

УДК 578.27+578.3+616.921.5+616.98]-092.4

І.В. Гомоляко¹, Н.Є. Ключкова¹, С.Л. Рибалко², Д.Б. Старосила², В.П. Лозицький³, А.С. Федчук³

ПОРІВНЯЛЬНА ВІРУСОЛОГІЧНА І МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГЕРПЕТИЧНОЇ ТА ГРИПОЗНОЇ ІНФЕКЦІЙ

¹ДУ “Національний інститут хірургії і трансплантології ім. О.О. Шалімова НАМН України”, м. Київ²ДУ “Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України”, м. Київ³ДУ “Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І.І. Мечникова МОЗ України”, м. Одеса

Експериментальна герпетична інфекція суттєво відрізняється від грипозної за вірусологічними та морфологічними характеристиками і супроводжується значно більш вираженими ураженнями лімфоїдної тканини, судинними розладами та дистрофічними змінами у внутрішніх органах з послідовністю печінка > нирки > серце > легені.

Ключові слова: грип, герпес, інфекція, вірусологія, морфологія.

Пошук діагностичних критеріїв для встановлення клінічного діагнозу при інфекційному захворюванні є актуальним, особливо коли мова йде про герпетичну інфекцію [2]. Герпетична інфекція є найбільш поширеною хронічною інфекцією, а грип — найбільш поширеною гострою інфекційною хворобою, які завдають великої шкоди здоров'ю населення і призводять до значних матеріальних втрат. Герпетична інфекція і грип, хоча і відрізняються за багатьма критеріями, тим не менше мають спільні клінічні прояви на початку захворювання — можуть мати перебіг гострого респіраторного захворювання. Незважаючи на велику історію дослідження обох вірусних інфекцій, морфологічні зміни в органах, які супроводжують їх розвиток, досліджені недостатньо, відсутні співставлення морфологічних та вірусологічних даних. Особливо це стало важливим, оскільки відбувається переоцінка ролі і місця інфекцій, викликаних вірусами сімейства *Herpesviridae*, в загальній структурі захворюваності. Герпетична інфекція є дуже підступною, оскільки поряд із маніфестуючими формами може протікати без суттєвих клінічних проявів, не формує стійкого імунітету, має чисельні “клінічні маски” [3, 5, 6, 7, 8]. Тому розуміння структурних відмінностей між збудниками герпетичної та іншими респіраторними інфекціями є дуже важливим для профілактики та адекватного лікування хворого.

Метою дослідження було проведення порівняльних вірусологічних і морфологічних досліджень збудників герпесвірусної та грипозної інфекцій в експерименті для встановлення особливостей розвитку органних уражень при цих видах патології.

Матеріали та методи

В експерименті були використані неінбредні білі миші обох статей вагою 15–18 г (n=42), групу порівняння склали 5 здорових мишей. Тварин утримували в стандартних умовах віварію і дотримувались вимог Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються для дослідницьких та інших наукових цілей (Страсбург, 18 березня 1986 р.). Інфекції моделювали шляхом введення культур вірусів у найбільш чутливі до них органи.

Експериментальні дослідження генералізованої герпетичної інфекції проводили на моделі герпетичного менінгоенцефаліту. Ліофілізований вірус звичайного герпесу (ВЗГ) 1-го антигенного типу, штам VC, був отриманий з музею вірусів Інституту вірусології ім. Д.І.Івановського РАМН. Інфекційний титр вірусу згідно його цитопатичної дії (ЦПД) в культурі клітин RK-13 складав 5,0–5,5 Іг ТЦД₅₀/0,1 мл. При внутрішньомозковому зараженні білих мишей 10-кратними розведеннями суспензії тканини головного мозку летальність мишей складала — 4,0–4,5 Іг ЛД₅₀. Миші були заражені ВЗГ-1 в дозі 10 LD₅₀ шляхом введення в мозок вірусної суспензії в об'ємі 0,03 мл. Наявність гострої генералізованої герпетичної інфекції підтверджували за допомогою визначення інфекційного титру вірусу в тканинах головного мозку та внутрішніх органах інфікованих мишей методом зараження культур клітин RK-13 10-кратними розведеннями суспензії тканин.

При моделюванні грипозної інфекції був використаний алантоїсний штам вірусу A/PR/8/34(H1N1) адаптований до легень мишей, який був отрима-

© І.В. Гомоляко, Н.Є. Ключкова, С.Л. Рибалко, Д.Б. Старосила, В.П. Лозицький, А.С. Федчук

ний з музею ДУ “Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І.І. Мечникова МОЗ України” (УНДПЧІ). Вірус накопичували шляхом проведення декількох пасажів через легені білих мишей та наступного зараження легенеvim вірус-вміщуючим гомогенатом 11-денних курячих ембріонів з подальшою інкубацією протягом 48 годин при +37°C. В якості інфекційного матеріалу використовували зразки з найбільш високими титрами. Зараження мишей здійснювали інтраназально під легким ефірним наркозом алантоїсною рідиною, яка містила вірус грипу A/PR/8/34(H1N1) в дозі 0,5 LD₅₀ [1, 4].

В легенях визначали кількість вірусу шляхом титрування 10% гомогенатів на культурі тканини хоріон-алантоїсних оболонок 11–13-денних курячих ембріонів з подальшими розрахунками lg TID₅₀ [1, 3]. В печінці, селезінці, нирках, гомогенатах кісткового мозку наявність вірусу визначали якісним методом.

Вірусологічне та морфологічне дослідження в обох групах проводили на 1, 3, 5, 7 добу після зараження. Летальність мишей заражених вірусом герпесу на 9 добу експерименту досягала 100%. Спостереження за мишами зараженими вірусом грипу продовжували на 10, 14 і 21 добу.

Внутрішні органи мишей фіксували в 10,0% нейтральному формаліні, опрацьовували за загальноприйнятою гістологічною методикою, парафінові зрізи забарвлювали гематоксиліном-езозином. Морфологічні зміни у внутрішніх органах тварин оцінювали за допомогою мікроскопу ВХ-43 (Olympus, Японія). Додатково виявлені зміни оцінювали напівкількісно з виділенням 5 градацій.

Таблиця 1. Інфекційні титри ВЗГ-1 в органах мишей, заражених ВЗГ-1

Інфекційні титри ВЗГ-1 в органах мишей в різні строки дослідження lg ID ₅₀		
Органи	на 3 добу	на 5 добу
Мозок	2,0	2,0
Легені	2,0	2,5
Печінка	3,0	2,5
Селезінка	2,0	2,5
Кістковий мозок	2,0	2,0
Ганглії	2,0	2,0
Міокард	2,0	3,0
Нирки	2,0	3,0

Результати та їх обговорення

Результати вірусологічних досліджень. Вірусологічні дослідження показали, що при моделюванні герпетичної інфекції відбувалась її генералізація, а рівень інфекційних титрів ВЗГ-1 в органах інфікованих мишей коливався в межах від 2,0 до 3,0 lg ID₅₀, що свідчить про деякі відмінності в рівні вірусного навантаження в досліджених органах. Найвищій середній показник інфекційного титру на 3 добу виявлено в печінці (3,0 lg ID₅₀), на 5 добу — в міокарді і нирках (3,0 lg ID₅₀). В інших органах він становив 2,0 lg ID₅₀ в усі строки дослідження. Вміст вірусу в головному мозку також становив 2,0 lg ID₅₀ (табл. 1).

У тварин, інфікованих вірусом грипу, в легенях максимальна кількість вірусу накопичується на 3 добу, а потім поступово знижується і на 14 добу в легенях і в інших органах спостерігається повна елімінація вірусу (рис. 1).

Результати морфологічних досліджень. При зараженні вірусом ВЗГ-1 у мишей розвивався генералізований запальний процес з ураженням внутрішніх органів. В легенях спостерігались дифузно-осередкові виражені судинні розлади — паретичне розширення та повнокров'я капілярів, стази в капілярах, крововиливи та випіт в альвеолах, набряк між альвеолярних перетинок, помірна дифузно-осередкова інтерстиціальна інфільтрація, осередки емфіземи; спостерігались субплеврально розташовані осередки пневмонії. Морфологічні зміни в легенях залишались в цілому помірними з рівномірним ураженням органу і були стабільними незалежно від строків експерименту (рис. 2).

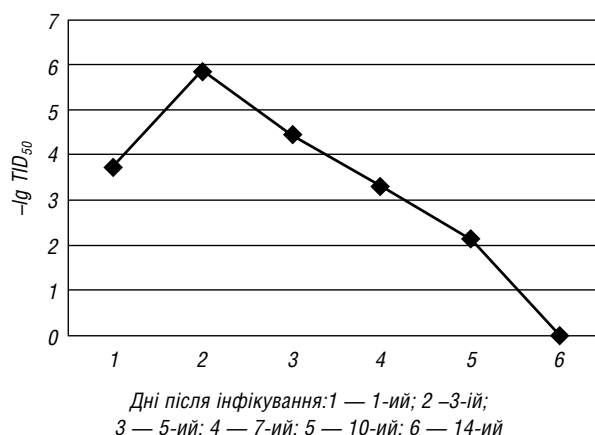
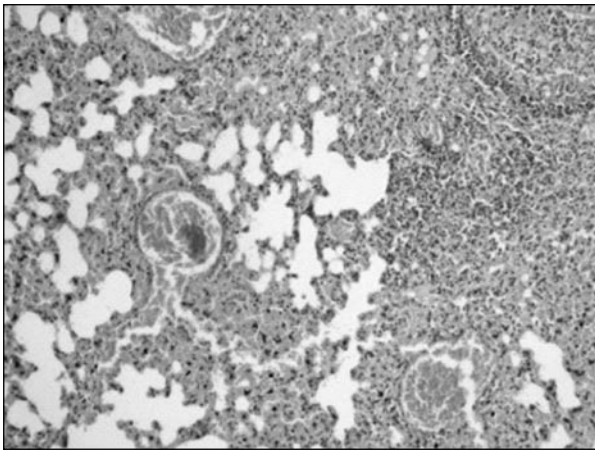
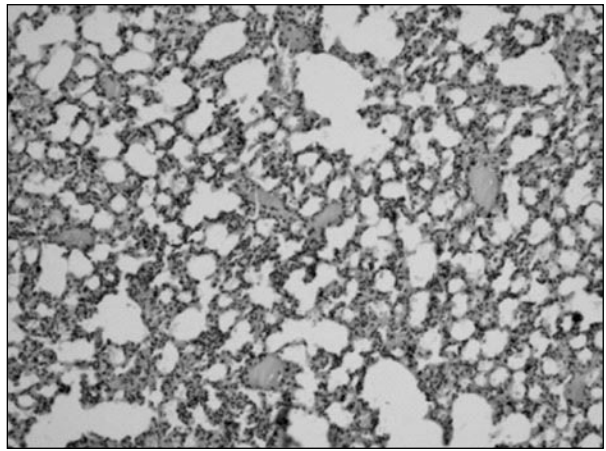


Рисунок 1. Динаміка накопичення інфекційного вірусу грипу A/PR/8/34(H1N1) в легенях інфікованих тварин



А



Б

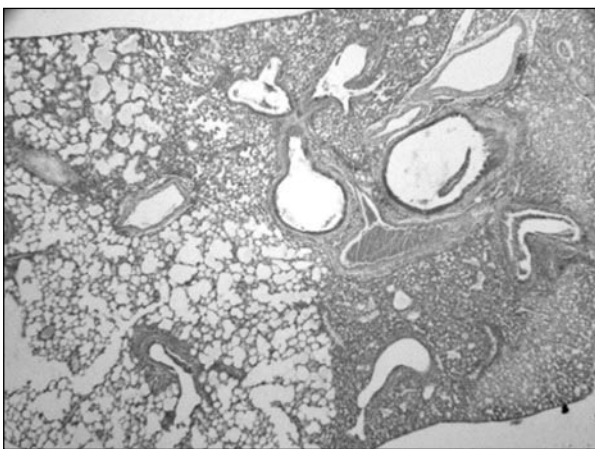
Рисунок 2. Легені тварини, інфікованої ВЗГ-1. А. Виражені повнокров'я капілярів, осередок запалення. Б. Виражена дифузна інтерстиціальна інфільтрація і набряк міжальвеолярних перетинок. Забарвлення гем.-еозин. Збільшення ок. 10, об. 20

Вірус грипу викликав в легенях мишей більш виражений осередковий характер (рис. 3). Це обумовлене в першу чергу тим, що в даному експерименті легені є органом-мішенню. Найбільш поширеними були явища гострого бронхіту і бронхопневмонії, набряк, нерівномірно вираженої осередкової інтерстиціальної інфільтрації. Виявлені зміни розвивались в часі хвилеподібно, але з наростаючою інтенсивністю незважаючи на елімінацію вірусу, що є свідченням приєднання бактеріальної інфекції.

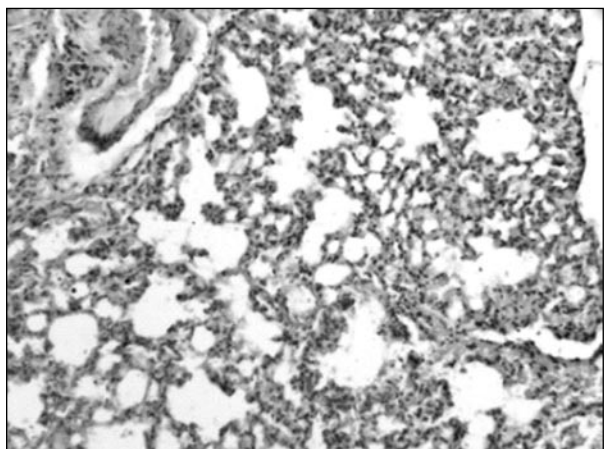
Герпетичне ураження печінки було вираженим, неоднорідним і також не залежало суттєво від строків експерименту. В картині ураження домінували судинні розлади — паретичне розширення судин та синусоїдів, повнокров'я, пілефлебії, тромбози з утворенням осередків некрозу. Ці зміни супроводжувались дифузною вираженою

білково-гідропічною дистрофією з вираженим поліморфізмом ядер гепатоцитів, їх вакуолізацією або гіперхромністю та активацією печінкових макрофагів за відсутності лімфоїдної інфільтрації портальних просторів. У окремих тварин в картині ураження присутня периканалікулярна лімфогістіоцитарна інфільтрація, явища гнійного холангіту, ділянки інтралобулярної запальної інфільтрації (рис. 4).

Ураження печінки при грипі було подібним за сімеотикою, але менш розповсюдженим. На фоні помірно вираженої білково-гідропічної дистрофії з характерними змінами ядер спостерігались окремі точкові інтралобулярні некрози із запальною інфільтрацією, зрідка пілефлебії, помірна реакція печінкових макрофагів та помірна лімфоїдна інфільтрація портальних просторів (рис. 5). Судинні розлади при грипі або не спостерігались, або були слабо виражені. В обох групах мали місце зміни

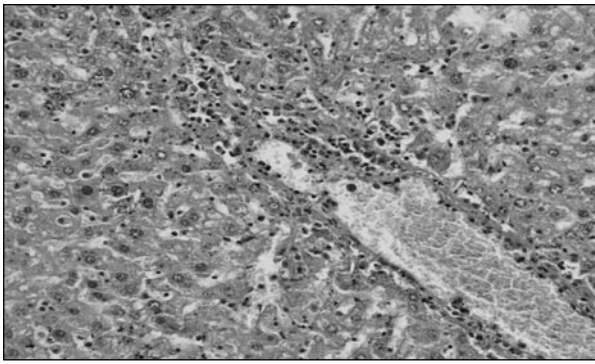


А

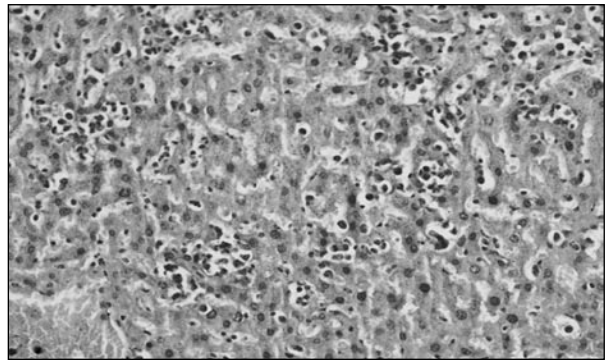


Б

Рисунок 3. Легені тварини, інфікованої А/PR/8/34(Н1N1). А. бронхопневмонія. Б. Помірна нерівномірна інтерстиціальна інфільтрація міжальвеолярних перетинок. Забарвлення гем.-еозин. Збільшення ок. 10, об. 20



А



Б

Рисунок 4. Печінка тварини, інфікованої ВЗГ-1. А. Виражене повнокров'я судини, венулїт, дистрофія гепатоцитів і поліморфізм ядер. Б. Виражена дифузна запальна інфільтрація паренхіми печінки Забарвлення гем.-еозин. Збільшення ок.10, об. 40

характерні для гепатиту, але ступінь їх вираженості при ВЗГ-1 був вищим.

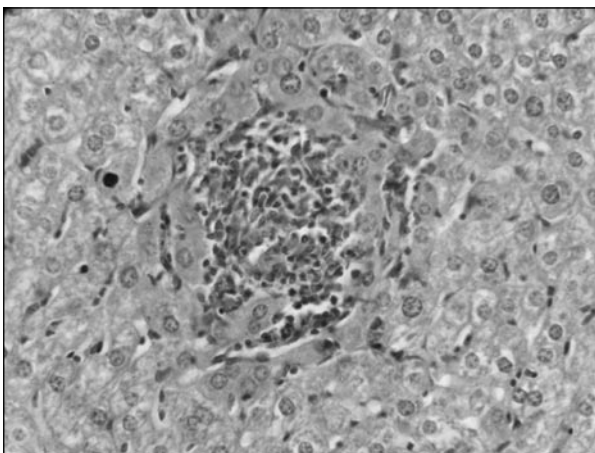
В картині ураження нирок при інфікуванні ВЗГ-1 також домінували значні судинні розлади та дистрофічні зміни різної вираженості (рис. 6 А). В корковій зоні виявляли крововиливи і дрібні осередки некрозу; в клубочках — явища гломерулїту та гломерулопатїї з підвищенням клітинності клубочків та ішемічним ураженням; в канальцях — виражені явища дифузної білково-гідропічної дистрофії та дифузно-осередкові некрози епітелію канальців. Запальні зміни як правило були незначними, але в окремих випадках спостерігались явища артеріїту та ендотелїїту.

При грипі у більшості тварин мали місце дуже незначні зміни здебільшого у вигляді застійного повнокров'я судин та помірних дистрофічних змін в епітелії канальців. У окремих тварин спостерігались явища гломерулїту в окремих клубочках.

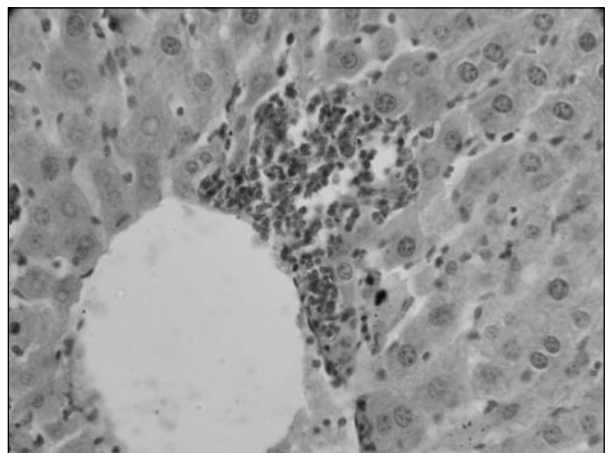
У тварин з герпетичною інфекцією ураження серцевого м'язу, як і інших органів, головним чином проявлялось судинними розладами — паретичним розширенням капілярів, застоєм крові з осередковою білковою дистрофією, вакуолізацією цитоплазми та лізисом окремих кардіоміоцитів або навіть з утворенням ділянок некрозу (рис. 6 Б). У однієї тварини на 5 добу спостереження були виявлені дрібні осередки гнійного запалення (гнійний міокардит, ендокардит та перикардит).

При грипі зміни в міокарді були незначними — виявлені осередки білково-гідропічної дистрофії, фрагментації кардіоміоцитів, окремі дрібні запальні інфільтрати на фоні помірного повнокров'я судин.

Характерним для герпетичної інфекції було пошкодження периферичної нервової тканини (гангліїв і нервових стовбурів) у вигляді набряку та осередків дистрофії. При грипі такі ураження виявлені не були.

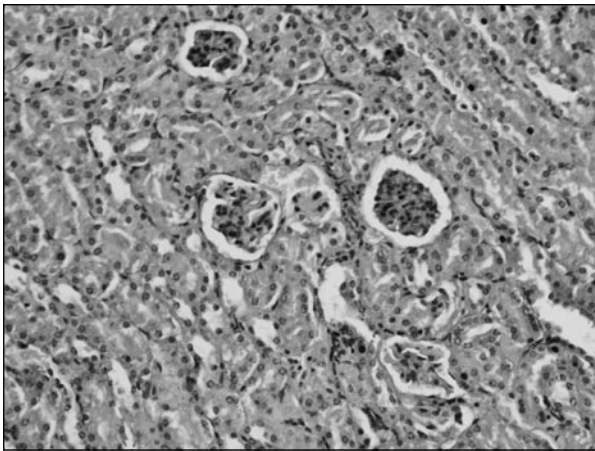


А

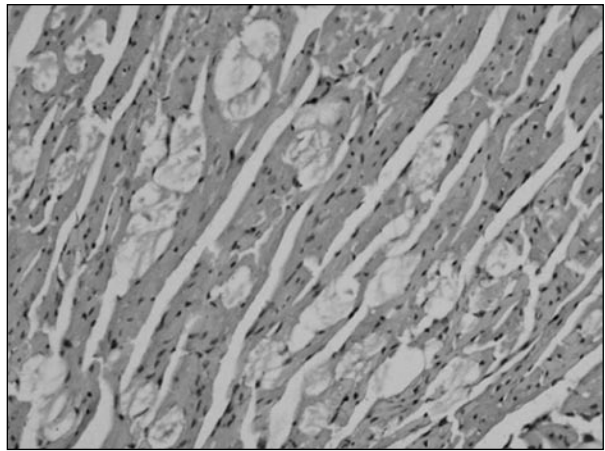


Б

Рисунок 5. Печінка тварини, інфікованої вірусом грипу А/PR/8/34(H1N1). А. Інтралобулярний інфільтрат на фоні дистрофічних змін. Б. Пілефлебіт Забарвлення гем.-еозин. Збільшення ок. 10, об. 40



А



Б

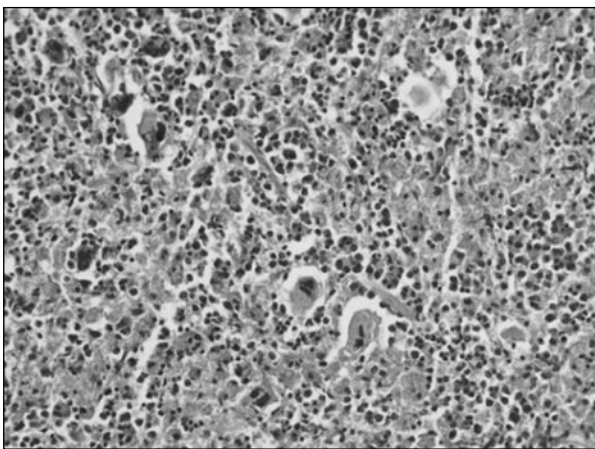
Рисунок 6. А. Нирка тварини, інфікованої ВЗГ-1. Гломеруліт, дистрофія епітелію канальців, застійні судини. Забарвлення гем.-еозин. Збільшення ок. 10, об.40. Б. Серце тварини, інфікованої ВЗГ-1. Осередки набряку і вираженої дистрофії кардіоцитів. Забарвлення гем.-еозин. Збільшення ок. 10, об. 40

Необхідно відмітити особливості імуноморфологічних реакцій у тварин, інфікованих ВЗГ-1. У досліджених органах, в першу чергу в легенях, лімфоїдні реакції або мали мінімальну вираженість, або були відсутні, що свідчило про значне пригнічення клітинного імунітету. При зараженні вірусом грипу, навпаки, лімфоїдні реакції (перибронхіальна інфільтрація в легенях, периваскулярна інфільтрація і лімфонодули в інших органах) збережені, хоча і виражені помірно, розвиваються хвилеподібно з посиленням на 5 та 7 добу і зниженням в подальші строки експерименту.

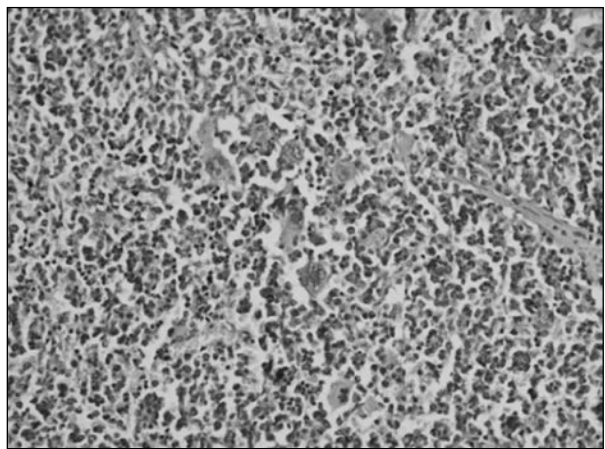
Виражене і стійке пригнічення імуноморфологічних реакцій при герпесвірусній інфекції має під собою чіткий морфологічний субстрат. Дослідження білої пульпи селезінки мишей та мегакаріоцитів червоної

пульпи, які є маркером проліферативної активності в лімфоїдній та гемопоетичній тканині показало значні структурні порушення (рис. 7 А). В селезінці спостерігалась або повна втрата білої пульпи, або значне зменшення її об'єму на фоні повнокров'я, крововиливів та осередків некрозу. Мегакаріоцити при цьому були або відсутні, або з вираженими ознаками дегенерації, лізису та апоптозу. Аналогічні деструктивні процеси спостерігались і в кістковому мозку. При грипі архітектоніка селезінки зберігалась з незначними коливанням об'ємів білої пульпи в різні строки спостереження. Хвилеподібно змінювалась і кількість мегакаріоцитів, спостерігались помірні дистрофічні зміни в їх ядрі та цитоплазмі (рис. 7 Б).

Інфікування вірусами герпесу і грипу і генералізація інфекційного процесу супроводжується



А



Б

Рисунок 7. А. Селезінка тварини, інфікованої ВЗГ-1. Виражені апоптотичні зміни і лізис мегакаріоцитів. Некротичні зміни в червоній пульпі. Забарвлення гем.-еозин. Збільшення ок. 10, об. 40 Б. Селезінка тварини, інфікованої А/PR/8/34(H1N1). Група функціонально активних мегакаріоцитів. Забарвлення гем.-еозин. Збільшення ок. 10, об.40 б

Таблиця 2. Морфологічні зміни у внутрішніх органах тварин, інфікованих вірусами звичайного герпесу та грипу (напівкількісна оцінка)

Органи	Вірус простого герпесу	Вірус грипу A/PR/8/34(H1N1)
Мозок	+++	--
Легені	+++	++++
Печінка	++++	++
Нирки	+++	+
Серце	++	+
Нервова тканина (ганглії)	++	+
Селезінка	++++	++
Кістковий мозок	+++	Немає даних

змінами у внутрішніх органах, які в обох групах частково є подібними, а частково значно відрізняються. Використання напівкількісної оцінки виявлених змін дозволяє порівняти вираженість ураження внутрішніх органів мишей (табл. 2). В таблиці наведена узагальнена характеристика вірусних уражень органів.

При зараженні тварин вказаними вірусами морфологічні зміни різної інтенсивності спостерігаються в паренхіматозних органах, причому за вираженістю ураження для герпетичної інфекції типовою є така послідовність: печінка > нирки > серце > легені. Ураження головного мозку, хоча він і є в даному експерименті воротами інфекції, є менш вираженим, ніж печінки або селезінки. При грипі має місце дещо інша послідовність: легені > печінка > нирки > серце. При цьому загальна інтенсивність патологічних змін в органах значно нижче за виключенням легенів, які є воротами інфекції.

Інфекції, які у людини клінічно починаються практично однаково, мають в своєму морфогенезі принципові відмінності. Так, вірус грипу адаптований до легенів мишей, які і є воротами інфекції, викликає виражені зміни в першу чергу в легенях, в той час як інші органи залишаються менш ушкодженими. Внутрішньомозкове інфікування вірусом простого герпесу призводить до значного ураження всіх внутрішніх органів.

Для герпетичної інфекції характерною була наявність виражених судинних розладів (паретичне розширення і повнокров'я судин, стази, тромбози, крововиливи). Особливої виразності судинні зміни досягають в легенях і в селезінці, але і в інших органах вони є суттєвою складовою патологічного процесу. При грипі вираженість судинних реакцій є несуттєвою. У тварин, інфікованих вірусом герпесу

спостерігається руйнування лімфоїдної тканини в результаті дистрофічних та некротичних змін, порушення проліферативних процесів в селезінці. Відсутність лімфоїдних реакцій в усіх органах також свідчить про суттєві порушення функціонування лімфоїдних органів. При грипі, навіть при найбільш важких його проявах, селезінка зберігає свою архітектоніку з диференціюванням на білу і червону пульпу, з наявністю мегакаріоцитів. Відповідно у внутрішніх органах спостерігається формування запальних інфільтратів та ознаки міграції лімфоїдних елементів, що свідчить про збереження функції лімфоїдної тканини. Важливим елементом морфогенезу герпетичної інфекції є ураження периферичної нервової системи, що певним чином має впливати на регуляторні та відновні процеси в органах і тканинах. Незважаючи на те, що описані морфологічні зміни зазвичай розглядаються як неспецифічні і можуть бути викликані різними причинами, встановлений зв'язок між ними і наявністю вірусної інфекції дає підстави вважати такі зміни специфічними для вірусної інфекції. Варіювати вони можуть від сумнівних і мінімальних до смертельних. Оскільки розповсюдженість вірусів герпетичної групи складає майже 100%, вірогідним є припущення, що більшість дистрофічно-запальних процесів в значній частині може бути обумовлена наявністю герпесвірусної інфекції.

Висновок

В результаті проведених досліджень було встановлено, що в експерименті вірусологічні і морфологічні характеристики гострих генералізованих інфекцій, викликаних ВЗГ-1 і А/PR/8/34(H1N1) суттєво відрізняються. При грипі повна самостійна елімінація вірусу з легенів і інших органів спостерігається на 14 добу з максимальним накопиченням

вірусу в легенях на 3 добу. При герпетичній інфекції вірусне навантаження залишається стабільним протягом всього терміну дослідження.

Перспектива подальших досліджень: Експериментальні дослідження підтверджують, що гер-

песвірусна інфекція може створювати значне розмаїття клінічної картини хронічних захворювань, може бути причиною імунодефіциту, шоківих та септичних станів, може бути причиною післяопераційних ускладнень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П. Вычисление ЕД50 при малом числе подопытных животных // Ж. микробиол. — 1959. — № 2. — С. 102–108.
2. Богомолов Б.П. К истории клинического диагноза инфекционных болезней // Терапевтический архив, 2009, № 4, С. 44–46.
3. Глинских Н.П. Герпесвирусы человека. Неизвестная эпидемия // Герпес. Сборник статей. Смоленск: Полиграмма, 1997. — С. 57–65.
4. Доклинические исследования лекарственных средств. Методические рекомендации: [ред. А.В. Стефанов]. — К.: Авиценна, 2002. — С. 395–420.
5. Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. Герпесвирусные инфекции человека. СПб.: СпецЛит., 2006. — 304 с.
6. Казмирчук В.Е., Мальцев Д.В. Клиника, диагностика и лечение герпесвирусных инфекций человека. Киев.: Феникс. 2009. — 247 с.
7. Хахалин Л.Н., Соловьева В.В. Герпесвирусные заболевания человека. Клиническая фармакология, терапия, 1995. — С. 78–81.
8. Magnus P. The influenza virus: its morphology, immunology and kinetics of multiplication // Influenza-la grippe, Bull. World Health Org., 1953, v. 8/5–6. — P. 647.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ВИРУСОЛОГИЧЕСКАЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ И ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИЙ

I.В. Гомоляко¹, Н.Е. Клочкова¹, С.Л. Рибалко², Д.Б. Старосила², В.П. Лозицкий³, А.С. Федчук³

¹ГУ “Национальный институт хирургии и трансплантологии им. О.О. Шалимова НАМН Украины”, г. Киев

²ГУ “Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского НАМН Украины”

³ГУ “Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И.И. Мечникова МЗ Украины”, г. Одесса

Экспериментальная герпетическая инфекция существенно отличается от гриппозной по вирусологическим и морфологическим характеристикам и сопровождается значительно более выраженными повреждениями лимфоидной ткани, сосудистыми нарушениями и дистрофическими изменениями во внутренних органах с последовательностью печень > почки > сердце > легкие.

Ключевые слова: грипп, герпес, инфекция, вирусология, морфология.

COMPERTIVE VIROLOGIC AND MORPHOLOGIC CHARACTERISTICS OF EXPERIMENTAL HERPETIC AND INFLUENZAL INFECTION

I.V. Gomolyako¹, N.Ye. Klotchkova¹, S.L. Ribalko², D.B. Starosyla², V.P. Lozitsky³, A.S. Fedchuk³

¹SI “The O.O. Shalimov Nationality Institute of Surgery and Transplantation NAMS of Ukraine”, Kyiv

²SI “The L.V. Gromashevskiy Institute of Epidemiology and Infectious Diseases NAMS of Ukraine”, Kyiv

³SI “I.I. Mechnikov Ukrainian Anti-Plague Research Institute of the Ministry of Health of Ukraine”, Odessa, Ukraine

Experimental herpetic infection differs essentially from influenza after virologic and morphological characteristics/ It is accompanied by more pronounced damage of lymphoid tissue, vessel abnormalities and dystrophic changes of organs in such consistency: liver > kidney > heart > lung.

Key words: influenza, herpetic infection, virology, morphology.