

СОСТОЯНИЕ ГЛИКОКАЛИКСА МЕМБРАН ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ХЛАМИДИОЗОМ

Г.И. Мавров, А.К. Кондакова, Л.В. Иващенко

ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины», г. Харьков

Резюме. Изучен гликокаликс мембран лимфоцитов периферической крови 18 больных хламидиозом с помощью биохимических и морфологических методов. Контрольную группу составили 22 здоровых донора. Выявлено снижение сорбционной емкости гликокаликса (до 60%), снижение гексоз (на 28%) и гексуроновых кислот (на 17%). Электронная микроскопия показала неравномерность толщины гликокаликса или его частичное отсутствие. Состояние гликокаликса лимфоцитов является важным критерием функционирования иммунной защиты при урогенитальном хламидиозе

Ключевые слова: *Chlamydia trachomatis*, хламидиоз, лимфоциты, мембраны, гликокаликс

Инфекции, которые передаются половым путем (ИППП) – национальная проблема Украины. По данным МЗ Украины ежегодно регистрируется до 400 тысяч новых случаев. Официальная статистика отображает от 30% до 40% реального количества случаев ИППП. Это связано с увеличением скрытых форм и тем, что отдельные группы населения не получают надлежащей дерматовенерологической помощи [6; 7]. Среди наиболее актуальных ИППП – хламидийная инфекция. Проблема хламидиозов обусловлена персистентным течением, бесплодием, поражением опорно-двигательного аппарата и сердечно-сосудистой системы. Заболеваемость в Украине в 2011 году составляла 67,5 на 100 тыс. Хламидийные инфекции характеризуются тем, что, с одной стороны, *Chlamydia trachomatis* является внутриклеточной бактерией, способной вызвать иммунопатологические нарушения, а с другой – инфекция протекает на фоне снижения иммунологической реактивности. Для того, чтобы разработать эффективные методы лечения и профилактики урогенитального хламидиоза необходимо ответить на вопрос, почему эта инфекция у разных людей протекает по-разному – от длительного бессимптомного

течения до выраженных восходящих воспалительных процессов в половых органах [10].

При заражении хламидиозом ключевой клеткой, которая вступает в борьбу с возбудителем, является лимфоцит. Т- и В-лимфоциты, включают специфический иммунный ответ. Механизм взаимодействия возбудителей хламидиоза с клетками хозяина и характер последовательных защитно-приспособительных реакций организма на инфекцию в виде иммунного ответа и воспаления невозможно понять без детального знания состояния плазматических мембран лимфоцита. Мембрана лимфоцита представляет собой композитную структуру, основу которой составляет липидный бислой с асимметрично встроенными белками. На поверхности раздела водной и липидной фаз, а также внутри липидной фазы «плавают» многочисленные ферменты, многие субстраты биохимических реакций, белковые клеточные рецепторы, гликолипиды и гликолипопротеиды. При этом наиболее важную роль играют углеводные компоненты мембран клеток, поскольку они обеспечивают разнообразие молекулярного состава плазматических мембран и формируют их поверхностный заряд [15].

Одной из важнейших структурных составляющих мембраны является ее гликокаликс, образуемый отрицательно заряженными сиаловыми кислотами трансмембранных белков и который формирует поверхностный мембранный заряд. Лимфоциты человека несут на внешней поверхности плазматической мембраны тонкий (около 5-10 нм) пласт гликокаликса, который состоит из гликопротеинов, гликолипидов и гликозаминогликанов. Этот пласт, неравномерный по толщине и структуре, обладает высокой лабильностью, и его компоненты способны десорбироваться даже при мягких воздействиях. Существует ряд данных, которые указывают на то, что большую информационную роль играют сульфатированные гликозаминогликаны. Сиаловые кислоты являются составной частью гликопротеинов и гликолипидов клеток и входят в состав гликокаликса. Доказана роль сиаловых кислот в строительстве специфических рецепторов для лимфоцитов. Лимфоциты, через свои сиаловые остатки в плазматической мембране принимают участие в формировании воспалительных клеток [11]. В ряде работ с помощью биохимических методов выявлены нарушения поверхности клеток лимфоидного ряда при некоторых заболеваниях [9, 11, 12, 13]. В литературе очень мало данных о морфологических исследованиях гликокаликса лимфоцитов и отсутствует информация о его ультраструктуре у больных хламидиозом. Поэтому целью данного исследования было изучить состояние гликокаликса мембраны лимфоцитов больных хламидиозом с помощью биохимических и морфологических методов с целью последующей коррекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было обследовано 18 больных урогенитальным хламидиозом в возрасте от 19 до 48 лет (в среднем $32,4 \pm 3,1$ года). Мужчин было 11 (61,1 %), женщин – 7 (38,9 %). Давность заболевания колебалась от 3 месяцев до 11 лет. Все больные имели субъективные сим-

птомы и объективные признаки хламидиоза. Контрольную группу составляли 22 здоровых донора (12 мужчин и 10 женщин) в возрасте от 22 до 45 лет. Как модель для изучения поверхностных характеристик клетки при хламидиозе были выбраны лимфоциты. Лимфоцит представляет собой удобную модель клетки для изучения мембранных явлений. Лимфоциты довольно просто и с малыми повреждениями могут быть получены в виде суспензионной культуры единичных клеток.

Лимфоциты выделяли из цельной гепаринизированной крови в градиенте плотности фикол-верографин. Полученные клетки дважды отмывали забуференным физиологическим раствором (рН 7,2-7,4). Жизнеспособность клеток в тесте с трипановым синим представляла не менее чем 98 %.

Сорбционную емкость гликокаликса лимфоцитов для альцианового синего (АС) определяли с помощью метода прижизненного количественного окрашивания лимфоцитов [1]. Определение уровня сиаловых кислот в лимфоцитах проводили по методу Т.И. Негрич [11], содержание гексоз – методом [2]. Для количественного определения гексуроновых кислот использовали карбазоловый и орциновый методы, для оценки качественного состава гликозаминогликанов (ГАГ) вычислили карбазол-орциновый коэффициент (К/О) [14, 16].

Электронную микроскопию гликокаликса проводили по общепринятой методике с дополнительным контрастированием рутением красным, специфически связывающимся с сиаловыми кислотами мембран [3]. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме УМТП-7, собирали на палладирированные сеточки и контрастировали насыщенным уранилацетатом и цитратом свинца. Затем исследовали с помощью электронного микроскопа ПЭМ-125К при ускоряющем напряжении 75 кV, снабженного системой съема и анализа изображения САИ - 01А (АО "Selmi", г. Сумы) с использованием высокочувствительной CCD камеры DX-2 и пакета программ для обработки изображения фирмы «КАРРА», Германия.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении сорбционной емкости гликокаликса к АС выяснилось, что у больных урогенитальным хламидиозом наблюдается

снижение сродства к красителю до 60%, что может свидетельствовать о нарушении состояния примембранных слоев иммунокомпетентных клеток при этой урогенитальной инфекции (табл.1).

Таблица 1

Состояние внешних примембранных слоев лимфоцитов периферической крови у больных урогенитальным хламидиозом ($M \pm m$)

| Обследованные группы | Сорбционная емкость ($\times 10^{-10}$ г/л) | Уровень сиаловых кислот (мкмоль/г белка) |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------|
| Практически здоровые доноры (n = 22) | 5,9 \pm 0,4 | 74,0 \pm 15,8 |
| Больные урогенитальным хламидиозом (n = 18) | 4,4 \pm 0,6* | 82,2 \pm 8,4 |

Примечание: * $p < 0,05$

Сродство плазматических мембран к АС дает возможность оценить гликокаликс в целом. Поэтому для более детального изучения состояния поверхностных слоев мембран лимфоцитов периферической крови при хламидиозе определили в них уровень сиаловых кислот. Показано, что у больных урогенитальным хламидиозом уровень сиаловых кислот в лимфоцитах достоверно не отличается от контрольных значений (табл. 1), что указывает на относительную сохранность структурной организации плазматических мембран клеток крови, по крайней мере у части больных, и может свидетельствовать об изменении доступности лимфоцитарных рецепторов - гликопротеинов. Предполагается, что снижение способности лимфоцитов к сорбции красителя - следствие накопление в их плазматической мембране свободнорадикальных химических групп, которые экранируют альциан-позитивные участки гликокаликса. Это может быть обусловлено

патологическим состоянием самой клетки (лимфоцита).

Полученные данные о нарушении сорбционных свойств гликокаликса лимфоцитов у больных урогенитальным хламидиозом обусловили проведение исследований по определению уровня отдельных углеводных макромолекул. Нами было показано, что у больных в лимфоцитах происходит достоверное снижение содержания гексоз (на 28%) и гексурановых кислот (на 17%) по сравнению с группой здоровых лиц (табл. 2).

В контрольной группе коэффициент К/О был меньше единицы, что свидетельствует о том, что в норме преобладают ГАГ, которые содержат уроновые кислоты. При хламидиозе коэффициент К/О достоверно возростал, что говорит о преимуществе в лимфоцитах больных ГАГ, которые содержат в основном глюкуроновые кислоты (табл. 2).

**Уровень гликозаминогликанов в лимфоцитах периферической крови
больных урогенитальным хламидиозом ($M \pm m$)**

| Обследованные группы | Содержание гексоз, мкмоль/мг белка | Содержание гексуриновых кислот, мкмоль/мг белка | К/О |
|---------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------|----------|
| Практически здоровые доноры (n = 22) | 13,5±1,3 | 5,4±0,4 | 0,6±0,1 |
| Больные урогенитальным хламидиозом (n = 18) | 9,9±1,3* | 4,1±0,6 | 0,9±0,1* |

Примечание: * $p < 0,05$

Некоторые противоречия, полученные при биохимических исследованиях мембран лимфоцитов, было решено разрешить, применив морфологический подход. Мы сосредоточились на гликокаликсе как важнейшем структурном составляющем мембраны. Известно, что он образуется отрицательно заряженными сиаловыми кислотами трансмембранных белков и формирует поверхностный мембранный заряд, от которого в значительной степени зависят рецепторные взаимодействия. Морфологических исследований гликокаликса клеток, поскольку он легко разрушается при приготовлении

препаратов, практически в доступной литературе нет. Мы исследовали его состояние в лимфоцитах больных урогенитальным хламидиозом, используя фиксатор, который содержит рутений-красный, специфически связывающийся с сиаловыми кислотами мембран [3].

Было установлено, что у здоровых лиц контрольной группы (доноров) структура гликокаликса лимфоцитов представлена сплошным примембранным слоем различной толщины. В целом гликокаликс сохранен, однородный, хотя имеются участки клетки, где он довольно истончен (рис. 1).

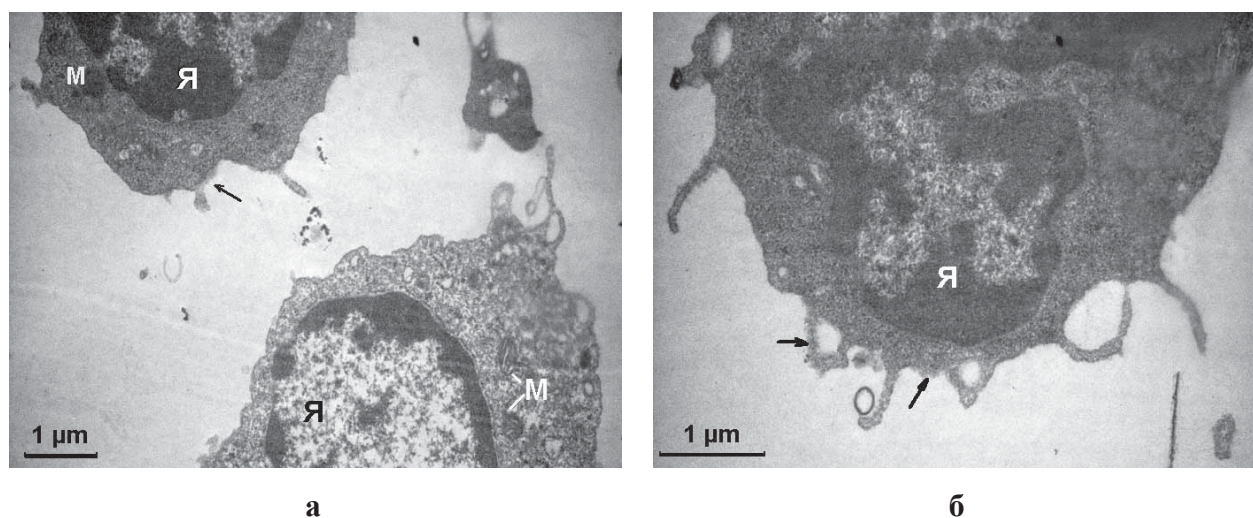
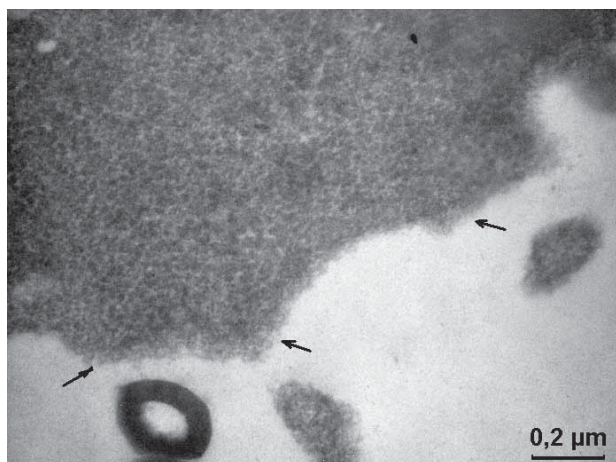


Рис. 1. Ультраструктура лимфоцитов крови человека (контроль).

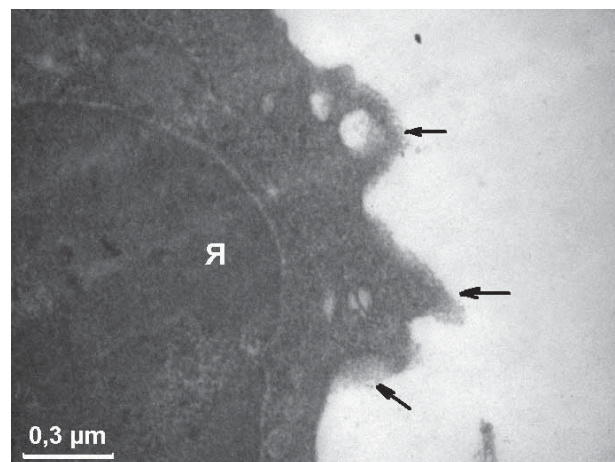
Обозначения: Я – ядро; М – митохондрии; стрелками обозначены участки гликокаликса.

У больных урогенитальным хламидиозом было выявлено два вида нарушений. В первом случае была выражена явная неравномерность толщины гликокаликса при его

относительной сохранности в целом. У поверхности лимфоцита толщина гликокаликса менялась от нескольких нанометров до десятков нанометров (рис. 2).



а

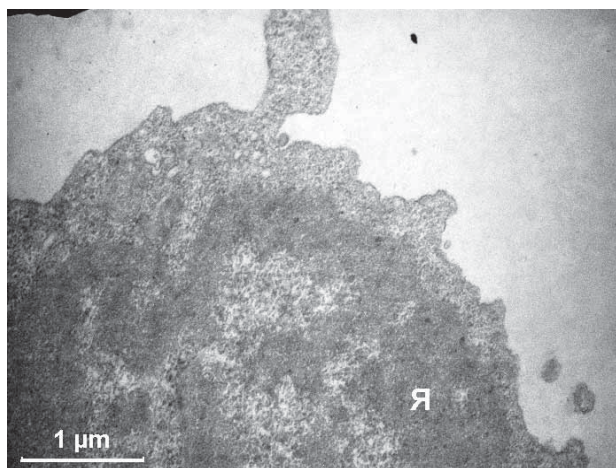


б

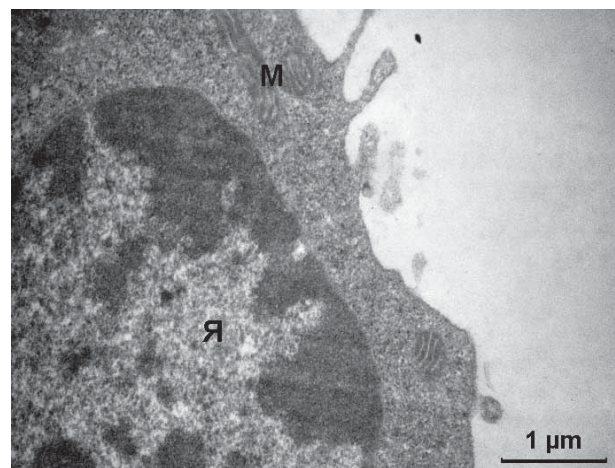
Рис. 2. Участок поверхности лимфоцита больного хламидиозом: (а) – с непрерывным равномерным слоем гликокаликса (Гк); (б) – неравномерное распределение Гк по поверхности лимфоцита (стрелки) от нескольких до десятков нанометров.

Во втором случае при патологии поверхность лимфоцитов содержала либо неболь-

шие фрагменты гликокаликса, либо была лишена его вовсе (рис. 3).



а



б

Рис. 3. Фрагменты лимфоцитов крови больного хламидиозом. Отсутствие гликокаликса на поверхности лимфоцита (а) и его сохранность в виде небольших фрагментов (б).

В предыдущих исследованиях, проведенных в нашем институте, было показано, что при урогенитальном хламидиозе создаются условия для возникновения патологического свободнорадикального окисления: активный кислород генерируется в большом количе-

стве, а его инактивация уменьшается [4, 5]. Усиление процессов перекисного окисления белков и липидов в клеточных мембранах приводит к уплотнению или деструкции липидного бислоя, увеличению его вязкости, уменьшению площади белково-

липидных взаимодействий, изменению поверхностного заряда, нарушению структурно-функционального состояния мембранно-рецепторного комплекса. До тех пор, пока на клетку не действуют чрезвычайные раздражители, все компоненты гликопротеиновых и гликолипидных рецепторов функционируют согласованно. Когда же патогенные факторы вызывают перестройку и разрушение отдельных частей рецепторов или их перераспределение по поверхности плазматических мембран, то нарушается функция всей клетки. Поэтому изменения качественного и количественного содержания ГАГ в лимфоцитах отражаются на функциональном состоянии лимфоцитов – а значит и на функционировании иммунных механизмов защиты при данной патологии.

Таким образом, в группе больных хламидиозом была выявлена неоднородность нарушений гликокаликса – одни пациенты имели относительно сохранное состояние

примембранного слоя лимфоцитов, а другие – значительные нарушения. Эти данные согласуются с неравномерностью и разбросом количественных данных при определении содержания гексоз, гексуриновых кислот, а также сорбционной емкости гликокаликса и уровня сиаловых кислот. Очевидно при варианте течения заболевания, когда иммунопатологические реакции преобладают над иммунозащитными, состояние гликокаликса лимфоцитов является одним из важных критериев. Полученные данные согласуются с иммунологическими исследованиями, проведенными ранее. Было установлено, что у больных хламидиозом выявлено повышение спонтанной и индуцированной продукции клетками крови провоспалительных цитокинов ИЛ-1, ИЛ-8, при этом резерв стимуляции был ниже, чем у здоровых доноров, что свидетельствует о снижении компенсаторных возможностей иммунной системы [8].

ЛІТЕРАТУРА

1. Арцишевская Р.А., Миронова А.П., Самойлова К.А. Десорбция гликопротеинов с поверхности лимфоцитов периферической крови человека после облучения коротковолновыми УФ лучами // Цитология. –1984. –Т.ХХVI, №2. – С.209-214.
2. Биохимическое исследование мембран /Под ред. Э. Медди: Пер. с англ. – М.: Мир, 1979. – С. 287.
3. Гайер Г. Электронная гистохимия. – М.: Мир.–1974.– 488 с.
4. Кондакова Г.К. Пероксидна оксидация ліпідів та окисна модифікації білків мембран лімфоцитів при уrogenитальному хламидиоз // Досягнення біології та медицини. – 2006. – №2 (8). – С.42-45
5. Кондакова Г.К. Стан антиоксидантного захисту та системи L-аргінін – окисд азоту у крові хворих на уrogenитальний хламидиоз / Г.К. Кондакова О.В. Єрмошенко, К.О. Калекіна, В.М. Цимбал // Український біохімічний журнал. – Т.80, №1. – 2008. – С.52-57.
6. Літус О.І. Поліетіологічні чинники і поліпатогенетичні механізми розвитку хронічного інфекційного простатиту. Комплексні методи діагностики та нові підходи до терапії захворювання / О.І. Літус, В.І. Степаненко // Український журнал дерматології, венерології, косметології. – 2003. – № 1 (8). – С. 72–86.
7. Мавров Г.И. Клинические проявления хламидийных инфекций / Г.И. Мавров, Г.П. Чиннов // Хламидийные инфекции: биология возбудителей, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика / Під ред. Г.І. Маврова. – К. : Геркон, 2005. – С. 319–381.
8. Мавров Г.И., Нагорный А.Е. Иммунные нарушения при половых инфекциях множественной этиологии (Herpes simplex-2, Chlamydia trachomatis, Trichomonas vaginalis // Український журнал дерматології, венерології, косметології. – 2010. – № 3 (38). – С. 117–122.

9. Мавров И.И. Барьерно-транспортные и структурные свойства мембран эритроцитов при псориазе / И.И. Мавров, М.С. Гончаренко, А.К. Кондакова и др. // Дерматология та венерология. – 2002. – №2 (16). – С.15-19.

10. Нагорный А.Е. Патоморфоз клинических проявлений при генитальном герпесе, хламидиозе и трихомонозе // Дерматология та венерология. – 2011. – № 3 (53). – С. 34–43

11. Негрич Т.І. Визначення сіалових кислот у лімфоцитах хворих на розсіяний склероз // Лікарська справа. – 2000. – №2. – С.48-50.

12. Новицкий В.В., Лимфоциты при хроническом вирусном гепатите С: поверхностная архитектура, микровязкость мембраны и функциональная активность / В.В. Новицкий, И.О. Наследникова, Н.В., Н.В. Токарева и др. // Бюллетень СО РАМН.– 2005. – №3 (117). – С.78-82.

13. Grimley P. M. Abnormal structures in circulating lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and related diseases / P. M. Grimley, J. L. Decker, H. J. Michelitch et al // Arthritis & Rheumatism. – 2005. – V.16 (3).– P.313-323.

14. Bitter T., Muir H.M. A modified uronic acid carbazole reaction // Anal. Biochem. – 1962. – Vol.4. – P.330-334.

15. Sten-Knudsen O. **Biological membranes, theory of transport, potentials and electric impulses.** — Cambridge University, 2002. —696 p.

16. Svennerholm L. The quantitative estimation of cerebroside in nervous tissue // J. Neurochem. – 1956. – Vol. 1. – N1. – P.42-53.

СТАН ГЛІКОКАЛІКСУ МЕМБРАН ЛІМФОЦИТІВ ХВОРИХ НА ХЛАМІДІОЗ

**Г.І. Мавров,
Г.К. Кондакова,
Л.В. Іващенко**

Резюме. Вивчено глікокалікс мембран лімфоцитів периферійної крові 18 хворих на хламідіоз за допомогою біохімічних і морфологічних методів. Контрольну групу склали 22 здорових донора. Виявлено зниження сорбційної ємності глікокаліксу (до 60%), зниження гексоз (на 28%) і гексуронових кислот (на 17%). Електронна мікроскопія показала нерівномірність товщини глікокаліксу або його часткову відсутність. Стан глікокаліксу лімфоцитів є важливим критерієм функції імунного захисту при сечостатевому хламідіозі.

Ключові слова: *Chlamydia trachomatis*, хламідіоз, лімфоцити, мембрани, глікокалікс

LYMPHOCYTE MEMBRANE GLICOKALEX STATE IN PATIENTS WITH CHLAMIDIOSIS

**G.I. Mavrov,
A.K. Kondakova,
L.V. Ivaschenko**

Resume. The membrane glicokalex of peripheral blood lymphocytes in 18 patients with chlamydiosis is studied by means of biochemical and morphological methods. The control group was compounded by 22 healthy donors. The sorption capacity decrease (up to 60 %), decrease in hexoses (on 28 %), and gexauronic acids (on 17 %) are revealed. The electronic microscopy has shown glicokalex layer non-uniformity or its particulate absence. So the state of lymphocyte glicokalex is an important criterion of a host defense functioning at genital *Chlamydia trachomatis* infection

Key words: *Chlamydia trachomatis*, chlamydiosis, lymphocyte, membrane, glicokalex