

В.Д.Товажнянская¹
И.В.Сорокина¹
И.И.Яковцова²

¹ Харьковский национальный
медицинский университет

² Харьковская медицинская
академия последипломного
образования

Ключевые слова: надпочеч-
ник, плод, клебсиеллез, внут-
риутробная инфекция, крыса.

Надійшла: 21.08.2016

Прийнята: 12.09.2016

УДК: [616.45-022.7:579.842.16] – 091.8-092.9

ВЛИЯНИЕ МАТЕРИНСКОГО КЛЕБСИЕЛЛЕЗА НА МОРФО- ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ ПЛОДОВ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

*Работа выполнена в рамках научно-исследовательской темы «Влияние мате-
ринской плодовой инфекции на эмбриогенез и филогенез потомков (клинико-
морфологическое исследование)», номер государственной регистрации
0115U000987.*

Реферат Нами изучены морфофункциональные особенности коры надпочеч-
ников плодов под влиянием материнского клебсиеллеза. Реакция на сильные
стрессорные воздействия характеризуется практически одновременным, но
различным по степени вовлечением всех морфофункциональных зон надпо-
чечников в единую адаптивную реакцию организма. Выявленные нами изме-
нения могут рассматриваться как проявление компенсаторно-
приспособительного процесса в ответ на внутриутробную инфекцию.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 283-287.

© В.Д.Товажнянская, И.В.Сорокина, И.И.Яковцова, 2016

✉ viratov@yahoo.com

Tovazhnianska V.D., Sorokina I.V., Yakovtsova I.I. Influence of maternal infection caused by Klebsiella pneumonia on morphologic and functional state of fetuses' adrenal glands cortex (experimental research).

ABSTRACT. Background. Infections of fetuses and newborns caused by Klebsiella themselves and in polymicrobial associations have short incubation period, as well as a high percentage of deaths. Intrauterine infection of fetus and fetal chronic hypoxia should be considered as conditions that require a lot of adaptive changes where one of the most important roles is performed by adrenal glands. **Objective:** to identify the influence of mother infection caused by K.pneumoniae on fetal adrenal cortex. **Methods:** During the experiment, laboratory rats were divided into 3 groups. Group 1 - control - pregnant rats lived in physiological conditions. Group 2 - modeling of chronic intrauterine hypoxia - pregnant rats throughout pregnancy (21 days) were subjected to a daily high altitude hypoxia. Group 3 – modeling of infection – using the infective dose of Klebsiella pneumonia was modeled. Then male were mated to infected female, females got pregnant. All rats were removed from the experiment on the last stages of gestation in order to extract fetus for further study. The adrenal glands of fetuses were examined using histological, morphometric and immunohistochemical methods. **Results.** Infectious pathology of mother has a more detrimental effect on fetal adrenal glands, than "pure" chronic intrauterine hypoxia. In group 3 hypoplasia is more pronounced in zona glomerulosa. Severe lesions of cytolysis and resorption of cell with increasing of cortisol production are seen in zona fasciculata. In fetal zone there are depletion of functional activity, zone is decreasing and has a tendency to decrease hormone production. **Conclusion:** when mother is infected by Klebsiella pneumonia in constant and fetal adrenal cortical areas of fetus changes manifested by hypoplasia of zona glomerulosa, hyperactivity of zona fasciculata and depletion of functional activity in fetal zone.

Key words: adrenal, fetus, intrauterine infection, rats.

Citation:

Tovazhnianska V.D., Sorokina I.V., Yakovtsova I.I. [Influence of maternal infection caused by Klebsiella pneumonia on morphologic and functional state of fetuses' adrenal glands cortex (experimental research)]. *Morphologia.* 2016;10(3):283-7. Russian.

Введение

В мире широко распространены заболевания, вызванные условно-патогенными микроорганизмами, среди которых клебсиелла занимает одно из ведущих мест [1]. Внутриутробное инфици-

рование плода происходит от больной матери. Микробные инфекции часто протекают без выраженных клинических симптомов, не вызывают тревоги ни у матерей, ни у врачей. Однако, возникает потенциальная опасность для беременной

и плода, связанная с восходящим путем инфицирования ребенка из половых органов женщины и колонизацией новорожденного условно-патогенными микроорганизмами [2].

Клебсиеллезные инфекции как сами, так и в полимикробных ассоциациях, у плодов и новорожденных имеют короткий инкубационный период, а также высокий процент летальных исходов. При инфицировании летальный исход может наступить в течение двух суток, что у новорожденных составляет 45,6% общей смертности [3].

Наиболее частным спутником инфекционной патологии матери является хроническая внутриутробная гипоксия (ХВГ). ХВГ диагностируется в 10-15% общего числа родов [4]. При ХВГ у детей развиваются серьезные постгипоксические последствия, которые приводят к развитию различных хронических заболеваний, к ухудшению качества жизни ребенка, а иногда к инвалидизации и летальному исходу [5].

В формировании адаптационных реакций на различные факторы внешней среды существенная роль принадлежит эндокринной системе, а в частности, надпочечникам, как одним из ведущих и чрезвычайно лабильных ее звеньев [6]. Внутриутробное инфицирование плода и хроническую внутриутробную гипоксию следует рассматривать как состояния, которые требуют множества приспособительных изменений, в которых одну из важнейших ролей играет надпочечник, синтезирующий гормоны стресса.

Наименее изученным является морфофункциональное состояние надпочечников при действии инфекционной патологии матери, вызванной *K.pneumoniae*. В литературе отсутствуют работы, в которых дана исчерпывающая информация об изменении состояния надпочечников в динамике плодово-материнской инфекции.

Учитывая скудность данных литературы и ее очевидную актуальность, изучение изменений морфофункционального состояния надпочечников при клебсиеллезе матери необходимо для полного понимания формирования патогенеза происходящих изменений [7].

Цель исследования – в эксперименте выявить влияние инфицирования матери *K.pneumoniae* на состояние коры надпочечников плодов крыс.

Материалы и методы

В качестве лабораторных животных использовались крысы линии WAG. Крысы были разделены на три группы: группа контроля (ГК), крысы которой содержались в физиологических условиях с нормально протекающей беременностью; группа с хронической внутриутробной гипоксией (ХВГ), крысы которой были подвергнуты кислородному голоданию (группа сравнения) и основная группа (ОК), крысы-матери которой были инфицированы *K.pneumoniae*.

Так как в клинике разделить два состояния (инфицирование и ХВГ) не представляется возможным, мы решили провести два эксперимента, результаты которых помогут нам отличить «чистую» ХВГ от ХВГ, которая сопровождается инфекцией.

Для моделирования ХВГ мы провели эксперимент. Беременные крысы на протяжении 21 дня подвергались ежедневному кислородному голоданию – высокогорной гипоксии. На поздних сроках гестации самок выводили из эксперимента. Плоды извлекались для исследования. Для моделирования высокогорной гипоксии использовали герметичную барокамеру, в которой создавали условия резкого уменьшения атмосферного давления, выкачивая воздух. Каждый день в одно и то же время крыс на 20 минут помещали в условия, которые соответствуют подъему на высоту 7500 метров (287 мм. рт. ст.)

Для инфицирования крыс также был проведен эксперимент. На первом его этапе была установлена инфицирующая доза для развития подострого, пролонгированного, инфекционно-воспалительного процесса в брюшной полости крысы-самки (в качестве инфекционного агента использовался референс-штамм *Klebsiella pneumoniae* (NCTC 5055)). На втором этапе эксперимента, к инфицированной самке подсаживали самцов, самки беременели, от беременных самок получали плоды. [8] Выведение животных из эксперимента проводилось согласно условиям эвтаназии, указанным в методических рекомендациях МОЗ Украины, и этическим принципам проведения экспериментов на животных согласно положениям «Европейской конвенции о защите позвоночных, которых использовали для экспериментальных и иных целей». Эвтаназию лабораторных животных проводили путем передозировки тиопентала натрия с последующей декапитацией.

У плодов всех групп извлекались оба надпочечника. Органы фиксировались в 10% формалине, затем заливались в парафин. Для исследования были использованы гистологический метод: окраска срезов гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии. [9] Микропрепараты изучались на микроскопе «Olympus BX-41». Иммуногистохимическое исследование проводили непрямой методом Кунса с антисывороткой к кортизолу и ФИТЦ (флуоресцеина изогиоцианат) (в качестве маркера гормонопродукции). Препараты изучались в люминисцентном микроскопе «Axioskop 40» (Carl Zeiss, ФРН). Оптическую плотность интенсивности иммунофлюоресценции измеряли по методу Губиной-Вакулик Г.И. и соавт. [9] выражали в условных единицах свечения (усл.ед.св.)

Морфометрическое исследование осуществлено на компьютерных фотографиях: проводилось вычисление относительных объемов

основных структурных компонентов, при подсчете плотности клеток каждой зоны, площади ядер, клеток и цитоплазмы в надпочечниках, исследование выполнялось с помощью программы Photoshop CS5. Материал данных обрабатывался методами математической статистики с помощью пакета прикладных программ компании Microsoft "Excel – 5.0". Достоверность рассчитывалась по методу Манна-Уитни-Уилкоксона [10].

Результаты исследования

Надпочечники всех групп имели округло-треугольную форму, были покрыты соединительнотканной капсулой. При микроскопии хорошо заметно, что клетки коры образуют перпендикулярно ориентированные эпителиальные тяжи, промежутки между которыми заполнены рыхлой соединительной тканью, в которой проходят сосуды и нервы.

При исследовании ГК, клубочковая зона хорошо дифференцировалась от пучковой, благодаря слою камбиальных клеток. Клетки клубочковой зоны содержали светлое ядро с мелкими глыбками хроматина, и светлую эозинофильную цитоплазму. Пучковая зона коры надпочечников у плодов крыс контрольной группы узкая. Спонгиоциты имеют эозинофильную цитоплазму и глыбчатый хроматин в ядре. У крысят ГК основную толщину коры составила фетальная зона.

У крысят группы ХВГ гистологическая структура надпочечников существенно отличалась от ГК. Клубочковая зона коры надпочечников увеличена, вследствие более рыхлого расположения клеток (в относительных объемах $17,55\% \pm 0,46$; в ГК: $16,04\% \pm 0,24$, $P \leq 0,01$). Это подтверждается достоверно меньшей плотностью клеток в поле зрения $\times 400$ ($76,50 \pm 5,39$; в ГК: $113,10 \pm 3,76$, $P \leq 0,01$), при этом отмечается некоторое увеличение площади клетки ($35,28 \pm 0,53$; в ГК: $30,59 \pm 0,34$, $P \leq 0,01$) за счет цитоплазмы, о чем свидетельствует почти равная площадь ядра ($11,79 \pm 0,21$; в ГК: $11,52 \pm 0,16$, $P \geq 0,05$).

Ширина пучковой зоны в группе ХВГ увеличена по сравнению с контрольной группой (в относительных объемах $40,45\% \pm 0,95$; в ГК: $26,85\% \pm 0,42$, $P \leq 0,01$), вследствие склеротических изменений, а также повышенного кровенаполнения синусоидов. В зоне заметны очаги цитолитиза и резорбции спонгиоцитов. Признаки гиперплазии зоны отсутствовали, что подтверждается равной контрольному плотностью клеток в поле зрения $\times 400$ ($216,00 \pm 2,52$; в ГК: $218,60 \pm 4,10$, $P \geq 0,05$), а также, некоторым уменьшением площади спонгиоцита ($62,74 \pm 0,53$; в ГК: $69,87 \pm 0,62$, $P \leq 0,01$), возможно, вследствие уменьшения объема цитоплазмы (площадь ядра $23,46 \pm 0,29$; в ГК: $20,87 \pm 0,14$, $P \leq 0,05$). При иммуногистохимическом исследовании с антителом к кортизолу выявлена активная иммунофлюоресценция в пучковой зоне (оптическая

плотность интенсивности свечения: $0,93 \pm 0,02$ усл.ед.св., в ГК: $0,72 \pm 0,02$ усл.ед.св., $P \leq 0,01$)

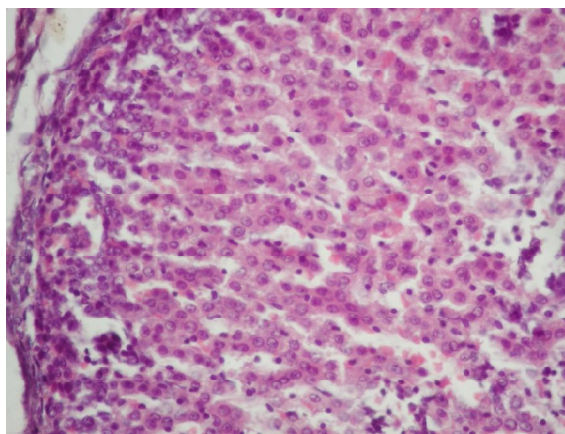


Рис.1. Рыхлое расположение спонгиоцитов в пучковой зоне коры надпочечника плода крысы. $\times 400$. Окраска гематоксилином и эозином.

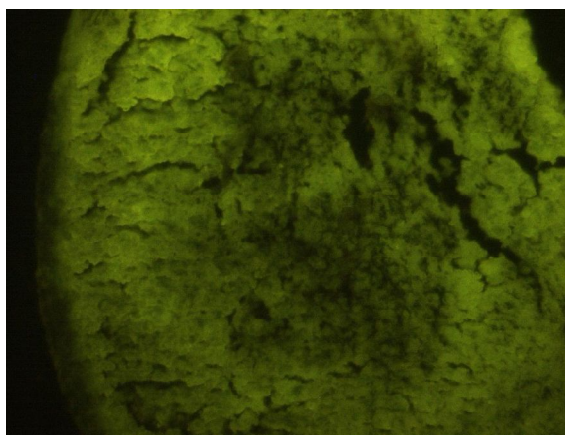


Рис.2. Выраженная иммунофлюоресценция кортизола в пучковой зоне коры надпочечника плода крысы. $\times 100$.

Фетальная кора уменьшена по ширине (в относительных объемах $42,00\% \pm 0,62$; в ГК: $57,11\% \pm 0,52$, $P \leq 0,01$), при этом плотность клеток увеличена ($139,10 \pm 5,58$; в ГК: $131,20 \pm 1,24$, $P \geq 0,05$), меньше средняя площадь клетки ($71,98 \pm 0,13$; в ГК: $83,11 \pm 1,07$, $P \leq 0,01$) и площадь ядра ($22,04 \pm 0,12$; в ГК: $23,37 \pm 0,31$, $P \leq 0,01$). В фетальной коре иммунофлюоресценция кортизола снижена, по сравнению с контрольной группой (оптическая плотность интенсивности свечения: $0,73 \pm 0,04$ усл.ед.св., в ГК: $0,79 \pm 0,03$ усл.ед.св., $P \geq 0,05$)

У крысят ОГ гистологическая картина отличалась от группы ХВГ. Клубочковая зона коры надпочечников достоверно уменьшена (в относительных объемах $13,77\% \pm 0,43$, при $17,55\% \pm 0,46$ в ХВГ, $P \leq 0,01$), но при этом выглядит рыхлой, плотность клеток в поле зрения $\times 400$ также несколько меньше ($67,85 \pm 2,86$, при

76,50±5,39 в ХВГ, $P \geq 0,05$), также наблюдается уменьшение площади клетки (25,18мкм²±0,07, при 35,28мкм²±0,34 в ХВГ, $P \leq 0,01$), площадь ядра осталась практически неизменной, однако имеется тенденция к ее увеличению (11,94мкм²±0,06, при 11,79мкм²±0,21, $P \geq 0,05$).

Ширина пучковой зоны снижена по сравнению с ХВГ (38,83%±1,07, при 40,45%±0,95 в ХВГ, $P \leq 0,05$), однако увеличена по сравнению с ГК (26,85%±0,42, $P \leq 0,01$), некоторое увеличение количества клеток в поле зрения (226,88±3,71 при 216,00±2,52 в ХВГ, $P \geq 0,05$), площадь клеток уменьшена (48,77мкм²±0,1 при 62,74мкм²±0,53 в ХВГ, $P \leq 0,01$), при площади ядра в ОГ 22,6мкм²±0,08, в ХВГ 23,46мкм²±0,29, $P \leq 0,01$. Обращает на себя внимание наличие очагов цитолита и резорбции спонгиозитов с образованием пустот. При иммуногистохимическом исследовании выявлена выраженная иммунофлюоресценция кортизола в пучковой зоне (оптическая плотность интенсивности свечения: 0,99±0,02 усл.ед.св., в ХВГ: 0,92±0,02 усл.ед.св., $P \leq 0,05$).

В относительных объемах ширина фетальной зоны выше (47,83±1,14, в ХВГ 42,00±0,62, $P \leq 0,01$), однако достоверно снижена плотность клеток (103,63±0,96, при 139,10±5,58 в ХВГ $P \leq 0,01$), меньше средняя площадь клетки (57,65±0,12 при 71,98±0,13 в ХВГ, $P \leq 0,01$), однако, площадь ядра в ОГ осталась практически неизменной (22,02мкм²±0,06, в ГК 22,04мкм²±0,12, $P \geq 0,05$). Определяется некоторое снижение уровня иммунофлюоресценции кортизола в фетальной зоне (оптическая плотность интенсивности свечения: 0,68±0,02 усл.ед.св., в ХВГ: 0,73±0,04 усл.ед.св., $P \geq 0,05$).

Обсуждение результатов исследования

Реакция на сильные стрессорные воздействия характеризуется практически одновременным, но различным по степени вовлечением всех морфофункциональных зон надпочечников в единую адаптивную реакцию организма [11].

По данным О.В. Заратьянца, в условиях длительного непрекращающегося антигенного воздействия на организм, при генотипически

полноценной структуре иммунной системы, при этом ведущее значение принадлежит реактивным сдвигам в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе, приводит к увеличению содержания кортикостероидов в крови, тем самым оказывая стрессорное влияние на формирование всех органов и систем плода [12].

Выявленные нами изменения могут рассматриваться как проявление компенсаторно-приспособительного процесса в ответ на внутриутробную инфекцию.

Полученные результаты позволяют предположить, что инфекционная патология матери оказывает еще более губительное влияние на надпочечники плода, чем «чистая ХВГ». В ОГ более выражена гипоплазия клубочковой зоны. Выраженные очаги цитолита и резорбции спонгиозитов в пучковой зоне с повышением иммунофлюоресценции кортизола. В фетальной зоне наблюдается истощение ее функциональной активности, в виде уменьшения зоны и тенденции к уменьшению гормонопродукции. Данные свидетельствуют в пользу приспособительных реакций надпочечника в ответ на антигенную стимуляцию [13], в нашем исследовании ей явился материнский клебсиеллез.

Заключение

При инфицировании матери *Klebsiella pneumoniae* в постоянной и фетальной зонах коры надпочечников плода развиваются разнонаправленные изменения, проявляющиеся гипоплазией клубочковой зоны, гиперфункцией пучковой зоны и истощением функциональной активности фетальной зоны.

Перспективы дальнейших исследований

В будущем необходимо проведение иммуногистохимического исследования надпочечников умерших плодов и новорождённых детей в связи с перенесённой ВУИ для изучения пролиферативной активности клеток различных зон надпочечника Ki-67, степени выраженности апоптоза P-53 и кортизол-продуцирующей активности.

Литературные источники

References

1. Korotyaev AI, Babichev AC. [Medical microbiology, immunology and virology]. St Petersburg: Foliant, 2000. 580 p. Russian.
2. Tsinzerling AV. [Perinatal infections] Moscow: Meditsina; 2002. 544 p. Russian.
3. Andreev AV, Gubina-Vakulyk GI. [Perinatal hypoxia as cause of pathological changes in adrenal glands of fetuses and newborns] International medical journal, 2013;19(3): Russian
4. Gabdulina TV, Timoshina EL, Yuryev SYu, Makhmuthodzhayev ASH. [The influence of urogen-

- ital infections on pregnancy, condition of foetus and neonate] Bulletin of Siberian medicine. 2002;1(1):84-8. Russian.

5. Davydova YuV. [Prevention of perinatal infection and its consequences in pregnant women]. Reproductive Endocrinology. 2013;(11):17-35. Russian.

6. Regnault TR, Galan HL, Parker TA, Anthony RV. Placental development in normal and compromised pregnancies – a review. Placenta. 2002 Apr;23 Suppl A:S119-29.

7. Sidorova IS, Makarov IO, Matvienko NA. [Intrauterine infection: prenatal care, childbirth and postpartum period: a tutorial]. Moscow: MEDpress-inform; 2012. p. 160. Russian.
8. Markovskiy VD, Sorokina IV, Miroshnychenko MS, Pliten OV, Mishyna MM, Shapkin AS, Kaluzhyna OV, inventors; Kharkiv national medical university, assignee. [Method for modeling intrauterine infection of fetus and newborn as a consequence of subacute infectious-inflammatory mother process]. Ukrainian patent UA 108806. 2015 Jun 10. Int. Cl. G09B 23/28. Ukrainian.
9. Hubina-Vakulyk HI, Sorokina IV, Markovskiy VD, Kykhtenko OV, Kupriianova LS, Sydorenko RV, inventors; Kharkiv national medical university, assignee. [Method for quantitative determination of content of antigen in biological tissues]. Ukrainian patent UA 46489. 2009 Dec 25. Int. Cl. G01N 33/00. Ukrainian.
10. Zaitsev VM, Leafliandskiy VG, Marynlin VI. [Applied Medical Statistics] St Petersburg: Foliant, 2003. 432 p. Russian.
11. Filaretova LP. [Stress in physiological studies]. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. 2010 Sep;96(9):924-35. Russian.
12. Sarkisov DS, Perov YuL, editors. [Microscopic technique: guidelines]. Moscow: Meditsina; 1996. 544 p. Russian.
13. Mekhdiieva YuD, Murzabaiev KhKh, Fayzullina RM. [Influence of intrauterine fetus infection on the development of thymus and adrenal cortex pathology]. Advances in current natural sciences. 2009(2):46-7. Russian.

Товажнянска В.Д., Сорокіна І.В., Яковцова І.І. Вплив материнського клібсієльозу на морфофункціональний стан кори наднирників плодів (експериментальне дослідження).

Реферат. Нами вивчено морфофункціональні особливості кори надниркових залоз плодів під впливом материнського клібсієльозу. Реакція на сильні стресові впливи характеризується практично одночасним, але різним за ступенем залученням всіх морфофункціональних зон наднирників в єдину адаптивну реакцію організму. Виявлені нами зміни можуть розглядатися як прояв компенсаторно-приспосувального процесу у відповідь на внутрішньоутробну інфекцію.

Ключові слова: наднирник, плід, клібсієльоз, внутрішньоутробна інфекція, щур.