ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТАБОЛІЧНОЇ АКТИВНОСТІ РІЗНОВИДІВ РОДИНИ CHLAMYDIACEAE ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ У ЛІНІЯХ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН

В.В. Гончаренко, Г.К. Кондакова, С.К. Джораєва, В.В. Кутова, О.М. Білоконь, Т.В. Земляна

ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України», Харків

Резюме. *Проведено порівняльні дослідження по вивченню споживання глюкози культурами клітин L-929 і Hep-2, інфікованими та неінфікованими штамами C. trachomatis і C.pneumoniae, у динаміці культивування. Вміст глюкози у інкубаційному середовищі досліджували через 24, 48 72, 96 годин у відповідності з циклом розвитку, притаманного виду мікроорганізму. Встановлено, що інфікування клітин спричиняє зміну енергетичного метаболізму, що виявляється у збільшенні швидкості споживання глюкози. Динаміка цього збільшення корелює з циклом розвитку збудників родини Chlamydiaceae.*

Ключові слова: *культура клітин L-929, культура клітин Hep-2, штами C. trachomatis та C. pneumoniae, споживання глюкози, енергетичний метаболізм.*

ВСТУП

Мікроорганізми порядку Chlamydiales є високоспеціалізованими грамнегативними внутрішньоклітинними паразитами еукаріоцитів, для яких є характерним облігатне внутрішньоклітинне існування та унікальний двохфазний життєвий цикл з конвертацією між двома морфологічно і функціонально дискретними формами: ретикулярними (РТ) та елементарними тільцями (ЕТ) [1,2]. Цикл розмноження хламідій реалізується при їх взаємодії з чутливою клітиною хазяїна. Процес взаємодії має достатньо складний молекулярно-мембранний механізм, пов'язаний зі змінами у процесах метаболізму у клітині-хазяїні. Для реалізації продуктивного розвитку збудника, у інфікованій клітині відбуваються складні біосинтетичні процеси, які характеризують своєрідність відносин паразита та клітини-хазяїна, визначену як енергозалежний паразитизм. Протягом багатьох років вважалось, що хламідії являються енергетичними паразитами, неспроможними генерувати АТФ та інші високо-енергетичні метаболіти [3]. Однак, при повній розшифровці геному були визначені гени, котрі передбачають здібність до синтезу і використання обмеженої кількості власного АТФ [4,5]. При проведенні досліджень встановлено наявність функціональних ферментів для метаболізму глюкози, а саме піруват кінази, фосфогліцерат кінази, гліцеролдегідро-3-фосфат дегідрогенази і глюкоза-6-фосфат дегідрогенази, та визначена максимальна експресія цих ферментів і 4 кодуючих генів у середині циклу розвитку. У результаті ідентифікації ферментів встановлено, що данні мікроорганізми мають функціональну здібність до продукування АТФ та відновлення енергії за допомогою фосфорилірування протягом більшої частини життєвого циклу, оскільки передбачається, що вони містять компоненти електронного транспортного ланцюга та комплекс АТФ-сінтази. Доведено, що ЕТ містять великий пул запасної АТФ і їх рання диференціація може наступати за рахунок запасу збереженого пулу АТФ і за допомогою АТФ, генерованого при метаболізмі глюкози. Крім того, було продемонстровано, що РТ отримують АТФ з клітин хазяїна через транслоказу АТФ/АДФ. У разі необхідності, на початку проліферації, АТФ, генерована хламідіями, може бути використана сумісно з АТФ, отриманою безпосередньо з клітин [6,7]. Стиму-

ляція метаболічних процесів обумовлена посиленням вживання глюкози, котра є основним енергетичним субстратом. Хламідії спроможні стимулювати транспорт глюкози для компенсації енергетичного навантаження на клітини, яке спровоковане інфекцією, за допомогою індукції експресії убіквітарних транспортерів глюкози GLUT-1 на клітинну поверхню, наслідком чого є інтенсифікація створення високо-енергетичних метаболітів, що збігається зі зростанням споживання глюкози [8,9]. Результатом складних процесів метаболізму бактерії є забезпечення достатнього запасу енергетичних метаболітів для власного розвитку та виживання у внутрішньому середовищі клітини. Для катаболізму глюкози, крім гліколізу, є також інші шляхи, що мають спеціальне призначення, а саме пентозофосфатний шлях, за допомогою якого генерується НАДФН2 – основне джерело енергії у біосинтезі, та утворюються пентози (D-рибоза), потрібні для синтезу нуклеїнових кислот [4,5,10].

Таким чином, у теперішній час вважається, що хламідіям притаманна функціональна здібність до продукування власної енергії за рахунок присутності біологічно активних, енерго-продукуючих ферментів у гліколізному та пентозо-фосфатному шляхах, з варіабельністю інтенсивності окремих етапів у різних представників порядку Chlamydiales [11].

Ураховуючи вищесказане, **метою** дослідження було вивчення динаміки споживання глюкози перещеплюваними лініями культур клітин, інтактними та інфікованими різновидами родини Chlamydiaceae, і визначення впливу хламідій на інтенсивність окремих етапів катаболізму глюкози.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для дослідження у якості інфекційного матеріалу використовувались суглобові ізоляти Ar1-Z та Ar2-K, виділені з суглобової рідини хворих з артрологічною патологією і віднесені до виду C. trachomatis, та судинні ізоляти виду C.pneumoniae AP1-a та AP2-fa, вилучені з атеросклеротичних бляшок магістральних судин, отриманих при операційному втручанні у хворих з атеросклеротичною патологією серцево-судинної системи. З метою накопичення біомаси збудника, штами C. trachomatis та C.pneumoniae культивувались у системах культур клітин ліній L-929 і Hep-2 на поживному середовищі 199, збагаченому 5% ембріональної телячої сироватки, упродовж 3 пасажів кожний за стандартною методикою [1] з інокуляцією інфекційного матеріалу на моношар відповідної культури клітин. Ступінь ураження клітинного моношару хламідіями оцінювали за допомогою забарвлення по методу Мая-Грюнвальда-Гімзи при світловій мікроскопії, а також візуалізували по методу прямої імунофлюоресценції з використанням моноклональних антитіл РекомбіСлайд Хламідія виробництва фірми Лабдиагностика, (Росія) при люмінесцентній мікроскопії. Після підрахунку включень у клітинах при світловій та люмінесцентній мікроскопії та корекції на фактор розведення, бактеріальні титри були виражені у якості одиниць, формуючих включення, (IFU/мл) і склали $5x10^3$ IFU/мл. Контролем слугувала суспензія неінфікованої культури клітин в концентрації 1,0-1,2 x 10^5 кл/мл. Результати експерименту реєстрували у початковій точці (вихідний фон), через 24, 48, 64 та 72 години інкубації як у неінфікованій клітинній суспензії, так і в інфікованій штамами C.trachomatis і додатково на 96 годині для штамів C.pneumoniae. Вибір цих часових проміжків був обумовлений особливостями циклу розвитку збудника. Рівень глюкози у інкубаційному середовищі оцінювали глюкозооксидазним методом [12], а для визначення кількості пентоз у суспензії клітин використовували орціновий метод (реакція Біаля) [13].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оцінка ступеню зараження клітинного моношару показала, що відсоток інфікованих клітин відрізнявся у різних штамів, що співпадало з результатами попередніх досліджень. При візуалізації моношару клітин, інфікованих суглобовими ізолятами Ar1-Z та Ar2-K, після проведення 3 пасажу виявлено відповідно до 50% та 90% клітин з цитоплазматичними включеннями різного ступеню зрілості у залежності від часу інкубації збудників. Так, при дослідженні культуральних зразків штаму Ar2-K, на 24 годину після інфікування, включення були порівнянні за величиною з розмірами ядра, у той час як для штаму Ar1-Z дрібні паразитофорні вакуолі, візуалізовані на 24 годині, були у межах видимості світлового мікроскопу у зв'язку з різними рівнями зростання цих варіантних збудників. Через 48 годин включення штаму Ar2-K займали більшу частину цитоплазми уражених клітин і на 64 годину у клітинах спостерігалися розвинуті цитоплазматичні включення, тоді як спільномірний розвиток штаму Ar1-Z визначено лише на 72 годині.

При вивченні порівняльної динаміки споживання глюкози у інфікованій та неінфікованій культурі клітин упродовж 72-годинної інкубації була встановлена різна інтенсивність окремих етапів глюкозокатаболічного процесу. Аналізуючи отриманні результати, було встановлено, що кількість глюкози, що споживається неінфікованою культурою L-929, практично не змінюється у досліджувані часові періоди. При розрахунку швидкості вживання глюкози з'ясувалося, що найвищою величиною характеризується перший 24-годинний інтервал розвитку культури, коли швидкість поглинання виявилася найвищою, подалі вона значно знижувалася і залишалася приблизно однаковою до закінчення культивування. Подібна динаміка швидкості вживання глюкози клітинами неінфікованої культури відображає особливості метаболізму вуглеводу у клітині на різних стадіях розвитку культури. Так, упродовж перших годин інкубації клітинних ліній завершується формування моношару за рахунок тривання фази експоненціального зростання клітин. У наступні години інкубації швидкість використовування вуглеводу значно знижується до рівня, необхідного для функціонування культури у стаціонарній фазі розвитку. Аналогічні характеристики були отримані і для інших клітинних ліній. Також у процесі дослідження встановлено помітне збільшення вживання глюкози клітинами, інфікованими усіма патогенними агентами, у порівнянні з інтактними культурами.

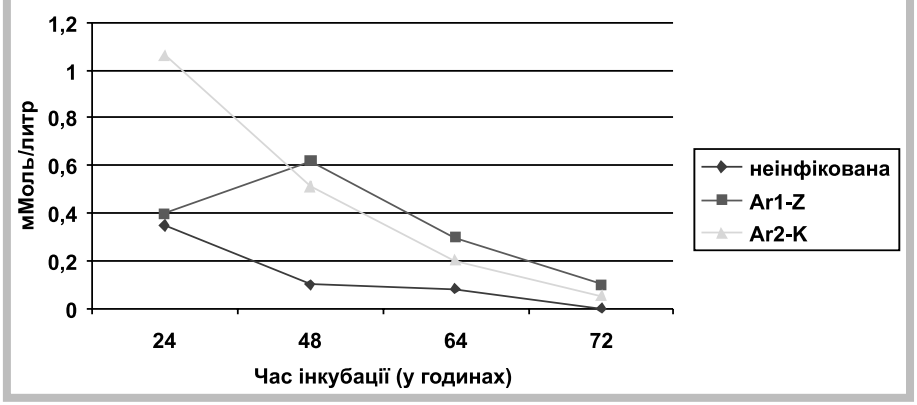
За результатами аналізу проведених експериментів з'ясовано, що рівні споживання глюкози відрізняються як між культурами, інфікованими та неінфікованими хламідіями, так і між культурами, зараженими різними штамами. Вживання вуглеводу відображає активність процесів метаболізму, притаманних кожному ізоляту, що досліджувався. Так, графічні зображення рівнів утилізованої глюкози (рис. 1) свідчать, що для штаму Ar2-K характерні активніші процеси катаболізму, співвідносні до особливостей встановленого циклу розвитку.

Найвищі показники витрат вуглеводу відзначалися у перший 24-годинний період розвитку збудника, з подальшим рівномірним зниженням показників до закінчення циклу. Пік більшого вживання глюкози співпадав з періодом інфекційного циклу, підчас якого метаболічна активність хламідій знаходилася на високому рівні на етапі первинної диференціації ЕТ і зростання кількості метаболічно активних форм збудника. Концентрація використаного вуглеводу значно знижувалася на 64 годину, коли більшість метаболічно активних РТ редиференціювалися у інертні ЕТ. Для штаму Ar1-Z були характерними дещо інші тенденції, котрі також співпадали з притаманним для нього циклом розвитку. Невелике підвищення рівнів вживання глюкози у порівнянні з нормальною культурою було визначено на 24 годину культивування, але кількісний показник був значно нижчим, ніж у Ar2-K. Інтенсифікація симпорту вуглеводу на відміну від попереднього штаму відбулася на 48 годині інкубації з нижчим кількісним значенням показника у порівнянні з піком споживання глюкози, визначеним для штаму Ar2-K. При вимірюванні рівнів вживання глюкози у наступні години культивування було виявлено рівномірне зниження показників, аналогічне метаболічним процесам, які спостерігались у порівнюваного штаму.

Таким чином, зіставлення глюкозокатаболічних показників, досліджених у різні часові інтервали при культивуванні суглобових ізолятів, посередньо підтверджує наявність встановлених особливостей завершення визначених етапів розвитку цих штамів за рахунок різної інтенсивності процесів метаболізму.

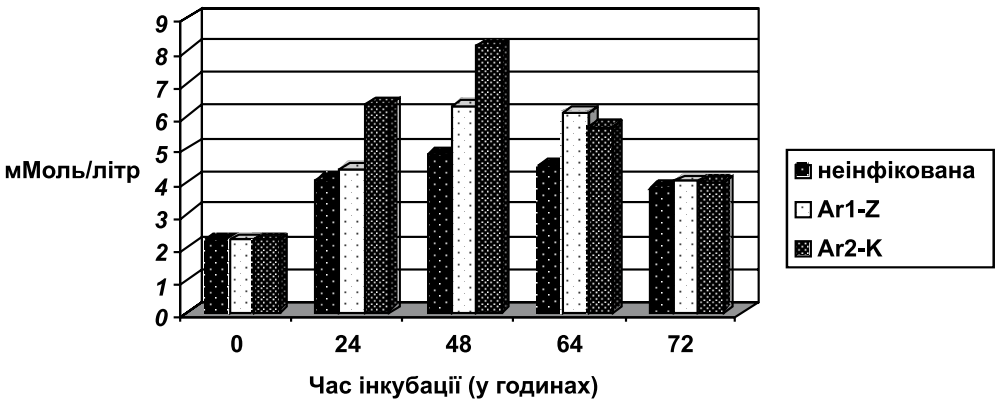
Для визначення впливу хламідій на інтенсивність окремих етапів катаболізму глюкози підчас культивування збудників паралельно проводили визначення рівнів зростання пентоз у суспензії клітин. Показано, що вміст рибози у клітинній

Рис.1. Швидкість споживання глюкози у період 72-годинного культивування клітин L-929, інфікованих та неінфікованих штамами хламідій



суспензії неінфікованої культури лінії L-929 зростає у перші 24 години інкубації і залишається практично на цьому рівні упродовж усього періоду культивування з незначним збільшенням показників на другу добу. При інфікуванні клітин штамами C. trachomatis відзначено відмінності в утворенні рибози, максимальна кількість котрої реєструвалася у різні проміжки часу для порівнювальних патогенних агентів. Результати вимірювань приведені на рисунку 2.

Рис. 2. Швидкість утворення рибози у культурі клітин L-929, інфікованої та неінфікованої хламідіями

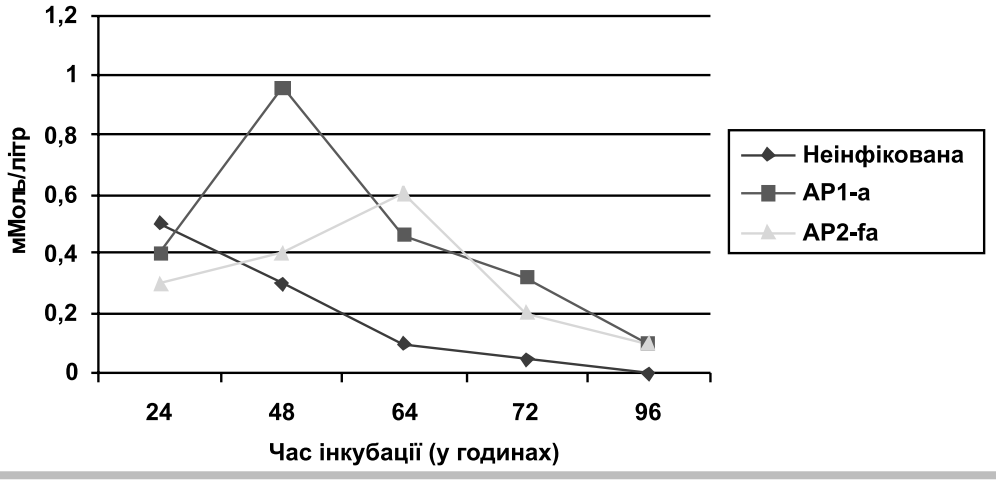


У процесі проведення досліджень виявилося, що продемонстроване збільшення вживання глюкози інфікованими клітинами співпадало з утворенням рибози у більш високих концентраціях у різні періоди інкубації в заражених культурах порівняно з інтактними. Так, на 24 години культивування рівні рибози помітно не відрізнялися, лише у суспензії клітин, інфікованих штамом Ar2-K, кількість утримання була вищою, ніж у інших порівнювальних суспензіях культур. Величина показників виявилася вищою як на першу добу інкубації, так і на другу, демонструючи більш активні процеси метаболізму при інтродукції клітин штамом Ar2-K, що співпадає з наявністю більшого патогенного потенціалу, притаманного саме для цього варіантного збудника. Утворення рибози на 48 годину інкубації виявилося помітно різним між усіма дослідженими культурами клітин. Зростання рівня рибози у суспензії клітин, заражених штамом Ar1-Z, мало повільний рівномірний характер, починаючи з 48 години культивування, що також вказує на особливості циклу розвитку цього штаму, патогенні властивості котрого у процесі попередніх досліджень були визнані помірними. У цілому максимальна кількість рибози у суспензії інфікованих клітин реєструється на 48 годину інкубації з варіаціями показників для кожного окремого штаму, що також підкреслює різну метаболічну активність представників виду C. trachomatis.

З метою встановлення метаболічної активності судинних ізолятів виду C. pneumoniae також було здійснено аналогічне дослідження рівнів вживання глюкози і утворення пентоз у процесі їхнього циклу розвитку. У попередніх дослідженнях було з'ясовано, що тривалість онтогенезу цих штамів займає подовжений інтервал часу у порівнянні зі штамами C. trachomatis. Слід відзначити, що показники катаболізму глюкози також відрізнялися від попередньо досліджених штамів, як було встановлено у процесі дослідження. Підвищення споживання вуглеводу у клітинах, інфікованих судинними ізолятами відзначені лише на 48 годині культивації з різницями термінів та кількісних значень показників між досліджуваними штамами. При визначенні рівнів вживання глюкози виявлено, що значне підвищення показників спостерігається у обох штамів як у різні години інкубації, так і з різницею у чисельних значеннях, котрі були вищими для штаму AP1-a, ніж для AP2-fa. Пік симпорту глюкози визначено на 48 годину для аортального ізоляту та на 64 для ізоляту стегнової артерії, на графічному зображенні (рис. 3) є помітною подібність конфігурацій кривих, котрі демонструють схожу динаміку вживання вуглеводу, але з відмінностями за рівнями кількісних показників. Подібні відмінності демонструють особливості циклу розвитку цих варіантних збудників, виявилося, що активніші процеси метаболізму притаманні більш патогенному штаму AP1-a, ніж штаму AP2-fa, котрий завжди відрізнявся повільнішим розвитком. На 96 годину культивування показники споживання глюкози були практично однаково мінімальними для інфікованих і неінфікованих культур. На цей час генерація нових поколінь збудників була завершеною для обох штамів, хоча тривалість характерного циклу розвитку для них відрізнялася за

часом реалізації, інтервал завершеності котрого для аортального ізоляту був менш тривалим, ніж для ізоляту стегнової артерії. Подібні риси конструктивного метаболізму штамів по відношенню до завершеного циклу обумовлені скоріш за все більш тривалим етапом конверсії розподілених РТ у метаболічно неактивні форми збудника на завершальній стадії.

Рис. 3. Швидкість вживання глюкози культурою клітин Нер-2, інтактною та інфікованою судинними ізолятами



У процесі досліджень утворення рибози був виявлений поступовий характер зростання показників з найбільшою величиною на 48 годину інкубації і подальшим рівномірним зниженням до настання завершальної стадії для штаму AP1-a, і у більшій мірі уповільненим збільшенням значень до 72 години для штаму AP2-fa (рис. 4). Подібна тенденція була відзначена і при вивченні дінамики вживання глюкози у інкубаційному середовищі.

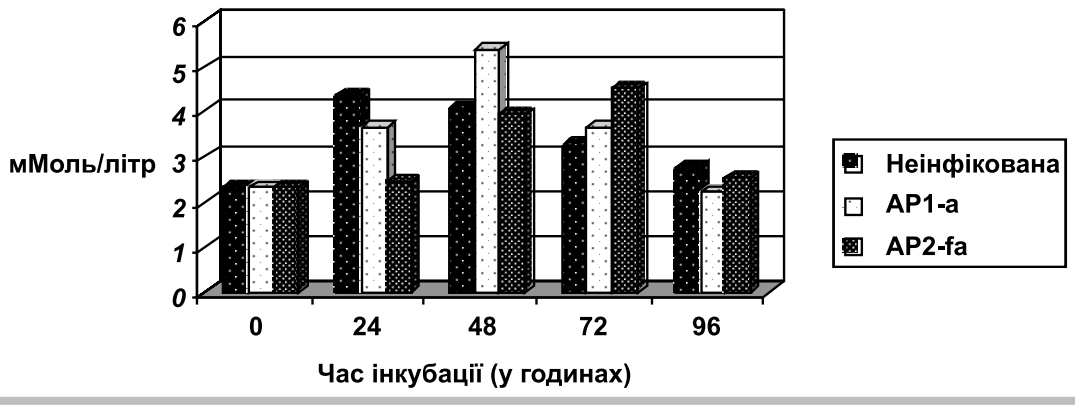
Також були визначені певні різниці у чисельних значеннях, котрі розрізнялися між досліджуємими штамами. Так, у дослідженій суспензії клітин, інфікованих AP1-a, найвище значення утвореної рибози, по відношенню до вихідного фону, склало у середньому 2,93 мМоль/літр вже на 48 годину культивування, тоді як для штаму AP2-fa подібний середній показник сягав значення 2,2 мМоль/літр лише на 72 годину. Подібні дані посередньо підтверджують наявні розходження у тривалості повного циклу розвитку, притаманні для цих штамів.

Порівняння досліджених параметрів продемонструвало взаємозв'язок між посиленням катаболізму глюкози та інтенсифікацією окремих етапів пентозофосфатного шляху метаболічних процесів у інфікованих клітинних культурах різних ліній. що імовірно сприяє активізації процесів біосинтезу.

ВИСНОВКИ

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено, що інтродукція збудників родини Chlamydiaceae у клітини різних ліній спричиняє інтенсифікацію енергетичного метаболізму шляхом підвищення швидкості вживання

Рис. 4. Швидкість утворення рибози у суспензіях інтактної та інфікованої культури клітин Нер-2



глюкози, як основного субстрату для продукування високо енергетичних метаболітів при гліколітичному шляху, та ініціації утворення конструктивних попередників біосинтезу нуклеотидів – рибозофосфатів - при пентозофосфатному шляху. Встановлені дані демонструють особливості метаболізму вуглеводу як при порівнянні інфікованих та інтактних клітин різних ліній, так і при зіставленні отриманих результатів у взаємозв'язку з особливостями реалізації продуктивного циклу розвитку не тільки на рівні різновидів родини Chlamydiaceae, а й на рівні окремих штамів збудника. Ці відмінності вказують на розходження в ефективності завершення визначених етапів розвитку за рахунок різної інтенсивності процесів метаболізму, підтверджують наявність встановлених особливостей зростання досліджених штамів та засвідчують неоднакову тривалість онтогенезу, притаманну цим варіантним збудникам.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Шаткин А.А*. Урогенитальные хламидиозы / А.А. Шаткин, И.И. Мавров. – Киев: Здоров'я, 1983. – 200 с.
2. *Abdelrahman Y.M.* The chlamydial developmental cycle / Y.M. Abdelrahman, R.J. Belland // FEMS Microbiol. Rev. – 2005. – Vol. 29. – P. 949-959.
3. *Moulder J.W.* Characteristics of chlamydiae. In: Microbiology of chlamydiae / Edited by A.L. Baron. – CRC Press, Boca Raton, Fla., 1988. – P. 1-20.
4. Chlamydial metabolism as inferred from the complete genome sequence. In: Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis, and immunity / Edited by R.S. Stephens. – Washington DC: American Society for Microbiology, 1999. – Chapt. 4. – P. 69-95.
5. *Мавров Г.І.* Хламідійні інфекції: біологія збудників, патогенез, клініка, діагностика, лікування та профілактика / Г.І. Мавров. – К., 2005. – 524 с. – Рос. мовою.
6. *Iliffe-Lee E.L.* Glucose metabolism in Chlamydia trachomatis: the «energy parasite» hypothesis revisited / E.L. Iliffe, McClarty G. // Molecular microbiology – 1999. – Vol. 33, 1. – P. 177-187.
7. Chlamydial development is adversely affected by minor changes in amino acid supply, blood plasma amino asid levels, and glucose deprivation / A. Harper, C.I. Pogson, M.L. Jones [et al.] // Infection & Immunity. – 2000. – Vol. 68, № 3 – P. 1457-1464.
8. Enhancement of ATP levels and glucose metabolism during an infection by Chlamydia / D.M. Ojcius, H. Degani, J. Mispelter [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 1998. – Vol. 273., № 12 – P. 7052-7058.
9. *Cocchiaro J.L.* New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms / J.L. Cocchiaro, R.H. Valdivia // Cellular Microbiology. – 2009. – Vol. 11. – P. 1571-1578.
10. Синтез оксида азота и некоторые параметры пентозофосфатного пути в культуре клеток L929, инфицированной штаммом UG-C Chlamydia trachomatis / И.И. Мавров, А.К. Кондакова, С.К. Джораева [и др.] // Експериментальна і клінічна медицина. – № 1. – 2005. – С. 20-24.
11. Chlamydia trachomatis genes whose products are related to energy metabolism are expressed differentially in active vs. persistent infection / H.C. Gerard, J. Freise, Z. Wang [et al.] // Microbes and Infection. – 2002. – Vol. 4, № 1 – P. 13-22.
12. *Горячковский А.М.* Клиническая биохимия в лабораторной диагностике: справочное пособие / А. М. Горячковский А. М. – Одесса, «Экология», 2005. – 616 с.
13. *Филиппович Ю.Б.* Практимум по общей биохимии / Ю.Б. Филиппович, Т.А. Егорова, Г.А. Севастьянова. – М.: Просвещение, 1975. – 318 с., с ил.
14. Культуральні та біологічні особливості Chlamydophila pneumoniae, виділеного з кардіоваскулярних зразків / І.І. Мавров, С.К. Джораєва, В.В. Гончаренко [та ін.] // Дерматологія та венерологія. – № 4(46). – 2009. – С. 51-54.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАЗНЫХ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА CHLAMYDIACEAE ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

В.В. Гончаренко, А.К. Кондакова, С.К. Джораева, В.В. Кутовая, О.Н. Белоконь, Т.В. Земляная

Резюме. *Проведены сравнительные исследования по изучению потребления глюкозы культурами клеток L-929 и Hep-2, инфи-*

METABOLISM ACTIVITY STUDY OF DIFFERENT SPECIES OF FAMILY CHLAMYDIACEAE WITH CULTIVATION ON INTERWAVING CELL LINE

V.V. Goncharenko, A.K. Kondakova, S.K. Dzhoraeva, V.V. Kutova, O.M. Bilokon, T.V. Zemlyana

Resume. *The effect of the intracellular parasite C. trachomatis and C.pneumoniae on the host cell energy metabolism has been*

цированными и неинфицированными штамами C. trachomatis и C.pneumoniae, в динамике культивирования. Содержание глюкозы в инкубационной среде исследовали через 24, 48, 64,72, 96 часов в соответствии с циклом развития, характерного для вида микроорганизма. Установлено, что инфицирование клеток вызывает изменение энергетического метаболизма, что выражается в увеличении скорости потребления глюкозы. Динамика этого увеличения коррелирует з циклом развития возбудителей семейства Chlamydiaceae.

Ключевые слова: *культура клеток L-929, культура клеток Hep-2, штаммы C. trachomatis и C.pneumoniae, потребление глюкозы, энергетический метаболизм.*

studied. Glucose consumption by L-929 or Hep-2 cell cultures infected or uninfected by strains this species was studied in comparison during the cultivation. The content of glucose in the cultural medium was determined every 24, 48,72, 96 hrs according to the developmental cycle of parasite species. It was shown that cell infection induced the alteration of energy metabolism via an increase in the glucose consumption rate.

Keywords: *cell culture L-929, cell culture Hep-2, strains of C. trachomatis and C.pneumoniae, glucose consumption, energy metabolism.*