

А. В. ЛИСИЦЯ, кандидат біологічних наук

П. Ю. КРИВОШИЯ, кандидат ветеринарних наук

М. С. МАНДИГРА, доктор ветеринарних наук, професор

І. В. СТЕПАНЯК, кандидат ветеринарних наук

Л. Б. КОТ, С. В. ЖИГАЛЮК, І. Л. АНДРУЩУК, І. М. ДМИТРІЄВ

Інститут сільського господарства Західного Полісся НААН України

КОМПЛЕКСНА ДІЯ ПОЛІМЕРНИХ ПОХІДНИХ ГУАНІДИНУ НА КЛІТИННІ КУЛЬТУРИ

У роботі представлені результати вивчення дії полігексаме-тиленгуанідину (ПГМГ) на культури клітин трахеї теляти і фібробластів курячого ембріону. Ці культури виявилися зручними моделями для всебічного дослідження властивостей ПГМГ. Встановлено, що ПГМГ хлорид в концентрації 10^{-4} % і вище діє біоцидно на сформований моношар клітин, а концентрації 10^{-5} % і нижче – практично на нього не впливають. ПГМГ повністю зупиняє проліферативну активність фібробластів курячого ембріону в концентраціях 10^{-5} - 10^{-6} %. І навпаки, – в діапазоні концентрацій 10^{-9} - 10^{-7} % може стимулювати проліферативну активність клітин за короткотривалої експозиції. Вперше визначено, що ПГМГ за короткотривалої експозиції захищає сформований моношар клітин від ураження вірусами. Вірусопротекторна дія солей ПГМГ залежить від їх аніонного складу (хлорид, суццинат або ін.), тривалості експозиції, концентрації клітин і титру вірусу.

Ключові слова: полігексаметиленгуанідин, токсичність, культура клітин, проліферація, віруси.

На певних етапах розробки та лабораторних випробувань властивостей нових дезінфектантів, хіміотерапевтичних препаратів або регуляторів клітинного обміну доцільно використовувати культури клітин. В складі сучасних засобів для дезінфекції часто використовують полімерні похідні гуанідину, типовим представником яких є полігексаметиленгуанідин (ПГМГ) [1]. Йому властива бактерицидна, фунгіцидна, віроцидна і альгіцидна дія [1,2]. За будовою полікатіон ПГМГ є лінійним або розгалуженим полімером з молекулярною масою від кількох сотень до кількох тисяч а.о.м., кількість мономерів зазвичай коливається в межах $n \approx 7 - 70$. Він добре розчинний у воді. Біоцидна дія і токсичність ПГМГ вивчені порівняно непогано. Наприклад, дослідження на трьох різних культурах клітин людини *in vitro* показали, що інгібуючі концентрації (IC_{50}) ПГМГ при 24 год. інкубуванні знаходяться в межах $0,5-1,3 \times 10^{-2}$ % [3]. Хоча, на нашу думку, визначені в цій роботі IC_{50} є дуже високими.

Разом з тим, широке впровадження в практику дезінфікуючих засобів на основі полімерних похідних гуанідину вимагає більш ретельного та всебічного аналізу їх дії на біологічні системи різного рівня. Нашим завданням було виявити та дослідити, крім біоцидного, ще й інші ефекти, які можуть спричиняти сполуки цієї групи.

Зокрема, відомо, що при обробці насіння пшениці 0,1-1,0 % розчинами ПГМГ препарат може не лише захистити насіння від ураження пліснявими грибами, а й позитивно вплинути на його проростання [4]. Вивчення дії ПГМГ на молодь риб гупі (*Poecilia reticulata*) показало, що при концентрації препарату 10^{-7} - 10^{-6} %, через 7 діб спостерігається збільшення показника питомої швидкості росту більш ніж на 60 % порівняно з контролем [5]. Через 14 діб темпи приросту (питома швидкість росту, ефективність конвертування корму, показник оптимальності) знижувались, але все ще перевищували контроль. Хоч автори вважають, що стимулюючий ефект пов'язаний із адаптаційним синдромом (стресом), і в кінцевому результаті може закінчитися фазою виснаження (прогресуючим токсикозом). В цих досліджах ПГМГ діяв на акваріумних рибок протягом всього часу експерименту (хронічно).

ПГМГ в концентрації 1×10^{-5} % може стимулювати ріст грибка *Aspergillus niger*, а за 2×10^{-5} % навпаки, – пригнічує [6,7].

Інший полімерний похідний гуанідину – полігексаметиленбігуанідин – в концентраціях від 2×10^{-5} до 2×10^{-4} % позитивно впливає на проліферацію кератоцитів людини, в більших дозах він вже діє цитотоксично [8].

Отже, полімерні похідні гуанідину неоднозначно впливають на організми або культури клітин. Хоч механізми біологічної активності ПГМГ остаточно не з'ясовані, вважається, що він діє переважно на мембрани клітин [9,10,11]. Оскільки ПГМГ є мембраноактивною сполукою, то, полікатіон за низьких (нетоксичних) концентрацій після адсорбції на цитоплазматичну мембрану (ЦПМ) клітини змінює її «ліпідний малюнок», проникність, латеральну рухливість ліпідів, роботу ферментів, трансмембранний електричний потенціал, тощо. Логічно припустити, що за певних умов препарат може зробити клітину менш вразливою з боку вірусів, наприклад таких, що містять в своїй оболонці ліпіди. Проведені нами попередні випробування справді виявили потенційні вірусопротекторні властивості ПГМГ [12].

Метою наших досліджень було з'ясувати як залежать ефекти спричинені дією ПГМГ на клітини еукаріот від його концентрації та часу експозиції.

Матеріали і методи. Об'єкти досліджень: первинна культура фібробластів курячого ембріону (ФКЕ), перещеплювана культура клітин трахеї теляти (ТТ) великої рогатої худоби; вірус-рідини герпесвірусів ринопневмонії коней (*Equine herpesvirus type 1*) вакцинний штам СВ-69 (комерційний препарат) і ринотрахеїту великої рогатої худоби (*Rhinotracheitis infectiosa bovine*) штам ТК-А, а також вірусу інфекційної анемії (ІНАН) коней (*Equine infectious anemia virus*, родина ретровірусів *Retroviridae*, підродина *Lentivirinae*) польовий штам. Середня активність використаних штамів вірусів становила 4,0-5,5 lg ТЦД₅₀/см³. При підготовці культур клітин використовували стандартні методики [13,14] у нашій модифікації [15]. Клітини висівали в 96-лункові планшети в об'ємі 100 мкл на одну лунку в поживному середовищі, що складалося з суміші середовища 199 (45 %), Ігла (45 %) і сироватки крові великої рогатої худоби (10 %). При формуванні моношару клітин ТТ використовували суспензію, що містила ≈ 800 тис. кл/см³.

Досліджували дію на клітини водних розчинів ПГМГ хлориду (ПГМГхл) і ПГМГ сукцинату двозаміщеного (ПГМГсд) («Терміт», м. Рівне, Україна), які до потрібних концентрацій розводили в стерильному сольовому збалансованому

розчині Хенкса (рН 7,2-7,4) у співвідношенні 1:10, в контролі – стерильний фізрозчин і розчин Хенкса (1:10).

При визначенні інгібуючих (токсичних) і вірусопротекторних властивостей ПГМГхл і ПГМГсд їх використовували в робочих концентраціях від 10^{-6} % до 10^{-2} %, або від 10 мкг/л до 100 мг/л (10^{-11} - 10^{-7} М), в дозах 0,1 мл, 0,2 мл або 0,3 мл на лунку. При визначенні ростостимулюючих властивостей препарати брали в концентраціях від 10^{-9} % (або 0,01 нг/мл) до 10^{-5} % (0,1 мкг/мл).

Для визначення вірусопротекторної дії солей ПГМГ використовували розведення вірусів ІНАН, ринотрахеїту і ринопневмонії в робочій дозі 100 ТЦД₅₀/см³. Робочі розчини ПГМГ, у зазначених вище концентраціях, так само в дозах 0,1 мл, 0,2 мл або 0,3 мл на лунку додавали до вже сформованого моношару клітин. Ростове середовище з моношару перед цим обережно видаляли. Після 15 або 30 хвилинної експозиції розчини, що містили ПГМГ, також видаляли. Моношар клітин ТТ промивали забуференим стерильним фізрозчином (рН 7,0-7,2) та розчином Хенкса. Після цього додавали вірусний матеріал у поживному середовищі. До клітин в контролі додавали розчин Хенкса на 15 або 30 хв. Оброблені препаратами ПГМГ культури клітин у мікропланшетах вміщували в термостат ($t = 37$ °С). Час інкубування і спостереження становив 6-7 діб. Для визначення цитопатичної дії вірусів стан моношару клітин оцінювали візуально з використанням мікроскопа лабораторного бінокулярного (збільшення $\times 70$).

Вивчаючи стимулюючу дію ПГМГ на проліферативну активність клітин їх суспензію у ростовому середовищі вносячи в лунки розтитровували від 1:2 до 1:128 для клітин трахеї теляти і від 1:2 до 1:2048 для фібробластів курячого ембріону. Після добової інкубації клітин ($t = 37$ °С) в лунки, до моношару що був сформований не повністю (10-50 %), зважаючи на розведення (титр клітин), на 15 хв. додавався препарат в дозі 0,1 мл. Через 15 хв. експозиції середовище, що містило ПГМГ вилучали, клітини промивали стерильним забуференим фізрозчином (рН 7,0-7,2) та розчином Хенкса. Після цього додавали поживне середовище. В контролі до клітин на 15 хв. додавали розчин Хенкса. Оброблені препаратами ПГМГ культури клітин в мікропланшетах вміщували в термостат ($t = 37$ °С). Час інкубування і спостереження становив 6 діб.

Результати досліджень та їх обговорення. Визначення токсичної дії різних концентрацій ПГМГхл на ПККТ показало, що за концентрацій препарату 10^{-3} % і вище дози від 0,1 до 0,3 мл на лунку викликали швидку загибель моношару клітин вже протягом першої доби інкубування. Концентрація 10^{-4} % викликала загибель половини клітин протягом першої доби і 100 % загибель протягом наступних днів. 10^{-5} % концентрація в дозі 0,2 мл на лунку не спричиняли помітні зміни стану клітин моношару протягом першої доби, через 6 діб неушкодженою лишалося половина клітин. Виявилось, що нетоксичною для культури клітин ТТ можна вважати концентрацію 10^{-5} % (або 0,1 мг/л) взятую в мінімальній дозі 0,1 мл на одну лунку з моношаром клітин.

Узагальнюючи результати токсичної дії різних доз ПГМГ хлориду на сформований моношар субкультури фібробластів курячого ембріону можна стверджувати, що його концентрації від 10^{-4} % і вище є токсичними. Проте з'ясувалося, що у випадку коли препарат додати до моношару клітин на короткий час (10-15 хв.), а після цього злити, промити моношар фізрозчином і додати чистий розчин Хенкса, то клітини не гинуть. Тобто, при короткотривалій експозиції навіть за концентрацій

ПГМГхл 10^{-3} – $10^{-2}\%$, сформований моношар залишається неушкодженим. Концентрації препарату від $10^{-5}\%$ і нижче можна вважати такими, що практично не впливають на тривалість життя сформованого моношару фібробластів.

Також з'ясувалося, що солі ПГМГ можуть впливати на швидкість формування моношару клітин. Додавання ПГМГхл на початку формування моношару фібробластів в концентраціях 10^{-5} – $10^{-6}\%$ призводить до повної зупинки їх проліферативної активності. Концентрації від $0,3 \times 10^{-7}\%$ до $0,3 \times 10^{-9}\%$ частково інгібують проліферативну активність і пригальмовують утворення моношару (табл. 1).

Таблиця 1.

Формування моношару фібробластів курячого ембріону за постійної дії різних концентрацій ПГМГхл.

Концентрація ПГМГ у зразку, %	Стан моношару
$0,3 \times 10^{-6}$	впродовж перших 3 діб з'являються окремі незначні ділянки росту груп клітин, впродовж наступних 3 діб повна зупинка росту
$0,3 \times 10^{-7}$	впродовж перших 3 діб помітний повільний ріст окремих груп клітин (близько 30 % в порівнянні з нормально сформованим моношаром в контролі), впродовж наступних 3 діб повністю сформувався моношар клітин
$0,3 \times 10^{-8}$	впродовж перших 3 діб розвиток моношару сповільнений (близько 60 % в порівнянні з контролем), впродовж наступних 3 діб повністю сформувався моношар клітин
$0,3 \times 10^{-9}$	впродовж перших 3 діб розвиток моношару сповільнений (близько 80-90 % в порівнянні з контролем), впродовж наступних 3 діб повністю сформувався моношар клітин
контроль (без ПГМГ)	моношар повністю сформувався за 2 доби, впродовж наступних 4 діб змін не спостерігали

Зовсім інша картина спостерігається у випадку короткотривалої дії солей ПГМГ. Оскільки в титрах клітин від 1:2 до 1:64 моношар за першу добу інкубування сформувався практично повністю, то препарати вносили в лунки з вихідним розведенням клітин від 1:128 до 1:2028. Це дало можливість визначити динаміку процесу формування моношару після короткотривалої обробки клітин препаратами ПГМГ. Узагальнені результати впливу різних концентрацій солей ПГМГ на формування моношару фібробластів в залежності від початкової кількості клітин наведено в таблиці 2.

У концентраціях 10^{-6} – $10^{-5}\%$ ПГМГхл і $10^{-5}\%$ ПГМГсд гальмують процес формування моношару клітин. Найкраще стимулюють проліферативну активність фібробластів препарати ПГМГхл в діапазоні концентрацій 10^{-8} – $10^{-7}\%$, а ПГМГсд – 10^{-9} – $10^{-7}\%$. Чому такі самі концентрації ПГМГхл (табл. 1) сповільнювали ріст моношару при його постійній дії на фібробласти? Ймовірно це пов'язано з тим, що для адсорбції полікатіону на ЦПМ потрібен певний час. В такому випадку стимулюючі концентрації знаходяться на 2-3 порядки нижче. Або має значення саме одномоментна короткочасна стресова дія препарату.

**Динаміка формування моношару фібробластів після короткотривалої дії
різних концентрацій ПГМГ_{хл} і ПГМГ_{сд}.**

Зра- зок, конц. препа- рату, %	Ступінь сформованості моношару фібробластів, %														
	Через 1 добу (на момент внесення препарату)					Через 2 доби					Через 3 доби				
	Розведення клітин														
	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2028	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2028	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2028
ПГМГ_{хл}															
10 ⁻⁵	50	30	20	10	10	50	30	20	10	0	40	20	10	0	0
10 ⁻⁶	50	30	20	10	10	60	30	30	10	10	40	70	40	30	20
10 ⁻⁷	50	30	20	10	10	100	80	70	50	40	100	100	100	100	80
10 ⁻⁸	50	30	20	10	10	100	80	80	50	40	100	100	100	100	100
10 ⁻⁹	50	30	20	10	10	80	50	50	20	20	100	100	90	40	30
ПГМГ_{сд}															
10 ⁻⁵	50	30	20	10	10	70	40	30	20	10	80	60	40	30	20
10 ⁻⁶	50	30	20	10	10	80	50	50	20	20	100	100	80	40	30
10 ⁻⁷	50	30	20	10	10	100	100	100	80	50	100	100	100	100	80
10 ⁻⁸	50	30	20	10	10	100	100	100	90	80	100	100	100	100	100
10 ⁻⁹	50	30	20	10	10	90	60	60	40	30	100	100	100	80	70
кон- троль															
	50	30	20	10	10	80	50	50	20	20	100	100	80	40	30

$P > 0,95$.

Що стосується клітин ТТ, то в титрах від 1:2 моношар сформувався практично повністю за першу добу інкубування. Тому препарати вносили в лунки з вихідним розведенням клітин від 1:4 до 1:128. Вже через наступну добу були помітні суттєві відмінності в швидкості формування моношару залежно від концентрацій солей ПГМГ. Узагальнені результати визначення впливу ПГМГ_{хл} і ПГМГ_{сд} на швидкість утворення моношару клітин ТТ в залежності від титру (кратного розведення початкової кількості клітин) наведено в таблиці 3.

Найкраще стимулюють проліферативну активність клітин трахеї ПГМГ_{хл} в концентрації 10⁻⁷ %, а ПГМГ_{сд} – 10⁻⁸ %, хоча другий проявляє стимулюючу дію в досить широкому діапазоні від 10⁻⁸ до 10⁻⁶ %. ПГМГ_{хл} в концентрації 10⁻⁵ % гальмує процес утворення моношару клітин.

З даних наведених в таблицях 2 і 3 видно, що клітини первинної культури фібробластів утворюють моношар значно швидше за клітини ТТ. При цьому, фібробласти принаймні на порядок більш чутливі до дії препаратів ПГМГ ніж трансформовані клітини трахеї, які пережили більше тисячі пасажів. Проте, стимулюючий ефект солей ПГМГ проявляється для обох типів евкаріотичних клітин. Щодо його причин, то можна припустити, що стимуляція по-перше пов'язана зі зміною проникності мембрани для води, іонів Н⁺, К⁺, Na⁺, Cl⁻ та ін., по-друге – вона може бути викликана механізмами стресової адаптації клітин, як у випадку рибок гупі [5].

Динаміка формування моношару клітин трахеї теляти після короткотривалої ПГМГ_{хл} і ПГМГ_{сд} різних концентрацій.

Зразок, конц. препарату, %	Ступінь сформованості моношару клітин трахеї теляти, %																	
	Через 2 доби						Через 4 доби						Через 6 діб					
	Розведення клітин																	
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
ПГМГ_{хл}																		
10 ⁻⁵	70	60	30	10	0	0	90	70	40	30	0	0	100	80	40	40	0	0
10 ⁻⁶	70	70	50	10	10	0	100	80	70	50	50	20	100	100	80	60	60	40
10 ⁻⁷	90	70	70	70	30	30	100	100	90	80	70	50	100	100	100	100	100	100
10 ⁻⁸	90	70	70	50	20	10	100	90	90	70	50	40	100	100	90	90	80	70
10 ⁻⁹	70	70	60	50	10	10	100	80	80	60	50	30	100	100	80	70	60	50
ПГМГ_{сд}																		
10 ⁻⁵	70	50	40	40	10	0	100	70	60	50	50	30	100	100	80	70	50	40
10 ⁻⁶	90	50	50	50	20	10	100	80	70	70	60	40	100	100	90	80	70	60
10 ⁻⁷	90	50	50	50	20	10	100	100	90	80	70	40	100	100	100	90	80	70
10 ⁻⁸	90	100	100	100	30	20	100	100	100	100	80	50	100	100	100	100	100	100
10 ⁻⁹	70	70	40	30	20	10	100	80	70	70	50	30	100	100	80	80	70	50
контроль	75	70	40	30	10	10	100	75	70	60	50	30	100	100	80	70	60	50

$P > 0,95$.

Як зазначалося вище, на фібробластах нами були проведені попередні випробування вірусопротекторної дії ПГМГ. З'ясувалося, що короткочасна 10-15-хвилинна обробка вже сформованого моношару фібробластів препаратом в концентраціях 10⁻⁵ - 10⁻⁴ % надійно захистила клітини від інфікування вірусом ринопневмонії коней. Оскільки препарат діяв і після промивання моношару фізрозчином та розчином Хенкса, то логічно припустити, що молекули ПГМГ міцно зв'язалися з цитоплазматичними мембранами клітин і забезпечили вірусопротекторний ефект. При цьому вірус, що перебував у культуральному середовищі, залишився неушкодженим, тобто десорбції полімера з ЦПМ не відбувалося. Якщо цей вірусовмісний розчин додати до необробленого препаратом моношару клітин, останній швидко вражається і гине протягом першої доби інкубування (як і в контролі) [12].

Але для герпес-вірусів ринопневмонії коней та ринотрахеїту великої рогатої худоби фібробласти курячого ембріона є не зовсім адекватним об'єктом. Наприклад, збудник ринотрахеїту має чітко виражений тропізм до епітеліальних клітин слизових оболонок верхніх дихальних шляхів і статевих органів. Тому в наступних дослідках ми використали клітини ТТ. Узагальнюючи результати вірусопротекторної дії різних концентрацій препаратів ПГМГ при короткочасній 15-хвилинній експозиції зі сформованим моношаром клітин ТТ можна сказати, що ПГМГ_{хл} у концентраціях 10⁻³-10⁻² % повністю захищає клітини трахеї від цитопатичної дії всіх випробуваних вірусів протягом 6 діб інкубації. Концентрація препарату 10⁻⁴ % має частково виражений вірусопротекторний ефект, а нижча концентрація (10⁻⁵ %) практично не впливає на цитопатичну дію вірусів. Тобто, концентрації ПГМГ_{хл} 10⁻⁵ - 10⁻⁴ %, які надійно захищали фібробласти від інфікування вірусом ринопневмонії коней, для ПККТ виявилися недостатніми. Це

пояснюється не лише особливостями будови ЦПМ трансформованих клітин трахеї, а й їх більшою сприйнятливістю до вірусу ринопневмонії (більша адекватність об'єкта). Та й взагалі, швидко проліферуючі клітини, зокрема фібробласти, більш чутливі та вразливі до дії різних екзогенних чинників (ксенобіотиків, патогенів, іонізуючого випромінювання тощо).

Вірусопротекторна дія ПГМГсд виявилася значно слабшою. Лише за концентрації 10^{-2} %, максимальної з усіх випробуваних нами, препарат показав повний (щодо ІНАН), або частковий (щодо вірусів ринопневмонії та ринотрахеїту) захисний ефект. У менших концентраціях ПГМГсд не захищає клітини від ураження вірусами. Якщо в окремих випадках вірусопротекторний ефект і спостерігався, то він був незначним. Тому в повторних дослідах час експозиції клітин ТТ з ПГМГсд було збільшено з 15 до 30 хв. З'ясувалося, що в концентрації 10^{-2} % препарат повністю захищає клітини від ураження вірусом ринопневмонії (інші штами вірусів у цьому досліді не випробовувалися), протягом 6 днів цитопатична дія не спостерігалася. Концентрація ПГМГсд 10^{-3} % забезпечила вірусопротекторний ефект лише на ≈ 50 %. Тобто, час адсорбції препарату на ЦПМ залежить від аніонного складу солей ПГМГ.

Узагальнюючи результати експериментів, можна стверджувати, що вірусопротекторна дія солей ПГМГ залежить від їх аніонного складу (хлорид, сукцинат або ін.), тривалості експозиції, загальної кількості (концентрації) клітин в об'ємі лунки та титру вірусу.

Висновки. Культури клітин трахеї теляти та фібробластів курячого ембріону виявилися зручними моделями для всебічного вивчення властивостей полімерних похідних гуанідину. Нетоксичною для сформованих моношарів клітин трахеї теляти і фібробластів курячого ембріону можна вважати концентрацію ПГМГ 10^{-5} % (або 0,1 мг/л), вищі концентрації викликають деструкцію моношару. Концентрації ПГМГхл в поживному середовищі 10^{-5} - 10^{-6} % викликають повну зупинку проліферативної активності, нижчі концентрації, аж до $0,3 \times 10^{-9}$ %, частково інгібують мітоз фібробластів і гальмують утворення моношару. При короткочасній 15-хв. попередній експозиції фібробластів з ПГМГхл в концентраціях 10^{-6} - 10^{-5} %, а ПГМГсд 10^{-5} % гальмують процес формування моношару. Стимулюють проліферативну активність фібробластів препарати ПГМГхл в діапазоні концентрацій 10^{-8} - 10^{-7} %, а ПГМГсд – 10^{-9} - 10^{-7} %. При короткочасній 15-хв. попередній експозиції клітин трахеї з ПГМГхл в концентрації 10^{-5} % процес утворення моношару клітин гальмується. Найкраще стимулюють проліферативну активність клітин трахеї ПГМГхл в концентрації 10^{-7} %, а ПГМГсд – 10^{-8} %, хоча другий проявляє стимулюючу дію в досить широкому діапазоні від 10^{-8} до 10^{-6} %.

Вперше виявлено, що солі ПГМГ можуть мати вірусопротекторну дію. При цьому блокується адсорбція вірусу на поверхню клітини та його проникнення всередину. Для прояву ефекту захисту клітин від вірусів, концентрації ПГМГ для трансформованої культури клітин ТТ мають бути принаймні на порядок вищими, ніж для фібробластів. Короткочасна 15-хвилинна обробка моношару фібробластів ПГМГхл в концентраціях 10^{-5} - 10^{-4} % захищає клітини від інфікування вірусом ринопневмонії коней. ПГМГхл у концентраціях 10^{-3} - 10^{-2} % за 15-хв, а ПГМГсд в концентрації 10^{-2} % за 30-хвилинної експозиції забезпечують захист моношару клітин трахеї від цитопатичної дії випробуваних нами вірусів.

Таким чином, вплив полімерних похідних гуанідину на організми або культури клітин суттєво залежить від концентрації препарату і часу експозиції.

В подальшому доцільно випробувати всі виявлені нами ефекти на інших культурах клітин, зокрема людини. Також залишається відкритим питання захисту клітин від вірусів, які не містять ліпідів, а мають лише білковий капсид. Отримані результати можуть бути використані в біотехнології при роботі з культурами клітин еукаріот і, можливо, прокаріот.

Список використаної літератури

1. *Воинцева И. И.* Полигуанидины – дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы / И. И. Воинцева, П. А. Гембицкий. – М.: ЛКМ-пресс, 2009. – 304 с.
2. Використання полігексаметиленгуанідину для дезінфекції / М. С. Мандигра, І. В. Степаняк, А. В. Лисиця, Ю. М. Мандигра // Аграрний вісник Причорномор'я: збірник наукових праць. – Одеса: СМІЛ, 2008. – Вип. 42. – Ч. 2. – С. 69–73.
3. *Адаменко Л. В.* Токсичність дезінфекційних засобів на культури клітин людини *in vitro* // Біологія тварин. – 2010. – Т. 12. – № 1. – <http://www.inenbiol.com/bt/20101/9/1.pdf>.
4. *Гембицкий П.* Защита пшеницы от биоповреждений / П. Гембицкий, К. Ефимов // Хлебопродукты. – 1999. – № 11. – С. 26-27.
5. *Гаврикова В. С.* Вплив полігексаметиленгуанідину на біопродукційні параметри молоді риб / В. С. Гаврикова, О. А. Ігнатюк, В. Л. Чумак // Наукові вісті НТУУ «КП». – 2010. – № 3. – С. 16-20.
6. *Кузнецова Л. С.* О механизме действия полигуанидиновых дезинфектантов // Мясная индустрия. – 2001. – № 4. – С. 52.
7. *Кузнецова Л. С.* Влияние антиоксидантов на состав липидов *Cunninghamella japorica* в норме и в состоянии стресса: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1990. – 24 с.
8. *Wiegand C.* Proliferationsforderung und biokompatibilitat von polihexanid / C. Wiegand, M. Abel, A. Kramer, G. Muller, P Ruth, U.-C. Hipler // GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär. – 2007. – V. 2 (2). <http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2007-2/dgkh000076.shtml>.
9. *Gilbert P.* Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet / P. Gilbert, L. Moore // J Appl Microbiol. – 2005. – Vol. 99. – P. 703-715.
10. *Лисиця А. В.* Механізми бактерицидної дії полігексаметиленгуанідину // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2011. – № 3 (25). Електронне видання: http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2011_3/11lav.pdf.
11. *Zhou Z.* Interactions of biocidal guanidine hydrochloride polymer analogs with model membranes: a comparative biophysical study / Z. Zhou, A. Zheng, J. Zhong // Acta Biochimica et Biophysica Sinica. – 2011. – Vol. 43. – № 9. – P. 729-737.
12. *Лисиця А. В.* Вплив полігексаметиленгуанідину гідрохлориду на плазматичну мембрану фібробластів курячих ембріонів та на штучну бішарову ліпідну мембрану / А. В. Лисиця, П. Ю. Кривошия, О. Я. Шатурський // Біотехнологія. – 2010. – Т. 3. – № 2. – С. 56-61.
13. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів. За ред. І.Я. Коцюмбаса. – Львів: Тріада плюс, 2005. – 356 с.

14. Посібник з медичної вірусології / [Гирін В.М., Порохницький В.Г., Вороненко С.Г. та ін.]; за ред. В.М. Гиріна. – К.: Здоров'я, 1995. – С. 48-51.

15. Лисиця А.В. Перевірка цитопатичної та віруліцидної дії ПГМГ / А.В. Лисиця, П.Ю. Кривошия // Наук.-техн. бюл. Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів. – 2009. – Вип. 10. – № 4. – С. 157-164.

КОМПЛЕКСНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПОЛИМЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГУАНИДИНА НА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК/ Лисица А.В., Кривошея П.Ю., Мандыгра Н.С., Степаняк И.В., Кот Л.Б., Жигалюк С.В., Андрушук И.Л., Дмитриев И.Н.

В статье представлены результаты изучения действия полигексаметиленгуанидина (ПГМГ) на культуры клеток трахеи теленка и фибробластов куриного эмбриона. Установлено, что ПГМГ хлорид в концентрации 10^{-4} % и выше действует биоцидно на сформированный монослой клеток, концентрации 10^{-5} % (0,1 мг/л) и ниже – практически на него не влияют. В концентрациях 10^{-5} - 10^{-6} % ПГМГ хлорид полностью приостанавливает пролиферативную активность фибробластов куриного эмбриона. Концентрации препарата от $0,3 \times 10^{-7}$ % до $0,3 \times 10^{-9}$ % частично ингибируют митоз фибробластов и тормозят процесс образование монослоя. При кратковременной 15-мин. предварительной экспозиции наоборот – соли ПГМГ в диапазоне концентраций 10^{-9} - 10^{-7} % могут стимулировать пролиферативную активность клеток. Наилучшую стимулирующую активность для клеток трахеи ПГМГ хлорид проявляет в концентрации 10^{-7} %, а ПГМГ сукцинат – 10^{-8} %.

Впервые было выявлено, что при кратковременной экспозиции ПГМГ защищает уже сформированный монослой клеток от поражения вирусами. При этом блокируется адсорбция вируса на поверхности клетки и его проникновение внутрь. Вирусопротекторное действие солей ПГМГ зависит от их анионного состава, продолжительности экспозиции, концентрации клеток и вируса. Испытано вирусы, которые содержат в своей оболочке липиды. А именно: герпесвирусы ринопневмонии лошадей и ринотрахеита крупного рогатого скота, а так же ретровирус инфекционной анемии лошадей. Определено, что ПГМГ хлорид в концентрациях 10^{-3} - 10^{-2} % при 15-мин., а ПГМГ сукцинат в концентрации 10^{-2} % при 30-мин. экспозиции обеспечивают надежную защиту клеток монослоя от поражения вирусами. При этом для трансформированной перевиваемой культуры клеток трахеи теленка концентрации ПГМГ должны быть на порядок более высокими, чем для первичной культуры фибробластов.

Ключевые слова: полигексаметиленгуанидин, токсичность, культура клеток, пролиферация, вирусы.

INTEGRATED ACTION OF POLYMERIC GUANIDINE DERIVATIVES ON CELL CULTURES / A. V. Lisitsa, P. U. Krivosheya, N. S. Mandygra, I. V. Stepanyak, L. B. Kot, S. V. Zhigalyuk, I. L. Andruschuk, I. N. Dmitriev

The article presents results of the study of polyhexamethylene guanidine (PHMG) on cell culture of bovine trachea and chicken embryo fibroblasts. It is found that PHMG

chloride in 10^{-4} % concentrations or high has a biocidal effect on the formed monolayer of cells, in 10^{-5} % (0,1 mg/L) concentration and lower – almost not affected on it. At 10^{-5} – 10^{-6} % concentrations PHMG chloride completely suspends the proliferative activity of chicken embryo fibroblasts. From 0,3×10,7% to 0,3×10,9% drug concentrations are partially inhibited mitosis of fibroblasts and retarded the process of the monolayer formation. In short-term 15-minute pre-exposure it is contrary – PHMG salt in 10^{-9} – 10^{-7} % concentration range can stimulate cell proliferative activity. The 10^{-7} % concentration of PHMG chloride and the 10^{-8} % of PHMG succinate show the best stimulating activity for trachea cells.

It was revealed first that the short-term exposure PHMG protects already formed monolayer of cells from virus. Herewith virus adsorption on the cell surface and its penetration inside are blocking. Virus protective effect of PHMG salt depends on the anionic composition, duration of exposure, concentration of cells and virus. There were tested viruses, which contain lipids in its shell. Namely herpesviruses equine rhinopneumonitis and bovine rhinotracheitis, as well as the retrovirus of equine infectious anemia. It is determined that 10^{-3} – 10^{-2} % concentrations of PHMG chloride at 15 minutes, and 10^{-2} % concentration of PHMG succinate at 30 minutes exposure provide reliable protection of cells monolayer from damage by viruses. In addition, for transformed continuous cell culture of calf trachea PHMG concentrations should be much higher than those for primary fibroblast cultures.

Key words: polyhexamethylene guanidine, toxicity, cell culture, proliferation, viruses.

Рецензент – зав. відділу паразитофауни Західного регіону України Інституту сільського господарства Західного Полісся НААН, к.вет.н., с.н.с. **С. М. Катюха**.