

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ ЛАБОРАТОРНИХ ШТАМІВ ХЛАМІДІЙ

В.В. Гончаренко, В.В. Кутова, С.К. Джораєва, О.М. Білоконь

ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України», м. Харків

Резюме. У статті наведені результати електронно-мікроскопічних досліджень ультраструктури лабораторних штамів хламідій. Показана варіабельність морфологічних характеристик збудників, ізольованих з різних екоотів організму людини, при різноманітних нозологічних формах захворювань хламідійної етіології.

Ключові слова: лабораторні штами хламідій, морфологічні характеристики збудника, електронно-мікроскопічні дослідження.

ВСТУП

Здійснення мікробіологічного моніторингу за домінуючими видами актуальних збудників, які циркулюють на території країни, визнане важливою проблемою для національних служб охорони здоров'я. Рішення проблеми неможливе без виділення, вивчення біологічних властивостей та збереження лабораторних штамів мікроорганізмів [1]. Одним з актуальних інфекційних агентів продовжують залишатися облигатні внутрішньоклітинні бактерії виду *C. trachomatis*, котрі відносяться до числа самих розповсюджених бактеріальних патогенів, що передаються статевим шляхом, та спричиняють розвиток висхідних та екстрагенітальних ускладнень [2]. Пріоритетними дослідженнями також доведено етіологічну роль у патології серцево-судинної системи збудників виду *C. pneumoniae* [3-5]. Сучасні багатовекторні дослідження біологічних, генетичних, етіопатогенних особливостей хламідій різних видів приваблюють усе більшу увагу фахівців різних напрямків медичної науки та практики у зв'язку з широким спектром патологічних станів та клініко-епідеміологічних проявів інфекції, список яких значно розширений у останні роки [6]. Дослідження ультраструктури цих мікроорганізмів на сучасному методичному рівні розпочато з середини 60-х років минулого сторіччя і значно сприяло розкриттю процесів адгезії та інтерналізації інфекційного агента, особливостей онтогенезу при взаємодії внутрішньоклітинного бактеріального паразита з клітинами – хазяїнами, отриманню важливих морфологічних характеристик послідовних перетворень представників різних видів порядку *Chlamydiales* у динаміці їх

унікального циклу розвитку [7-10]. Хламідії є високоспеціалізованими бактеріями з двохфазним життєвим циклом, у якому елементарні тільця (ЕТ) сприяють транзиту між клітинами та метаболічно активними ретикулярними тільцями (РТ), відповідальними за внутрішньоклітинну реплікацію. Зрілою інфекційною формою збудника, адаптованою до позаклітинного існування, є ЕТ, що має вид сфери діаметром 200–300 нм, з надзвичайно щільним нуклеоїдом та протопластом. Оболонка ЕТ представлена тришаровими структурами з ригідною клітинною стінкою. Ретикулярне тільце являє собою овальне або округле утворення з середніми розмірами 400-600 × 800-1000 нм. Його внутрішній вміст оточено двома тришаровими мембранами. Цитоплазма РТ займає периферійну частину протопласту і заповнена рибосомами та дрібногранулярним компонентом. Нуклеоїд у РТ представлений фібрилами ДНК. У циклі розвитку визначають також проміжну стадію розвитку, яка є результатом трансформації бактеріального організму зі стійкої позаклітинної (ЕТ) у сталу внутрішньоклітинну (РТ) форму та зворотно. Морфологічно ці перехідні форми схожі, але розрізняються за спрямованістю процесів, що у них відбуваються. Увесь цикл розвитку триває 48-96 годин і слугує однією з характерологічних особливостей видової належності. Цикл розвитку хламідій здійснюється у цитоплазматичних включеннях, котрі представляють обмежену плазмалемою фагоцитарну вакуоль, первинно утворену на етапі фагоцитозу ЕТ і утримує, внаслідок асинхронного характеру розмноження, різні морфологічні структури мікроорганізму [6]. Електронно-мікроскопічні дослідження ультраструктурної будови вилучених штамів хла-

мідій є важливою складовою частиною ідентифікації виду збудника при поглибленому вивченні біологічних особливостей.

У зв'язку з вищевикладеним, метою дослідження стало електронно-мікроскопічне вивчення морфологічних характеристик лабораторних штамів хламідій, ізольованих з різних осередків ураження, що культивуються з використанням перещеплюваних клітинних культур.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для дослідження використовувались суглобові ізоляти Ar1-Z та Ar2-K, виділені з синовіальної рідини хворих з артрологічною патологією, і урогенітальні ізоляти Ku та UG-c, вилучені із зішкрябного матеріалу уретри та цервікального каналу хворих з запальними захворюваннями сечостатевої системи. Культивування мікроорганізму здійснювалось за стандартними та удосконаленими методами на перещеплюваній клітинній лінії L 929 [11]. Об'єктом дослідження слугувала клітинна культура, інфікована відповідними штамми. Для електронно-мікроскопічного дослідження інфіковану клітинну суспензію відмивали за допомогою центрифугування у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) і фіксували упродовж 2 годин при +4 °C у 2 %-му розчині глутарового альдегіду, приготовленому на ФСБ (рН 7,3 – 7,4). Потім матеріал відмивали у фосфатному буфері і постфіксували в 1 %-му розчині чотирьохокису осмію протягом 1 години. Після зневоднювання спиртами зростаючої концентрації (30% > 96% і двічі в абсолютному спирті) клітини просочували сумішшю епон-аралдіт. Зразки, поміщені в поліетиленові капсули, заливали смолою і полімеризували при 60 °C упродовж 48 годин. Для вибору необхідної ділянки дослідження робили напівтонкі, товщиною 1 мкм, зрізи, що забарвлювали метиленовим синім і переглядали в мікроскопі МБИ-15, оснащеному цифровою відеокамерою. Для електронної мікроскопії ультратонкі зрізи, отримані на ультрамікромомі УМТП-7, контрастували насиченим водним розчином уранілацетату і розчином цитрату свинцю за Рейнольдсом [12, 13]. Ультраструктуру клітин досліджували за допомогою електронного мікроскопу ПЭМ-125К при напрузі, що прискорює, 75 kV, оснащеного системою зйомки й аналізу зображення САИ-01А (АО «SELMI», м. Суми) на основі CCD камери DX-2 і пакету програм фірми «КАРРА», Німеччина.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для отримання інформації про ультраструктурні характеристики штамів хламідій, а також про окремі етапи циклу розвитку були здійснені комплексні морфологічні дослідження за допомогою методу електронної мікроскопії. У процесі електронно-мікроскопічних досліджень проведено вивчення характеру інфікування клітинних культур у залежності від попередньо встановленого виду збудника упродовж аналогічного інтервалу часу після зараження клітин, а також було визначено морфологічні характеристики окремих штамів хламідій. Для порівняння ультраструктурних особливостей застосовувались штами, вилучені з однакових екоотопів ураження. При проведенні електронної мікроскопії виявляли цитоплазматичні включення, вміст яких відрізнявся у різні строки розвитку інфекції.

У препаратах ультратонких зрізів клітин, інфікованих штамми Ar1-Z та Ar2-K, були отримані морфологічні характеристики збудників, первинно вилучених з синовіальної рідини хворих з артрологічною патологією. На 48 годину культивування у культурі клітин L 929 сформувалися включення, морфологічно характерні для виду *C. trachomatis*. Частинки мікроорганізму у інфікованих клітинах розташовувалися усередині єдиних цитоплазматичних вакуолей, обмежених тришаровою мембраною. Як видно на рис. 1 та 2, цитоплазматичні включення різняться за виглядом, щільністю упакування морфологічних структур збудника та розмірами внутрішньоклітинних мікроколоній. Паразитофорні вакуолі, котрі сформувалися у клітинах L 929, заражених штамом Ar2-K (рис.1), за своїми розмірами перевищують клітинні ядра, займають більшу частину цитоплазми, відтискуючи ядро на периферію клітини та фактично утворюючи його вдавлення, на відміну від внутрішньоклітинних включень штаму Ar1-Z (рис.2), кінетика росту яких значно повільніша і внаслідок цього вони мають явно менший розмір, ніж ядро клітини. Ці дані співпадають з результатами експериментів по визначенню динаміки розвитку цих штамів у системі *in vitro* при вивченні культуральних особливостей.

На електронних фотографіях (рис. 3 та 4) ретикулярні тільця штамів Ar1-Z та Ar2-K являли собою округлі, частково витягнуті форми, з варіаціями середніх показників діаметру 400-1000 нм, оточені зовнішньою трьохшаровою мембраною. Під цією мембраною часто проглядалася друга внутрішня мембрана, що має аналогічну будову. Вміст РТ представлений грану-

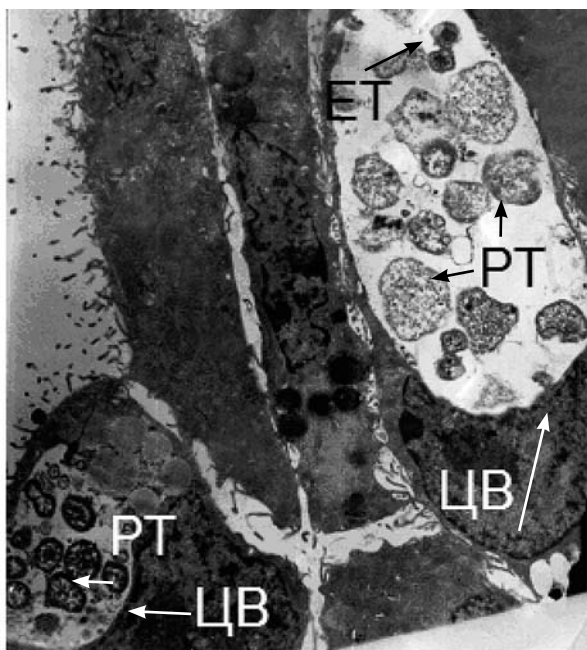


Рис. 1. Цитоплазматичні включення штаму Ar2-K у клітинах L929, 48 годин після інфікування. Масштаб – 1 мкм

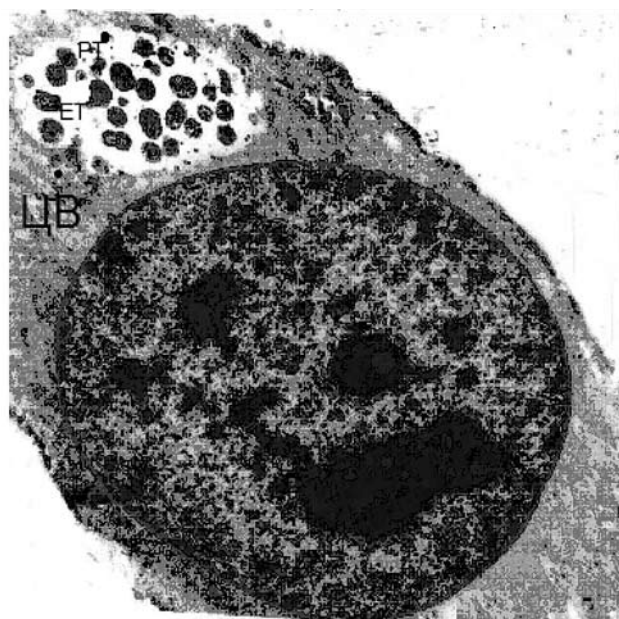


Рис. 2. Цитоплазматичні включення штаму Ar1-Z у клітинах L929, 48 годин після інфікування. Масштаб – 1 мкм

лярним та фібрилярним компонентами. Фібрили товщиною 20-30 Å відповідають ДНК збудника. Гранулярний компонент, представлений гранулами діаметром 100-200 Å, можливо розглядати як рибосоми. Часто спостерігалися РТ у стані бінарного розподілу. Елементарні тільки являли собою округлі або злегка овальні утворення розміром 200-300 нм, обмежені трьохшаровою мембраною. На деяких ділянках була роз-

ташована друга обмежуюча мембрана. Було відзначено різну щільність для електронів внутрішнього складу ЕТ, котре могло бути розподілено на хламідієплазму, у якій чітко диференціювалися рибосоми, та ДНК-утримуючий нуклеоїд, що відрізнявся найбільшою електронною щільністю, і звичайно був розташований ексцентрично. Також у включеннях спостерігалися форми, що за своєю ультраструктурою були перехідними між РТ та

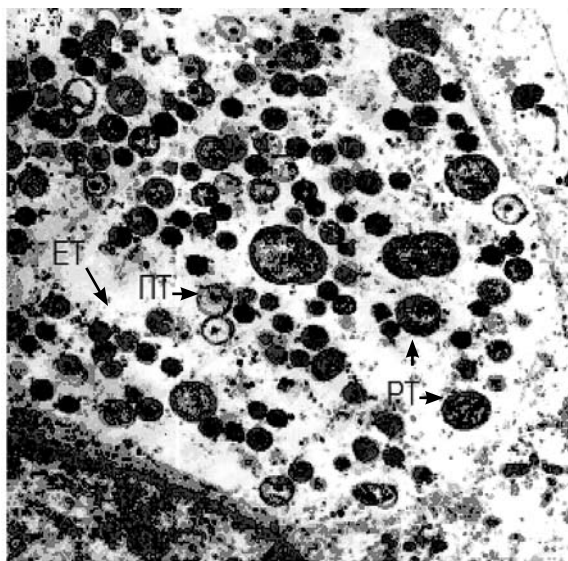


Рис. 3. Фрагмент цитоплазматичного включення штаму Ar2-K у клітинах L929, 48 годин після інфікування, у якому розташовані структури збудника на різних стадіях розвитку. Масштаб – 1 мкм

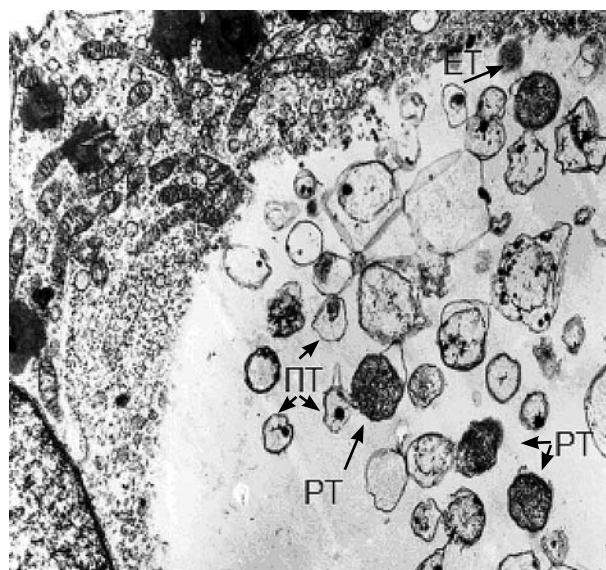


Рис. 4. Фрагмент цитоплазматичного включення штаму Ar1-Z у клітинах L929, 48 годин після інфікування, у якому розташовані структури збудника на різних стадіях розвитку. Масштаб – 1 мкм

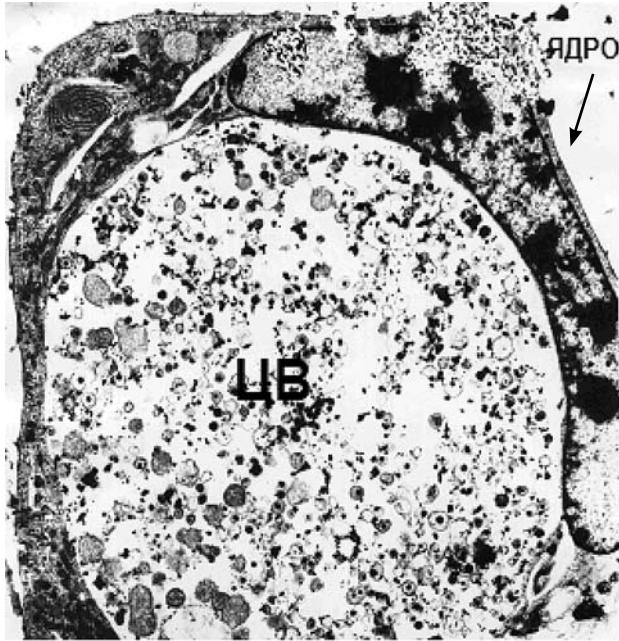


Рис. 5. Внутрішньоклітинне включення урогенітального штаму UG-с у клітинах L929 після 64 годин інкубації. Масштаб – 0,1 мкм

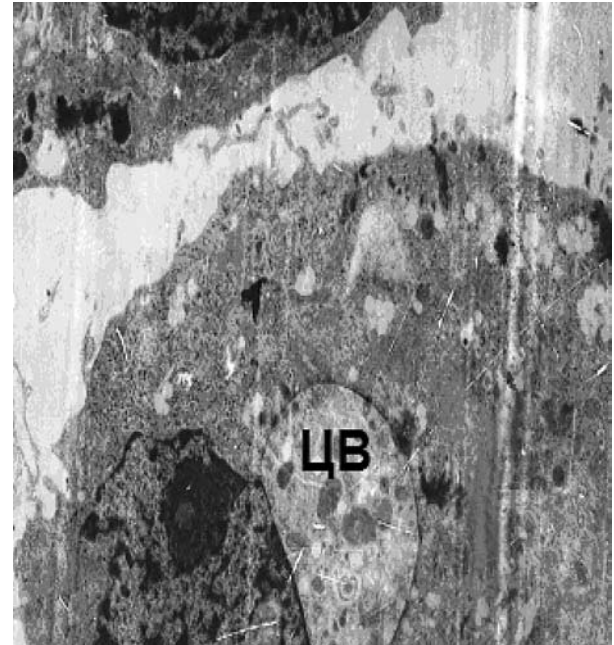


Рис. 6. Внутрішньоклітинне включення урогенітального штаму Ки у клітинах L929 після 64 годин інкубації. Масштаб – 0,1 мкм

ЕТ. Їх мембранні структури були схожими з мембранами РТ, нуклеоїд у вигляді щільного тіла діаметром 150 нм розташовувався у центрі. У деяких ПТ нуклеоїд був оточений світлою зоною, утримуючою фібрилярний компонент. На рисунках помітна різниця у щільності заповнення мікроколоній та у формі РТ штамів, вилучених з аналогічних джерел. Принципових відмінностей ультраструктурних характеристик дослідженого мікроорганізму не встановлено.

При електронно-мікроскопічному дослідженні ультраструктурних особливостей лабораторних штамів, вилучених з урогенітальних осередків ураження, отримані результати були аналогічними тим висновкам, що були зроблені відносно патогенного потенціалу даних ізолятів при формуванні внутрішньоклітинних включень на перещеплюваних лінійних культурах. Так, на електронних фотографіях штаму UG-с, вилученого із зішкрябного матеріалу цервікального каналу, спостерігається щільне заповнення цитоплазматичних вакуолей морфологічними структурами збудника. Колонії мікроорганізму мають розміри, які перевищують розмір ядра у клітинах вже після 48 годин інкубації, а через 64 години культивування утворюються розвинуті включення патогену, у котрих спостерігаються у більшості елементарні тільця, але присутні і ретикулярні, і перехідні форми хламідій (рис. 5). Ядро клітині зміщене зростаючим включенням та розташоване

на її периферії, фактично завершений час генерації нового покоління збуднику. При вивченні ультраструктурних характеристик штаму Ки, ізольованого з уретри від хворого з хронічним уретропростатитом, були відзначені відмінності також на рівні формування цитоплазматичних включень, котрі відрізнялися помітно меншими розмірами та кількістю морфологічних структур патогенного агенту (рис. 6).

На електронних фотографіях (рис. 7 та 8) ретикулярні тільця штаму UG-с являли собою округлі форми, з варіаціями середніх показників діаметру 400-1000 нм, оточені зовнішньою трьохшаровою мембраною. Така форма не була строго обов'язковою, оскільки спостерігалась висока щільність упакування структур хламідій і РТ приймали різноманітну форму, що підтверджує пластичність їхньої клітинної стінки. Часто зустрічались РТ у стані бінарного розподілу. Між клітинною стінкою та цитоплазматичною мембраною РТ визначався вузький цитоплазматичний простір, що обмежував протопласт РТ, утримуючий цитоплазму з рибосомами та нуклеоїд, представлений фібрилами ДНК. Елементарні тільця являли собою сферичні утворення розміром 200-300 нм, обмежені трьохшаровою мембраною. На деяких ділянках була розташована друга обмежуюча мембрана. ДНК-утримуючий нуклеоїд відрізнявся найбільшою електронною щільністю, і звичайно мав центральне розташування. Також у включеннях спо-

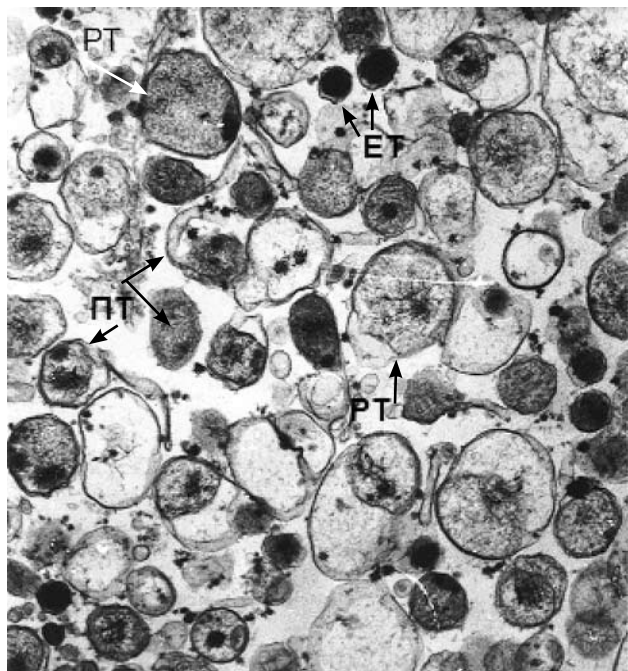


Рис. 7. Фрагмент цитоплазматичного включення штаму штаму UG-с у клітинах L929 після 64 годин інкубації. Розходження розмірів та форм морфологічних структур. Масштаб – 1 мкм

стерігалися форми, що за своєю ультраструктурою були перехідними між РТ та ЕТ. ПТ мали дещо більший розмір, ніж ЕТ. Їх мембранні структури були схожими з мембранами РТ. Для нуклеоїда була характерна різна ступінь конденсації генетичного матеріалу. Ступінь дисперсії нуклеоїда була найбільш виражена на пізніх етапах перетворення ПТ

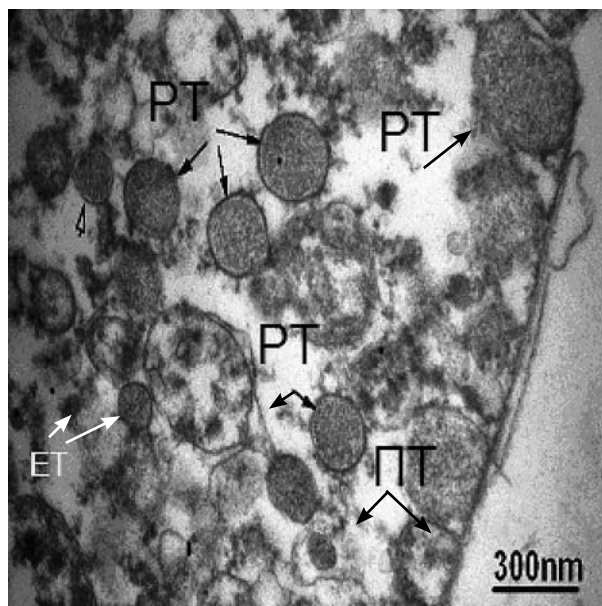


Рис. 9. Фрагмент цитоплазматичного включення штаму штаму Ku у клітинах L929 після 64 годин інкубації. Розходження розмірів та форм морфологічних структур

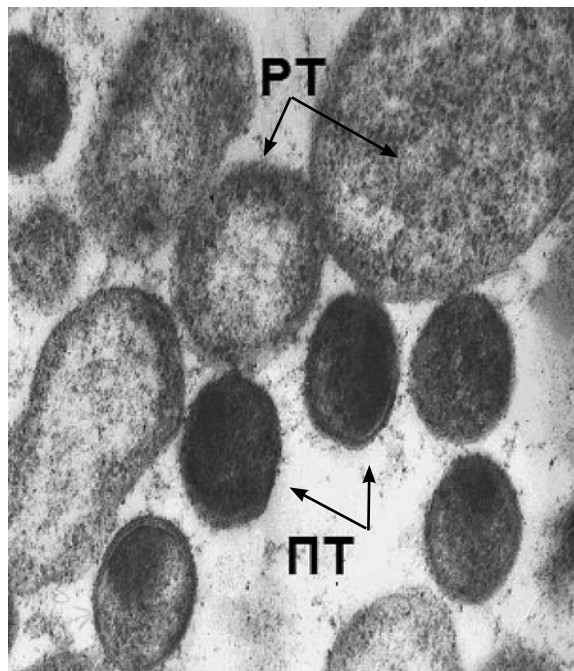


Рис. 8. Ретикулярні та перехідні форми штаму UG-с, світлими стрілками позначені РТ на стадії початку розподілу. Масштаб – 1 мкм

у РТ. Після 60 годин культивування визначався центрально розташований щільний нуклеоїд діаметром 150 нм з радіально розбіжними фібрилами. У деяких ПТ нуклеоїд був оточений світлою зоною, утримуючою фібрилярний компонент.

При дослідженні культуральних зразків, інфікованих штамом Ku, не відзначено принци-

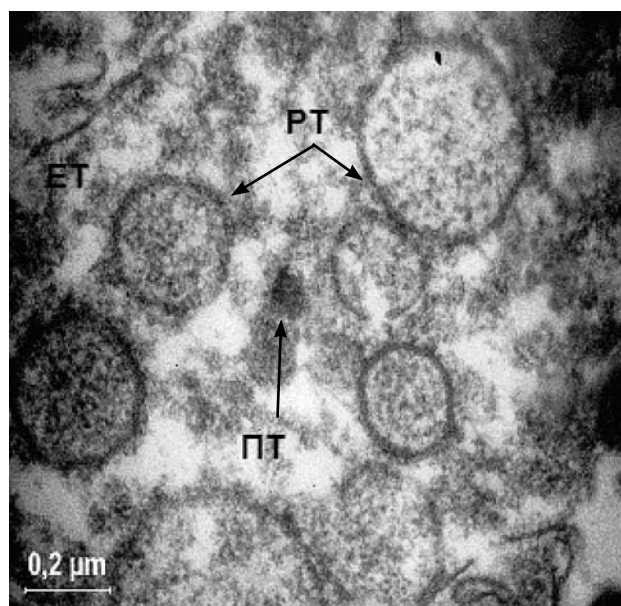


Рис. 10. Ретикулярні, елементарні та перехідні форми штаму Ku

пових відмінностей будови морфологічних форм збудника. Частинки мікроорганізму мали дещо менші розміри у порівнянні з штамом UG-с. Можливо це пов'язане саме з властивостями, котрі стосуються строків продуктивного циклу розвитку, оскільки різняться терміни генерації інфекційних форм нового покоління, що є рисою окремих штамів хламідій.

Після 60 годин культивування усіх вищеописаних штамів хламідій, більшість клітин інфікованого моношару лінії зберігали свою цілісність, а включення збудника містили усі форми, котрі зустрічаються упродовж циклу розвитку. Далі клітини починали руйнуватися, вивільняючи хламідії, що розпочинають новий життєвий цикл, поширюючи інфекцію у ще неінфіковані клітини.

ВИСНОВКИ

Таким чином, за результатами електронно-мікроскопічного дослідження встановлено, що штами, вилучені від хворих з урогенітальною та артрологічною патологіями, володіють морфологічними ознаками, характерними для представ-

ників виду *C. trachomatis*. Вивчені агенти проходять у цитоплазматичних включеннях складний цикл розвитку з послідовною зміною морфологічних структур. Ці дані співпадають з результатами наших експериментів по визначенню динаміки розвитку штамів у системі *in vitro* при вивченні культуральних особливостей. Отримані результати були аналогічними тим висновкам, що були зроблені відносно патогенного потенціалу даних ізолятів при формуванні внутрішньоклітинних включень на перещеплюваних лінійних культурах. При електронно-мікроскопічному дослідженні клітин, інфікованих штамами хламідій, отриманих з різних осередків ураження, які віднесено до виду *Chlamydia trachomatis*, наглядно продемонстрована різниця між штамами на рівні формування включень, щільності заповнення морфологічними структурами збудника, розмірами різних життєвих форм паразиту, часом завершення генерації нового покоління, на відміну від будови морфологічних форм мікроорганізму, де не відзначено принципових відмінностей на ультраструктурному рівні.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сельникова О.П., Поліщук О.І., Колтукова Н.В. Музей патогенних для людини мікроорганізмів: принципи формування та перспективи розвитку // Методи одержання чистих культур мікроорганізмів та їх довгострокового зберігання в колекціях: Зб. робіт співробітників Музею патогенних для людини мікроорганізмів. 2000. – Вип. 1. – С. 4-17.
2. Мавров І.І., Болотная Л.А., Сербина І.М. Основы диагностики и лечения в дерматологии и венерологии: Руководство для врачей, интернов и студентов. – Харьков: Факт, 2007. – 792 с.
3. Campbell L.A., Kuo C.C., Grayston J.T. Chlamydia pneumoniae and cardiovascular disease // Emerging Infectious diseases. – 1998. – Vol. 4, № 4. – P. 571-579.
4. Blasi F., Tarsia P., Aliberti S. Chlamydia pneumoniae // Clin. Microbiol. Infect. – 2009. – № 15. – P. 29-35.
5. Chlamydia pneumoniae как патогенетический фактор риска в развитии атеросклероза и его осложнений / Нагорнев В.А., Мальцева С.В., Селиверстова В.Г. [и др.] // Архив патологии 2004. – № 2 – С. 52-60.
6. Мавров Г.И. Хламидийные инфекции: биология возбудителей, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика. Монография. – Киев: 2005. – 524 с.
7. Шаткин А.А., Мавров И.И. Урогенитальные хламидиозы. – Киев: Здоров'я, 1983. – 200 с.
8. Ultrastructural study of endocytosis of Chlamydia trachomatis by McCoy cells / Hodinka R.L., Davis C.H., Choong J. [et al] // Infection and Immunity. 1988. – Vol. 56, № 6. – P. 1456-1463.
9. Wolf K., Fischer E., Hackstadt T. Ultrastructural analysis of developmental events in Chlamydia pneumoniae – infected cells // Infection and Immunity. – 2001. – Vol. 68, № 4. – P. 2379-2385.
10. Cocchiaro J.L., Valdivia R.H. New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms // Cellular Microbiology. – 2009. – № 11(11). – P. 1571-1578.
11. Збудники хламідіозів: особливості методологічних заходів при ізоляції та ідентифікації штамів мікроорганізму / Кутова В.В., Гончаренко В.В., Джораєва С.К. [та ін.] // Методи одержання чистих культур мікроорганізмів та їх довгострокового зберігання в колекціях. Роботи співробітників Музею патогенних для людини мікроорганізмів. 2004. – Вип. 3. – С. 80-84.
12. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH in electron microscopy // J. Cell Biology. – 1963. – Vol. 17. – P. 208-213.
13. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. – 1975. – М.: Мир, 324 с.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ ШТАМОВ ХЛАМИДИЙ

ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF LABORATORY STRAINS OF CHLAMYDIA

В.В. Гончаренко, В.В. Кутовая,
С.К. Джораева, О.Н. БелоконовV.V. Goncharenko, V.V. Kutova,
S.K. Dzhoraeva, O.M. Bilokon

Резюме. В статье представлены результаты электронно-микроскопических исследований ультраструктуры лабораторных штаммов хламидий. Показана вариабельность морфологических характеристик возбудителей, изолированных из разных экотопов организма человека, при разнообразных нозологических формах заболеваний хламидийной этиологии.

Resume. The electron microscopy study results of ultrastructure of laboratory strains of Chlamydia is adduced in the article. It is shown the variability of morphological characteristic of the causative agents isolated from diverse ecotopes of the human organism with different nosological forms of the chlamydial etiology diseases.

Ключевые слова: лабораторные штаммы хламидий, морфологические характеристики возбудителя, электронно-микроскопические исследования.

Keywords: the laboratory strains of Chlamydia, the morphological characteristic of the causative agents, the electron microscopy study.

Новини медицини

Чудо-лекарство от облысения

Ученые вплотную подошли к созданию лекарства от облысения, которое сможет в короткий срок вернуть облысевшему мужчине волосы. Выход препарата может состояться на рынок уже через пять лет.

Конечно, большинство лысых представителей сильного пола презрительно скривят губы при чтении этих строк – они, наверняка, слышали подобные новости не раз. Вот только теперь речь идет о действительно эффективном средстве, которое действительно скоро появится в продаже. Причем его создатели уверяют, что оно восстанавливает волосяной покров необыкновенно быстро.

Лабораторные анализы вещества под названием *astressin-B* дали «ошеломляющие» результаты в деле восстановления волос. Отметим, что эффект наблюдался всего после одной инъекции и всего через пять дней! Любопытно, что изначально *astressin-B* и не рассматривался в качестве лекарства от облысения, так как ученые исследовали этот препарат на предмет предотвращения проблем с желудком, связанных со стрессом.

Правда, пока что мощный эффект восстановления волос достигнут на мышах, и впереди остаются клинические исследования на людях. Вот почему лекарство может выйти на рынок не раньше чем через 5 лет. Как говорят ученые, препарат будет особенно эффективен для лечения мужского очагового облысения, от которого с возрастом страдает две трети всех мужчин. Но *astressin-B* сможет применяться также против алопеции и у мужчин, и у женщин.

Творцами чудо-лекарства от облысения стали ученые из Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе. Они изучали мышей, у которых наблюдались расстройства желудка, связанные с выделением гормона стресса.