

© Коротких О. О., Калініченко С. В.

УДК 615.277.3:576.3:579.262

Коротких О. О., Калініченко С. В.

ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* IN VITRO

Державна установа «Інститут мікробіології та імунології

ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (м. Харків)

kalinichenko_sv@ukr.net

Дана робота є фрагментом науково-дослідної роботи лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «ІМІ НАМН» «Біологічні основи розробки синбіотичних комплексів за умов застосування електромагнітних й ультразвукових хвиль», № державної реєстрації 0113U001517.

Вступ. На сьогодні вже встановлена провідна роль мікробіоти організму людини в збереженні її здоров'я [10-12]. Пробиотичні препарати розглядаються найбільш перспективними засобами проти антибіотикорезистентних субпопуляцій патогенних бактерій, оскільки вони проявляють зовсім інший механізм впливу на життєдіяльність патогенів [5,8]. Пробиотики широко застосовують для етіотропного лікування та відновлення мікрофлори при запальних інфекційних процесах в кишковому та уrogenітальному трактах [2,6].

Одним з основних критеріїв, які зараз пред'являються для оцінки пробиотиків та пробиотичних властивостей продуктів функціонального харчування є визначення їх токсичності (сумісне засідання експертної ради Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН (FAO) та Всесвітньої організації охорони здоров'я (WHO), що проходила в м. Кордоба (Аргентина) 1-4 жовтня 2001 р.). Вивчення токсичного впливу будь-якого лікарського препарату для подальшого застосування людиною проводиться з застосуванням лабораторних тварин.

Ще у 1885 році німецький дослідник Roux започаткував застосування культур клітин у біологічних дослідженнях, а з середини ХХ століття почався інтенсивний розвиток технологій, пов'язаних з культурами клітин, завдяки чому було отримано першу перещеплювальну клітинну культуру з карциноми шийки матки – клітинна лінія HeLa.

На цей час перещеплювальні культури клітин, або клітинні лінії, широко використовуються в біології, медицині, біотехнології завдяки відносній простоті і стандартних умов культивування, а також

стабільної морфології клітин. В останні роки клітинні культури привертають увагу як модель доклінічного тестування лікарських засобів, біологічно активних речовин тощо, оскільки клітинні культури здатні специфічно реагувати на вплив біотичних чинників. Специфічність, як правило, проявляється у вигляді цитотоксичного ефекту, який оцінюють за ступенем морфологічних змін, порушень морфологічного апарату та проліферативних властивостей клітин [4].

Виходячи з вище зазначеного нами була поставлена наступна **мета**: за ступенем морфологічних змін оцінити можливість застосування клітинної культури для визначення цитотоксичної дії пробиотичних штамів.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом дослідження були субстратозалежні культури клітин ліній HeLa, Vero, Hep-2, які за морфологією є епітеліальними клітинами.

Для дослідів готували суспензію клітин з посівною концентрацією $0,5 \cdot 10^6$ /мл. Культури клітин культивували в середовищі DMEM/F-12 (Sigma, Германія) з додаванням 5% фетальної сироватки крові ембріонів корів, розчинів гентаміцину та ністатину в 80% етанолі з кінцевою концентрацією 50 од/мл, у герметичному культуральному посуді в умовах CO_2 -інкубатора при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, постійній вологості 95% та вмісту CO_2 5%. До середовища культивування додавали екзometаболіти *L. plantarum* в кількості 0,3 мл; 0,2 мл; 0,1 мл; 0,05 мл; 0,025 мл; 0,0125 мл; 0,00625 мл на 1,0 мл середовища, оскільки саме ці кількості не викликали зміни рН ростового середовища (титрування агента впливу). Як контролю використовували клітинні культури, які культивували в ростовому середовищі з додаванням відповідної кількості цукрового бульйону, що застосовувався для отримання екзometаболітів (контроль впливу бульйону), та культури клітин, які культивували в ростовому середовищі без додавання цукрового бульйону та екзometаболітів (контроль клітин).

Через 24 год. інкубування за ступенем розпластування, клітин визначали їх адгезивну здатність. Щоденно, протягом 3 діб, контролювали клітинні моношари на наявність/відсутність порушення цілісності моношару, появі осередків дегенерації, виникнення яких характеризує цитотоксичну дію агентів впливу. Ступень дегенерації клітинного моношару оцінювали за системою «чотирьох хрестів»: (4+) – деструкція всіх клітин (100%); (3+) – руйнування більшості клітин (75%); (2+) – деструкція половини клітин у моношарі (50%); (1+) – руйнування 25% клітин; (±) – руйнування окремих клітин; (–) – відсутність дегенерації клітин.

Для отримання екзометаболітів *L. plantarum* готували суспензію добової культури штаму з оптичною щільністю 1,0 McF [9]. До 45 мл поживного бульйону з додаванням 1% глюкози (цукровий бульйон) додавали 5,0 мл приготованої суспензії мікроорганізмів. Отриману суміш інкубували при (37±1)°C впродовж 72 год., після чого двократно центрифугували при 3000 об/хв. впродовж 30 хв. та відбирали супернатант, що містив екзометаболіти.

Статистична обробка даних здійснювалась у відповідності з правилами рядової і альтернативної варіаційної статистики, як викладено у посібниках [1,3,7]. Для вибірок оцінювалась відповідність емпіричних розподілів нормальному закону (розподілення Гауса) за критеріями Колмогорова-Смірнова, Шапіро-Уїлка та Ліллієфорса. Якщо розподіл досліджуваних вибірок відрізнявся від нормального, для обробки даних використовували непараметричні критерії: Манна-Уїтні, Краскала-Уолліса, Вілкоксона, критерій знаків. Достовірність розбіжностей нормально розподілених величин визначали за допомогою критерію *t* – Стюдента, з обчисленням середньої величини *M*, середньоквадратичного відхилення *S*, середньої похибки величини *m*, значення достовірності *p*. Для аналізу одержаного матеріалу проводилось його групування за атрибутивними та варіаційними ознаками [1,3,7]. У результаті зведення матеріалу при підрахунках одиниць спостережень були отримані абсолютні числа, які виражали описові і кількісні ознаки.

Результати досліджень та їх обговорення.
Першим етапом дослідження стало дослідження впливу цукрового бульйону на адгезивні властивості та наявність/відсутність порушення цілісності моношару клітинних культур ліній HeLa, Vero, Hep-2.

Встановлено, що додавання цукрового бульйону в кількості 0,3 мл; 0,2 мл; 0,1 мл; 0,05 мл; 0,025 мл; 0,0125 мл; 0,00625 мл на 1,0 мл ростового середовища не впливало на адгезивні властивості клітин ліній HeLa, Vero, Hep-2 та не викликало порушення цілісності їх моношару.

Наступним етапом стало вивчення дії екзометаболітів *L. plantarum* на культури клітин.

Порівняльний аналіз результатів показав, що після 24-х годинної експозиції ефективність прикріплення клітин HeLa, Vero, Hep-2 до субстрату достовірно не змінювалась. Через 48 та 72 год. інкубування всі контрольні культури клітин утворювали моношар без ознак дегенерації.

Щодо ступеню дегенерації клітинного моношару культур дослідних ліній, то найбільш стійкими до дії екзометаболітів лактобацил були клітини лінії Vero – тільки через 72 години інкубування в ростовому середовищі з додаванням зазначеного агенту впливу в кількості 0,3 мл на 1,0 мл середовища були відмічені поодинокі клітини з ознаками руйнування. Це може свідчити про нечутливість культури клітин до агенту впливу (табл.).

Клітини лінії HeLa проявляли помірну чутливість до дії екзометаболітів лактобацил. Так, через 48 годин інкубації у 25% клітин, що культивували в ростовому середовищі з додаванням агенту впливу в кількості 0,3 мл та 0,2 мл на 1,0 мл середовища, були відмічені деструктивні ознаки. Додавання до ростового середовища екзометаболітів *L. plantarum* в кількості 0,1 мл призводило, через 48 год. інкубування до руйнування поодиноких клітин цієї лінії. Через 72 год. інкубації деструкцію спостерігали у 50% клітин, що культивувались з додаванням екзометаболітів у кількості 0,3 мл; 0,2 мл і 0,1 мл на 1,0 мл ростового середовища та були відмічені поодинокі клітини з ознаками руйнування

Таблиця.

Ступень дегенерації клітинного моношару при культивуванні культури клітин в ростовому середовищі з додаванням екзометаболітів *L. plantarum*

Клітини лінії	Час спостереження, год.	Кількість екзометаболітів на 1,0 мл ростового середовища, мл						
		0,3	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625
HeLa	24	-	-	-	-	-	-	-
	48	+	+	±	-	-	-	-
	72	++	++	++	±	-	-	-
Vero	24	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-
	72	±	-	-	-	-	-	-
Hep-2	24	±	±	-	-	-	-	-
	48	+++	++	+	+	±	-	-
	72	++++	+++	++	++	+	±	-

при культивуванні клітин у ростовому середовищі з додаванням екзометаболітів в кількості 0,05 мл.

Самими чутливими до дії екзометаболітів *L. plantarum* виявились клітини лінії Нер-2. Так, поодинокі клітини з ознаками деструкції при культивуванні клітин у ростовому середовищі з додаванням екзометаболітів в кількості 0,3 мл і 0,2 мл були відмічені вже через 24 год. інкубації. Після 48-годинної інкубації ознаки деструкції виявляли 75% клітин, які інкубували з додаванням агенту впливу в кількості 0,3 мл; 50% клітин – в кількості 0,2 мл; 25% клітин – в кількості 0,1 мл і 0,05 мл. Навіть при додаванні екзометаболітів лактобацил в кількості 0,025 мл були відмічені поодинокі клітини з ознаками руйнування. Через 72 год. інкубування деструкцію спостерігали у 100% клітин, які інкубували з додаванням екзометаболітів *L. plantarum* в кількості 0,3 мл; 75% клітин – в кількості 0,2 мл; 50% клітин – в кількості 0,1 мл і 0,05 мл; 25% – в кількості 0,025 мл; та поодинокі – в кількості 0,0125 мл.

Узагальнюючи результати зазначимо, що оскільки основним місцем дії пробіотичних засобів є слизові оболонки організму людини, які, перш за все, висланні епітеліальними клітинами то, за морфологією відібрані до дослідів лінії перещеплювальних клітин також були епітеліальними, проте відрізнялись за походженням: аденокарцинома шийки матки людини (HeLa), нирка африканської зеленої мавпи (Vero) та аденокарцинома гортані людини (Нер-2). Експериментально визначено, що чутливими до дії екзометаболітів лактобацил виявились клітини лінії Нер-2 та HeLa. Встановлено дозозалежний цитоток-

сичний ефект впливу екзометаболітів лактобацил. Зазначене свідчить про можливість використовувати клітинні культури для доклінічного тестування пробіотичних засобів.

Висновки

1. Визначено, що взяті до дослідів клітинні лінії (HeLa, Vero, Нер-2) проявляють різну чутливість до дії екзометаболітів лактобацил.

2. Клітини лінії Vero проявляли чутливість тільки через 72 год. інкубування в ростовому середовищі з додаванням екзометаболітів *L. plantarum* в кількості 0,3 мл в кількості на 1,0 мл середовища.

3. Клітини лінії HeLa проявляли помірну чутливість – через 72 год. інкубації деструкцію спостерігали у 50% клітин, що культивувались з додаванням екзометаболітів у кількості 0,3 мл; 0,2 мл і 0,1 мл на 1,0 мл ростового середовища.

4. За умов низької концентрації екзометаболітів *L. plantarum* у ростовому середовищі (0,0125 мл і 0,025 мл) через 72 год. інкубації дегенерація клітинного моношару спостерігалась тільки у клітин культури Нер-2.

5. Отримані результати свідчать про можливість використання клітинних культур лінії Нер-2 для доклінічного тестування пробіотичних засобів.

Перспективи подальших досліджень

Експериментальні результати щодо застосування клітинних культур як можливої моделі для тестування пробіотичних засобів розкривають перспективність їх використання в біотехнологічних процесах при проведенні доклінічних випробувань замість досліджень на лабораторних тваринах.

Література

1. Боровиков В.П. Statistica. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows [Текст] / В.П. Боровиков, И.П. Боровиков. – М.: Филінь, 1998. – 592 с.
2. Войда Ю.В. Микроеккологія человека и роль пробиотических препаратов в терапии гнойно-воспалительных заболеваний в акушерстве и гинекологии [Текст] / Ю.В. Войда, Н.Л. Солонина // Annals of Mechnikov Institute. – 2012. – № 2. – С. 27-37. [Електронний ресурс] Режим доступу: http://archive.nbuv.gov.ua/e-journals/AMI/2012_2/12vyvmcr.pdf.
3. Гельман В.Я. Медицинская информатика: практикум [Текст] / В.Я. Гельман. – [2-е изд.]. – СПб.: Питер, 2002. – 480 с.
4. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 31. [Текст] [отв. ред. М.С. Богданова]. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2015. – 81 с.
5. Кордон Т.І. Принципи створення, механізм дії та клінічне застосування пробіотиків (Огляд) [Текст] / Т.І. Кордон // Аннали Мечниковського інституту. – 2014. – № 4. – С. 8-16. – Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/j-pdf/ami_2014_4_3.pdf.
6. Мокрозуб В.В. Ефективність застосування штамів лакто- та біфідобактерій з препаратами цитокінів при експериментальній стафілококовій інфекції [Текст]: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.07 / Мокрозуб Вікторія Вікторівна; Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України. – К., 2014. – 22 с.
7. Прикладная медицинская статистика [Текст] / [под ред. В.М. Зайцева, В.Г. Лифляндского]. – СПб.: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2000. – 299 с.
8. Сизенцов А.Н. Эффективность совместного применения пробиотиков и антибиотиков в условиях in vitro [Текст] / А.Н. Сизенцов, Р.В. Ильясова // Весник ОГУ. – 2011. – № 12 (131). – С. 355-357.
9. Стандартизація приготування мікробних суспензій [Текст]: Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006 К.: (Укрмедпатентінформ), 2006. – 10 с. – (Нормативний документ. МОЗ України; Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. Інформаційний лист).
10. Янковский Д.С. Микрофлора и здоровье человека [Текст] / Д.С. Янковский, Г.С. Дымент. – К.: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2008. – 552 с.
11. Gollwitzer E.S. Microbiota abnormalities in inflammatory airway diseases - Potential for therapy [Text] / E.S. Gollwitzer, B.J. Marsland // Pharmacol Ther. – 2014. – Jan. – № 141 (1). – P. 32-39.
12. Tojo R. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis [Text] / R. Tojo, A. Suárez, M.G. Clemente, C.G. de los Reyes-Gavilán, A. Margolles, M. Gueimonde, P. Ruas-Madiedo // World J. Gastroenterol. – 2014. – Nov. 7. – № 20 (41). – P. 15163-15176.

УДК 615.277.3:576.3:579.262

ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* IN VITRO

Коротких О. О., Калініченко С. В.

Резюме. У роботі наведено дані щодо вивчення цитотоксичної дії екзометаболітів *L. plantarum* за ступенем морфологічних змін клітинних культур HeLa, Vero, Hep-2. Визначено, що культури клітин лінії Vero були не чутливими до дії вказаного агенту. Чутливими до дії екзометаболітів лактобацилл виявились клітини ліній Hep-2 та HeLa. Експериментально встановлено дозозалежний цитотоксичний ефект впливу екзометаболітів: із зниженням їх концентрації в ростовому середовищі ступень дегенерації клітинного моношару знизювався. Так, через 72 години інкубації у 50% клітин лінії HeLa, що культивували в ростовому середовищі з додаванням агенту впливу в кількості 0,3 мл та 0,2 мл на 1,0 мл середовища, були відмічені деструктивні ознаки. Щодо клітин лінії Hep-2, то після 72-годинної інкубації ознаки деструкції були виявлені у 100% клітин, які інкубували з додаванням агенту впливу в кількості 0,3 мл; у 75% клітин – в кількості 0,2 мл; у 50% клітин – в кількості 0,1 мл і 0,05 мл; у 25% клітин – в кількості 0,025 мл та поодинокі – в кількості 0,0125 мл.

Ключові слова: *Lactobacillus*, культури клітин, пробіотики, цитотоксичний ефект.

УДК 615.277.3: 576.3: 579.262

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* IN VITRO

Коротких Е. О., Калиниченко С. В.

Резюме. В работе приведены данные по изучению цитотоксического действия экзозимов *L. plantarum* по степени морфологических изменений клеток культур HeLa, Vero, Hep-2. Определено, что культура клеток линии Vero была не чувствительна к действию указанного агента. Чувствительными к действию экзозимов лактобацилл оказались клетки линий Hep-2 и HeLa. Экспериментально установлен дозозависимый цитотоксический эффект воздействия экзозимов: со снижением их концентрации в ростовой среде степень дегенерации клеточного монослоя снижалась. Так, через 72 часа инкубации у 50% клеток линии HeLa, что культивировали в ростовой среде с добавлением агента влияния в количестве 0,3 мл и 0,2 мл на 1,0 мл среды, были отмечены деструктивные признаки. Что касается клеток линии Hep-2, то после 72-часовой инкубации признаки деструкции были обнаружены у 100% клеток, которые инкубировали с добавлением экзозимов в количестве 0,3 мл; у 75% клеток – в количестве 0,2 мл; у 50% клеток – в количестве 0,1 мл и 0,05 мл; у 25% клеток – в количестве 0,025 мл; и единичные – в количестве 0,0125 мл.

Ключевые слова: *Lactobacillus*, культуры клеток, пробиотики, цитотоксический эффект.

UDC 615.277.3: 576.3: 579.262

EVALUATION OF THE EXOMETABOLITES CYTOTOXIC EFFECT OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* IN VITRO

Korotkykh O. O., Kalinichenko S. V.

Abstract. An exceptionally important role of lactobacilli in the microorganisms is determined by the diversity of their functions. They are participating in the regulation of optimal levels in metabolic processes, creating a high colonization resistance of mucosal, inhibit adhesion, penetrate and propagate pathogenic and opportunistic microorganisms, have a broad spectrum antimicrobial mechanisms, produce biologically active substances. One of the main criteria, which are now presented for evaluation of probiotics and probiotic properties of the functional food is to determine their toxicity. In recent years, attention is attracted to the cell cultures as a model for preclinical testing of drugs, biologically active substances, etc. This is due to the fact that the cell cultures are capable to specifically respond to impact of biotic factors. Specificity is typically manifested as a cytotoxic effect which is evaluated by the degree of morphological changes, disorders of morphological apparatus and proliferative properties of cells.

Our next aim was staged proceeding from the above: evaluate the possibility of using cell culture to determine the cytotoxic effect of probiotic strains by the degree of morphological changes.

The study involved the culture substrate dependent cell lines HeLa, Vero, Hep-2, which morphologically is an epithelial cell. For the experiments was prepared suspension of cells with the inoculum concentration 0.5×10^6 / ml. Cultures of cells were cultured in DMEM / F12 (Sigma, Germany) supplemented with 5% fetal serum of cattle embryos, solutions gentamicin and nystatin in 80% ethanol to a final concentration of 50 U / ml, in a sealed culture dish in a CO₂ incubator with $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ and constant humidity of 95% and a CO₂ content of 5%. To the culture medium were added exometabolites *L. plantarum* in an amount of 0.3 ml 0.2 ml 0.1 ml 0.05 ml 0.025 ml ml 0.0125 0.00625 ml per 1.0 ml of medium, since it did not cause the amount of change pH of the growth medium (titration agent of influence).

A suspension of the daily strain culture with an optical density of 1.0 McF was prepared for exometabolites *L. plantarum*. 5.0 mL of microbial suspension was added to 45 ml of nutrient broth supplemented with 1% glucose (sugar broth). The resulting mixture was incubated at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ for 72 h. Then it was centrifuged twice at 3000 rev / min for 30 minutes and the supernatant was collected which contains exometabolites. As a result were obtained, while calculating the data, the absolute numbers, which express the descriptive and quantitative traits.

The data which studied the cytotoxic effect of *L. plantarum* exometabolites by degree of morphological changes HeLa cell cultures, Vero, Hep-2 are given in. The first stage of the study was to investigate the influence of sugar

broth on the adhesive properties and the presence / absence of compromising the integrity of the monolayer cell culture lines HeLa, Vero, Hep-2. The next step was to study the action of exometabolites *L. plantarum* in the cell culture. It was determined that the culture Vero cell line was not sensitive to the action of specified agent. Hep-2 cells and HeLa lines were sensitive to the action of lactobacilli exometabolites. Dose-dependent cytotoxic effect of exometabolites was established experimentally: the degree of degeneration of the cell monolayer is decreased with a reduction of their concentration in the growth medium. Thus, after 72 hours of incubation in 50% HeLa cell lines that are cultured in growth medium supplemented with an agent of influence in an amount of 0.3 ml and 0.2 ml per 1.0 ml of medium destructive signs were noted. As for the cell line Hep-2, after 72 hours of incubation, the signs of degradation were detected in 100% of the cells that were incubated with the addition of exometabolites at 0.3 ml; 75% of the cells – in an amount of 0.2 ml; 50% of the cells – in an amount of 0.1 ml and 0.05 ml; 25% of the cells – in an amount 0,025ml; and unit – in an amount of 0.0125 ml.

Experimental results on the use of cell cultures as a possible model for testing probiotic agents reveal prospects of their use in biotechnological processes during pre-clinical trials instead of research on laboratory animals.

Keywords: *Lactobacillus*, cell culture, probiotics, cytotoxic effect.

Рецензент – проф. Філімонова Н. І.

Стаття надійшла 07.03.2016 року