

УДК 578:24

**ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ ПРОБІОТИЧНОГО ШТАМУ
A. VIRIDANS 167 НА ПЕРЕЩЕПЛЮВАНІ
КУЛЬТУРИ КЛІТИН**

**Риженко С.А., Кременчуцький Г.М., Бредіхіна М.О.,
Коваленко С.М.**

**Дніпропетровська обласна санітарно –
епідеміологічна станція**

**Дніпропетровська державна медична академія
Дніпродзержинська міська санітарно –
епідеміологічна станція**

В сучасній медичній практиці все ширше застосовуються пробіотики з профілактичною та лікувальною ціллю як при інфекційних захворюваннях так і при інших захворюваннях і станах, що супроводжуються порушенням мікробіоценозів та імунітету [1, 2]. Антагоністична активність пробіотиків доведена як по відношенню до патогенної так і умовно патогенної бактеріальної мікрофлори організму людини, однак актуальне питання сьогодення - вплив пробіотиків на віруси - вивчено недостатньо [3, 4, 5].

Однією із можливих лабораторних моделей для вивчення впливу пробіотичних мікроорганізмів та продуктів їх життєдіяльності на репродукцію вірусів є перещеплювані культури клітин, які здатні підтримувати розмноження тропних до них вірусів.

Дослідженнями на моделі культури клітин Vero встановлено інгібуючий ефект пробіотиків із лактобактерій та ентерококів на вірус простого герпесу [6]. На культурі клітин Her-2 проведені дослідження впливу нейрамініну *S.aureus* на поліовіруси [7].

Мікроорганізм *Aerococcus viridans* є основною складовою вітчизняного пробіотику "А-бактерину", антагоністичний вплив якого на патогенні та умовно патогенні мікроорганізми доведено дослідженнями [1, 8], однак взаємодія *A. viridans* із вірусами не вивчалась. Також ми не знайшли у літературі опису моделі "пробіотичні мікроорганізми – культури клітин", без чого неможливо досліджувати процеси в системі "пробіотичні мікроорганізми – культури клітин – віруси". В той же час є публікації, у яких описується ефект пробіотиків при лікуванні ентеровірусної і ротавірусної інфекції [2].

Біологічні властивості аерококів, що входить в склад "А-бактерина", дозволяють припустити їх вірицидну дію [1]. Але вивчення вірицидної дії аерококів на віруси неможливе без створення динамічної моделі "аерококи – культури клітин". Проведене дослідження передбачає визначення максимально стерпної концентрації аерококів, тобто такої, що не спричиняє незворотних змін у морфології та життєздатності клітин. Зауважимо, що до цього часу не існує уніфікованого методу оцінки цитотоксичності пробіотиків у культурі клітин.

Метою роботи було визначення максимально переносимої концентрації *A. viridans* 167 яка не діє на перещеплювані культури клітин та розробка моделі "культура клітин – аерокок".

Матеріали та методи дослідження

Добову культуру *A. viridans* штам 167 вирощували в пробірках на зкошеному м'ясо-пептонному агарі. Суспензію культури аерококів готували на стерильному 0,9% розчині натрію хлориду. Мутність визначалась на денситометрі, вона становила 2,0 по МакФарланду. У суспензії з цією мутністю визначалась концентрація клітин аерококів стандартним шляхом. Підрахунок колонієутворюючих одиниць (КУО) проводили шляхом посіву 0,05 мл суспензії мікробних клітин в розведенні $1 \cdot 10^{-3}$ – 10^{-8} на м'ясо-пептонний агар, після чого по вирості колоній робився перерахунок концентрації клітин. Щільність суспензії аерококів 2,0 по МакФарланду становила $3 \cdot 10^8$ КУО/мл.

Перед дослідженням методом серійних розведень була визначена чутливість *A. viridans* до антибіотиків. Було виявлено, що мінімальна стерпна концентрація стрептоміцину для аерококів становила 1024 мкг/мл.

Готували десятикратні послідовні розведення суспензії аерококів на поживному середовищі DMEM і інкубували суміші при 37°C протягом 5 діб. Щодобово визначали зміни концентрації аерококів і рН середовища.

Після попереднього видалення ростового середовища із флаконів з моношаром культури клітин вносили по 0,8 мл підтримуючого середовища DMEM без сироватки та інокулювали по 0,2 мл клітин *A. viridans* розведеннями суспензії культури відповідно, таким чином розводили концентрацію аерококів у 5 разів, досягає концентрації $0,6 \cdot 10^8$ КУО/мл у першому флаконі і відповідно у 10 разів менше у кожному послідовному розведенні.

Для досліджень були використані перещеплювані культури клітин: Her-2 (клітини, отримані із епідермоїдної карциноми людини), RD – (клітини рабдоміосаркоми людини), та L-41 (лімфобластні клітини людини). Всі лінії клітин культивували з використанням поживного середовища DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (виробник «Підприємство з виробництва бактерійних та вірусних препаратів» Інституту поліомієліту та вірусних енцефалітів ім. М. П. Чумакова РАМН, Росія) з додаванням 7% ембріональної сироватки великої рогатої худоби згідно методики [9].

Посіви інкубували в термостаті при 37°C, спостерігали за клітинами протягом 5 діб, щоденно мікроскопуючи на наявність цитопатичного ефекту чи появи змін клітинного моношару. Були застосовані контрольні: контроль поживного середовища DMEM на стерильність, контроль інтактної культури клітин, контрольні посіви культуральних рідин на м'ясо-пептонний агар для визначення наявності *A. viridans*.

Максимальну концентрацію *A. viridans*, яку переносить культура клітин без прояву цитопатичного ефекту, визначали по той концентрації клітин, присутність якої не викликала змін клітинного моношару.

Результати та їх обговорення

Визначена кількість мікробних клітин добової культури *A. viridans* в 1 мл суспензії мутністю 2,0 по МакФарланду становила $3 \cdot 10^8$ колоніє-утворюючих одиниць (КУО).

Кратність зростання біомаси *A. viridans* на рідкому поживному середовищі DMEM протягом доби інкубації при 37°C становила 1,5 рази.

З першої доби культивування культури клітин RD відбувалося швидке окислення культурального

середовища, зниження його водневого показника (рН). Спостерігалось щоденне поступове руйнування моношару клітин всіх розведень і в подальшому повна його загибель на 5 добу, спричинена впливом суспензії *A. viridans*.

Результати визначення максимальної концентрації *A. viridans*, що не викликають цитопатичний ефект у культурах клітин, представлені у таблиці.

Таблиця.- Цитопатичний вплив *A. viridans* на культури клітин

Вид культури клітин	Розведення lg (КУО)/мл	Строки спостереження за культурою клітин				
		1 доба	2 доба	3 доба	4 доба	5 доба
Нер-2	7,78	0	0	+	+	+
	6,78	0	0	0	0	0
RD	7,78	+	+	+	+	+
	6,78	+	+	+	+	+
	5,78	0	+	+	+	+
	4,78	0	+	+	+	+
	3,78	0	0	+	+	+
	2,78	0	0	+	+	+
	1,78	0	0	+	+	+
	0,78	0	0	0	+	+
L-41	7,78	+	+	+	+	+
	6,78	0	+	+	+	+
	5,78	0	0	+	+	+
	4,78	0	0	0	+	+
	3,78	0	0	0	0	0

Умовні позначення:

+ - наявність цитопатичного ефекту

0 - відсутність цитопатичного ефекту

Наведені у таблиці дані свідчать, що в культурі клітин Нер-2 морфологічні зміни з'явилися на третю добу спостережень, тільки у флаконах, які були інокульовані *A. viridans* - $6 \cdot 10^7$ КУО/мл, і відсутні при інокуляції - $6 \cdot 10^6$ КУО/мл. Зміни моношару характеризувались округленням клітин зі збереженням міжклітинних зв'язків та появою зернистості в цитоплазмі. З четвертої доби у флаконах з концентрацією аерококів $6 \cdot 10^7$ була відзначена часткова втрата міжклітинних зв'язків і подальша стабілізації змін до кінця спостережень. Наявність живої культури *A. viridans* була підтверджена при щоденних контрольних посівах та бактеріоскопії. Таким чином, найбільш стерпна концентрація аерококів, яка не визиває змін у моношарі клітин для культури клітин Нер-2, становить $6 \cdot 10^6$ КУО/мл

Вплив *A. viridans* на культуру клітин L-41 проявлявся помутнінням культурального середовища у першу добу у флаконах, які інокульовані дозою аерококів $6 \cdot 10^6$ КУО (розведення 10^{-1}), та зниженням рН середовища з 7,4 до 5,0. Зміни характеризувались

швидким руйнуванням моношару та відокремленням клітин від скла. Найбільш стерпна концентрація аерококів, яка не викликала цитопатичний ефект культури клітин L-41, становила $6 \cdot 10^5$ КУО/мл.

Вплив *A. viridans* на культуру клітин RD відзначений цитопатичним ефектом вже починаючи з першої доби спостереження у розведенні 6 КУО/мл. Культура клітин Нер-2 та викликані *A. viridans* цитопатичні зміни представлені на рис. 1 і 2.

Висновки

1. Встановлено виражений цитопатичний вплив *A. viridans* на культуру клітин RD.
2. Стійкість культури клітин Нер-2 до цитопатичної дії *A. viridans* у концентрації $6 \cdot 10^5$ КУО та нижче протягом 5 діб, дає можливість використати цю лінію клітин як лабораторну модель для вивчення впливу *A. viridans* на віруси.

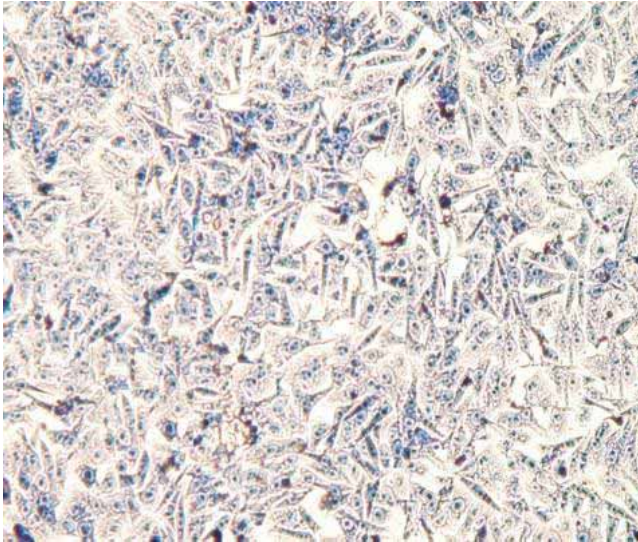


Рис.1 Мікрофотографія культури клітин Нер-2.
Фарбування за Романовським – Гімза. Збільш. х
1000

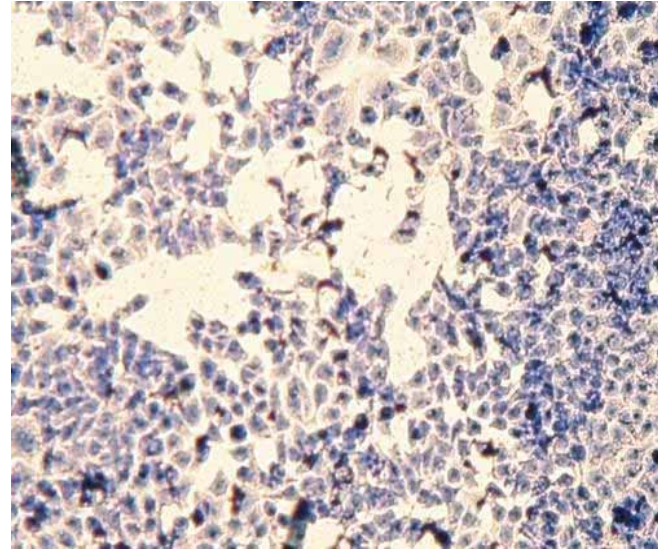


Рис. 2 Мікрофотографія культури клітин Нер-2, що іно
кульована *A.viridans* $6 \cdot 10^7$ КУО/мл після 4-ї
добі.

Фарбування за Романовським – Гімза. Збільш. х
1000

Список літератури

1. Кременчуцкий Г.Н., Рыженко С.А., Вальчук С.И. Роль микробиологии организма человека и принципы ее коррекции. – Днепропетровск: Пороги, 2003. – 230 с.
2. Салливан А., Норд К. Место пробиотиков в терапии инфекций желудочно-кишечного тракта у человека // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2003. – № 3. – С. 275–284.
3. Доронин А.Ф., Шендеров Б.А. Функциональное питание. – М.: Грант, 2002. – 296 с.
4. Isolauri E., Kaila M., Mykkanen H. et al. Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis // Dig Dis Sci. – 1994. – Vol. 39. – P. 2595–2600.
5. Majamaa H., Isolauri E., Saxelin M. et al. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis // J Pediatr Gastroenterol Nutr. – 1995. – Vol. 20. – P. 333–338.
6. Voeikova A., Ermolenko E., Furaeva V. et al. In vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication caused by various probiotics // Clinical Microbiology and Infection. – 2004. – Vol. 10. – P. 218.
7. Зубкова Н.Л., Рибалко С.Л., Задорожна В.І., Шапіро А.В. Вивчення впливу нейрамініну на репродукцію поліовірусів у перещеплюваній клітинній культурі Нер-2 // Лабораторна діагностика. – 2002. – № 1. – С. 44–46.
8. Рыженко С.А. Новый пробиотик А-бактерин. – Днепропетровск: Пороги, 2001. – 252 с.
Новые методы культуры животных тканей: сб. ст. / под ред. Ю.М. Оленова. – М.: Мир, 1976. – 148 с.

УДК 578:24

ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ ПРОБІОТИЧНОГО ШТАМУ *A.VIRIDANS* 167 НА ПЕРЕЩЕПЛЮВАНІ КУЛЬТУРИ КЛІТИН Рыженко С.А., Кременчуцкий Г.М., Бредихіна М.О., Коваленко С.М.

Дніпропетровська обласна санітарно –
епідеміологічна станція

Дніпропетровська державна медична академія
Дніпродзержинська міська санітарно –
епідеміологічна станція

Представлено дані про цитопатичний ефект пробиотичного штаму *Aerococcus viridans* №167 у перещеплюваних культурах кліток Нер-2, RD і L-41. Установлена цитопатична стійкість культури кліток Нер-2 до *A.viridans* у концентрації $6 \cdot 10^5$ КУО/мл.

Ключові слова: цитопатичний ефект, перещеплювані культури кліток, *Aerococcus viridans* №167

УДК 578:24

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *A.VIRIDANS* 167 НА ПЕРЕВИВАЕМЫЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК Рыженко С.А., Кременчуцкий Г.Н., Бредихина М.А., Коваленко С.М.

Днепропетровская областная санитарно –
эпидемиологическая станция

Днепропетровская государственная медицинская
академия

Днепропетровская городская санитарно –
эпидемиологическая станция

Представлены данные о цитопатическом эффекте пробиотического штамма *Aerococcus viridans* №167 на перевиваемых культурах клеток Нер-2, RD и L-41. Установлена цитопатическая устойчивость культуры

клеток Hep-2 к *A. viridans* в концентрации $6 \cdot 10^5$ КОЕ/мл.

Ключевые слова: цитопатический эффект, перевиваемые культуры клеток, *Aerococcus viridans* №167

UDK 578:24

RESEARCH ACTION OF PROBIOTICS CULTURE OF *A. VIRIDANS* INTERTWINED CULTURES OF CELLS

Ryzhenko S., Kremenchutskiy G., Bredihina M., Kovalenko S.

Dnepropetrovsk area sanitary is the epidemiology station

Dnepropetrovsk state medical academy

Dneprodzerzhinska city sanitary is the epidemiology station

Information is presented about the cytopathic effect of probiotics culture of *Aerococcus viridans* N 167 on the in tissue culture of Hep-2, RD and L-41. Cytopathic stability in tissue culture of Hep-2 is set to *A. viridans* in concentration $6 \cdot 10^5$ CGU/ml.

Keywords: cytopathic effect, intertwined cultures of cells, *Aerococcus viridans* N 167