчить про туберкулоостатичну його дію.

Низька концентрація (0,1 та 0,5%) препарату ізоніазид на середовищі з рН 6,5 та 7,1 за температури 37°С ріст патогенного штаму *M. bovis* 100-го пасажу не стримує.

**Висновки.** 1. Дія препарату ПГКП-135 за різних концентрацій (0,1, 0,5% та 1,0%) на середовищі з рН 6,5 не відрізняється від рН 7,1 протягом всього періоду спостереження (90 діб), активно впливаючи на культуральні властивості патогенного штаму *M. bovis*, стримуючи його ріст і розвиток, володіючи туберкулоостатичною дією.

2. Препарат ізоніазид за 1% концентрації пригнічує ріст і розвиток патогенного штаму *M. bovis*, культивованого на середовищі з рН 7,1 за температури 37 °С, що свідчить про туберкулоостатичну його дію. Низька концентрація (0,1 та 0,5%) препарату ізоніазид на середовищі з рН 6,5 та 7,1 за температури 37°С ріст патогенного штаму *M. bovis* 100-го пасажу не стримує.

**Перспективи подальших досліджень.** Планується подальше вивчення матеріалу, що може бути використано для підвищення ефективності бактеріологічної діагностики туберкульозу тварин, селекції вакцинних штамів для конструювання препаратів специфічної профілактики хвороби.

#### Список використаних джерел

1. Harrison's Principles of Internal Medicine. – 14th edition. – New York: McGraw-Hill, 1998. – 2596 h.
2. Shulman S. T. et al. The biologic and clinical basis of infectious diseases. 5th ed. – W. B. Saunders Company, 1997. – 2787 p.
3. Tuberculosis Guide for low income countries. – 4th ed.– IUATLD, Paris, 1996.– 65 p.
4. Визель А. А., Гурылева М. Э. Туберкулез. Этиология, патогенез, клинические формы, диагностика, лечение. – М.: Гэотар Медицина, 2000. – 204 с.

5. Kumar, Vinay; Abbas, Abul K.; Fausto, Nelson & Mitchell, Richard N. Robbins Basic Pathology. – 8th. – Saunders Elsevier, 2007. – P. 516–522.

6. World Health Organization. The Stop TB Strategy, case reports, treatment outcomes and estimates of TB burden // Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. – 2009. – P. 187–300. – ISBN 978 92 4 156380 2.

7. Guidelines for Clinical and Operational Management of Drug-Resistant Tuberculosis. – ed. J. Caminero. – 2013.

8. Манченко, В.М., Троценко, З.Р., Павленко, М.С., та ін., 1994. Настанова по діагностиці туберкульозу. Київ.

9. Лабораторна діагностика туберкульозу тварин: [практичний посібник] / О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Зажарський, Л. О. Ковальова. – Дніпропетровськ: видавництво «Свідлер А. Л.», 2010. – 208 с.

**Сравнительная оценка культуральных свойств *M. bovis* при действии разных концентраций ПГКП-135 и изониазида / В. В. Зажарский, П. А. Давыденко, О. Н. Кулишенко.**

Целью работы было исследование влияние различных концентраций препаратов ПГКП-135 (2-((5-((Теофілін-7'-іл)метил)-4-метил-4*H*-1,2,4-тріазол-3-іл)тіо)-N'-(4-(диметиламіно)бензіліден)-ацетогідразид) и изониазида на культивирование патогенных штаммов *M. bovis* при температуре 37° С при различных рН среды.

Для всех исследованных (0,1, 0,5 и 1,0%) концентраций ПГКП-135 отмечено отсутствие роста патогенного штамма *M. bovis* 100 пассажа в течение всего периода наблюдения (90 суток). Препарат ПГКП-135 активно влияет на культуральные свойства патогенного штамма *M. bovis*, культивируемых на среде с рН 6,5 и 7,1 при температуре 37° С, сдерживая рост и развитие, проявляя туберкулостатическое действие. Низкая концентрация (0,1 и 0,5%) препарата изониазид на среде с рН 6,5 и 7,1 при температуре 37° С рост патогенного штамма *M. bovis* 100-го пассажа не сдерживает.

**Ключевые слова:** туберкулез, *M. bovis*, тинкториальные свойства, морфологические признаки, препарат ПГКП-135, изониазид.

**The influence of PGKP-135 on cultural properties of pathogenic strains of *M. bovis* / V. Zazharsky, P. Davydenko, O. Kulishenko.**

The aim was to study the effect of different concentrations of PGKP-135 and isoniazid on the cultivation of pathogenic strains of *M. bovis* at 37° C and various pH. For all studied (0.1, 0.5 and 1.0%) concentrations PGKP-135 the lack of growth of the pathogenic strain of *M. bovis* of 100 passage was noted during the observation period (90 days). The drug PGKP-135 actively influences the properties of the culture of a pathogenic strain of *M. bovis*, cultured in a medium with a pH of 6.5 and 7.1 at 37° C, holds back growth and development, shows tuberculostatic action. Low concentrations (0.1 and 0.5%) of the isoniazid in the medium with pH 6.5 and 7.1 at 37° C does not restrain the growth of a pathogenic strain of *M. bovis* of 100 passage.

**Keywords:** tuberculosis, *M. bovis*, tinctorial properties, morphological characteristics, drug PGKP-135, isoniazid.