

УДК: 579.882 +57.082.542

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ
ЦИТОПАТОГЕННОСТІ БІОЛОГІЧНОГО
МАТЕРІАЛУ НА КЛІТИННІ ЛІНІЇ McCoу TA
L929**

**Мавров І.І., Кондакова Г.К., Джорасва С.К.,
Гончаренко В.В., Кутова В.В.**

**ДУ „Інститут дерматології та венерології АМН
України”, м. Харків.**

Культивування хламідій у культурі клітин є широко розповсюдженим “золотим стандартом”, який використовується для демонстрації інфекції, спричиненої різними видами хламідій, збереження життєздатності та інфекційності штамів. Культуральний метод має ряд суттєвих переваг перед іншими методами лабораторної діагностики, в першу чергу до них відносяться: можливість виділення живих форм мікроорганізму з подальшим вивченням його біологічних та морфофункціональних властивостей, сприяння розкриттю механізмів взаємодії між клітиною-хазяїном та збудником [1-2].

У теперішній час у лабораторіях світу найбільш часто використовуються наступні клітинні лінії: McCoу - клітини синовіальної оболонки людини [3], L 929 - трансформовані мишачі фібробласти [4], HeLa – клітини карциноми шийки матки [5], Нер-2 - клітини карциноми гортані людини, [6] та ін. Ці клітинні популяції не тільки чутливі до проникнення хламідій, але й дозволяють їм розмножуватися.

Виділення збудника на даних клітинних лініях, без особливих методологічних підходів, ускладнено, незалежно від ступеню чутливості клітин [1,7]. Важливе значення має концентрація вихідного біологічного матеріалу, оскільки його мала кількість недостатня для виявлення хламідій, а висока концентрація унеможливує підрахунок результатів, так як призводить до руйнування моношару унаслідок токсичної дії біологічного матеріалу на клітинні культури, у яких проводиться виділення збудника. У якості клінічного матеріалу для виділення збудника можуть бути використані зішкряби статевих органів та дихальних шляхів, синовіальна рідина, кардіоваскулярні зразки та ін. Інколи слабкі штами збудника первісно культивують у системі “in ovo” до досягнення ними достатньої вірулентності і потім продовжують пасивування у культуральній системі.

Метою нашого дослідження було підбір оптимальних концентрацій синовіальної рідини та інфікованих жовткових мішків курячих ембріонів, які вносяться для пасивування у культури клітин та порівняльне визначення ступеню чутливості цих клітинних ліній до даних типів біологічного матеріалу.

Об'єкт і методи дослідження

У роботі використовували клітинні лінії L929 та McCoу, оскільки хламідії, які виділяють з синовіальної рідини, володіють тропізмом до цих клітинних культур, а інфіковані жовткові мішки курячих ембріонів – це ідеальна модель для нарощування біомаси збудника для подальшого

використання у перещеплюваних клітинних лініях. У якості біологічного матеріалу були використані синовіальна рідина хворого В., який знаходився на стаціонарному лікуванні у ДУ “Інститут дерматології та венерології АМН України” з приводу хвороби Рейтера та жовтковий мішок курячого ембріона № 4831, які імовірно містять хламідії. Вивчення концентрацій біологічного матеріалу обумовлено його вираженою токсичною дією при внесенні на клітинні культури для виділення з них збудника хламідіозів. Культивування проводять за стандартною методикою: в стерильні плоскодонні пробірки діаметром 14 мм з накривними скельцями засівають по 1 мл клітинної суспензії ліній L 929 або McCoу (1×10^5 клітин/мл) на ростовому середовищі 199 з 3% вмістом ембріональної телячої сироватки, гентаміцину 100 мкг/мл та амфотеріцину В 2,5 мкг/мл, після чого поміщають на 24 години у термостат при 35-37⁰С для формування моношару. Після формування моношару, із пробірок з добою клітинною культурою видаляють ростове середовище, розподіляють біологічний матеріал у різних концентраціях (від 0 до 100%) по 500мкл на кожен пробірку та центрифугують протягом години при 3000 об/хв (2400g) у центрифугі з горизонтальним ротором, інкубують у термостаті при 35-37⁰С протягом 2 годин. Після цього середовище у пробірках змінюють на поживне середовище, яке складається з середовища 199 – до 90%, ЕТС- 5% , 40мМ розчин глюкози - 5%, циклогексимід (інгібітор білкового синтезу еукаріотних клітин) - 90-100 мкг/мл, гентаміцин - 100 мкг/мл та амфотеріцин В - 2,5 мкг/ мл та інкубують в термостаті при 35-37⁰С 48-72 години, після чого з пробірок видаляють накривні скельця, забарвлюють за методом Мая-Грюнвальда-Романовського[8].

Для визначення ED₅₀ у експерименті ми використовували метод Ріда та Менча, в основу якого покладено принцип кумуляції[9]. Цей принцип припускає, що інтервали між усіма дозами представляють однакову величину, кількість пробірок з культурою клітин, що заражалася однаковою дозою повинна становити не менш 6, дози внесення біологічного матеріалу повинні бути від 0 до 100%. Розведення синовіальної рідини та інфікованого жовткового мішка курячого ембріона проводилось на середовищі 199. Підрахунок проводять шляхом оцінки цитопатогених доз, які містяться у 500 мкл біологічного матеріалу. Доза, яка спричиняє 50% ефекту (ED₅₀), обрана у якості одиниці вимірювання. Розрахунок

$$\lg ED_{50} = \lg B + \frac{b-50}{b-a} d, (1)$$

проводився по формулі:

де В- доза, яка дає ефект >50%;

b – ефект дози В у відсотках;

А – доза, яка дає ефект <50%;

a – ефект дози А у відсотках;

d- інтервал між логарифмами сусідніх доз

Для порівняння чутливості двох клітинних ліній на внесення синовіальної рідини або інфікованих жовткових мішків курячих ембріонів ми визначаємо статистичну вірогідність за допомогою критерію t:

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}, (2)$$

Де $X_1 - X_2$ - різниця між величинами ED_{50} , які порівнюються;

m_1 та m_2 - середні похибки величин, які порівнюються

Очевидно, що для цього необхідно визначити m_1 та m_2 :

$$m = \frac{\delta}{\sqrt{n}}, (3)$$

де n - кількість спостережень

Значення стандартної похибки δ - величини, що характеризує варіабельність середньої, знаходимо за допомогою формули:

$$\delta = \pm \sqrt{\sum \frac{pq}{n} d^2}, (4)$$

Таблиця 1 Визначення ED_{50} при титруванні синовіальної рідини у культурі клітин McCoу та L929

Назва культури клітин	Розведення синовіальної рідини	Кількість пробірок з нормальними культурами (шт)	Кількість пробірок зі зруйнованими культурами (шт)	% культур з дегенерацією клітин	Кумулятивні дані		Співвідношення дегенеративних до загальної кількості заражених культур	% культур з дегенерацією
					Кількість пробірок з нормальними культурами (шт)	Кількість пробірок з дегенерацією клітин (шт)		
L929	10^2	0	10	100	0	21	21:21	100
	10^1	2	8	80	2	11	11:13	84,6
	10^0	8	2	20	10	3	3:13	23,1
	10^{-1}	9	1	10	19	1	1:10	5
	10^{-2}	10	0	0	29	0	0:29	0
McCoу	10^2	0	10	100	0	22	22:22	100
	10^1	3	7	70	3	17	17:20	85
	10^0	6	4	40	9	5	5:14	35,7
	10^{-1}	9	1	10	18	1	1:19	5,3
	10^{-2}	10	0	0	28	0	0:28	0

Як видно із таблиці 1, концентрація синовіальної рідини, яка дорівнювала 100%, спричиняла руйнування клітинного моношару у всіх пробірках. По мірі зменшення концентрації синовіальної рідини, яка вносилась до пробірок з культурою клітин, знижувалась кількість культур, які мали дегенеративні зміни.

На підставі отриманих даних за допомогою формули 1 визначаємо ED_{50} для культури клітин L929 при внесенні синовіальної рідини:

$$\lg ED 50 = \lg 10^1 + \frac{80 - 50}{80 - 20} (-1) = 0,5,$$

де δ - стандартна похибка ED_{50} ;

Σ - означає суму;

p - відношення кількості пробірок в яких відмічається дегенерація до кількості пробірок, які заражені цією дозою; $q=1-p$;

d - логарифм кратності розведення;

n - кількість пробірок з культурою клітин, які заражені однією дозою біологічного матеріалу.

Результати дослідження та їх обговорення

Було проведено титрування синовіальної рідини у перещеплюваних клітинних культурах McCoу та L929 з метою визначення ED_{50} .

що відповідає 3,2% розчину синовіальної рідини.

$$\lg ED 50 = \lg 10^1 + \frac{70 - 50}{70 - 40} (-1) = 0,33,$$

ED_{50} для лінії McCoу при внесенні синовіальної рідини становило:

що відповідає 2,1% розчину синовіальної рідини.

При порівнянні чутливості клітинних культур McCoу та L929 до внесення синовіальної рідини, нами були отримані дані, наведені у таблиці.2.

Таблиця 2. Порівняльний аналіз результатів дослідження на клітинних лініях McCoy та L929, отриманих у експерименті з синовіальною рідиною

Назва культури клітин	Розведення синовіаль-ної рідини	Кількість пробірок		P	q	Pq
		зі зруйнованими клітинами (шт)	з нормальними клітинами (шт)			
L929	10^2	10	0	10/10	0	0
	10^1	8	2	8/10	2/10	16/100
	10^0	2	8	2/10	8/10	16/100
	10^{-1}	1	9	1/10	9/10	9/100
	10^{-2}	0	10	0	10/10	0
McCoy	10^2	10	0	10/10	0	0
	10^1	7	3	7/10	3/10	21/100
	10^0	4	6	4/10	6/10	24/100
	10^{-1}	1	9	1/10	9/10	9/100
	10^{-2}	0	10	0	10/10	0

За допомогою даних таблиці та формул 2,3,4 визначаємо δ, m та n для культур клітин.

$$\delta(L929) = \pm \sqrt{\frac{16/100 + 16/100 + 9/100}{10}} \cdot 1^2 = \pm 0,21$$

$$m(L929) = \frac{0,21}{\sqrt{1}} = 0,21$$

$$\delta(McCoy) = \pm \sqrt{\frac{21/100 + 23/100 + 9/100}{10}} \cdot 1^2 = \pm 0,23$$

$$m(McCoy) = \frac{0,23}{\sqrt{1}} = 0,23$$

$$n = n_1 + n_2 - 2 = 50 + 50 - 2 = 98$$

$$t = \frac{0,5 - 0,3}{\sqrt{0,21^2 + 0,23^2}} = 0,54$$

З таблиці Фішера та Йетса для рівня значимості дослідження (p) 0,05 знаходимо t_1 , яке дорівнює 1,960. Оскільки $t < t_1$, то розходження, яке спостерігається між величинами, не виходить за межі похибки дослідження та є статистично невірогідним (таблиця.2).

Аналогічні дослідження були проведені для визначення концентрації інфікованого жовткового мішка, який вносився до перещеплюваної клітинної лінії з метою подальшого пасивування.

Таблиця 3 Визначення ED₅₀ при титруванні інфікованих жовткових мішків курячих ембріонів у культурі клітин McCoу та L929.

Назва культури клітин	Розведення жовткових мішків	Кількість пробірок з нормальними культурами (шт)	Кількість пробірок зі зруйнованими культурами (шт)	% культур з дегенерацією клітин	Кумулятивні дані		Співвідношення дегенеративних до загальної кількості заражених культур	% культур з дегенерацією
					Кількість пробірок з нормальними культурами (шт)	Кількість пробірок з дегенерацією клітин (шт)		
L929	10 ²	0	10	100	0	22	22:22	100
	10 ¹	2	8	80	2	12	12:14	85,7
	10 ⁰	7	3	30	9	4	4:13	30,8
	10 ⁻¹	9	1	10	16	1	1:17	5,9
	10 ⁻²	10	0	0	26	0	0:26	0
McCoу	10 ²	0	10	100	0	20	20:20	100
	10 ¹	3	7	70	3	10	10:13	76,9
	10 ⁰	8	2	20	11	3	3:14	21,4
	10 ⁻¹	9	1	10	20	1	1:21	4,8
	10 ⁻²	10	0	0	30	0	0:30	0

На підставі отриманих даних та за допомогою формули 1 визначаємо ED₅₀ для культури клітин L929 при внесенні інфікованих жовткових мішків:

$$\lg ED_{50} = \lg 10^1 + \frac{80 - 50}{80 - 30} (-1) = 0,4,$$

що відповідає 2,5% розчину жовткового мішка курячого ембріона.

$$\lg ED_{50} = \lg 10^1 + \frac{70 - 50}{70 - 20} (-1) = 0,6,$$

Визначаємо ED₅₀ для клітин лінії McCoу :

що відповідає 4% розчину.

Таким чином, при титруванні інфікованого жовткового мішка у культурі клітин L929 ED₅₀ дорівнювала 2,5% розчину, та 4% для клітинної лінії McCoу відповідно. Порівняємо чутливість цих клітинних культур до внесення інфікованого жовткового мішка.

Таблиця 4. Порівняльний аналіз результатів дослідження на клітинних лініях McCoу та L929, отриманих у експерименті з інфікованим жовтковим мішком курячого ембріона

Назва культури клітин	Розведення синовіальної рідини	Кількість пробірок		P	q	Pq
		зі зруйнованими клітинами	з нормальними клітинами			
L929	10 ²	10	0	10/10	0	0
	10 ¹	8	2	8/10	2/10	16/100
	10 ⁰	3	7	3/10	7/10	21/100
	10 ⁻¹	1	9	1/10	9/10	9/100
	10 ⁻²	0	10	0	10/10	0
McCoу	10 ²	10	0	10/10	0	0
	10 ¹	7	3	7/10	3/10	21/100
	10 ⁰	2	8	2/10	8/10	16/100
	10 ⁻¹	1	9	1/10	9/10	9/100
	10 ⁻²	0	10	0/10	10/10	0

За допомогою даних таблиці та формул 2-4

$$\delta(McCoy) = \pm \sqrt{\frac{21/100 + 16/100 + 9/100}{10}} 1^2 = \pm 0,21$$

$$m(McCoy) = \frac{0,21}{\sqrt{1}} = 0,21$$

$$\delta(L929) = \pm \sqrt{\frac{21/100 + 16/100 + 9/100}{10}} 1^2 = \pm 0,21$$

$$m(L929) = \frac{0,21}{\sqrt{1}} = 0,21$$

$$n = n_1 + n_2 - 2 = 98$$

$$t = \frac{0,6 - 0,4}{\sqrt{0,21^2 + 0,21^2}} = 0,67$$

З таблиці Фішера та Йетса для рівня значимості дослідження (p) 0,05 знаходимо t_1 : $t_1=1,960$. Оскільки $t < t_1$, то можна зробити висновок, що розходження, яке спостерігається між величинами, не виходить за межі похибки дослідження та є статистично невіргодним.

Висновки

1. Експериментально доведено, що чутливість до внесення синовіальної рідини та жовткових мішків курячих ембріонів є однаковою для клітинних ліній McCoу та L929, тому можливо використання обох клітинних культур для діагностичного виділення хламідій з цих видів біологічного матеріалу.

2. У результаті дослідження була розрахована необхідна концентрація біологічного матеріалу для виділення хламідій на перещеплюваних клітинних лінях: для клітинної лінії L929 концентрація синовіальної рідини склала 3,2%, інфікованого жовткового мішка курячого ембріона – 2,5%, для культури клітин McCoу - 2,1% і 4%, відповідно.

3. Використання експериментально розрахованих концентрацій біологічного матеріалу дозволило проводити діагностичне виділення хламідій у оптимальному режимі: з одного боку синовіальна рідина та жовткові мішки курячих ембріонів у цих концентраціях не спричиняють вираженої цитотоксичної дії на клітинні культури, а з другого – цієї кількості біологічного матеріалу, який імовірно може містити хламідії, достатньо для визначення наявності збудника

УДК: 579.882 +57.082.542
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ
ЦИТОПАТОГЕННОСТІ БІОЛОГІЧНОГО
МАТЕРІАЛУ НА КЛІТИННІ ЛІНІЇ McCoу ТА
L929

визначаємо δ, m та n для культур клітин.

Мавров І.І., Кондакова Г.К., Джораєва С.К., Гончаренко В.В., Кутова В.В.

Описується визначення цитопатогенності біологічного матеріалу на культури клітин McCoу та L929. Наведено результати культуральних досліджень по порівнянню чутливості клітинних ліній McCoу та L929 до внесення синовіальної рідини та інфікованого жовткового мішка. Отримані дані свідчать про необхідність продовжувати культуральні дослідження, направлені на підбір оптимальних умов виділення збудника з різних видів біологічного матеріалу.

Ключові слова: культура клітин McCoу, культура клітин L929, культивування, синовіальна рідина, інфікований жовтковий мішок

УДК: 579.882 +57.082.542

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ
ЦИТОПАТОГЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО
МАТЕРИАЛА НА КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ McCoу И
L929

Мавров И.И., Кондакова А.К., Джораева С.К., Гончаренко В.В., Кутова В.В.

Описывается определение цитопатогенности биологического материала на клеточные культуры McCoу и L929. Приведены результаты культуральных исследований по сравнению чувствительности клеточных линий McCoу и L929 к внесению синовиальной жидкости и инфицированного желточного мешка. Полученные данные свидетельствуют о необходимости продолжать культуральные исследования, направленные на подбор оптимальных условий выделения возбудителя из разных видов биологического материала.

Ключевые слова: культура клеток McCoу, культура клеток L929, культивирование, синовиальная жидкость, инфицированный желточный мешок.

EXPERIMENTAL STUDY OF BIOLOGICAL
MATERIAL CYTOPATHOGENIC FOR CELL
CULTURE McCoу AND L 929

Mavrov I.I., Kondakova A.K., Dzhoraeva S.K., Goncharenko V.V., Kutova V.V.

It was described the biological material cytopathogenic determination for cell culture McCoу and L 929. The sensitiveness cell culture McCoу and L 929 is compared with inoculation of joint juice and infected yolk sac in the received results. The necessary subsequent cultural study for optimal inoculation conditions of the agent from the biological material is confirmed by the data.

Key words: the cell culture McCoу and L 929, the cultivation, the joint juice, infected yolk sac.

Література

1. Виділення, ідентифікація та умови довгострокового зберігання Chlamydia trachomatis та Chlamydoiphila

- пневмоніає: Метод.рек./ Уклад.:І.І.Мавров та ін.-К.: Знання України, 2007.- 24с.- Бібліограф.: с. 22-23.
2. Black C.M. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections // Clin. microbiol. Rev. – 1997. – Vol. 10.-№1. – P. 160–184
 3. Smith T.F., Broun S.D., Weed L.A. Diagnosis of Chlamydia trachomatis infection by cell culture and serology // Lab.Met.-1982.-№ 13.-P.92-100
 4. Beatty W.L., Morrison R.P., Byrne G.I. Reactivation of persistent Chlamydia trachomatis infection in cell culture // Infect. and Immun.-1995.- № 1.-P. 199-205.
 5. 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.
 6. Apfalter P., Loidl M., Nadrshal R., Makristathis A., Rolter M., Bergmann M., Polteraner P. Isolation and continuous growth of Chlamydia pneumoniae from arterectomy specimens. // Eur.J.Clin. Microbiol Infect Dis.-2000.-№ 19.-P.305-308.
 7. Мавров І.І. Половые болезни. – Х.: Факт, 2002. – 800 с.
 8. Кутова В.В., Джораєва С.К. Досвід виділення хламідій у культурі клітин // Дерматологія та венерологія.-2004.-№2 (24).-С.81-84.
 9. Анджапаридзе О.Г. Культура ткани в вирусологических исследованиях.-М.: Гос.изд.мед.лит.-1962.-С.195-213.
-