

**ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ГЕРПЕСВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ  
У ПЕЧІНЦІ ТА ЇЇ КОРЕКЦІЯ АЦИКЛОВІРОМ**<sup>1</sup>Національний медичний університет імені О. О. Богомольця (м. Київ)<sup>2</sup>ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб

ім. Л. В. Громашевського НАМН України» (м. Київ)

savosko\_s@ukr.net

Дослідження є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця: «Органи нервової, імунної та сечостатевої системи в умовах експериментального пошкодження», № державної реєстрації 0112U001413.

**Вступ.** Вірус простого герпесу (ВПГ) є найпоширенішою інфекцією, що тривалий час існує в організмі в латентній формі. Генералізація вірусної інфекції відбувається із нервової тканини і вражає інші органи і тканини [12]. Хоча механізм реактивації ВПГ досі не з'ясований у 75% випадків автори пов'язують з травматичним і ішемічним ураженням мозку, з ослабленням імунітетом [10,11], тому ці чинники розглядаються основними факторами ризику генералізованої вірусної інфекції як при первинному інфікуванні, так і реактивації латентної інфекції [8].

Гостра печінкова недостатність є лише одним з проявів вірусної інфекції, що відмічають на тлі енцефаліту спричиненого ВПГ. Автори зазначають, що виявлення септичного ураження печінки ВПГ є пізнім, оскільки у 90% протікає безсимптомно, за відсутності специфічних ознак [4]. За результатами інших авторів лише у 30% мали місце характерні герпетичні ураження шкіри, а у 50% випадках герпетичний гепатит діагностували за результатами аутопсії [8], також при біопсії у 70% підтверджували репродукцію ВПГ і некроз печінки при печінковій недостатності [9]. Це свідчить про необхідність раннього застосування протівірусних препаратів у профілактичних і лікувальних цілях, не чекаючи вірусологічного підтвердження [2,6]. В даному випадку молекулярні методи виявлення ВПГ (ПЦР і ІФА) є корисні і високочутливі, але часто малодоступні [5,7]. Клітинні культури у серологічних дослідженнях надзвичайно чутливі і можуть бути використані в якості додаткового скринінгового інструменту в оцінці рівня репродукції вірусу.

Зважаючи на ці дані, дослідження структурного ураження печінки при розвитку ВПГ-інфекції є актуальним як з медико-соціальної, так і з наукової точки зору, оскільки морфологічним дослідженням при комбінованих ураженнях не приділяється достатньої уваги, а фармакологічні роботи як правило присвячені ізольованим моделям патологічного стану.

Саме тому **метою дослідження** було встановити особливості розвитку структурних змін печінки при герпесвірусній інфекції та порушенні мозкового кровообігу, як чиннику реактивації латентної інфекції.

**Об'єкт і методи дослідження.** Експерименти проведені на білих мишах вагою 18-20 г. Інтактним тваринам вводили вірусний матеріал у головний мозок в об'ємі 0,03 мл, що дорівнювало 1-10 LD<sub>50</sub> (мишачих летальних доз). Вірусним матеріалом слугував ліофілізований ВПГ I типу, штамп VC. Інфекційний титр по ЦПД в культурі клітин RK13 становив 4,0-5,0 lg TCID<sub>50</sub>/0,1 мл, при внутрішньомозковому зараженні білих мишей – 4,0-4,5 lg LD<sub>50</sub>/0,03 мл. Розвиток симптомів інфекційного стану в контролі відмічали на 5-6-у добу з моменту інфікування, а максимуму досягали до 13-14 доби, після чого було відзначено зменшення вираженості проявів інфекції, тварини видужували. З цього часу вважали, що ВПГ I типу трансформувалася у латентну форму. Дана модель зручна для оцінки вираженості симптоматики, відрізняється 100% відтворюваністю і не вимагає застосування додаткових методів контролю. Згідно гістологічним дослідженням у головному мозку тварин носіїв розвивається запальний процес на рівні оболонки та тканини мозку, що дозволило застосувати модель для відтворення герпетичного менінгоенцефаліту.

Експерименти проведені у відповідності з положенням Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986 р.), Закону України № 3447 – IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001 р.).

На 30-40 добу після редукції проявів вірусної інфекції (слабкість, малорухомість, зменшення потреби у їжі і воді) у тварин моделювали геморагічний інсульт. Відтворення обмеженого крововиливу у головному мозку тварин досягали шляхом введення 0,15-0,2 мл аутокрові у праву гемісферу (L=1,5; H=3,0; AP=1,0) [1,3]. Впродовж 10 діб після відтворення інсульту тваринам вводили ацикловір

(і.р., 50 мг/кг). Після завершення курсу введення лікарських засобів здійснено забір біологічного матеріалу для вірусологічного і гістологічного дослідження.

Розподіл лабораторних тварин за групами та схему проведення дослідів наведено у таблиці 1 і рисунку 1.

Для якісної і кількісної оцінки рівня репродукції вірусу у зразках біологічного матеріалу (сироватка крові) використані методи ПЦР, точковий імуноферментний аналіз (dot-ELISA), метод визначення вірусних антигенів у культурі клітин Vero.

**Методика ПЛР.** Виявлення ДНК ВПГ I та II типів в біологічному матеріалі методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з гібридаційно-флуоресцентною детекцією з використанням набору реагентів «АмплісенсСенс<sup>R</sup> ВПГІ, II-FL». Для екстракції ДНК використовується комплект реагентів «ДНК-сорб-АМ». Екстракція ДНК з кожного досліджуваного зразка відбувається в присутності внутрішнього контрольного зразку (ВКО-FL).

**Точкова реакція ензимічних антитіл на нітроцеллюлозі**

В пронумеровані попередньо лунки на нітроцеллюлозних фільтрах наносили по 1 мкл досліджуваної проби. Фільтри з нанесеними зразками підсушували та занурювали в розчин, який містить 30 мг/мл БСА в буфері 0,01 М Трис рН 7,5 – 0,15М NaCl, інкубували протягом 2 год. при температурі 37°C. Потім фільтри виймали, підсушували, занурювали в робочий буферний розчин і занурювали в розчин, який містить специфічні антитіла. Фільтр залишали зануреним в розчин гіперімумних кролячих антитіл на 2 години при температурі 37°C. Після чого його виймали, відмивали від залишка антитіл протягом 30 хвилин, шестиразово міняючи робочий буфер в чашці Петрі і занурювали в розчин антитіл до глобулінів кроля. Фільтри інкубували в розчині протягом 2 годин при температурі 37°C, а потім відмивали і занурювали на одну годину в підготовлений розчин білку А, міченого пероксидазою. Після інкубації при 37°C в розчині кон'югату повторювали шестиразову відмивку і занурювали фільтр в субстрат для проявлення ферменту: 3,8 мл ДАВ (diaminobenzidine tetrachloride) + 0.2 мл 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Облік реакції проводили за жовтим забарвленням в центрі лунок. Для перевірки специфічності реакції ставили наступні контролю:

- 1/ контроль без кон'югату білку А, міченого пероксидазою;
- 2/ контроль антигену без специфічних сироваток;
- 3/ контроль с нормальною кролячою сироваткою;
- 4/ контроль зразка без антигену.

**Методика культури клітин.** Клітинну культуру Vero вирощували в стерильних плашках («Nunc»). Інкубація заражених плашок проводилася у культуральному середовищі (88% середовища RPMI

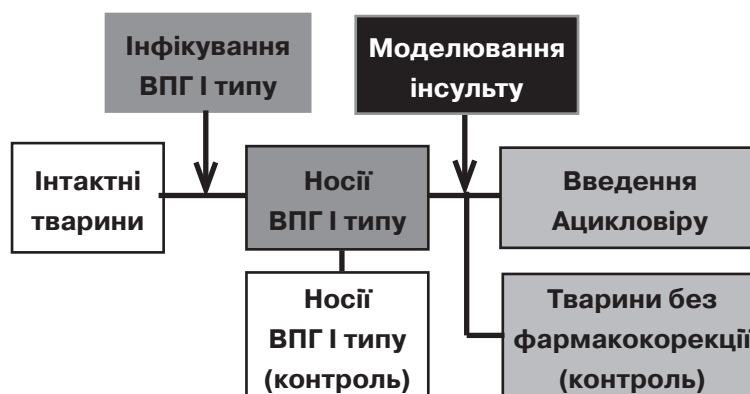


Рис. 1. Схема проведення експериментального дослідження.

Таблиця 1.

### Дослідні групи тварин

| Група                   | Кількість тварин |
|-------------------------|------------------|
| Контроль                | 10               |
| ВПГ-I                   | 85               |
| Інсульт                 | 15               |
| ВПГ-I+інсульт           | 37               |
| ВПГ-I+інсульт+ацикловір | 48               |

1640 («Sigma») з додаванням 12% інактивованої прогріванням сироватки ембріона корови («ПанЕко» Москва) і антибіотиків при 37°C з 5% CO<sub>2</sub>. Маркером репродукції вірусу була цитопатична дія (ЦПД) – утворення синцитіїв. Облік ЦПД проводили протягом 6-7 діб.

**Методика гістологічного дослідження.** Фрагменти печінки мишей фіксували у 10%-розчині формаліну на 0,1М фосфатному буфері (рН 7,4), зневоднювали у висхідних концентраціях етанолу і заливали у парафін за стандартною методикою. Парафінкові зрізи товщиною 6-8 мкм профарбовували гематоксиліном і еозином. Морфометричний аналіз проведено за допомогою мікроскопу Olympus BX 51 і програмного забезпечення CarlZeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1), збільшення x400.

Статистичну обробку отриманих вибірок даних проводили із застосуванням програми Statistica 6.0. Вибірки порівнювали за допомогою t-критерію Стьюдента.

**Результати досліджень та їх обговорення.** У дослідженні проведено співставлення результатів детекції герпесвірусної інфекції та морфологічних змін печінки, а також можливості запобігти загостренню структурних порушень органу шляхом застосування ацикловіру.

Результати ІФА і ПЛР підтвердили наявність ВПГ 1 типу у всіх 100% досліджуваних зразків – плазми крові і гомогенатів печінки тварин після інфікування та відтворення локального інсульту (рис. 2, табл. 2).

При оцінці рівня репродукції ВПГ 1 типу на культурі клітин Vero встановлено зниження рівня інфекційного титру вірусу на 30 добу після інфікування і наступне зростання після моделювання інсульту. Ці

## МОРФОЛОГІЯ

дані вказують на початкове зменшення вірусної інфекції, тобто формування латентної інфекції, а порушення мозкового кровообігу стало чинником наступної її реактивації.

В результаті проведених морфологічних досліджень виявлено появу фокальних ділянок запальної реакції і дистрофічних змін гепатоцитів (рис. 3). Поодинокі інфільтрати макрофагів розташовані дифузно, часто в ділянках портальних трактів. Печінкові часточки на 5 добу спостереження характеризувалися різким збільшенням просявиту кровоносних і жовчних капілярів. Гепатоцити різко збільшені в об'ємі, цитоплазма гранулярна з ознаками вакуолізації. Ядра гепатоцитів гіпертрофовані, часто із різко вираженим перинуклеарним простором. Реєстрували клітини з ознаками амітозу – двоядерні клітини або клітини з незавершеним поділом ядра. На 30 добу після інфікування зазначені зміни набули більшого ступеня тяжкості, відмічено різку дилатацію системи часточкових капілярів, стаз крові в центральних венах і портальних трактах. При цьому цитопатологічні зміни ядер гепатоцитів менш виражені, що може вказувати на редукцію реплікаційного процесінгу ВПГ і підтверджено молекулярно-біологічними методами.

Після моделювання інсульту у тварин-носіїв ВПГ-інфекції встановлено збільшення щільності вогнищ макрофагічної інфільтрації і появу поодиноких перипортальних некрозів. Структурні зміни печінкових часточок на 5 добу проявлялися головним чином на цитологічному рівні – гіпертрофія гепатоцитів, поділ і фрагментація ядер, поява атипових ядер, грануляція цитоплазми. На 30 добу після інсульту реєстрували вогнищевий або дифузний некроз гепатоцитів, інфільтрацію макрофагів в системі інтралобулярних гемокапілярів і жовчних проток. Проявів регенерації гепатоцитів не відмічено.

У групі тварин із введення ацикловіру при експериментальному інсульті на тлі ВПГ-інфекції відзначено тенденцію зменшення дистрофічних змін гепатоцитів і запальних реакцій. Реєстрували лише поодинокі макрофаги в гемокапілярах часточок і поліморфізм змін гепатоцитів (гідропічна дистрофія, грануляційний розпад цитоплазми), внаслідок чого була

порушена будова часточкових балок. Портальні тракти розширені і набряклі, з агрегацією еритроцитів, розширені синусоїдні капіляри і жовчні протоки. Морфометричний аналіз підтвердив дані гістологічного дослідження, результати якого наведено у таблиці 3.

### Висновки

В результаті наших досліджень підтверджено, що порушення мозкового кровообігу є чинником реактивації системної герпесвірусної інфекції, що різко порушує морфологію печінкових структур і суттєво знижує функціонування систем органів. Співставлення результатів гістологічних та молекулярно-біологічних методів дослідження дозволило в повній мірі оцінити якісні і кількісні зміни органу на тлі розвитку інфекції, дослідити вплив ацикловіру на ці процеси.



Рис. 2. Позитивні реакції ІФА в зразках плазми крові тварин з ВПГ 1 типу.

Таблиця 2.

### Результати молекулярно-біологічного дослідження репродукції ВПГ I типу

| Група                   | ПЛР | dot-ELISA | Інфекційний титр, Ig ID <sub>50</sub> |                           |
|-------------------------|-----|-----------|---------------------------------------|---------------------------|
|                         |     |           | Сироватка крові                       | Гомогенат тканини печінки |
| Група з ВПГ-I, 5 доба   | +   | +         | 2,0±0,0                               | 3,2±0,2                   |
| Група з ВПГ-I, 30 доба  | +   | +         | 1,2±0,2                               | 1,6±0,2                   |
| ВПГ-I+інсульт, 5 доба   | +   | +         | 1,4±0,2                               | 2,4±0,2                   |
| ВПГ-I+інсульт, 30 доба  | +   | +         | 3,0±0,3                               | 2,8±0,3                   |
| ВПГ-I+інсульт+ацикловір | -   | +         | 0,4±0,2*                              | 1,2±0,2                   |

Примітка: \* – до групи ВПГ-I+інсульт (30 доба)(p<0,05).

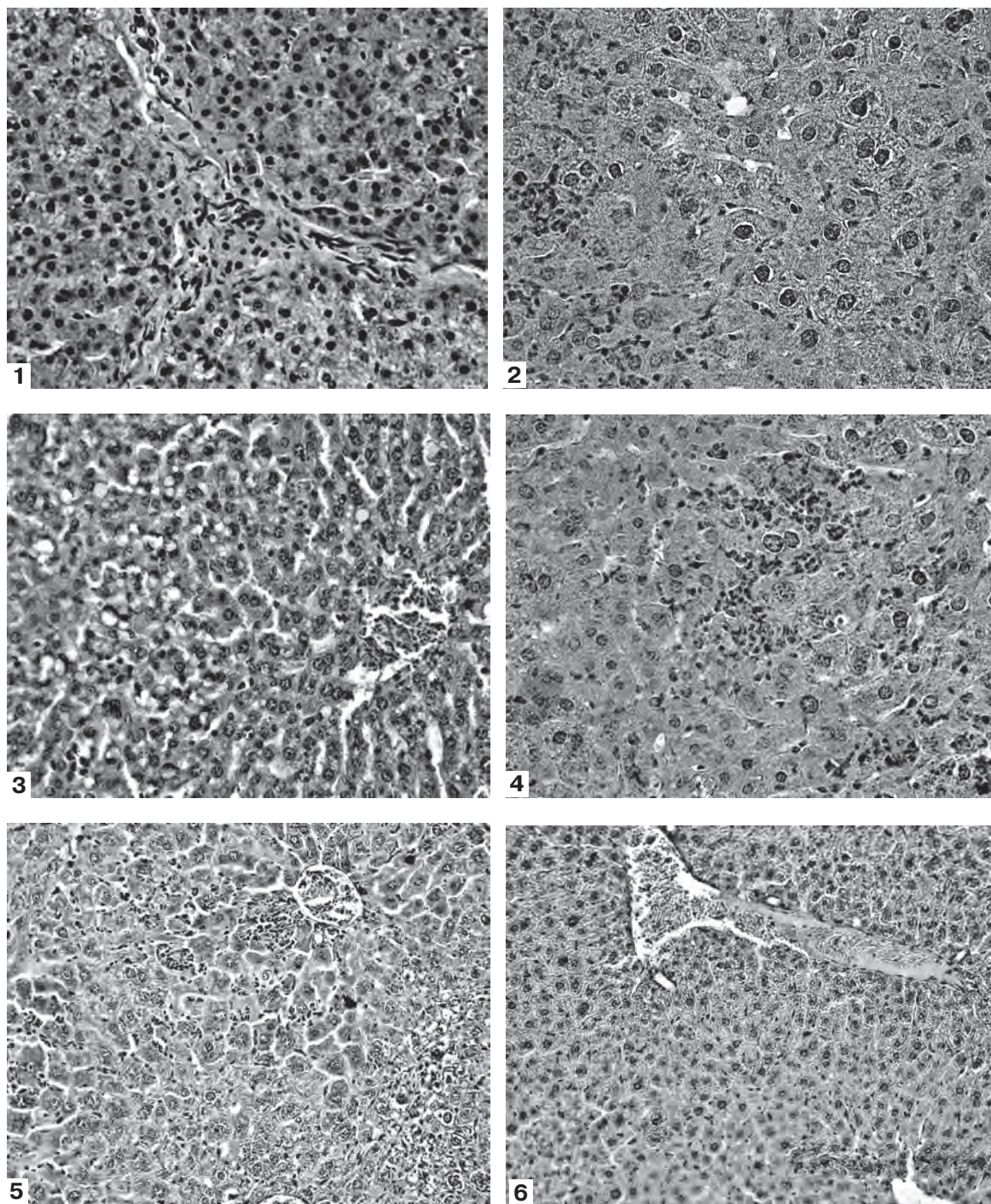
Таблиця 3.

### Морфометричні показники нейронів гіпокампу СА1 сектора на 30 добу досліду

| Група                   | Площа ядер гепатоцитів, мкм <sup>2</sup> | Площа соми гепатоцитів, мкм <sup>2</sup> | Щільність вогнищ запальної інфільтрації, од/мм <sup>2</sup> |
|-------------------------|--|--|---|
| Контроль                | 41,3±1,6                                 | 146,0±10,7                               | 0,4±0,1   |
| Група з ВПГ-I, 5 доба   | 93,8±5,4*                                | 481,7±51,7*                              | 1,7±0,4*  |
| Група з ВПГ-I, 30 доба  | 55,8±3,3*#                               | 277,5±14,2*#                             | 3,3±0,7*#   |
| ВПГ-I+інсульт, 5 доба   | 102,6±5,5*                               | 402,1±26,8*                              | 4,3±0,4*#   |
| ВПГ-I+інсульт, 30 доба  | 104,4±8,3*                               | 376,4±19,9*                              | 5,2±1,6*  |
| ВПГ-I+інсульт+ацикловір | 62,2±2,6**                               | 351,5±24,7*                              | 2,3±0,3*  |

Примітка: \* – достовірно до групи 1 (p<0,05); # – достовірно до групи 2 (p<0,05); ^ – достовірно до групи 5 (p<0,05).





**Рис. 3. Гістологічні зміни печінки на герпесвірусної інфекції.**  
1 – контроль; 2 – ВПГ-І-5доба; 3 – ВПГ-І-30 доба; 4 – ВПГ-І+інсульт-5 доба;  
5 – ВПГ-І+інсульт-30 доба; 6 – ВПГ-І+інсульт+ацикловір-30 доба.  
Гематоксилін-еозин. Об. 40, ок. 10.

### Література

1. Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга у экспериментальных животных / А.Н. Макаренко, Н.С. Косицын, Н.В. Пасикова [и др.] // Журнал высшей нервной деятельности. – 2002. – Т. 52, № 6. – С. 765-768.
2. Boysen T. A case of acute liver failure caused by herpes simplex type 2 / T. Boysen, M.R. Clausen // Scand. J. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 36 (6-7). – P. 529-532.
3. Franklin K. The mouse brain in stereotaxic coordinates / K. Franklin, G. Paxinos. – San Diego: Academic Press, 2001. – 320 p.
4. Fulminant hepatitis from herpes simplex virus type 2 in an immunocompetent adult / L. Abbo, M.L. Alcaide, J.R. Pano, P.G. Robinson and R.E. Campo // Transplant Infectious Disease. – 2007. – Vol. 9 (4). – P. 323-326.

5. Herpes simplex virus-associated acute liver failure: a difficult diagnosis with a poor prognosis / P. Ichai, A.M. Roque Afonso, M. Sebahg [et al.] // *Liver Transpl.* – 2005. – Vol. 11 (12). – P. 1550-1555.
6. Herpes simplex virus sepsis and acute liver failure / C. Riediger, P. Sauer, E. Matevossian [et al.] // *Clin. Transplant.* – 2009. – Suppl 21. – P. 37-41.
7. Herpes Simplex Virus Hepatitis in an Immunocompetent Adult: A Fatal Outcome due to Liver Failure / R.A. Poley, J.F. Snowdon, D.W. Howes // *Case Reports in Critical Care.* – 2011. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24826316>.
8. Herpes simplex virus hepatitis: an analysis of the published literature and institutional cases / J.P. Norvell, A.T. Blei, B.D. Jovanovic, J. Levitsky // *Liver Transpl.* – 2007. – Vol. 13 (10). – P. 1428-1434.
9. Herpes simplex virus hepatitis – it's high time we consider empiric treatment / U. Navaneethan, E. Lancaster, P. Venkatesh [et al.] // *J. Gastrointest. Liver Dis.* – 2011. – Vol. 20 (1). – P. 93-96.
10. Herpes simplex encephalitis initially presented with parietal cortex lesions mimicking acute ischemic stroke: A case report / Y. Hara, N. Ishii, K. Sakai [et al.] // *Rinsho Shinkeigaku.* 2016. – Vol. 56 (2). – P. 104-107.
11. Herpes simplex virus type-1: replication, latency, reactivation and its antiviral targets / C.P. Pires de Mello, D.C. Bloom, I.C. Paixro // *Antivir. Ther.* – 2016. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26726828>.
12. Weber syndrome: herpes simplex virus brainstem encephalitis as an etiology / J.S. Ballaekere, P.P. Chebbi, H. Sundarmurthy, A. Parameshwarappa // *Am. J. Med.* – 2014. – Vol. 127 (12). – P. 5-6.

УДК 616.831-005.1-022.6-06

### ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ГЕРПЕСВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ПЕЧІНЦІ ТА ЇЇ КОРЕКЦІЯ АЦИКЛОВІРОМ Моторна Н. В., Рыбалко С. Л., Сокурєнко Л. М., Старосила Д. Б., Савосько С. І.

**Резюме.** В статті наведено дані гістологічного та молекулярно-біологічного дослідження особливостей розвитку герпесвірусної інфекції у печінці тварин та її корекції ацикловіром. Встановлено, що при гострій ВПГ-інфекції у печінці розвиваються дистрофічні зміни печінкових часточок, що з часом загострюються. Моделювання локального геморагічного інсульту викликало реактивацію латентної ВПГ-інфекції з наступним прогресуванням дистрофічних змін печінки. Застосування ацикловіру після моделювання інсульту зменшило цитопатологічні зміни гепатоцитів та рівень репродукції ВПГ 1 типу, без ознак відновлення гістоструктури органу у 30-денний термін.

**Ключові слова:** герпес, печінка, інсульт, ацикловір.

УДК 616.831-005.1-022.6-06

### ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ПЕЧЕНИ И ЕЕ КОРРЕКЦИЯ АЦИКЛОВИРОМ

Моторная Н. В., Рыбалко С. Л., Сокурєнко Л. М., Старосила Д. Б., Савосько С. И.

**Резюме.** В статье приведены данные гистологического и молекулярно-биологического исследования особенностей развития герпесвирусной инфекции в печени животных и ее коррекции ацикловиром. Установлено, что при острой ВПГ-инфекции в печени развиваются дистрофические изменения печеночных долек, которые со временем обостряются. Моделирование локального геморагического инсульта вызвало реактивацию латентной ВПГ-инфекции с последующим прогрессированием дистрофических изменений печени. Применение ацикловира после моделирования инсульта уменьшило цитопатологические изменения гепатоцитов и уровень репродукции ВПГ 1 типа, без признаков восстановления гистоструктуры органа в 30-дневный срок.

**Ключевые слова:** герпес, печень, инсульт, ацикловир.

UDC 616.831-005.1-022.6-06

### FEATURES OF HERPES VIRUS INFECTIONS IN THE LIVER AND THEIR CORRECTION BY ACYCLOVIR Motorna N. V., Rybalko S. L., Sokurenko L. M., Starosyla D. B., Savosko S. I.

**Abstract.** Herpes simplex virus (HSV) is the most common infection that at long time presented in latent form. Mechanism of HSV reactivation is still not clear, but in most cases this phenomenon associated with traumatic and ischemic brain lesions with weakened immune systems. That is why structural study of liver damage in the development of HSV infection is important, and the purpose of this study was to determine the features of structural changes in the liver at herpes infection, activation of latent infection after cerebrovascular accident and degree of their progression after applying acyclovir.

ELISA and PCR testing presented HSV-1 in 100% animal's samples – blood plasma and liver homogenates after infection and local stroke modeling.

In Vero cell culture we assessed the level of HSV-1 reproduction and established reduction of cytopathic effect (CPE) in 30 days after infection and next growth after stroke modeling. These data indicate a decrease of viral infection, i.e. formation of latent infection, but cerebrovascular accident was a factor of its reactivation.

Result of morphological studies presented local inflammatory reactions and degenerative changes of hepatocytes. Single macrophage infiltrations are diffuse, mostly in portal tracts. At 5 days after infection hepatic lobules characterized by a sharp increase of capillaries (blood and bile) lumen. Hepatocytes area is sharply increased, cell cytoplasm is granulated and vacuolated, hypertrophied nuclei often with expressive perinuclear space, also registered amitotic cells (dual nuclear cells, cells with incomplete nuclear separation). At 30 days after HSV-infection these changes gained greater severity, noted a sharp dilatation of partial capillaries, blood stasis in the central veins



and portal tracts. This cytopathological changes in hepatocyte nuclei are less pronounced, which indicate a reduction of HSV replication and confirmed by molecular biological methods.

Stroke modeling in HSV-infected animals resulted increasing density of macrophages infiltration and appearance single of periportal necrosis. Structural changes in hepatic lobules manifested mainly in the cytological level – the hypertrophy of hepatocytes, division and fragmentation of nuclei, atypical nuclei, cytoplasm granulation. At 30 days after stroke were resulted focal or diffuse necrosis of hepatocytes, infiltration of macrophages in the system intralobular capillaries and bile ducts. The regeneration sings of hepatocyte and hepatic lobules are not selected.

The applying acyclovir after stroke reduces degenerative changes of hepatocytes and inflammatory reactions. Only a few macrophages registered in intralobular capillaries. The polymorphism changes in injured lobular beams manifested in hydropic degeneration, disintegration and granulation of hepatocytes. Portal tracts, sinusoidal capillaries and bile ducts were also swollen and dilated.

The result of our research confirmed that cerebrovascular accident is a factor of reactivation of systemic herpes infection that dramatically disturb a liver morphology and significantly reduces the functioning of organs. The comparison of results of histological and molecular biological research provides qualitative and quantitative changes in liver against HSV infection, and investigates the effect of acyclovir on these processes.

**Keywords:** herpes, liver, stroke, acyclovir.

*Рецензент – проф. Старченко І. І.*

*Стаття надійшла 22.03.2016 року*