

*¹Львівський національний університет ім. І.Франка,
вул. Університетська, 1, м. Львів, Україна**²ДУ "Львівський НДІ епідеміології та гігієни МОЗ України",
вул. Зелена, 12, м. Львів, 79005, Україна*

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ КЛІТИН МІКОБАКТЕРІЙ ПІД ДІЄЮ ПОХІДНИХ ФЛУРЕНІЗИДУ

*Встановлено, що у клітинах мікобактерій штамів *M. tuberculosis hominis* H₃₇R₃, *M. tuberculosis bovis* 8 та *M. scrofulaceum* під дією антибактеріальних речовин спостерігалися такі ультраструктурні зміни, як дезорганізація нуклеоїду та цитоплазми, утворення цитоплазматичних вакуолей та внутрішньоклітинних ліпидоподібних включень, а також зміна форми клітин на сферодіодну та на безформну масу, зникнення периплазматичного простору, поява у зразках клітин дрібних розмірів та неповністю поділених клітин. Частіше вони мали місце після 72 годин експозиції культур з антибактеріальними речовинами. При застосуванні вищих концентрацій речовин ультраструктурні зміни були більш вираженими. Суттєвої різниці між характером змін структури клітин при використанні досліджених антибактеріальних речовин не виявлено.*

Ключові слова: мікобактерії туберкульозу, електронна мікроскопія, ультраструктурні зміни, похідні флуоренізиду.

Протягом останніх років у багатьох країнах світу туберкульоз став однією з найважливіших і складних проблем, що зумовлено неухильним погіршенням епідемічної ситуації щодо цієї інфекції. В Україні епідемія туберкульозу зареєстрована в 1995 році. В сучасних умовах однією з основних причин зростання епідемії туберкульозу є зміна біологічних особливостей мікобактерій туберкульозу, найважливішою з яких є розвиток резистентності до антимікобактеріальних препаратів [4, 6, 8, 10]. Хіміорезистентний туберкульоз як особливу форму туберкульозу почали виділяти з 90-х років, коли в усьому світі відбулося зростання частоти медикаментозної резистентності збудника туберкульозу до найактивніших протитуберкульозних препаратів (ізоніазиду й рифампіцину) і значне зниження ефективності лікування, зростання смертності від туберкульозу при застосуванні існуючих методів лікування. Зростання частоти медикаментозної стійкості мікобактерій туберкульозу до відомих антимікобактеріальних препаратів серед усіх контингентів хворих на туберкульоз вимагає пошуку нових ефективних протимікробних препаратів. В наш час багато уваги приділяється вивченню антимікобактеріальної дії похідних відомих антибіотиків й інших лікарських засобів [5, 9].

Питання щодо механізму дії хіміотерапевтичних сполук в першу чергу вивчається шляхом їх впливу на біосинтез та обмін речовин мікроорганізмів. Можливості електронної мікроскопії дозволяють прослідкувати зміни ультраструктури мікобактерій в результаті дії на них різних антибактеріальних речовин.

На сьогоднішній день, в час широкого застосування антибіотикотерапії, мікобактерії в їх класичній формі зустрічаються порівняно рідко. Частіше – це дуже короткі палички, часом навіть окремі кислотостійкі зерна. На електронній мікрографії капсули або воскової оболонки не спостерігається. Про існування в мікобактеріях дуже тонкої мембрани, яка оточує цитоплазму, свідчить виступаюча, часом переривчаста контурна лінія, що повторює обриси клітини на віддалі 50-120 нм від поверхні. Дезорганізація нуклеоїду вказує на інгібування синтезу ДНК в клітині. Деструкція зовнішньої оболонки клітини, як і збільшення або відсутність периплазматичного простору, зміна форми клітин та неповний їх поділ можуть свідчити про інгібування синтезу елементів клітинної оболонки [9, 12, 14, 15]. У 29 % випадків мікобактерії туберкульозу здатні утворювати L-форми. Тоді їх мікроструктура характеризується різною оптичною густиною. Вони можуть мати вигляд вакуолей, куль та приймати інші конфігурації [1, 7].

Відомо, що при дослідженні за допомогою електронного мікроскопу в нормі мікобактерії мають вигляд паличок із заокругленими кінцями, зустрічаються вигнуті, овальні форми. Довжина клітин в нормальних умовах коливається від 0,8 до 5,5 м, а діаметр – від 0,2 до 0,5 м. По мірі старіння культури клітини мікобактерій стають коротшими і з'являються коковидні форми. Це, очевидно, пов'язано з тим, що спочатку синтез цитоплазми відбувається у них

повільніше ніж поділ клітин. Мікрокапсула мікобактерій відділена від гомогенної клітинної стінки осміофобною зоною. До клітинної стінки щільно прилягає цитоплазматична мембрана. Вакуолі в мікобактеріях спостерігаються рідко. В старих культурах зникають гранули, спостерігається фрагментація цитоплазми в середині інтактної мембрани, після чого настає трансформація бактерій у більш-менш безструктурні утворення. При фрагментації цитоплазми бактерії внаслідок резистентності мембрани можуть не втратити клітинної організації [1, 2, 11].

Метою роботи було вивчення специфічних ультраструктурних змін у клітинах різних штамів мікобактерій під впливом нових похідних флуореніду.

Матеріали і методи. Вивчено ультраструктурні зміни клітин мікобактерій під дією п'яти нових субстанцій, які є похідними солями вітчизняного протимікробного препарату флуореніду (N-(9-флуореніліден)-N'-ізонікотингідрозиду), а саме його срібною, натрієвою, калійною, кальцієвою та літєвою солями, отриманими професором Л.І. Петрух у Львівському національному медичному університеті ім. Данила Галицького.

Культури музейних штамів *Mycobacterium tuberculosis hominis* H₃₇R_v та *M. tuberculosis bovis* 8, одержані з Інституту фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського АМН України, та атипові мікобактерії II групи за класифікацією Раніона, скотохромогени *M.scrofulaceum* – з Державного НДІ стандартизації і контролю медичних біологічних препаратів ім. Л.О. Тарасевича (Росія), культивували загальноприйнятим методом на середовищі Левенштейна-Йенсена протягом 21 доби, після чого проводили експозицію протягом 24 та 72 год. з антимікробними речовинами в концентраціях, що дорівнюють мінімальній інгібуючій та вдвічі вищій, з використанням оптимального для флуоренів розчинника – ПЕГ-400.

Для вивчення ультраструктурних змін у клітинах у мікобактерій, які відбувалися під впливом нових синтезованих субстанцій, 0,2 мл суспензії культури відповідного штаму концентрацією 10 млн. мікробних клітин/мл вносили у 5 мл живильного середовища, яке містило 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,313; 0,156; 0,078; 0,039 мкг/мл досліджуваних препаратів. Після культивування при 37 °С протягом 24 та 72 год. з препаратом біомасу мікобактерій відмивали фізіологічним розчином, фіксували послідовно 2,5 % глутаровим альдегідом на 0,1 М какодлатному буфері (рН 7,2) та 2 % розчином OsO₄ в цьому ж буфері. Клітини мікобактерій обезводнювали в зростаючих концентраціях етанолу і заключали в епоксидну смолу Епон-812. Зрізи готували на ультрамікроскопі УМТП-6. Контрастували в 1,5 % розчині уранілацетату та солями свинцю по Рейнольдсу [13].

Готові зразки розглядали та фотографували на трансмісійному електронному мікроскопі ПЕМ-100.

Результати та їх обговорення. Попередніми дослідженнями було встановлено, що мінімальні бактеріостатичні концентрації флуореніду, його срібною, кальцієвою та літєвою солей щодо досліджуваних штамів мікобактерій становили 0,078 мкг/мл, натрієвою та калійною солей флуореніду – 0,039 мкг/мл [3].

У результаті проведених досліджень встановлено, що штамів мікобактерій туберкульозу *M.tuberculosis hominis* H₃₇R_v та *M.tuberculosis bovis* 8 не відрізнялися за чутливістю до досліджуваних речовин. Однак, найвища активність похідних флуореніду спостерігалася при концентрації від 0,039 до 0,313 мкг/мл. Щодо штамів атипових мікобактерій *M.scrofulaceum*, то була виявлена низька активність всіх досліджуваних речовин, тобто тільки у концентрації 20 мкг/мл. Солі флуореніду (літєва, натрійна, калійна, срібна і кальцієва) є перспективними фармакологічними речовинами для подальшого вивчення їх як протитуберкульозних лікарських засобів, що є вельми актуальним у період розпаду епідемії туберкульозу.

Для розуміння механізму дії нових антимікробних речовин на мікобактеріальні клітини за допомогою електронної мікроскопії були вивчені специфічні ультраструктурні зміни у клітинах різних штамів мікобактерій після експозиції їх з срібною, натрієвою, калійною, кальцієвою та літєвою солями флуореніду.

У всіх дослідних зразках були зафіксовані ультраструктурні зміни клітин мікобактерій. Так, після експозиції *M.tuberculosis hominis* H₃₇R_v та *M.tuberculosis bovis* 8 з калійною, літєвою та срібною солями флуореніду була виявлена деструкція зовнішньої оболонки клітини (ДЗО), а також спостерігалася дезорганізація нуклеоїду та цитоплазми (рис. 1, 2). Після експозиції всіх досліджуваних штамів із солями флуореніду мало місце утворення цитоплазматичних вакуолей (ЦВ) (рис. 1, 2, 3) та внутрішньоклітинних ліпоподібних включень (ЛВ) (рис. 2). Крім того, спостерігали зміну форми клітин на сфероїдну (рис. 1, 3), що було більш

характерним після дії літєвої, срібної та калійної солей флуореніду на *M.tuberculosis hominis* H₃₇R_v та *M.tuberculosis bovis* 8. Також в окремих зразках були зафіксовані клітини дрібних розмірів (ДФ) і неповністю поділені клітини (рис. 3). Поява дрібних форм частіше була результатом експозиції із срібною, калійною та літєвою солями флуореніду з мікобактеріями туберкульозу культур *M.tuberculosis hominis* H₃₇R_v та *M.tuberculosis bovis* 8. Разом із тим, слід зазначити, що суттєвої різниці між характером змін структури клітин мікобактерій при використанні досліджених речовин не виявлено.

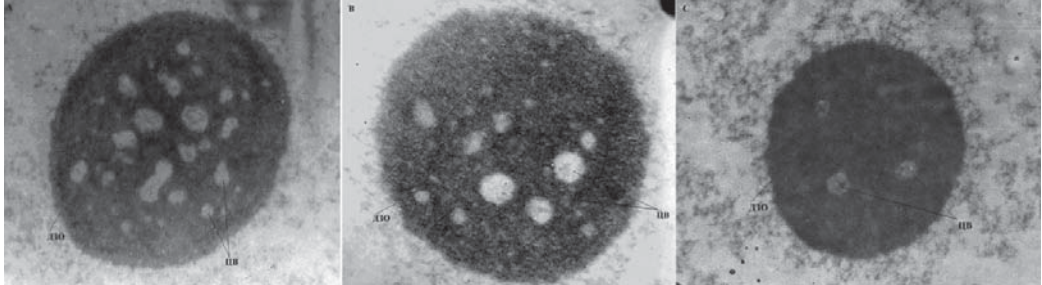


Рис. 1. Ультраструктурні зміни у клітинах *M.tuberculosis hominis* H₃₇R_v x 130 μÅ.

ЦВ – цитоплазматичні вакуолі; ДЗО – деструкція зовнішньої оболонки;
 А – після експозиції з калійною сіллю флуореніду;
 В – після експозиції з срібною сіллю флуореніду;
 С – після експозиції з літєвою сіллю флуореніду.

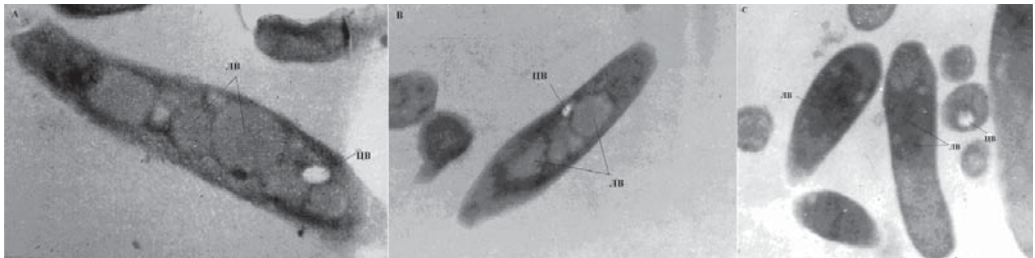


Рис. 2. Ультраструктурні зміни у клітинах *M.scrofulaceum* x 130 μÅ.

ЦВ – цитоплазматичні вакуолі; ЛВ – ліпоподібні вclusions;
 А – після експозиції з літєвою сіллю флуореніду;
 В – після експозиції з кальцієвою сіллю флуореніду;
 С – після експозиції з натрієвою сіллю флуореніду.

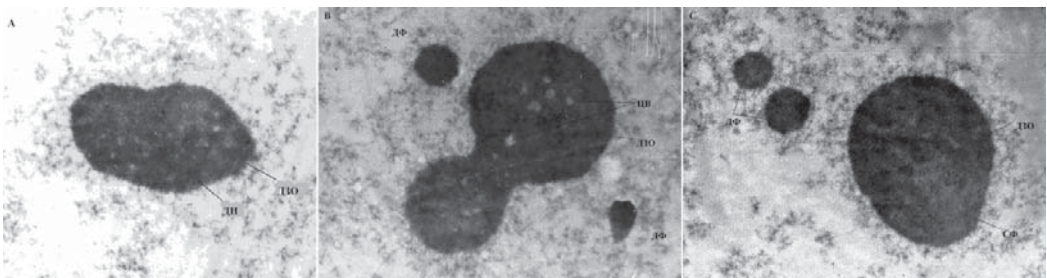


Рис. 3. Ультраструктурні зміни у клітинах *M.tuberculosis bovis* 8 x 130 μÅ.

ДН – дезорганізований нуклеоїд та цитоплазма; ДЗО – деструкція зовнішньої оболонки; ЦВ – цитоплазматичні вакуолі; ДФ – дрібні форми; СФ – сфероїдна форма;
 А – після експозиції з калійною сіллю флуореніду;
 В – після експозиції з срібною сіллю флуореніду;
 С – після експозиції з літєвою сіллю флуореніду.

Вивчення частоти появи ультраструктурних змін у клітинах всіх використаних штамів мікобактерій під дією солей флуореніду (таблиця) показало, що наявність цитоплазматичних вакуолей та ліпоїдних включень мало місце лише у частини клітин після 24 годин експозиції та мінімальної інгібуючої концентрації препаратів (МІК). Збільшення експозиції до 72 год.

або МІК вдвічі призводило до появи названих ультраструктурних змін у всіх клітинах зразка. Дезорганізація нуклеоїду і цитоплазми та збільшення або відсутність периплазматичного простору наступали, переважно, після 72-годинної експозиції мікобактерій із препаратами, і то, лише у частини клітин. У всіх зразках, незалежно від часу експозиції та концентрації препаратів, у незначній частини клітин відбувалася зміна форми клітин на сфероїдну та утворення їх дрібних форм, а після 72 год. експозиції та подвійній мінімальній інгібуючій концентрації препаратів ці зміни з'являлися у всіх клітинах зразка.

Таблиця

Частота виявлення ультраструктурних змін в клітинах мікобактерій, спричинених дією досліджуваних препаратів

Ультраструктурні зміни	Час експозиції			
	МІК		2xМІК	
	24 год.	72 год.	24 год.	72 год.
Дезорганізація нуклеоїду і цитоплазми	-	+	+	+
Наявність цитоплазматичних вакуолей	+	+++	+++	+++
Збільшення або відсутність периплазматичного простору	-	+	-	+
Зміна форми клітин на сфероїдну та утворення дрібних форм	+	+	+	+++
Внутріцитоплазматичні ліпідоподібні включення	+	+++	+++	+++

Примітки:

- відсутність клітин із даними зміни
- + - наявність даних змін у частини клітин
- +++ - дані зміни наявні у всіх клітинах зразка
- МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

Таким чином, частіше ультраструктурні зміни мали місце після 72 год. експозиції культур з антибактеріальними речовинами, ніж після 24 год. При застосуванні вищих концентрацій цих речовин ультраструктурні зміни ставали більш суттєвими.

Отримані результати, в цілому, підтверджують дані аналогічних досліджень, проведених за кордоном [11, 12]. На думку більшості авторів дезорганізація нуклеоїду вказує на інгібування синтезу ДНК в клітині. Деструкція зовнішньої оболонки клітини, як і збільшення або відсутність периплазматичного простору, зміна форми клітин та неповний їх поділ можуть свідчити про інгібування синтезу елементів клітинної оболонки. Дезорганізація цитоплазми, поява в клітинах цитоплазматичних вакуолей та ліпідоподібних включень свідчать про порушення внутрішньоклітинного метаболізму, початок процесів автолізу клітин мікобактерій внаслідок дії на них нових похідних флуренизиду.

О.Р. Кулачковский¹, О.З. Зарична², А.В. Сибирный

¹Львовский национальный университет им. И.Франко, Украина
²ГУ "Львовский НИИ эпидемиологии и гигиены МЗ Украины", Украина

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ МИКОБАКТЕРИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОИЗВОДНЫХ ФЛУРЕНИЗИДА

Резюме

В клетках микобактерий всех исследованных образцов под действием антибактериальных веществ наблюдались такие ультраструктурные изменения: дезорганизация нуклеоида и цитоплазмы, образование цитоплазматических вакуолей и внутриклеточных липоподобных включений, а также изменение формы клеток на сфероидную и на безформенную массу, исчезновение периплазматического пространства, появление в образцах клеток мелких размеров и не полностью поделившихся клеток. Чаще они наблюдались после 72 часов экспозиции культур с антибактериальными веществами, чем после 24 часов экспозиции. При использовании более высоких концентраций этих веществ ультраструктурные изменения были более существенными. Существенной разницы между характером изменений структуры клеток при использовании исследованных антибактериальных веществ не обнаружено.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, электронная микроскопия, ультраструктурные изменения, производные флуренизида.

**ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN CELLS OF MICOBACTERIA
UNDER ACTION OF FLURENIZYD DERIVATIVES**

S u m m a r y

In cells of micobacteria of all investigated samples the following ultrastructural changes were observed: disorganization of a nucleoid and citoplasm, formation of the cytoplasmic vacuoles and endocellular lipide-like inclusions, and also change of the cells form into spheroid and formeless mass, disappearance of periplasmatic space, occurrence of cells of small-size and short incompletely divided cells in the samples. They were observed more often after 72 hours of exposition of the cultures with antibacterial substances, than after 24 hours of exposition. The highest concentration of these substances being used, the ultrastructural changes were more essential. No significant difference between the nature of changes in the structure of cells studied using antibacterial substances has been found.

The paper is presented in Ukrainian.

K e y w o r d s: micobacteria, submicroscopy, ultrastructural changes, flurenizyd derivatives.

The author's address: *Kulachkovskij J.R.*, I.Franko Lviv National University,
1 Universytetska St., Lviv, 79000, Ukraine.

1. *Вейсфейлер Ю.К.* Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичные микобактерии. - Будапешт: Изд.-во АН Венгрии, 1975. - 336 с.
2. *Гольшевская В.И., Корнеев А.А., Черноусова Л.Н., Селина Л.Г., Казарова Т.А., Гришина Т.Д., Сафонова С.Г., Пузанов В.А., Николаева Г.М., Фадеева Н.И.* Применение новых микробиологических технологий в диагностике туберкулеза // Пробл. туберкулеза. – 1996. - № 6. – С. 22-25.
3. *Зарічна О.З.* Антимікобактеріальна активність солей флуоренізиду // Мікробіологічний журнал. – 2007. – 69, № 5. – С. 65-69.
4. *Ліскіна І.В., Кузовкова С.Д., Журило О.А., Барбова А.І., Вишневська Г.М., Загаба Л.М.* Клініко-лабораторні особливості перебігу мультирезистентного туберкульозу легень в Україні // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2011. – 2, № 5. - С. 5-9.
5. *Петрух Л.І., Ткач О.А., Коваленко М.М.* Флуореніліденгідрозиди як потенційні субстанції протитуберкульозних засобів // Мед. хімія. – 2000. – 2, № 2. – С. 70-72.
6. *Разнатовська О.М.* Хіміорезистентний туберкульоз легень – актуальна проблема фтизіатрії // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2010. – 4, № 23. – С. 116-118.
7. *Сибірня Р.І.* Мікобактеріози (імунологічні механізми патогенезу, імунодіагностика та терапія). Автореф. дис. ... д.б.н. – К., 1994. – 38 с.
8. *Тодоріко Л.Д.* Особливості епідемії та патогенезу хіміорезистентного туберкульозу на сучасному етапі // Клиническая иммунология, аллергология, инфектология. – 2011. - № 4. – С. 38-41.
9. *Хоменко А.Г., Гольшевская В.И., Маслова Л.И., Калмыкова Г.Н., Уварова О.А.* Химиотерапевтическая эффективность нового противотуберкулезного фармакологического средства флуоренизида в эксперименте // Пробл. туберкулеза. - 1990. - № 6. - С. 3-6.
10. *Datta B.S., Hassan G., Kadri S.M.* Multidrug-resistant and extensively drug resistant tuberculosis in Kashmir, India // J. Infect. Dev. Ctries. – 2010. – 1, N 4. – P. 19-23.
11. *John L.* Scanning electron microscopy analysis of aged Mycobacterium tuberculosis cells // Can. J. Microbiol. – 2005. – 51, N 3. – P. 277–281.
12. *Reisner B., Woods G., Popov V.* Electron microscopic analysis of Mycobacterium avium complex isolates exposed to ciprofloxacin, rifabutin, ethambutol and clarithromycin // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 1997. – 1, N 3. – P. 270– 275.
13. *Reynolds E.S.* The use of citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. – 1963. – N 17. – P. 208– 212.
14. *Velayati A.A., Farnia P., Merza M.A., Zhavnerko G.K., Tabarsi P., Titov L.P., Ghanavei J., Farnia P., Setare M., Poleschuyk N.N., Owlia P., Sheikolslami M., Ranjbarf R., Masjedi M.R.* New insight into extremely drug-resistant tuberculosis: using atomic force microscopy // Eur. Respir. J. – 2010. – N 36. – P. 1490-1493.
15. *Velayati A.A., Farnia P., Masjedi M.R., Ibrahim T.A., Tabarsi P., Haroun R.Z., Kuan H.O., Ghanavi J., Farnia P., Varahram M.* Totally drug-resistant tuberculosis strains: evidence of adaptation at the cellular level // Eur. Respir. J. – 2009. – N 34. – P. 1202-1203.

Отримано 18.04.2011