

РЕВМАТИЧЕСКИЕ ПОРОКИ СЕРДЦА И ЭНТЕРОВИРУСЫ

Митрофанова Л. Б.¹, Шляхто Е. В.¹, Ковальский Г. Б.²

НИИ кардиологии им. В. А. Алмазова Росздрави¹; городское патолого-анатомическое бюро², Санкт-Петербург.

Резюме

На материале от 1086 прооперированных больных с пороками сердца проводились: традиционное гистологическое исследование, серебрение ядрышковых организаторов с подсчетом среднего количества гранул серебра на ядро эндотелиоцита и фибробласта; иммуногистохимическое исследование с использованием моноклональных антител к энтеровирусам, виментину, десмину, SMA, Ki-67-, bcl-2-антигенам; цитологическое исследование мазков-отпечатков и полимеразно-цепная реакция клапанов. Была выявлена репликация энтеровирусов в эндотелиоцитах, фибробластах, миофибробластах и гладкомышечных клетках во всех случаях активного ревматизма, а также подавление функции эндотелия под воздействием энтеровирусной инфекции.

Ключевые слова: ревматизм, энтеровирусы, клапаны сердца.

Изучение неполиомиелитных энтеровирусов (Эв) началось в 1948 году, когда в городке Коксаки (США) из содержимого кишечника больных детей с симптомами поражения центральной нервной системы были выделены первые представители этой группы, относящиеся к семейству пикорнавирусов. Известны 87 серотипов Эв. Из них 64 являются патогенными для человека. Эв распространены во всех странах мира. Они обнаруживаются в пищевых продуктах и воде, характеризуются небольшими размерами вирионов: 25-35 нм. Вирусы обладают широким спектром патогенности, что объясняется их способностью репродуцироваться в нервных клетках, клетках соединительной ткани, эндотелии, эпителии, миоцитах и кардиомиоцитах, а также большой изменчивостью их свойств и способностью персистировать в организме хозяина [11].

Убедительные доказательства персистенции Эв в миокарде были получены по: обнаружению самих вирусов, их антигенов и РНК; сохранению высоких уровней антител к вирусам; накоплению клинических наблюдений хронического и рецидивирующего течения сердечной патологии, обусловленной ими. При миокардите инфицированность Эв составляет от 73,1% до 82%, при дилатационной кардиомиопатии — 75% [6, 9]. В основном, это вирусы Коксаки серотипов А 9, 13, 18, В 3 и 4. Эв были выявлены и у 77% больных ревматизмом (Р). При серологическом исследовании у этих больных обнаруживались высокие титры антител к Эв Коксаки А 3, 6, 13, 17, 18; В 1-6 и ЕСНО 8, 15, 16. Тем не менее, на сегодняшний день нет однозначного толкования присутствия Эв при Р. Не исключается их альтернативная стрептококку роль в этиологии заболевания. Высказывается предположение о том, что, по аналогии с дилатационной кардиомиопатией, Эв способствуют хронизации Р с формированием порока, облегчая прогрессию острого процесса в затяжной. В то же время, Р может повы-

шать восприимчивость организма к данным вирусам. В связи с этим, изучение роли энтеровирусной инфекции в патогенезе современного Р представляется актуальным.

Цель исследования — определение роли энтеровирусной инфекции при ревматизме.

Материалы и методы

Использован материал от 1086 прооперированных больных с пороками сердца. Группа контроля — 35 умерших без патологии сердца. Парафиновые срезы митрального и аортального клапанов окрашивали гематоксилином и эозином, толуидиновым синим, по ван-Гизону, азотнокислым серебром. С помощью последней окраски выявляли ядрышковые организаторы с подсчетом среднего количества гранул серебра на одно ядро фибробласта (Ф) и эндотелиоцита (Э) в группах вялотекущего активного Р, инфекционного эндокардита (ИЭ), мезенхимальной дисплазии (МД) и контроля (соответственно, 17, 15, 16, 15 случаев). В этих же случаях проводилось иммуногистохимическое исследование (ИГХИ) клапанов с использованием моноклональных мышиных антител фирмы ДАКО к Ki-67-, bcl-2-антигенам, к виментину, десмину и SMA (гладкомышечному актину). ИГХИ с использованием моноклональных антител к Эв (ДАКО) и полимеразная цепная реакция (ПЦР) на выявление РНК Эв в митральном клапане проводились в группах активного и неактивного Р, МД и контроля (соответственно, 14, 7, 10 и 10 случаев). Протокол ИГХИ включал инкубацию с первичными антителами в течение 18 часов при температуре 6°C. Антитела к Эв разводились в 1%-м растворе бычьего сывороточного альбумина 1:100.

В 250 случаях исследовались мазки-отпечатки клапанов, окрашенные по Паппенгейму. Активность Р констатировали при одновременном наличии признаков дезорганизации соединительной ткани, кле-

Таблица 1

Средние значения индексов пролиферации (по Ki-67), апоптоза (по Bcl-2) и ядрышковых организаторов (ЯО) в ядре фибробластов и эндотелиоцитов при разных заболеваниях клапанов сердца

Показатели	Ревматизм (митральный и аортальный клапаны; n-17)	Инфекционный эндокардит (митральный и аортальный клапаны; n-15)	Мезенхимальная дисплазия (митральный и аортальный клапаны; n-16)	Неизмененные клапаны (митральный и аортальный; n-15)
Ср. кол-во ЯО в эндотелиоцитах	2,0±0,4	5,2±2,6	3,3±1,8	2,1±0,5
Индекс пролиферации эндотелиоцитов	3,0±1,8%	22,0±15,7%	1,6±1,4%	0,6±0,4%
Индекс апоптоза эндотелиоцитов	14,2±7,5%	12,2±5,9%	1,6±1,4%	0,5±0,5%
Ср. кол-во ЯО в фибробластах	3,0±0,8	6,3±1,9	2,9±0,8	2,2±1,0
Индекс пролиферации фибробластов	3,1±3,3%	15,3±11,9%	1,5±1,5%	0,8±0,6%
Индекс апоптоза фибробластов	3,7±2,7%	1,9±0,8%	0,9±0,7%	0,8±0,7

точной инфильтрации, набухания и пролиферации Э. Каждый признак оценивался в крестах (+) со следующей формулировкой степени активности процесса: $\pm$ — вялотекущий процесс, $++$ — умеренной степени активности, $+++$ — высокой. Фаза активности Р оценивалась по критериям Т. И. Сучковой [3].

Результаты исследования

В операционном материале Р был выявлен у 622 больных, т.е. в 57% случаев (средний возраст больных — 47 лет, 40% мужчин и 60% женщин). В среднем диагноз Р (по историям болезни) устанавливали в 18 лет. Первые атаки Р у разных пациентов отмечались в возрасте от 3 до 51 лет. У 16% больных Р диагностировали после 25 лет. ИЭ осложнял течение Р всего у 8% больных, тогда как на фоне МД он развивался у 22% больных, т.е. почти в 3 раза чаще.

Преобладали комбинированный порок митрального клапана (у 35% больных) и сложный порок митрального и аортального клапанов (у 33%). Макроскопический вид МК был традиционным: в виде пиджачной петли или рыбьей пасти со сросшимися по комиссурам, деформированными, утолщенными створками, которые в 85% случаев были кальцинированы, а хордальные нити всегда были утолщены и укорочены. Отверстие аортального клапана было треугольным за счет сращения по комиссурам только на ранних этапах. По мере прогрессирования процесса растущие конгломераты кальция изменяли форму створок и отверстия. Преобладал фибропластический эндокардит. Возвратно-бородавчатый вальвулит отмечали лишь у 24% больных активным Р.

При гистологическом исследовании преобладали пролиферативные формы проявления процесса. У 18% больных в одном клапане был активный Р, в другом — неактивный, еще у 14% изменения в клапанах различались по степени и фазе процесса. Эти наблюдения, на наш взгляд, характеризуют Р, как «блуждающий», непрерывно-прогрессирующий процесс и объясняют высокую частоту расхождений (33%) по активности при клинико-морфологических сопос-

тавлениях. Первая фаза активности процесса встречалась наиболее часто и наблюдалась у 41% больных, II фаза — у 23%, а III — у 37%. Вялотекущий процесс преобладал над Р умеренной и высокой активности. Он встречался у 52% больных.

Продуктивная реакция при Р в подавляющем большинстве случаев была представлена лимфо-гисто-плазмоцитарными инфильтратами. Гранулемы Ашоффа-Талалаева в клапанах встречались лишь у 5% больных с активной фазой процесса. Инфильтративно-продуктивный васкулит был обнаружен в клапанах только у 41% больных с активным Р. Капиллярит обнаруживали чаще — у 50% больных. Начальные проявления Р в виде дезорганизации соединительной ткани, а затем васкуляризации и капиллярита наблюдались в *pars spongiosa* без нарушения целостности Э.

При детальном исследовании эндотелия было выявлено одновременное наличие набухания, пролиферации, дистрофических изменений, некроза и апоптоза со следующим средним соотношением процессов: апоптоз : некроз : пролиферация = 1 : 2,6 : 3,4. Для более объективной оценки набухания и пролиферации Э выстилки клапана использовались мазки-отпечатки, исследование которых позволило выявить, что данные признаки в Э выстилки клапана сопутствуют таковым в Э сосудов лишь в 63% случаев с активным процессом. Причем в половине из них пролиферация Э сопровождается набуханием и цитоллизом клеток, а в 23% случаев были обнаружены только цитоллиз и дистрофические изменения. Серебрение ядрышковых организаторов в Э выстилки при активном вялотекущем Р показало, что среднее количество гранул серебра в ядре этой клетки статистически достоверно не отличается от такового в группе неизмененных клапанов и достоверно ниже, чем при ИЭ и МД (табл. 1).

Таким образом, несколькими методами была продемонстрирована невысокая пролиферативная активность Э при Р (ниже, чем при МД и ИЭ) на фоне его явной дисфункции с явлениями дистрофии, некроза и апоптоза. Этот факт подтвердили и результаты

Таблица 2

**Результаты иммуногистохимического исследования на наличие антигенов энтеровирусов
в нормальном митральном клапане, при ревматизме и мезенхимальной дисплазии**

Заболевание	Кол-во случаев с наличием энтеровирусов ++++	Кол-во случаев с наличием энтеровирусов +	Кол-во случаев с отсутствием энтеровирусов	Общее кол-во случаев
Ревматизм а/ф	12	2	0	14
Ревматизм н/ф	3	1	3	7
Мезенхимальная дисплазия	4	2	4	10
Нормальные клапаны	0	5	5	10

ИГХИ. В частности, при вялотекущем Р количество Э, находящихся в состоянии апоптоза, в среднем было в 4,7 раз больше, чем пролиферирующих клеток (табл. 1). При ИЭ, наоборот, апоптоз наблюдался в 1,8 раза реже, чем пролиферация Э, а среднее число пролиферирующих клеток в 7,3 раза превышало таковое при Р. При МД среднее число Э в апоптозе соответствовало числу пролиферирующих. В целом, описанные нами изменения Э при Р можно сформулировать как эндотелиоз.

По функциональной же активности Ф группа Р достоверно отличалась от групп неизмененных клапанов и ИЭ и была сравнима с группой МД. Средний процент пролиферирующих Ф при вялотекущем Р соответствовал проценту этих клеток, находящихся в апоптозе.

ИГХИ на наличие Эв в митральном клапане выявило положительное окрашивание моноклональными антителами к вирусам цитоплазмы Э выстилки клапана и сосудов, Ф и гладкомышечных клеток вновь образованных сосудов (рис. 1) в 18 из 21 случая Р (80%), тогда как в группе контроля вирусы были выявлены только в Ф 5 из 10 клапанов (в 50%), а в группе сравнения (МД) – в Ф, Э и недифференцируемых (полиморфных, в том числе, звездчатых) клетках – 4 из 10 случаев (40%). В группе активного Р Эв обнаруживались на всем протяжении (++++) в перечисленных клетках у 12 из 14 больных (табл. 2). У 2 оставшихся больных из этой группы антигены к вирусам обнаруживались в единичных Э и Ф (+). Судя по результатам окрашивания антителами к виментину, десмину и SMA (в среднем, соответственно, $46,3 \pm 25,2\%$, $0,85 \pm 0,5\%$, $24,6 \pm 11,1\%$), не менее 46% клеток фибробластического ряда были представлены миофибробластами.

Таким образом, ИГХИ выявило наличие антигенов Эв в Э, Ф, миофибробластах, гладкомышечных клетках во всех случаях активного Р. Следует отметить, что наибольшее количество положительно окрашенных гладкомышечных клеток и Э выявлялось во вновь образованных сосудах клапана. В группе неактивного Р вирусы манифестировались на всем протяжении (++++) только в 3-х из 7 случаев. Еще в одном случае положительно окрашивались единичные Ф (+). В остальных трех Эв не были обнаружены. Таким образом, иммуногистохимически Эв при неактивном Р выявлялись в 57% случаев, тогда как при активном – в 100%. От группы контроля и срав-

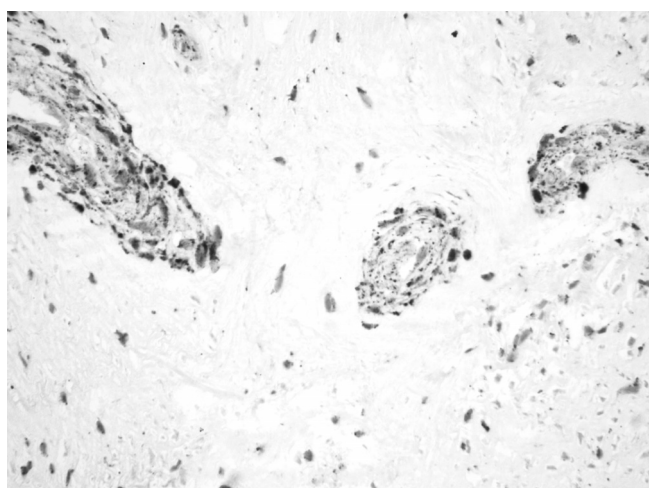


Рис. 1. Энтеровирусы в цитоплазме гладкомышечных клеток и эндотелиоцитах сосудов, фибробластов митрального клапана при активном ревматизме: коричневые включения в цитоплазме клеток. х 400. Окр. моноклональными мышиными антителами к энтеровирусам (DAKO) с подкрашиванием гематоксилином.

Таблица 3

Сравнительная характеристика клапанов на наличие в них энтеровирусов при иммуногистохимическом исследовании (ИГХИ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) у больных с ревматизмом и мезенхимальной дисплазией

Заболевание	Количество случаев с наличием РНК энтеровирусов при ПЦР-методе	Количество случаев с наличием антигенов энтеровирусов при ИГХИ	Общее количество случаев
Ревматизма а/ф	5	14	14
Ревматизм н/ф	0	4	7
Мезенхимальная дисплазия	2	4	10

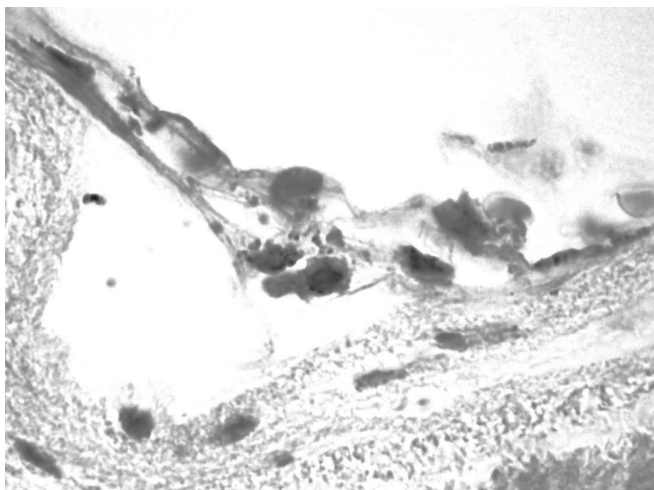


Рис. 2. Энтеровирусы в эндотелиоцитах выстилки митрального клапана при активном ревматизме: коричневые включения в цитоплазме эндотелиоцитов. Альтерация эндотелиоцитов. $\times 1000$. Окр. моноклональными мышиными антителами к энтеровирусам (DAKO) с подкрашиванием гематоксилином.

нения (МД) случаи Р отличались явными дистрофическими и некротическими изменениями, а также апоптозом эндотелия, клетки которого содержали Эв (рис. 2).

Сосуды с интенсивным окрашиванием цитоплазмы практически всех клеток их стенки на Эв также наблюдались только при Р. При сравнении полученных данных с результатами исследования этих же клапанов методом ПЦР (табл. 3) было выявлено, что с помощью последней вирусы обнаруживались в 4,4 раза реже суммарно и в 3,6 раза реже при Р (23% положительных результатов при Р и 20% — при МД). Расхождение результатов, полученных 2 методами, можно объяснить возможностью мутации как самого вириона, так и генов мишени в процессе инфекции [4]. Как причину, нельзя отвергнуть и недостаточный объем материала (2х3 мм). При Р это может быть связано с тем, что в целях исключения кальциноза для ПЦР забирались наименее измененные участки створок.

Обсуждение результатов

Результаты исследования показали, что современный Р чаще всего представляет собой вялотекущий, непрерывно прогрессирующий процесс, сопровождающийся явным снижением защитных сил организма, судя по отсутствию гранул при одновременном наличии других признаков активности. Кроме того, многие авторы отмечают увеличение частоты затяжных, вялотекущих форм заболевания, рефрактерных к обычной антиревматической терапии. Растет количество больных с тяжелым течением послеоперационного периода после протезирования клапанов, характеризующихся вялотекущими, плохо поддающи-

мися антибактериальной терапии осложнениями в виде нагноения операционной раны, медиастенитов, остеомиелитов и прочих заболеваний. Таким образом, складывается представление о снижении иммунитета у больных Р, которое сопровождается подавлением нормальной функции эндотелия с эндотелиозом, что особенно четко выявляется при сравнении с его состоянием в группе контроля, при МД и ИЭ. Явная несостоятельность эндотелия при Р и побудила нас искать дополнительный, повреждающий его фактор. Обнаружение Эв в цитоплазме Э и других клеток клапана, на наш взгляд, объясняет его дисфункцию, сопровождающуюся дистрофией, некрозом и апоптозом. Последний, как известно, является частым спутником вирусной инфекции, в том числе, и Эв [8]. Энтеровирусная инфекция доказана в сердце различными методами: серологически, методами иммунофлюоресценции, гибридизации *in situ*, ПЦР и ИГХИ. Но именно последний метод способен диагностировать репликацию Эв в клетке, так как моноклональные антитела к ним (DAKO) рассчитаны на прикрепление к структурному белку VP1 — индикатору транскрипции и трансляции вирусной РНК [9]. С одной стороны, несомненно присутствие Эв в клетках клапанов при Р. С другой стороны, в отличие от Y. Li et al [10], которые не нашли Эв в миксоматозно измененных клапанах, мы обнаружили их репликацию не только при МД, но и в неизмененных клапанах. Последнее подтверждает результаты исследований других авторов [1, 2], которые обнаружили инфицированность вирусами 11-33% больных ИБС и 64% здоровых лиц, умерших насильственной смертью. Тем не менее, по нашим данным, наличие Эв в цитоплазме Ф клапанов контрольной группы и при МД не сопровождается воспалительной реакцией, как при Р. В этих группах апоптоз Э не преобладает над его пролиферацией, и Эв в Э миксоматозно измененных клапанов не вызывают некроза и некомпенсированного апоптоза. Кроме того, при активном Р Эв выявляются в 100% случаев, тогда как при МД — в 40%, а в неизмененных клапанах — в 50% случаев. Все вышесказанное убеждает нас в мысли о том, что Эв играют несомненную роль в прогрессии Р. Конечно, они не могут конкурировать со стрептококком в отношении этиологии Р, как полагают некоторые авторы [10]. Наиболее вероятно, что вирусы реактивируются или инфицируют клапан уже на фоне текущего Р, который повышает их вирулентность. На наш взгляд, несомненна роль Эв в аутоиммунном механизме процесса, так как доказана перекрестная реакция между вирусами, М-протеином стрептококка и миозином кардиомиоцитов [5]. При этом известно, что Р относят к аутоиммунным заболеваниям с гуморальным и клеточным ответом, вызванным повышенной реактивностью к стрептококковым антигенам, которые

вызывают синтез антител, перекрестно реагирующих с антигенами: основного вещества соединительной ткани, Ф и Э клапана, сарколеммой миокарда и гладких мышц, миозином кардиомиоцитов. Активация Э клапанов, в свою очередь, вызывает экспрессию молекул адгезии сосудистых клеток-1, что приводит к экстравазации лимфоцитов через Э в субэндотелиальный слой и к запуску реакции воспаления [7]. Таким образом, по мнению S. Roberts et al [12], эндотелий имеет важную, инициирующую роль в патогенезе Р, в то время как описанные нами изменения этой структуры можно сформулировать как эндотелиоз и дисфункцию, обусловленную репликацией Эв. Руководствуясь данным взглядом на патогенез Р, в нашей клинике разрабатывается тактика ведения больных с

непрерывно рецидивирующим течением Р как в до-, так и в послеоперационном периоде.

Выводы

1. Результаты гистологического, цитологического, иммуногистохимического исследования показали явную дисфункцию Э выстилки клапана и эндотелиоз при Р, которые, очевидно, способствует неуклонному прогрессированию процесса.

2. Подавление функции Э вызвано энтеровирусной инфекцией, которая приводит к его дистрофии, некрозу и апоптозу.

3. Во всех случаях активной фазы Р наблюдается репликация Эв в Э, Ф, миофибробластах и ГМК вновь образованных сосудов клапанов сердца.

Литература

1. Бочаров Е.Ф., Ермак Б.А., Фомин В.В. и др. Энтеровирусная инфекция: новые аспекты. — Новосибирск: Наука, 1990. — 224 с.
2. Когут Е.П., Лозовская Л.С., Жердева А.Н. Персистенция вируса Коксаки А13 в семьях больных ревматизмом детей//Вопросы вирусологии. — 1981. - №4. — С.446-457.
3. Струков А.И., Бегларян А.Г. Патологическая анатомия и патогенез коллагеновых болезней. — М.: Гос. изд. мед. лит., 1963. — 322 с.
4. Coyle P.V., Jain S., Wyatt D. et al. Description of a nonlethal herpes simplex virus type 1 glycoprotein D deletion mutant affecting a site frequently used for PCR//Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2000. — Vol.7. — P.322-324.
5. Cunningham M. W. T-cell mimicry in inflammatory heart disease//Molecular Immunology. — 2004. — Vol.40. — P.1121-1127.
6. Fujioka Sh., Kitaoura Y., Deguchi H. et al. Evidence of viral infection in the myocardium of american and japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy//Am. J. Cardiol. — 2004. — Vol.94. — P.602-605.
7. Galvin J.E., Hemric M.E., Ward K., Cunningham M.W. Cytotoxic monoclonal antibody from rheumatic carditis with human endothelium: implications in rheumatic heart disease//J. Clin. Invest. — 2000. — Vol. 106. — P.217-224.
8. Kingel K., Rieger P., Mall G. et al. Visualization of enteroviral replication in myocardial tissue by ultrastructural in situ hybridization: identification of target cells and cytopathic effects//Lab. Invest.. — 1998. — Vol.78. — P. 1227-1237.
9. Li Y., Bourlet Th., Andreoletti L. et al. Enteroviral capsid protein VP1 is present in myocardial tissues from some patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy//Circulation. — 2000. — Vol. 101. — P. 231-234.
10. Li Y., Pan Z., Ji Y. et al. Enterovirus replication in valvular tissue from patients with chronic rheumatic heart disease//Eur.Heart J. — 2002. — Vol. 23. — P. 567-573.
11. Melnick J. F. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses//Virology. 3rd. - New York: Raven Press, 1996. — P. 656-712.
12. Roberts W.C., Kozanke S., Dunn S.T. et al. Pathogenic mechanisms in rheumatic carditis: focus on valvular endothelium//J. Infect. Dis. — 2001. — Vol.183. — P. 507-

Abstract

In material from 1086 patients who underwent heart valve disease surgery, traditional hystologic assessment, argyrophilic nucleolar organizer analysis, with calculation of mean Ag granule number per endotheliocyte and fibroblast nucleus; immuno-hystochemical assay with monoclonal antibodies to Enteroviruses, vimentin, desmin, SMA, SMA, Ki-67-, bcl-2-antigens; print-smear cytology; and valve PCR were performed. Enterovirus replication was observed in endotheliocytes, fibroblasts, and smooth muscle cells in all cases of active rheumatism. Endothelial dysfunction was associated with Enterovirus infection.

Keywords: Rheumatism, enteroviruses, heart valves.

Поступила 5/03-2005