

strains isolated from various sources, which allows us to recommend them for the development of a complex polyvalent phage preparation against salmonellosis.

УДК 579.871.9:615.281.9:616-07:616-08

ПОЛУЧЕНИЕ ТОНКОДИСПЕРСНОЙ СУСПЕНЗИИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК – ПУТЬ К ПРОМЫШЛЕННОМУ ПРОИЗВОДСТВУ МИКОБАКТЕРИОФАГОВ КАК ЛЕЧЕБНЫХ СРЕДСТВ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЁЗА

*Болдырев А.Н., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
boldyrev@vector.nsc.ru*

*Туманов Ю.В., доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
тел. 8 (383) 363-47-51, tumanov@vector.nsc.ru*

ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Ключевые слова: *бактериофаги, микобактериофаг D29, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium tuberculosis, МЛУ-туберкулёз, ШЛУ-туберкулёз, детергенты*

Статья посвящена разработке метода получения тонкодисперсной культуры клеток Mycobacterium smegmatis, не патогенной для человека и животных. Используя культуру клеток M. smegmatis в таком виде, удалось осуществить культивирование литического микобактериофага D29, одновременно вирулентного и для патогенной микобактерии Mycobacterium tuberculosis, без потерь культуры. В статье сообщается подобранный состав ростовой питательной среды для культивирования M. smegmatis, компоненты для приготовления которой имеются в любой бактериологической и молекулярно-биологической лаборатории. Разработанная схема получения фаголизата литического микобактериофага D29 является прототипом для промышленного получения других литических микобактериофагов, поскольку условия для культивирования клеток микобактерий и микобактериофагов соответствуют национальным требованиям обеспечения биологической безопасности персонала при работе с этими объектами. Таким образом, микобактериофаги могут быть наработаны в необходимых количествах и в виде фаголизата, и в виде суспензии фага и использованы для лечения.

Введение. Исследования по получению тонкодисперсной суспензии культуры клеток (КК) *M. smegmatis* были выполнены в 2005–2007 гг. в ГНЦ ВБ «Вектор» и направлены на разработку технологического регламента для промышленного производства литических микобактериофагов. Иммунобиологические препараты, включающие микобактериофаг(и), должны быть доступны государственным учреждениям различного профиля: медицинским, ветеринарным, научно-исследовательским для осуществления исследований, нацеленных на борьбу с туберкулёзом.

Около трети населения планеты инфицировано преимущественно микобактериями вида *M. tuberculosis*. В 2011 г. из 8,7 млн чел., заболевших туберкулёзом во всём мире, 1 млн 131 тыс. выявлены как ВИЧ-инфицированные; смертность в 2011 г. составила 1,4 млн чел., включая 990 тыс. ВИЧ-отрицательных и 430 тыс. ВИЧ-положительных.

В России инфицированность превышает 80 %. Она входит в число 22 неблагоприятных по туберкулёзу стран и находится на 18-м месте (заболеваемость в 2011 г. составила 73 случая на 100000 населения против 645 в Южной Африке, занимающей 1-е место) [1]. По

данным ВОЗ, число больных туберкулёзом на конец года в 2007 г. (именно в это время были проведены наши исследования!) составило 164 тыс. чел., а в 2011 г. – 159479 чел. и болезненность составила (159479/1428,36000) 112 чел.

ВИЧ-инфекция в России становится отягощающим фактором для активизации туберкулёзной инфекции. Несмотря на снижение доли ВИЧ-инфицированных больных туберкулёзом до 5,8 % (9300/159479) к концу 2011 г. [1], смертность ВИЧ-позитивных пациентов в ~ 70 % случаев связана именно с заболеванием туберкулёзом.

С появлением лекарственно устойчивых (ЛУ) штаммов *M. tuberculosis* усложнились подходы к лечению заболевания: традиционные режимы проведения противотуберкулёзной терапии (ПТТ) оказались уже непригодными, поскольку препараты, к которым была выявлена у пациента устойчивость, должны были исключаться. В 2011 г. число обращений по поводу лечения МЛУ-туберкулёза (устойчивость одновременно как минимум к изониазиду и рифампицину – двум ключевым препаратам в ПТТ) составило 18902 случая. В случаях заболевания туберкулёзом с широкой лекарственной устойчивостью, т. н. ШЛУ-туберкулёзом (устойчивость практически ко всем известным ПТП второй линии), антибиотико- и химиотерапия оказываются бессильными. Причина стремительного распространения ЛУ-штаммов обусловлена отсутствием контроля за применением антибиотиков и химиопрепаратов в ходе лечения туберкулёза и других заболеваний. Лечение таких пациентов требует введения в практику новых препаратов. К ним можно отнести и микобактериофаги.

Бактериофаги успешно применяются при лечении кишечных заболеваний (дизентерийный, протейный, сальмонеллёзный, клебсиелловый, бактериофаг коли), раневых инфекций (протейный, интести-бактериофаг, пиобактериофаг, бактериофаг коли). Микобактериофаги – вирусы, повреждающие микобактерии рода *Mycobacterium*.

Используя микобактериофаги можно проводить лечение туберкулёза как отдельно микобактериофагами, так и комбинированно в сочетании с антибиотиками и химиопрепаратами, которые в настоящее время используются в фтизиатрии, и теми новыми препаратами, которые оказывают бактерицидное действие на *M. tuberculosis* и *M. bovis* проходят доклинические испытания. Поэтому актуальны проекты, связанные с поиском новых бактериофагов вообще и микобактериофагов в частности, и внедрением последних в практику лечения туберкулёза.

Материалы и методы исследований. Для исследований использовали литический микобактериофаг D29 (США) и культуру клеток вида *M. smegmatis* (НИИ туберкулёза, г. Новосибирск).

Агар, дрожжевой экстракт, лауроилсаркозинат натрия (SLS), 30 % р-р, Sigma (США); твин 80 (T80), Applichem и триптон, ICN (Германия). Ампициллин (А) (50 мкг/мл) и амфотерицин В (Ар) (5 мкг/мл); глюкоза (Glc), 40 % р-р; кальция хлорид (CaCl₂), 10 % р-р для инъекций, – фармакопейные (Россия); натрия хлорид (NaCl), калия гидрофосфат (K₂HPO₄) (Россия). Приготовление среды 2 × УТМус (2 ×) в (г/л): дрожжевой экстракт – 10, триптон – 30, NaCl – 10, K₂HPO₄ – 5. Автоклавируют. Приготовление питательной среды УТМус41: для 40 мл среды УТМус41 смешивают 4 мл Glc, 0,4 мл 0,1 М CaCl₂, 20 мл 2 × и 15,6 мл стерильной дистиллированной воды. Вносили антибиотики (А и Ар) и детергенты (T80, SLS). В этом случае среду обозначали, например как УТМус41/А/Ар и УТМус41/А/Ар//0,25T80/0,01SLS – добавление А, Ар, T80, SLS (конечные концентрации указаны в названии среды цифрой в объёмных процентах с сокращённым названием детергента). Приготовление среды УТМус/НА и УТМус/ВА: на 1 л среды брали навески, вполовину меньшие, для приготовления среды 2 ×, и 15 г агара (нижний агар, НА) или 8 г агара (верхний агар, ВА), дистиллированной воды до 1 л. Автоклавируют.

Газон бактерий в НА. На чашку вносят 0,5 мл Glc, 0,1 мл 0,1 М CaCl₂, по 50 мкл А и Ар (5 мкг/мл), чашку прогревают при 37 °С 10 мин, вносят 1 мл нагретой до 37 °С суспензии

клеток микобактерий, и добавляют 8,3 мл охлажденной до 50 °С среды УТМус/НА, используя мерную пробирку на 10 мл, тщательно перемешивают. Газон бактерий в ВА. На чашку вносят 0,5 мл Glc и по 50 мкл А и Ар, чашку прогревают при 37 °С 10 мин, добавляют 9,4 мл охлажденной до 50 °С среды УТМус/НА. После отверждения чашку с НА помещают в термостат на 37 °С на 10 мин.

0,3 мл суспензии клеток, 30 мкл 0,1 М CaCl₂ вносят в пробирку, инкубируют при 37 °С 5 мин, добавляют охлажденную до 50 °С среду УТМус/ВА до 3 мл, перемешивают на вортексе и выливают на поверхность чашки с НА.

Засев *M. smegmatis* из единичной колонии (или со скошенного агара) с 0,5 % Т80. В пробирку на 20 мл вносят 0,5 мл Glc, 50 мкл 0,1 М CaCl₂, 25 мкл А (50 мкг/мл), 2,5 мл среды 2 ×, 1,8 мл стерильной дистиллированной воды и 0,125 мл 20 % водного р-ра Т80, затем небольшое количество клеток *M. smegmatis* на микробиологической петле с чашки, содержащей единичные колонии, или из пенфлакона с КК *M. smegmatis* на скошенном агаре. Инкубируют при 37 °С при скорости вращения 200 об./мин в течение 2–4 сут.

Культивирование *M. smegmatis* с 0,25 % Т80 и 0,01–0,05 % SLS. Пробирку для засева готовят так же, как приведено выше, с добавлением 62,5 мкл 20 % р-ра Т80 и 10–50 мкл 5 % р-ра SLS. Инкубируют 5–6 сут.

Культивирование *M. smegmatis* в присутствии 0,01 % SLS и без детергентов. Пересев культуры, выращенной в присутствии 0,25–0,5 % Т80 и 0,01 % SLS, в свежую питательную среду УТМус41/А/(Ар) или УТМус41/А/(Ар)/0,01SLS проводят 1:50, через 2-е суток культивирования пересев повторяют.

Титрование КК *M. smegmatis* до отдельных колоний. Разведения готовят на среде УТМус41//0,03SLS. На каждую чашку (Ø 90 мм) наносят 0,5 мл Glc, по 50 мкл А и Ар, прогревают при 37 °С 5 мин, добавляют 9,4 мл охлажденной 50 °С среды УТМус/НА, перемешивают. Высевают по 100 мкл каждого разведения культуры на каждую чашку, растирая шпателем.

Использование КК *M. smegmatis* для титрования микобактериофага. На дно пробирки на 10 мл вносят 0,3 мл охлажденной до 0 °С суспензии КК, выращенных в отсутствие детергентов (1-й или 2-й пересев) в течение 2 сут, добавляют 0,1 мл разведения суспензии микобактериофага, инкубируют при 37 °С 60 мин, переносят пробирки с инфицированной культурой в стерильное место, добавляют 30 мкл 0,1 М CaCl₂ и до 3,0 мл охлажденной до 50 °С среды УТМус/ВА, быстро перемешивают на вортексе 2–3 раза с остановками и выливают на поверхность с твердой агаризованной средой УТМус/НА в чашке Петри, предварительно изъятая из термостата (37 °С). Чашки с ВА ставят на ровную поверхность, выставленную по уровню. После затвердевания чашки переносят в термостат на 37 °С, перевернув вверх дном.

Результаты исследований и их обсуждение. Патогенные микобактерии вызывают социально опасные заболевания – туберкулёз, лепру; условно патогенные – микобактериозы, у животных – туберкулёз (возбудитель *Mycobacterium bovis*). Культивирование микобактерий в жидкой среде осложняется тем, что поверхностный слой клеточной стенки содержит миколовые кислоты (C_{78–95}), которые имеют гидрофобный характер (рис. 1) [3]. Две углеводородные цепи располагаются параллельно (см. рис. 1). Гидрофильность мембраны определяется незначительным количеством гликолипидов и свободных белков наружного слоя. Отсюда высокая адгезия микобактерий к стеклянным и металлическим поверхностям. Вторая причина – способность к ветвлению. Результат – агрегация клеток. Поэтому промышленное культивирование микобактерий в жидкой среде до сих пор отсутствует.

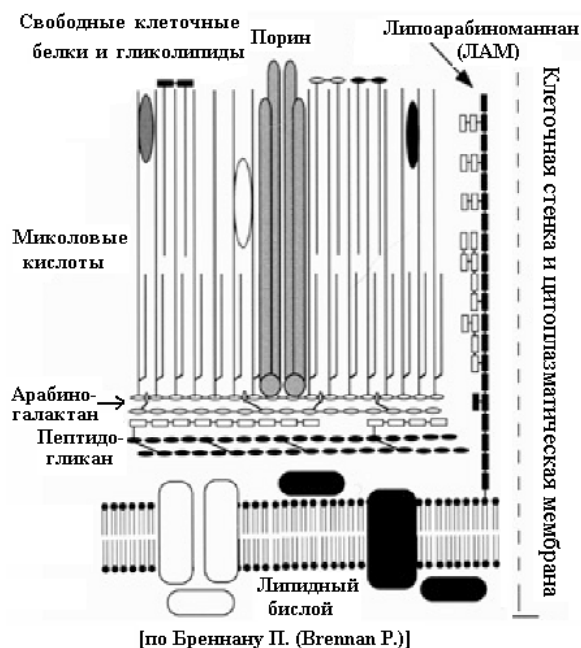


Рис. 1 - Общее строение клеточной стенки грамположительных бактерий, содержащих в поверхностном слое миколовые кислоты

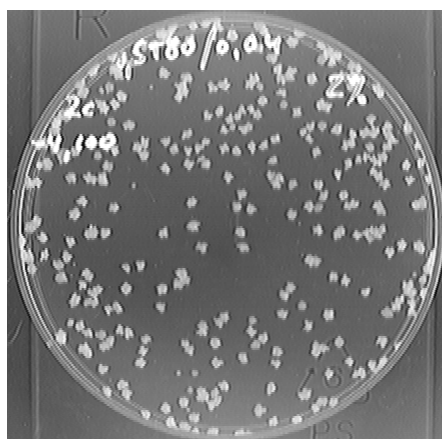


Рис. 2 - Культивирование на среде УТМус21/0,5Т80/0,04SLS микобактерий *M. smegmatis* 45 ч и высев 100 мкл 4-го разведения (10-кратные) (фото со стороны дна чашки Петри)

Первый этап исследования – анализ работ предшественников [4–6] и выбор среды. При культивировании *M. smegmatis* увеличена концентрация Т80 до 1 %. Результат – образование тонкодисперсной КК микобактерий в диапазоне 0,25–1 %. Добавление SLS (0,01–0,03 %) обеспечивает рост КК *M. smegmatis* в виде эмульсии с высокой седиментационной и агрегативной устойчивостью и получению при расसेве единичных колоний (см. рис. 2). Полученная КК нечувствительна к микобактериофагу при прямом инфицировании. Последующее культивирование без детергентов (1–2 пересева) ведёт к восстановлению чувствительности к микобактериофагу. При внесении SLS в концентрации свыше 0,03 % до 0,05 % наблюдается значительное снижение скорости роста культуры.

Заключение. Проведённые культуральные исследования показали, что промышлен-

ное культивирование микобактериофагов возможно в жидкой среде (не только на твёрдой) и является наиболее эффективным и безопасным способом для их накопления.

Библиографический список

1. Global tuberculosis report 2012, www.who.int/tb/publications/global_report/en/, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf
2. Jacobs-Sera D. et al. On the nature of mycobacteriophage diversity and host preference // *Virology*, v. 434, 2012, p. 187–201.
3. Takayama K. et al. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis* // *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 18, 2005, p. 81–101.
4. Dubos R.J., Davis B.D. Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media // *J. Exp. Med.*, v. 83, 1946, p. 409–423.
5. Sarkis G.J., Hatfull G.F. // *Meth. Mol. Biol.*, v. 101, 1998, p. 145–173. – Totowa: Hum. Press
6. McNerney R. // *Meth. Mol. Medicine*, v. 54, 2001, p. 145–154. – Totowa: Hum. Press.

**AN OBTAINING FINE-DISPERSED SUSPENSION OF CELL CULTURE –
A WAY TO INDUSTRIAL PRODUCTION OF MYCOBACTERIOPHAGES
AS THERAPEUTIC AGENTS AGAINST TUBERCULOSIS**

Boldyrev A.N., Tumanov Yu.V.

Key words: *bacteriophages, mycobacteriophage D29, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium tuberculosis, MDR tuberculosis, XDR tuberculosis, detergents*

The article is devoted to the development of the method of obtaining fine-dispersed Mycobacterium smegmatis cells culture. This mycobacterial species is not pathogenic for humans and animals. Using M. smegmatis cell culture in such form, the cultivation of lytic mycobacteriophage D29 which is virulent simultaneously for Mycobacterium tuberculosis along with M. smegmatis became possible. The selected composition of nutrient medium for cultivation of M. smegmatis is also reported in this article. Components for its preparation are available in any bacteriological and molecular-biological laboratory. The developed scheme of obtaining lytic mycobacteriophage D29 phage lysate is the prototype for the industrial production of other lytic mycobacteriophages since the conditions for culturing mycobacteria and mycobacteriophages comply with national requirements for biological safety of personnel when working with these objects. Thus, mycobacteriophages may be amassed in necessary quantities both in the form of phage lysate and in the form of the purified phage suspension then be used for phage therapy.