

**В. О. Іваниця¹, Т. В. Гудзенко¹, Т. О. Філіпова¹, Б. М. Галкін¹,
Т. В. Іваниця¹, О. Г. Горшкова¹, Н. Чанішвілі²**

¹ Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 68 79 64,
e-mail: tgl@inbox.ru

² Інститут бактеріофагії, мікробіології і вірусології імені Г. Еліави,
Тбілісі, Грузія

ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАКТЕРІОФАГА *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN VITRO НА МОДЕЛІ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЛЮДИНИ НЕР-2

Використання культури клітин Нер-2 у логарифмічній і стаціонарній фазі росту для попередньої скринінгової оцінки безпеки застосування активного фага Clostridium perfringens у медичній практиці дозволило встановити слабо виражену цитотоксичну дію препарату в концентрації 10⁶ фагових часток у одному мілілітрі, що реєструвалася через 24 год експозиції.

Ключові слова: бактеріофаг, Clostridium perfringens, культура клітин Нер-2, цитотоксичні властивості.

Харчове отруєння, викликане *Clostridium perfringens*, — у всіх країнах світу одне з найпоширеніших захворювань. В останні роки значно підвищився інтерес до використання бактеріофагів для лікування бактеріальних інфекцій. Це пов'язано, насамперед, з ростом резистентності збудників хвороб людини і тварин до антибактеріальних препаратів [1, 3, 4].

У 30 — 40 роках ХХ сторіччя цей ефективний і недорогий підхід успішно використовувався не тільки для лікування, але і для запобігання поширення багатьох інфекцій. За свою історію бактеріофаги пережили і великий інтерес до них в епоху їхнього зародження і практично повне забуття в 60 — 80-ті роки. В останні 5 років інтерес до них відродився [2, 5, 6, 10 — 14].

Для зменшення ризику шлунково-кишкових захворювань людини, що викликають *Clostridium perfringens* з придбаною стійкістю до лікарських засобів, в Інституті бактеріофагії, мікробіології і вірусології АН Грузії був створений препарат специфічного бактеріофага, що містить 10⁷ бляшкоутворювальних одиниць (БУО) в 1 мл. У даний час проводиться комплексна оцінка біологічних властивостей нового препарату in vitro і in vivo [9, 13].

Метою роботи було вивчення цитотоксичних властивостей бактеріофага *Clostridium perfringens* на моделі перещеплюваної культури клітин людини Нер-2 у логарифмічній і стаціонарній фазах росту.

© В. О. Іваниця, Т. В. Гудзенко, Т. О. Філіпова, Б. М. Галкін, Т. В. Іваниця,
О. Г. Горшкова, Н. Чанішвілі, 2008



Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був препарат бактеріофага *Clostridium perfringens* у концентрації 10^5 та 10^6 БУО/мл. Як експериментальну модель для вивчення біологічної активності вказаного препарату використовували перещеплювану культуру клітин карциноми гортані людини Нер-2. Оцінку цитотоксичного впливу бактеріофага на культуру клітин у логарифмічній фазі росту здійснювали по показниках: ступінь атракції кліток до поверхні носія, швидкість формування моношару клітин, величина мітотичної активності.

Вплив бактеріофага на культуру клітин у стаціонарній фазі росту оцінювали по показниках — морфологічні зміни і виживання клітин, ступінь дегенерації моношару [5, 7, 8]. При культивуванні як ростове використовували середовище 199, яке містить 10 % сироватки великої рогатої худоби. Посівна доза $30 - 50 \times 10^3$ клітин/мл ростового середовища. Температура культивування 37°C . У логарифмічній фазі росту, тобто через 24 години культивування, проводили контамінацію клітин бактеріофагом: додавали по 0,1 мл препарату у пеніциліновий флакон з 0,9 мл суспензії клітин. Облік результатів проводили через 24, 48, 72 год.

Для оцінки впливу бактеріофага на культуру клітин у стаціонарній фазі росту контамінацію перещеплюваної культури клітин здійснювали через 72 год культивування, тобто після закінчення формування моношару. Облік результатів проводили через 24, 48, 72 год експозиції шляхом візуальної оцінки морфологічних змін клітин та цілісності моношару. Ступінь дегенерації моношару клітин оцінювали за 4-плюсовою системою. Через 72 год здійснювали підрахунок кількості життєздатних клітин у моношарі. Для цього знімали клітини механічною дією з поверхні скла, забарвлювали трепановим синім у концентрації 0,01 %. Нежиттєздатні клітини при цьому забарвлювалися дифузно в синій колір, життєздатні залишалися не забарвленими. Підраховували забарвлені клітини у камері Горяєва.

Для вивчення впливу досліджуваного препарату на мітотичну активність клітин, культивування проводили на скельцях у флаконах. Отримані на скельцях препарати фіксували у фіксаторі Карнуа з подальшим забарвленням барвником Романовського-Гімза.

Експериментальні дослідження проводили у п'ятикратному повторі. Математичне опрацювання отриманих результатів здійснювали з використанням програми MS Excel. Вірогідність різниці показників оцінювали стандартними статистичними методами з використанням t -критерію Ст'юдента.

Результати та їх обговорення

У результаті досліджень встановлено незначну цитотоксичну дію бактеріофага в концентрації 10^6 БУО/мл, що виявляється в зниженні на 17 % атракції клітин до поверхні скла (рис. 1).

У дозі препарату 10^6 БУО/мл відзначалося пригнічення на 10 % формування моношару клітин Нер-2 (рис. 2). Причиною пригнічення формування моношару було зниження рівня мітотичної активності культури Нер-2 (рис. 3).

Бактеріофаг у концентрації 10^5 БУО/мл не призводив до негативного впливу на культуру клітин у логарифмічній фазі росту. У стаціонарній фазі росту культури клітин Нер-2, контамінованої бактеріофагом *C. perfringens* у концентрації 10^6 БУО/мл, морфологічні зміни окремих клітин виявлялися в зменшенні розмірів, появі клітин веретеновидної форми з дрібнокрапельною вакуолізацією цитоплазми.



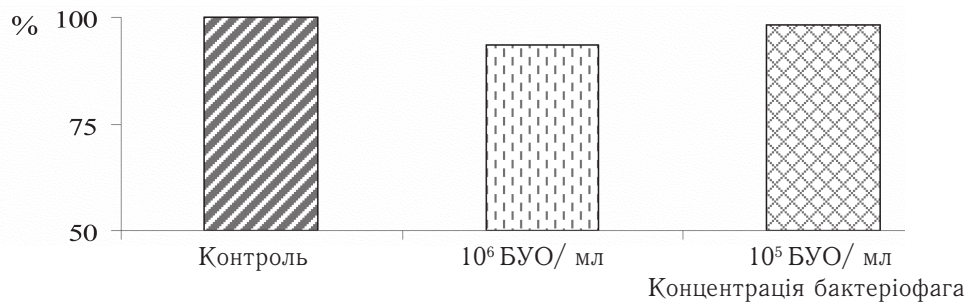


Рис. 1. Вплив бактеріофага *C. perfringens* на ступінь атракції клітин Нер-2 до поверхні скла. Експозиція 24 год

* — різниця вірогідна у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$)

Fig. 1. *C. perfringens* bacteriophage effect on Hep-2 cell attraction on glass surface. Exposition for 24 hours

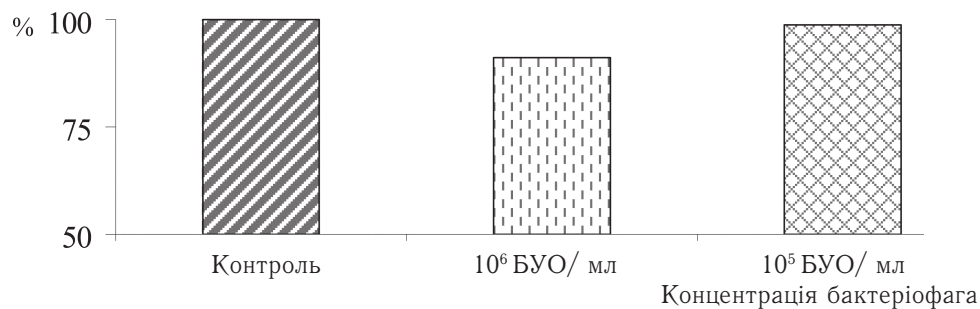


Рис. 2. Вплив бактеріофага *C. perfringens* на формування моношару культури клітин Нер-2. Експозиція 72 год

* — різниця вірогідна у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$)

Fig. 2. *C. perfringens* bacteriophage effect on Hep-2 cell monolayer formation. Exposition for 72 hours

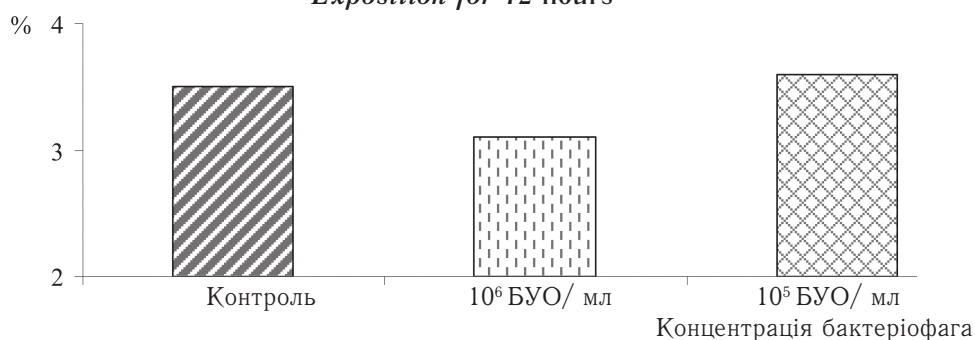


Рис. 3. Вплив бактеріофага *C. perfringens* на мітотичну активність культури клітин Нер-2. Експозиція 48 год

* — різниця вірогідна у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$)

Fig. 3. *C. perfringens* bacteriophage effect on Hep-2 cell culture mitotic activity. Exposition for 48 hours



Через 72 год. реєструвалися деструктивні зміни моношару. При цьому кількість нежиттєздатних клітин у моношарі не перевищувала контрольного рівня (рис. 4).

Це свідчить про те, що деструкція моношару пов'язана не з прямою цитотоксичною дією фагового препарату, а опосередкована порушенням атракції клітин до носія.

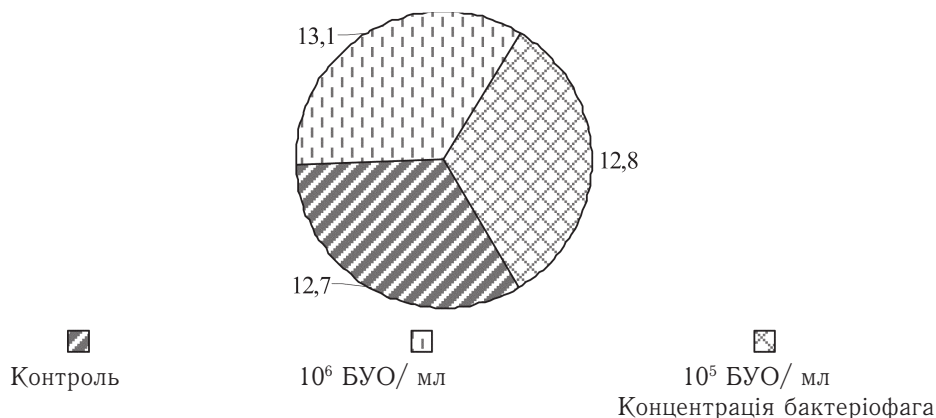


Рис. 4. Вплив бактеріофага *C. perfringens* на кількість нежиттєздатних клітин у моношарі Нер-2. Експозиція 72 год

Fig. 4. *C. perfringens* bacteriophage effect on the quality of inviable cells in Hep-2 monolayer. Exposition for 72 hours

Препарат, що містив 10^5 БУО/мл, не призводив до морфологічних змін, збільшення числа нежиттєздатних клітин і деструкції моношару, у порівнянні з контролем.

Таким чином, у результаті проведених досліджень була встановлена незначна цитотоксична дія препарату в концентрації 10^6 БУО/мл, що реєструвалося через 24 год експозиції. Показана можливість використання популяції клітин Нер-2 для попередньої скринінгової оцінки безпеки застосування активних фагів у медичній практиці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Асланов Б. И. Проблемы фаготерапии гнойных инфекций в стационаре для пациентов с хроническими остеомиелитами // Проблемы теории и практики укрепления общественного и индивидуального здоровья в современных условиях. Сборник научных трудов СПбГМА имени И. И. Мечникова. — Санкт-Петербург: Здоровье, 1999. — С. 104.
2. Асланов Б. И., Гончаров А. Е. Перспективы использования псевдомонадных бактериофагов для диагностики и терапии внутрибольничной инфекции // Актуальные проблемы санитарно-эпидемиологического благополучия населения Северо-Западного региона. Материалы науч.-практ. конф., посвященной организации Центра Госсанэпиднадзора в Санкт-Петербурге. — Санкт-Петербург: Здоровье, 2000. — С. 263 — 264.
3. Бельмер С. В., Гасилина Т. В. Рациональная терапия дисбактериоза у детей // Клиническая медицина. — 1998. — 76., № 10. — С. 35 — 38.
4. Голиков С. Н., Рысс Е. С., Фишзон-Рысс Ю. И. Рациональная фармакотерапия гастроэнтерологических заболеваний. — С.-Пб.: Питер, 1993. — 57 с.
5. Голубев Д. Б. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. — Л.: Медицина, 1976. — 184с.



6. Григорьев П. Я., Яковенко Э. П. Диагностика и лечение болезней органов пищеварения. - С.-Пб.: Питер, 1997. — С. 298 — 320.
7. Гудзенко Т. В., Кожанова Г. А., Синенко Г. И. Методические указания по определению патогенных / инвазивных и цитотоксических / свойств бактерий, выделенных из водной среды, на модели культуры клеток. Для студентов биологического факультета специальности микробиология. — Одесса: ОГУ, 1988.-22 с.
8. Елизарова О. Н., Рязанова Р. А. Клеточные культуры как биологическая модель в токсикологических исследованиях. — М.: Всес. НИИ мед. и мед.-техн. информации, 1982. — 60 с.
9. Иваниця В. О., Гудзенко Т. В., Філіпова Т. О., Галкін Б. М., Чанішвілі Н., Бабуташвілі Т., Іваниця Т. В., Горшкова О. Г. Вплив препарату бактеріофага *Clostridium perfringens* на функціональний стан макрофагів // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — 2, №1. — С. 23 — 28.
10. Линник С. А., Асланов Б. И., Ли В. И. Профилактика гнойно-септических инфекций в травматологическом стационаре // Медико-биологические и эколого-гигиенические проблемы оценки и прогнозирования воздействия факторов окружающей среды. Тезисы докладов на Всероссийской науч.-практ. конф. — Санкт — Петербург: Питер, 1998. — С. 195.
11. Яфаев Р. Х., Зуева Л. П., Любимова А. В., Асланов Б. И., Околов И. Н. Перспективы использования бактериофагов с лечебной и профилактической целью // В кн.: Инфекционный контроль в лечебно-профилактических учреждениях. — Санкт-Петербург: Питер, 1998. — С. 55 — 58.
12. Яфаев Р. Х., Асланов Б. И., Зуева Л. П. Эпидемиологическая оценка перспектив использования лечебных синегнойных бактериофагов // Современные технологии диагностики и терапии инфекционных болезней. Материалы Всероссийской научной конференции. — Санкт-Петербург: Питер, 1999. — С. 357 — 358.
13. Ivanytsya V., Philippova T., Gudzenko T., Galkin B., Rusakova M., Stepanova T., Ivanytsya T., Chanishvili N., Burbutashvili T. Anti-inflammatory and cytotoxic properties of *Clostridium perfringens* bacteriophage // Тези доповіді науково-практичної конференції „Пошук та розробка нових профілактичних і лікувальних протимікробних засобів, антисептиків, дезінфектантів та пробіотиків. — 2006. — Харьков: ХМИ, 2006. — С. 15.
14. Elizabeth Kutter. Phage therapy: Bacteriophages as antibiotics. Evergreen State College, Olympia, WA 98505 — Nov. 15. — 1997. — 42 p.

Робота виконана за підтримки гранту INTAS Ref. Nr. 03-51-5563.

**В. А. Иваниця ¹, Т. В. Гудзенко ¹, Т. О. Филиппова ¹, Б. Н. Галкин ¹,
Т. В. Иваниця ¹, Е. Г. Горшкова ¹, Н. Чанишвили ².**

¹ Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 687964, tgl@inbox.ru

² Институт бактериофагии, микробиологии и вирусологии, Тбилиси, Грузия

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГА *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN VITRO НА МОДЕЛИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НЕР-2

Реферат

Показана возможность использования перевиваемой культуры клеток человека Нер-2 для предварительной скрининговой оценки безопасности применения активного фага *Clostridium perfringens* в медицинской практике. In vitro установлено слабо выраженное цитотоксическое действие бактериофага *Clostridium perfringens* в концентрации 10⁶ ф. ч. / мл на перевиваемую культуру клеток Нер-2 в стационарной и логарифмической фазе роста.

К л ю ч е в ы е с л о в а : бактериофаг, *Clostridium perfringens*, культура клеток Нер-2, цитотоксические свойства.



**V. O. Ivanytsya¹, T. V. Gudzenko¹, T. O. Filippova¹, B. M. Galkin¹,
T. V. Ivanytsya¹, E. G. Gorshkova¹, N. Chanishvili².**

¹ Odesa Mechnykov National University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082,
Ukraine, tel.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: tg1@inbox.ru

² Eliava Institute of bacteriophages, Microbiology and Virology, Tbilisi, Georgia

**ESTIMATION OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*
BACTERIOPHAGE CYTOTOXIC PROPERTIES IN VITRO ON THE
HUMAN CELLS HEP-2 PASSAGED CULTURE MODEL**

Summary

The passaged culture of human cells Hep-2 can be used for the initial screening of safe use of *Clostridium perfringens* active phage in medicine. Low-expressed cytotoxicity effect of *Clostridium perfringens* bacteriophage in concentration of 10^6 php/ml on Hep-2 passaged cell culture on both stationary and logarithmic growth phase has been determined in vitro.

Key words: bacteriophage, *Clostridium perfringens*, Hep-2 cell culture, cytotoxicity.

