

# ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ХЛАМІДІЙ РІЗНИХ ВИДІВ НА РОЗВИТОК АПОПТОЗУ У КЛІТИННИХ КУЛЬТУРАХ L 929 ТА НЕР–2

**Г.І.Маєров, С.К.Джорасва, В.В.Гончаренко**

*ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України»,*

**Резюме:** Проведено вивчення впливу різних видів хламідій на розвиток апоптозу у клітинних культурах L 929 та Нер–2. Показано, що для штаму *S. trachomatis* UGc характерно пригнічення клітинної загибелі у перещеплюваній культурі у перші 24 години розвитку інфекції. Штам *S. pneumoniae* К6 виявляє антиапоптозну дію упродовж усього періоду спостереження (96 годин). Це пов'язано з більш уповільненим циклом розвитку даного виду хламідій та меншою швидкістю виснаження живильних та енергетичних субстратів клітини.

**Ключові слова:** апоптоз, клітинна культура L 929, клітинна культура Нер–2, штам *S. trachomatis* UGc, штам *S. pneumoniae* К6.

## ВСТУП

Хламідії– нерухомі, облігатні внутрішньоклітинні коковидні патогенні бактерії, що відносяться до еубактерій, їх репродукція знаходиться у тісній залежності від клітини-хазяїна. Унікальний цикл розвитку цих мікроорганізмів, що складається з чергування функціонально і морфологічно різних форм – елементарних (ЕТ) і ретикулярних тілець (РТ), здатність до внутрішньоклітинного паразитизму визначає їх біологічну своєрідність та самостійне становище у світі мікроорганізмів. Цей збудник розмножується тільки усередині паразитофорної вакуолі, що розташовується в цитоплазмі клітин людини, ссавців, птахів і амеб. [3, 4, 13].

Багато факультативних внутрішньоклітинних паразитів при потраплянні у клітини запускають процеси некрозу та апоптозу. Некроз спричиняється позаклітинними факторами, а апоптоз – генетично запрограмована смерть клітини, регулюється внутрішньоклітинними факторами. Таким чином кліти-

ни руйнуються не під впливом зовнішнього екстремального фактору, а у результаті дії регуляторних систем, які тригерно вмикають енергетично залежні механізми аутодеструкції або від безпосереднього контакту з біологічно активною речовиною, яка прямо або непрямо впливає на поділ клітин. Це означає, що у геномі клітин закладена програма, реалізація якої у визначений термін їхнього існування призводить до експресії одного або декількох генів та створенню продуктів, що спричиняють їхню загибель [1, 7, 9]. Морфологічні прояви апоптозу *in vivo* та *in vitro* подібні [2], тому клітинні культури є зручним об'єктом для вивчення природи цього явища. Існує декілька механізмів розвитку апоптозу у клітинних культурах, наприклад, відсутність у ростовому середовищі ембріональної телячої сироватки (ЕТС), збільшення щільності розташування клітин у культурі при переході від логарифмічної до стаціонарної фази росту, коли на куль-

туральній підложці не залишається місця для нового покоління клітин і повністю ви-снажується ростове середовище. Інгібітори синтезу білка та РНК також запобігають загибелі клітин за механізмом апоптозу, але є винятки: актиноміцин D та деякі інші інгібітори трансляції та транскрипції. Основним моментом у загибелі клітин за механізмом апоптозу є особливе ураження хроматину – правильна міжнуклеосомальна фрагментація ДНК, унаслідок активації Ca-Mg залежної нуклеази [1, 10-12].

Відомо, що при інфекційній патології апоптоз - це протективна реакція організму, направлена на запобігання розповсюдження інфекції. Придушення апоптозу призводить до дисемінації збудника у різні тканини та органи, розповсюдження інфекційного процесу, виживання патогену та його персистенції [11, 12]. До цих пір не з'ясовано, яким чином інфіковані хламідіями клітини не

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для проведення дослідження використовували лабораторний штам *S.trachomatis* UGc, отриманий у лабораторії мікробіології ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН У» та лабораторний штам *S.pneumoniae* K6, отриманий з Науково-дослідного інституту епідеміології та мікробіології ім. М.Ф.Гамалей РАМН, Москва. Збудники культивувались на чутливих клітинних лініях за стандартною методикою [8]. Особливістю культивування лабораторного штаму *S.pneumoniae* K6 було використання безсироваткового середовища. Упродовж виконання експерименту клітинні культури було розподілено на групи:

1 група – контроль – неінфікована клітинна культура L929 або Нер-2, в залежності від виду збудника

2 група – дослідна – добова культура, інфікована лабораторним штамом *S.trachomatis* UGc або *S.pneumoniae* K6 у дозі 1 ВУО/мл.

3 група – дослідна - добова культура, інфі-

елімуються в умовах імунокомпетентного організму. Завдяки дослідженням останніх років стає очевидним, що контроль хламідіями клітинної загибелі є одним із головних механізмів відвернення від атаки захисних факторів макроорганізму. У експериментах *in vitro*, проведених на різних клітинних моделях декількома групами дослідників, було показано, що хламідії захищають епітеліальні клітини від апоптозу, спричиненого як зовнішніми, так і внутрішніми сигналами, такими як фактор некрозу пухлин- $\alpha$ , стауроспорин, етопозид, гранзим В/перфорин, УФ-опромінювання. Крім того, ступінь апоптозу залежить від кількості інфекційного матеріалу та умов культивування [1, 3, 6, 14].

**Метою** дослідження стало вивчення впливу хламідій різних видів на розвиток апоптозу у перещеплюваних клітинах ліній L929 та Нер-2.

кована лабораторним штамом *S.trachomatis* UGc або *S.pneumoniae* K6 у дозі 1 ВУО/мл. Середовище, у якому проводилося культивування збудника містило L-цистеїн-HCl у концентрації 2,5 мг/л у поєднанні з L-триптофаном у кількості 20 мг/л, розчинені попередньо на фізіологічному розчині *ex tempore* у асептичних умовах.

4 група – дослідна - добова культура, інфікована лабораторним штамом *S.trachomatis* UGc або *S.pneumoniae* K6 у дозі 1 ВУО/мл. Середовище, у якому проводилося культивування збудника, містило розчин  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  у концентрації  $10^{-9}$  Моль/л у поєднанні з L-триптофаном у кількості 30 мг/л, які готують *ex tempore* на фізіологічному розчині в асептичних умовах.

Через 48 годин культивування накривні скельця з моношаром видалляли з культуральних флаконів та забарвлювали в залежності від задач дослідження. Для оцінки ступеню інфікованості клітинного моношару

частина накривних скелець забарвлювалася за методом Мая-Грюнвальда-Гімзи [1,8]. Для вивчення апоптозу накривні скельця з моношаром послідовно забарвлювали моноклональними антитілами до родоспецифічного епітопу ЛПС хламідій та водним розчином бромістого етидію. Кількість інфікованих, живих та загиблих у результаті

апоптозу клітин підраховували за допомогою люмінесцентної мікроскопії [1]. Використання даного морфологічного тесту для оцінки розвитку апоптозу є найбільш оптимальним, оскільки дозволяє проводити аналіз розвитку апоптичних змін у клітинному моношарі з диференціюванням інфікованих та неінфікованих хламідіями клітин.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У попередніх дослідженнях нами було показано, що циклогексимід, який додається у концентрації 1,0 мкг/мл до поживного середовища для виділення збудників хламідійної інфекції, має чітко виражений проапоптозний вплив на клітини моношару. При цьому проапоптозна дія циклогексими́ду зберігається упродовж усього періоду культивування (72 години) [5]. Крім того, згідно з літературними даними, ступінь апоптозу прямо залежить від дози інфекції, що вноситься до моношару клітин [6], тому експериментально розрахована доза зараження, що дорівнює 1 ВУЕ/мл та не має цитотоксичної дії, була обрана для подальших експериментів з вивчення впливу лабораторного штаму хламідій на життєз-

датність моношару клітин [5].

У результаті проведених досліджень встановлено, що через 24 години після інфікування моношару лінії L929 штамом *S.trachomatis* UGc кількість клітин, що мали ознаки апоптозу (конденсація хроматину, фрагментація ядер) була на 12,8-14,8% нижче у всіх дослідних групах у порівнянні з контрольною культурою (табл. 1), що говорить про виражену антиапоптозну дію збудника у цей термін культивування.

На пізніх строках інфекції (48 годин) захист клітин від апоптозу не виявляється, а навпаки спостерігається помітна індукція апоптозу у всіх дослідних групах інфікованих культур.

Таблиця 1

*Вплив лабораторного штаму S.trachomatis UGc на розвиток апоптозу в культурі клітин L929 у залежності від умов культивування*

Тип культивування	Термін культивування	
	24 год. інфекції / 48 год. культури	48 год. інфекції / 72 год. культури
Культивування неінфікованої клітинної культури (% клітин з ознаками апоптозу, підрахунок на 500 клітин, n=6)	39,3±4,0	79,8±7,2
Культивування інфікованої клітинної культури (% клітин з ознаками апоптозу, підрахунок на 500 клітин, n=6)	26,2±3,2 (P<0,05)*	79,2%±3,7 (P>0,1)*
Культивування інфікованої клітинної культури з внесенням триптофану та цистеїну (% клітин з ознаками апоптозу, підрахунок на 500 клітин, n=6)	24,5±3,0 (P<0,02)*	86,3±6,2 (P>0,1)*
Культивування інфікованої клітинної культури з внесенням триптофану та цинку (% клітин з ознаками апоптозу, підрахунок на 500 клітин, n=6)	26,5±2,2 (P<0,02)*	79,5±6,0 (P>0,1)*

Примітка: \* – P наведено у порівнянні зі стандартним способом культивування.

Найбільш виражена проапоптозна дія збудника спостерігається у третій групі культур. Це можна пояснити тим, що у перші 24 години після інфікування включення збудника переважно складаються з ретикулярних тілець – метаболічно активної форми хламідій, максимально пристосованої до внутрішньоклітинного існування. У цей термін культивування збудник максимально розмножується та накопичує біомасу. Оскільки збудник отримує від клітини-хазяїна амінокислоти та інші поживні речовини, для нього необхідно, щоб клітини залишалися життєздатними та нормально функціонували. На 48 годину культивування, коли цикл розвитку майже завершений, збуднику не потрібно стримувати апоптоз або цілісність клітин моношару, оскільки збудник вивільняється та розпочинає новий цикл ін-

фікування. Отримані дані свідчать, що лабораторний штам *S.trachomatis* UGc має антиапоптозну активність тільки у перші 24 години після інфікування незалежно від умов культивування. Таким чином, при інфікуванні клітинної культури L929 лабораторним штамом *S.trachomatis* UGc спостерігається гальмування апоптозу на початку циклу розвитку хламідій (0-24 години), на більш пізніх строках інфікування (48-72 години) виявлена індукція апоптозу. Антиапоптозна дія лабораторного штаму *S.trachomatis* UGc на початку циклу розвитку та проапоптозна на 48 годину культивування не залежала від умов культивування.

На відміну від представників виду *S.trachomatis*, *S. pneumoniae* гальмує апоптоз упродовж усього часу спостереження (табл.2).

Таблиця 2

*Вплив лабораторного штаму S.pneumoniae K6 на розвиток апоптозу в культурі клітин Нер-2 у залежності від умов культивування*

Тип культивування	Термін культивування		
	24 год. інфекції / 48 год. культури	48 год. інфекції / 72 год. культури	72 год. інфекції / 96 год. культури
Культивування неінфікованої клітинної культури (% клітин з ознаками апоптозу, підрахунок на 500 клітин, n=6)	63,0±6,1	83,6±8,5	Руйнація моношару
Культивування інфікованої клітинної культури (% клітин з ознаками апоптозу, підрахунок на 500 клітин, n=6)	15,8±3,1 (P<0,001)	28,8±2,9 (P<0,001)	35,0±2,5
Культивування інфікованої клітинної культури з внесенням триптофану та цистеїну (% клітин з ознаками апоптозу, підрахунок на 500 клітин, n=6)	14,4±2,6 (P<0,001)	31,0±2,4 (P<0,001)	33,8±3,0
Культивування інфікованої клітинної культури з внесенням триптофану та цинку (% клітин з ознаками апоптозу, підрахунок на 500 клітин, n=6)	15,2±2,0 (P<0,001)	33,2±3,2 (P<0,001)	38,0±3,5

Примітка: \* – P наведено у порівнянні зі стандартним способом культивування.

Так, на 72 годину культивування збудника кількість клітин з ознаками апоптозу становила від 33,8 до 38,8% в усіх дослідних

групах, що обумовлюється особливостями тривалості циклу розвитку. Таким чином, лабораторний штам *S.pneumoniae* K6 при

культивуванні на поживному середовищі, яке не містить ЕТС, має тенденцію до значного гальмування апоптозу упродовж усього періоду культивування, тим самим забезпечуючи собі завершеність циклу розвитку у життєздатній клітині-хазяїні.

**Таким чином**, у процесі експерименту визначено, що тест-штам *C.trachomatis* UGc в першу добу культивування проявляє чітку антиапоптозну дію, що обумовлено особливостями продуктивного циклу розвитку даного виду збудника. У період інтенсивної метаболічної активності та бі-

нарного розподілу ретикулярних тілець, патогенний агент максимально користується поживними речовинами клітини, запобігаючи розвитку апоптозу. На стадії завершення репродуктивного циклу мікроб запускає проапоптозні механізми. Тест-штам *C.pneumoniae* K6 виявляє виражений антиапоптозний вплив на клітини лінії Her-2 упродовж чотирьох діб культивування, що пояснюється уповільненим циклом розвитку даного виду хламідій та меншою швидкістю виснаження живильних та енергетичних субстратів клітини.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Антиапоптозная активность хламидий / Н.А. Зигангирова, В.Р. Мартынова, Н.И. Колкова [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2005. – № 1. – С. 34–37.
2. Бережков Н. В. Апоптоз – управляемая смерть клетки // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1990. – № 12. – С. 68–77.
3. Мавров Г. І. Хламідійні інфекції: біологія збудників, патогенез, клініка, діагностика, лікування та профілактика / Г. І. Мавров. – К., 2005. – 524 с. – Рос.мовою.
4. Мавров И. И. Половые болезни: Руководство для врачей, интернов и студентов – Харьков: Факт, 2002. – 789 с.
5. Мавров І. І., Джораєва С.К. Регуляція апоптозу у клітинній культурі L 929, інфікованій штамом хламідій UGc, в залежності від умов культивування // Експериментальна та клінічна медицина. – 2009. – № 1. – С. 53–57.
6. Регуляція хламидіями апоптоза клеток хозяина / П.А. Борцов, Е.Д. Федина, Е.А. Токарская [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии – 2006. – № 4. – С. 53–58.
7. Уманский С. Р. Генетическая программа клеточной гибели: гипотеза и некоторые приложения (трансформация, канцерогенез, старение) // Успехи современной биологии. – 1982. – Т. 93, № 1. – С. 139–148.
8. Уніфікація лабораторних методів дослідження в діагностиці захворювань, що передаються статевим шляхом / під ред І.І.Маврова – Х. : Факт, 2000. – 120 с.
9. Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia psittaci* 1 / D.M. Ojcius, Ph. Souque, J-L Perfettini [et al] // J. Immunol. – 1998. – Vol. 161. – P. 4220 – 4226.
10. *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells through induction of IL-10 / Y. Geng Y, R.B. Shane, K. Berencsi K [et al] // J. Immunol. – 2000. – Vol. 64, № 10. – P. 5522–5529.
11. *Chlamydia pneumoniae* derived from inclusions late in the infectious cycle induce apoptosis in human aortic endothelial cells / J. Marino, I.Stoeckli, M. Walch [et al] // BMC Microbiology. – 2008. – Vol. 8, № 32. – P. 1-14.
12. Cocchiari J.L., Valdivia R.H. New insights into *Chlamydia* intracellular survival mechanisms // Cellular Microbiology. – 2009. – Vol. 11 (11). – P. 1571-1578.

13. Everett K. D. E., Bush R. M., Andersen A. A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam.nov. and Simkaniaceae fam.nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species standards for the identification of organisms // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1999. – № 49. – P. 415–440.

14. Inhibition of apoptosis in Chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome C release and caspase activation / T. Fan T, H. Lu, H. Hu [et al] // J. Exp Med. – 1998. – Vol. 187, № 4. – P. 487–496.

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ  
ХЛАМИДИЙ РАЗНЫХ  
ВИДОВ НА РАЗВИТИЕ  
АПОПТОЗА В  
КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ  
L 929 И HEP-2**

**Г.И.Маєров, С.К.Джораєва,  
В.В.Гончаренко**

*ГУ «Институт дерматологи и  
венерологи АМН Украины»*

**Резюме.** Проведено изучение влияния разных видов хламидий на развитие апоптоза в клеточных культурах L 929 и Hep-2. Показано, что для штамма *C. trachomatis* UGc характерно подавление клеточной гибели в перевиваемой культуре в первые 24 часа развития инфекции. Штамм *C.pneumoniae* K6 проявляет антиапоптотное действие на протяжении всего периода наблюдения (96 часов). Это связано с более медленным циклом развития этого вида хламидий и меньшей скоростью истощения питательных и энергетических субстратов клетки.

**Ключевые слова:** апоптоз, клеточная культура L 929, клеточная культура Hep-2, штамм *C. trachomatis* UGc, штамм *C.pneumoniae* K6.

**STUDY OF DIFFERENT  
SPECIES CHLAMYDIA  
INFLUENCE  
ON APOPTOSIS  
DEVELOPMENT IN CELL  
LINE L 929 AND HEP-2**

**G.I.Mavrov, S.K.Dhzoraeva,  
V.V.Goncharenko**

*SE "Institute of dermatology and  
venerology AMS of Ukraine", Kharkov*

**Summary.** The examination of the different species chlamydia influence on apoptosis development in cell line L 929 and Hep-2 was implemented. It was shown, that strain *C. trachomatis* UGc oppress the mortality cell in the cultural line during 24 hours of the infection development. Strain *C.pneumoniae* K6 displays the antiapoptosis action during observation period (96 hours). It is bound up with the most slower developmental cycle of this chlamydiae species and the less rate of exhausting of the nutrient and energetic cell substrate.

**Keywords:** apoptosis, cell line L 929, cell line Hep-2, strain *C. trachomatis* UGc, strain *C.pneumoniae* K6.