

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ им. ак. И.П.Павлова

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И
ИММУНОЛОГИИ

Санкт-Петербург, 1970896 ул. Л. Толстого 6/8,
Тел.7(812)238-7049; Факс: 7(812) 234-3146;

Отчет об исследовании активности медицинского препарата
WN - криомелт на модели хламидийной инфекции.

Санкт-Петербург
2001 г.

Введение

Проблема терапии хламидийной инфекции занимает важное место в гинекологии, урологии и венерологии. Особенно актуально в появлении и распространение штаммов хламидий устойчивых к антибиотикам. В настоящее время широко используется назначение больному одновременно двух антимикробных препаратов с различным механизмом действия. В основном это макролиды, фторхинолоны, тетрациклины и рифампицин, однако даже новейшие представители этих групп не всегда бывают эффективны. В связи с этим применяют высокие дозы лекарств, что ведет к тяжелому дисбактериозу и проявлению других побочных реакций: аллергии, изменения гематологических показателей, нарушения функции почек и печени, изменения психического статуса.

Все это указывает на актуальность проблемы терапии урогенитального хламидиоза. Для преодоления проблем, имеющих при лечении несомненно перспективным следует считать создание препаратов, повышающих эффективность антибиотикотерапии, снижающих устойчивость хламидий к препаратам, не обладающих токсичностью для человека и не вызывающих дисбактериоз.

Препарат WN Криомелт представляет собой водный раствор пчелиного меда, приготовленного в соответствии с технологией, защищенной патентом и включающей в себя «ноу-хау».

Предварительные исследования показали, что препарат обладает противовирусным действием при некоторых заболеваниях птиц (вирус саркомы Рауса и пр.), при инфицировании вирусом простого герпеса 1 типа в составе комплексной терапии с препаратом зовиракс (ацикловир).

В данном исследовании мы тестировали влияние данного препарата на хламидий и их чувствительность к антибиотикам в системе *in Vitro*.

Материалы и методы.

Препарат WN -криомелт медицинского назначения использован в соответствии с рекомендациями заказчика.

1 Тканевые культуры

В работе использована культура клеток L₉₂₉. полученная из банка клеточных культур института Цитологии РАН. Клетки размножили и образованный монослой снимали при помощи 0.02% раствора версена, после чего суспензию вносили в другой флакон, большей

емкости. Для роста клеток использовали среду DMEM/RPMI 1:1 с 10% эмбриональной сывороткой коров (FCS). Клетки помещали в термостат и инкубировали при 37°C до образования монослоя. После этого клетки снимали с матраса (см. выше), подсчитывали в камере Горяева и засевали на 96-луночные планшеты по 50 тыс. клеток в лунку либо во флакончики с покровным стеклом по 350 тыс. клеток.

2. Заражение культуры клеток и индикация хламидий.

В экспериментах была использована *Chlamydia trachomatis* серовар К и штамм, выделенный от больного из коллекции каф. микробиологии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Бактерии для исследования выращивали на культуре клеток. В последнюю вносили микробов в количестве 50 мкл, центрифугировали при 700g 45 мин., после чего инкубировали 2 часа для лучшей адгезии элементарных телец; затем производили смену среды с ростовой на поддерживающую (DMEM/RPMI 1:1 с 5%FCS).

Выявление хламидий осуществляли при помощи двух методов: классического культурального и его модификации, разработанной на нашей кафедре. Первый заключается в культивировании хламидий в клеточной культуре в течение 48-72 часов с последующей фиксацией клеток ацетоном, окраской моноклональными антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой, и подсчетом количества внутриклеточных включений.

Другой метод представляет собой принципиально новый способ учета количества пораженных хламидиями клеток. Он основан на избирательном влиянии хламидий на чувствительность клеток к индуцированному апоптозу. Благодаря этому эффекту возможен качественный и полуколичественный анализ хламидийной инфекции.

3. Противохламидийные препараты.

Для опыта использовали сухую форму рифампицина фирмы «Феррейн» по 150 мг во флаконе и разводили в дистиллированной воде. Так же был взят макропен (мидекамицин) в таблетках по 0.4г компании KRKA (Словения), растворенный, как и рифампицин. Исследования проводили согласно рекомендациям ВОЗ по исследованию активности химических соединений в отношении хламидий.

4. Определение токсичности препарата МН-криомелт для клеточной культуры.

При исследовании токсичности МН-криомелт для культуры клеток L₉₂₉ использовали разведения препарата 1/2, 1/4 и цельный. При тестировании на 96-луночных планшетах в лунку в разных разведениях был добавлен МН-криомелт по 25 мкл в поддерживающую среду (100 мкл). Препарат добавляли однократно и дважды (сразу и через час).

В качестве контроля использовали монослойные культуры, в которые вносили 100 мкл поддерживающей среды. Оценку токсичности проводили в течение 3 дней. Токсичность оценивали согласно «Методическим рекомендациям» от 1977 года.

Токсичность препарата по отношению к клеткам 1-929

Процент дегенерации клеток	Токсичность
100-76	+++++
75-51	+++
50-26	++
25-6	+
5-0	-

5 Постановка опыта по определению влияния МН-криомелта на репродукцию хламидий и их чувствительность к рифампицину.

Для изучения влияния МН-криомелта на репродукцию хламидий и их чувствительность к рифампицину использовали препарат без разведения в соответствии с рекомендациями

производителя. Исследование осуществлялось двумя методами, описанными выше. В первом варианте в опыт были взяты следующие пробы:

- 1) контроль клеточной культуры с поддерживающей средой 1 мл;
- 2) клеточная культура с препаратом в количестве 0,2 мл и поддерживающей средой 0,8 мл;
- 3) клетки с хламидиями по 0.5 мл материала и поддерживающей средой 0,8 мкл;
- 4) клетки с рифампицином по 10 мкл (10мкг/мл) или макропеном по 10 мкл (10 мкг/мл) и 0,8 среды;
- 5) клетки с хламидиями 0,5 мл и рифампицином 10 мкл или макропеном 10 мкл и 0,8мл среды;
- 6) клетки с хламидиями 0.5 мл, препаратом МН-криомелт 0,2 мл, и рифампицином 10 мкл или макропеном 10 мкл, средой-0,8мл.

На каждую пробу использовали минимум 5 флаконов. Репродукцию хламидий оценивали по количеству цитоплазматических включений хламидий (в процентах).

В случае использования второго метода в систему дополнительно вводили цитостатик 5-фторурацил 40 мкг/мл по 50 мкл в лунку, МН-криомелт в количестве 50 мкл на 200 мкл поддерживающей среды, рифампицин по 10 мкл (10 мкг/мл) или макропен по 10мкл (10 мкг/мл). Для каждой пробы повторов выполнено 8 повторов.

Результаты исследования.

Изучение токсичности препарата МН криомелт для клеточной культуры L₉₂₉

Разведение препарата	Количество проб опыте	Наличие ЦПД при однократном введении	Наличие ЦПД при дробном введении	% токсичности
1/1 (цельный)	24	0	0	0
¹ / ₂	24	0	0	0
¹ / ₄	24	0	0	0
Контроль культуры	24	0	0	0

Данные таблицы говорят о том, что препарат не обладает токсичностью для клеток L₉₂₉.

Определение токсичности рифампицина для культуры L₉₂₉.

Разведение препарата	Число проб	Цитопатическое действие	токсичность
100мкг/мл	8	4	++
50 мкг/мл	8	2	+
25 мкг/мл	8	1	+

10 мкг/мл	8	0	0
Контроль культуры	8	0	0

Результаты свидетельствуют, что минимальная токсическая концентрация рифампицина для L₉₂₉ соответствует 25 мкг/мл. Для нашего эксперимента мы взяли 10 мкг/мл рифампицина, чего обычно достаточно для проявления его бактериостатического действия.

Определение токсичности макропена для клеток L₉₂₉.

Разведение препарата	Число проб	Цитопатическое действие в пробах	Токсичность
100мкг/мл	8	1	+
85 мкг/мл	8	0	0
50 мкг/мл	8	0	0
25 мкг/мл	8	0	0
10 мкг/мл	8	0	0
Контроль культуры	8	0	0

Препарат слабо токсичен в концентрации 100 мкг/мл, поэтому использовали меньшую концентрацию, 10 мкг/мл.

Определение влияния препарата МН криомелт на репродукцию хламидий серовара К и штамм, выделенный от больного.

А) При помощи культурального метода с последующим подсчетом включений, окрашенных моноклиральными антителами, в люминесцентном микроскопе.

Влияния препарата МН криомелт на репродукцию хламидий серовара К и штамм, выделенного от больного.

Проба	Число проб	Количество клеток хламидийными включениями (штамм больного)	Количество клеток хламидийными включениями (Серовар К)
Инфицированные клетки	10	7-8%	8-10%
Инфицированные клетки с МН (однократное введение)	10	6%	7-9%
Инфицированные клетки с МН (двукратное введение)	10	6%	7%-9%

Вывод: препарат незначительно подавляет репродукцию хламидий в клеточной культуре L₉₂₉.

Б) При помощи модификации культурального метода. Количество инфицированных клеток определяли измерением оптической плотности (Е) исследуемых лунок в фотометре (ридере) "Star fax" при длине волны 540 нм и вычисляли по формуле:

$$(E \text{ опытной лунки} * 50000) / E \text{ контрольной лунки} = \text{количество инфицированных клеток (O)}$$

Влияние препарата МН-криомелт на репродукцию штамма хламидий серовара К, оцененного методом контроля апоптоза.

Составляющие пробы	Количество	Е	D
--------------------	------------	---	---

	повторов(N)		
Контроль культуры	16	0,630 (--0,050)	50000 (-3960)
Клетки, обработанные цитостатиком	16	0,250 (+- 0,050)	19850(-3960)
Клетки с цитостатиком и МН	16	0,250 (-0,050)	19850(-3960)
Клетки, инфицированные хламидиями без препаратов	16	0,400 (+-0,150)	31700(+11900)
Инфицированные клетки в присутствии цитостатика	16	0,600(+0,050)	47500(+3960)
Инфицированные клетки с цитостатиком и МН.(введенным однократно)	16	0,560(+0,050)	45500(+3960)
Инфицированные клетки с цитостатиком и МН.(двукратное добавление)	16	0,560(+0,050)	45500(+3960)

Влияние препарата МН-криомелт на репродукцию штамма, выделенного от больного, оцененного методом контроля апоптоза.

Составляющие пробы	Количество повторов(N)	E	D
Контроль культуры	16	0,630 (--0,050)	50000 (+-3960)
Клетки, обработанные цитостатиком	16	0,250 (+- 0,050)	19850(-3960)
Клетки с цитостатиком и МН	16	0,250 (-0,050)	19850(-3960)
Клетки, инфицированные хламидиями без препаратов	16	0,355 (+-0,150)	28174(+11900)
Инфицированные клетки в присутствии цитостатика	16	0,550(+0,050)	43650(+3960)
Инфицированные клетки с цитостатиком и МН.(введенным однократно)	16	0,500(+0,050)	39682(+3960)
Инфицированные клетки с цитостатиком и МН.(двукратное добавление)	16	0,500(+0,050)	39682(+3960)

Вывод: исследуемый препарат способен слабо подавлять репродукцию хламидий как при однократном так и при двукратном введении.

Определение влияния препарата МН на чувствительность хламидий к антибиотикам.

Исследование проводилось при помощи двух описанных выше способов.

1. Результаты культурального метода.

Влияние препарата МН на чувствительность к антибиотикам использованных вариантов хламидий

Описание пробы	Количество проб.	Количество клеток с хламидийными включениями	Количество клеток с хламидийными

		(штамм от больного)	включениями (серовар К)
Контроль культуры	10	0%	0%
Инфицированная хламидиями культура	10	7-9%	8-10%
Зараженная культура обработанная рифампицином	10	6-7%	7-8%
Зараженная культура, обработанная макропеном	10	6%	7-8%
Зараженная культура с макро-пеном и с МН-криомелт.(однократно)	10	3-4%	4-5%
Зараженная культура с макропеном и с МН-криомелт.(двукратно)	10	3- 4%	4-5%
Зараженная культура с рифампицином и с МН-криомелт (однократно)	10	3-4%	3-5%
Зараженная культура с рифампицином и с МН-криомелт (двукратно)	10	3-4%	3-5%

Вывод: препарат МН-криомелт способен повышать эффективность рифампицина в данном случае не менее чем в 2 раза.

2. Результаты исследования, выполненного методом, основанным на изменении хламидиями апоптотического статуса клетки-хозяина.

Влияние препарата МН-криомелт на чувствительность к антибиотикам хламидий серовара К.

Проба	Количество повторов	Экстинкция пробы	Количество выживших клеток
Контроль культуры	8	0,630 ($\pm 0,050$)	50000(± 3960)
Клетки, инфицированные хламидиями, обработанные цитостатиком	8	0,600 ($\pm 0,050$)	47600(± 4166)
Инфицированные клетки с цитостатиком и рифампицином	8	0,490 ($\pm 0,050$)	38900 (± 5102)
Инфицированные клетки с цитостатиком и макропеном	8	0,490 ($\pm 0,050$)	38900 (± 5102)
Инфицированные клетки с цитостатиком, макропеном и препаратом	8	0,320 ($\pm 0,050$)	25396 (± 4802)

МН.(однократно)			
Инфицированные клетки с цитостатиком, макропеном и препаратом МН.(двукратно)	8	0,320 ($\pm 0,050$)	25396 (± 4802)
Инфицированные клетки с цитостатиком, рифампицином и препаратом МН.(однократно)	8	0,250 ($\pm 0,020$)	19841 (± 2100)
Инфицированные клетки с цитостатиком, рифампицином и препаратом МН.(двукратно)	8	0,250 ($\pm 0,020$)	19841(± 2100)

Влияние препарата МН-криомелт на чувствительность к антибиотикам, хламидий выделенных от больного.

Проба	Количество повторов	E	D
Контроль культуры	8	0,630 ($\pm 0,050$)	50000(± 3960)
Клетки, инфицированные хламидиями, обработанные цитостатиком	8	0,550 ($\pm 0,050$)	43650(± 4166)
Инфицированные клетки с цитостатиком и рифампицином	8	0,450 ($\pm 0,050$)	35714 (± 5102)
Инфицированные клетки с цитостатиком и макропеном	8	0,400 ($\pm 0,050$)	31746(± 4936)
Инфицированные клетки с цитостатиком, макропеном и препаратом МН-криомелт.(однократно)	8	0,180 ($\pm 0,020$)	14285(± 3940)
Инфицированные клетки с цитостатиком, макропеном и препаратом МН-криомелт.(двукратно)	8	0,180(+ $-0,020$)	14285 (± 3940)
Инфицированные клетки с цитостатиком, рифампицином и препаратом МН-криомелт.(однократно)	8	0,200 ($\pm 0,020$)	15873 (± 1800)
Инфицированные клетки с цитостатиком, рифампицином и препаратом МН-криомелт (двукратно)	8	0,200 ($\pm 0,020$)	15873(± 1800)

Вывод: МН-криомелт повысил действие рифампицина на хламидии в 1,96 раза ($\pm 0,78$) при исследованиях на лабораторном штамме, и в 2,25 ($\pm 0,7$) раза при использовании штамма, выделенного от больного.

Заключение

1. Препарат МН - криомелт не обладает токсичностью для культуры клеток L₉₂₉.

2. Препарат МН-криомелт оказывает незначительное подавляющее действие на репродукцию хламидии, как в течение 24 часов (при использовании метода, основанного на изменении апоптотического статуса клетки), так и в течение 72 часов - на протяжении всего жизненного цикла хламидии (в ходе использования культурального метода).

3. Добавление данного препарата к рифампицину или макропену приводит к повышению эффективности антибиотика практически в 2 раза. Последнее следует считать важным свойством препарата, поскольку может позволить преодолеть некоторые случаи резистентности микроба к антибиотику, снизив при этом его дозировку. Отсутствие токсичности делает препарат привлекательным для использования в урологии, гинекологии, офтальмологии, ревматологии и, особенно, акушерстве.

Зав.кафедрой микробиологии
Профессор, академик РАЕН

В.В.Тец