

УДК 591.81:547.495.9

DOI: 10.31073/vet_biotech41-04

КРИВОШИЯ П.Ю., канд. вет. наук, e-mail: kpravlo1964@gmail.com,
МАНДИГРА Ю.М., канд. с.-г. наук, e-mail: julijamandygra@gmail.com,
КАТЮХА С.М., канд. вет. наук, e-mail: katyuha.71@ukr.net,
ЛИСИЦЯ А.В., д-р біол. наук, e-mail: lysyca@ukr.net

Дослідна станція епізоотології Інституту ветеринарної медицини НААН

ЗАСТОСУВАННЯ КУЛЬТУР КЛІТИН *SUS DOMESTICUS* ДЛЯ ТЕСТУВАННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ КОМПОЗИЦІЙ З ПОЛІГЕКСАМЕТИЛЕНБІГУАНІДИНОМ

В роботі наведено результати дослідження як токсичного, так і стимулюючого впливу на первинні культури клітин свині полігексаметиленбігуанідину гідрохлориду (ПГМБ), в т.ч. в сумішах з іншими біологічно активними речовинами.

Використано метод культивування клітин нирки, легенів, печінки, м'язової і нервової тканин ембріонів свині. Вперше в Україні порівняно вплив ПГМБ на різні типи клітин одного організму.

З'ясовано, що залежно від концентрації ПГМБ інгібує або стимулює проліферативну активність та формування моношару клітин. За нетоксичних концентрацій (від 10⁻⁵% і нижче) ПГМБ може стимулювати проліферативну активність клітин і прискорювати формування їх моношару. При цьому більш виражений ефект проявляють комбінації ПГМБ з оліями лікарських рослин. Найвищий ростостимулюючий ефект ПГМБ в концентрації 10⁻⁵% отримано на клітинах легенів (+52%), а при застосуванні його комбінації з олією сосни проліферативна активність цих клітин зростала на 61%.

Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення композицій ПГМБ з іншими біологічно активними речовинами в якості антисептику, а також для пришвидшення загоєння ран, зокрема в складі мазей, гелів, пов'язок або пластирів.

Ключові слова: *полігексаметиленбігуанідин, олії лікарських рослин, культура клітин, токсичність, стимулювання росту.*

Вступ. Полімерні похідні гуанідину вже достатньо тривалий час використовують в якості ефективних дезінфектантів і антисептиків. В першу чергу це полігексаметиленгуанідин (ПГМГ) та його аналог полігексаметиленбігуанідин (ПГМБ). Вони володіють чітко вираженими бактерицидними, віруліцидними, фунгіцидними і альгіцидними властивостями [1–3]. Є чисельні дані про їх застосування в складі різних дезінфікуючих засобів і антисептиків, наприклад при боротьбі з лікарняними інфекціями тощо [4–6]. Тривалий час вважалося що ці препарати малотоксичні для вищих організмів, в тому числі й для людини [4, 7, 8]. Також є дані, що вони мають

виражені протизапальні та ранозагоювальні властивості, а тому можуть застосовуватися для лікування хронічних ран та термічних опіків, також є інформація про антиоксидантну активність полімерного біоциду [9, 10]. Отже вплив ПГМГ і ПГМБ на клітини еукаріот неоднозначний і потребує подальшого вивчення [11, 12]. Проведені нами раніше експерименти показали, що для вже сформованого моношару клітин нирки великої рогатої худоби відносно нетоксичними (не викликають руйнацію моношару) концентраціями ПГМГ і ПГМБ є від $10^{-4}\%$ ($1,0 \text{ мкг/см}^3$) і нижче [13], для інших типів клітин нетоксичні концентрації зазвичай становлять $10^{-5}\%$ ($0,1 \text{ мкг/см}^3$) і нижче [14]. При цьому треба зважати на те, що наприклад у бактерій суспензійні культури на порядок чутливіші до ПГМГ ніж бактерії в біоплівках [6]. Відповідно, і суспензія клітин еукаріотичних може бути чутливіша за тканину або сформований моношар клітин.

Мета роботи. Дослідити вплив ПГМБ в концентраціях 10^{-5} - $10^{-4}\%$ та його композицій з іншими біологічно активними речовинами на проліферацію різних типів клітин організму свині та формування ними моношару.

Матеріали і методи досліджень. Полігексаметиленбігуанідину гідрохлорид (ПГМБ) синтезовано на ПП «Терміт» (Рівне, Україна) шляхом поліконденсації гексаметилендіаміну і діціандіаміду з додаванням амонію хлориду (Sinopharm Chemical Reagents Co. Ltd., Shanghai, China). ПГМБ гідрохлорид розчиняли у фосфатному буферному розчині (PBS, pH 7,4) і після фільтрування використовували розчини препарату з масовою концентрацією від $10^{-5}\%$ до $10^{-1}\%$ (від $0,1 \text{ мг/дм}^3$ до 1 г/дм^3). Це становить $\approx 5,5 \times 10^{-7}$ – $5,5 \times 10^{-3}$ Моль/дм³, молярну концентрацію рахувати по масі одного мономеру $\approx 183 \text{ Da}$ через те, що кількість мономерів в неоднорідних за розмірами олігомерних ланцюгах різна і коливається в широких межах.

В частині дослідів використано отримані нами раніше наночастинки оксиду цинку (ZnO) розміром $\approx 25 \text{ нм}$ [15], а також електрохімічно активовану воду – аноліт ($E_h = -800 \text{ mV}$, pH 6,0–7,0) [16], отриманий на установці STEL-ANK-SUPER device (Enviolyte Industries International Ltd., Естонія). Також використано фармакопейні препарати: олія сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L., виробник Frey + Lau GmbH, Німеччина), олія отримана з хвої (виробник Frey + Lau GmbH, Німеччина); олія з евкаліпту (*Eucalyptus globulus* Labill., виробник Frey + Lau GmbH, Німеччина), отримана з молодих пагонів (виробник Frey + Lau GmbH, Німеччина); олія отримана методом холодного віджиму з шкірки апельсину (*Citrus sinensis* L., виробник LLC CPC Green Pharm Cosmetic, Україна); олія отримана методом парової дистиляції квіток монарда (*Monarda didyma* L., виробник AZ-M Aroma-Zone, Франція). В окремих зразках

використовували глутаровий альдегід $C_5H_8O_2$ (*Glutaraldehyde* CAS RN:111-30-8, Hebei Junyu Pharmaceutical Co., Ltd, Hebei, Китай).

Нумерація зразків в таблицях наступна, №:

- 1 – аноліт;
- 2 – ПГМБ $10^{-4}\%$;
- 3 – ПГМБ $10^{-5}\%$;
- 4 – ПГМБ $10^{-5}\%$ + аноліт (співвідношення 1:1);
- 5 – ПГМБ $10^{-5}\%$ + олія монарди (співвідношення 200:1);
- 6 – ПГМБ $10^{-5}\%$ + олія евкалипту (співвідношення 200:1);
- 7 – ПГМБ $10^{-5}\%$ + олія апельсину (співвідношення 200:1);
- 8 – глутаровий альдегід 0,1%;
- 9 – ПГМБ $10^{-4}\%$ + глутаровий альдегід $10^{-2}\%$ (співвідношення 100:1);
- 10 – ПГМБ $10^{-5}\%$ + аноліт + олія сосни (співвідношення 100:100:1);
- 11 – ПГМБ $10^{-5}\%$ + олія сосни (співвідношення 200:1);
- 12 – ПГМБ $10^{-5}\%$ + аноліт + наночастинки ZnO + олія сосни (співвідношення 200:10:200:1);
- 13 – ПГМБ $10^{-5}\%$ + наночастинки ZnO (співвідношення 20:1);
- 14 – ПГМБ $10^{-4}\%$ + глутаровий альдегід $10^{-2}\%$ + олія сосни (співвідношення 200:2:1).

Методика перевірки дії ПГМБ на культурах клітин. Первинні культури клітин з нирок, печінки, легенів, м'язів та нервової тканини ембріонів свині домашньої (*Sus domesticus*) отримували за загальноприйнятими методиками [17–20]. Принципів біологічної етики дотримано, зразки органів відбирали на бойнях і м'ясопереробних підприємствах. Засів трипсинізованих клітин з органів ембріонів свиней проводили в концентрації $3-4 \times 10^5$ клітин на 1 cm^3 . Визначення *концентрації* клітин в поживному середовищі проводили з використанням фотокалориметричного методу на КФК-3 [21]. В якості поживного середовища використовували: модифіковане середовище Дульбекко, мінімальне середовище Ігла (Dulbecco's modified Eagle's Medium, ДМЕМ, D 5468, Sigma, США), середовище 199 (M 5017, Sigma, США) та збагачене мінімальне середовище Ігла (MEM, M3024, Sigma, США), а також суміш середовищ 199 та Ігла в рівних співвідношеннях з 10%-им вмістом сироватки крові великої рогатої худоби. Змішування ПГМБ з поживним середовищем, наприклад Ігла, не впливає на його якості оскільки до складу середовища не входять інгредієнти, що потенційно могли б вступати в реакцію з ПГМБ, наприклад кислоти глютамінова або аспарагінова, АТФ, іони важких металів. Субкультури отримували шляхом пересіву клітин через 3-8 днів з формуванням моношару клітин. Для спостереження використовували бінокулярний мікроскоп XS-5520 LED (MICROmed, Україна). Моношар

знімали розчином Версену з трипсином у співвідношенні 3:1. Життєздатність клітин визначали за допомогою фарбування 0,2% розчином трипанового синього (Bio-Rad, USA, кат. № 1450021). Відповідну концентрацію клітин від $0,5 \times 10^5$ до 12×10^5 в 1 см^3 додавали в об'ємі 2 см^3 в кожну пробірку для формування моношару. Після чого додавали відповідний зразок, що випробовували, в об'ємі $0,2 \text{ см}^3$, тобто розведення експериментального зразка становило 1:10.

Для проведення дослідів з культурами клітин, ПГМБ komponували з оліями лікарських рослин (ОЛР), анолітом і наночастинками ZnO, при цьому кінцеві концентрації ПГМБ становили близько $10^{-5}\%$, окремих випадках $10^{-4}\%$, тобто такі, що зазвичай не проявляють навіть мінімальних бактеріостатичних властивостей і в тисячі разів нижчі за концентрації, які використовують для дезінфекції [2]. Препарати додавали до суспензії клітин різних вихідних концентрацій перед початком формування ними моношару. Вимірювання довжини моношару, що формується в дослідних зразках проводили після того, як завершилося формування моношару клітин в контрольних пробах. Час спостереження становив до 96 год. Кожен дослід проводили щонайменше в 4-х повторях.

Результати досліджень та їх обговорення. Експерименти з клітинами нирки показали, що ПГМБ в концентрації $10^{-5}\%$ (зразок № 3) стимулює формування моношару, +27% (табл. 1). Навіть композиції ПГМБ з анолітом (№ 4, 10, 12) позитивно впливають на проліферацію клітин та забезпечують збільшення довжини моношару в середньому на +21%, +24%, +20%, відповідно. Ефективність показали також суміші ПГМБ з олією сосни (№ 11) – +20% і наночастинками ZnO (№ 13) – +25%. Інгібують розвиток моношару зразки з глутаровим альдегідом (№ 8, 9, 14), що зайвий раз підтверджує його біоцидні властивості і може бути обґрунтуванням доцільності виготовлення дезінфектантів, що містять як ПГМБ, так і глутаровий альдегід. В зразку № 14 навіть додавання олії сосни не пом'якшило токсичної дії композиції ПГМБ з глутаровим альдегідом, спостерігається повне інгібування формування моношару.

Зразки ПГМБ з оліями монарди, евкалипту, апельсину (№ 5, 6, 7) суттєво не вплинули на ріст моношару. ПГМБ в концентрації $10^{-4}\%$ (№ 2) і аноліт (№ 1) показали помірний інгібуючий вплив на швидкість формування моношару клітин нирки свині, -31% і -34%.

Таблиця 1

Вплив композицій ПГМБ з біологічно активними речовинами на формування моношару (активація або пригнічення) клітин нирки ембріону свині, n = 4

Вихідна концентрація клітин в 1 см ³	№ дослідного зразка														Контроль культури
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
	Довжина моношару клітин в пробірці (<i>in vitro</i>), см*, 1 серія дослідів														
12 × 10 ⁵	7	8	11	10	9	10	9	0	0	11	10	11	10	0	10
6 × 10 ⁵	5	6	10	10	7	8	8	0	0	10	9	10	10	0	8
3 × 10 ⁵	4	3	8	7	6	6	5	0	0	8	7	6	7	0	5
1 × 10 ⁵	2	3	6	4	4	3	3	0	0	4	4	5	4	0	3
0,5 × 10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 серія дослідів															
12 × 10 ⁵	8	7	11	10	9	8	9	0	0	11	11	10	10	0	9
6 × 10 ⁵	5	6	10	10	8	8	7	0	0	10	11	9	10	0	8
3 × 10 ⁵	4	4	8	7	5	6	5	0	0	7	8	7	8	0	5
1 × 10 ⁵	1	2	4	4	1	2	3	0	0	4	5	4	5	0	2
0,5 × 10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 серія дослідів															
12 × 10 ⁵	6	8	11	11	9	9	10	0	0	11	11	11	10	0	9
6 × 10 ⁵	4	5	9	10	8	8	8	0	0	10	9	10	10	0	9
3 × 10 ⁵	4	5	9	9	8	7	8	0	0	9	8	8	9	0	7
1 × 10 ⁵	1	3	5	6	3	5	3	0	0	5	5	6	5	0	4
0,5 × 10 ⁵	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 серія дослідів															
12 × 10 ⁵	6	6	11	10	9	10	10	0	0	11	11	10	11	0	10
6 × 10 ⁵	6	5	10	10	8	9	9	0	0	10	9	9	10	0	9
3 × 10 ⁵	4	3	9	8	8	7	6	0	0	8	7	9	9	0	6
1 × 10 ⁵	2	1	5	5	3	3	4	0	0	5	5	5	6	0	3
0,5 × 10 ⁵	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
Ефект**	-	-	+	+	0	0	0	-	-	+	+	+	+	-	
Усереднене значення % підсилення (або пригнічення) щодо контролю	-34	-31	+27	+21				-100	-100	+24	+20	+20	+25	-100	

Примітки: * похибка вимірювань розмірів моношару ±0,5 см, наведені в таблиці дані заокруглено до цілих значень; ** «-» негативний вплив на формування моношару клітин, «+» позитивний, «0» нейтральний.

Досліди на клітинах м'язової тканини підтвердили стимулюючу дію самого ПГМБ в концентрації 10⁻⁵% (зразок № 3), найкращий стимулюючий вплив, +40% на формування моношару показав зразок № 13, це ПГМБ з наночастинками ZnO (табл. 2). Також позитивно вплинули на проліферацію клітин композиції ПГМБ з анолітом (№ 4), анолітом і олією сосни (№ 10), олією сосни (№ 11), анолітом, олією сосни і наночастинками ZnO (№ 12).

Таблиця 2

Вплив композицій ПГМБ з біологічно активними речовинами на формування моношару (активація або пригнічення) клітин м'язової тканини ембріону свині, n = 4

Вихідна концентрація клітин в 1 см ³	№ дослідного зразка														Контроль культури
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
	Довжина моношару клітин в пробірці (<i>in vitro</i>), см*														
	1 серія дослідів														
12 × 10 ⁵	7	9	11	11	9	10	9	0	0	12	11	12	11	0	10
6 × 10 ⁵	6	7	10	11	7	8	8	0	0	11	10	11	11	0	8
3 × 10 ⁵	4	6	7	8	6	6	5	0	0	9	8	7	8	0	5
1 × 10 ⁵	2	3	5	5	4	3	3	0	0	5	5	6	5	0	3
0,5 × 10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2 серія дослідів														
12 × 10 ⁵	8	9	10	11	9	8	9	0	0	12	12	11	11	0	9
6 × 10 ⁵	7	7	10	10	8	8	7	0	0	10	11	9	10	0	8
3 × 10 ⁵	5	6	7	8	5	6	5	0	0	8	9	8	9	0	5
1 × 10 ⁵	2	2	4	5	1	2	3	0	0	4	6	5	6	0	2
0,5 × 10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3 серія дослідів														
12 × 10 ⁵	6	9	11	12	9	9	10	0	0	12	12	12	11	0	9
6 × 10 ⁵	4	8	9	11	8	8	8	0	0	11	10	11	11	0	9
3 × 10 ⁵	4	8	9	10	8	7	8	0	0	10	9	9	10	0	7
1 × 10 ⁵	1	4	5	7	3	5	3	0	0	5	5	6	5	0	4
0,5 × 10 ⁵	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 серія дослідів														
12 × 10 ⁵	6	10	12	11	9	10	10	0	0	12	12	11	12	0	10
6 × 10 ⁵	5	9	10	11	8	9	9	0	0	11	10	10	11	0	9
3 × 10 ⁵	3	5	9	9	8	7	6	0	0	9	8	10	10	0	6
1 × 10 ⁵	1	4	5	6	3	3	4	0	0	6	6	6	7	0	3
0,5 × 10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	2	0	1
Ефект**	—	0	+	+	0	0	0	—	—	+	+	+	+	—	
Усереднене значення % підсилення (або пригнічення) щодо контролю	-34		+28	+37				-100	-100	+38	+36	+35	+40	-100	

Примітки: * похибка вимірювань розмірів моношару ±0,5 см, наведені в таблиці дані заокруглено до цілих значень; ** «—» негативний вплив на формування моношару клітин, «+» позитивний, «0» нейтральний.

Експерименти з клітинами тканин печінки, легенів і нервової тканини ембріону свині свідчать, що найбільш вразливими до «високої» концентрації ПГМБ (10⁻⁴%) є клітини печінки і легенів (табл. 3). Хороший стимулюючий ефект проявив як сам ПГМБ в концентрації 10⁻⁵% (№3), так і його композиції з олією сосни (№ 10, 11, 12). Для клітин нервової тканини найбільш сприятливою для росту виявилася комбінація ПГМБ з олією апельсину (№ 7), аналогічно позитивно вплинула ця композиція і на клітини печінки.

Таблиця 3

Вплив композицій ПГМБ з біологічно активними речовинами на формування моношару (активація або пригнічення) клітин тканин печінки, легенів і нервової тканини ембріону свині, n=3

Вихідна концентрація клітин в 1 см ³	№ дослідного зразка														Контроль культури
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
	Довжина моношару клітин печінки в пробірці (<i>in vitro</i>), см* усереднене значення за 4 серіями дослідів														
12 × 10 ⁵	10	2	11	10	10	10	11	0	0	11	11	12	11	0	9
6 × 10 ⁵	7	1	10	10	9	8	10	0	0	10	11	11	10	0	8
3 × 10 ⁵	4	0	8	7	7	7	8	0	0	7	8	7	8	0	5
1 × 10 ⁵	2	0	4	4	4	4	5	0	0	4	5	4	5	0	2
0.5 × 10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
Ефект**	0	–	+	0	+	+	+	–	–	+	+	+	+	–	
Усереднене значення % підсилення (або пригнічення)		-87,5	+33		+25	+21	+42	-100	-100	+25	+21	+50	+50	-100	
Довжина моношару клітин легенів в пробірці (<i>in vitro</i>), см* усереднене значення за 4 серіями дослідів															
12 × 10 ⁵	8	0	11	8	6	9	8	0	0	7	11	10	7	0	7
6 × 10 ⁵	7	0	10	6	6	9	6	0	0	6	10	8	5	0	6
3 × 10 ⁵	7	0	8	4	6	7	4	0	0	5	8	7	5	0	5
1 × 10 ⁵	6	0	6	4	5	6	2	0	0	3	6	6	5	0	5
0.5 × 10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
Ефект**	+	–	+	0	0	+	0	–	–	0	+	+	0	–	
Усереднене значення % підсилення (або пригнічення)	+22	-100	+52			+35		-100	-100		+61	+39		-100	
Довжина моношару клітин нервової тканини в пробірці (<i>in vitro</i>), см* усереднене значення за 4 серіями дослідів															
12 × 10 ⁵	6	6	10	6	7	7	11	0	0	9	10	8	7	0	7
6 × 10 ⁵	5	4	8	5	6	6	10	0	0	8	9	6	6	0	7
3 × 10 ⁵	3	4	7	5	6	6	8	0	0	8	7	6	6	0	6
1 × 10 ⁵	1	1	5	1	3	3	6	0	0	4	5	3	4	0	3
0.5 × 10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ефект**	–	–	+	–	0	0	+	–	–	+	+	0	0	–	
Усереднене значення % підсилення (або пригнічення)	-35	-35	+30	-26			+52	-100	-100	+26	+35			-100	

Примітки: * похибка вимірювань розмірів моношару ±0,5 см, наведені в таблиці дані заокруглено до цілих значень; ** «–» негативний вплив на формування моношару клітин, «+» позитивний, «0» нейтральний.

ПГМБ в композиції з анолітом в частині дослідів показав ростостимулюючу активність, але дані про антиоксидантні властивості полімерних похідних гуанідину [9] в цілому ставлять під сумнів доцільність комбінування ПГМБ з анолітом в складі одного дезінфектанту. Ймовірно, термін придатності такого деззасобу буде обмеженим через швидку втрату

анолітом своїх бактерицидних властивостей. Проте, це припущення потребує подальшої перевірки.

Спостереження за розвитком моношару різних видів клітин підтвердило припущення, що додавання до полімерних похідних гуанідину олій рослин в цілому знижує токсичність і пришвидшує проліферацію клітин, а отже може підсилювати ранозагоюючі властивості ПГМБ [9, 10]. Це перегукується з дослідженнями по пікногенолу (екстракт кори французької морської сосни) [22] і може бути враховано при розробці нових лікарських засобів для антисептики і прискорення загоєння ран, наприклад антисептичних пов'язок і пластирів. Крім того, є дані, що ПГМГ (і ПГМБ) при зовнішньому використанні в якості антисептика менш токсичний порівняно з низкою традиційних деззасобів [4]. Оскільки суспензійні культури зазвичай чутливіші і вразливіші до дії токсикантів [6], то при розробці ветеринарних препаратів для лікування ран і для забезпечення мінімального антисептичного ефекту ПГМБ доцільно використовувати в концентрації 0,005–0,5%.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Встановлена здатність ПГМБ стимулювати проліферативну активність клітин свідчить, що в невисоких концентраціях його можна використовувати у ветеринарній медицині для створення лікарських засобів (мазей, гелів, пов'язок або пластирів) для лікування ран різного походження. Комбінування ПГМБ з оліями лікарських рослин підсилює проліферативну активність, тож включення таких композицій до складу ранозагоюючих ветеринарних препаратів буде забезпечувати їх високий лікувальний ефект.

В подальшому потрібно визначити чи є кореляція між здатністю окремих композицій ПГМБ з іншими біологічно активними сполуками позитивно впливати на проліферацію клітин еукаріот і бактерицидними властивостями тих самих композицій. Також доцільно дослідити вплив ПГМБ на запальні процеси [23]. Є сенс продовжити дослідження на культурах клітин інших тканин і органів, зокрема на епітеліальній тканини. Порівняльні дослідження покажуть як ПГМБ впливає на різні тканини і органи, що може розширити спектр можливостей його застосування.

USE OF *SUS DOMESTICUS* CELL CULTURES FOR TESTING THE PROPERTIES OF COMPOSITIONS WITH POLYHEXAMETHYLENE BIGUANIDINE / Kryvoshyya P.Yu., Mandyhra Yu.M., Katyukha S.M., Lysytsya A.V.

Introduction. The polymeric guanidine derivatives have long proven to be efficient disinfectants and antiseptics. Most common these are polyhexamethylene guanidine and its analogy polyhexamethylene biguanidine (PHMB). The influence of PHMB itself and its combination with

other biologically active substances on the proliferation of cells and their formation of a monolayer is insufficiently studied.

The goal of the work was to study the proliferation of different types of cells from the pig body and their formation of a monolayer under the influence of PHMB hydrochloride in concentrations of 10^{-5} - 10^{-4} % and its compositions with other biologically active substances.

Materials and methods. Primary cell cultures of fetal kidney, liver, lung, muscle and nerve tissue cells of piglets were used to determine the influence of PHMB alone and in combination with the following biologically active substances: essential oils of *Pinus sylvestris*, *Eucalyptus globulus*, *Citrus sinensis*, *Monarda didyma*, ZnO nanoparticles (size c. 25 nm), and electrochemically activated water anolyte ($E_h = -800$ mV, pH 6.0–7.0). The concentration of the cells in the nutrient medium was determined via photocolourimetry.

Results of research and discussion. The effect of PHMB on different types of cells of the same organism was investigated for the first time. Combinations of PHMB with medicinal plant oils give a good stimulating effect. Liver and lung cells are more vulnerable to the action of PHMB, and muscle cells are less sensitive. The composition of PHMB 10^{-5} % + orange oil stimulated the proliferative activity (growth by 52%) of nerve tissue cells the best. Treatment with a 10^{-5} % solution of PHMB or its combinations with medicinal plant oils and ZnO nanoparticles enhanced the proliferative activity of kidney cells by a quarter. The best growth-stimulating effect of PHMB in a concentration of 10^{-5} % was shown on lung cells (+52%), and when using a combination of PHMB with pine oil, the proliferative activity of these cells increased by 61%.

Conclusions and prospects for further research. We found that at non-toxic concentrations (from 10^{-5} % and below) PHMB can stimulate the proliferative activity of cells and accelerate the formation of a monolayer of cells. Further research will be aimed at studying compositions of PHMB with other biologically active substances both as an antiseptic and to accelerate wound healing, in particular as part of ointments, gels, bandages or plasters.

Keywords: polyhexamethylene biguanidine, oils of medicinal plants, cell culture, toxicity, growth stimulation.

REFERENCES

1. Chakraborty, B., Pal, N.K., Maiti, P.K., et al. (2014). Action of Newer Disinfectants on Multidrug Resistant Bacteria. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 3(11), 2797-2813. doi: 10.14260/jemds/2014/2211.
2. Lysytsya, A.V., Mandygra, Yu.M., Bojko, O.P., Romanishyna, O.O., & Mandygra, M.S. (2015). Dyferentsiyna chutlyvist mikroorhanizmiv do poliheksametylenhuanidynu [Differential sensitivity of microorganisms to polyhexamethyleneguanidine]. *Microbiologichny Zhurnal – Journal of microbiology*, 77(5), 11-19. http://www.imv.kiev.ua/images/doc/MBJ/2015/UMJ_05_2015.pdf [in Ukrainian].
3. Mashat, B.H. (2016). Polyhexamethylene biguanide hydrochloride: features and applications. *British Journal of Environmental Sciences*, 4(1), 49-55. <http://www.eajournals.org/wp-content/uploads/Polyhexamethylene-Biguanide-Hydrochloride-Features-and-Applications1.pdf>.
4. Oule, M.K., Lesage, C., Gauvin, J., et al. (2017). *In vitro* assessment of the toxic effects of an AKWATON based disinfectant on human tissues. *Journal of Antimicrobial Agents*, 3(2), 140-146. <https://doi.org/10.4172/2472-1212.1000140>.
5. Vitt, A., Sofrata, A., Slizen, V., et al. (2015). Antimicrobial activity of polyhexamethylene guanidine phosphate in comparison to chlorhexidine using the quantitative

suspension method. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(36). <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0097-x>.

6. Moshynets, O.V., Baranovskyi, T.P., Iungin, O.S., Kysil, N.P., et al. (2022). eDNA Inactivation and Biofilm Inhibition by the Polymeric Biocide Polyhexamethylene Guanidine Hydrochloride (PHMG-Cl). *Int. J. Mol. Sci.*, 23(731). <https://doi.org/10.3390/ijms23020731>.

7. Oule, M.K., Staines, K., Lightly, T., et al. (2015). Fungicidal activity of AKWATON and in vitro assessment of its toxic effects on animal cells. *Journal of Medical Microbiology*, 64(1), 59-66. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.079467-0>.

8. Lysytsya, A. (2017). Research on the impact of polyhexamethyleneguanidine on the plant component of biocenoses. *Biosystems Diversity*. 25(2), 89-95. <https://doi.org/10.15421/011713>.

9. Kamenieva, T.M., Tarasyuk, O.P., Derevianko, K.Yu., Aksenovska, O.A., Shybyryn, O.V., Metelytsia, L.O., & Rogalsky, S.P. (2020). Antioxidant activity of polymeric biocide polyhexamethylene guanidine hydrochloride. *Kataliz ta naftohimia – Catalysis and petrochemicals*, 30, 73-82. <https://doi.org/10.15407/kataliz2020.30.073>.

10. Dias, F.G.G., Pereira, L.F., Parreira, R.L.T., Veneziani, R.C.S., et al. (2021). Evaluation of the antiseptic and wound healing potential of polyhexamethylene guanidine hydrochloride as well as its toxic effects. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 160, 105739. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105739>.

11. Paliienko, K.O., Veklich, T.O., Shatursky, O.Ya., Shkrabak, O.A., Pastukhov, A.O. et al. (2019). Membrane action of polyhexamethylene guanidine hydrochloride revealed on smooth muscle cells, nerve tissue and rat blood platelets: A biocide driven pore-formation in phospholipid bilayers. *Toxicology in Vitro*, 60, 389-399. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.06.008>.

12. Lysytsya, A., Mandyhra, Yu., Kryvoshyya, P., & Nechyporuk, B. (2022). Possible mechanisms of the biological activity of polyhexamethylene guanidine on cell membranes. *Sciences of Europe* (Praha, Czech Republic), 1(90), 11-22. <https://www.europe-science.com/wp-content/uploads/2022/04/Sciences-of-Europe-No-90-2022-Vol.-1.pdf>.

13. Kryvoshyya, P., Rud, O., & Lysytsya, A. (2021). Vyznachennya tsytotoksychnosti antimikrobnnykh preparativ ta dezinfektantiv na kulturi klityn nyrky telyaty [Determination of cytotoxicity of germicides and disinfectants on the culture of kidney cells of a calf]. *Visnyk ahrarnoyi nauky – Bulletin of Agricultural Science*, 99(1), 40-46. <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202101-05>. [in Ukrainian].

14. Mandygra, M.S., & Lysytsya, A.V. (2014). Some aspects of the polyhexamethyleneguanidine salts effect on cell cultures. *Agricultural science and practice*, 1(1), 62-67. <https://doi.org/10.15407/agrisp1.01.062>.

15. Danilevskaya, N.B., Lysytsya, A.V., Moroz, M.V., Nechyporuk, B.D., Novoseletskyi, N.Yu., & Rudyk, B.P. (2018). Growth of Zinc Compound Nanocrystals from Different Electrolytes. *Technical Physics*, 63(3), 411-415. <https://doi.org/10.1134/S1063784218030076>.

16. Mandyhra, M.S., Lysytsya, A.V., Hnatyuk D.M., et al. (2020). *Vykorystannya elektrokhimichno aktyvovanykh (EKHA) rozchyniv u veterynarniy medytsyni i orhanichnomu vyrobnytstvi: (naukovo-praktychni rekomendatsiyi) [The use of electrochemically activated (ECA) solutions in veterinary medicine and organic production: (scientific and practical recommendations)]*. Kyiv: «PP Ivanyuk VP». [in Ukrainian].

17. Golubev, D.B., Sominina, A.A., & Medvedeva, M.N. (1976). *Rukovodstvo po primeneniyu kletochnykh kultur v virusologii [Guidelines for the use of cell cultures in virology]*. Saint Petersburg: Medicine. [in Russian].

18. Adams, R. (1983). *Metody kultury kletok dlya biokhimikov [Cell culture methods for biochemists]*. M.: Mir. [in Russian].
19. Freshni, R. (1989). *Kultura zhivotnykh kletok. Metody [Culture of animal cells. Methods]*. M.: Mir. [in Russian].
20. Sergeev, V.A., & Sobko, Y.A. (1990). *Kultury kletok v veterinarii i biotekhnologii [Cell cultures in veterinary medicine and biotechnology]*. K.: Urozhay. [in Russian].
21. Margis, R., & Borojevic, R. (1989). Quantification of attached cells in tissue culture plates and on microcarriers. *Anal Biochem.*, 181(2), 209-211. doi:10.1016/0003-2697(89)90230-3.
22. Park, C.M., Kim, H.Y., Jeon, D., et al. (2022). Anti-fibrotic effect of pycnogenol® in a polyhexamethylene guanidine-treated mouse model. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 296, 103802. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2021.103802>.
23. Kim, H.R., Shin, D.Y., & Chung, K.H. (2017). In vitro inflammatory effects of polyhexamethylene biguanide through NF-κB activation in A549 cells. *Toxicology in Vitro*, 38, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.10.006>.