

ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ХЛАМІДІЙ, ВИЛУЧЕНИХ З РІЗНИХ ЕКОТОПІВ ВЕГЕТУВАННЯ

**Мавров Г.І., Джорасва С.К.,
Гончаренко В.В., Кутова В.В.**

ДУ „Інститут дерматології та венерології АМН України”

Резюме: В статті наведені дані електронно-мікроскопічного та молекулярно-біологічного вивчення хламідій, виділених з різних осередків ураження на перещеплюваних клітинних культурах. Показано, що виділені збудники мають різну морфологію, умови культивування та видову належність. Проведені дослідження підтверджують можливість гематогенного розповсюдження *S.trachomatis* з розвитком хвороби Рейтера та взаємозв'язок між *S.pneumoniae* та патогенезом атеросклерозу.

Ключевые слова: *S.trachomatis*, *S.pneumoniae*, цикл розвитку, культура клітин Нер-2, культура клітин L 929, культивування, електронна мікроскопія, морфологія,

Урогенітальний хламідіоз (УГХ) відноситься до найбільш поширених інфекцій, що передаються статевим шляхом. За свідченням Всесвітньої Організації охорони здоров'я у світі щорічно реєструється близько 100 млн. хламідіозів, за далеко не повними даними статистики розповсюдженість цього захворювання в Україні становить 70,2 на 100 тис. населення [1, 2]. Вважається, що на Землі живе від 500 млн до 1 млрд. хворих на хламідійну інфекцію; в економічно розвинутих країнах третина населення інфікується упродовж життя декілька разів. Урогенітальний хламідіоз спричиняє розвиток висхідних та екстрагенітальних ускладнень, призводить до порушень репродуктивної функції та безпліддя. Доведено також роль хламідій у патогенезі захворювань дихального тракту, опорно-рухального апарату, серцево-судинної системи тощо [3, 4].

У багатьох країнах світу проводяться дослідження, спрямовані на вивчення біологічних властивостей хламідій, вилучених з сечостатевого тракту та екстрагенітальних

осередків ураження, з застосуванням перещеплюваних культур клітин [5, 6]. Можливість ізоляції живих форм збудника вигідно відрізняє культуральну діагностику від інших методів дослідження.

Метою дослідження стало ізоляція, ідентифікація та вивчення біологічних характеристик збудників, виділених з різних екопів вегетування на перещеплюваних лінійних культурах клітин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У нашому дослідженні у якості біологічного матеріалу для вилучення хламідій використовували зішкряби зі слизових оболонок сечостатевого тракту, синовіальні рідини, отримані від хворих, що знаходилися на стаціонарному лікуванні у ДУ „Інститут дерматології та венерології АМН України” з приводу урогенітального хламідіозу і хвороби Рейтера; атеросклеротичні бляшки,

отримані від хворих, що знаходилися на стаціонарному лікуванні у відділенні гострих захворювань судин ДУ „Інститут загальної та невідкладної хірургії АМН України” при оперативному втручанні з приводу атеросклеротичних уражень аорти та магістральних судин нижніх кінцівок.

Культивування збудника проводилось на перещеплюваних клітинних лініях L929 та Нер-2, згідно загальноприйнятій методиці [7, 8]. Особливістю культивування судинних зразків було використання середовища без вмісту ембріональної телячої сироватки та подовжений до 96 годин термін культивування.

Для встановлення видової належності збудника ми використовували полімеразну ланцюгову реакцію, що дозволяє виявити ДНК *S. trachomatis* та *S. pneumoniae* у культуральних зразках (діагностична тест-система “GenePak”®DNA PCR test, Росія). Крім позитивного контролю, що міститься у діагностичній тест-системі, у якості позитивних зразків ми використовували тест-штами *S. trachomatis* та *S. pneumoniae*, що культивувались за аналогічних умов, що і біологічний матеріал від хворих.

Електронно-мікроскопічне дослідження інфікованих клітинних культур здійснювали по методу Рейнольдса. Ультраструктуру клітин досліджували за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125Д при напрузі, що прискорує,

75 к, обладнаному системою знімання й аналізу зображення САІ - 01А (АО “SELMI”, м. Суми) на основі ССD камери DX- 2 і пакету програм фірми «КАРРА», Німеччина [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ізоляція чистих культур хламідій на перещеплюваних культурах клітин є головним етапом для подальшого вивчення широкого кола біологічних характеристик збудника. Так, при культивуванні матеріалу, отриманого з уrogenітального тракту, ми спостерігали, що на 24 годину культивування клітини моношару містилися у цитоплазмі ранні форми патогенного агенту у вигляді дрібних цитоплазматичних включень фіолетового кольору (рис.1). У препаратах, забарвлених на 48 годину інкубації, мікроколонії збудника розміщалися поблизу ядра, відтискуючи його на периферію клітини, мали рожевий колір та середні розміри у порівнянні з величиною ядер (рис.2). Через 72 години інкубації 31,0 до 69,2% клітин мали включення збудника переважно великих розмірів, що займають більшу частину цитоплазми (рис.3). При мікроскопії 72-годинної зараженої культури у більшості випадків визначалися як клітини, ушкоджені внаслідок виходу нових поколінь збудника у міжклітинний простір, так і частка незруйнованих клітин.

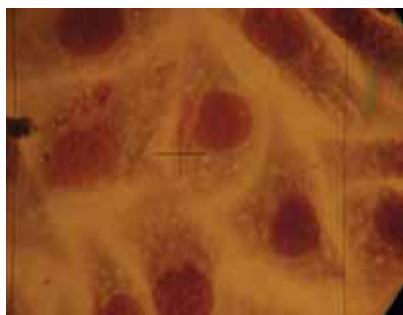


Рис. 1

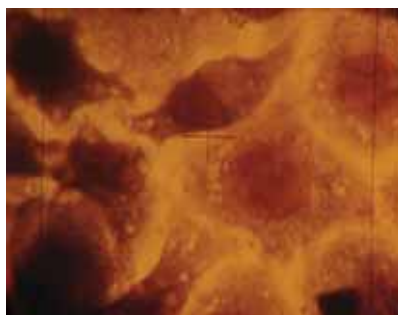


Рис. 2

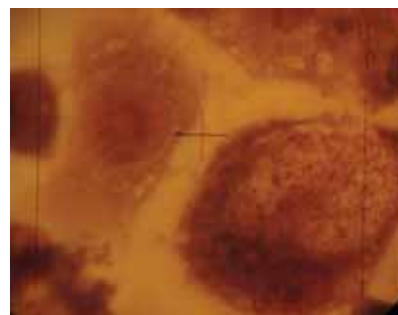


Рис. 3

Динаміка розвитку цитоплазматичних включень культурі клітин L-929, інфікованої матеріалом з уrogenітального тракту хворого В. у другому пасажі: (забарвлення по Мая-Грюнвальда-Гімза, х 900)

Примітка: рис.1 – 24 години; рис.2 – 48 годин; рис.3 – 72 години

Майже аналогічні результати були отримані при вилученні збудника з синовіальних рідин.

При ізоляції хламідій з судинних зразків були відзначені деякі відмінності у циклу розвитку мікроорганізму, а саме: упродовж трьох пасажів кількість інфікованих клітин коли-

валась у межах від 17,6 до 32,6%, цитоплазматичні включення мали невеликий розмір, тривалість циклу розвитку досягала 96 і більше годин, частіше визначалось декілька цитоплазматичних включень збудника у одній клітині, все це притаманно виду *S.pneumoniae*. Отримані дані наведено на рис. 4-6.

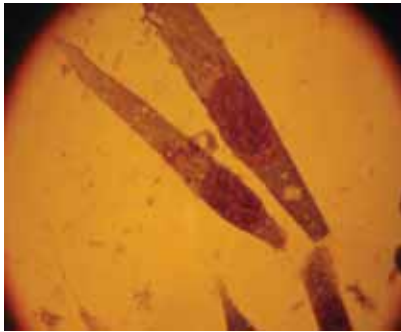


Рис. 4

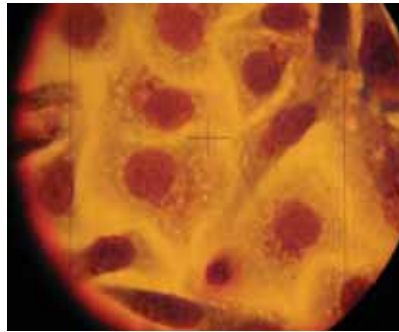


Рис. 5

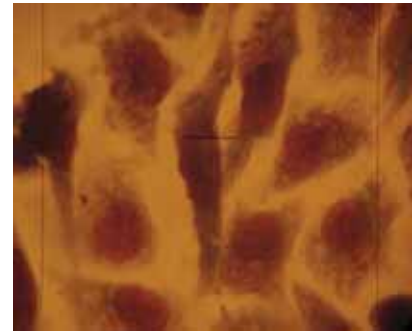


Рис. 6

Динаміка розвитку цитоплазматичних включень культури клітин Her-2, інфікованої матеріалом з атеросклеротичної бляшки хворого К. у третьому пасажі: (забарвлення по Мая-Грюнвальда-Гімза, х 900)

Примітка: рис.4 – 48 годин; рис.5 – 72 години; рис.6 – 96 годин

Видову належність мікроорганізмів визначено завдяки застосуванню полімеразної ланцюгової реакції. Так, при верифікації етіологічної ролі збудників, що штами, вилучені з урогенітального тракту та синовіальної рідини, відносяться до виду *S.trachomatis*, а штами, ізольовані з кардіоваскулярних зразків до виду *S.pneumoniae*. Крім того, судинні зразки були досліджені на наявність ДНК *S.trachomatis*. Було досліджено 3 зразки. ДНК виду *S.trachomatis* не було виявлено в жодному з досліджених зразків.

З метою вивчення морфологічних особливостей отриманих лабораторних ізолятів збудників хламідійної інфекції було проведено електронно-мікроскопічне дослідження даних зразків.

У результаті електронно-мікроскопічного дослідження морфологічних характеристик збудників, виділених з урогенітального тракту та синовіальних рідин, було отримане підтвердження того, що вони належать до виду *S.trachomatis*. На 48 годину культивування в культурі клітин L 929, інфікованій зішкрябним

матеріалом з урогенітального тракту та синовіальними рідинами, утворювалися включення, морфологічно характерні для *S.trachomatis*. Елементарне тільце (ЕТ) мало сферичну форму і середній діаметр 250-300 нм, зовні було обмежено двома тришаровими мембранами, кожна товщиною 8 нм. Усередині нього утримувався нуклеоїд і цитоплазма. Цитоплазма ЕТ мала значну електронну щільність і містила компактно розташовані рибосоми і гранули. Нуклеоїд, що утримує генетичний матеріал, щільно упаковану ДНК, мав, як правило, трохи ексцентричне розташування (рис.8.). Після проникнення всередину чутливої до інфікування клітини, ЕТ починали реорганізовуватися в ретикулярні тільця (РТ) - овальні або округлі структури із середніми розмірами 400-600 x 800-1000 нм. Зовні РТ були обмежені двома тришаровими мембранами, середня товщина кожної 8 нм, між клітинною стінкою і цитоплазматичною мембраною визначався вузький плазматичний простір, що обмежував протопласт, який містив цитоплазму з рибосомами і нуклеоїд, представлений фібрилами ДНК (рис. 9.).

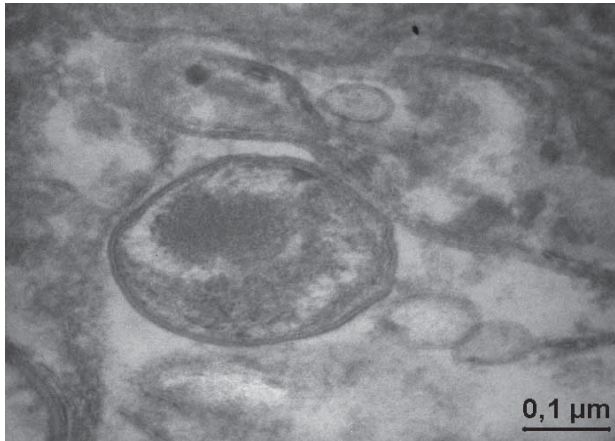


Рис. 8. Елементарне тільце *C. trachomatis* у клітині лінії L 929, інфікованої матеріалом з уретри хворого В. (48 годин культивування). N-нуклеоїд

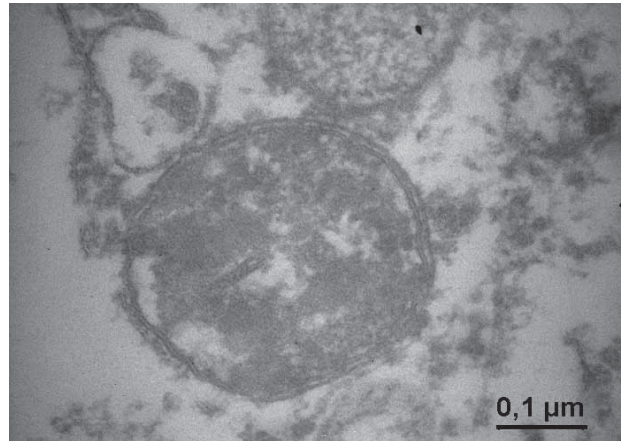


Рис. 9. Ретикулярне тільце *C. trachomatis* у клітині лінії L 929, інфікованої матеріалом з уретри хворого В. (48 годин культивування).

Крім ЕТ і РТ, ми спостерігали проміжні тільця (ПТ), що виникають на двох стадіях розвитку збудника: при перетворенні ЕТ у РТ і на стадії реорганізації РТ у ЕТ. Морфологічно вони досить схожі, але відрізняються за спрямованістю процесів, що відбуваються у них (наприклад деконденсація і конденсація нуклеоїда та ін). ПТ мали трохи більший розмір, ніж ЕТ. Вони також обмежені клітинною стінкою і цитоплазматичною мембраною, внутрішній уміст складався з рибосом та нуклеоїда, для якого характерний різний ступінь конденсації генетичного матеріалу

(рис. 10). Ступінь дисперсії нуклеоїда найбільш виражений на пізніх етапах перетворення ПТ у РТ. У ПТ (на пізніх стадіях циклу розвитку – 60 годин після інфікування), визначався центрально розташований щільний нуклеоїд із радіально розбіжними фібрилами. Рибосоми, локалізовані в цитоплазмі, заповнювали периферійну частину ПТ. Після 60 годин культивування більшість клітин інфікованого моношару зберігали свою цілісність, а включення збудника містили усі форми, що зустрічаються упродовж циклу розвитку (рис. 11.).

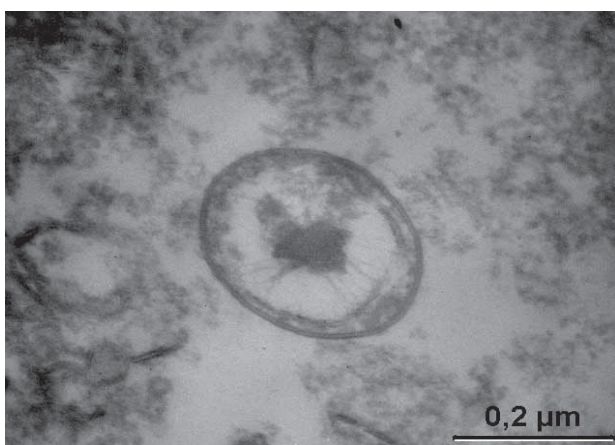


Рис. 10. ПТ на пізніх стадіях циклу розвитку у клітині лінії L929, інфікованій матеріалом з уретри хворого В. (60 годин культивування). N-нуклеоїд

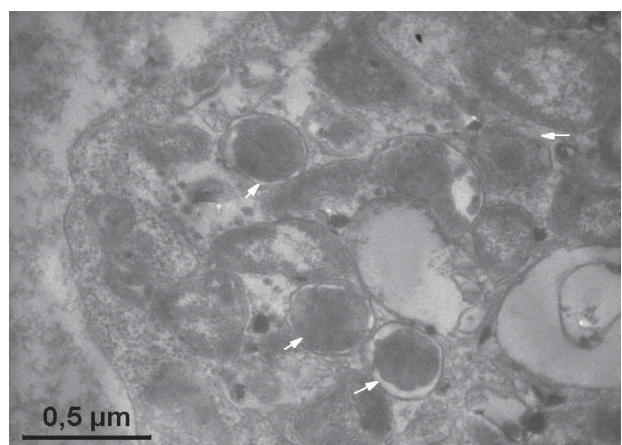


Рис. 11. Фрагмент цитоплазматичного включення збудника у клітині лінії L 929, інфікованій матеріалом з уретри хворого В., що містить мікроорганізм на різних стадіях розвитку. (60 годин культивування)

Близько 72 годин культивування клітини інфікованого моношару руйнувалися, вивільняючи хламідії, тим самим починаючи новий життєвий цикл та поширюючи інфекцію в ще неінфіковані клітини.

Таким чином, на підставі електронно-мікроскопічних характеристик і виявлених особливостей циклу розвитку, можна з упевненістю сказати, що збудник, виділений з уретри та синовіальної рідини, відноситься до виду *S. trachomatis*.

При культивуванні збудників, отриманих із сегмента аорти з атеросклеротичними ураженнями та артерій нижніх кінцівок при синдромі Леріша, було встановлено, що морфологічні характеристики і тривалість циклу розвитку відрізнялися від таких при пасивуванні уретрального і синовіальних

зразків. Подібно до ЕТ представників роду *Chlamydia* ЕТ даного мікроорганізму містили щільний нуклеоїд і цитоплазму з рибосомами, але мали менший розмір і грушоподібну форму (рис. 12.), що обумовлена, головним чином, великим периплазматичним простором завдяки гнучкій і плеіоморфній зовнішній мембрані. Ретикулярні тільця цих мікроорганізмів являли собою округлі структури із середніми розмірами 400-500 x 700-900 нм. (рис. 13.). Ці морфологічні особливості характерні для деяких представників *S. pneumoniae*. Культивування виділеного з аорти збудника показало, що цикл його розвитку складає 84-96 годин, що підтверджує приналежність мікроорганізму до виду *S. pneumoniae*.

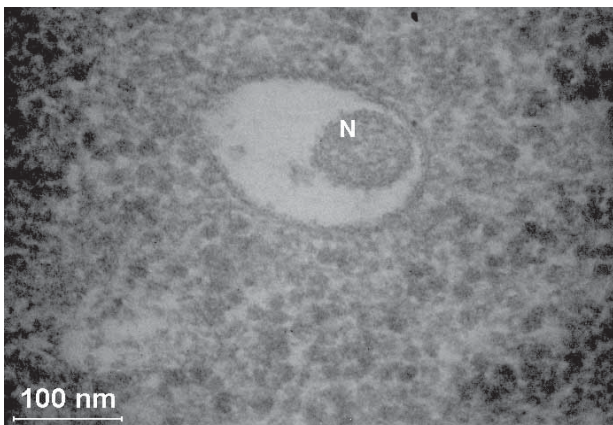


Рис. 12. ЕТ збудника у клітині культури Нер-2, інфікованій матеріалом аорти, отриманим від хворого К. (60 годин культивування). (N-нуклеоїд).

Грунтуючись на отриманих даних можна зробити висновок, що збудник, виділений з атеросклеротичних уражень сегменту аорти, належить до представників виду *S. pneumoniae*, тому що цілком задовольняє морфологічним критеріям і тривалості циклу розвитку для даного виду збудника.

Таким чином, вивчення особливостей циклу розвитку і морфологічних характеристик ізолятів хламідій, виділених з різних осередків ураження в системі перещеплених клітинних культур, показало, що

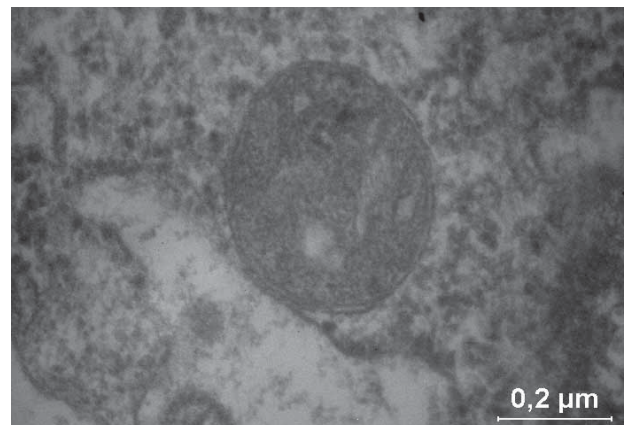


Рис. 13. РТ у клітині лінії Нер-2, інфікованій матеріалом аорти хворого К. (84 години культивування).

хламідії, виділені з уrogenітального тракту і синовіальної рідини колінного суглобу, належать до представників виду *S. trachomatis*, а мікроорганізми, виділені з операційного сегменту аорти та та нижніх кінцівок – *S. pneumoniae*. Електронно-мікроскопічні дослідження культур клітин, інфікованих операційним зразком аорти з атеросклеротичними ураженнями та артерій нижніх кінцівок при синдромі Леріша, наочно демонструють зв'язок між *S. pneumoniae* і можливим розвитком атеросклерозу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Gaydos C.A. Practical aspects of Chlamydia diagnosis and management // Abstracts book. Proceedings of the 25th IUSTI-Europe Conference “South Caucasian dermatology and venerology”. – 2010. - № 1 (8). – P.21 – 22.
2. Мавров Г. І. Хламідійні інфекції: біологія збудників, патогенез, клініка, діагностика, лікування та профілактика / Г. І. Мавров. – К., 2005. – 524 с. – Рос.мовою.
3. Савенкова М. С. Хламидийная инфекция на пороге третьего тысячелетия // Детские инфекции. – 2004. – № 1. – С. 36–42.
4. Boman J. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies / J. Boman, M. R. Hammerschlag // Clin. Microbiol. Reviews. – 2002. – Vol. 15, № 1. – P. 1–20.
5. Black C. M. Current method of laboratory diagnosis Chlamidia trachomatis infection // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol. 10, № 1. – P. 160-184.
6. Ramirez J. A. Isolation of Chlamydia pneumoniae from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis // Ann. Intern. Med. – 1996. – № 125. – P. 979–982.
7. Виділення, ідентифікація та умови довгострокового зберігання Chlamydia trachomatis та Chlamydophila pneumoniae : [метод. рекомендації] / уклад.: І. І. Мавров, В. В. Кутова, В. В. Гончаренко, С. К. Джораєва. – К. : Знання України, 2007. – 24 с.
8. Джораєва С. К. Досвід використання амінокислот для виділення збудників хламідіозів у перещеплюваній культурі McCoу / С. К. Джораєва, В. В. Кутова, В. В. Гончаренко // Експериментальна та клінічна медицина. – 2008. – № 2. – С. 44–47.
9. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH in electron microscopy // J. Cell Biology. – 1963. – Vol. 17. – P. 208–213.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ
БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОСОБЕННОСТЕЙ
ХЛАМИДИЙ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ
РАЗЛИЧНЫХ ЕКОТОПОВ
ВЕГЕТИРОВАНИЯ**

**Маеров Г.И.,
Джораева С.К.,
Гончаренко В.В.,
Кутовая В.В.**

Резюме. В статье представлены данные электронно-микроскопического и молекулярно-биологического изучения хламидий, выделенных из различных очагов поражения на перевиваемых клеточных культурах. Показано, что выделенные возбудители имеют различную морфологию, условия культивирования и видовую принадлежность. Проведенные исследования подтверждают возможность гематогенного распространения *C. trachomatis* с развитием болезни Рейтера и взаимосвязь между *C. pneumoniae* и патогенезом атеросклероза.

Ключевые слова: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, цикл развития; культура клеток Hep-2, культура клеток L 929, культивирование, электронная микроскопия, морфология.

**THE RESEARCH
OF BIOLOGICAL
PARTICULARITIES
OF CHLAMYDIAE
ISOLATES, WHICH
ISOLATED FROM DIFFERENT
VEGETATION ECOTYPES**

**Mavrov G.I.,
Dzhoraeva S.K.,
Goncharenko V.V.,
Kutovaya V.V.**

Summary. It was presented the data of the electron microscopy and molecular-biological researches of chlamydiae, which isolated from different destruction focuses in cell culture system at the article. It has been estimated, that agents are distinguished by morphology, cultivation condition and are applied to different species. The realized investigations are demonstrated the possibility of the *C. trachomatis* gematogenic dissemination for development of the Reiter's disease and the interrelation between the *C. pneumoniae* and pathogenic of atherosclerosis.

Keywords: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, the cycle of development, cell culture L929, cell culture Hep-2, cultivation, the electron microscopy, morphology,