

У всех обследованных животных наблюдали системную лимфаденопатию мезен териальных, медиастенальных, паховых и бронхиальных лимфоузлов.

Макроскопические и микроскопические изменения в тканях скорее всего обус ловлены ассоциированным действием двух вирусных агентов ЦВС-2 и ВРРСС.

Перспективы исследований. На современном этапе изучения ЦВИС перспектив ным направлением является применение иммуногистохимических методов выявления ЦВС-2 антигена в тканях животного.

Список литературы

1. Малоголовкин, А. С., Надточей, Г. А., Жигалева, О.Н., Бурдинский, В.Г., Новикова М. Б. Идентифи кация генома цирковирuсов свиней 1-го и 2-го типов методом полимеразной цепной реакции. Ветеринар ная медицина №88. – 2007. 137-140 с. 2. Меркулов, Г. А. Курс патологической техники. Изд-во «Медици на», – 1969. – 422 с. 3. Орлянкин, Б.Г., Алипер, Т.Н., Непоклонов, Е.А. Цирковирuсная инфекция свиней. Животноводство России, 2003 . – №8, с. 24-25. 4. Сагина, Т.Н. Цирковирuсные инфекции свиней. Обзор литературы. Владимир. Изд-во ВНИИЗЖ, 2003. – 100 с. 5. Allan Grodon, M., Ellis, John, A. Porcine circovirus: a review // J. Vet. Diagn. Invest. – 2000-12, №1– P.–3-14. 6. Seamus Kennedy, Joaquim Segalers, Albert Rovira, Sandra Scholes, Mariano Domingo, Deborah Moffett, Brian Meehan, Ronan O'Neill, Francis McNeilly, Gordon Allan. Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. J Vet Diagn Invest. 2003– 15: P.151–156. 7. Drolet, R., Thibault. S.D. Allaire et al. Porcine dermatitis and nephropathy syn drome. An overview of the disease. Swine Health Prod.1999 – 7(6).P. 283-285. 8. Quintana, J., Segales, J., Rossel, C., Calsamiglia, M., Rodriguez-Arrijoa, G. M., Chianini, F., Folch, J., Maldonado, J., Canal, M., Plana-Duran, J., Domingo. Clinical and pathological observations on with porcine multisystemic wasting syndrome. The veteri nary record, 22, – 2001. 9. Zeljko Grabarevic, Josip Madic, Branko Bacanek, Andrea Gudan, Branka Artukovic, Ozren Smolec and Ana Beck. Pathological observation on pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Croatia. Veterinarski arcyiv 74 (1), 3-11, – 2004.

CAUSES OF PORCINE DERMATITIS AND NEPHROPATHY SYNDROME: CLINICAL SIGNS AND PATHOLOGICAL LESIONS.

Malogolovkin A. S., Nadtochey G. A., Yakusheva O. V., Kolbasov D. V.

All-Russian Institute of Experimental Veterinary Medicine, Moscow, Russia.

Economic damage from porcine circoviruses associated diseases (PCVAD) increases every year. Porcine circovirus (PCV-2) plays a significant role in pathogenesis porcine multisystemic wasting syndrome (PMWS), porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) and congenital tremor (CT). PCVAD can be provoke to presence in farms other viruses or bacterial agents. The aim of our investigations was study of the pathoanatomical changes on piglets with PDNS. Data about clinical signs and microscopical changes in affected piglets with PCV-2 and porcine respiratory and reproductive virus (PRRSV) are presented in this paper. PCV-2 infection was detected in all necropsied pigs by PCR. Results of our investigations describe multisystemic histological lesions in organs, including skin, lymph. nodes, kidneys, liver, spleen and heart.

УДК 619:577.1:615.28:547.495.9

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ ДЕЗІНФЕКТАНТУ НА ОСНОВІ ПОЛІГЕКСАМЕТИЛЕНГUANIDИну НА МЕМБРАНИ КЛІТИН

Мандигра М.С., Лисиця А.В.

Інститут епізоотології УААН, м. Рівне

Шатурський О.Я.

Інститут біохімії НАН України, м. Київ

У роботі розглянуто вплив різних концентрацій полігексаметилегуанідину, що є ос новним інгредієнтом нового дезінфектанту Епідез, на іонну провідність бішарової фос фоліпідної мембрани, яка слугує в якості моделі нативної мембрани мікроорганізмів. Визначена мінімальна діюча, або каналформуюча концентрація препарату, яка стано вить $2 \cdot 10^{-5} \%$. Отримані результати також свідчать про незворотній характер взає модії молекул препарату з ліпідним бішаром.

Ефективна дезінфекція та деконтамінація є одним з важливих елементів про філактики та боротьби з інфекційними хворобами сільськогосподарських тварин

і птиці. Вона направлена на знешкодження збудників заразних захворювань у довікеллі та діє на одну з ланок епізоотичного ланцюга, а саме на механізм передачі збудників від джерел інфекції до сприйнятливих тварин або птахів.

Серед порівняно нових препаратів, які найбільш повно відповідають зростаючим вимогам щодо дезінфектантів, провідне місце починають займати полімерні сполуки гуанідину або поліалкіленгуанідини (далі ПАГи). Ця група дезінфектантів за цілою низкою параметрів вигідно відрізняється від традиційних препаратів, таких як четвертинні амонієві сполуки (ЧАС), альдегіди, поверхнево-активні речовини (ПАР), похідні фенолу, хлорактивні та ін. Завдяки полімерній природі біоцидна активність ПАГів вища ніж у хлоргексидину біглюконату та інших низькомолекулярних катіонних ПАР, при цьому вони й менш токсичні.

Одним з найбільш ефективних препаратів з групи полімерних похідних гуанідину є полігексаметиленгуанідин (polyhexamethyleneguanidine) (рис. 1). Біоцидні властивості полігексаметиленгуанідину (далі ПГМГ) зумовлюються наявністю гуанідинових груп [1].

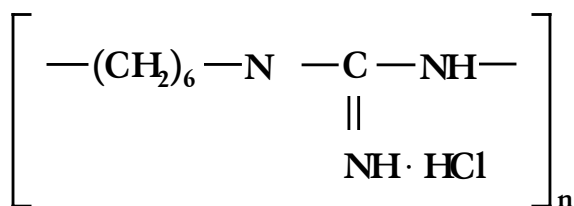


Рис. 1. Структура молекули полігексаметиленгуанідину гідрохлориду

За хімічною будовою ПГМГ — лінійний або розгалужений полімер, за кімнатної температури прозора склоподібна маса, температура розм'якшення 100-150 °С, добре розчинний у воді. В Інституті епізоотології УААН розроблено та проведено успішну апробацію нового дезінфікуючого засобу, який в якості основної діючої речовини містить ПГМГ, цей засіб отримав назву „Епідез” [2,3]. Лабораторні та виробничі випробування показали, що Епідез за своєю бактерицидною, віруліцидною та фунгіцидною дією й іншими параметрами перевершує більшість традиційних дезінфектантів, що на сьогодні використовуються у ветеринарній медицині.

Біоцидні властивості ПАГів значною мірою залежать від їх молекулярної маси та від хімічної природи аніону. Для ПГМГ гідрохлориду найбільша біоцидна активність притаманна полімерам з молекулярною масою близько 10 000 – 15 000 Да [1]. Для них можна розрахувати приблизну довжину молекули. Аніоном у випадку ПГМГ гідрохлориду слугує Cl⁻. Хлор, як досить сильний акцептор, відтягує на себе електрони, збільшуючи позитивний заряд на катіоні гуанідинію. Перерозподіл електронної густини в гуанідиновій групі створює певне напруження в усій макромолекулі, вона випрямляється і набуває форми близької до лінійної, при цьому всі гуанідинові групи є легкодоступними та можуть реалізувати свою реакційну здатність при взаємодії з клітиною [4].

Схематично механізм біоцидної дії препарату можна описати наступним чином. ПГМГ належить до групи катіонних поліелектролітів, які завдяки N⁺ мають позитивний заряд молекули. На першому етапі взаємодії з негативно зарядженою бактеріальною клітиною (заряд обумовлюється тейхоевими, сіаловими кислотами, фосфатними групами ліпідів) молекули ПГМГ адсорбуються на її поверхні (бактеріальній стінці) та частково блокують дихання, живлення та транспорт метаболітів через клітинну стінку. На наступному етапі молекули ПГМГ взаємодіють з цитоплазматичною мембраною мікроорганізму, тут, крім електростатичного (мішенню можуть слугувати карбоксильні групи амінокислот, білки, кислі фосфоліпіди, кислі полісахариди [5]), діє також і гідрофобний механізм — молекула ПГМГ містить неполярні гексаметиленові ділянки, які взаємодіють з фосфоліпідами мембран бактерій.

Певне значення має і той фактор, що плазматична мембрана бактерій часто містить трубчасті або пластинчасті заглиблення в бік цитоплазми. Отже, при контакті з клітиною відбувається електростатична взаємодія негативно заряджених груп на клітинній мембрані з молекулою полімеру. Це призводить до переорієнтації молекули та потрапляння її заряджених фрагментів до ліпідного зовнішнього моношару мембрани. Макромолекула полімеру кооперативно зв'язується з великою кількістю молекул фосфоліпідів мембрани і спричиняє нейтралізацію їх негативного заряду. Комплекс, що утворився, стабілізується гідрофобними взаємодіями алкільних ланцюгів жирних кислот фосфоліпідів. Це призводить до змін електростатичних і гідрофобних взаємодій, які стабілізують мембрану, послаблюються ліпід-ліпідні взаємодії. Наслідком сорбції є порушення бар'єрних і транспортних функцій мембрани, а подальше проникнення до її неполярної частини гідрофобного фрагменту молекули ПГМГ призводить до порушення ван-дер-ваальсової взаємодії між молекулами ліпідів. Це спричинює спочатку зміну проникності, а потім і цілісності мембрани, яка деформується та фрагментується. Оскільки молекули ПГМГ також є ферментативними сполуками, то вони можуть інгібувати роботу окремих ферментних систем цитоплазматичної мембрани бактерій [6]. Комплекс цих факторів призводить до порушення цілісності мембрани, її ферментативних, бар'єрних і транспортних функцій, і як наслідок – до розладу метаболізму та загибелі клітини [1,2,4].

В інших експериментах вивчали вплив полімерних похідних гуанідину на фракційний і жирнокислотний склад мембранних і нейтральних (запасних) ліпідів пліснявого гриба *Aspergillus niger* [7]. Виявилось, що в певних концентраціях (1×10^{-5} %) для ПГМГ властива навіть ростостимулююча дія на грибок. При цьому зростає рівень загальних ліпідів і, зокрема, мембранних (полярних). При збільшенні концентрації ПГМГ ростові процеси сповільнюються, зростає фракція нейтральних (резервних або запасних) ліпідів. При загибелі мікроорганізму змінюється жирнокислотний склад, в міцелії утворюються ліпіди з більшою кількістю насичених жирних кислот і з меншим значенням йодного числа.

Дослідження іншого гриба *Cunninghamella japonica* також показали, що у відповідь на стрес (у даному випадку дію дезінфектанту) починають функціонувати такі механізми біохімічної адаптації, як зміна ненасиченості жирних кислот мембранних ліпідів, зміна довжини їх алкільних ланцюгів, модифікації фракційного складу клітинних ліпідів [7].

В експериментах з вивчення впливу ПГМГ на водорості *Chlorella pyrenoidosa* показано, що при додаванні у середовище препарат викликав зменшення проникності мембран при концентрації 50 мг/л і часткове руйнування клітин при 100 мг/л [8].

Тобто, полігуанідинові дезінфектанти є мембраноактивними сполуками, значно впливають на фракційний і жирнокислотний склад ліпідів пліснявих грибів, особливо мембранних ліпідів. Проте, тонкі механізми дії ПАГів на мембрани залишаються досі нез'ясованими. З арсеналу сучасних методів молекулярної біохімії, в якості аналога плазматичних мембран мікроорганізмів, нами була використана модель штучної бішарової ліпідної мембрани (БЛМ). Зокрема, вивчався вплив на іонну провідність БЛМ різних концентрацій ПГМГ.

Мета роботи. Визначити в яких концентраціях полігексаметиленгуанідину гідрохлорид спроможний взаємодіяти з ліпідним бішаром штучної мембрани та призводити до формування в ньому іонпровідних отворів. З'ясувати, чи носить взаємодія полімеру з ліпідним бішаром зворотній характер.

Методи досліджень. БЛМ формували за власною оригінальною методикою з розчину фосфатидилхоліну (ФХ) (Харківський завод біопрепаратів "Біолек") та холестерину "Calbiochem" (Німеччина) в н-гептані на отворі діаметром 0,6 мм у тefлоновому стаканчику, розміщеному в скляній комірці.

Співвідношення ФХ:холестерин в розчині становило 2:1 за умови загальної концентрації ліпідів 20 мг/мл. Формування ліпідного шару спостерігали візуально у відображеному світлі за допомогою бінокулярного мікроскопу.

Розчин, який оточує мембрану, містив 10 мМ Трис-НСІ ("Sigma", США) та задану кількість хлоридів металів кваліфікації х. ч.

Для вимірів провідності мембрани використовували хлор-срібні електроди, занурені в розчин 2М хлористого калію з агаровими містками, розміщеними з різних боків мембрани. Електричний потенціал зовні тefлонового стаканчика (цис-сторона) задавали відносно потенціалу внутрішнього об'єму (транс-сторона), який приймали рівним 0 мВ. Мембранний потенціал становив 50 мВ. Водно-сольовий розчин, який оточує мембрану, перемішували за допомогою магнітної мішалки. Всі експерименти проводили за температури 22-24 °С.

До цис-сторони (ззовні) додавали розчини ПГМГ у буфері в певних концентраціях. Спостерігали за зміною в часі інтенсивності трансмембранного іонного струму, що призводив до зміни електричного потенціалу мембрани. За відсутності каналформуючих елементів (наприклад антибіотиків) провідність БЛМ залишається незмінною, додавання досліджуваних речовин у певних концентраціях може призводити до зростання трансмембранного струму і до зміни потенціалу. Таким чином можна судити про здатність препаратів, що досліджуються формувати отвори (канали) в БЛМ і змінювати її провідність.

Результати досліджень. Узагальнені результати експериментів наведено в таблиці.

Таблиця – Вплив різних концентрацій ПГМГ на стан БЛМ

Концентрація ПГМГ у циско-мірці БЛМ, %	Ефект
0,2	Зростання трансмембранного струму через 1,2 хв., розрив БЛМ.
0,02	Зростання трансмембранного струму через 1,2 хв., розрив БЛМ.
0,002	Зростання трансмембранного струму через 1,6 хв., розрив БЛМ.
0,0002	Зростання трансмембранного струму через 6,6 хв., розрив БЛМ.
0,00002	Зростання трансмембранного струму через 7-10 хв., розрив БЛМ.
0,000002	Незмінність провідності БЛМ протягом 30 хв. і довше, цілісність БЛМ, що не виключає можливості зв'язування ПГМГ з поверхнею ліпідного бішару.

Отримані результати свідчать про наступне:

1. Полімер у концентраціях, починаючи з $2 \cdot 10^{-5} \%$ і вище спроможний взаємодіяти з ліпідним бішаром штучної мембрани, призводити до формування іонпровідних отворів у ліпідному бішарі, зростання трансмембранного струму 100 мМ NaCl і спричиняти в подальшому розрив БЛМ.

2. Незважаючи на досить ретельне видалення ПГМГ з водно-сольового розчину, що оточує мембрану (перфузія, відмивання), провідність мембрани не зменшувалася, що свідчить про незворотній характер взаємодії препарату з ліпідним бішаром.

3. Отже, одним з пояснень біоцидної дії ПГМГ може бути формування іонпровідних отворів у ліпідному бішарі нативних мембран прокаріот. Можливо, аналогічно препарат може взаємодіяти і з клітинами еукаріот, для яких характерна наявність високої кількості холестерину в плазматичній мембрані.

Висновки. Полігексаметиленгуанідин, що є основним компонентом нового дезінфектанту Епідез, у першу чергу діє на плазматичні мембрани мікроорганізмів. Незворотньо зв'язуючись з фосfolіпідами, він формує іонпровідні канали в штучних бішарових мембранах, починаючи з концентрації $2 \cdot 10^{-5} \%$ і вище. Це призводить до порушення функцій мембрани та загибелі клітини.

У подальшому необхідно буде визначити як впливає зміна аніону (ПГМГ хлорид, ПГМГ сукцинат, ПГМГ валерат, ПГМГ малеат та ін.) і, відповідно, конформації та ліпофільності молекули полімеру на формування іонпровідних отворів у БЛМ.

Список літератури

1. Гембицкий, П.А. Полимерный биоцидный препарат полигексаметиленгуанидин / П.А. Гембицкий, И.И. Войнцева. – Запорожье: Полиграф, 1998. – 44 с.
2. Використання полігексаметиленгуанідину для дезінфекції / М.С. Мандигра, І.В. Степаняк, А.В. Лисиця, Ю.М. Мандигра // Аграрний вісник Причорномор'я. Збірник наукових праць. Вип. 42. – Одеса: СМІЛ, 2008. – Ч. 2. – С. 69-73.
3. Изучение

биоцидной активности дезинфектанта содержащего полигексаметиленгуанидин / Н.С. Мандыгра, А.В. Лисица, И.В. Степаняк, Ю.Н. Мандыгра, А.М. Дьяченко // Совр. проблемы диагн., лечения и проф. инфекц. болезней животных и птиц: Сб. науч. трудов. Вып. 2. – Екатеринбург: Уральское издат., 2008. – С. 318-322. 4. www.iet.biocide.ru 5. Книрель, Ю.А. Строение липополисахаридов грамотрицательных бактерий / Книрель Ю.А., Кочетков Н.К. // Биохимия. – 1993. – Т.58, № 2. – С. 166-181. 6. Біохімічні аспекти біоцидної дії полімерних похідних гуанідину / М.С. Мандигра, А.В. Лисица, І.Л. Андрушук, Ю.М. Мандигра-Мельник // Вісник Білоцерківського державного аграрного університету: Зб. наук праць. – Біла Церква, 2009. – Вип. 60. – Ч. 1. – С. 81-85. 7. Кузнецова, Л.С. О механизме действия полигуанидиновых дезинфектантов // Мясная индустрия. – 2001. – № 4. – С. 16-19. 8. Константиновская, С.В. Исследование действия биоцидов (на примере ПГМГ) на эколого-функциональное состояние водоросли *Chlorella pyrenoidosa*: автореф. дис. канд. биол. наук: спец. 03.00.16. «Экология» / С.В. Константиновская. – Москва, 2006. – 20 с.

MOLECULAR MECHANISMS OF THE INFLUENCE OF DISINFECTANT ON THE BASE OF *POLYHEXAMETHYLENEGUANIDINE* ON THE CELL MEMBRANES

Mandygra M.S., Lysytsya A.V.
Epizootology Institute of UAAS, Rivne
Shaturskiy O.Ya.
Biochemistry Institute of NASU, Kyiv

Polyhexamethyleneguanidine (PGMG) is the main component of the new disinfectant Epi-dez. The article presents the results of the study of the influence of different concentrations of PGMG on ion conductivity through double layer phospholipid membrane. It is a model of the nature membrane of microorganism. It has been established that minimum acting concentration of the preparation is 2×10^{-5} %. We have established that interaction of the molecules of PGMG with lipid double layer has the inconvertible nature.

УДК 577.11.542.951,1:615,281:615.23.73

ТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ КОНСТРУЮВАННЯ ВАКЦИН ДЛЯ МЕДИЦИНИ ТА ВЕТЕРИНАРІЇ НА ОСНОВІ АЦИЛЬОВАНИХ ПОХІДНИХ ІМУНОГЕННИХ БІОПОЛІМЕРІВ *P.AERUGINOSA*

Мартинов А.В., Волянська Н.П.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України»

Отримано сукцинільовані похідні антигенних білків синьогнійної палички з різним ступенем модифікації, визначено їх найбільш імуногенні варіанти з метою подальшої розробки лікарських форм імунобіологічних препаратів для трансдермального і перорального застосування в гуманній та ветеринарній медицині.

На сьогодні існує достатньо великий арсенал засобів специфічної профілактики інфекційних захворювань – вакцин, імуноглобулінів тощо, деякі з них вже дозволили людству майже подолати окремі пандемічні хвороби (натуральна віспа, поліомієліт), інші проявляють вельми високу ефективність при широко розповсюджених хворобах людей і тварин (кліщовий енцефаліт, дифтерит, кір, правець, сказ та ін.). Однак, поки що немає ефективних засобів специфічної профілактики щодо широко розповсюджених (лістеріоз, мікоплазмози, уреоплазмози, хламідіози, псевдомонози, малярія та фактично всі паразитози, ентеробактеріози і др.) та якби екзотичних, але які в останні десятиріччя агресивно себе проявили в глобальному масштабі (СНІД, віруси груп герпесу, адено-, рота-, енцефалопатії, пташиний грип, SARS) захворювань. В одних випадках неспроможність конструювання надійних імунобіологічних засобів обумовлена низькою імуногенністю антигенів збудника, в інших – неспецифічністю імунної відповіді, що пояснюється вираженим поліморфізмом антигенів, гетерогенністю та популяційною мінливістю збудників [1, 2]. Пошук но-