

ISTRAŽIVANJE „IN – VITRO“ CHLAMYCIN

Na zahtev preduzeća MEDICAL FLORA, sa sedištem u Novom Sadu, ulica Bulevar Oslobođenja 30A, pristupili smo oceni, in vitro, proizvoda pod nazivom : CHLAMYCIN sa ciljem da se utvrdi moguće bakteriološko dejstvo na jednu određenu lozu Chlamydia trachomatis.

Pomenuto ocenjivanje je izvršeno u Laboratoriji doktora MARI-a, na Ibici, koja je opremljena za kultivisanje tkiva, tokom perioda između 23.01.2011. i 02.02.2011.

1) UVOD

Prisustvo Chlamydia trachomatis u etiologiji trajno polno prenosivih bolesti (PPB) postaje u današnje vreme jedan od sve prisutnijih problema, s obzirom na to da je poznato da se svake godine zarazi oko 90 miliona ljudi. Ove infekcije često daju nespecifičnu kliničku sliku koja kreće od akutne burne infekcije sa jasnim simptomima do potpuno netipičnih simptoma, koji postaju izvor manje ili više ozbiljnih komplikacija.

Godine 1957, TANG (1) prvi put uspeva da identifikuje bakteriju uzročnika, dobivši je ubrizgavanjem u embrion pileta.

Osam godina kasnije GORDON i QUAN (2) opisuju jednu tehniku izolovanja agensa trachoma u ćelijskoj monomembrani eukariota tokom kontinuiranog ponavljanja (ćelije Mc Coy).

Tehnike mikro imuno-fluorescencije WANG-a i GRAYSTON-a (3) omogućavaju lakše prepoznavanje ove bakteriološke grupe koja se deli u tri podgrupe sa patogenezom kod ljudi (Chlamydia trachomatis) i kod životinja (Chlamydiopsittaci).

Od 1975, otkrićem monoklonalnih antitela, obeležena je jedna značajna etapa u označavanju ove vrste infekcije, zahvaljujući povećavanoj osetljivosti neposrednih dijagnostičkih tehnika (4).

Savremena molekularna biologija omogućava brzu dijagnostiku prisustva bakterijske DNK samo jednim biološkim ogledom. Ipak, mogući opstanak bakterije u inficiranom organizmu mora da probudi izvesnu razboritost u tumačenju ovih oglada.

Patologija u urogenitalnom traktu najverovatnije se ograničava na sluzokožu koja oblaže šupljine (ždrelo, oči, vagina, cerviks, creva, bešika) uključujući, takođe, unutrašnje žlezde koje mogu da predstavljaju infektivni rezervoar ili da iskomplikuju infekciju sluzokože.

Smatra se da svi serotipovi iz grupe trahomonasa mogu da budu uključeni, ali se mnogo češće i ozbiljnije radi o grupi L (L1, L2, L3) koja je najveći uzročnik veneričnog limfogranuloma i iz grupa od D do K (D, E, F, G, H, I, J, K).

Nakon infekcije kod čoveka se razvija upala uretre koja ponekad može ići istovremeno sa gonoreičnom infekcijom koja se brzo manifestuje zbog čega može da prođe neprimećeno i bez utvrđivanja dijagnoze. Komplikacije mogu biti lokalne i regionalne (Prostatitis, Epididimitis (9), rectitis (10)).

Kod žena, infekcija vaginalne i cervikalne sluzokože može da prođe neprimećeno i da izazove ozbiljne komplikacije (Salpingitis (11, 17)) koje dovode i do trajnog steriliteta usled začepljenja jajovoda. (12,19)

Infekcija hlamidijom kod porodilje izlaže eventualnoj očnoj ili plućnoj infekciji novorođenčeta usled dodira obe sluzokože kao i infekciju tokom trudnoće, a može da izazove negativne posledice na opšte stanje novorođenčeta (smanjenje telesne težine, prevremni porođaj, smrt novorođenčeta (14, 15, 18)).

U nemogućnosti da akumulira dovoljna energije za samostalni razvoj hlamidija je primorana da na najrazvijenije parazitske organizme poput eukariotskih ćelija koje dopuštaju parazite postajući i sami energetsko-zavisni paraziti , što morfološki vodi do intraćelijske kolonije sa različitim strukturama unutar zarazne vakuole pod nazivom: inkluzija. Zarazne su samo male guste i kompaktne čestice, koje se zovu elementarna telašca (0,2- - 0,4 mcm). Zbog toga, in vitro blokiranje proteinskog metabolizma pogoduje razvoju parazita na račun gostujuće ćelije, koja predstavlja osnovu svih tehnika izolacije ovih bakterija in vitro. (21)

Nema sumnje, ova privilegovana situacija unutar epitelnih ćelija predstavlja uzrok problema u terapiji koja je ponekad povezana sa ovom vrstom infekcije zbog čega je pretvara u evolutivnu latentnu infekciju koja je u stanju da ponovo bukne, ali isto tako može da se konstatuje i u brojnim komplikovanim infekcijama.

Pretpostavlja se da uključivanje jednog dijetetskog dodatka ili bilo kakvog pomoćnog sredstva može da pospeši terapijsko dejstvo koje je ponekad samo po sebi nedovoljno.

Upravo je to predmet pomenutog istraživanja.

2) MATERIJA I METODE

- **Ćelijska podloga:** korišćena je linija Mr Coy (ATCC CRL-1696) iz Laboratorije „Virceil”
- **Uzorak za rast:** DMEM (Dominique Dutscher SAS) sa 10% seruma goveđeg fetusa (SFB) Dominique Dutscher, 4,5 g/l glukoze, 2mM L Glutamine, natrijum piruvat I 3,7 g/l Na H COOH, gentamicin 20 mcg/ml.
- **Ćelijska suspenzija:** ćelijska opna isprana sa EBSS bez Ca Mg niti HC03Na-fenol, odvaja se sa tripsinom u PBS koncentracije 0,25%. Dejstvo tripsina na PBS blokira EBSS sa 10% SFB i

reguliše na 2x10*5 ćelija prečnika 14mm nakon prebrojavanja u komori marke Malassez. suspenzija se raspoređuje u cevi „Sterilin” ravne osnove sa jednim okruglim predmetom za prekrivanje prečnika 14 mm, a inkubacija cevi se vrši u grejaču sa 5% CO₂, tokom 24h.

- **Inokulum:** korišćena je loza (familija L” (Vircell) Hlamidije trahomatis, koja potiče iz zaražene ćelijske kultivacije od 72h, čije su čestice dobijene nakon serije zamrzavanja-odmrzavanja, I podešena na koncentraciju od 10000 cfi/ml. Dodaje se 100 mcl u svaku cev I horizontalno centrifugira na 2500 obrtaja/mn tokom jednog sata na 35 stepeni. Nakon centrifugiranja vrši se inkubacija cevi na 37° tokom dva sata.

Uzorak za inkubaciju: Usisa se uzorak za inkubaciju i deli se 1 ml uzorka za rast kojem se dodaje jedna završna koncentracija od 1 mcg/ml cikloheximida (Albaran 424454561 – Sigma-Aldrich-Quimica)-

- **CHLAMYCIN:** proizvod koji je podvrgnut istpitivanju pojavljuje se kao tamna zelena tečnost i odgovara mešavini tinktura:
- *T.uvea ursi folium, T.juniperis fructus, Hyperi herba, T.serpilli herba, T.caryophylli flos, T.plataginis lanceolatae folium*, u **etanolskom rastvoru od 60%**.
- Prisustvo etanola u preparatu nas je primoralo da ocenjujemo akciju sredstava za inkubaciju slične koncentracije samog etanola, prema istim rastvorima kao i proizvod u sredstvu za inkubaciju.
- **Pre rastvaranja bruto proizvod je centrifugiran** tokom jednog sata na 4000 obrtaja/mn sa ciljem da se odstrani bilo koji ostatak (otpad) koji bi mogao da ošteti ćelijsku opnu. Napravljena su četiri rastvora proizvoda u sredstvu za inkubaciju: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80. Za svaki ogled su korišćene 4 cevi, stvarajući tako 4 serije.
- **Očitavanje:** Tokom 48h inkubacije na 36° u sredini od 5% CO₂ odlaže se sredstvo za inkubaciju, pere se ćelijska opna sa 1ml EBSS-a, fiksira se ćelijska opna sa hladnim acetonom (4°C) tokom 10mn. Stavlja se 100 mcl monoklalnog antitela anti genski, pomešan sa fluoresceinom (30mn na 37°C). Mikroskopsko posmatranje epi fluorescencije (Leitz, sa filterima BG 12, 535 K, okulari 10X, jedan od njih sa mikrometričkom crticom). Prebrojavaju se inkluzije iz čitavog okruglog pokrivača.

3) REZULTATI I RASPRAVA

Na slici 1 predstavljen je prosek svakog prebrojanog pokrivača.

Za cevi koje su predstavljale sredstvo inkubacije vrednost proseka brojanja su 733 inkluzije (redom: 580,944,780, 620) po jednoj cevi.

U sredstvu sa samim etanolom (etanol rastvoren na 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 u sredstvu za inkubaciju) pokazuje značajno smanjivanje na najnižem rastvoru (1/10) sa takođe značajnim smanjenjem veličine inkluzije.

Ovo smanjenje veličine inkluzije posmatra se takođe u svim rastvorima koji sadrže aktivne proizvode, sa inhibitorском aktivnošću koja je najistaknutija kod najvišeg rastvora sa CHLAMYCIN-OM.

Ako se uporedi aktivnost proizvoda sa eventualnom aktivnošću samog etanola, unutar sredstva za inkubaciju, može se odbaciti ideja da je globalna inhibitorска aktivnost povezana sa prisustvom rastvarača (etanola), bolje nego sama aktivnost, jer se u najnižem rastvoru (1/10) ne ispoljava bilo kakvo inhibitorско dejstvo u poređenju sa aktivnošću Chlamycin-a.

Po analogiji sa primenom minimalne inhibitorске koncentracije za bakterije, smatramo značajnim vrednost $< 0,2$ = a 20% oblikovanih tela inkluzije.

Jasno je da ispitan proizvod ima inhibitorску aktivnost do rastvora od 1/40. Bilo bi neophodno da se zna da li u praktičnoj svakodnevnoj upotrebi, kao dijetetski dodatak može da se postignu ove koncentracije u organizmu.

Tabela 1: Prosečna inkluzija po prebrojanim inkluzijama u 4 cevi

| Serija | Rastvori | | | | Uzorak |
|---------------|----------------|-----------------|---------------|---------------|--------|
| | 1/10 | 1/20 | 1/40 | 1/80 | |
| Uzorak | | | | | 733 |
| Etanol (%) | 225* (30,7) | 480* (65,48) | 750* (100) | 658 (80,7) | |
| Chlamycin (%) | 5 (0,7) | 60 (8,2) | 42 (5,7) | 255 (34,8) | |

Bilo bi zanimljivo raspolagati sa farmakološkim podacima, znajući da su komponente proizvoda CHLAMYCIN, prema opštem pravilu, snažni antioksidansi (22, 23, 24) koji deluju tako što stimulišu organsku odbranu od napada raznih mikroorganizama. (25, 26)

Među njima se nalaze uvae ursi folium i serpilli herba, koji čine sastavni deo koncentracije proizvoda. Aktivnost je uslovljena prisustvom fenola u mM/L koji sadrži i njegovoj visokoj koncentraciji antioksidansa (FRAP : 22), kao što je slučaj i sa ostalim sastavnim činiocima krajnjeg proizvoda (22, 23, 24).

ZAKLJUČAK

Svojstva Chlamycina koja smo prethodno opisali, zajedno sa direktnim mehaničkim aspektom pojedinih sastojaka(juniper : 27) obećavaju mnogo u pomoći za iskorenjivanjem infekcije i izbegavanje mogućih i veoma čestih komplikacija koje klinički nisu upadljive.

Ovim ohrabrujućim rezultatima neophodno je dodati studiju o ispitivanju sa ciljem da se prilagodi najpovoljnije doziranje za ovu vrstu infekcije.

Ovaj rad je izvršen od strane dr Francois Catalan i dr Alexandre Milovanovic u saradnji sa dr Miguel Mari Tur.

BIBLIOGRAFIA

1) TANG FT., CHANG H.L., HUANG Y.T.and WANG K.C.

Studies on the aetiology of trchoma with special reference to isolation of the virus in chick embrio. Cli. Med. J., 1957, 75, 429-447

2) GORDON F.B. and QUAN A.L..Isolation of the trachoma agent in cell culture. Soc. Exp. Biol Med, 1965, 118, 354-359

3) WANG S.P., and GRAYSTON J.T."Immunologic relation ship between genital TRIC agents, lymphogranuloma venereum and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescece test. Am. J Ophtalmol. 1970, 70, 367-374

4) POULETTY P.,MARTIN J.,CATALAN F.,GARCIA GONZALEZ M.,MORELET I.,BETTINGER S., KADOUCHE J. J. Clin Microbiol, 1988, 26 829 267-270.

- 5) DURAND a., NICOLAS ET FAVRE: "Lymphogranulomatose inguinale subaigue, d'origine génitale probable, peut être vénérienne" : *Bulletins et mémoires de la Société médicale des hôpitaux de Paris*. 1913, 35, 274-279
- 6) BOWIE W.R., WANG S.P., ALEXANDER E.R., and all : "Etiology of non gonococcal urethritis. Evidence for *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum*. *J. Clin. Invest.*, May 1977, 59, 735-742.
- 7) BOWIE W.R., ALEXANDER E.R., and HOLMES K.K. "Eradication of *Chlamydia trachomatis* from the urethra of men with nongonococcal urethritis. *Sex. Transm. Dis.*, 1981, 8, 79-81.
- 8) BOWIE W.R. and JONES H. ""Acute pelvic inflammatory disease in outpatients: association with *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*" : *Ann. Intern. Med.* 1981, 95, 685-688.
- 9) HEAP G. " Acute epididymitis attributable to Chlamydial infection: preliminary report". *Med. J. Aust.*, 1975, 1, 718
- 10) BAUER J., BRUCE E., PARINAUD and CATALAN F. *Gastro. Entero. Clin. Et Biol.* 1981, 5, 246^a.
- 11) HENRY-SUCHET J., CATALAN F., LOFFREDO V., SANSON M.J., DEBACHE C., PIGEAUD et COPPIN R. "*Chlamydia trachomatis* associated with chronic inflammation in abdominal specimens for women selected for tuboplasty. *Fertil steril.*, 1981, 36, 599-605.
- 12) HENRY-SUCHET J., UTZMANN C., De BRUX J., ARDOUIN A., CATALAN F., SERFATY D., ET LOFFREDO V. "*Microbiological study of chronic histological inflammation associated to tubal sterility, role of Chlamydia trachomatis*". 6th Int. Meet. Int.Soc. for STD research. 31 juillet-2 Aout, 1985, Brighton, 33.

- 13) HARRISSON H.R., ENGLISH M.G., LEE C.K., et ALEXANDER E.R.: "Chlamydia trachomatis infant pneumonitis". *New Eng. J. Med.*, 1978, 298, 702-708.
- 14) MARTIN and all. *Jama*. 1982, 247, 1585-1588.
- 15) MARTIN ., KOUTSKY L., ESCHENBACH D., DABING J.R., ALEXANDER E.R., BENEDETTI J.K., and all : "Prematurity and perinatal mortality in pregnancies complicated by maternal Chlamydia trachomatis infection.
- 16) WADLER M. "Pregnancy And the neonate". *Br. Med. J.*, feb 1984, 288, 624-627.
- 17) SVENSON L., WESTRÖM L., MÄRDH P.A. "Acute salpingitis with Chlamydia trachomatis isolated from falopian tubes : clinical, cultural and serlogical findings, *Sex. Transm. Dis*, 1981, 8, 51-55.
- 18) WAGER G.P., MARTIN D.H., et KOUSTKY L. "Puerperal infection morbidity: relation ship to route of delivery and to antepartum Chlamydia trachomatis infection". *Am.J. Obstet.gynecol.* 1980, 138, 1028-1033
- 19) ZORN B., ABEILLE J.P., LEGROS R., CATALAN F., IONESCO M., et De BRUX J.: "Liquide peritoneal et infection a chlamydia trachomatis. *Gynecologie*, 1986, 37, 4, 286-294.
- 20) WENMAN W.M., et meuser r.u. "Chlamydia trachomatis elementary bodies possess proteins wich bind to eucaryotic cells membrans" *J. Bacteriol.* 1986, 165.
- 21) CATALAN F: in "CAHIER DE FORMATION EN BIOLOGIE MEDICALE" N° 4. Bioforma juin 1986
- 22) KATALINIC V., MILOS M., KULISIC T., JUKIC M. "Screening of 70 medicinal plants extracts for antioxydant capacity and total phenols". *Food Chemistry* 2006, ,94, 550-557.
- 23) ENAMY S.A., ASILI J., MOHAGHEZ Z., HASSANZADECH M.K. "Antioxydant activity of leaves and fruts of iranian conifers : " *Evid. Based complements, Alter. Med.*, 2007, 4, 313-319.
- 24) BANTHORPE D.V. and all: "Monoterpene pattern of juniperus and Thuja species.
- 25) GLISIC S.B., MILOJEVIC S.Z., DIMITRIJEVIC S.I., ORLOVIC A.M., SKALA D.U. "Antimicrobial activity of the essential oil and differents fractions of juniperis communis L and comparison with some commercial antibiotics. *J. Serb. Chem. Soc.* 2007, 72, 311-320.