

УДК 579.882 + 57.082.542

## ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ХЛАМІДІЙ, ВИЛУЧЕНИХ З РІЗНИХ ОСЕРЕДКІВ УРАЖЕННЯ

Джорасва С.К.

ДУ „Інститут дерматології та венерології АМН  
України”, м. Харків

Проблема хламідіозів людей і тварин у значній мірі обумовлена довготривалим персистентним перебігом, поліорганним ураженням, суттєвими негативними медико-соціальними наслідками [1, 2]. За свідченням Всесвітньої Організації охорони здоров'я, у світі щорічно реєструється близько 90 млн. хламідіозів, за далеко не повними даними статистики, розповсюдженість цього захворювання в Україні становить 70,2 на 100 тис. населення [3]. 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-рухового апарату, серцево-судинної системи тощо [4–7].

У багатьох країнах світу проводяться дослідження, спрямовані на удосконалення підходів щодо вилучення хламідій з урогенітального тракту та екстрагенітальних осередків ураження [8–11]. Культуральні методи незамінні для уточнення етіологічного діагнозу при складних формах захворювання та надійності контролю за ефектом лікування. Можливість ізоляції живих форм збудника вигідно відрізняє культуральну діагностику від інших методів дослідження.

Тому, метою нашого дослідження стало вилучення, ідентифікація та вивчення особливостей циклу розвитку і морфологічних характеристик збудника, виділеного з різних осередків ураження на перещеплюваних лінійних культурах клітин.

### Матеріали та методи

У нашому дослідженні у якості біологічного матеріалу для вилучення хламідій використовували зішкряби зі слизових оболонок урогенітального тракту (2 зразки), синовіальні рідини (7 зразків), отримані від хворих, що знаходилися на стаціонарному лікуванні у ДУ „Інститут дерматології та венерології АМН України” з приводу урогенітального хламідіозу і хвороби Рейтера; судинний матеріал (2 зразки), 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 Her-2, згідно загальноприйнятій методиці [12]. 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”<sup>®</sup>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.

Для електронно-мікроскопічного дослідження клітинну суспензію відмивали за допомогою центрифугування і фіксували упродовж 2 годин при +4 °C у 2 % розчині глутарового альдегіду, виготовленому на фосфатно-сольовому буфері (ФСБ), рН 7,3–7,4. Потім матеріал відмивали у ФСБ та постфіксували у 1% розчині чотирьохокисі осмію на протязі 1 години [13].

Після зневоднення спиртами зі збільшенням концентрації (30% → 96% та двічі у абсолютному спирті) клітини просочували сумішню епон-аралдіт. Зразки, які поміщені у поліетиленові капсули, заливали смолою та полімеризували при 60 °C упродовж 48 годин. Для вибору необхідної ділянки дослідження робили напівтонкі, товщиною 1 мкм, зрізи, котрі забарвлювали метиленовим синім та проглядали у мікроскопі МБІ-15. Для електронної мікроскопії ультратонкі зрізи, отримані на ультрамікротомі УМТП-7, контрастували насиченим водним розчином ураніл ацетату та розчином цитрату свинцю за Рейнольдсом [14]. Ультраструктуру клітин досліджували за допомогою електронного мікроскопа ПЭМ-125Д за напругою, що прискорює, 75 к, обладнаному системою знімання й аналізу зображення САИ - 01А (АО “SELMF”, м. Суми) на основі CCD камери DX- 2 і пакету програм фірми «КАРРА», Німеччина.

### Результати та їх обговорення

При визначенні видової належності збудників, виділених з урогенітального тракту, синовіальних рідин та судинних зразків, за методом ПЛР було отримано наступні дані (рис.1–2). 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.

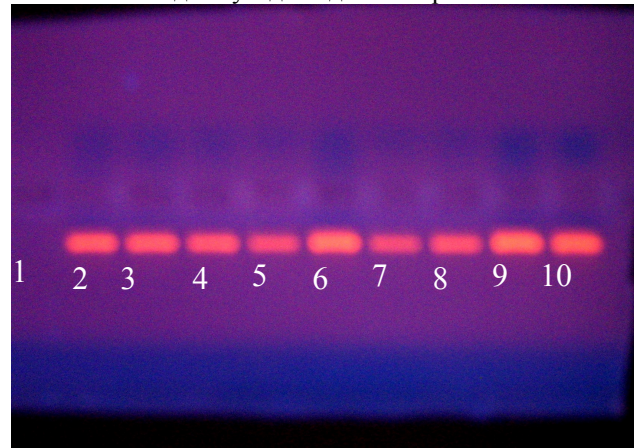


Рис. 1. Належність зразків до виду *S.trachomatis*: 1 – негативний контроль системи, 2 – синовіальна рідина хворого І., 3 – синовіальна рідина хворого С., 4 – синовіальна рідина хворого З., 5 – синовіальна рідина хворого Д., 6 – си-

новіальна рідина хворого К., 7 – зішкряб з уретри хворого В., 8 – зішкряб із цервікального каналу хворої М., 9 – лабораторний штам *S.trachomatis* UGC, 10 – позитивний контроль системи.

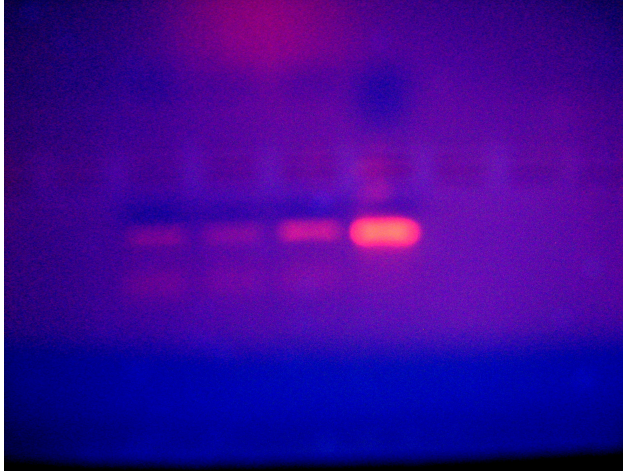


Рис. 2. Належність зразків до виду *S.pneumoniae* 1 – негативний контроль системи, 2 – аорта хворого К., 3 – поворотна стегнова артерія хворого К., 4 – лабораторний штам *S.pneumoniae* K6, 5 – позитивний контроль системи

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 уrogenітального тракту та синовіальних рідин, було отримане підтвердження того, що вони належать до виду *S.trachomatis*. На 48 годину культивування в культурі клітин L 929, інфікованої зішкрябним матеріалом з уrogenітального 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.3.). Після проникнення ЕТ збудника всередину чутливої до інфікування клітини, вони 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. 4). 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. Внутрішній

уміст ПТ складався з рибосом та нуклеоїда, для якого характерний різний ступінь конденсації генетичного матеріалу (рис. 5).

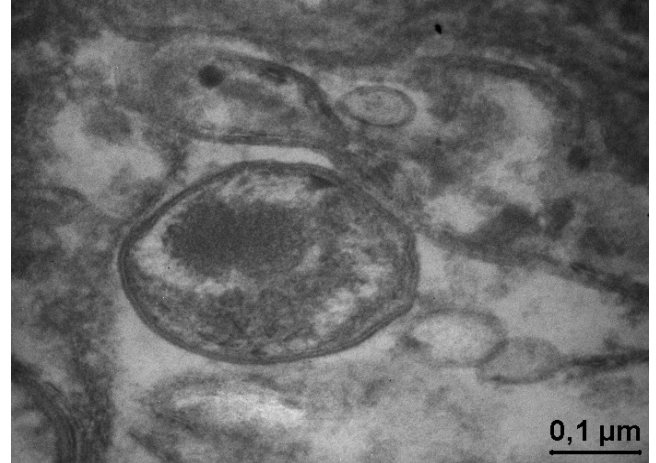


Рис. 3. Елементарне тільце *S.trachomatis* у клітині лінії L 929, інфікованої матеріалом з уретри хворого В. (48 годин культивування). N-нуклеоїд

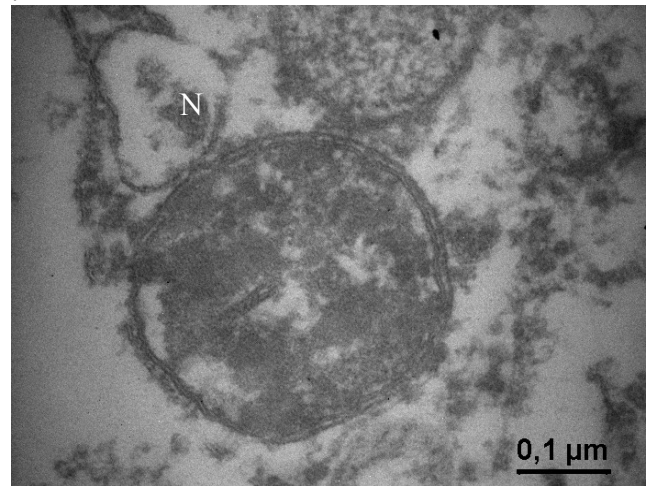


Рис. 4. Ретикулярне тільце *S. trachomatis* у клітині лінії L 929, інфікованої матеріалом з уретри хворого В. (48 годин культивування).

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. 6).

Близько 72 годин культивування клітини інфікованого моношару руйнувалися, вивільняючи хламідії, тим самим починаючи новий життєвий цикл та поширюючи інфекцію в ще неінфіковані клітини (рис. 7). 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

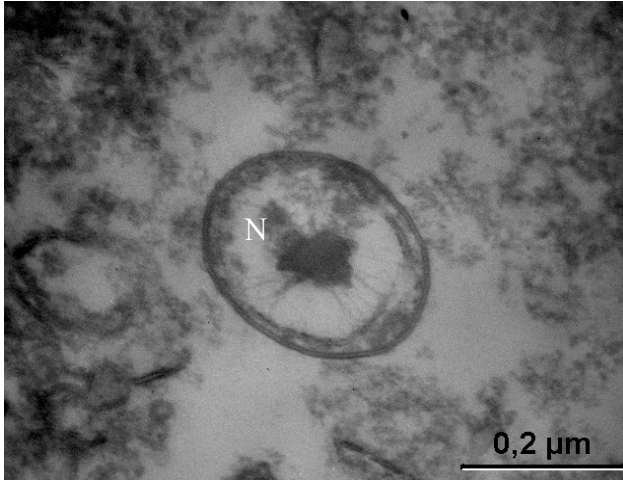


Рис. 5. ПТ на пізніх стадіях циклу розвитку у клітині лінії L929, інфікованій матеріалом з уретри хворого В. (60 годин культивування). N-нуклеоїд

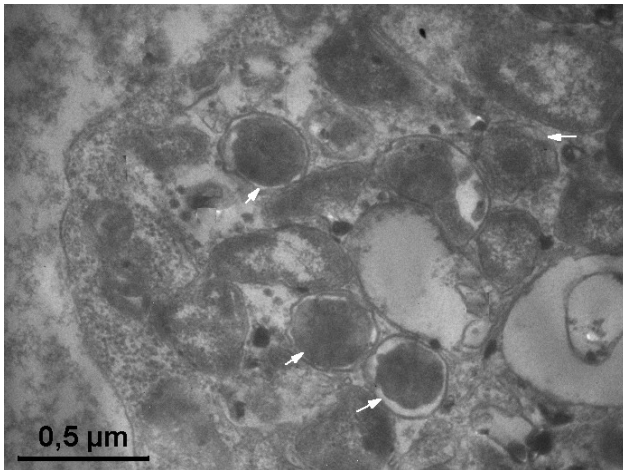


Рис. 6. Фрагмент цитоплазматичного включення збудника у клітині лінії L 929, інфікованій матеріалом з уретри хворого В., що містить мікроорганізм на різних стадіях розвитку. (60 годин культивування)

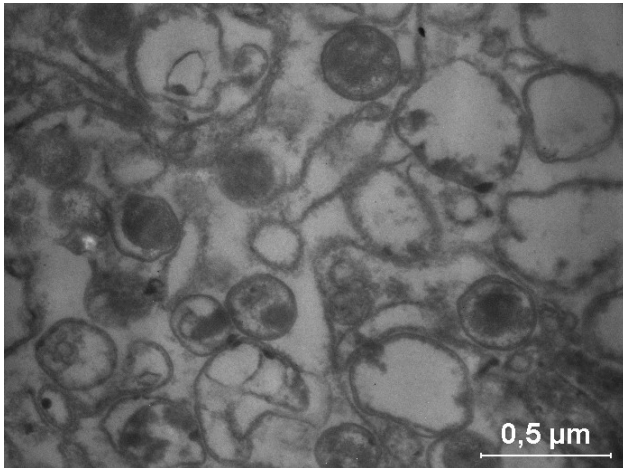


Рис. 7. Вивільнення хламідій зі зруйнованої клітки (72 години культивування).

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. 8), що обумовлена, головним чином, великим периплазматичним простором завдяки гнучкій і плейоморфній зовнішній мембрані. Ретикулярні тільця цих мікроорганізмів являли собою округлі структури із середніми розмірами 400-500 x 700-900 нм. (рис. 9). 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*.

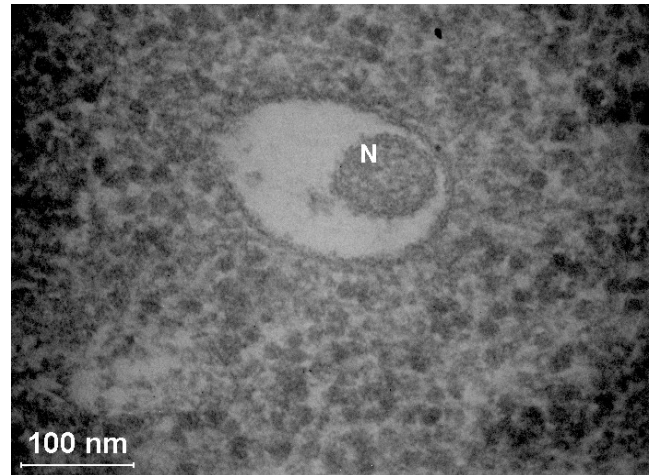


Рис. 8. ЕТ збудника у клітині культури Her-2, інфікованій матеріалом аорти, отриманим від хворого К. (60 годин культивування). (N-нуклеоїд).

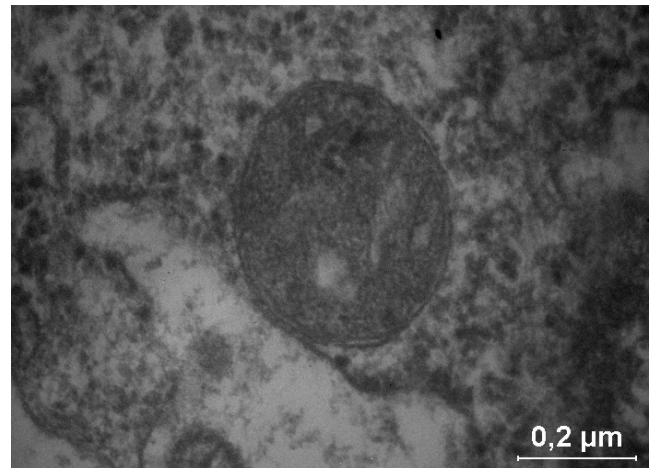


Рис. 9. РТ у клітині лінії Her-2, інфікованій матеріалом аорти хворого К. (84 години культивування).

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

#### Висновки

1. Вивчення особливостей циклу розвитку і морфологічних характеристик ізолятів хламідій, ви-

ділених з різних осередків ураження в системі перещеплених клітинних культур, показало, що дані збудники мають різну видову належність. Хламідії, виділені з урогенітального тракту і синовіальної рідини колінного суглобу, належать до представників виду *S. trachomatis*, а мікроорганізми, виділені з операційного сегменту аорти та нижніх кінцівок – *S. pneumoniae*;

2. Виявлення *S. pneumoniae* в зразках аорти з атеросклеротичними ураженнями та артерій нижніх кінцівок при синдромі Леріша, наочно демонструють зв'язок між *S. pneumoniae* і можливим розвитком атеросклерозу;

3. Належність хламідій, виділених із синовіальної рідини колінного суглобу пацієнтів, до виду *S. trachomatis* підтверджує імовірність гематогенного поширення збудника з урогенітального тракту з можливим розвитком хвороби Рейтера.

### Література

1. Мавров И.И. Современное состояние проблемы хламидийной инфекции / И. И. Мавров // Международный медицинский журнал. – 2003. – № 3. – С. 101–105.
2. Мавров И.И. Ключевые проблемы лабораторной медицины в дерматологии и венерологии // Дерматология та венерология. – 2008. – № 3(41). – С. 8–13.
3. Мавров Г. И. Хламидийні інфекції: біологія збудників, патогенез, клініка, діагностика, лікування та профілактика / Г. И. Мавров. – К., 2005. – 524 с. – Рос. мовою.
4. Мавров И. И. Новые подходы к этиопатогенезу ишемической болезни сердца / И. И. Мавров, А. П. Белозоров // Дерматология та венерология. – 2004. – № 3. – С. 3–6.
5. Савенкова М. С. Хламидийная инфекция на пороге третьего тысячелетия / М. С. Савенкова // Детские инфекции. – 2004. – № 1. – С. 36–42.
6. 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.
7. Black C. M. Current method of laboratory diagnosis Chlamydia trachomatis infection / C. M. Black // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol. 10, № 1. – P. 160–184.
8. Сидорович С. Ю. Культура клеток как инструмент для определения хламидийной инфекции / С. Ю. Сидорович // Вестник дерматологии и венерологии. – 2001. – № 6. – С. 20–25.
9. Ramirez J. A. Isolation of Chlamydia pneumoniae from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis / J. A. Ramirez // Ann. Intern. Med. – 1996. – № 125. – P. 979–982.
10. Wolf K. Ultrastructural analysis of developmental events in Chlamydia pneumoniae-infected cells / K. Wolf, E. Fischer, T. Hackstadt // Infection & Immunity – 2001. – Vol. 68, № 4. – P. 2379–2385.
11. Isolation and continuous growth of Chlamydia pneumoniae from arterectomy specimens / P. Apfalter, M. Loidl, R. Nadrshal [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis. – 2000. – № 19. – P. 305–308.
12. Виділення, ідентифікація та умови довгострокового зберігання *Chlamydia trachomatis* та *Chlamydia pneumoniae* : [метод. рекомендації] / уклад.: І. І.

Мавров, В. В. Кутова, В. В. Гончаренко, С. К. Джораєва. – К. : Знання України, 2007. – 24 с.

13. Уикли Б Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. – М. : Мир, 1975. – 324 с.

14. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH in electron microscopy / E. S. Reynolds // J. Cell Biology. – 1963. – Vol. 17. – P. 208–213.

УДК 579.882 + 57.082.542

### ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ХЛАМИДИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ОЧАГОВ ПОРАЖЕНИЯ

Джораєва С.К.

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 *S. trachomatis* с развитием болезни Рейтера и взаимосвязь между *S. pneumoniae* и патогенезом атеросклероза.

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

УДК 579.882 + 57.082.542

### ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ХЛАМІДІЙ, ВИЛУЧЕНИХ З РІЗНИХ ОСЕРЕДКІВ УРАЖЕННЯ

Джораєва С.К.

В статті наведені дані електронно-мікроскопічного та молекулярно-біологічного вивчення хламідій, виділених з різних осередків ураження на перещеплених 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,

UDC 579.882 + 57.082.542

### THE RESEARCH OF BIOLOGICAL PARTICULARITIES OF CHLAMYDIAE ISOLATES, WHICH ISOLATED FROM DIFFERENT DESTRUCTION FOCUSES

Dzhoraeva S.K.

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 established, that agents are distinguished by morphology, cultivation condition and are applied to different species. The realized investigations are demonstrated the possibility of the *S. trachomatis* gemato-

genic dissemination for development of the Reiter's disease and the interrelation between the *C. pneumoniae* and pathogenic of atherosclerosis.

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