

© Коллектив авторов, 2013
УДК 616.453-018

*Т.Г.Боровая, Н.В.Шевлягина, А.М.Иванова, А.Н.Наровлянский, Н.В.Калмыкова,
О.Ю.Третьяков и Л.В.Диденко*

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕНИТАЛЬНОЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Лаборатория анатомии микроорганизмов (зав. — д-р мед. наук Л.В.Диденко), Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины им.Н.Ф. Гамалеи, Москва

Изучены реактивные изменения коры надпочечников половозрелых самок морских свинок (n=5) на экспериментальной модели острого генитального герпеса. Использованы методы световой и трансмиссионной электронной микроскопии. Для обнаружения антигенов вирусов в кортикостероцитах (Ксц) применены методы иммуофлюоресценции и электронной иммуноцитохимии. Показано, что на 7-е сутки острого процесса возникают очаговые реактивные изменения КСЦ в клубочковой зоне — при светооптическом исследовании Ксц имели сохранными ядра и оптически пустую цитоплазму, при электронно-микроскопическом исследовании в этих Ксц обнаружены разрушенные мембранные органеллы и различные мембранные структуры, не свойственные им в норме. Выявлены скопления гипертрофированных КСЦ в пучковой зоне. Отмеченные изменения имеют обратимый характер, поскольку они практически исчезают с наступлением спонтанной реконвалесценции (21-е сутки после инфицирования). Регенерация Ксц клубочковой и пучковой зон коры надпочечника осуществляется с участием внутриклеточного и клеточного механизмов.

Ключевые слова: надпочечник, кортикостероциты, герпесвирусная инфекция

В многочисленных исследованиях сообщается о повреждающем влиянии вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов на клетки надпочечников, сопровождающемся репликацией вирионов. Однако в одних случаях исследователи наблюдали апоптоз клеток надпочечников [1, 5, 6], в других — в разной степени выраженные очаги некроза [8, 11]. Помимо трактовки способов патогенного влияния вирусов простого герпеса на клетки надпочечников, авторы расходятся и в оценке зон поражения: приводятся факты о репликации вируса и разрушении мозгового вещества [1, 13], пучковой и сетчатой зон коры [18]. Практически все исследования имеют вирусологический характер и посвящены анализу репликации вирусов. Способ заражения — чаще внутривенный или интраперитонеальный. В качестве инфектов применяют разные штаммы и концентрации вирусов. В совокупности это не соответствует естественному пути инфицирования и развития острого генитального герпеса у человека. Вместе с тем, существуют более адекватные модели, разработанные на половозрелых самках морских свинок. Эти экспериментальные животные высокочувствительны к возбудителю генитального герпеса, и острый

период заболевания клинически проявляется у них, как и у человека, в виде специфического вульвовагинита с последующим формированием хронической рецидивирующей инфекции [16, 17]. Это позволяет использовать данные модели для углубленного изучения реактивных изменений и компенсаторно-приспособительных процессов в тканях надпочечника при генитальном герпесе.

Цель настоящего исследования — оценка реактивных изменений коры надпочечника в экспериментальной модели острого генитального герпеса у половозрелых самок морских свинок.

Материал и методы. Объектом исследования служили правый и левый надпочечники 12 половозрелых самок морских свинок (2 из которых составили группу контроля, 10 — группу инфицированных животных). Заражение производили штаммом MS вируса простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2) путем интравагинального введения 20 мкл вирусосодержащего материала. Вирус предварительно был размножен на перевиваемой культуре клеток Vero. По данным анализа вагинальных мазков, все морские свинки в период заражения находились в фазе диэструса полового цикла. Надпочечники (правый и левый) фиксировали на 7-е сутки (в острый период, когда воспаление и специфические высыпания в области кожи и слизистой оболочки наружных гениталий отчетливо выражены) и на 21-е сутки (в период спонтанной реконвалесценции). В каждый срок эксперимента

Сведения об авторах:

Боровая Татьяна Геннадьевна (e-mail: tbor27@yandex.ru), Диденко Любовь Васильевна, Шевлягина Наталья Владимировна, Иванова Алла Михайловна, Наровлянский Александр Наумович, Калмыкова Нина Владимировна, Третьяков Олег Викторович, лаборатория анатомии микроорганизмов, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины им. Н. Ф. Гамалеи, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 25

анализировали материал от 5 морских свинок. Выведение животных из опыта и взятие материала осуществляли после усыпления животных парами хлороформа в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1989)». Надпочечники фиксировали в 10% нейтральном формалине, готовили серийные срезы, которые окрашивали гематоксилином—эозином. Поскольку все вирусы семейства *Herpes viridae* эпителиотропны, а возбудитель генитального герпеса обладает свойством инициировать воспаление, основное внимание было обращено на реакцию коры надпочечника, кортикостероциты (Ксц) которого имеют эпителиальную природу и синтезируют гормоны, участвующие в развитии воспалительных процессов. Для выявления вирусной природы повреждений Ксц использованы 2 тест-реакции на антигены вируса. Реакцию прямой иммунофлюоресценции на антигены ВПГ-2 проводили на депарафинированных срезах надпочечника. После промывки в дистиллированной воде срезы обрабатывали 3% перекисью водорода, затем фосфатным буфером (рН 7,4). Инкубацию срезов с поликлональными антителами к ВПГ-2 (Лабдиагностика, Россия), меченных флюоросцеин-изотиоцианатом, осуществляли в течение 90 мин при комнатной температуре. После промывки в фосфатном буфере (рН 7,4) и в дистиллированной воде срезы заключали в глицерин и просматривали под световым микроскопом AxioStar plus (Carl Zeiss, Германия) с люминесцентной приставкой MBQ 52 AC. Для электронной иммуноцитохимии использовали ультратонкие срезы надпочечника, заключенные в метакрилатную заливочную среду LR White (Polyscience GMBX, Германия). Сетки со срезами инкубировали в дистиллированной воде в течение 10 мин, далее 30 мин — в 5% растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере (рН 7,4). Инкубацию с первичными кроличьими поликлональными антителами к ВПГ-2 (Лабдиагностика, Россия) в разведении 1:100 осуществляли в течение 2 ч при температуре 37 °С. После отмывки в фосфатном буфере проводили инкубацию с антикроличьими антителами, конъюгированными с коллоидным

золотом (Invitrogen, США) в течение 1 ч с последующей отмывкой в фосфатном буфере и фиксацией по методу S. Ito и M. Karnovsky [7]. Контрольные срезы инкубировали 2 ч в 5% растворе бычьего сывороточного альбумина и с конъюгатами антител, меченных золотом. Срезы контрастировали по методу E. S. Reynolds [15]. Препараты изучали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM 100B (Jeol, Япония).

Результаты исследования. Изменения гистологического строения коры надпочечника у всех инфицированных свинок в разгар заболевания (на 7-е сутки после введения вируса) были идентичными; различия в реакции правого и левого надпочечников не отмечено.

В клубочковой зоне коры на фоне общей сохранной гистологической структуры наблюдали локальные истончения зоны с признаками кровенаполнения сосудов и очаговыми нарушениями гистологического строения клубочков. При окрашке гематоксилином—эозином Ксц таких клубочков имели светлую (оптически пустую) цитоплазму, сохранялось лишь ядро (рис. 1, а, б). На электронно-микроскопическом уровне в этих Ксц обнаружено разрушение мембранных органелл и присутствие различных мембранных структур, не свойственных этим клеткам в норме. Реакция иммунофлюоресценции на антигены ВПГ-2, как правило, была положительна в ядрах нескольких Ксц в каждом из очагов (рис. 2, а), а также в ядрах эндотелиоцитов рядом расположенных сосудов. При электронной иммуноцитохимии обнаружено, что метка коллоидного золота локализовалась в деструктивно измененных митохондриях (см. рис. 2, б) и в ядрах описанных выше Ксц с резко

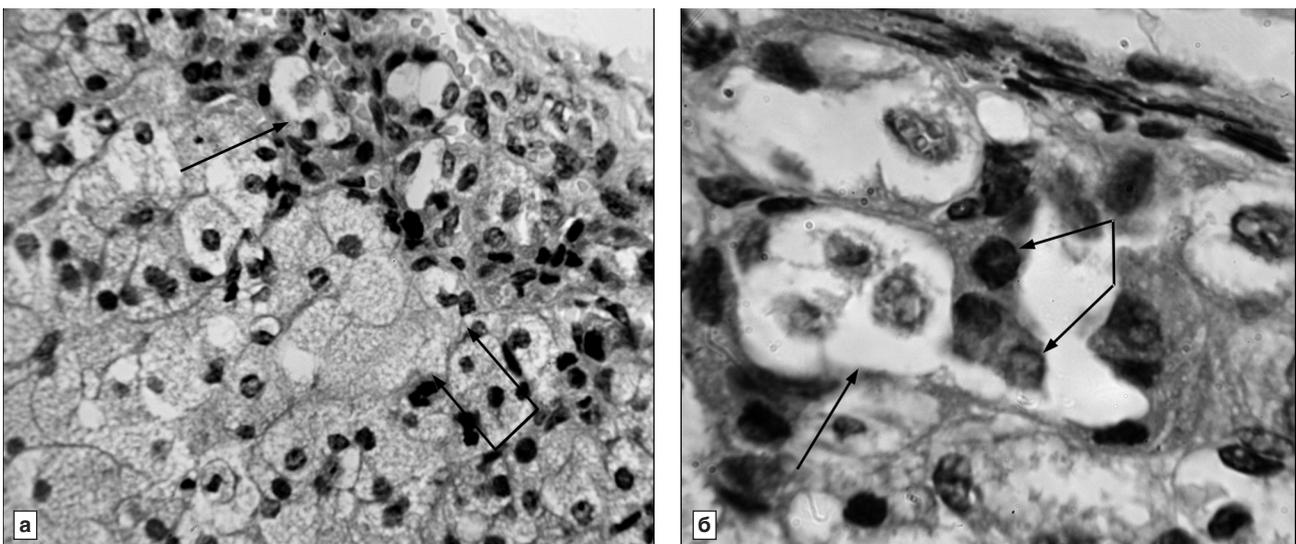


Рис. 1. Кора надпочечника морской свинки на 7-е сутки после инфицирования вирусом простого герпеса 2-го типа.

а — общий вид участка клубочковой и пучковой зон коры: очаговые нарушения гистологического строения клубочков (стрелка), скопления гипертрофированных кортикостероцитов (Ксц) в пучковой зоне (сдвоенные стрелки); б — Ксц клубочковой зоны с оптически пустой цитоплазмой (стрелка), малодифференцированные клетки (сдвоенные стрелки). Окраска гематоксилином—эозином.
а — об. 20, ок. 10; б — об. 40, ок. 10

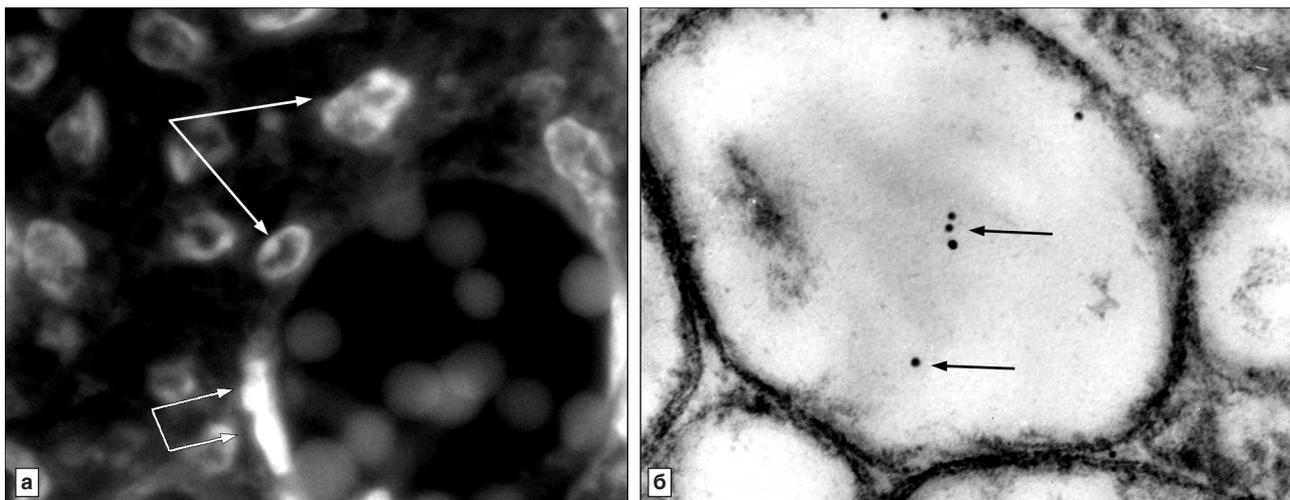


Рис. 2. Кортикостероциты (Ксц) в клубочковой зоне надпочечника морской свинки на 7-е сутки после инфицирования вирусом простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2).

а — положительная реакция иммунофлюоресценции в ядрах Ксц (стрелки) и эндотелиоците (сдвоенные стрелки); б — локализация метки коллоидного золота (стрелки) в разрушенной митохондрии Ксц. а — реакция прямой иммунофлюоресценции на антигены ВПГ-2; б — иммуноцитохимическая реакция на антигены ВПГ-2. а — об. 20, ок. 10; б — ув. 50 000

просветленной цитоплазмой. На остальных участках клубочковой зоны, как гистологическое строение, так и ультраструктура Ксц, практически не отличались от таковых в контроле, а результаты тест-реакций на антигены вируса были отрицательны.

Пучковая зона коры надпочечников во всех случаях выглядела утолщенной по сравнению с контролем. На фоне обычного гистологического строения с расширенными капиллярами и отдельными диффузно расположенными Ксц с признаками пикноза ядра в этой зоне имелись крупные скопления гипертрофированных Ксц. Подобные скопления в контроле отсутствовали.

По своей локализации скопления гипертрофированных Ксц часто топографически совпадали с очагами деструкции Ксц в клубочковой зоне. Светооптически Ксц в составе указанных скоплений утрачивали вид, свойственный им в норме (рис. 3, а): они имели крупные размеры и в разной степени вакуолизированную цитоплазму (см. рис. 3, б). Электронно-микроскопически в гипертрофированных Ксц были выявлены разрушенные митохондрии и гранулярная эндоплазматическая сеть, резко расширенные каналцы агранулярной эндоплазматической сети, отсутствие липидных включений. Вместе с тем, в таких скоплениях в ядрах только отдельных Ксц была отмечена поло-

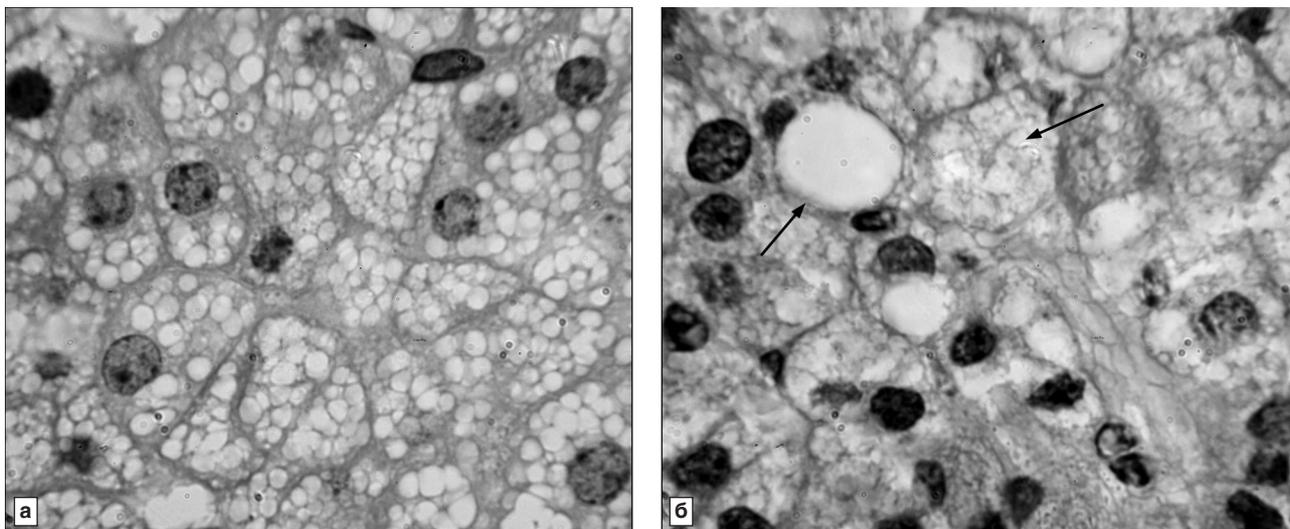


Рис. 3. Пучковая зона коры надпочечника морской свинки.

а — кортикостероциты (Ксц) нормального строения контрольного животного; б — гипертрофия Ксц, вакуолизация цитоплазмы (стрелки) на 7-е сутки после инфицирования вирусом простого герпеса 2-го типа. Окраска гематоксилином—эозином. Об. 90, ок. 10

жительная иммунофлюоресценция при реакции на антигены ВПГ-2, а метка коллоидного золота — в ядрах и митохондриях.

Сетчатая зона коры была несколько утолщена по сравнению с контролем и содержала расширенные микрососуды. Ее Ксц выглядели гетероморфными: одни имели темную эозинофильную цитоплазму (ТКсц), другие — светлую вакуолированную (СвКсц). Различий в светооптическом строении ядер ТКсц и СвКсц отмечено не было. Аналогичный гетероморфизм Ксц был присущ и сетчатой зоне контрольных надпочечников. Видимой разницы в соотношении ТКсц и СвКсц в контроле и опыте не отмечено. В обоих случаях СвКсц имели тенденцию группироваться вблизи венул (рис. 4), в то время как ТКсц располагались вокруг капилляров. Использованная реакция иммунофлюоресценции на антигены вируса позволила выявить присутствие последних только в отдельных Ксц сетчатой зоны надпочечников инфицированных морских свинок, определить

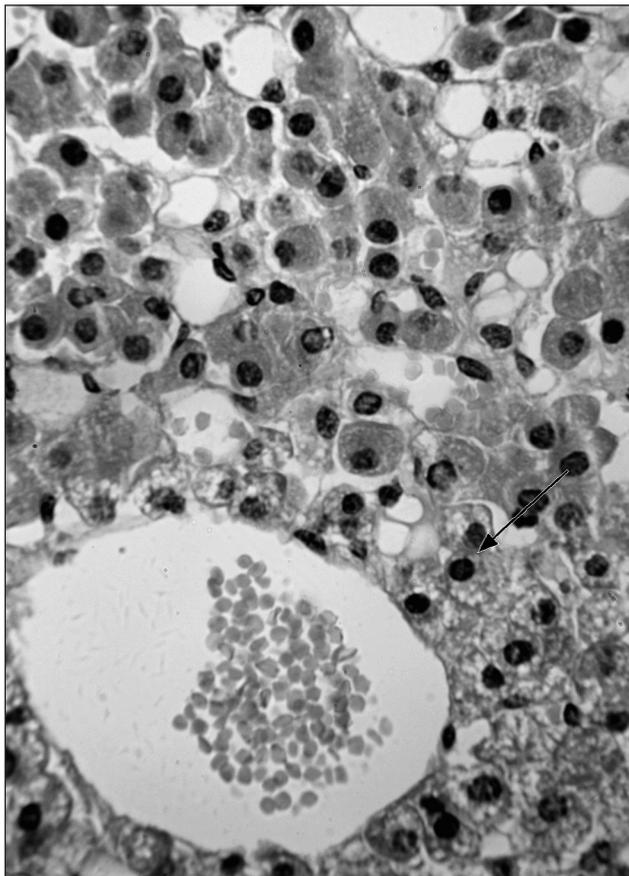


Рис. 4. Сетчатая зона надпочечника морской свинки на 7-е сутки после инфицирования вирусом простого герпеса 2-го типа.

Расположение темных кортикостероцитов (Ксц) в тесном контакте с расширенными капиллярами, светлых Ксц — вблизи расширенной венулы (стрелка). Окраска гематоксилином—эозином. Об. 20, ок. 10

принадлежность которых к ТКсц или СвКсц не представлялось возможным.

Ни в одном из случаев в коре надпочечников не были обнаружены признаки воспаления с лейкоцитарной макрофагальной инфильтрацией, как не были отмечены и признаки апоптоза Ксц.

Рядом с очагами деструкции Ксц в клубочковой зоне, а также на границе клубочковой и пучковой зон были обнаружены скопления малодифференцированных клеток небольшого размера с относительно крупным округлым или овальным гиперхромным ядром, окруженным узким ободком цитоплазмы. Часть этих клеток внедрялись в пучковую зону (рис. 5).

Таким образом, в остром периоде развития генитального герпеса морфофункциональные изменения Ксц наиболее отчетливо проявлялись в клубочковой и пучковой зонах коры надпочечника.

К 21-м суткам после инфицирования (период спонтанной реконвалесценции) гистологическое строение коры надпочечника у всех подопытных животных практически не отличалось от контроля. Ультраструктурные признаки Ксц всех зон

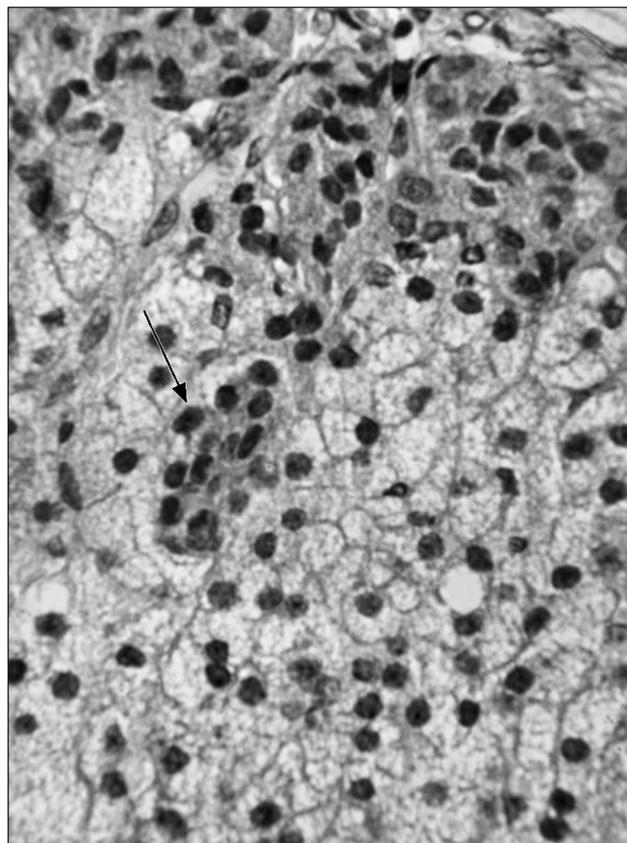


Рис. 5. Клубочковая и пучковая зоны коры надпочечника морской свинки.

Группа малодифференцированных клеток (стрелка), внедрившихся в пучковую зону (7-е сутки после инфицирования). Окраска гематоксилином—эозином. Об. 20, ок. 10

коры соответствовали таковым в норме. В пограничной области между клубочковой и пучковой зонами располагались немногочисленные малодифференцированные клетки небольшого размера с гиперхромным ядром, окруженным узким ободком цитоплазмы.

Обсуждение полученных данных. В остром периоде генитальной герпесвирусной инфекции наблюдаются структурные изменения коры надпочечников. Данные изменения связаны с присутствием в Ксц вируса, что подтверждают результаты двух параллельно выполненных тест-реакций. Выявленную разницу в присутствии антигенов вируса в Ксц разных зон коры надпочечника (градиент реакции иммунофлюоресценции на антигены вируса) можно трактовать в связи с особенностями кровоснабжения органа [2]. Капиллярная сеть клубочковой зоны, на которую распадаются многочисленные субкапсулярные артерии, является, по сути, первым (по вектору кровотока и, соответственно, вектору движения вируса) звеном в коре, где вирусы могут вступить в контакт с Ксц надпочечника. В пучковой и сетчатой зонах концентрация вирусов в крови, вероятно, снижается из-за их адгезии клетками клубочковой зоны, и специфическое мечение клеток на антигены вируса в этих зонах становится более редким явлением. Кроме того, имеются сведения [12], что разные концентрации преднизолона, дексаметазона, гидрокортизона способны уменьшить активность вирусной репликации до 99%.

Очаговая деструкция Ксц клубочковой зоны коры надпочечников рассматривается как реакция на присутствие вируса. Однако в отличие от ранее полученных данных [1, 5, 6, 8, 11, 14] зарегистрированные изменения Ксц нельзя отнести ни к категории некротических, ни к категории апоптотических изменений. Гипертрофия Ксц пучковой зоны и появление скоплений Ксц с вакуолизированной цитоплазмой являются компенсаторной реакцией, направленной на усиление синтеза противовоспалительных гормонов и подавление острой воспалительной реакции в области входных ворот инфекции и, возможно, на снижение активности репликации вируса в самих надпочечниках [12]. В сетчатой зоне нами не было отмечено каких-либо структурных различий с контролем за исключением расширения микрососудов. Этот признак может служить косвенным указанием на возможную активацию поступления в кровь андрогенов, участие которых в развитии воспалительного процесса в области входных ворот инфекции также вероятно [19]. Связано ли это с присутствием вируса не ясно, поскольку в сетчатой зоне имму-

нопозитивные Ксц при реакции на антигены вируса были в абсолютном меньшинстве.

Обнаружение на 7-е сутки малодифференцированных по светооптическим признакам клеток в клубочковой зоне и на ее границе с пучковой зоной, а также наличие этих клеток непосредственно в пучковой зоне мы расцениваем как их участие в клеточной регенерации в период спонтанной ремиссии герпесвирусной инфекции. Это согласуется с результатами исследований по регенерации коры надпочечников после гипертермических воздействий [9]. Автор указывает, что первое появление малодифференцированных клеток регистрируется под капсулой надпочечника примерно на 7-е сутки, далее клетки мигрируют вдоль капилляров по направлению к пучковой зоне, дифференцируясь впоследствии в типичные Ксц клубочковой и пучковой зон.

По материалам проведенного исследования регенерация Ксц клубочковой зоны наступает к 21-м суткам, что хронологически согласуется с данными авторов, которые наблюдали на 20-е сутки появление субкапсулярно расположенных клеток клубочковой зоны после энуклеации надпочечников [4]. Регенерация Ксц клубочковой зоны, помимо участия малодифференцированных клеток [10], реализуется также за счет внутриклеточных механизмов [3]. В пучковой зоне восстановление обычной структуры Ксц происходит, вероятно, преимущественно путем внутриклеточной регенерации. Однако не исключается и участие малодифференцированных клеток. В сетчатой зоне не выявлены существенные морфофункциональные признаки повреждения Ксц.

Итак, в использованной экспериментальной модели в остром периоде генитального герпеса развиваются реактивные изменения коры надпочечников в виде появления очаговых морфологических изменений Ксц в клубочковой зоне и формирования скоплений гипертрофированных (функционально напряженных) Ксц в пучковой зоне. Отмеченные нарушения строения не сопровождаются развитием воспаления, некроза, а также апоптоза Ксц.

Выявленные реактивные изменения Ксц указанных зон имеют преимущественно обратимый характер, поскольку с наступлением спонтанной реконвалесценции (21-е сутки после инфицирования) они практически исчезают. Восстановление нормального гистологического строения клубочковой и пучковой зон протекает путем внутриклеточной регенерации и при участии малодифференцированных эпителиальных клеток надпочечника.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aita K., Irie H., Koyama A.H. et al. Acute adrenal infection by HSV-1: role of apoptosis in viral replication. *Arch. Virol.*, 2001, v. 146, № 10, p. 2009–2020.
2. Coupland R.E. Blood supply of the adrenal gland. In *Handbook of Physiology. Section 7. Endocrinology*. Washington, American Physiological Society, 1976, p. 283–294.
3. Derev'ianko L.P. and Nosov A.T. Effect of external ionizing radiation on morphofunctional indices of the hypothalamus, hypophysis and adrenal glands. *Lik Sprava*, 2004, № 5–6, p. 64–68.
4. Engeland W.C. and Levay-Young B.K. Changes in the glomerulosa cell phenotype during adrenal regeneration in rats. *Am. J. Physiol.*, 1999, v. 276, № 5, p. 1374–1382.
5. Esaki S., Goshima F., Katsumi S. et al. Apoptosis induction after herpes simplex virus infection differs according to cell type in vivo. *Arch. Virol.*, 2010, v. 155, № 8, p. 1235–1245.
6. Irie H., Kiyoshi A. and Koyama A.H. A role for apoptosis induced by acute herpes simplex virus infection in mice. *Int. Rev. Immunol.*, 2004, v. 23, № 1–2, p. 173–185.
7. Ito S. and Karnovsky M. Proteolytic microdissection of smooth-surfaced vesicles of liver microsomes. *J. Cell. Biol.*, 1969, v. 39, № 1, p. 168–169.
8. Kapoor A.K., Nash A.A., Wildy P. et al. Pathogenesis of herpes simplex virus in congenitally athymic mice. The relative roles of cell mediated and humoral immunity. *J. Gen. Virol.*, 1982, v. 60, p. 225–233.
9. Kashirina N.K. The morphological and functional basis of the new conception about the suprarenal cortex regeneration. *Medicina (Kaunas)*, 2003, v. 39, № 10, p. 951–954.
10. Mitani F., Mukai K. and Miyamoto H. The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex. *Biochem. Biophys. Acta*, 2003, v. 1619, p. 317–325.
11. Nachtigal M. and Caulfield J.B. Early and late pathologic changes in the adrenal glands of mice after infection with herpes simplex virus type 1. *Am. J. Pathol.*, 1984, v. 115, № 2, p. 175–185.
12. Notter M.F. and Docherty J.J. Steroid hormone alteration of herpes simplex virus type 1 replication. *J. Med. Virol.*, 1978, v. 2, № 3, p. 247–252.
13. Podlech J., Hengerer F., Fleck M. et al. Replication of HSV type 1 and 2 in the medulla of the adrenal gland after vaginal infection of mice. *Arch. Virol.*, 1996, v. 141, № 10, p. 1999–2008.
14. Pollara G., Katz D.R. and Chain B.M. The host response to herpes simplex virus infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2004, v. 17, № 3, p. 199–203.
15. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 1963, v. 17, № 2, p. 208–212.
16. Stanberry L.R. Animal model of ultraviolet-radiation-induced recurrent herpes simplex virus infection. *J. Med. Virol.*, 1989, v. 28, p. 125–128.
17. Stanberry L.R. Evaluation of herpes simplex virus vaccines in animals: the guinea pig vaginal model. *Rev. Infect. Dis.*, 1991, v. 13, № 11, p. 920–923.
18. Wiegand H., Dienes H.P., Schirmacher P. et al. Colonization of adrenal glands and ovaries of mice by variant of HSV1 and 2. Histopathological, immunohistochemical and in situ hybridization studies. *Arch. Virol.*, 1991, v. 117, № 3–4, p. 237–249.
19. Yirrell D.L., Blyth W.A. and Hill T.J. The influence of androgens on paralysis in mice following intravenous inoculation of herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.*, 1987, v. 68, № 9, p. 2461–2464.

Поступила в редакцию

Получена после доработки 25.03.2013

STRUCTURAL CHANGES OF THE ADRENAL CORTEX IN EXPERIMENTAL GENITAL HERPES VIRUS INFECTION

T.G. Borovaya, N.V. Shevlyagina, A.M. Ivanova, A.N. Narovlyanskiy, N.V. Kalmykova, O. Yu. Tretyakov and L.V. Didenko

The reactive changes in the adrenal gland cortex were studied in mature female guinea pigs (n=5) in an experimental model of acute genital herpes virus infection. The methods of light and transmission electron microscopy were used. To confirm the presence of viral antigen in the corticosterocytes (CSC), the methods of immunofluorescence and electron microscopic immunocytochemistry were used. It was shown that at day 7 of an acute process, focal CSC reactive changes appeared in the glomerular zone — at the light microscopic level, CSC had intact nuclei and optically empty cytoplasm, while at the electron microscopic level, these CSC demonstrated the damaged membranous organelles, and various membranous structures which were not found in the normal cells. The aggregates of hypertrophied CSC were found in the fasciculate zone. The changes described were reversible, as they practically disappeared by the onset of spontaneous recovery (day 21 after inoculation). The regeneration of CSC of glomerular and fasciculate zones of the adrenal cortex involves both intracellular and cellular mechanisms.

Key words: *adrenal gland, corticosterocytes, herpes virus infection*

Laboratory of the Anatomy of Microorganisms, N.F. Gamaleya Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow