

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

EPIDEMIOLOGY AND DISTRIBUTION OF ASCARIDOSIS IN CHERNIVTSI REGION

V.P. Pishak, O.I. Zakharchuk, N.V. Chernovska, M.I. Kryvchanska, V.H. Vysotska, Yu.V. Lomakina, M.B. Myronyuk
SUMMARY. *The epidemiological peculiarities of ascaridosis distribution have been studied in different regions of Bukovina. In 2009-2011 years the parasitic morbidity of population of Chernivtsi region has decreased if compare with previous years, mainly due*

to Sokiranskiy, Zastavniyskiy, Storozhynetskiy areas. The high percentage of diseased with ascaridosis people are children before 16 years old.

Key words: *ascaridosis, epidemiology, areas of Chernivtsi region.*

Отримано 19.10.2011 р.

© Колектив авторів, 2011
УДК 579.61:579.882-093/-095

В.В. Гончаренко, С.К. Джораєва, І.Г. Гайдучок, Т.О. Волков, А.Ю. Волянський ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ЗБУДНИКІВ РОДИНИ CHLAMYDIACEAE НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ КЛІТИН РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Інститут дерматології та венерології НАМН України, Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова
НАМН України (Харків), Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького

*Вивчено вплив різних видів хламідій на розвиток апоптозу у клітинних культурах L929 та Her-2. Показано, що для штаму *C. trachomatis* UGc характерно пригнічення клітинної загибелі у перещеплюваній культурі у перші 24 год розвитку інфекції. Штам *C. pneumoniae* K6 виявляє антиапоптозну дію упродовж усього періоду спостереження (96 год). Це пов'язано з більш уповільненим циклом розвитку даного виду хламідій та меншою швидкістю виснаження живильних і енергетичних субстратів клітини.*

Ключові слова: *апоптоз, клітинна культура L929, клітинна культура Her-2, штам *C. trachomatis* UGc, штам *C. pneumoniae* K6.*

Мікроорганізми родини *Chlamydiales* є високоспеціалізованими облігатними внутрішньоклітинними паразитами еукаріотів, характерною ознакою котрих є конвертація між двома морфологічно і функціонально дискретними формами: ретикулярними (РТ) та елементарними (ЕТ) тільцями. Репродукція патогенного агенту знаходиться у тісній залежності від клітини-хазяїна. Сукупність фаз внутрішньоклітинного розвитку та позаклітинного існування складає їх унікальний життєвий

цикл, який сприяє оптимальній адаптації збудника до умов існування як усередині, так і поза клітиною. Мікроорганізм має розвинуті пристосувальні механізми для виживання і власного розвитку, у процесі онтогенезу хламідій здійснюється реалізація багатьох функціональних властивостей для ініціації продуктивного циклу розвитку та появи нової генерації поколінь. Однією з відомих особливостей цих патогенів є здатність впливати на функціональний стан клітин з індукцією апоптозу у терміни, потрібні мікроорганізму, і навпаки – інгібіцією цього процесу на початку розвитку [1-3]. Апоптоз – генетично запрограмована смерть клітини, що регулюється внутрішньоклітинними факторами: клітини руйнуються не під впливом зовнішнього екстремального фактору, а в результаті дії регуляторних систем, які тригерно вмикають енергетично залежні механізми автодеструкції, 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 і створення

продуктів, що спричиняють їхню загибель [4-6]. Морфологічні прояви апоптозу *in vivo* та *in vitro* подібні [7], тому клітинні культури є зручним об'єктом для вивчення природи цього явища. Існує декілька механізмів розвитку апоптозу у клітинних культурах, наприклад, збільшення щільності розташування клітин у культурі при переході від логарифмічної до стаціонарної фази росту, коли на культуральній підложці не залишається місця для нового покоління клітин і повністю виснажується 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 [4, 8-10].

Відомо, що при інфекційній патології апоптоз – це протективна реакція організму, спрямована на запобігання розповсюдженню інфекції. Придушення апоптозу призводить до дисемінації збудника у різні тканини та органи, розповсюдження інфекційного процесу, виживання патогену та його персистенції [9, 10]. До цих пір не з'ясовано, яким чином інфіковані хламідіями клітини не елімінуються 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. В 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- α , стауроспорин, етопозид, гранзим В/перфорин, УФ-опроміювання. Шляхи клітинної загибелі по типу апоптозу у популяціях інфікованих клітин залежать від типу клітин, виду хламідій або експериментальних процедур. [1, 4, 11, 12].

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

Матеріали і методи

Для проведення дослідження використовували лабораторний штам *C. trachomatis UGc*, отриманий у лабораторії мікробіології ДУ «Інститут дерматології та венерології АМНУ», та лабораторний штам *C. pneumoniae K6*,

отриманий з НДІ епідеміології та мікробіології ім. М.Ф. Гамалеї РАМН, Москва. Збудники культивувалися на чутливих клітинних лініях за стандартною методикою [13]. Особливістю культивування лабораторного штаму *C. pneumoniae K6* було використання безсироваткового середовища. Упродовж виконання експерименту клітинні культури було розподілено на групи:

1 група (контроль) – неінфікована клітинна культура L929 або Her-2, залежно від виду збудника.

2 група (дослідна) – добова культура, інфікована лабораторним штамом *C. trachomatis Ugc* або *C. pneumoniae K6* у дозі 1 ВУО/мл.

3 група (дослідна) – добова культура, інфікована лабораторним штамом *C. trachomatis Ugc* або *C. pneumoniae K6* у дозі 1 ВУО/мл. Середовище, в 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* в асептичних умовах.

4 група (дослідна) – добова культура, інфікована лабораторним штамом *C. trachomatis Ugc* або *C. 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 год культивування накривні скельця з моношаром видаляли з культуральних флаконів й забарвлювали залежно від задач дослідження. Для оцінки ступеня інфікованості клітинного моношару частина накривних скелець забарвлювалася за методом Мая-Грюнвальда-Гімзи [4, 13]. Для вивчення апоптозу накривні скельця з моношаром послідовно забарвлювали моноклональними антитілами до родоспецифічного епітопу ЛПС хламідій та водним розчином бромистого етидію. Кількість інфікованих, живих та загиблих у результаті апоптозу клітин підраховували за допомогою люмінесцентної мікроскопії [4]. 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 досліджень та їх обговорення

У попередніх дослідженнях нами було показано, що циклогексимід, який додається у концентрації 1,0 мкг/мл до живильного середовища для виділення збудників хламідійної інфекції, має чіткий проапоптозний вплив на клітини моношару. При цьому проапоптозна дія циклогексиміду

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

зберігається упродовж усього періоду культивування (72 год) [14]. Крім того, згідно з даними літератури, ступінь апоптозу прямо залежить від дози інфекції, що вноситься до моношару клітин [11], тому експериментально розрахована доза зараження, що дорівнює 1 ВУО/мл, не має цитотоксичної дії, була обрана для подальших експериментів з вивчення впливу лабораторних штамів хламідій на життєздатність моношару клітин [14].

У результаті проведених досліджень встановлено, що через 24 год після інфікування моноша-

ру лінії L929 штамом *C. trachomatis* Ugc кількість клітин, що мали ознаки апоптозу (конденсація хроматину, фрагментація ядер), була на 12,8-14,8% нижче у всіх дослідних групах порівняно з контрольною культурою (табл. 1), що говорить про значну антиапоптозну дію збудника у цей термін культивування. На пізніх строках інфекції (48 год) захист клітин від апоптозу не виявляється, а навпаки, спостерігається помітна індукція апоптозу у всіх дослідних групах інфікованих культур.

Таблиця 1

Вплив лабораторного штаму *C. trachomatis* Ugc на розвиток апоптозу в культурі клітин L929 залежно від умов культивування

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

Примітка: * – p наведено порівняно зі стандартним способом культивування.

Найзначніша проапоптозна дія збудника спостерігається у третій групі культур. Це можна пояснити тим, що у перші 24 год 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-у год культивування, коли цикл розвитку майже завершений, збуднику не потрібно стримувати апоптоз або цілісність клітин моношару, оскільки збудник вивільняється та розпочинає новий цикл інфікування. Отримані дані свідчать, що лабораторний штам *C. trachomatis* Ugc має антиапоптозну активність тільки у перші 24 год після інфікування незалежно від умов культивування. Таким чином, при інфікуванні клітинної культури L929 лабораторним штамом *C. trachomatis* Ugc спостерігається гальмування апоптозу на початку циклу розвитку хламідій (0-24 год), на більш пізніх строках інфікування (48-72 год) виявлено

індукцію апоптозу. Антиапоптозна дія лабораторного штаму *C. trachomatis* Ugc на початку циклу розвитку та проапоптозна – на 48-у год культивування не залежала від умов культивування. На відміну від представників виду *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* гальмує апоптоз упродовж усього часу спостереження (табл. 2).

Так, на 72-у год 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 *C. pneumoniae* K6 при культивуванні на живильному 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.

На мал. 1 представлена порівняльна гістограма кількості клітин, що мають ознаки апоптозу, при інфікуванні чутливих клітин різного походження досліджуваними штамми хламідій при стандартному культивуванні. Часові інтервали позначені з урахуванням того, що інокуляція інфекційних агентів здійснювалась на 24-годинний моношар чутливих клітин.

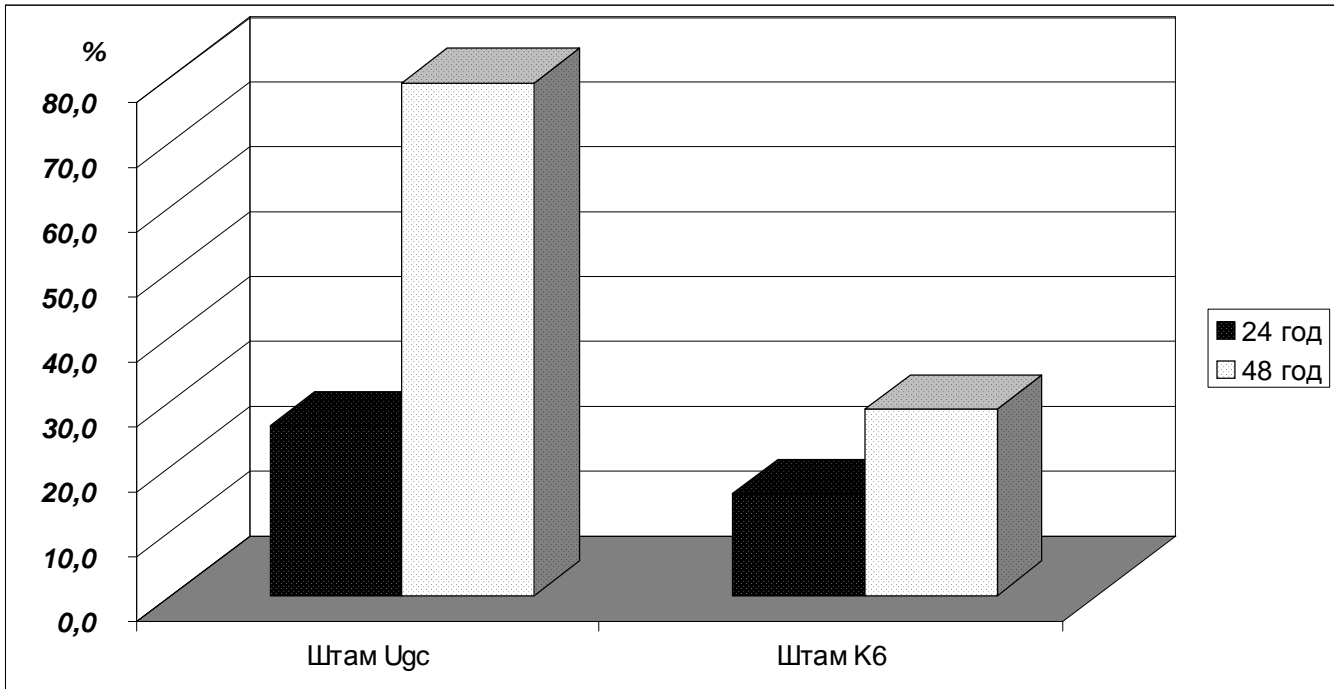
ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 2

Вплив лабораторного штаму *C. pneumoniae* K6 на розвиток апоптозу в культурі клітин Нер-2 залежно від умов культивування

Тип культивування, % клітин з ознаками апоптозу, підрахунок на 500 клітин	Термін культивування		
	24 год інфекції / 48 год культури	48 год інфекції / 72 год культури	72 год інфекції / 96 год культури
Культивування неінфікованої клітинної культури (n=6)	63,0±6,1	83,6±8,5	Руйнація моношару
Культивування інфікованої клітинної культури (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 (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 (n=6)	15,2±2,0 (p<0,001)	33,2±3,2 (p<0,001)	38,0±3,5

Примітка.* – p наведено порівняно зі стандартним способом культивування.



Мал. 1. Порівняння кількості клітин з ознаками апоптозу при інфікуванні перещеплюваних ліній L929 та Нер-2 у різні часові інтервали.

При порівнянні отриманих результатів для обох досліджених штамів були відзначені відмінності щодо впливу збудників видів *C. trachomatis* і *C. pneumoniae* на життєдіяльність клітин та розбіжності інтервалів часу для клітинної деструкції, викликані різними видами мікроорганізму. На приведених гістограмах помітно різницю у процентному співвідношенні клітин з ознаками апоптозу, котрий спостерігався у процесі досліджень. Наведені дані відображають не тільки про- та анти-апоптозні характеристики вивчених штамів, а й по-

середньо підтверджують відмінності у тривалості циклу розвитку, притаманну різним видам патогену.

Висновки

1. Тест-штам *C. trachomatis* Ugc у першу добу культивування проявляє чітку антиапоптозну дію, що обумовлено особливостями продуктивного циклу розвитку цього виду збудника. У період інтенсивної метаболічної активності та бінарного розподілу ретикулярних тілець патогенний агент максимально користується поживними речовина-

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ми клітини, запобігаючи розвитку апоптозу. На стадії завершення репродуктивного циклу мікроб запускає проапоптозні механізми.

2. Тест-штам *C. pneumoniae* K6 виявляє суттєвий антиапоптозний вплив на клітини лінії Hep-2 упродовж 4 діб культивування, що пояснюється уповільненим циклом розвитку цього виду хламідій і меншою швидкістю виснаження живильних та енергетичних субстратів клітини.

Література

1. Мавров Г.І. Хламідійні інфекції: біологія збудників, патогенез, клініка, діагностика, лікування та профілактика / Г.І. Мавров. – К., 2005. – 524 с.
2. Мавров І.І. Половые болезни: Руководство для врачей, интернов и студентов / И.И. Мавров. – Харьков: Факт, 2002. – 789 с.
3. Everett K.D.E. 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 / K.D.E. Everett, R.M. Bush, A.A. Andersen // Intern. J. System. Bacteriology. – 1999. – N 49. – P. 415-440.
4. Антиапоптозная активность хламидий / Н.А. Зигангирова, В.Р. Мартынова, Н.И. Колкова и др. // Вестн. Росс. АМН. – 2005. – № 1. – С. 34-37.
5. Уманский С.Р. Генетическая программа клеточной гибели: гипотеза и некоторые приложения (трансформация, канцерогенез, старение) / С.Р. Уманский // Успехи современной биологии. – 1982. – Т. 93, № 1. – С. 139-148.
6. 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.
7. Бережков Н.В. Апоптоз – управляемая смерть клетки / Н.В. Бережков // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1990. – № 12. – С. 68-77.
8. *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells through induction of IL-10 / Y. Geng, R.B. Shane, K. Berencsi et al. // J. Immunol. – 2000. – Vol. 64, N 10. – P. 5522-5529.
9. *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, N 32. – P. 1-14.
10. Cocchiario J.L. New insights into *Chlamydia* intracellular survival mechanisms / Cocchiario J.L., Valdivia R.H. // Cellular Microbiology. – 2009. – Vol. 11, N 11. – P. 1571-1578.
11. Регуляция хламидиями апоптоза клеток хозяина / П.А. Борцов, Е.Д. Федина, Е.А. Токарская и др. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 2006. – № 4. – С. 53-58.
12. 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, N 4. – P. 487-496.
13. Уніфікація лабораторних методів дослідження в діагностиці захворювань, що передаються статевим шляхом / за ред. І.І. Маврова. – Х.: Факт, 2000. – 120 с.
14. Мавров І.І. Регуляція апоптозу у клітинній культурі L929, інфікованій штамом хламідій UGc, в залежності від умов культивування / І.І. Мавров, С.К. Джораєва // Експериментальна та клінічна медицина. – 2009. – № 1. – С. 53-57.

INFLUENCE FEATURE OF CAUSATIVE AGENTS OF FAMILY CHLAMYDIACEAE ON VIABILITY INTERWEAVING CELL LINE OF DIFFERENT ORIGIN

V.V. Honcharenko, S.K. Dzhorayeva, I.H. Hayduchok, T.O. Volkov, A.Yu. Voliansky

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.*

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

Отримано 30.05.2011 р.