БАКТЕРІЙНА АДГЕЗІЯ НА КЛІТИНИ ЕПІТЕЛІЮ ПІДНЕБІННИХ МИГДАЛИКІВ ПРИ ІНФЕКЦІЙНОМУ МОНОНУКЛЕОЗІ

Надрага О.Б.¹ ORCID: 0000-0002-3688-6179

Луцик О.Д.² ORCID: 0000-0001-6819-804X

Клименко Х.П.¹ ORCID: 0000-0003-4131-8720

Хомин О.Я.¹ ORCID: 0000-0002-2509-8898

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна

¹ Кафедра дитячих інфекційних хвороб

² Кафедра гістології, цитології та ембріології

BACTERIAL ADHESION OF PALATINE TONSILS EPITHELIAL CELLS IN INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

A.B. Nadraga ORCID: 0000-0002-3688-6179

O.D. Lutsyk ORCID: 0000-0001-6819-804X

Kh.P. Klymenko ORCID: 0000-0003-4131-8720

O.Ya. Khomyn ORCID: 0000-0002-2509-8898

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Ключові слова: інфекційний мононуклеоз, діти, бактерійний тонзиліт, вірус Епіштейн-Барр, бактерійна адгезія

Для цитування: Надрага О. Б., Луцик О. Д., Клименко Х. П., Хомин О. Я. Бактерійна адгезія на клітини епітелію піднебінних мигдаликів при інфекційному мононуклеозі. Львівський медичний часопис. 2021. Т. 27. № 1-2. С. 8-14. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2021.1-2.008>

Для кореспонденції: Клименко Христина Петрівна, Пекарська, 54, Львів, Львівська область, 79000
e-mail: kristinkalnmu@gmail.com

Стаття надійшла: 1.03.2021 **Прийнята до друку:** 28.04.2021

Keywords: infectious mononucleosis, children, bacterial tonsillitis, Epstein-Barr virus, bacterial adhesion

For citation: Nadraga AB, Lutsyk OD, Klymenko KhP, Khomyn OYa. Bacterial adhesion of palatine tonsils epithelial cells during infectious mononucleosis infection. Acta Medica Leopoliensia. 2021;27(1-2):8-14. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2021.1-2.008>

For correspondence: Klymenko Khrystyna Petrivna, Pekarska, 54, Lviv, Lviv region, Ukraine, 79000
e-mail: kristinkalnmu@gmail.com

Received: March 1, 2021 **Accepted:** April 28, 2021

Реферат

Мета. Встановлення особливостей колонізації слизової оболонки мигдаликів зіву патогенними і умовно патогенними мікроорганізмами шляхом електронно-мікроскопічного дослідження епітелію піднебінних мигдаликів зіву хворих з інфекційним мононуклеозом та гострим стрептококовим тонзилітом.

Матеріали і методи. Обстежено двох пацієнтів чоловічої статі - пацієнт П., віком 12 років з підтвердженим діагнозом інфекційний мононуклеоз та пацієнт А. віком 8 років, із гострим стрептококовим тонзилітом. Хворим проведено бактеріологічному дослідженні слизу поверхні мигдаликів зіву та зішкріб з поверхні епітелію мигдаликів зіву, зразки тканин досліджували у лабораторії електронної мікроскопії Міжфакультетської лабораторії експериментальних методів досліджень ЛНУ імені Івана Франка.

Результати й обговорення. Досліджено 36 препаратів епітеліальної тканини мигдалика пацієнта А. і 41 препарат - пацієнта П. При бактеріологічному

Abstract

Aim. To evaluate the features of pharynx tonsils mucous membrane colonization by pathogenic and opportunistic microorganisms using electron microscopic examination of pharynx palatine tonsils epithelium in patients with infectious mononucleosis and acute streptococcal tonsillitis.

Materials and Methods. Two patients, i.e. a patient P. (12 years old) with a confirmed diagnosis of infectious mononucleosis, and patient A. (8 years old) with acute streptococcal tonsillitis diagnosis were examined. A bacteriological examination of mucus and epithelium scraping from the surface of the pharyngeal tonsils was conducted. Tissue samples were examined in the electron microscopy laboratory of the Lviv National University.

Results and Discussion. 36 tonsils epithelial tissue micro preparations of patient A. and 41 micro preparations of patient P. were studied. *Streptococcus pyogenes*, *Str. pneumoniae*, *Str. viridans*, *Candida albicans*, as well as non-pathogenic bacteria, *Diphtheroides* sp., *Neisseria*

дослідженні слизу з поверхні мигдаликів зіву у пацієнта П виявлено: *Str. pyogenes*, *Str. pneumoniae*, *Str. viridans*, *Candida albicans*, а також непатогенні бактерії: *Diphtheroides spp.*, *Neisseria spp.*, *Corynebacterium spp.* У хворого А. виявлено: *Staph. aureus*, *Str. viridans*, *Str. pneumoniae*. Гістологічно у дослідженому матеріалі, отриманому від хворого з гострим тонзилітом біля поверхні мигдаликів спостерігалися еозинофіли із двосегментним ядром, специфічною зернистістю та фагоцитованими бактеріями кулястої форми у цитоплазмі. У пацієнта з інфекційним мононуклеозом виявлено нагромадження бактерій не лише у позаклітинному детриті, але й скупчення численних бактерій у цитоплазмі епітеліоцитів у вигляді виноградинних грон.

Висновки. Проведене електронно-мікроскопічне дослідження виявило відмінності у локалізації кокової флори (яку за морфологічними ознаками можна титувати як стрептококи) у епітеліальних тканинах при тонзилітах різної етіології - позаклітинна локалізація бактерій при гострому бактерійному тонзиліті та внутрішньоепітеліальна при тонзилітах на тлі інфекційного мононуклеозу.

Вступ

Одним з найбільш поширених симптомів інфекційного мононуклеозу (ІМ), який спричинений Епштейн-Бар вірусом (ЕБВ), є тонзиліт при якому в патологічний процес залучені піднебінні мигдалики, що покриваються щільним, мембраноподібним ексудатом. До складу ексудату входять бактерії, бактеріальні залишки та тканинний детрит. За даними літератури більшість мікроорганізмів, які виявлені при бактеріологічних дослідженнях слизу з мигдаликів зіву при ІМ належать до мікрофлори, яка у здорових індивідуумів заселяє поверхні мигдаликів. Разом з тим, виявляються і бета-гемолітичні стрептококи, в основному груп А, С, G, а також представники анаеробної мікрофлори - *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* [1].

Із метою встановлення особливостей колонізації слизової оболонки мигдаликів зіву патогенними і умовно патогенними мікроорганізмами ми провели електронно-мікроскопічне дослідження епітелію піднебінних мигдаликів зіву хворих з ІМ та гострим стрептококовим тонзилітом.

Матеріал і методи

Під спостереженням перебувало двоє хворих -

sp., and *Corynebacterium spp.* were identified as result of the bacteriological examination of mucus from the surface of the pharyngeal tonsils of the patient P. *Staph. aureus*, *Str. Viridans*, and *Str. pneumoniae* were identified during a bacteriological examination of the patient A. Eosinophils with a two-segmented nucleus, specific granularity, phagocytosed spherical bacteria in the cytoplasm were detected during the histological examination of the materials taken from the surface of the patient with acute tonsillitis tonsils. Research shows that bacteria accumulate not only in the structure of extracellular detritus. Numerous bacteria accumulations were found in the cytoplasm of the epithelial cells in the patient with infectious mononucleosis also. The cell's shape resembles a bunch of grapes.

Conclusions. The electron microscopic examination showed differences in the coccal flora localization. The extracellular localization of bacteria in the patient with acute bacterial tonsillitis, and intraepithelial presence of the bacteria in the patient with tonsillitis during infectious mononucleosis were found.

хлопець П., віком 12 років який перебував на стаціонарному лікуванні з діагнозом ІМ, і хлопець А., віком 8 років, у якого було діагностовано і проводилося лікування гострого стрептококового тонзиліту.

Діагноз інфекційного мононуклеозу у хворого П. було встановлено на підставі типових симптомів захворювання, характерних змін загального аналізу крові (зокрема, наявності у мазку крові 12% атипичних мононуклеарів) та підвищеного рівня специфічних імуноглобулінів (IgM до капсидного антигену). При бактеріологічному дослідженні слизу з поверхні мигдаликів зіву у цього пацієнта виявлено: *Streptococcus pyogenes* у концентрації 4,0 lgKYO, *Str. pneumoniae* 3,7 lgKYO, *Str. viridans* - 3,1 lgKYO, *Candida albicans* - 2,7 lgKYO, а також непатогенні бактерії: *Diphtheroides sp.*, *Neisseria sp.*, *Corynebacterium spp.*

Гострий стрептококовий тонзиліт у дитини А. було діагностовано за характерними симптомами захворювання, наявністю ознак запалення у загальному аналізі крові (лейкоцитоз, прискорена ШОЕ), високого рівня С-реактивного протеїну та результатів бактеріологічного дослідження слизу з мигдаликів (*Staph. aureus* в концентрації 8,0 lgKYO, *Str. viridans* - 6,1 lgKYO, *Str. pneumoniae* - 2,5 lgKYO).

На першу добу стаціонарного лікування пацієнтам проведено зішкріб з поверхні епітелію мигдаликів зіву. Зразки тканин досліджували у лабораторії електронної мікроскопії Міжфакультетської лабораторії експериментальних методів досліджень ЛНУ імені Івана Франка. Матеріал фіксували 1,5% розчином OsO_4 (CHEM, USA) в 0,2 М какодилаті натрію (Fluka) при pH 7,2 на протязі 2-2,5 годин та обезводнювали в зростаючих концентраціях етилового спирту (50%, 70%, 90%, 98%) по 30 хв. в кожному. Після проведення через пропіленоксид протягом 10 хв здійснювали заливку зразків в епоксидну смолу Epon-812 (Fluka) з подальшою полімеризацією протягом 24 год. в термостаті при температурі 60°C. Зрізи готували на ультрамікротомі УМТП-6М з використанням алмазного ножа DIATOM. Контрастування здійснювали у 1% розчині уранілацетату та в контрастері за Рейнольдсом [2,3]. Дослідження зрізів проводили з використанням трансмісійного електронного мікроскопа TEM -100, фотографували цифровою камерою SONY - H9.

Методи досліджень, які використані в науково-дослідній роботі науково обґрунтовані, відповідають принципам Гельсінської декларації прав людини (1950 р.), Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину (1997 р.) та вимогам чинного законодавства України. У ході проведення науково-дослідної роботи дотримано права та інтереси учасників дослідження відповідно до загальноприйнятих норм моралі, етики та деонтології. Пацієнти введені до дослідження згідно з письмовою інформованою згодою.

Результати й обговорення

Усього було досліджено 36 препаратів епітеліальної тканини мигдалика пацієнта А. і 41 препарат - пацієнта П. При цьому встановили, що більша частина поверхні мигдаликів вкрита багат шаровим плоским незроговілим епітелієм, який в окремих ділянках підлягав зроговінню. Сусідні епітеліоцити утворювали численні десмосомні контакти та інтердигітації плазматичної мембрани. Ядра клітин

овальної форми з поодинокими інвагінаціями ядерної оболонки. У цитоплазмі виявлено вільно розсіяні рибосоми, а також окремі мітохондрії та елементи гранулярної ендоплазматичної сітки. Численні тонофібрили формували характерну внутрішньоклітинну мережу. За умов гострого стрептококового тонзиліту у детриті, який вкривав поверхню епітелію мигдалика, виявлено скупчення бактерій, які за формою та локалізацією можна розцінити як коки; водночас у цитоплазмі епітеліоцитів патологічні включення та бактерії не візуалізувалися (рис. 1- 3).

У дослідженому матеріалі, отриманому від хворого П., в окремих препаратах біля поверхні мигдаликів спостерігалися еозинофіли з характерним двосегментним ядром, специфічною зернистістю еліптичної форми, та, правдоподібно, фагоцитованими бактеріями кулястої форми у цитоплазмі (рис.4).

У цитоплазмі клітин поверхневого епітелію мигдалика добре розвинена везикулярна система, великі мітохондрії, множинні фібрили та внутрішньоклітинні включення,

Рис. 1

Електронна мікрофотографія епітеліоцита піднебінного мигдалика пацієнта з гострим бактерійним тонзилітом. Стрілки вказують на грона електронно-щільних бактерій, які локалізовані в позаклітинному просторі, заповненому слизом та тканинним детритом. Збільшення $\times 6000$

Рис. 2

Електронна мікрофотографія зішкребу поверхні піднебінного мигдалика пацієнта з гострим бактерійним тонзилітом. Плазматична мембрана епітеліоцита в стані цілковитої руйнації, цитоплазма заповнена гронами електронно-щільних бактерій (вказані стрілками). Збільшення $\times 6000$

Рис. 3

Електронна мікрофотографія крипти піднебінного мигдалика пацієнта з гострим бактерійним тонзилітом. У заповненому слизом позаклітинному просторі візуалізуються скупчення електронно-щільних бактерій кулястої та овоїдної форми (стрілки). Збільшення $\times 10000$

добре видно складки клітинної оболонки. Окрім нагромадження бактерій у позаклітинному детриті скупчення численних бактерій бу-

ли виявлені у цитоплазмі епітеліоцитів; деякі з них мали вигляд виноградинних грон (рис.4-7).

За результатами електронної мікро-

Рис. 4

Електронна мікрофотографія еозинофіла у складі піднебінного мигдалика пацієнта з інфекційним мононуклеозом. Частина електронно-щільної цитоплазматичної зернистості представлена фагоцитованими бактеріями кулястої форми (стрілки). Збільшення $\times 6000$

Рис. 5

Електронна мікрофотографія епітеліоцитів поверхні піднебінного мигдалика пацієнта з інфекційним мононуклеозом. Множинні колонії бактерій у цитоплазмі клітини (стрілки), поряд клітина вільна від бактерій. Збільшення $\times 6000$

скопії встановлено відмінності у локалізації кокової флори (яку за морфологічними ознаками можна типувати як стрептококи) у епітеліальних тканинах при тонзилітах різної етіології - позаклітинна локалізація бактерій при гострому бактерійному тонзиліті та внутрішньоепітеліальна при тонзилітах на тлі ІМ.

Слизова оболонка носо- та ротоглотки, і мигдаликів зокрема, має декілька доволі складних механізмів захисту від колонізації та інвазії мікроорганізмів. На першій лінії захисту патогенні мікроорганізми можуть бути адсорбовані та нейтралізовані плівкою слизу, що покриває поверхню мигдаликів та містить бактерицидні речовини - травні ферменти, лізоцим, лактоферин, дефензини тощо). До захисних механізмів належить десквамація епітелію, неспецифічні (пероксидаза, інтерферони, лізоцим, комплемент) та специфічні (імуноглобуліни) чинники, а також мукоциліарний кліренс та фагоцитоз. Усе вищезазначене зумовлює значну стійкість слизової оболонки носо- та ротоглотки до бактерійної інвазії.

Можна припускати, що ЕБВ уражаючи В-лімфоцити, призводить до зменшення

продукції ними імуноглобулінів. У патогенезі тонзиліту важливу роль відіграють два типи імуноглобулінів - секреторний імуноглобулін А (sIgA), який перешкоджає бактеріям осісти на поверхні епітелію, та IgG, який при контакті з бактеріями індукує бактеріолізис та посилює фагоцитоз. Поверхня піднебінних мигдаликів вкрита багатошаровим плоским незроговілим епітелієм, у якому відсутні війчасті клітини, що унеможливує використання механізму муко-циліарного кліренсу, якому належить важлива роль у саногенезі повітряних шляхів [4, 5]

Традиційно стрептококи відносили до позаклітинних збудників, однак протягом останніх десятиліть низкою експериментальних досліджень встановлено, що деякі стрептококи, зокрема *Str. Pyogenes*, може локалізуватися і внутрішньоклітинно (цим можна пояснити наявність стрептококів у ротовій порожнині після терапії антибіотиками). Внутрішньоклітинна інвазія стрептококів була вперше описана ще у 1994 році LaPenta і спів-авт. які, використавши модель інфікування клітинної культури, продемонстрували, що

Рис. 6

Електронна мікрофотографія зішкребу піднебінного мигдалика пацієнта з інфекційним мононуклеозом. Множинні колонії бактерій у цитоплазмі епітеліоцита та у масі тканинного детриту, яким заповнений міжклітинний простір. Збільшення $\times 6000$

Рис. 7

Електронна мікрофотографія фрагменту епітеліоцита поверхні піднебінного мигдалика пацієнта з інфекційним мононуклеозом. Численні бактерії у цитоплазмі клітини (стрілка). Збільшення $\times 10000$

Str. pyogenes може інфікувати клітини епітелію людини, які не мають здатності до фагоцитозу, з такою самою частотою як класичні внутрішньоклітинні патогени - лістерії, хламідії чи сальмонели [6, 7].

Запальні зміни у слизовій оболонці ротоглотки також обумовлені посиленням продукції медіаторів запалення, стимуляцією чутливих нервових закінчень, розширенням кровоносних судин і збільшенням їх проникливості, інфільтрацією клітинами імунної відповіді - макрофагами, мастоцитами, лімфоцитами, поліморфнуклеарними лейкоцитами тощо. У розвитку цих процесів, безумовно, провідну роль відіграє активація опортуністичної бактерійної мікрофлори, що завжди щільно заселяє слизові оболонки ротоглотки, на тлі імунодефіциту, обумовленого герпесвірусною інфекцією [8].

За даними Stenfors і співавт. [9] при інфекційному мононуклеозі на поверхні однієї епітеліальної клітини поверхні піднебінного мигдалика може фіксуватися більш як 500 різноманітних бактерій. Проведеними дослідженнями встановлено, що адгезія бактерій до епітеліоцитів мигдаликів, а також епітелію носоглотки обернено пропорційна до віку пацієнтів; водночас інтенсивність цього процесу зростає відповідно до збільшення тривалості захворювання [10].

На сьогодні вивчено декілька механізмів стрептококової інвазії в епітеліальні та ендотеліальні клітини. SfbI та M протеїни ініціюють цей процес шляхом зв'язування фібрoneктину, який надалі взаємодіє з інтегриновими рецепторами клітинної поверхні. Кластеризація інтегринових рецепторів спричиняє агрегацію кавеол, внаслідок чого утворюються великі інвагінації плазматичної мембрани, які відтак колонізуються стрептококами. Деякі стрептококи, використовуючи зв'язаний з M-протеїном фібрoneктин, індукують комплекси вогнищевої адгезії та проникають через клітинну оболонку одним з двох механізмів - застіжковим (zipper-like mechanism) або мембрано-урухомлюючим (membrane ruffling) [11]. Перший механізм спрямовує

стрептококи у більш безпечний для них каверно-сомальний компартмент клітини, а другий скеровує бактерії у фаголізосоми, де більшість з них знищуються.

Можна припустити, що високий ступінь адгезії бактерій до епітеліальних поверхонь служить підґрунтям для масивної бактерійної колонізації, що спостерігається при ЕБВ тонзилітах з формуванням мембранозних нашарувань. Окрім масивної адгезії бактерій, переважно коків, на клітинах поверхневого епітелію мигдаликів зіву все ще недостатньо вивчене явище бактерійної інвазії епітеліоцитів при гострій ЕБВ інфекції. Результати нашого дослідження свідчать що ЕБВ та β -гемолітичному стрептококу належить синергетична роль у розвитку запальних захворювань верхніх дихальних шляхів.

Висновок

Проведені нами електронно-мікроскопічні дослідження виявили відмінності у локалізації кокової флори (яку за морфологічними ознаками можна типувати як стрептококи) у епітеліальних тканинах при тонзилітах різної етіології - позаклітинна локалізація бактерій при гострому бактерійному тонзиліті та внутрішньоепітеліальна при тонзилітах на тлі ІМ.

Література

1. Boiarska LM, Hrebenuk LV, Ivanova KO, Akhtyrskyi VV. Mikrobna kontaminatsiia nosohlotky u ditei iz khronichnym tonzylytom i hastroezofahealnoiu refluiksnoiu khvoroboiu. Zaporozhskiy medytsynskiy zhurnal. 2019. 21(5): 650-655. (Боярська ЛМ, Гребенюк ЛВ, Іванова КО, Ахтирський ВВ. Мікробна контамінація носоглотки у дітей із хронічним тонзилітом і гастроезофагеальною рефлюксною хворобою. Запорозький медичний журнал. 2019. 21(5): 650-655.) Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zmzh_2019_21_5_15.
2. Daddow LY. An abbreviated method of the double lead stain technique. J Submicrosc Cytol. 1986. 18(1): 221-224.
3. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol. 1963. 17(1): 208-212. doi: 10.1083/jcb.17.1.208.
4. Feller L, Altini M, Khammissa RA, Chandran R, Bouckaert M, Lemmer J. Oral mucosal immunity. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2013. 116(5): 576-583. doi: 10.1016/j.oooo.2013.07.013. PMID:

- 24119522.
5. Matrajt L, Gantt S, Mayer BT, Krantz EM, Orem J, Wald A, Corey L, Schiffer JT, Casper C. Virus and host-specific differences in oral human herpesvirus shedding kinetics among Ugandan women and children. *Sci Rep*. 2017. 7(1):13105. doi: 10.1038/s41598-017-12994-0. PMID: 29026166; PMCID: PMC5638921.
 6. LaPenta D, Rubens C, Chi E, Cleary PP. Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. 91(25): 12115-9. doi: 10.1073/pnas.91.25.12115. PMID: 7991594; PMCID: PMC45387.
 7. Greco WR, Bravo G, Parsons JC. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev*. 1995. 47(2): 331-385. PMID: 7568331.
 8. Dias EP, Rocha ML, Carvalho MO, Amorim LM. Detection of Epstein-Barr virus in recurrent tonsillitis. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009. 75(1): 30-4. doi: 10.1016/s1808-8694(15)30828-4. PMID: 19488557].
 9. Stenfors LE, Bye HM, Raisanen S, Myklebust R. Bacterial penetration into tonsillar surface epithelium during infectious mononucleosis. *J Laryngol Otol*. 2000. 114(11): 848-852. doi: 10.1258/0022215001904149. PMID: 11144834.
 10. Rusan M, Klug TE, Ovesen T. An overview of the microbiology of acute ear, nose and throat infections requiring hospitalisation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009. 28(3): 243-251. doi: 10.1007/s10096-008-0619-y. Epub 2008 Oct 2. PMID: 18830726
 11. Dombek PE, Cue D, Sedgewick J, Lam H, Ruschkowski S, Finlay BB, Cleary PP. High-frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein-mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. *Mol Microbiol*. 1999. 31(3): 859-870. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01223.x. PMID: 10048029