

УДК 618.36-07:616.916.1

Н. П. Бондаренко, Л. О. Стеченко, В. П. Лакатош, П. В. Лакатош, М. І. Антонюк,
Г. Г. Наритник

Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця м. Київ

УЛЬТРАСТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ПЛАЦЕНТИ ПРИ ПАРВОВІРУСНІЙ ІНФЕКЦІЇ

Виявлення часточок парвовірусу В19 у плацентарній тканині плодів з набряковим синдромом неімунного походження є допоміжним методом у діагностиці вертикальної передачі парвовірусу В19 під час вагітності. Сприйнятливість плацентарних клітин (цитотрофобласта та синцитіотрофобласта) до парвовірусу В19 та його цитотоксичний вплив на клітини-мішені обумовлює природу патогенетичних порушень, а саме викиднів та загибель плоду у термінах до 21 тижнів гестації. До цитопатичного ефекту дії вірусів слід віднести утворення у ядрі ендотеліоцитів кровоносних капілярів, як і у цитоплазмі мієліноподібних структур, які пов'язані з посиленням перекисного окислення ліпідів. Метод електронної мікроскопії надає додаткову інформацію про причину самовільних викиднів та загибелі плоду з неімунною водянкою у другому триместрі вагітності при сумнівних результатах імуноферментного аналізу на В19-парвовірусну інфекцію. Часточки парвовірусу В19 візуалізувались у 100% випадку самовільного переривання вагітності з набряковим синдромом у плода та плаценті в термінах 15-19 тижнів, в той час як, гостра В19-парвовірусна інфекція у матері (за виявленням Ig M до парвовірусу В19) була діагностована шляхом імуноферментного аналізу лише у 62,5% випадків.

Ключові слова: В19-парвовірусна інфекція, віріони парвовірусу В19, неімунна водянка плода, загибель плоду, самовільний викидень, цитотрофобласт, синцитіотрофобласт, вагітність.

Робота є фрагментом НДР «Збереження репродуктивного здоров'я жінки в сучасних умовах», № державної реєстрації 0113U00733.

Перший опис фетального інфікування парвовірусом В19 з'явився у 1984 році. У цьому описі парвовірус був виявлений у багатьох тканинах плода з водянкою за допомогою метода гібридизації. У 1986-1987 роках інфікування плода було діагностовано завдяки виявленню вірусу тканинах декількома способами, у тому числі за допомогою електронної мікроскопії з негативним контрастуванням, яка показала часточки вірусу у витяжках тканин. Пізніше часточки вірусу В19 знаходили у ядрах фетальних клітин за допомогою просвічувальної (трансмісійної) електронної мікроскопії. В ході діагностичних робіт за останні 6 років, для підтвердження доказів наявності вірусу В19 у вагітних та плодів збирались сироватки та тканини. Вивчались фетальні тканини та плацента плодів, які загинули внаслідок вірусної інфекції. При спостереженні тонких зрізів тканин на ультраструктурному рівні була здобута нова інформація про розташування часточок парвовірусу В19 як у ядрі, так і в цитоплазмі інфікованих клітин. Під час досліджень вияснили, що імунна електронна мікроскопія була більш чутлива для свіжих витяжок з тканин, а тканини фіксовані у формаліні обстежувались за допомогою негативного контрастування вібріонів, отриманих з витяжки, або за допомогою просвічувальної електронної мікроскопії [3, 7].

За розмірами та структурою вірус мав подібність з вірусами роду Erythrovirus сімейства парвовірусів. Назва сімейства вірусів обумовлена їх розмірами та фізичними властивостями. Parvum по латині означає «маленький». Сімейство парвовірусів включає маленькі ДНК віруси, які мають односпіральної молекулу ДНК. Доказано, що репродукція парвовірусу залежить від стану ядра клітин органа-мішені, як правило, інфікуються лише клітини, які активно діляться. У дітей та дорослих ця умова здійснюється завдяки кістковому мозку, як відомо, вірус пошкоджує клітини-попередники еритроцитів. Проникаючи у незрілі клітини - еритробласти кісткового мозку, які знаходяться на стадіях активного розмноження, вірус проявляє токсичну дію на ці клітини. Внаслідок цього інгібується еритропоез, який характеризується виникненням апластичного кризу у дорослих та водянку у плода [4, 6, 10, 12]. На чутливих клітинах організму існують вірус-специфічні рецептори, які експресуються головним чином на базолатеральній поверхні клітин і відповідають за обмежений круг хазяїв для тих чи інших вірусів. Існують нееритроїдні клітини, що можуть містити глобулярний рецептор, включаючи мегакаріоцити, ендотеліальні клітини, кардіоміоцити та клітини плаценти. Проведення теста на парвовірус-специфічний IgM до пологів чи викидня може бути неефективним. В таких випадках високі рівні IgG до парвовірусу можуть вказувати на материнську інфекцію в анамнезі [1, 5].

Вивчення цитопатологічної картини клітин плаценти при інфікуванні парвовірусом, ідентифікація самої часточки віріону шляхом електронної мікроскопії, допоможе довести вертикальну передачу парвовірусу та його негативний вплив на вагітність.

Метою роботи було вивчення ультраструктурних змін в зразках тканини плаценти у вагітних, інфікованих парвовірусною інфекцією, шляхом просвічувальної електронної мікроскопії та довести діагностичну ефективність цього метода шляхом виявлення часточок парвовірусу В19 у тканинах плаценти у порівнянні з імуноферментним методом дослідження сироватки крові вагітних інфікованих парвовірусом В19.

Матеріал та методи дослідження. Електронномікроскопічно досліджено плаценту 8 вагітних інфікованих парвовірусом В19 з неімунною водянкою у плода в гестаційних термінах 15-19 тижнів. Матеріал фіксували у 2,5% розчині глютарового альдегіду на фосфатному буфері з до фіксацією 1% розчином чотирьохокису осмію. Зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації та ацетоні. Заливали в суміш епон-аралдит, згідно загальноприйнятій методиці. Після полімеризації блоків на ультратомі LKB III (Швеція) виготовляли ультратонкі зрізи товщиною 40нм, які контрастували 2% розчином ураніацетату та цитратом свинцю. Препарати досліджували та фотографували під електронним мікроскопом ПЕМ-125К при збільшеннях в 9,6–20 тисяч раз. Вірусні часточки вивчали на мікрофотографіях із збільшенням у 40-60 тисяч.

В роботі використано тест-систему для імуноферментного аналізу, яка передбачає виявлення антитіл IgM та IgG до парвовірусу В 19 в сироватках крові людини, виробництва фірми DRG (США). Концентрація антитіл IgM до парвовірусу В19 вище значення 0, 89 IV (index values оптична густина сироваток на виявлення антитіл) розцінювалась, як гостра парвовірусна інфекція. Присутність лише специфічних антитіл Ig G вище 0, 89 IV свідчило про парвовірусну інфекцію в анамнезі. Матеріалом для імуноферментного дослідження на парвовірусну інфекцію були сироватки вагітних жінок, які потрапляли до гінекологічного відділення з неімунною водянкою у плода в гестаційних термінах 13-21 тиждень Дані про клінічні обстеження та діагнози одержували з історії розвитку вагітностей, висновків УЗД та патологоанатомічних висновків абортівних та завмерлих плодів з неімунною водянкою.

Результати дослідження та їх обговорення. У ході обстеження були відібрані 8 вагітних основної групи в термінах 15-19 тижнів вагітності з неімунною водянкою у плода з підозрою на В19-парвовірусну інфекцію. В усіх випадках вагітність закінчилась внутрішньоутробною загибеллю плода та викиднем. Патологоанатомічний діагноз підтверджував набряковий синдром у плода, плаценти та виключав вади розвитку у плода. Вагітні були обстежені на TORCH, в тому числі на В19-парвовірусну інфекцію. Антитіла до парвовірусу класу М були присутні у сироватці крові у 5 вагітних, а інші 3 вагітних не мали симптоматики, у сироватці крові були присутні лише високі концентрації антитіл класу G, що свідчило про інфекцію в анамнезі, та не було доказовим про існування інфекції на даний час обстеження.

Електронномікроскопічне дослідження плаценти 8 вагітних інфікованих парвовірусом В19 показало наявність вірусних часточок у невеликій кількості як у ядрі, так і в цитоплазмі у всіх вивчених зразках. Більшою мірою у клітинах плаценти проявлявся цитопатичний ефект, обумовлений вірусною інфекцією, який виявлявся у клітинах цитотрофобласта, синцитіотрофобласта, ендотеліоцитах та клітинах крові. Він відображав стан клітин при інфікуванні вірусом і визначався першими етапами автофагії, одного із способів смерті інфікованих клітин. Так у цитоплазмі цих клітин виявляються аутофагосоми (рис.1, 2) з подвійною мембраною, що оточує клітинний детрит, або ж віріони та їх капсиди у вигляді пухирців. Відомо, що аутофагосоми поглинають довгоживучі білки, пошкоджені органели і навіть інвазивні патогени.

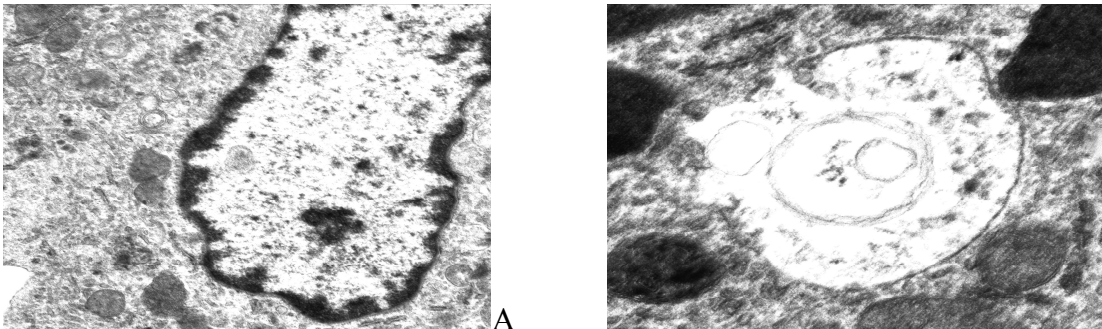


Рис.1. Ядро, аутофагосоми у цитоплазмі ендотеліоцитів та макрофага, лізосома, вірусні часточки капсиди. Електроннограми А – х 19000, Б – х 60000.

У деяких випадках аутофагосоми оточуються додатковою мембраною зливаються з вакуолею і вивільняють продукти аутофагічної деградації, тобто вірусних часточок, разом з рідиною набряку та клітинним детритом у цитоплазму макрофагів. Як правило, поряд розміщуються лізосоми, які сприяють лізису ушкоджених структур та патогенів, що транспортуються аутофагосомами (рис.1 Б). Цитоплазма переважної кількості клітин цитотрофобласта та синцитіотрофобласта містить вакуолі з рідиною набряку та мієліноподібними структурами, які є проявом посилення процесів перекисного окислення ліпідів, розширені каналці гладенької та зернистої ендоплазматичної сітки.

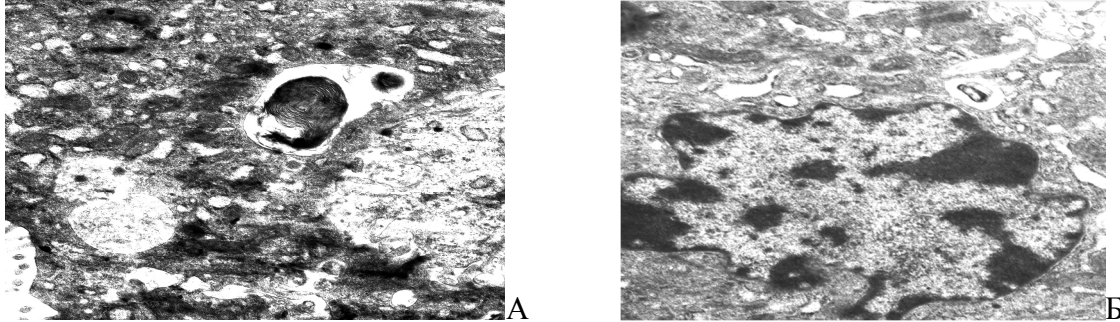


Рис.2. Вакуолі, мієліноподібні тільця у цитоплазмі інфікованих клітин. Електроннограми А – х 16000, Б– х 14000.

Остання, як правило, втрачає рибосоми і каналці представленні у вигляді вакуолей. Все це свідчить про розвиток гідропічної дистрофії у таких клітинах (рис. 2А,Б). У ядрах інфікованих клітин виявляються скупчення капсидів вірусних часточок. В основному вони розміщені у гетерохроматині округлої форми і мають незначну прозорість, а самі віріони визначаються у вигляді електроннощільних утворів розміром 20-25 нм. Капсиди можуть сягати 30нм і виявляються також зонах розширення перинуклеарного простору (рис. 2 Б, 3). Деякі капсиди розширені і включають вірусні часточки, вони трапляються і за межами ядра, у цитоплазмі, але в основному біля фагосом та лізосом.

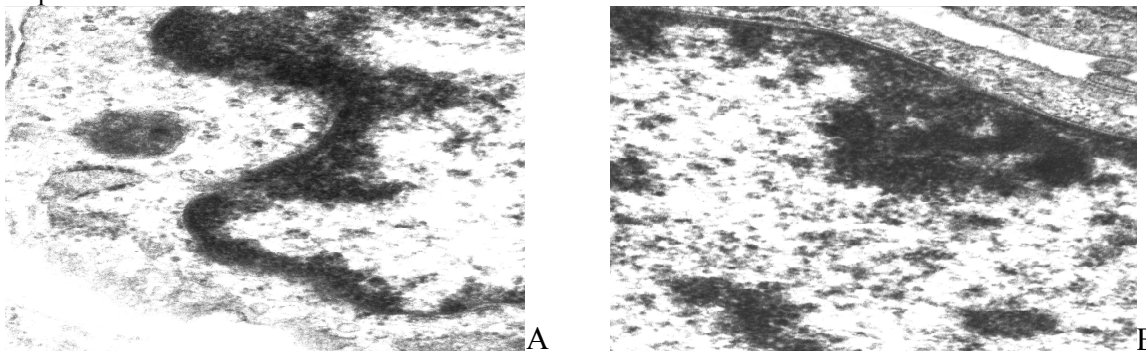


Рис. 3. Ядро, парануклеарний простір капсиди у ядрі та перинуклеарному просторі. Електроннограми, А- х 30000, Б- х 40000.

На рис. 3А видно як капсиди скупчуються біля ядерних пор в зоні локалізації лізосом, очевидно, останні їх поглинають. До цитопатичного ефекту дії вірусів слід віднести утворення у ядрі ендотеліоцитів кровеносних капілярів, також як і у цитоплазмі, мієліноподібних структур, які пов'язані з посиленням перекисного окислення ліпідів (рис. 4А). У таких ядрах у невеликій кількості реєструються вірусні часточки, капсиди яких трапляються і в цитоплазмі.

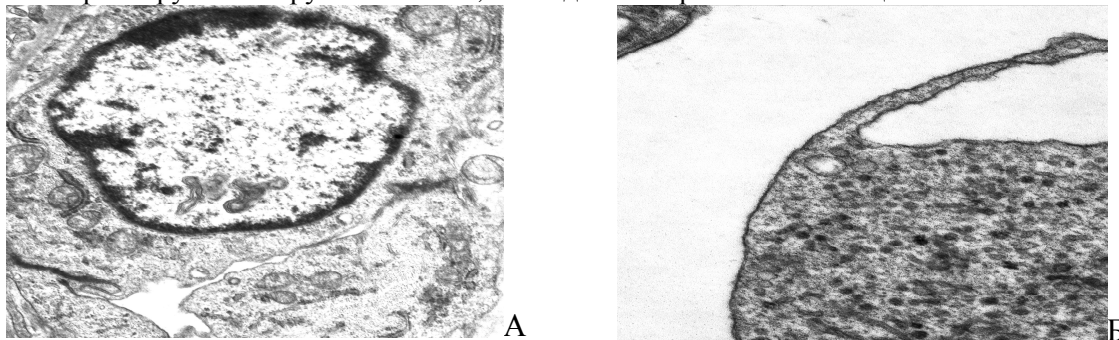


Рис.4. Ядро, мієліноподібні тільця, капсиди у ядрі та перинуклеарному просторі, ендоплазматична сітка, вірусні часточки. Електроннограми А – х 18000, Б– х 40000.

У лакунах спостерігаються ретикулоцити, які містять агранулярну ендоплазматичну сітку, у меншій кількості гранулярну, включення глікогену (рис.4 Б). Тут же виявляються еритроцити, які містять фагосомы з електроннощільними включеннями, везикули та залишками мембран (рис.5 А, Б), а також електроннопрозорі, повністю або ж частково, пухирці з електроннощільним вмістом. Можливо, і фагосомы, і ці пухирці включають матеріал вірусних часточок. Тромбоцити, які тут трапляються, малих розмірів і невеликою кількістю гранул. Еритроцити формують відростки, що проникають через клітини, що вистеляють лакуни (рис.5).

Таким чином, вірусні часточки які виявлялись у клітинах плаценти локалізувались у більшості, у ядрах цитотрофобласта, синцитіотрофобласта та макрофагах. У меншій мірі у ендотелії кровеносних капілярів та цитоплазмі цих клітин. Розмір віріонів 20-25 нм і виявляти їх можна на збільшеннях у 40-60 тисяч.

Висновки

1. Ультраструктурне дослідження зразків плаценти вагітних інфікованих В19-парвовірусною інфекцією значно розширює наше уявлення про цитопатичну дію цієї інфекції на тканині плаценти і пояснює патогенез невиношування вагітності у I та II триместрах
2. Висока частота враження В19-парвовірусною інфекцією клітин плаценти обумовлено тропністю вірусу до клітин цитотрофобласта та синцитіотрофобласта з швидким поділом клітин і розкриває природу викиднів у I та II триместрах.
3. Гістологічна картина плаценти при парвовірусній інфекції характеризується вираженим набряком, що пов'язано з цитолітичною дією вірусів у клітинах мішенях
4. При спостереженні тонких зрізів плаценти на ультраструктурному рівні виявлена інформація про розташування часточок парвовірусу В19 як у ядрі, так і в цитоплазмі інфікованих клітин. Розмір віріонів парвовірусу В19 становив 20-25 нм і виявляти їх можна на збільшеннях у 40-60 тисяч.
5. Метод електронної мікроскопії надає додаткову інформацію про причину самовільних викиднів та загибелі плода з неімунною водяною у другому триместрі вагітності при сумнівних результатах імуноферментного аналізу на В19-парвовірусну інфекцію.

Список літератури

1. Бондаренко Н.П. Діагностична цінність комбінованого методу імуноферментного аналізу та полімеразної ланцюгової реакції для виявлення внутрішньоутробного інфікування плода / Н.П. Бондаренко, В.П. Лакатош, П.В. Лакатош [та ін.] // Лікарська справа. -2015.- №3-4-С. 121-128
2. Anne M. Detection of D19 Parvovirus in Human Fetal Tissues by Electron Microscopy / M. Anne, K.E. Field, B.J. Cohen [et al.] // Journal of Medical Virology.-1991.-№35-Р. 85-95.
3. Brown T. Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis / T. Brown, A. Anand, L.D. Richie [et al.] // Lancet: P. 1033-1034.- 1984.
4. Butchko A.B. Comparison of three commercially available serologia assays used to detect human parvovirus B19-specific immunoglobulin M(IgM) and IgG antibodies in sera of pregnant woman / A. B. Butchko, I. A. Jordan // Clin Microbiol.-2004.-№42(7).-P.3191-3195.
5. Burton T. Intranuclear inclusions in marrow of hydrops fetus due to parvovirus infection/ T. Burton, D. Carrington, D. Gilmore [et al.] // Lancet ii – P. 1115.-1986.
6. Caul E.O. Intrauterine infection with human parvovirus B19: a light and electron microscopy study / E. O. Caul, M. J. Usher, P. A. Burton // Journal of Medical Virology.- 1988. - №24- P.55-66.
7. Jordan J. A. Infect Dis Obstet Gynecol / J.A. Jordan // -2004.- №12 (2).-P.69-78.
8. Young N.S. Mechanisms of disease: Parvovirus B19 / Young N.S. Brown K.E. // Eng. J. Med- 2004.-№350- P.586-598.

Реферати

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В19

Бондаренко Н.П., Стеченко Л.А., Лакатош В.П., Лакатош П.В., Антоныук М.И., Нарытник Т.Т.

Виявлення частиць парвовірусу В19 в плацентарній тканині плодів з отечним синдромом неімунного походження являється допоміжним методом в діагностиці вертикальної передачі арбовірусу В19 во время вагітності. Восприимчивість плацентарних кліток – цитотрофобласта і синцитіотрофобласта к парвовірусу В19 і його цитотоксическе впливание на клітки мішені обуславлює природу патогенетических порушень, а именно викидній і гибель плода в сроках до 21 недели гестації. К цитопатическому ефекту действия вірусів необхідно віднести утворення в ядрі ендотеліоцитів кровеносних капілярів просвічувальної, а также как і в цитоплазмі миелиноподобных структур, которые связаны с усилением перекисного окисления ліпидов. Метод електронної мікроскопії надає додаткову інформацію про природу викиднів та загибелі плода з неімунною водяною у другому триместрі вагітності при сумнівних результатах імуноферментного аналізу на В19-парвовірусну інфекцію.

ULTRASTRUCTURE OF THE PLACENTA DURING PARVOVIRUS INFECTION B19

Bondarenko N.P., Stechenko L.O., Lakatos V.P., Lakotosh P.V., Antonyuk M.I., Narytnik T.T.

Response in Placental Tissues – cytotrophoblast and plasmiodiotrophoblast to parvovirus B19 and its cytotoxic influence on cells cause pathogenic abnormality, such as abortions and fetal death in terms of 21 weeks' gestation. To cytopathic effect of virus include formation in the nucleus of endothelial cells of blood capillary as well as myelin figures in cytoplasm, which are connected with enhancement of lipid peroxidation. The method of electron microscopy provides additional information about the cause of immature birth and embryofoetal death with non-immune hydrop in the

дополнительную информацию о причине самопроизвольных выкидышей и гибели плода с неиммунной водянкой во втором триместре беременности при сомнительных результатах иммуноферментного анализа на В19-парвовирусную инфекцию. Частицы парвовируса В19 визуализировались в 100% случаев самопроизвольного прерывания беременности с отеком синдромом у плода и плаценти та в сроках 15-19 недель, в то время, как острая В19-парвовирусная инфекция у матери (наличие Ig М к парвовирусу В19) была диагностирована путем иммуноферментного анализа лишь в 62,5% случаев.

Ключевые слова: В19-парвовирусная инфекция, вирионы парвовируса В19, неиммунная водянка плода, гибель плода, самопроизвольный выкидыш, цитотрофобласт, синцитиотрофобласт, беременность.

Стаття надійшла 3.03.2016 р.

second trimester of pregnancy with ELISA doubtful results on parvovirus infection В19. Parvovirus В19 viral particles imaging in 100% cases of termination with edema syndrome in the fetus and placenta in terms of the 15-19 weeks, at the same time as mothers infected by acute parvovirus infection (detection of human parvovirus В19-specific IgM and IgG antibodies) only in 62,5% cases was diagnosed by ELISA.

Key words: Human parvovirus (hPV) В19 infection, parvovirus В19 virions, non-immune hydrops, embryofoetal death, immature birth, cytotrophoblast, plasmodiotrophoblast, pregnancy.

Рецензент Волков К.С.

УДК 579.61:616-078

Є.С. Воробей, О.С. Воронцова, А.І. Вишник

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, м. Дніпропетровськ

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛЕЙ ДИСБІОЗУ ПІХВИ МИШЕЙ, СТВОРЕНИХ ШЛЯХОМ ВВЕДЕННЯ ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Порівняльний аналіз якісного та кількісного складу мікрофлори піхви мишей показав, що при дисбіозі, індукованому плівкоутворюючим штамом *S. aureus* (ДПС), визначалися більш значні зміни, ніж при дисбіозі, індукованому неплівкоутворюючим штамом *S. aureus* (ДНС). Так, при ДПС кількість мікроаерофільних лактобацил зменшувалася до $1,07 \pm 0,58$ Іг КУО/мл при частоті виявлення 44,1%, а при ДНС – до $1,71 \pm 1,10$ Іг КУО/мл при частоті 70,1%, тоді як кількість анаеробних лактобацил зменшувалася до $3,60 \pm 2,46$ Іг КУО/мл при частоті 44,1% та $3,77 \pm 2,28$ Іг КУО/мл при частоті 49,3% відповідно. При цьому кількість стафілококів при ДПС збільшувалася до $3,36 \pm 2,36$ Іг КУО/мл, а при ДНС – до $2,99 \pm 1,38$ Іг КУО/мл при частоті виявлення 100% в обох випадках, тоді як кількість ентеробактерій збільшувалася до $2,39 \pm 1,30$ Іг КУО/мл при частоті 19,1% та до $2,00 \pm 1,14$ Іг КУО/мл при частоті 19,4% відповідно. Крім того, спостерігалось збільшення загального мікробного числа до $2,79 \times 10^5$ КУО/мл для моделі ДПС та до $1,62 \times 10^5$ КУО/мл – для ДНС, причому співвідношення кількості аеробних представників мікрофлори до анаеробних становило 1 : 83 та 1 : 90 відповідно. Отже, ДПС характеризувався значним ростом кількості умовно-патогенних та анаеробних бактерій і більшою стійкістю дисбіозу.

Ключові слова: стафілококи, біоплівка, дисбіоз, репродуктивний тракт.

Робота є фрагментом держбюджетної теми №1-294-15 «Структурно-функціональні властивості природних мікробіоценозів та механізми біологічної дії мікробних препаратів».

Нормальна життєдіяльність організму залежить від складу резидентної мікрофлори відкритих порожнин, репродуктивного тракту зокрема, де мікроорганізми знаходяться у стані рівноваги. Під впливом багатьох факторів відбувається зміна мікробіоти піхви, що призводить до порушення складу нормальної мікрофлори. Зсув співвідношення кількості аеробів : анаеробів у бік збільшення анаеробних мікроорганізмів, зменшення кількості лактобацил та збільшення кількості представників умовно-патогенної мікрофлори трактується як дисбіоз [8, 17].

Значну небезпеку у гінекології представляють аеробні та факультативні мікроорганізми, що належать до транзитної флори вагінального біоценозу, зокрема, бактерії роду *Staphylococcus* [4]. При глибоких дисбіотичних розладах стафілокок найчастіше стає збудником інфекцій будь-якої локалізації, самостійно або в асоціації з іншими патогенами. Збільшення кількості стафілококів у складі мікробіоти піхви є головним фактором, що пригнічує розвиток представників нормальної мікрофлори цього біотопу, насамперед, лактобацил.

Відповідно до сучасних даних [15, 16, 18], ключовим фактором у патогенезі дисбактеріозу репродуктивного тракту є утворення бактеріями біоплівок – стійких бактеріальних асоціацій, які посилюють їх резистентність до лікувальних препаратів. Біоплівки умовно-патогенних мікроорганізмів на слизовій оболонці піхви блокують запальну відповідь, знижують активність імунітетів, що дозволяє бактеріям досягати високих концентрацій [5, 19], та створюють усталені патологічні біоценози. Вони зберігають життєздатність мікроорганізмів при концентраціях перекису водню і молочної кислоти у 4-8 разів більш високих, ніж потрібні для пригнічення окремих бактерій поза плівками [1]. Стафілококи найчастіше виступають в ролі ініціаторів біоплівкового процесу, що полегшує колонізацію для інших мікроорганізмів [9]. Тому вони були обрані для створення експериментальних моделей дисбіозу піхви, що дозволять прогнозувати перебіг дисбіозу, визначити чинники, які сприяють його утворенню, та розробити ефективні