

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 577.3:615.9:612.014

А.В. ЛИСИЦЯ П.Ю. КРИВОШИЯ

Інститут сільського господарства Західного Полісся НААН України
вул. Князя Володимира 16/18, Рівне, 33028

СТИМУЛЯЦІЯ ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ КЛІТИН СОЛЯМИ ПОЛІГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНІДИНУ

Вивчено вплив солей полігексаметиленгуанідину (ПГМГ) на ріст первинної культури фібробластів курячого ембріону та перещеплюваної культури клітин трахеї (ПККТ) теляти. Залежно від концентрації ПГМГ може чинити як інгібуючу, так і стимулюючу дію на проліферативну активність цих клітин. З'ясовано умови за яких солі ПГМГ проявляють найкращі ростостимулюючі властивості. Визначено, що при 15 хв. експозиції ПГМГ хлорид (ПГМГхл) в концентраціях 10^{-8} - 10^{-7} %, а ПГМГ сукцинат двозаміщений (ПГМГсд) 10^{-9} - 10^{-7} %, стимулюють проліферативну активність фібробластів. Трансформовані клітини трахеї, принаймні, на порядок менш чутливі до дії цих сполук. Зокрема, найкраще впливають на ріст моношару ПККТ препарати ПГМГхл в концентрації 10^{-7} %, а ПГМГсд – 10^{-8} %, хоча останній є ефективним у досить широкому діапазоні від 10^{-8} до 10^{-6} %. Отримані дані можуть бути використані в біотехнології при роботі з культурою клітин евкаріот.

Ключові слова: полігексаметиленгуанідин, фібробласти, культура клітин трахеї, проліферативна активність

Полігексаметиленгуанідин є типовим представником полімерних похідних гуанідину. Зазвичай ці сполуки використовуються в складі дезінфектантів або антисептиків. ПГМГ володіє бактерицидними, фунгіцидними, віроцидними і альгіцидними властивостями [1, 2]. Проте давно відомо, що одна й та сама речовина в певних дозах може бути отрутою, а в інших – ліками. Ще наприкінці минулого століття з'явилися дані про ростостимулюючі властивості ПГМГ, зокрема, при обробці насіння пшениці 0,1-1,0 % розчинами ПГМГ хлориду було виявлено, що препарат не лише захищає насіння від ураження грибками (*Alternarium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*), а й стимулює його проростання [4]. Проведені нами дослідження з передпосівної обробки насіння деяких культур (пшениці, кукурудзи, буряку, гороху) також довели можливість підбору оптимальних концентрацій ПГМГ для стимуляції проростання [4]. При цьому суттєво підвищувалися схожість насіння та енергія проростання.

Вивчення дії різних доз ПГМГ на *Aspergillus niger* показало, що концентрація 2×10^{-5} % пригнічує ріст грибка, а 1×10^{-5} %, навпаки, стимулює [6, 7]. Також відомо, що алогічний до ПГМГ препарат полігексаметиленбігуанідин (ПГМБГ) у концентрації 2×10^{-5} - 2×10^{-4} % може стимулювати проліферацію кератоцитів людини, а в більших концентраціях – діє цитотоксично [15]. Крім того, з'ясувалося, що ця сполука може впливати на експресію певних генів *E. coli*, синтез ферментів тощо [14]. Щодо ПГМГ, який входить до складу австрійського медичного препарату «акацид», то дослідження показали, що він може редукувати S-фазу клітинного циклу ракових клітин простати, впливати на експресію циклінів D1, E, p27 та циклін-залежних кіназ 2, 4 [13].

У ветеринарній медицині при розробці препарату для захисту шкіри вимені великої рогатої худоби і рук персоналу, що працює з тваринами, нами була використана здатність деяких солей ПГМГ прискорювати загоєння ран. Нова мазь для вимені містить в якості основного компоненту ПГМГ сукцинат. Випробування показали, що крім антисептичних та пом'якшуючих властивостей, мазь має також ранозагоюючу і протизапальну дію [11]. Проте механізми як ростостимулюючої, так і інгібуючої або біоцидної дії солей ПГМГ, в значній мірі залишаються нез'ясованими.

Вивчення токсичної і стимулюючої дії ПГМГ на молодь (1 міс.) риб гупі (*Poecilia reticulata*) показало, що при концентраціях 10^{-7} - 10^{-6} % через 7 діб спостерігається збільшення показника питомої швидкості росту більш ніж на 60 % порівняно з контролем [3]. Через 14 діб темпи приросту (питома швидкість росту, ефективність конвертування корму, показник оптимальності) знижувались, але все ще перевищували контроль. Дослідники вважають, що це пов'язано із адаптаційним синдромом (стресом), після якого повинна наступити фаза виснаження (прогресуючий токсикоз). У цих дослідах ПГМГ вносився в акваріуми з рибками на початку експерименту і перебував там протягом всього часу моніторингу.

У дослідах з перещеплюваною культурою клітин трахеї теляти та первинно культурою фібробластів курячого ембріону нами було встановлено, що ПГМГ хлорид (ПГМГхл) у концентрації 10^{-4} % і вище діє біоцидно на вже сформований моношар клітин, а концентрації 10^{-5} % і нижче – практично на нього не впливають. У концентраціях 10^{-5} - 10^{-6} % ПГМГ повністю зупиняє проліферативну активність і формування моношару фібробластів. Концентрації від $0,3 \times 10^{-7}$ % до $0,3 \times 10^{-9}$ % можуть інгібувати проліферативну активність фібробластів і гальмувати утворення моношару клітин [8]. В цих експериментах ПГМГхл перебував в середовищі культивування протягом всього часу експерименту (до 6 діб). Проте, моношар не руйнується, якщо препарат додавати до ростового середовища на короткий час (10-15 хв.). Якщо після цього ростове поживне середовище, яке містить ПГМГ, забрати, промити моношар фізрозчином і додати чисте ростове середовище, то клітини залишаються неушкодженими. Лише при збільшенні концентрації ПГМГхл до 10^{-3} % така сама короткочасна експозиція може призвести до загибелі моношару фібробластів вже протягом першої доби [8].

Метою наших досліджень було з'ясувати за яких умов солі ПГМГ можуть стимулювати проліферативну активність клітин евокаріот.

Матеріал і методи досліджень

Об'єктами досліджень були перещеплювана трансформована культура клітин трахеї теляти (ПККТ) і первинна культура фібробластів курячого ембріону. При підготовці культур клітин використовували загальноприйняті методики [5, 12] у нашій модифікації [9]. Суспензію клітин при внесенні в лунки розтитровували від 1:2 до 1:128 для клітин трахеї і від 1:2 до 1:2048 для фібробластів. Випробовували дію на клітини водних розчинів солей ПГМГ, зокрема хлориду (ПГМГхл) і сукцинату двозаміщеного (ПГМГсд) («Терміт», м. Рівне, Україна). Розведення ПГМГ до необхідних концентрацій від 10^{-9} % (або 0,01 нг/мл) до 10^{-5} % (або 0,1 мкг/мл) проводили в середовищі Хенкса за описаною раніше схемою [12]. Концентрацію водневих іонів (рН) в розчинах ПГМГ контролювали з використанням іоніміру лабораторного И-130, рН встановлювали в межах 7,2-7,4. Ростове поживне середовище для клітин складалося з суміші середовища 199 (45%), середовища Ігла (45%) і сироватки крові великої рогатої худоби (10%). Для вивчення стимулюючої дії ПГМГ на проліферативну активність, препарат у дозі 0,1 мл на лунку додавали на 15 хв. до клітин, що перебували у ростовому середовищі, після цього середовище з ПГМГ відбирали, клітини промивали розчином Хенкса і додавали свіжоприготоване ростове середовище. В контролі до клітин на 15 хв. додавали розчин Хенкса. Оброблені препаратами ПГМГ культури клітин у мікропланшетах вмішували в термостат ($t = 37^\circ\text{C}$), час інкубування і спостереження становив 6 діб. Стан моношару клітин оцінювали візуально з використанням лабораторного бінокулярного мікроскопа (збільшення $\times 70$). Кратність повторень у кожному досліді становила від 3 до 5.

Результати досліджень та їх обговорення

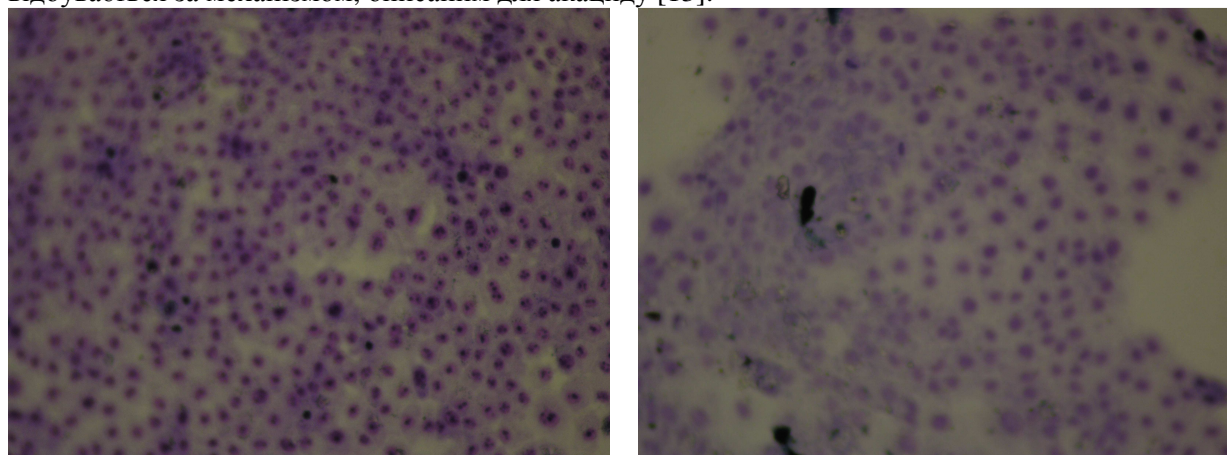
Узагальнені результати досліджень впливу різних концентрацій ПГМГхл і ПГМГсд на формування моношару ПККТ залежно від початкової кількості клітин (ступеня розведення клітин) наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Динаміка формування моношару клітин трахеї теляти після дії ПГМГхл і ПГМГсд різних концентрацій

Зразок, конц., %	Ступінь сформованості моношару клітин, %																	
	Через 1 добу						Через 3 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
ПГМГхл																		
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
ПГМГсд																		
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	80
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

Як з'ясувалося, солі ПГМГ впливають на швидкість формування моношару клітин. Найкраще стимулюють проліферативну активність клітин трахеї ПГМГхл в концентрації 10⁻⁷ % (рис. 1 а), а ПГМГсд – 10⁻⁸ %, хоча останній проявляє свою дію в досить широкому діапазоні від 10⁻⁸ до 10⁻⁶ %. У концентрації 10⁻⁵ % ПГМГхл гальмує процес утворення моношару клітин (рис. 1 б). Не виключено, що за цих і вищих концентрацій інгібування розвитку клітин відбувається за механізмом, описаним для акациду [13].



А

Б

Рис. 1. Вплив різних концентрацій ПГМГхл на формування моношару клітин трахеї теляти через 3 доби (початкове розведення клітин 1:8): а – концентрація препарату 10⁻⁷ %; б – 10⁻⁵ %.

Узагальнені результати досліджень впливу різних концентрацій солей ПГМГ на формування моношару фібробластів залежно від початкової кількості клітин наведено в таблиці 2.

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

Зразок	Ступінь сформованості моношару клітин, %																					
	Через 1 добу											Через 2 доби										
	Розведення клітин																					
конц., %	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2028	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2028
ПГМГ _{хл}																						
10 ⁻⁵	70	70	60	40	40	20	10	10	0	0	0	80	70	70	50	50	30	20	10	0	0	0
10 ⁻⁶	80	80	70	50	50	30	20	20	10	10	0	100	90	70	60	50	40	40	30	20	20	10
10 ⁻⁷	100	100	100	100	100	100	100	100	80	70	50	40	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80
10 ⁻⁸	100	100	100	100	100	100	100	80	80	50	40	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10 ⁻⁹	100	100	100	100	100	100	80	60	50	30	20	100	100	100	100	100	100	100	100	90	40	30
ПГМГ _{сд}																						
10 ⁻⁵	100	90	80	70	70	50	50	30	20	10	0	100	100	100	80	80	70	60	40	20	10	0
10 ⁻⁶	100	100	100	100	100	100	100	90	60	50	20	10	100	100	100	100	100	100	100	70	40	30
10 ⁻⁷	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80
10 ⁻⁸	100	100	100	100	100	100	100	100	100	90	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10 ⁻⁹	100	100	100	100	100	100	90	60	60	30	30	100	100	100	100	100	100	100	100	100	70	50
контроль	100	100	100	100	100	100	80	50	50	20	20	100	100	100	100	100	100	100	100	80	40	30

Як видно з табл. 2, клітини первинної культури фібробластів утворюють моношар значно швидше за ПККТ. Найкраще стимулюють проліферативну активність фібробластів препарати ПГМГ_{хл} у концентраціях 10⁻⁸-10⁻⁷%, а ПГМГ_{сд} в концентраціях 10⁻⁹-10⁻⁷%. Дещо вищих концентраціях 10⁻⁶-10⁻⁵% ПГМГ_{хл} і 10⁻⁵% ПГМГ_{сд} вже пригальмовують процес утворення моношару клітин. Виявилися, що фібробласти, принаймні, в 10 разів (на порядок) більш чутливі до дії препаратів ПГМГ, ніж клітини трахеї. Останні є трансформованими, ПККТ теляти підтримується нами тривалий час (більше тисячі пасажів). Крім того, помітно, що первинні культури або субкультури (фібробласти) мають ростові потенції значно вищі ніж ПККТ. Проте, ростостимулюючий ефект ПГМГ проявляється для обох, хоча і досить різних типів екаріотичних клітин. Дія ПГМГ на клітини залежить не лише від концентрації препаратів та часу експозиції, а й від кількості (титру) клітин у зразку.

ПГМГ є мембраноактивною сполукою, він впливає на структуру і функції цитоплазматичної мембрани. Можна припустити, що стимуляція, з одного боку, пов'язана зі зміною проникності мембрани для води, іонів Н⁺, К⁺, Na⁺, Сl та ін., з іншого боку, вона може бути викликана механізмами стресової адаптації клітин. Полікатион ПГМГ за досить короткий час незворотно зв'язується з аніонними ліпідами мембрани. Внаслідок латеральної дифузії вони стягуються до місць адсорбції молекул полімеру, окремі ділянки мембрани переходять з рідкокристалічного в кристалічний стан, утворюються домени збагачені кислими або нейтральними фосфоліпідами. Ймовірно, клітина позбавляється «дефективних» фосфоліпідів. Адаптивні механізми клітини включають синтез нових полярних ліпідів з більшим відсотком насичених жирних кислот. Новосинтезовані ліпіди, вбудовуючись в мембрану, компенсують функції тих, що незворотно зв'язалися з полікатионом ПГМГ. Ці процеси впливають на проліферативну активність. Запуск механізму синтезу ліпідів якимось чином пов'язаний з прискоренням неогенезу інших сполук, скороченням клітинного циклу і прискоренням проліферації. Можливо, має місце «адаптаційний синдром», як зазначалося в роботі [3].

Отримані дані щодо ростостимулюючого впливу різних концентрацій ПГМГ в перспективі можуть бути застосовані в біотехнології при розробці та виготовленні ростових живильних середовищ для культивування клітин.

Висновки

Отже, встановлено, що солі ПГМГ залежно від концентрації можуть чинити як інгібуючий, так і стимулюючий вплив на проліферативну активність клітин трахеї теляти та фібробластів курячого ембріону. ПГМГ_{сд} є менш токсичним і діє на клітини «м'якше» ніж ПГМГ_{хл}. Визначено, що для фібробластів при короткотривалій 15 хв. експозиції ПГМГ_{хл} у концентраціях 10⁻⁸-10⁻⁷%, а ПГМГ_{сд} у концентраціях 10⁻⁹-10⁻⁷% не є токсичними і

стимулюють їх проліферативну активність. Підтверджено, що концентрації ПГМГхл від 10^{-6} % і вище, а ПГМГсд від 10^{-5} % і вище гальмують швидкість формування моношару фібробластів. Трансформовані клітини трахеї, принаймні, на порядок менш чутливі до препаратів ПГМГ, ніж фібробласти. Зокрема ПГМГхл у концентрації 10^{-5} % гальмує процес утворення моношару клітин трахеї. Найкраще стимулюють проліферативну активність клітин трахеї ПГМГхл в концентрації 10^{-7} %, а ПГМГсд – 10^{-8} %, хоча останній є ефективним у широкому діапазоні: від 10^{-8} до 10^{-6} %. Отримані результати можуть бути використані в біотехнології при роботі з культурами клітин.

1. 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.
2. *Воинцева И.И.* Полигуанидины – дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы / И.И. Воинцева, П.А. Гембицкий. – М.: ЛКМ-пресс, 2009. – 304 с.
3. *Гаврикова В.С.* Вплив полігексаметиленгуанідину на біопродукційні параметри молоді риб / Гаврикова В.С., Ігнатюк О.А., Чумак В.Л. // Наукові вісті НТУУ «КП». – 2010. - № 3. – С. 16-20.
4. *Гембицкий П.* Защита пшеницы от биоповреждений / П. Гембицкий, К. Ефимов // Хлебопродукты. – 1999. – № 11. – С. 26-27.
5. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів. За ред. І.Я. Коцюмбаса. – Львів: Тріада плюс, 2005. – 356 с.
6. *Кузнецова Л.С.* Влияние антиоксидантов на состав липидов *Cunninghamella japonica* в норме и в состоянии стресса: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук / Л.С. Кузнецова. – М., 1990. – 24 с.
7. *Кузнецова Л.С.* О механизме действия полигуанидиновых дезинфектантов / Л.С. Кузнецова. // Мясная индустрия. – 2001. – № 4. – С. 52.
8. *Лисиця А.В.* Дія дезінфектантів з полігексаметиленгуанідином на культури клітин евкаріот / А. Лисиця, П. Кривошия // Вісн. Житомир. нац. агрокол. ун-ту. – 2012. – Т. 3. – Ч. 1, № 1. – С. 267-271.
9. *Лисиця А.В.* Перевірка цитопатичної та віруліцидної дії ПГМГ / А.В. Лисиця, П.Ю. Кривошия // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів. – 2009. – Вип. 10. – № 4. – С. 157-164.
10. *Лисиця А.В.* Стимулювання проростання насіння полімерними похідними гуанідину / А.В. Лисиця // Наук. доп. Нац. ун-ту біоресурсів і природокористування України. – 2010. - № 3 (19). Електронне видання <http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2010-3/10lavpdg.pdf>.
11. Пат. 53487 Україна, МПК (2009) А61К 31/00. Мазь захисна для вимені „Інстеп” / М.С. Мандигра, А.В. Лисиця, Ю.М. Мандигра-Мельник, І.М. Дмитрієв. – заявл. 01.04.2010; опубл. 11.10.2010, Бюл. № 19.
12. *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.
13. *Akacid-medical-formulation, a novel biocidal oligoguanidine with antitumor activity reduces S-phase in prostate cancer cell lines through the Erk 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway* / Н. Neuwirt, Н. Muller, I.T. Cavarretta [et al.] // Int. J. Oncol. – 2006. – № 29(2). – P. 503-512.
14. *Allen M.J.* The response of *Escherichia coli* to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide / M.J. Allen, G.F. White, A.P. Morby // Microbiology. – 2006. – Vol. 152. – P. 989–1000.
15. *Wiegand C.* Proliferationsforderung und biokompatibilitat von polihexanid / C. Wiegand, M. Abel, A. Kramer, G. Muller, P Ruth, U.-C. Hipler // GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär. – 2007. – Vol. 2(2). Електронне видання <http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2007-2/dgkh000076.shtml>.

А.В. Лисиця, П.Ю. Кривошия

Институт сельского хозяйства Западного Полесья НААН, Ровно, Украина

СТИМУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК СОЛЯМИ полигексаметиленгуанидина

Приведены результаты изучения влияния солей полигексаметиленгуанидина (ПГМГ) на рост первичной культуры фибробластов куриного эмбриона и перевиваемой культуры клеток трахеи (ПККТ) телят. В зависимости от концентрации ПГМГ может как ингибировать, так и стимулировать пролиферативную активность этих клеток. Выяснены условия при которых соли ПГМГ проявляют свои лучшие ростостимулирующие свойства. Определено, что при 15

мин. экспозиции ПГМГ хлорид (ПГМГхл) в концентрациях 10^{-8} - 10^{-7} %, а ПГМГ сукцинат двузамещенный (ПГМГсд) 10^{-9} - 10^{-7} %, ускоряют пролиферативную активность фибробластов. Трансформированные клетки трахеи, как минимум, на порядок менее чувствительны к действию этих соединений. В частности, лучше всего влияют на рост монослоя ПККТ препараты ПГМГхл в концентрации 10^{-7} %, а ПГМГсд – 10^{-8} %, хотя второй эффективен в широком диапазоне от 10^{-8} до 10^{-6} %. Полученные данные могут быть использованы в биотехнологии при работе с культурами клеток.

Ключевые слова: полигексаметиленгуанидин, фибробласты, культура клеток трахеи, пролиферативная активность

A.V. Lysytsya, P.Y. Kryvosha

Agriculture Institute of the West Polissya of NAAS, Rivne, Ukraine

POLYHEXAMETHYLENEGUANIDINE SALTS STIMULATE THE PROLIFERATION ACTIVITY OF CELLS

This article reports that salts of polyhexamethyleneguanidine (PHMH) can affect on growing of the primary culture fibroblasts of the chicken embryo and interweaved culture of the trachea cells (ICTC) of calf. PHMH, in depending of concentrations, can hold up or stimulate the proliferation activity of these cells. It is realized under what condition salts of PHMH show for the best their own stimulate characteristic. It is determined that under 15 min. exposures PHMH chloride (PHMHch) in concentration 10^{-8} - 10^{-7} %, but PHMH succinate (PHMHsd) 10^{-9} - 10^{-7} %, accelerate proliferation activity of fibroblasts. The transformed cells of trachea are on tenfold more sensitive to action of these materials. As follows, for the best influence upon growing monolayer of ICTC preparations PHMHch in concentrations 10^{-7} %, but PHMHsd – 10^{-8} %, though the last is efficient in rather broad range from 10^{-8} before 10^{-6} %. Got results can be used in biotechnologies in work with culture of eukaryote cells.

Key words: polyhexamethyleneguanidine, fibroblasts, cell culture of tracheas calf, proliferation activity.

Рекомендує до друку

Н.М. Дробик

Надійшла 16.08.2012