

ВПЛИВ НА ПРОЛІФЕРАЦІЮ М'ЯЗОВИХ КЛІТИН ПОЛІМЕРНИХ ПОХІДНИХ ГУАНІДИНУ, НАНОЧАСТИНОК ОКСИДУ ЦИНКУ І ЕФІРНОЇ ОЛІЇ СОСНИ

Кривошия П. Ю., Лисиця А. В., Мандигра Ю. М.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: lysycya@ukr.net

Квартенко О. М.

Національний університет водного господарства та природокористування, Рівне, Україна

Нечипорук Б. Д.

Рівненський державний гуманітарний університет, Рівне, Україна

У статті досліджено вплив окремих компонентів та їхніх композицій на проліферацію м'язових клітин різних видів тварин (свині, кроля, ВРХ та курки) в умовах *in vitro*. Метою роботи було вивчення ростостимулюючого ефекту полімерних похідних гуанідину (полігексаметиленбігуанідину — ПГМБ та полігексаметиленгуанідину — ПГМГ), наночастинок оксиду цинку (НЧ ZnO) та ефірної олії сосни з метою їх потенційного застосування у ветеринарній медицині як лікувально-профілактичних препаратів. Використані в досліді ПГМГ гідрохлорид, НЧ ZnO та ЕО сосни звичайної були застосовані в низьких, нетоксичних концентраціях, що підтверджено попередніми дослідженнями та відповідає принципам біобезпеки. Проліферативну активність клітин оцінювали шляхом визначення довжини моношару. Результати експериментів на первинних культурах м'язових клітин усіх чотирьох видів тварин показали, що ПГМБ та ПГМГ у концентрації 10^{-7} % мають виражений позитивний вплив на проліферацію. Зокрема, зразок, що містив лише ПГМБ, демонстрував найбільш значний стимулюючий ефект. Композиції ПГМГ з НЧ ZnO також показали високі показники стимуляції росту клітин, підтверджуючи їхню безпечність та синергетичний потенціал за можливого використання у складі препаратів для загоєння ран. Важливо, що НЧ ZnO у дослідженій концентрації 10^{-7} % не виявили цитотоксичних властивостей, що спростовує деякі попередні дані та підтверджує їхню роль як підтримуючих компонентів. Однак, додавання ефірної олії сосни до композицій з ПГМГ/ПГМБ та НЧ ZnO дещо послабило ростостимулюючий ефект полімерних похідних гуанідину. Це свідчить про необхідність подальших досліджень для оптимізації багатокомпонентних складів та вивчення впливу інших ефірних олій. Зроблені висновки підкреслюють, що полімерні похідні гуанідину в низьких концентраціях діють не лише як біоциди, а й як стимулятори проліферації клітин еукаріот, що розширює їхній терапевтичний потенціал під час розробки препаратів для пришвидшення загоєння ран та опіків у тварин. Отже, комбінація ПГМГ/ПГМБ з НЧ ZnO є перспективною для розробки нових препаратів для зовнішнього застосування, однак для антисептичного ефекту доцільно використовувати вищі концентрації ПГМГ/ПГМБ.

Ключові слова: культура клітин, біотехнологія, лікувальні препарати

На стадії розробки та випробувань нових лікувально-профілактичних препаратів для ветеринарної медицини в якості одного з видів тест-об'єктів можна використовувати культури клітин тварин [1]. В складі засобів для пришвидшення загоєння ран у тварин, для дезінфекції та антисептики, для лікування інфекцій різної етіології перспективним є використання полімерних похідних гуанідину, наночастинок (НЧ) металів, зокрема оксиду цинку, ефірних олій (ЕО) рослин. При цьому важливо враховувати вплив окремих інгредієнтів та їх композицій на проліферативну активність клітин.

Відомо, що НЧ оксиду цинку мають виражені антимікробні та регенеруючі властивості, можуть підсилювати імунітет при бактеріальних інфекціях, тому є сенс додавати їх в якості одного з інгредієнтів до комплексних препаратів [2]. НЧ ZnO проявляють цитотоксичні,

протигрибкові та антибактеріальні властивості, діють підтримуюче при лікуванні ран та проявляють протизапальні властивості [3, 4].

ЕО рослин, в т. ч. різних видів сосни, відомі широким спектром біологічної активності, включаючи антибактеріальну, протизапальну, протипухлинну, знеболювальну, антиоксидантну та імуномодуючу дію, вони можуть сприяти загоєнню ран шляхом боротьби з інфекцією, зменшенню запалення та захисту тканин від окисного стресу [5, 6].

Полімерні похідні гуанідину вже давно довели свою ефективність у боротьбі з вірусними, бактеріальними і грибовими інфекціями [7], зокрема мова йде про полігексаметиленгуанідин (ПГМГ) та полігексаметиленбігуанідин (ПГМБ).

В попередніх дослідженнях впливу ПГМГ (ПГМБ) на проліферацію клітин ми використовували обмежену кількість первинних культур клітин, зокрема клітини нирки теляти ВРХ і свині [8], а також клітини м'язової тканини ембріонів свині [9]. При цьому порівнювали дію самого ПГМГ або ПГМБ, та їх композицій з ЕО і НЧ оксиду цинку. Також було визначено цитотоксичність ПГМГ і підібрано оптимальні не токсичні концентрації, вони знаходяться в межах від 10^{-5} % і нижче.

Відомо, що ПГМГ має також протизапальні та ранозагоювальні властивості, а тому може застосовуватися для лікування хронічних ран та термічних опіків, це може свідчити і про антиоксидантну активність полімерного біоциду [10, 11]. Крім того, в терапевтичних дозах ПГМГ не викликає гепатотоксичної, нефротоксичної, цитотоксичної та генотоксичної дії [11]. Відсутність цитотоксичності є ключовим моментом для проліферації клітин, оскільки це означає, що ПГМГ в низьких концентраціях не є шкідливим для клітин організму, це, в свою чергу, дозволяє клітинам проліферувати та пришвидшує загоєння рани.

Тому, враховуючи низьку токсичність ПГМГ та перспективність його лікувального застосування для загоєння ран, доцільним було б випробувати його дію на клітинах більшої кількості видів тварин.

Мета роботи. Враховуючи перспективи використання ПГМГ та / або ПГМБ, ЕО рослин і НЧ металів, зокрема оксиду цинку при профілактиці та лікуванні хвороб тварин, дослідити *in vitro* вплив цих сполук на проліферацію клітин м'язової тканини.

Матеріали та методи. У дослідях використано ПГМГ гідрохлорид у вигляді 20 %-го водного розчину (ПП «Терміт», Рівне, Україна), який розчиняли у фізіологічному розчині (0,9 % NaCl, рН 6,5–7,0) і після фільтрування використовували розчини препарату з масовою концентрацією від 10^{-7} % до 10^{-5} %. Наночастинки оксиду цинку (ZnO) розміром 25–100 нм були отримані нами раніше електролітичним способом [12]. Зразок НЧ у вигляді розчину електролітів концентрацією 3 г/дм³ (або 0,3 %) дозволяє стабілізувати агрегатний стан суспензії. Кінцева концентрація НЧ ZnO в зразках становила 10^{-7} %. Також використано фармакопейний препарат ефірної олії (ЕО) сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.), олія отримана з хвої (виробник Frey + Lau GmbH, Німеччина). Термодинамічно стійку водну емульсію ЕО отримували з використанням ультразвукового диспергатора USD-A ("Selmi", м. Суми, Україна). Кінцева концентрація ЕО сосни в зразках становила 5×10^{-8} %.

Первинні культури м'язових клітин свині, кроля, теляти ВРХ і курки отримували за загальноприйнятими методиками [13, 14]. Принципів біологічної етики дотримано [15], зразки відбирали на бойнях та/або м'ясопереробних підприємствах. Засів трипсинізованих клітин свині, кроля, ВРХ та курки проводили в концентрації $3\text{--}4 \times 10^5$ клітин на 1 см³ згідно зазначених вище рекомендацій. Визначення концентрації клітин в поживному середовищі проводили з використанням фотокolorиметричного приладу КФК-3 [16, 17]. При цьому, моношар клітин знімали диспергуючим розчином, зняту суспензію клітин переносили в кювети і визначали оптичну густину клітин за допомогою фотокolorиметричного приладу. Концентрацію клітин визначали відповідно до оптичної густини суспензії клітин по калібрувальному графіку. В якості поживного середовища використовували середовища 199 та Ігла в рівних співвідношеннях з 10 %-им вмістом сироватки крові ВРХ. Субкультури отримували шляхом пересіву клітин через 3–8 діб з формуванням моношару клітин, $t = 37^\circ\text{C}$. Моношар знімали розчином Версену з трипсином у співвідношенні 3:1. Життєздатність клітин визначали за допомогою фарбування 0,2 % розчином трипанового синього. Відповідну концентрацію клітин від $0,5 \times 10^5$ до 12×10^5 в 1 см³ додавали в об'ємі 2 см³ в кожну пробірку для формування моношару. Після чого додавали

відповідний зразок в об'ємі $0,2 \text{ см}^3$, тобто розведення експериментального зразка становило 1:10.

Всі експерименти проводили в чотирьох повтореннях (серіях). Попередні наші дослідження показали, що для стимулювання проліферативної активності клітин ПГМГ краще брати в концентрації $\approx 10^{-7} \%$.

Нумерація зразків в таблицях: 1 — ПГМБ (конц. $10^{-7} \%$), 2 — ПГМГ (конц. $10^{-7} \%$), 3 — ПГМГ (конц. $10^{-7} \%$) + НЧ ZnO (конц. $10^{-7} \%$), 4 — ПГМГ (конц. $1 \times 10^{-7} \%$) + ЕО сосни (конц. $5 \times 10^{-8} \%$), 5 — ПГМГ (конц. $10^{-7} \%$) + НЧ ZnO (конц. $10^{-7} \%$) + ЕО сосни (конц. $5 \times 10^{-8} \%$), 6 — контроль (0,9 % NaCl).

Результати та обговорення. Визначення впливу експериментальних зразків на проліферацію клітини м'язової тканини свині показало чітко виражений стимулюючий ефект зразків № 1 ПГМБ і № 3 ПГМГ + НЧ ZnO, також непоганий результат показали зразки № 2 ПГМГ, № 5 ПГМГ + НЧ ZnO + ЕО сосни, № 4 ПГМГ + ЕО сосни (табл. 1).

Таблиця 1 — Вплив експериментальних зразків на ріст первинної культури клітин посмугованої м'язової тканини свині свійської (*Sus domesticus* Erxleben, 1777), $n = 4$

Вихідна концентрація клітин в 1 см ³	№ дослідного зразка					
	1	2	3	4	5	6
	Довжина моношару клітин в пробірці (<i>in vitro</i>), см*					
1 серія дослідів						
12×10 ⁵	12,5	10	8,5	8	9	8,5
6×10 ⁵	9	9,5	8	8	8,5	7,5
3×10 ⁵	10	7	8	8,5	8	6,5
1×10 ⁵	6	8	7	6	5,5	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
2 серія дослідів						
12×10 ⁵	13	10	14	11	11	10,0
6×10 ⁵	12	9	12	9	9	8,0
3×10 ⁵	10	8	10	9	8	6,0
1×10 ⁵	7	0	0	0	0	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
3 серія дослідів						
12×10 ⁵	13	11	12	9	10	9
6×10 ⁵	10,5	8,5	10	8,5	8	6
3×10 ⁵	9,5	7,5	9	7,5	8	3
1×10 ⁵	6,5	4	3	3	2,5	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
4 серія дослідів						
12×10 ⁵	12	9,5	11,5	9,5	10	12
6×10 ⁵	9,5	9	10	8	8,5	9
3×10 ⁵	9	8	9	7,5	7	8
1×10 ⁵	5,5	6	3,5	3	3	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
Середнє значення довжини моношару клітин в пробірці (<i>in vitro</i>), см						
12×10 ⁵	12,5	10	11,5	9,5	10	10
6×10 ⁵	10,5	9	10	8,5	8,5	7,5
3×10 ⁵	9,5	7,5	9	8	8	6
1×10 ⁵	6,5	4,5	3,5	3	3	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
Сума	39	31	34	29	29,5	23,5
Усереднений відносний відсоток збільшення (або зменшення)	+66	+32	+45	+23	+26	

Примітки: * — похибка вимірювань розмірів моношару $\pm 0,5 \text{ см}$; ** — негативний вплив на формування моношару клітин, “+” — позитивний, “±” — наближений до нейтрального.

Визначення впливу експериментальних зразків на проліферацію клітини м'язової тканини кроля показало чітко виражений стимулюючий ефект зразків № 1 ПГМБ і № 3 ПГМГ + НЧ ZnO, також непоганий результат показали зразки № 2 ПГМГ, № 4 ПГМГ + ЕО сосни, № 5 ПГМГ + НЧ ZnO + ЕО сосни (табл. 2).

Таблиця 2 — Вплив експериментальних зразків на ріст первинної культури клітин м'язової тканини кроля європейського (*Oryctolagus cuniculus domesticus* (Linnaeus, 1758)), n = 4

Вихідна концентрація клітин в 1 см ³	№ дослідного зразка					
	1	2	3	4	5	6
	Довжина моношару клітин в пробірці (<i>in vitro</i>), см*					
1 серія дослідів						
12×10 ⁵	10	9,5	9	8,5	12,0	8,0
6×10 ⁵	9,5	7,5	9	8	11,5	7,0
3×10 ⁵	9	6,5	7	7,5	10	6,0
1×10 ⁵	8	5,5	5,5	7	8	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
2 серія дослідів						
12×10 ⁵	13	13	13,5	13,5	13,5	10,0
6×10 ⁵	12,5	11	13,5	13,5	7	8,0
3×10 ⁵	11,5	10,5	12	10	0	6,0
1×10 ⁵	10,5	10	11	0	0	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
3 серія дослідів						
12×10 ⁵	11,5	9	10	10	9	11
6×10 ⁵	9	6	4	8	6	8
3×10 ⁵	7,5	3	0	0	3	5,5
1×10 ⁵	1,5	0	0	0	3	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
4 серія дослідів						
12×10 ⁵	11,5	11	13	11	12,5	10,0
6×10 ⁵	9,5	9	12	10,5	9,5	7,0
3×10 ⁵	8,5	8,5	10	8,5	6	6,0
1×10 ⁵	7,5	6,5	8	4	5,5	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
Середнє значення довжини моношару клітин в пробірці (<i>in vitro</i>), см*						
12×10 ⁵	11,5	10,5	11,5	11	12	10
6×10 ⁵	10	8,5	9,5	10	8,5	7,5
3×10 ⁵	9	7	7,5	6,5	5	6
1×10 ⁵	7	5,5	6	3	4	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
Сума	37,5	31,5	34,5	30,5	29,5	23,5
Усереднений відносний відсоток збільшення (або зменшення)	+60	+34	+47	+30	+26	

Визначення впливу експериментальних зразків на проліферацію клітини м'язової тканини теляти ВРХ показало певний стимулюючий ефект всіх зразків порівняно з контролем. По низхідній: № 1 > № 2 > № 3 > № 4 > № 5 (табл. 3).

Визначення впливу експериментальних зразків на проліферацію клітини м'язової тканини курки домашньої показало чітко виражений стимулюючий ефект зразків № 1 ПГМБ і № 2 ПГМГ, певний результат показали зразки № 3 ПГМГ + НЧ ZnO і № 5 ПГМГ + НЧ ZnO + ЕО сосни (табл. 4).

Таблиця 3 — Вплив експериментальних зразків на ріст первинної культури клітин м'язової тканини теляти BPX (*Bos taurus* Linnaeus, 1758), n = 4

Вихідна концентрація клітин в 1 см ³	№ дослідного зразка					
	1	2	3	4	5	6
	Довжина моношару клітин в пробірці (<i>in vitro</i>), см*					
1 серія дослідів						
12×10 ⁵	12	10	12	11	11	9,5
6×10 ⁵	10,5	8	10	10	9	8,5
3×10 ⁵	8,5	0	0	0	0	6
1×10 ⁵	6,5	0	0	0	0	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
2 серія дослідів						
12×10 ⁵	13	12	10	9	12	10
6×10 ⁵	12	10	11	9	9	7
3×10 ⁵	6	9	8	8	8	5
1×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
3 серія дослідів						
12×10 ⁵	12,5	11	10,5	10	11	9
6×10 ⁵	10,5	9	8	9	7	6
3×10 ⁵	7	5	4	5	5	4
1×10 ⁵	3	0	0	0	0	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
4 серія дослідів						
12×10 ⁵	11,5	10	11	12	10,5	11
6×10 ⁵	10,5	9	10	9	8	8
3×10 ⁵	6	7	4	6	5	6
1×10 ⁵	3	0	0	0	0	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
Середнє значення довжини моношару клітин в пробірці (<i>in vitro</i>), см*						
12×10 ⁵	12	11	11	10,5	11	10
6×10 ⁵	11	9	10	9	8	7,5
3×10 ⁵	7	5	4	5	4,5	5
1×10 ⁵	3	0	0	0	0	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
Сума	33	25	25	24,5	23,5	22,5
Усереднений відносний відсоток збільшення (або зменшення)	+47	+11	+11	+9	+4	

Отже, за результатами досліджень росту клітин чотирьох видів тварин в чотирьох серіях експериментів виявилось, що позитивно на проліферацію впливають фактично всі зразки які містять ПГМБ або ПГМГ. Найкращий результат отримано для зразка № 1 ПГМБ. Також значний ростостимулюючий ефект показали зразки № 3 ПГМГ + НЧ ZnO і № 2 ПГМГ. З'ясувалося, що додавання до ПГМБ або ПГМГ ефірної олії сосни (зразки № 4 і 5) тільки послабило ефект від цих полімерних похідних гуанідину.

Вважається, що пробіркові культури клітин мають певні обмеження, які спонукали дослідників до розробки більш складних методів [18, 19, 20]. Незначна площа їх поверхні обмежує ріст прикріплених клітин, а поганий газообмін може перешкоджати життєздатності клітин, особливо ссавців, що потребують кисню. Традиційні 2D-культури не можуть відтворити складну 3D-архітектуру тканин, що призводить до зміненої поведінки клітин, експресії генів та функцій порівняно з умовами *in vivo*. Крім того, пробірки не підходять для великомасштабного виробництва або експериментів, що вимагають високого виходу клітин.

Таблиця 4 — Вплив експериментальних зразків на ріст первинної культури клітин м'язової тканини курки домашньої (*Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758)), n = 4

Вихідна концентрація клітин в 1 см ³	№ дослідного зразка					
	1	2	3	4	5	6
	Довжина моношару клітин в пробірці (<i>in vitro</i>), см*					
1 серія дослідів						
12×10 ⁵	13	10	13	10	13	10
6×10 ⁵	11	9	10	8	10	8
3×10 ⁵	9,5	6	8	0	0	6
1×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
2 серія дослідів						
12×10 ⁵	12,5	11	14	12	13	9
6×10 ⁵	11,5	10	8	11	11	8
3×10 ⁵	11,5	9,5	0	9,5	10	0
1×10 ⁵	8,5	8	0	0	0	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
3 серія дослідів						
12×10 ⁵	13	12	11	8	9	9
6×10 ⁵	11,5	9	9	8	8,5	7
3×10 ⁵	9	8	0	0	0	6
1×10 ⁵	6,5	5	0	0	0	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
4 серія дослідів						
12×10 ⁵	12	11	13	10	12	11
6×10 ⁵	10	8,5	9	9	4	8
3×10 ⁵	9	8	3	4	3	6
1×10 ⁵	6	5,5	0	0	0	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
Середнє значення довжини моношару клітин в пробірці (<i>in vitro</i>), см*						
12×10 ⁵	12,5	11	13	10	12	10
6×10 ⁵	11	9	9	9	8,5	8
3×10 ⁵	10	8	3	3,5	3	4,5
1×10 ⁵	5	4,5	0	0	0	0
0,5×10 ⁵	0	0	0	0	0	0
Сума	38,5	32,5	25	22,5	23,5	22,5
Усереднений відносний відсоток збільшення (або зменшення)	+71	+44	+11	0	+4	

Разом з тим, на нашу думку, використаний в роботі метод первинних культур клітин наразі залишається актуальним завдяки своїй простоті та доступності.

Результати наших досліджень показують, що полімерні похідні гуанідину в низьких концентраціях проявляють не біоцидні властивості, а можуть стимулювати проліферативну активність клітин еукаріот. Це підтверджує припущення про ранозагоюючі властивості ПГМГ (ПГМБ) і дозволяє використовувати їх не лише в якості дезінфектанта або антисептика, а й в якості стимулятора загоєння ран. Аналогічні результати були отримані й при вивченні впливу ПГМГ на фібробласти курячого ембріону та клітини трахеї теляти ВРХ [21]. Разом з тим, враховуючи, що при лікуванні ран важливим є також антисептичний ефект, а органічні сполуки (кров, слиз, гній) в значній мірі інактивують ПГМГ, останній краще брати в таких концентраціях, які на декілька порядків перевищують ростостимулюючі, наприклад 0,01–0,1 %.

Деякі дослідники зазначали, що НЧ ZnO можуть проявляти цитотоксичні властивості [3], ми перевірили цю тезу і наші дослідження її не підтверджують. Швидше, можна погодитись з тим, що НЧ оксиду цинку діють підтримуюче при лікуванні ран та проявляють протизапальні властивості [4].

Отже, можна припустити, що при розробці нових препаратів з ПГМГ для пришвидшення загоєння ран у тварин додавання наночастинок ZnO приведе до певного підсилення ранозагоюючого ефекту. Тим більше, що оксид цинку має й антисептичні властивості.

Про підсилення стимулюючої дії ПГМГ ЕО, зокрема ЕО сосни наразі говорити зарано, є сенс продовжити дослідження з ефірними оліями інших рослин.

Висновки. 1. На ріст клітин м'язової тканини теплокровних і холонокровних позитивно впливають зразки ПГМБ і ПГМГ в концентрації 10^{-7} %.

2. НЧ оксиду цинку в концентрації від 10^{-7} % не проявляють цитотоксичних властивостей та в поєднанні з ПГМГ прискорюють проліферацію клітин.

Перспективи подальших досліджень. Композиції ПГМГ або ПГМБ з наночастинами оксиду цинку можна використати при розробці нових препаратів для зовнішнього застосування при лікуванні ран та опіків у тварин. При цьому більш перспективним, на наш погляд, є застосування концентрацій ПГМГ (ПГМБ), вищих за стимулюючі.

Список літератури

1. Cardoso B. D., Castanheira E. M. S., Lanceros-Méndez S., Cardoso V. F. Recent advances on cell culture platforms for in vitro drug screening and cell therapies: from conventional to microfluidic strategies. *Advanced Healthcare Materials*. 2023. Vol. 12. P. 2202936. DOI: <https://doi.org/10.1002/adhm.202202936>.
2. Jones N., Ray B., Ranjit K. T., Manna A. C. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 2008. Vol. 279, No. 1. P. 71–76. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01012.x>.
3. Szewczyk O. K., Roszczenko P., Czarnomys R., Bielawska A., Bielawski K. An overview of the importance of transition-metal nanoparticles in cancer research. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23, No. 12. P. 6688. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23126688>.
4. Agarwal H., Shanmugam V. A review on anti-inflammatory activity of green synthesized zinc oxide nanoparticle: mechanism-based approach. *Bioorganic Chemistry*. 2020. Vol. 94. P. 103423. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103423>.
5. Mirković S., Martinović M., Tadić V. M., Nešić I., Jovanović A. S., Žugić A. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oils from selected *Pinus* species from Bosnia and Herzegovina. *Antibiotics*. 2025. Vol. 14, No. 7. P. 677. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics14070677>.
6. Ponomarenko G. V., Kovalenko V. L., Balatskiy Y. O., Ponomarenko O. V., Paliy A. P., Shulyak S. V. Bactericidal efficiency of preparation based on essential oils used in aerosol disinfection in the presence of poultry. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021. Vol. 12, No. 4. P. 635–641. DOI: <https://doi.org/10.15421/022187>.
7. Лисиця А. В., Мандигра Ю. М., Бойко О. П. Полімерні похідні гуанідину, їх властивості та вплив на біологічні об'єкти : монографія. Херсон : Олді-Плюс, 2018. 324 с.
8. Lysytsya A., Kryvoshyya P., Kvartenko O., Lebed O. Effect of hydrochloric polyhexamethylene guanidine (PHMGH) and polyhexamethylene biguanidine (PHMBH), also in combination with plant essential oils and ZnO nanoparticles on some eukaryotic cattle and pig cells. *Agricultural Science and Practice*. 2022. Vol. 9, No. 1. P. 15–26. DOI: <https://doi.org/10.15407/agrisp9.01.015>.
9. Кривошия П. Ю., Мандигра Ю. М., Катюха С. М., Лисиця А. В. Застосування культур клітин *Sus domesticus* для тестування властивостей композицій з полігексаметиленбігуанідином. *Ветеринарна біотехнологія*. 2022. Вип. 41. С. 35–45. DOI: https://doi.org/10.31073/vet_biotech41-04.
10. Kamenieva T. M., Tarasyuk O. P., Derevianko K. Yu., Aksenovska O. A., Shybyryn O. V., Metelytsia L. O., Rogalsky S. P. Antioxidant activity of polymeric biocide polyhexamethylene guanidine hydrochloride. *Catalysis and Petrochemistry*. 2020. No. 30. P. 73–82. DOI: <https://doi.org/10.15407/kataliz2020.30.073>.
11. Dias F. G. G., Pereira L. F., Parreira R. L. T., Veneziani R. C. S., Bianchi T. C., Fontes V. F. N. P., Galvani M. C., Cerce D. D. P., Martins C. H. G., Rinaldi-Neto F., Ferreira N. H., da Silva L. H. D., de Oliveira L. T. S., Esperandim T. R., de Sousa F. A., Ambrósio S. R., Tavares D. C. Evaluation of the antiseptic and wound healing potential of polyhexamethylene guanidine hydrochloride as well as its toxic effects. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021. Vol. 160. P. 105739. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105739>.
12. Danilevskaya N. B., Lysytsya A. V., Moroz M. V., Nechyporuk B. D., Novoselets'kyi N. Yu., Rudyk B. P. Growth of zinc compound nanocrystals from different electrolytes. *Technical Physics*. 2018. Vol. 63, No. 3. P. 411–415. DOI: <https://doi.org/10.1134/s1063784218030076>.
13. Adams R. L. P. Cell culture methods for biochemists. 2nd rev. ed. Amsterdam, London, New York, Tokyo : Elsevier, 1990. 382 p.
14. Sergeyev V. A., Sobko Y. A. Cell cultures in veterinary medicine and biotechnology. Kyiv : Urozhay, 1990. 152 p.
15. Недосеков В. В., Блаху Т., Ситюк М. П., Мартинюк О. Г., Мельник В. В., Юстинюк В. Є. Основи біобезпеки та благополуччя тварин. Ніжин, 2021. 252 с.
16. Margis R., Borojevic R. Quantification of attached cells in tissue culture plates and on microcarriers. *Analytical Biochemistry*. 1989. Vol. 181, No. 2. P. 209–211. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90230-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90230-3).
17. Кривошия П. Ю., Кот Л. Б., Мандигра М. С. Спосіб визначення концентрації клітин перещеплюваної культури трахеї теляти за допомогою фотокалориметричного приладу : пат. 62119 Україна : МПК G01N 21/00. № u2002119483 ; заявл. 28.11.2002 ; опубл. 15.12.2003, Бюл. № 12. 3 с.

18. Popova D., Stonier A., Pain D., Titchener-Hooker N. J., Farid S. S. Representative mammalian cell culture test materials for assessment of primary recovery technologies: a rapid method with industrial applicability. *Biotechnology Journal*. 2015. Vol. 10, No. 1. P. 162–170. DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.201400294>.
19. Nie L., Gao D., Jiang H., Gou J., Li L., Hu F., Guo T., Wang H., Qu H. Development and qualification of a scale-down mammalian cell culture model and application in design space development by definitive screening design. *AAPS PharmSciTech*. 2019. Vol. 20, No. 6. DOI: <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1451-7>.
20. Górnicki T., Lambrinow J., Golkar-Narenji A., Data K., Domagała D., Niebora J., Farzaneh M., Mozdziak P., Zabel M., Antosik P., Bukowska D., Ratajczak K., Podhorska-Okolów M., Dzięgiel P., Kempisty B. Biomimetic scaffolds—a novel approach to three dimensional cell culture techniques for potential implementation in tissue engineering. *Nanomaterials*. 2024. Vol. 14, No. 6. P. 531. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano14060531>.
21. Лисиця А. В., Кривошия П. Ю. Стимуляція проліферативної активності клітин солями ПГМГ. *Наукові записки Тернопільського педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: Біологія*. 2012. № 4(53). С. 21–26. URL: <http://dspace.tnpu.edu.ua/handle/123456789/4980>.

**EFFECT OF POLYMERIC GUANIDINE DERIVATIVES, ZINC OXIDE NANOPARTICLES,
AND PINE ESSENTIAL OIL ON MUSCLE CELL PROLIFERATION**

Kryvoshyia P. Yu., Lysytsya A. V., Mandygra Yu. M.
*National Scientific Center “Institute of Experimental
and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, Ukraine*

Kvartenko O. M.
National University of Water and Environmental Engineering, Rivne, Ukraine

Nechyporuk B. D.
Rivne State University of Humanities, Rivne, Ukraine

This article examines how individual components and their combinations affect the proliferation of animal muscle cells from different species (pigs, rabbits, cattle, and chickens) in vitro. The study aimed to evaluate the growth-stimulating effect of polymeric guanidine derivatives (polyhexamethylene biguanide — PHMB, and polyhexamethylene guanidine — PHMG), zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs), and pine essential oil for their potential application as therapeutic and prophylactic agents in veterinary medicine. The PHMG hydrochloride, ZnO NPs, and common pine essential oil used in the experiments were applied at low, non-toxic concentrations, confirmed by previous research and adhering to biosafety principles. Cell proliferative activity was assessed by determining the length of the cell monolayer. Experimental results from primary muscle cell cultures of all four animal species demonstrated that PHMB and PHMG at a concentration of 10⁻⁷% exhibited a pronounced positive effect on proliferation. Specifically, the sample containing only PHMB showed the most significant stimulating effect. Compositions of PHMG with ZnO NPs also demonstrated high levels of cell growth stimulation, confirming their safety and synergistic potential for possible use in wound healing preparations. Importantly, ZnO NPs at the tested concentration of 10⁻⁷% did not exhibit cytotoxic properties, refuting some previous data and supporting their role as supportive components. However, the addition of pine essential oil to the PHMG/PHMB and ZnO NPs compositions somewhat weakened the growth-stimulating effect of the polymeric guanidine derivatives. This suggests the need for further research to optimize multicomponent formulations and investigate the influence of other essential oils. The conclusions emphasize that low concentrations of polymeric guanidine derivatives act not only as biocides but also as stimulators of eukaryotic cell proliferation, thereby expanding their therapeutic potential in the development of preparations for accelerating wound and burn healing in animals. Therefore, the combination of PHMG/PHMB with ZnO NPs is promising for the development of new topical preparations; however, for an antiseptic effect, it is advisable to use higher concentrations of PHMG/PHMB

Keywords: cell culture, biotechnology, medicinal preparations