

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСОВ В СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНЫХ С ПАТОЛОГИЕЙ ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНОГО АППАРАТА (ОДА)

И.А.Мальчиков, И.А. Тузанкина, Л.А. Соколова, Л.Г.Тулакина, Ю.В. Григорьева, А.П. Порываева, Л.Н. Канкина, Л.П. Мальчикова

ФГУН Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Уральская государственная медицинская академия г. Екатеринбург.

Метод электронной микроскопии может быть использован для различных целей, в том числе для обнаружения вирусов, определения клеток-мишеней, где выделена репродукция вирусов в органе, их структуры, места и способа репродукции, характера патологических изменений, а также для выявления морфологических изменений в тканях вокруг пораженных клеток. На основе анализа совокупности указанных ультраструктурных изменений ряд авторов выделили наиболее информативные морфологические признаки для каждого вида инфекции [2,3,5]. Но сам вирус можно обнаружить только при высокой концентрации вирионов. Существует проблема утраты антигенов при фиксации и обработке препаратов [1,4,6]. Поэтому **целью** нашей работы было: определение возможности использования культуры клеток для культивирования вирусов, содержащихся в синовиальной жидкости больных патологией ОДА, дальнейшим исследованием методом электронной микроскопии и определением этиологической роли вирусов в развитии заболеваний ОДА.

Материалы и методы исследования

Проведено исследование синовиальной жидкости 60 больных реактивным (РеА) и ревматоидным (РА) артритами, остеоартрозом (ОА), имевших лабораторно подтвержденную герпетическую инфекцию в возрасте от 18 до 60 лет. Среди них мужчин было 20 человек (33,3%), женщин – 40 (66,6%). Средняя продолжительность заболевания с поражением крупных и мелких суставов (коленных, плечевых, височно-нижнечелюстных) составила $3,7 \pm 2,6$ года. Наличие герпетической группы вирусов в синовиальной жидкости указанных больных подтверждено в 30% случаях. Для накопления содержащихся в исследуемом материале вирусов использовали культуру клеток Vero в 3-4 пассажах. Предупреждение размножения и подавление случайно попавших в клеточную культуру бактерий производилось с помощью противомикробного препарата (гентамицин). Его концентрация для культур клеток составила 200 ед/мл. При электронной микроскопии использовали следующую схему фиксации: взвесь культуры ткани из пробирок сливали в одну емкость не менее 200 мл и центрифугировали при 1500 тыс. об/мин в течение 15 мин.

Сформировавшийся осадок в виде столбика объемом 0,5 см помещали в 2,5% раствор глутарового альдегида с последующей фиксацией в 1% растворе четырехоксида осмия и заливкой в аралдит (Araldit Beschleuniger 964). Срезы готовили на ультротоме ЛКБ, концентрировали цитратом свинца и исследовали с помощью электронного микроскопа ЭМВ-100 ЛМ при увеличении $\times 28000$.

Результаты и обсуждение

По данным электронной микроскопии при исследовании синовиальной жидкости больных наблюдаемых групп (РеА, РА, ПОА), прошедшей несколько пассажей на культурах ткани Vero, были выявлены сформированные вирусные структуры, которые идентифицированы как принадлежащие герпетической группе вирусов [7].

При электронномикроскопическом исследовании контрольной клеточной культуры Vero наблюдались клетки округлой формы с небольшими выростами. Цитоплазматический матрикс – светлый, с массой рибосом и полисом. В перикарионе определялась хорошо развитая гранулярная эндоплазматическая сеть в виде канальцев и цистерн. Митохондрии – осмиофильного вида, округлой формы. Ядро – с равномерным распределением хроматина. Ядрышко располагалось в центре (Рис.1)

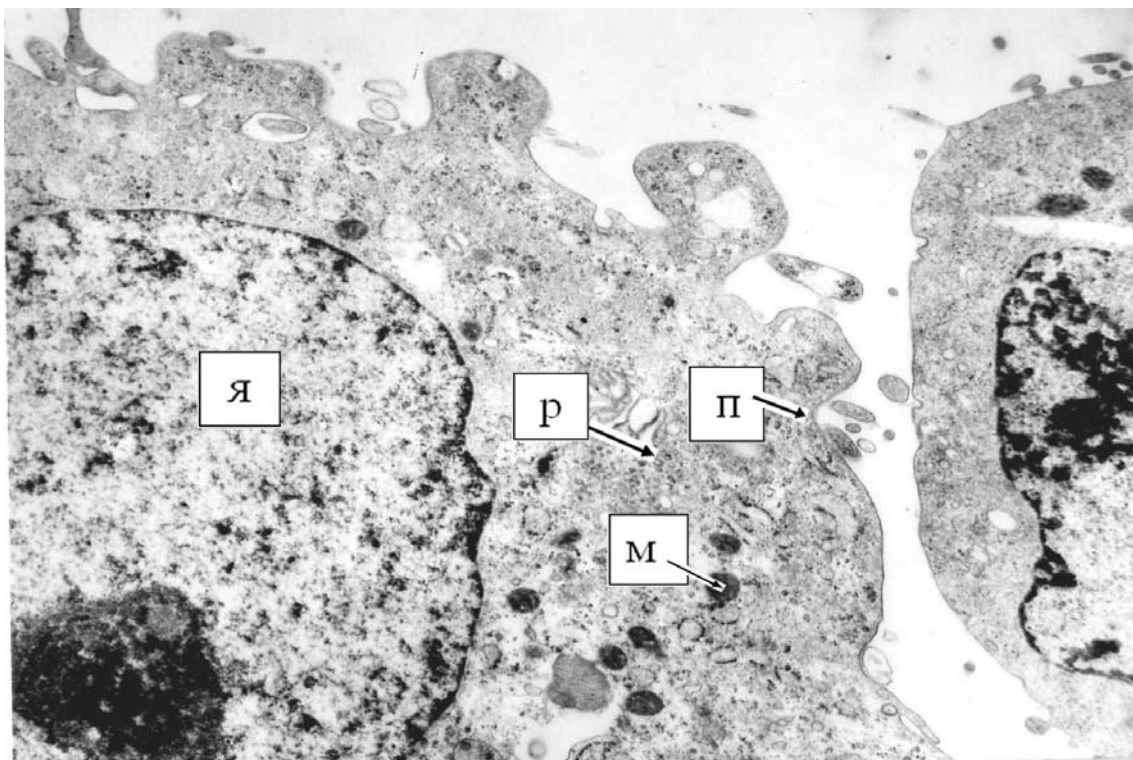


Рис.1 Контрольная клеточная культура Vero. Цитоплазма с монотонным распределением рибосом (р) и полисом (п), гранулярной эндоплазматической сетью (энд), митохондрии осмиофильного вида. Ядра (я) с равномерным распределением хроматина (увел. 28000)

При заражении культуры ткани *Vero* вирусами, выделенными из синовиальной жидкости больного ВПГ, были обнаружены вирионы, которые наблюдали в межклеточном пространстве среди неизмененных клеток. Репродукция вирионов, в основном, наблюдалась в ядрах у внутренней поверхности ядерной мембраны с нарушением ее целостности и выходом вирионов в перинуклеарное пространство и цитоплазму. В последней отмечались деструктивные изменения органелл, нарушение цитоплазматической мембраны с выходом вируса в межклеточное пространство. В клеточных культурах, где имела место репродукция вируса, отмечался лизис ядер и гибель клеток (Рис. 2).

Рисунок .2

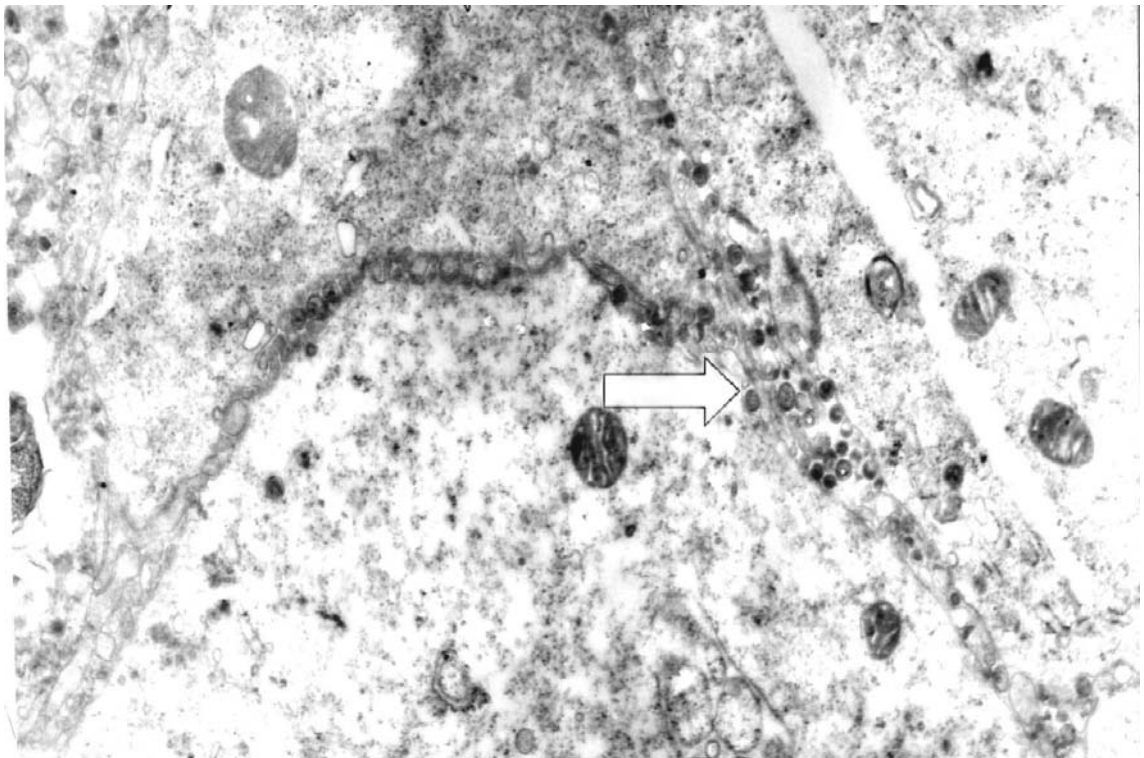


Рис. 2 Монослой клеточной культуры *Vero* с с/ж больного с патологией ОДА и ВНС при герпетической инфекции. Межклеточное расположение вирионов ВПГ (увел. 28000)

В клетках определялось большое число вирионов, расположенных в межклеточном пространстве. Они находились в процессе репродукции среди нормальных, а также деструктивных клеток, что сопровождалось характерными изменениями в структуре последних. В ходе этого процесса происходила гибель основных компонентов клеток. При этом, в ядре клеток происходила перегруппировка хроматина, его «маргинация» (краевое расположение). Также выявлялись разные стадии созревания вирионов, которые в основном происходили в непосредственной близости от края ядерной мембраны. Выход ВПГ осуществлялся непосредственно в перинуклеарное пространство, в цитоплазму и далее

межклеточно. В то же время в значительной части клеток отмечались изменения в ядрах, характерные для герпетической инфекции. В ядрах появлялись единичные вирионы, имело место отслоение ядерной мембраны и выход вирионов в перинуклеарное пространство. В цитоплазме наблюдали просветление цитоплазматического матрикса за счет обеднения его рибосомами и появление вакуолей (Рис.3).

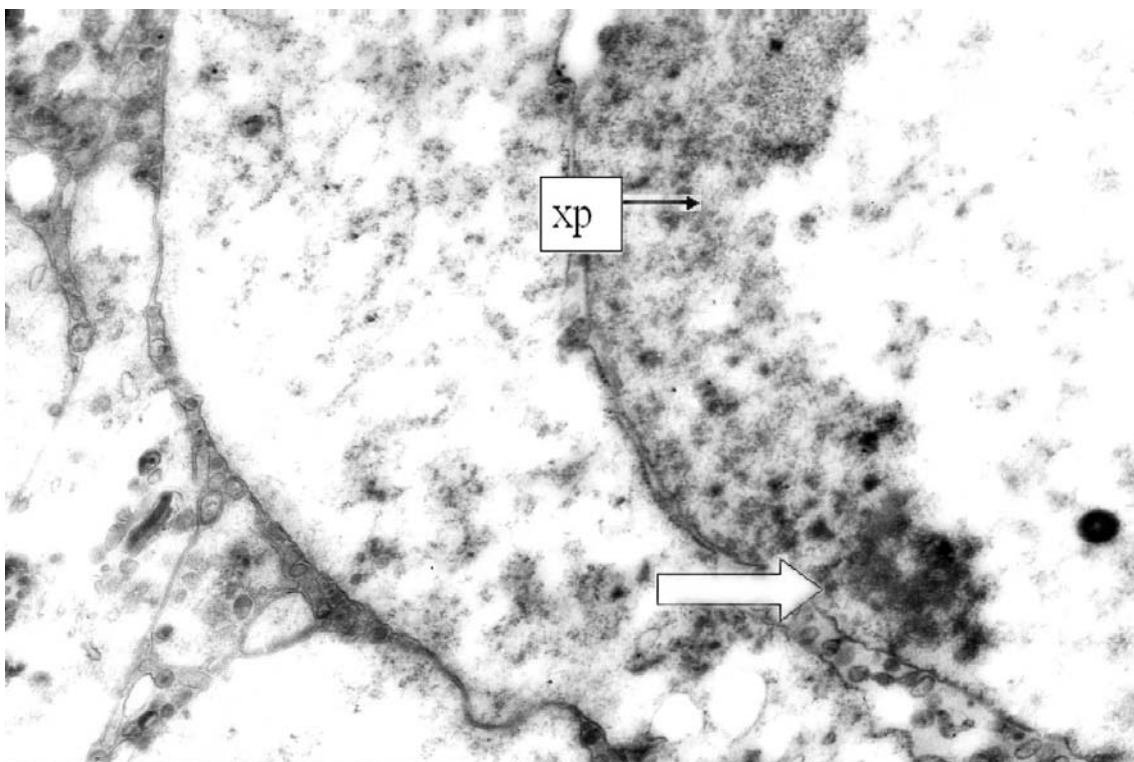


Рис. 3. Монослой культуры клеток Vero с с/ж больного с патологией ОДА и ВНС при герпетической инфекции. Маргинация хроматина (хр) в ядре, появление межклеточно единичных вирионов ВПГ () (увел. 28000)

У внутренней поверхности ядерной мембраны прослеживались скопления мелкозернистого, в разной степени осмиофильного материала, в котором происходила репродукция вирионов. На некоторых участках наблюдалось нарушение целостности ядерной мембраны и выход вирионов в цитоплазму. При этом отмечалось просветление цитоплазматического матрикса и деструкция органелл. В дальнейшем вирусные частицы определялись не только в цитоплазматическом матриксе и в вакуолях клетки, но и в межклеточных пространствах. В месте репродукции вирионов ВПГ визуализировался выход из ядра клетки в цитоплазму. Наблюдался полиморфизм вирионов (от начала стадии их формирования, до образования зрелых частиц) (рис.4).

В клетках с репродуцирующими вирусами ВПГ отмечался массовый лизис ядер. В центре клетки обнаруживалась выраженная деструкция органелл и деструктивные изменения

цитоплазматической мембраны. В более поздние стадии размножения вируса отчетливо определялась масса вирионов, заполнявшая обширные участки цитоплазмы, а также проникавшая в межклеточное пространство. Продолжалась дальнейшая деструкция клеток. Наблюдалось нарушение цитоплазматической мембраны и выход вирусных частиц в межклеточное пространство. Полиморфизм вирионов в ядре и цитоплазме сохранялся на прежнем уровне. В самих клеточных культурах, где имела место репродукция вируса, отмечалось полное опустошение ядер и лизис клеток (рис. 5).

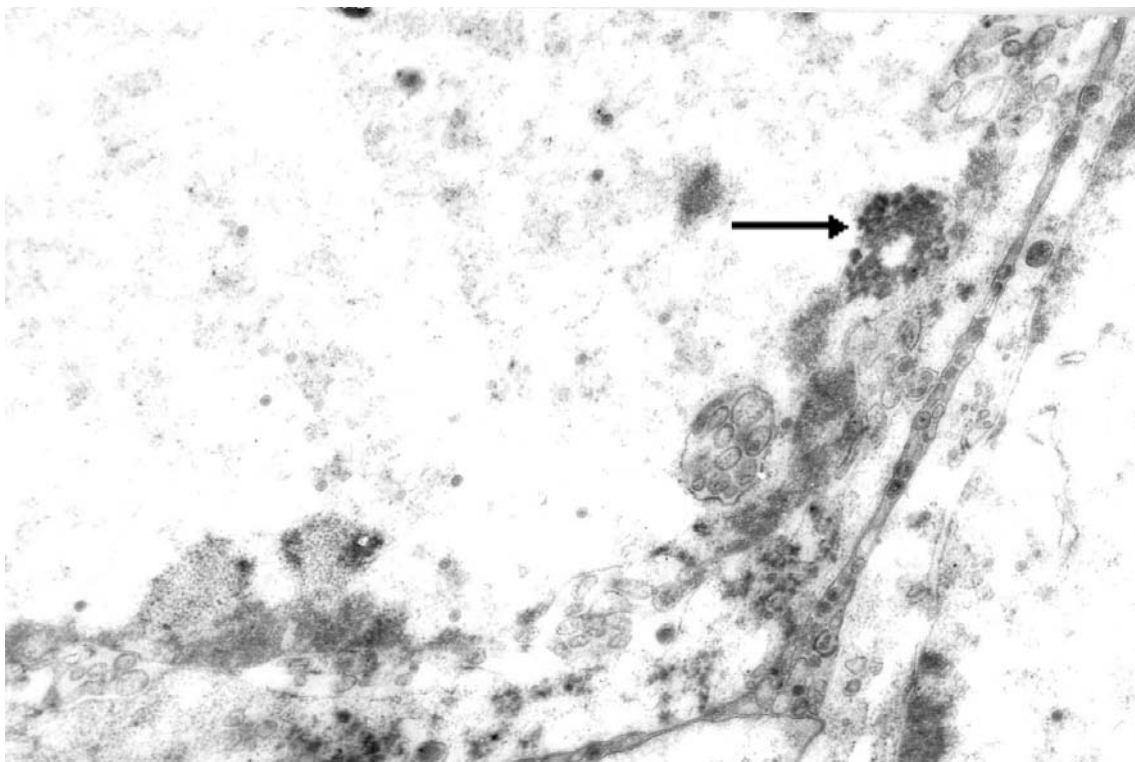


Рис. 4. Монослой культуры клеток Vero с с/ж больного с патологией ОДА и ВНЧС при герпетической инфекции. Репродукция ВПГ по краю ядерной мембраны с выходом в цитоплазму и межклеточное пространство () (увел. 28000)

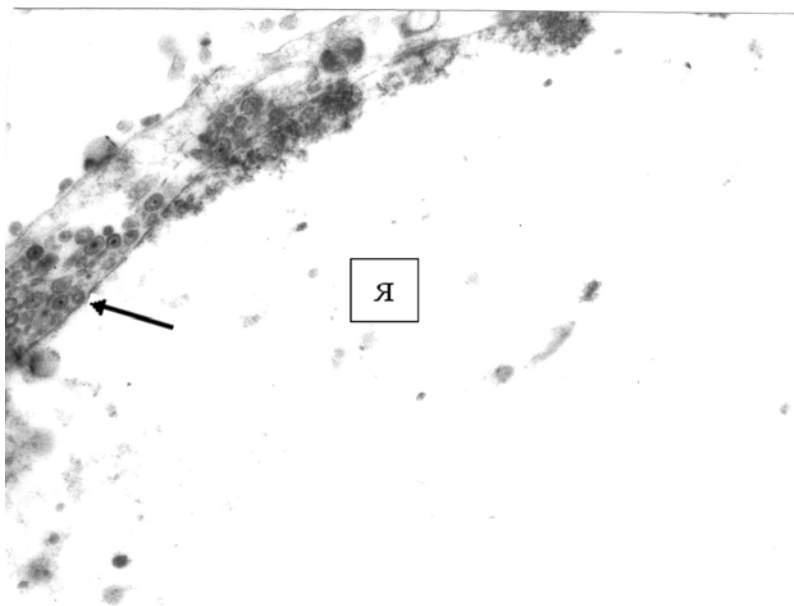


Рис. 5. Монослой культуры клеток Vero с с/ж больного герпетической инфекцией. Опустошение ядра (я). Полиморфизм вирионов в цитоплазме. Нарушение цитоплазматической мембраны и выход вирусных частиц в межклеточное пространство () (увел. 28000).

Таким образом, проведенные электронно-микроскопические исследования позволили утверждать, что для выявления вирусов ВПГ в синовиальной жидкости больных с заболеваниями ОДА необходимо применять метод культивирования вирусов в клеточных культурах с использованием среды Vero.

Обнаружено, что в процессе репродукции вируса происходила гибель структурных компонентов клеток. Наряду с этим определялся гипертрофированный цитоплазматический матрикс с вновь возникшими мембранными структурами и многочисленными гранулами рибосом, локализация, количество и группировка которых отличалась от нормальных. Отмеченные морфологические сдвиги позволяют предположить, что именно этот морфологический субстрат обеспечивает дальнейшую репродукцию вирусов, а существующие представления об изменениях в инфицированных клетках генетической информации и метаболических процессов необходимо дополнять данными об изменении структурной организации инфицированных клеток.

В клеточных структурах инфицированной клетки был выявлен и сам герпесвирус. Он индуцировал в клетках синтез не только новых веществ, но и появление новых структур, обеспечивающих его репродукцию. Репродукция, в основном, происходила в ядрах у внутренней поверхности ядерной мембраны, целостность которой нарушалась и наблюдался выход вирионов в перинуклеарное пространство и цитоплазму. Отмечались деструктивные

изменения органелл, нарушение цитоплазматической мембраны и попадание вируса в межклеточное пространство. В культуральных клетках, внутри которых происходила репродукция вирусов, отмечался лизис ядер и гибель клеток.

Выводы

1. Метод электронной микроскопии с использованием клеточных культур Vero дает возможность верифицировать этиологическое значение вирусов при заболеваниях ОДА, что важно для определения этиотропной терапии.

2. Несмотря на трудоемкость используемого метода, он позволяет обнаруживать не только сам вирус, но и получать доказательства его размножении в суставной оболочке.

Литература

1. Адаскевич В.П. Инфекции, передаваемые половым путем (Руководство для врачей) – Н-Новгород: НГМА, -2001,- 416 с.

2. Атлас вирусной цитопатологии / А.Ф. Быковский, Ф.И. Ершов, В.Я. Кармышева [и др.] М.: Медицина, 1975. –255 с.

3. Дрейзин Р.С. Семейство Adenoviridae // Общая и частная вирусология /Под ред. В.М. Жданова, С.Я. Гайдомович .М.: Медицина, 1982. Т.2.-С.413-462.

4. Исаков В.А. Клиника и лечение генитального герпеса / В.А.Исаков, М.М. Сафронова.- СПб.: Медицина, 1997,- 32 С.

5. Шабунина-Басок Н.Р. Атлас ультроструктурной патологии перинатальных вирусных инфекций;- Екатеринбург: УрО РАН, 2003.- 132 с.

6. Херрингтон С., Дж. Макги. Молекулярная клиническая диагностика. М.: Мир, 1999. - 558с.

7. Электронная микроскопия для начинающих: пер. с англ./ под ред. Б. Уикли –М.: Мир, 1975.- 430 с.