

ВІРУСОПРОТЕКТОРНА ДІЯ ПОЛІГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНІДИНУ НА КЛІТИНИ ЕВКАРІОТ

А.В. ЛИСИЦЯ, кандидат біологічних наук

П.Ю. КРИВОШИЯ, кандидат ветеринарних наук

Л.Б. КОТ, науковий співробітник

Інститут сільського господарства Західного Полісся НААН України, м. Рівне,

Розглянуто вірусопротекторну дію солей полігексаметиленгуанідину (ПГМГ) на перещеплювану культуру клітин трахеї (ПККТ) теляти. Вперше виявлено на фібробластах курячого ембріона і підтверджено на ПККТ вірусозахисні властивості ПГМГ. Встановлено, що короточасна експозиція клітин еукаріот з препаратами ПГМГ захищає сформований моношар від ураження вірусами. Випробувано віруси, які містять в своїй оболонці ліпіди, зокрема: герпесвіруси ринопневмонії коней та ринотрахеїту великої рогатої худоби, а також ретровірус інфекційної анемії коней. Визначено, що ПГМГ хлорид у концентраціях 10^{-3} - 10^{-2} % за 15-хв, а ПГМГ сукцинат в концентрації 10^{-2} % за 30-хвилинної експозиції забезпечують надійний захист клітин моношару від вірусів. З'ясовано, що для захисту клітин від вірусів, концентрації ПГМГ при обробці трансформованої ПККТ мають бути щонайменше на порядок вищими, ніж у випадку прояву аналогічного ефекту на первинній культурі фібробластів. Визначено, що вірусопротекторна дія солей ПГМГ залежить від їх аніонного складу (хлорид, сукцинат або ін.), тривалості експозиції, концентрації клітин і титру вірусу.

Ключові слова: *полігексаметиленгуанідин, культура клітин трахеї теляти, герпесвіруси ринопневмонії коней та ринотрахеїту великої рогатої худоби, ретровірус інфекційної анемії коней.*

Серед чисельних хвороб коней та великої рогатої худоби інфекції вірусної етіології (ринопневмонія, ринотрахеїт, інфекційна анемія та ін.)

займають одне з провідних місць. Пошук нових засобів терапії та профілактики не припиняється. У наших дослідженнях оцінювалися потенційні фармакологічні можливості такої групи полімерних сполук як поліалкіленгуанідини.

Зазвичай полімерні похідні гуанідину, в тому числі й солі полігексаметиленгуанідину (ПГМГ), використовуються в складі дезінфектантів та антисептиків [1,2]. Хоча механізми біоцидної дії препарату остаточно не з'ясовані, та вважається, що він діє переважно на мембрани клітин [3,4,5]. Вивчення взаємодії ПГМГ з нативними та штучними фосфоліпідними мембранами, як моделями цитоплазматичної мембрани (ЦПМ), показало, що за певних (не біоцидних) концентрацій препарат може адсорбуватися на їх поверхні. При цьому суттєвого пошкодження ліпідного бішару чи суттєвої зміни його іонної проникності не відбувається, проте властивості його поверхні змінюються [6]. Адсорбований полікатіон ПГМГ електростатично зв'язується з фосфоліпідними голівками ліпідів, фосфатні групи яких мають частково негативний заряд. Краще полікатіон зв'язується з кислими або аніонними ліпідами (кардіоліпін, фосфотидилгліцерол, фосфотидилхолін та ін.) [3].

У дослідах з перещеплюваною трансформованою культурою клітин трахеї (ПККТ) теляти та первинною культурою фібробластів курячого ембріона нами попередньо були визначені цитотоксичні дози ПГМГ хлориду (ПГМГхл). Зокрема встановлено, що в концентрації 2×10^{-4} % і вище він діє біоцидно на вже сформований моношар клітин, концентрації 10^{-5} % і нижче практично не впливають на тривалість його життя. У цих експериментах ПГМГхл, внесений у зразки на початку досліду, перебував у середовищі культивування протягом всього часу експерименту (до 7 діб). Проте моношар фібробластів залишається без змін, якщо порівняно високі концентрації препарату додавати до ростового середовища на короткий час (10-15 хв). Якщо після цього ростове поживне середовище, що містить ПГМГхл, видалити, промити моношар розчином Хенкса і додати чисте ростове середовище, то клітини залишаються неушкодженими. Лише при підвищенні концентрації ПГМГхл до 10^{-3} % така

сама короткочасна експозиція може призводити до загибелі фібробластів курячого ембріона і руйнування моношару вже протягом першої доби [7]. ПККТ є стійкішою, 15-хвилинна експозиція з ПГМГхл у концентраціях 10^{-3} - 10^{-2} % не призводила до пошкодження моношару протягом 7 діб спостереження.

Якщо препарат додати на початку формування моношару фібробластів, то в концентраціях 10^{-6} - 10^{-5} %, він повністю зупиняє проліферативну активність клітин. Концентрації ПГМГ від $0,3 \times 10^{-7}$ % до $0,3 \times 10^{-9}$ % частково інгібують проліферативну активність фібробластів і гальмують утворення моношару клітин [7]. У цих експериментах ПГМГхл, внесений у зразки на початку досліду, перебував у середовищі культивування також протягом всього часу спостереження (до 6 діб).

Оскільки ПГМГ є мембраноактивною сполукою, то взятий в низьких нетоксичних концентраціях полікатіон після адсорбції на цитоплазматичну мембрану (ЦПМ) клітини змінює її «ліпідний малюнок», проникність мембрани, латеральну рухливість ліпідів, принаймні, в зовнішньому ліпідному шарі. Логічно припустити, що за певних умов препарат може зробити клітину менш вразливою до дії вірусів, у першу чергу тих, які мають в своїй оболонці ліпіди. Тому на фіброблестах нами були проведені попередні випробування вірусопротекторної дії ПГМГ. З'ясувалося, що короткочасна 10-15-хвилинна обробка моношару фібробластів препаратом у концентраціях 1×10^{-5} - 1×10^{-4} % надійно захистила клітини від інфікування вірусом ринопневмонії коней. Оскільки препарат діяв і після промивання моношару фізрозчином, то можна припустити, що молекули ПГМГ міцно зв'язалися з плазматичними мембранами клітин і забезпечили вірусопротекторний ефект. При цьому вірус, що перебував у культуральному середовищі, залишився неушкодженим, тобто десорбції полімера з ЦПМ не відбувалося. Після додавання цього вірусомісного розчину до необробленого препаратом моношару клітин, останній швидко вражався і гинув протягом першої доби інкубування (як і в контролі) [8].

Для герпес-вірусів ринопневмонії коней та ринотрахеїту великої рогатої худоби фібробласти курячого ембріона є не зовсім адекватним об'єктом. Так, збудник ринотрахеїту має чітко виражений тропізм до епітеліальних клітин слизових оболонок верхніх дихальних шляхів і статевих органів. Тому доцільніше, на нашу думку, було б використати як об'єкт випробувань не фібробласти, а саме ПККТ.

Метою нашого дослідження було перевірити здатність препаратів ПГМГ при короткотривалій експозиції захищати клітини еукаріот, зокрема трахеї теляти, від ураження вірусами.

Матеріал і методика досліджень. Об'єкти досліджень: перещеплювана трансформована культура клітин трахеї (ПККТ) великої рогатої худоби; нативні культури герпесвірусів (родина *Herpesviridae*) ринопневмонії коней (штам СВ-69) (*Equine herpesvirus type 1*) і ринотрахеїту великої рогатої худоби (*Rhinotracheitis infectiosa bovine*), а також вірусу інфекційної анемії (ІНАН) коней (*Equine infectious anemia virus*, родина ретровірусів *Retroviridae*, підродина *Lentivirinae*). Культури вірусів і клітин трахеї отримували за загально визнаною методикою [9] в нашій модифікації [10]. Для формування моношару використовували суспензію, що містила 340 тис. кл/см³. Ростове поживне середовище для клітин складалося з суміші середовищ 199 (45 %) і Ігла (45 %) та сироватки крові великої рогатої худоби (10 %). У досліджах використовували розведення вірусів ІНАН, ринотрахеїту і ринопневмонії в робочій дозі 100 ТЦД₅₀/см³.

Досліджували дію на ПККТ водних розчинів солей ПГМГ, зокрема хлориду (ПГМГхл) і сукцинату двозаміщеного (ПГМГсд) («Терміт», м. Рівне, Україна), які до потрібних концентрацій розчиняли в стерильному сольовому збалансованому середовищі Хенкса (рН 7,2-7,4) у співвідношенні 1:10, в контролі – фізрозчин і розчин Хенкса (1:10). ПГМГхл і ПГМГсд використовували в робочих концентраціях від 10⁻⁶ % до 10⁻² %, або від 10 мкг/л до 100 мг/л (10⁻¹¹-10⁻⁷ М). Концентрацію водневих іонів (рН) у системі ПГМГ-

середовище Хенкса контролювали з використанням іоніра І-130 («ЗИП», м. Гомель, Республіка Білорусь), рН встановлювали в межах 7,2-7,4.

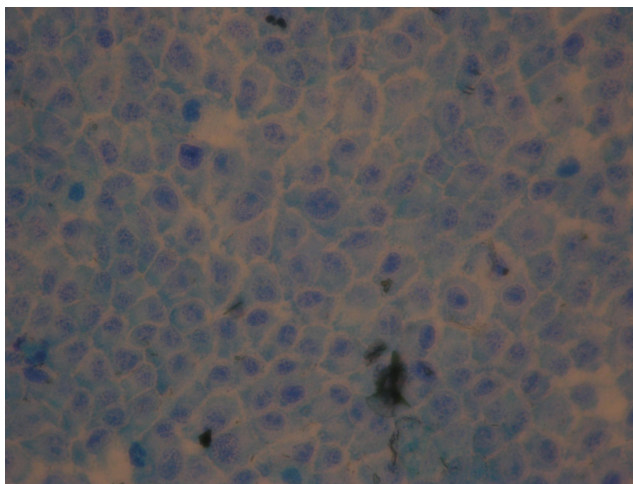
Для визначення вірусопротекторної дії препарату робочі розчини ПГМГ, взяті у зазначених вище концентраціях, у дозі 0,2 мл на лунку додавали до вже сформованого моношару клітин. Ростове середовище з моношару перед цим обережно видаляли. Після 15- або 30-хвилинної експозиції розчини, що містили ПГМГ, також видаляли. Моношар ПККТ промивали чистим розчином Хенкса і додавали вірусний матеріал у поживному середовищі. В контролі до клітин на 15 або 30 хв. додавали розчин Хенкса. Оброблені препаратами ПГМГ культури клітин у мікропланшетах вміщували в термостат ($t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Час інкубування і спостереження становив 6-7 діб. Для визначення цитопатичної дії вірусів стан моношару клітин оцінювали візуально з використанням мікроскопа лабораторного біокулярного (збільшення $\times 70$). Кратність повторень у кожному досліді становила від 3 до 5.

Результати досліджень. Узагальнені результати вірусопротекторної дії різних концентрацій препаратів ПГМГ при короткочасній 15-хвилинній експозиції з моношаром ПККТ наведено в табл. 1.

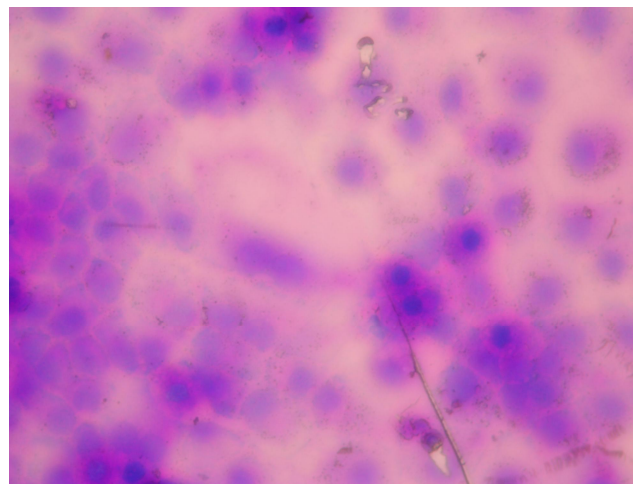
1. Цитопатична дія вірусів після 15-хвилинної обробки моношару ПККТ препаратами ПГМГ

Концентрація препарату, %	ЦПД після додавання вірусу, % пошкодженої частини моношару клітин					
	ІНАН		ринопневмонія		ринотрахеїт	
	через 2 доби	через 6 діб	через 2 доби	через 6 діб	через 2 доби	через 6 діб
ПГМГ _{сд}						
10^{-2}	0	0	10	50	0	40
10^{-3}	10	50	20	70	10	100
10^{-4}	30	100	30	100	20	100
10^{-5}	40	100	40	100	20	100
ПГМГ _{хл}						
10^{-2}	0	0	0	0	0	0
10^{-3}	0	0	0	0	0	0
10^{-4}	20	70	0	10	10	70
10^{-5}	30	100	30	100	20	100
контроль	40	100	40	100	20	100

Встановлено, що ПГМГхл у концентраціях 10^{-3} - 10^{-2} % за 15-хвилинної експозиції повністю захищає клітини трахеї від цитопатичної дії всіх випробуваних вірусів протягом 6 днів інкубації (рис. 1. а). Концентрація препарату 10^{-4} % має частково виражений вірусопротекторний ефект, нижча концентрація (10^{-5} %) практично не впливає на цитопатичну дію вірусів (рис. 1. б). Але, ці ж концентрації ПГМГхл (10^{-5} - 10^{-4} %), як вже зазначалося вище, надійно захищали фібробласти від інфікування вірусом ринопневмонії коней (рис. 2. а) [6]. Тобто, вірусопротекторні концентрації препарату для ПККТ, принаймні, на порядок вищі, ніж для фібробластів. Ймовірно, це пов'язано, як з особливостями будови і загальної чутливості ЦПМ трансформованих клітин трахеї, так і з більшою сприйнятливістю ПККТ до вірусу ринопневмонії порівняно з фібробластами (більша адекватність об'єкта). Крім того, відомо, що швидко проліферуючі клітини, зокрема фібробласти, взагалі є чутливішими (і вразливішими) до дії різних екзогенних чинників (ксенобіотиків, патогенів, іонізуючого випромінювання тощо).

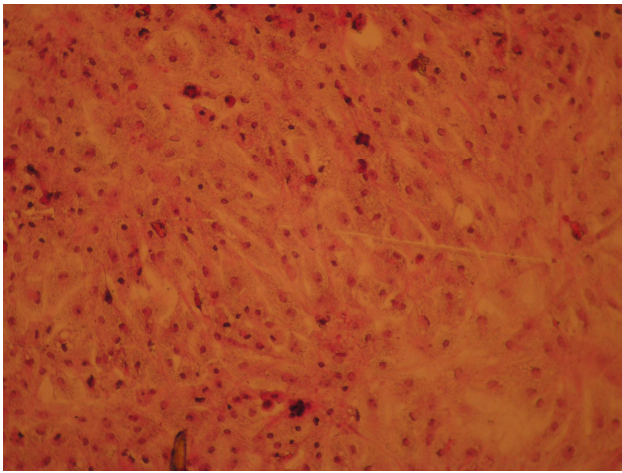


а

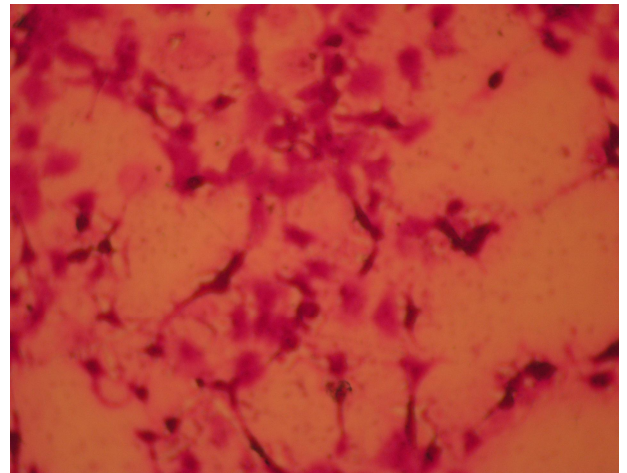


б

Рис. 1. Результат дії вірусу ринотрахеїту великої рогатої худоби на ПККТ: а – моношар клітин трахеї теляти, оброблений ПГМГхл у концентрації 10^{-3} %; б – деструкція моношару не обробленого ПГМГхл (контроль), прояв цитопатичної дії вірусу.



а



б

Рис. 2. Результат дії вірусу ринопневмонії коней на первинну культуру фібробластів курчати: а – моношар фібробластів, оброблений ПГМГ в концентрації 10^{-4} %; б – деструкція моношару необробленого ПГМГ, прояв цитопатичної дії вірусу.

Вірусопротекторна дія ПГМГсд виявилася значно меншою. 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 ПККТ 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 дослідженні не випробовувалися), протягом 6 днів цитопатична дія не проявилася. Концентрація ПГМГсд 10^{-3} % забезпечила вірусопротекторний ефект лише на 50 %. Тобто, час адсорбції препарату на ЦПМ залежить від аніонного складу солей ПГМГ, який в свою чергу впливає на конформацію і сумарний заряд молекули полікатиона. Узагальнюючи результати експерименту, 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 від титру вірусу.

На нашу думку, механізм захисної дії ПГМГ такий: після незворотної адсорбції полікатиона на ЦПМ в ній відбувається певний перерозподіл

(сегрегація) кислих і нейтральних фосфоліпідів, локальні пертурбації ліпідного бішару, специфічні рецепторні ділянки мембрани (гліколіпопротеїни) стають недоступними для вірусу. Тобто, полікатіон ПГМГ, зв'язуючись з мембранними ліпідами, в т.ч. ліпопротеїнами, блокує специфічні для цього типу вірусу рецептори. Оскільки для герпесвірусів (ринопневмонія, ринорхейт) і ретровірусів (ІНАН коней) специфічні рецептори різняться, то ми припускаємо, що вірусопротекторна дія ПГМГ не видоспецифічна. Також, внаслідок порушення іонної провідності мембрани і позитивного заряду самої молекули ПГМГ, змінюється електричний потенціал поверхні клітини. Відбувається певне «екранування» ліпідів і рецепторів ЦПМ полікатіоном, що адсорбувався на її поверхні. Проникнення вірусів, які мають ліпідну оболонку, всередину клітини стає неможливим. Також можна припустити, що адаптаційний стрес, спричинений адсорбцією на поверхні ЦПМ ксенобіотика (ПГМГ), підвищує загальну резистентність клітини.

Аналіз динаміки деструкції моношару також свідчить, що в концентраціях препарату, недостатніх для повного захисту клітин від ураження вірусами, все ж спостерігається тимчасовий вірусопротекторний ефект. Подібний ефект тимчасового або часткового захисту є, як відомо, і при застосуванні специфічних антитіл або інгібіторів вірусу. Тимчасовість захисної дії ПГМГ може бути пов'язана з тим, що відбувається як поступова хімічна деструкція полікатіона, так і відторгнення клітиною фосфоліпідів, які зв'язалися з ПГМГ і втратили свої властивості та функціональне значення.

Всі досліджувані нами віруси містять ліпіди, наприклад вірус ринотрахеїту має в своїй оболонці зовнішній ліпоглікопротеїновий шар, який захищає ДНК-геном. З іншого боку, у взятих нами вірусомісних суспензіях містяться не лише повністю сформовані віріони, можуть траплятися вірусні частинки як з уже сформованою ліпопротеїновою оболонкою, так і без. Хоча у другому випадку слід враховувати, що вірусна нуклеїнова кислота (РНК або ДНК) є поліаніоном і може бути нейтралізована при електростатичному

зв'язуванні з полікатионом ПГМГ. Питання захисту клітин від вірусів, що не містять ліпідів, а мають лише білковий капсид потребує подальшого вивчення.

Висновки

1. На культурах клітин еукаріот (ПККТ і фібробластах), використаних нами як модель, досліджено вірусопротекторні властивості солей ПГМГ.

2. Встановлено, що ПГМГ хлорид в концентраціях 10^{-3} - 10^{-2} % за 15-хвилинної експозиції, а ПГМГ сукцинат в концентрації 10^{-2} % за 30-хвилинної забезпечують надійний захист клітин моношару ПККТ від ураження вірусами.

3. Взятий в нетоксичних концентраціях полікатион ПГМГ, адсорбується на поверхні клітини і певним чином «екранує» специфічні рецептори цитоплазматичної мембрани. Це унеможлиблює проникнення вірусів всередину.

4. Для прояву ефекту захисту клітин від вірусів, концентрації ПГМГ для трансформованої ПККТ мають бути принаймні на порядок вищими, ніж для фібробластів. Швидше за все, захисна дія ПГМГ не є видоспецифічною.

5. Вірусопротекторний ефект солей ПГМГ залежить від їх аніонного складу (хлорид, сукцинат або ін.), тривалості експозиції, кількості (концентрації) клітин і титру вірусу.

Отримані результати можуть бути використані для розробки нових засобів профілактики та лікування вірусних хвороб тварин.

СПИСОК 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. *McDonnell G.* Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance / G. McDonnell, A. Russell // *Clinical microb. Rev.* – 1999. – № 1. – Vol. 12. – P. 147-179.
3. *Gilbert P.* Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet / P. Gilbert, L. Moore // *J Appl Microbiol.* – 2005. – Vol. 99. – P. 703-715.

4. *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.
5. *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.
6. *Лисиця А.В.* Дія полігексаметиленгуанідину на мембрани клітин / V з'їзд укр. біофізичного товариства: тези доповідей. – Луцьк: Волин. нац. ун-т ім. Лесі Українки, 2011. – С. 82.
7. *Лисиця А. В.* Дія дезінфектантів з полігексаметиленгуанідином на культури клітин еукаріот / А. Лисиця, П Кривошия // Вісник Житомирського нац. агрокол. ун-ту. – 2012. - № 1. – т. 3. – ч. 1. – С. 267-271.
8. *Лисиця А.В.* Вплив полігексаметиленгуанідину гідрохлориду на плазматичну мембрану фібробластів курячих ембріонів та на штучну бішарову ліпідну мембрану / Лисиця А.В., Кривошия П.Ю., Шатурський О.Я. // Біотехнологія. – 2010. - Т. 3, № 2. - С. 56-61.
9. 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.
10. *Лисиця А.В.* Перевірка цитопатичної та віруліцидної дії ПГМГ / А. Лисиця, П. Кривошия // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів. – 2009. – Вип. 10. – № 4. – С. 157-164.

Вирусопротекторное действие полигексаметиленгуанидина на клетки эукариот

А.В. Лисица, П.Ю. Кривошея, Л.Б. Кот

Рассмотрено вирусопротекторное действие солей полигексаметиленгуанидина (ПГМГ) на перевиваемую культуру клеток трахеи (ПККТ) теленка. Впервые выявлено на фибробластах куриного эмбриона и подтверждено на ПККТ вирусозащитные свойства ПГМГ. Установлено, что кратковременная экспозиция клеток эукариот с препаратами ПГМГ защищает сформированный монослой от заражения вирусами. Используются вирусы, содержащие в своей оболочке липиды, а именно: герпесвирусы ринопневмонии лошадей и ринотрахеита крупного рогатого скота, ретровирус инфекционной анемии лошадей. Определено, что ПГМГ хлорид в концентрациях 10^{-3} - 10^{-2} % при 15-минутной, а ПГМГ сукцинат в концентрации 10^{-2} % при 30-минутной экспозиции обеспечивают надежную защиту клеток от вирусов. Оказалось, что для защиты клеток от вирусов, концентрации ПГМГ при обработке трансформированной ПККТ должны быть на порядок выше, чем в случае проявления подобного эффекта на первичной культуре фибробластов. Установлено,

что вирусопротекторное действие солей ПГМГ зависит от их анионного состава (хлорид, сукцинат или др.), продолжительности экспозиции, концентрации клеток и титра вируса.

Ключевые слова: полигексаметиленгуанидин, культура клеток трахеи теленка, герпесвирусы ринопневмонии лошадей и ринотрахеита крупного рогатого скота, ретровирус инфекционной анемии лошадей.

Polyhexamethyleneguanidine can protect cells of eukaryotes from viruses

A. Lysytsya, P. Kryvoshya, L. Kot

This article reports on that polyhexamethyleneguanidine (PHMH) can protect cells of eukaryotes from contamination of viruses. We have studied the defensive action of the salts of PHMH on interweaved culture of the trachea cells (ICTC) calf. Virusprotection characteristics of PHMH are for the first time revealed on fibroblasts of the chicken embryo and are confirmed on ICTC. We have installed that short exposure of the cells of eukaryotes with preparation of PHMH protects the formed cells monolayer from contamination of virus. We used the viruses, which contains lipids in its shell, as follows: herpesviruses of horses rhinopneumonia and bovine rhinotracheitis infectiosa, retrovirus equine infectious anemia. PHMH chloride in concentration 10^{-3} - 10^{-2} % under 15-min., but PHMH succinate in concentrations 10^{-2} % under 30-min. exposures provide reliable protection of the cells from viruses. The concentrations of PHMH when processing transformed ICTC must be on tenfold more high, than in the event of manifestation of the similar effect on primary culture of fibroblasts. Virusoprotektion action of the salts PHMH depends on their anion composition (the chloride, succinate or others), length to exposures, concentrations of the cells and subtitle of the virus.

Key words: polyhexamethyleneguanidine, cell culture of tracheas calf, herpesviruses of horses rhinopneumonia and bovine rhinotracheitis infectiosa, retrovirus equine infectious anemia.