УДК 579.882 +57.082.542.

©В.В. Гончаренко, С.К. Джораєва, І.Ю. Кучма, Д.О. Яремчук, С.В. Пилюгін, А.Ю. Воропай, А.Ю. Волянський, Т.О. Волков, С.М. Лахман

ДУ "Інститут дерматології та венерології АМН Укра ни"

ДУ "Інститут мікробіології та імунології імені І.І. Мечникова АМН Укра ни"

ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ ЗБУДНИКІВ ХЛАМІДІОЗІВ НА ПЕРЕЩЕПЛЮВАНІЙ ЛІНІ КЛІТИН McCoy З ВИКОРИСТАННЯМ АМІНОКИСЛОТ

ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ ЗБУДНИКІВ ХЛАМІДІОЗІВ НА ПЕРЕЩЕПЛЮВАНІЙ ЛІНІ КЛІТИН McCoy З ВИКОРИСТАННЯМ АМІНОКИСЛОТ – У статті наведено методологічні заходи, які застосовують для діагностичного виділення збудника хламідіозів та накопичення його біомаси на перещеплюваній клітинній лінії McCoy із застосуванням L-цисте ну-HCl та L-триптофану.

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ХЛАМИДИОЗОВ НА ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК McCoy С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АМИНОКИСЛОТ – В статье представлены методологические подходы, которые используются для диагностического выделения возбудителя хламидиозов и накопления его биомассы в перевиваемой клеточной культуре McCoy с использованием L-цистеина-HCl и L-триптофана.

PECULIARITIES OF CNLAMYDIAE CULTIVATION ON THE CELL LINE McCoy WITH AMINOACID APPLICATION – It was described the methodological approaches, which were applicated for the diagnostic chlamydiae isolation and accumulation their biomass in cell culture McCoy using L-cystein-hydrochloride and L-tryptophan.

Ключові слова: клітинна лінія McCoy, хламіді , розчин L-цисте ну, розчин L-триптофану.

Ключевые слова: клеточная линия McCoy, хламидии, раствор L-цистеина-HCl, раствор L-триптофана.

Key words: cell culture McCoy, chlamydiae, solution of L- cystein-hydrochloride, solution of L-tryptophan.

ВСТУП Серед проблем, що виникли за останні роки перед медициною в Укра ні, актуальним визнане завдання організаці епідмоніторингу за збудниками, що циркулюють на території кра ни. Проблема хламідійних інфекцій визнається однією із пріоритетних в галузі охорони здоров'я. За поширеністю та спектром патології вона посідає провідне місце серед захворювань, що передаються статевим шляхом [1]. На фоні високо частоти виявлення хламідій, непатогномонічності хламідійно інфекці , схильності до персистентного існування в організмі, особливу значущість набувають діагностичні методи, спрямовані на встановлення етіологічного фактора захворювання, тісно пов'язані з виділенням патогенного агента та подальшим вивченням його біологічних властивостей. Тяжко переоцінити значення виділення чистих культур цього мікроорганізму [2, 3].

Неперевершеною перевагою культурального методу є виділення тільки живих форм мікроорганізму. Ця властивість вигідно відрізняє цей метод від будь-яких інших. Виділення збудника у перещеплюваних клітинних лініях є переважним методом вибору при встановленні етіологічного діагнозу при складних формах захворювання. Культуральний метод вважається оптимальним для контролю виліковності пацієнтів, оскільки молекулярні методи через свою високу чутливість можуть давати хибно позитивні результати. Крім того, цей метод є незамінним при дослідженнях біологічних властивостей мікроорганізму, що дозволяє створювати моделі взаємоді між клітиною та паразитом, що в свою чергу сприяє розкриттю механізмів персистенці інфекці , випробуванню нових протихламідійних препаратів.

Методологічні основи вивчення біологі хламідій базуються на здібності цих мікроорганізмів до облігатного внутрішньоклітинного паразитування, тому для первинного виділення лабораторних штамів хламідій використовують різноманітні лініперещеплюваних клітинних культур: McCoy – клітини синовіально оболонки людини, L 929 – трансформовані мишачі фібробласти, HeLa – клітини карциноми шийки матки, Hep-2 – клітини карциноми гортані людини та ін. Ці клітинні популяці не тільки чутливі до проникнення хламідій, але й дозволяють м активно розмножуватися [4].

За традиційною методикою виділення збудника у перещеплюваних клітинних культурах до збагаченого ембріональною телячою сироваткою та глюкозою ростового середовища 199 додають циклогексимід – інгібітор білкового синтезу еукаріотних клітин, який уповільнює метаболізм цих клітин і, таким шляхом, непрямо стимулює розмноження хламідій [5, 6]. Але навіть у невеликих дозах, циклогексимід спричиняє цитотоксичну дію на клітини моношару, яка виявляється у вакуолізаці цитоплазми клітин, наявності клітин з виростами цитоплазми та ін., що в свою чергу утруднює підрахунок отриманих результатів. Крім того, головним недоліком цього поживного середовища є низька концентрація L-цисте ну-HCl та L-триптофану-амінокислот, які є важливими та незамінними для хламідій, особливо у період х інтенсивного росту і розмноження. Важливо зауважити, що L-триптофан входить до складу головного білка зовнішньо мембрани хламідій, який завжди знаходиться на поверхні хламідій, відповідаючи за процес прикріплення хламідій до клітин та виконуючи функцію порина [7].

У лабораторі хламідіозів ДУ "Інститут дерматології та венерології АМН Укра ни" є наробітки щодо використання L-цисте ну-HCl у якості метаболіту, що покращує процес виділення збудника хламідіозів у перещеплюваних клітинних лініях, завдяки активізаці та прискоренню метаболізму мікроорганізму [8].

Тому метою нашого дослідження було обрано підбір оптимальних концентрацій L-цисте ну-HCl, та L-цисте ну-HCl у поєднанні з L-триптофаном у поживному середовищі для поліпшення процесу діагностичного виділення та накопичення біомаси збудника у наступних пасажах на перещеплюваній клітинній лініMcCoy.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ У роботі використовували клітинну лінію McCoy, оскільки хламіді , які виділя-

ють з різних типів біологічного матеріалу, володіють тропізмом до цієї клітинно культури [3].

У якості біологічного матеріалу було використано синовіальну рідину хворого Д., який знаходився на стаціонарному лікуванні у ДУ "Інститут дерматології та венерології АМН Украни" з приводу хвороби Рейтера та тест- штам C.trachomatis UGC, отриманий в лабораторії хламідіозів ДУ "Інститут дерматології та венерології АМН Украни", який попередньо пасивувався на перещеплюваній клітинній культурі McCoy. Культивування проводили за стандартною методикою: в стерильні плоскодонні пробірки діаметром 14 мм з накривними скельцями засівали по 1 мл клітинно суспензі ліні McCoy ($1x10^5$ клітин/мл) на ростовому середовищі 199 з 3 % вмістом ембріонально телячо сироватки, 5 % розчину глюкози, гентаміцину 100 мкг/мл та амфотерицину В 2,5 мкг/мл, після чого поміщали на 24 год у термостат при 35-37 ^{0}С для формування моношару. Після формування моношару, із пробірок з добовою клітинною культурою видаляли ростове середовище, розподіляли по 500 мкл біологічного матеріалу на кожну пробірку та центрифугували протягом години при 3000 об./хв (2400g) у центрифузі з горизонтальним ротором, інкубували у термостаті при 35-37 ^{0}С протягом 2 год. Після інкубаці у термостаті з пробірок видаляли збагачене ростове середовище та змінювали його на поживне.

Для експерименту пробірки з біологічним матеріалом було поділено на 3 групи:

– у першій контрольній групі поживне середовище складалося з середовища 199 – до 90 %, ЕТС – 5 %, розчину глюкози – 5 %, циклогексиміду – 1,0 мкг/мл, гентаміцину – 100 мкг/мл та амфотерицину В – 2,5 мкг/ мл;

– у другій дослідній групі пробірок після центрифугування до поживного середовища додатково додавали L-цисте н-HCl у концентраці 2,5 мг/л: який попередньо розчиняли у стерильному фізіологічному розчині ex tempore в асептичних умовах та додавали до поживного середовища.

– у третій дослідній групі пробірок після центрифугування до поживного середовища додатково додавали L-цисте н-HCl у концентраці 2,5 мг/л разом з L-триптофаном у кількості 20 мг/л, розчинені попередньо у фізіологічному розчині ex tempore в асептичних умовах.

Усі групи пробірок інкубували в термостаті при 35-37 ^{0}С упродовж 48-72 год, після чого з пробірок видаляли накривні скельця, забарвлювали за методом ПІФ та Мая-Грюнвальда-Гімзи.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА Х ОБГОВОРЕННЯ Було проведено культивування синовіально рідини від хворого Д., який знаходився на стаціонарному лікуванні у ДУ "Інститут дерматології та венерології АМН Украни" з приводу хвороби Рейтера та тест-штаму C.trachomatisUGC. Біологічні зразки культивувались упродовж 3 пасажів на перещеплюваній клітинній культурі McCoy у стандартному поживному середовищі, стандартному середовищі з додатковим внесенням 2,5 мг/л L-цисте ну-HCl та стандартному середовищі з додатковим внесенням 2,5 мг/л L-цисте ну-HCl та 20 мг/л L-триптофану. Дані проведених досліджень наведено у таблицях 1, 2.

Як видно з таблиці 1, кількість клітин, які мали включення збудника, була максимальною – 86,2 % при культивуванні тест- штаму C.trachomatisUGC у поживному середовищі з L-цисте ном-HCl та L-триптофаном. При використанні поживного середовища з додатковим внесенням L-цисте ну-HCl, кількість клітин моношару, що містили морфологічні структури збудника, склала 68,4 %. У випадку застосування стандар-

Таблиця 1. Накопичення біомаси збудника при культивуванні еталонного штаму Ugc у стандартному поживному середовищі та середовищах з амінокислотами

Тип поживного середовища	Кількість інфікованих збудником клітин (підрахунок на 500 клітин)	n_{cp}	%	P
Стандартне	n_1=185 n_2=168 n_3=172	175±11	35,0	P<0,001
Стандартне з L-цистеном-HCl	n_1=362 n_2=348 n_3=315	342±24	68,4	P<0,05
Стандартне з L-цистеном-HCl та L-триптофаном	n_1=438 n_2=425 n_3=432	431±10	86,2	

Таблиця 2. Накопичення біомаси збудника при культивуванні синовіально рідини у стандартному поживному середовищі та середовищах з амінокислотами упродовж 3 пасажів

Тип поживного середовища	Кількість інфікованих збудником клітин (підрахунок на 500 клітин)	n_{cp}	%	P
Стандартне	n_1=158 n_2=167 n_3=161	162±8	32,4	P<0,001
Стандартне з L-цистеном-HCl	n_1=324 n_2=302 n_3=308	311±8	62,2	P<0,02
Стандартне з L-цистеном-HCl та L-триптофаном	n_1=402 n_2=378 n_3=387	389±17	77,8	

тного поживного середовища кількість інфікованих збудником клітин дорівнювала 35,0 %.

Дані з таблиці 2 показують, що застосування L-цисте ну-HCl у поєднанні з L-триптофаном для культивування збудника, виділеного з синовіально рідини, також виявилося досить ефективним прийомом: кількість клітин, що містили морфологічні структури збудника, становила 77,8 %. Кількість клітин, які мали включення збудника при стандартному культивуванні, дорівнювала 32,4 %, при культивуванні з L-цисте ном-HCl – 62,2 %.

Таким чином, встановлено, що додаткове внесення цих амінокислот до поживного середовища, має позитивний ефект не тільки на процес підтримання у перещеплюваній культурі клітин виділеного штаму, а й на первинне діагностичне виділення збудника, з біологічного матеріалу. Кількість клітин, що мали включення збудника, виросло у 2,5 раза для тест-штаму C.trachomatis UGC, та у 2,4 раза для синовіально рідини.

Внесення циклогексиміду до поживного середовища, в якому проводиться діагностичне виділення збудника, є загальноприйнятим прийомом, але ця речовина виявляє досить токсичну дію на моношар клітин, що виявляється у дегенеративних змінах у клітинах. Оскільки стан клітин моношару, у якому проводиться діагностичне виділення збудника, має вирішальне значення, ми постійно проводимо дослідження, направлені на пом'якшення цитотоксичного впливу циклогексиміду на моношар клітин. У процесі проведення експерименту був відзначений позитивний вплив застосування L-цисте ну-HCl та L-триптофану на стан клітинно культури. Кількість клітин, які мали дегенеративні зміни, викликані циклогексимідом, зменшилась з 78,6 % до 59 %. Дані цього спостереження наведено у таблиці 3.

Таблиця 3. Зниження цитотоксично ді циклогексиміду при наявності у поживному середовищі L-цисте ну-HCl та L-триптофану

Тип поживного середовища	Кількість інфікованих збудником клітин (підрахунок на 500 клітин)	$n_{ср}$	%	P
Стандартне	n_1=370 n_2=412 n_3=397	393±29	78,5	P<0,05
Стандартне з L-цистеном-HCl та L-триптофаном	n_1=280 n_2=294 n_3=310	295±15	59,0	

ВИСНОВКИ Таким чином, найбільш оптимальним прийомом для виділення збудника та накопичення його біомаси виявилось застосування поживного середовища з вмістом 2,5 мг/л L-цисте ну-HCl у поєднанні з L-триптофаном у концентраці 20 мг/л. Кількість клітин, що містили морфологічні структури збудника, становила 86,2 % до тест - штаму C.trachomatis UGC, що у 2,5 раза більше, ніж при стандартному культивуванні. Кількість клітин, що містили включення збудника, для синовіально рідини становила 77,8 %, що у 2,4 раза більше, ніж при стандартному культивуванні.

Внесення L-цисте ну-HCl у концентраці 2,5 мг/л до поживного середовища упродовж 3 пасажів збільшило кількість клітин, що мали включення збудника до 68,4 % для тест - штаму C.trachomatis UGC та до 62,2 % для синовіально рідини.

Застосування запропонованого нами прийому (L-цисте ну-HCl разом з L-триптофаном) дозволило знизити кількість клітин, що мали дегенеративні зміни, зумовлені застосуванням циклогексиміду, з 78,6 % до 59 %. Поліпшений стан клітинно культури в свою чергу сприяє кращому розвитку збудника та спрощує процес підрахунку клітин, які містять морфологічні структури збудника.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мавров И.И. Актуальные медико-социальные проблемы хламидийной инфекции // Дерматология и венерология. – 2001. – №1 (11). – С. 37-41.

2. Сельнікова О.П., Поліщук О.І., Колтукова Н.В. Музей патогенних для людини мікроорганізмів: Принципи формування та перспективи розвитку// Методи одержання чистих культур мікроорганізмів та х довгострокового зберігання в колекціях. Роботи співробітників Музею патогенних для людини мікроорганізмів. – К. – 2000. – Вип. 1. – С. 4-17.

3. Black C.M. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections // Clin. microbiol. Rev. – 1997. – Vol.10. – №1. – P. 160-184.

4. Herbrink P., Zuyderwijn-Zwinkels M., Wagenwoort J. Comparison of different culture media for isolation of Chlamydia trachomatis by cell culture on HeLa cells // Eur.J.Clin. Microbiol Infect Dis. – 1991. – № 10. – P. 655-659.

5. Кутова В.В., Джораєва С.К. Досвід виділення хламідій у культурі клітин //Дерматологія та венерологія. – 2004. – №2 (24). – С. 81-84.

6. Шаткин А.А., Бескина С.Р., Мартынова В.Р. Усовершенствование метода культивирования гальпровий (хламидий) в культуре клеток // Журн.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1981. – №1. – С. 24-28.

7. Мавров Г.І. Хламідійні інфекці : біологія збудників, патогенез, клініка, діагностика, лікування та профілактика – К., 2005. – 524 с.

8. Кутовая В.В. Некоторые особенности использования L-цистеина для стимуляции размножения хламидий в культуре клеток // Журн. дерматологии. и венерологи. – 2000. – №1(11). – С. 33-35.

Отримано 26.08.10