

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАЛОСИМПТОМНОГО НЕРЕВМАТИЧЕСКОГО МИОКАРДИТА

Дерюгин М.В. *, Косицкая Л.С., Кузнецова С.А.,
Житнухин Ю.Л., Сухов В.Ю. **, Фрейдлин И.С.,
Бойцов С.А. *

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

* Военно-медицинская Академия, Санкт-Петербург

** Центральный НИИ рентгенологии и радиологии МЗ РФ, Санкт-Петербург

Резюме. Целью данного исследования было сопоставление результатов обследования больных с клиническим диагнозом неревматического миокардита (НМ) методом сцинтиграфии с предварительной меткой аутолейкоцитов больного с результатами иммунологического обследования тех же больных. Полученные данные позволяют заключить, что в патогенезе этого заболевания можно выделить следующие стадии. Начальная стадия характеризуется диффузным процессом воспаления в миокарде с поступлением в кровоток кардиальных антигенов. Следующая стадия патогенеза проявляется накоплением в циркуляции специфических антител и сенсibilизированных к кардиальному антигену лимфоцитов. Этой стадии соответствует очаговый характер воспалительного процесса в миокарде. Повышенная спонтанная продукция IL-8 в культурах цельной крови больных НМ может свидетельствовать о существенной роли этого хемокина в патогенезе заболевания.

Ключевые слова: неревматический миокардит, циркулирующие иммунные комплексы, аутоантигены, аутоантитела, TNF, IL-8, сцинтиграфия миокарда.

Derugin M.V., Kositskaya L.S., Kuznetsova S.A., Zhytnukhin Yu.L., Suchov V.Yu., Freidin I.S., Boyzov S.A.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF A MILD FORM OF NON-RHEUMATIC CARDITIS

Abstract. The aim of the present study was to compare the results of 2 methods of examination of patients with non-rheumatic myocarditis: scintigraphy with labeled autoleukocytes and immunological investigation. On the basis of the obtained results we assume that there are 2 stages in the disease pathogenesis. During the initial stage the diffuse inflammatory process develops in the myocardium and cardiac antigens enters the blood. During the second stage of pathogenesis specific antibodies and sensibilized to cardiac antigen lymphocytes are accumulated in blood. This stage is characterized by local inflammatory process in the myocardium. The enhanced spontaneous IL-8 production in blood cultures of these patients evidences the important role of this chemokine in the disease pathogenesis. (*Med. Immunol.*, 2001, vol.3, N1, pp 99-103)

До сих пор остается достаточно актуальной проблемой диагностика и дифференциальная диагностика первичных неревматических миокардитов (НМ), которые по клинической картине сходны с другими формами некоронарной сердечной патологии. НМ представляют собой поражения сердечной мышцы преимущественно воспалительного характера. Причи-

ны воспаления в литературе описаны самые разные, начиная с инфекционных агентов и заканчивая воздействием химических и физических факторов. При этом, как правило, описываются или предполагаются иммунные механизмы воспалительной реакции [7, 9].

Клиническая диагностика НМ основывается на косвенных клинико-инструментальных критериях поражения миокарда, однако описанные клинические синдромы не являются строго специфичными для НМ. Методом прямой диагностики НМ могла бы быть биопсия миокарда, которая позволяет морфологически подтвердить наличие воспалительной реакции в мышце сердца [12, 13, 14]. Однако и эн-

Адрес для переписки:

Фрейдлин Ирина Соломоновна, д.м.н., профессор,
чл. -корр. РАМН, руководитель отдела НИИМ
РАМН. Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, д.12,
Тел.: (812) 234-29-29.

домиокардиальная биопсия подтверждает клинический диагноз миокардита только в 17 – 37% случаев [12,13,15,16].

В связи с этим актуальной задачей остается разработка методов диагностики НМ, позволяющих оценить степень выраженности воспалительного процесса в миокарде и динамику течения процесса.

В последние годы привлек внимание метод сцинтиграфии миокарда с предварительной меткой аутолейкоцитов крови больного ^{99}Tc – гексометилпропиленаминооксимом (ГМПАО). Метод основан на способности лейкоцитов избирательно мигрировать в очаги воспаления и инфекции. Ранее была показана достаточно высокая чувствительность и специфичность этого метода при диагностике разных воспалительных процессов в сердце [12, 17, 19, 21]. Однако при диагностике НМ этот метод до сих пор использовался лишь в единичных случаях [18,19].

В литературе описаны также единичные попытки использования при диагностике НМ иммунологических методов: выявления специфической сенсибилизации лимфоцитов к кардиальным антигенам, определения циркулирующих иммунных комплексов, определения фенотипических характеристик циркулирующих лимфоцитов [13, 14, 15, 18, 19, 20]. Однако ни для одного из использованных иммунологических тестов не показана диагностическая значимость при НМ.

В связи с этим целью настоящего клинико-иммунологического исследования было сопоставление результатов обследования больных с клиническим диагнозом НМ методом сцинтиграфии с предварительной меткой аутолейкоцитов больного ^{99}Tc – ГМПАО с результатами иммунологического обследования тех же больных.

Материалы и методы

Было обследовано 27 пациентов с клиническими признаками малосимптомного НМ и 4 пациента без клинических признаков НМ, проходивших обследование с целью выявления в организме очагов хронической инфекции, составивших контрольную группу. Иммунологическое обследование было проведено всем пациентам ($n=31$), а продукция цитокинов изучена только у 15 больных с клиническими признаками малосимптомного НМ.

Всем обследуемым была проведена сцинтиграфия тела с предварительной меткой аутолейкоцитов. Для этого из цельной крови больного выделяли лейкоцитарную взвесь с помощью лейкоцитофеза в количестве 20 мл при содержании 37-45 тыс. лейкоцитов в 1 мкл взвеси. Перед возвращением лейкоцитов в кровяное русло лейкоцитарную взвесь инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в присутствии ^{99}Tc – ГМПАО (500 МБк). Сцинтиграфию проводили дважды: через 1 и 24 часа пос-

ле возвращения меченых лейкоцитов в кровяное русло. Распределение лейкоцитов в организме оценивали с помощью однофотонного эмиссионного компьютерного томографа “Elcint-Apex-SP-6” (Израиль). На полученных изображениях отмечали места повышенного накопления радиофармпрепарата (РФП).

Для проведения иммунологических исследований получали кардиальный антиген (КАГ) по методу Витебского [22] из тканей сердца лиц нулевой группы крови, погибших от случайной травмы. Стандартную антикардиальную антисыворотку получали путем гипериммунизации кроликов приготовленным кардиальным антигеном. Полученную сыворотку истощали путем инкубации с сывороткой доноров для удаления антител к антигенам сыворотки. Для выявления в сыворотках больных антител к КАГ использовали реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА) с эритроцитами барана, нагруженными КАГ с помощью хлористого хрома [4]. Исследуемые сыворотки предварительно истощали эритроцитами барана. Положительными считали результаты выявления аутоантител в титрах 1:8 и выше. Для выявления в сыворотках больных КАГ использовали реакцию торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА), результаты которой оценивали как положительные при снижении в два и более раз гемагглютинирующего титра стандартной антикардиальной антисыворотки после ее инкубации с исследуемой сывороткой больного. При этом исходили из ранее проведенной оценки чувствительности РТПГА: инкубация в присутствии 3 мкг/мл КАГ снижала титр антикардиальной антисыворотки в два раза. Положительными считали результаты выявления КАГ в количестве 3 мкг/мл и выше.

Количество циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) оценивали путем их осаждения полиэтиленгликолем (мол. масса 6000) в микромодификации [10] и выражали в условных единицах (у. е.). Положительными считали результаты выявления ЦИК при оптической плотности при длине волны 620 нм - $\text{ОП}_{620} \geq 0,070$. Количество ЦИК, содержащих КАГ, оценивали по увеличению количества КАГ в исследуемой сыворотке после ее обработки солянокислым цистеином [3, 8].

Специфическую сенсибилизацию лейкоцитов крови больного к КАГ определяли в реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) цельной крови в пятиканальных капиллярах, оценивая торможение миграции в процентах в присутствии КАГ по сравнению со спонтанной миграцией. Положительными считали результаты при индексе торможения миграции $\geq 25\%$ [1].

Продукцию цитокинов: $\text{TNF}\alpha$, IL-8 определяли в культурах цельной крови с помощью иммуноферментного метода (ИФА) со стандартными коммер-

ческими наборами ("Цитокин", С.-Петербург) и вырождали в пг/мл.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью параметрических и непараметрических методов.

Результаты и обсуждение

У всех пациентов контрольной группы были выявлены экстракардиальные очаги накопления РФП в носоглотке, но накопления РФП в миокарде у пациентов контрольной группы выявлено не было.

Больные с клиническим диагнозом НМ в зависимости от характера накопления меченых лейкоцитов в миокарде были разделены на три группы:

- первую группу составили больные с диффузным накоплением меченых лейкоцитов в миокарде (11 человек),
- вторую группу составили больные с очаговым накоплением меченых лейкоцитов в миокарде (10 человек),
- третью группу составили больные без отчетливого накопления лейкоцитов (6 человек).

Экстракардиальные очаги накопления РФП были выявлены у всех 100% больных первой группы, в 73% случаев во второй группе и в 40% случаев в третьей группе.

Между выделенными группами были обнаружены статистически достоверные различия ($p < 0,05$) по длительности заболевания, которая оказалась минимальной в первой группе (10 ± 5 мес.), во второй составила 18 ± 9 мес., а максимальной оказалась в третьей группе (32 ± 12 мес.).

На основании полученных данных было высказано предположение о том, что в первую группу попали больные с начальной стадией заболевания (минимальная продолжительность), имеющие экстракардиальные очаги хронической инфекции и диффузные воспалительные проявления в миокарде. На следующей стадии заболевания (вторая группа) при продолжительности более полутора лет экстракардиальные очаги инфекции выявляются не у всех больных (73%), а воспалительные изменения в миокарде приобретают очаговый характер. Больные с наибольшей длительностью заболевания (третья группа) отличаются значительно более редким выявлением экстракардиальных очагов инфекции (40%) и отсутствием накопления меченых лейкоцитов в миокарде, что может косвенно свидетельствовать о переходе воспаления в следующую стадию, когда на смену инфильтрации приходят явления фиброза.

Накопление меченых аутолейкоцитов в очагах инфекции и воспаления отражает их миграционную активность и активность хемотаксиса, которая зависит еще и от продукции молекул хемоаттрактантов. Роль хемоаттрактантов в очагах воспаления

могут играть микробные компоненты и продукты, продукты деструкции тканей (аутоантигены), компоненты активированного комплемента (C5a), в активации которого большая роль принадлежит иммунным комплексам. Роль хемоаттрактантов могут выполнять также продуцируемые активированными лейкоцитами цитокины (хемокин IL-8, TNF α) [11]. Исходя из этого мы провели сопоставление результатов скинтиграфии с результатами иммунологического обследования тех же больных.

Кардиальный антиген как свободный, так и связанный в составе ЦИК, достоверно чаще выявлялся в сыворотках больных первой группы (у 8 из 11 обследованных). Из 10 обследованных больных второй группы КАГ обнаружен лишь у троих, а в третьей группе – у одного из шести обследованных ($p < 0,05$) (табл.1).

Специфические антитела к КАГ удалось выявить у 7 больных из 10 обследованных второй группы, и только у двух из 11 обследованных больных первой группы и у двух из шести обследованных в третьей группе ($p < 0,05$) (табл.1).

По содержанию в сыворотках ЦИК не удалось выявить существенных различий между тремя группами. Из всей обследованной совокупности больных (27 пациентов) повышенный уровень ЦИК был выявлен лишь у троих, отнесенных к трем разным группам. У пяти из 27 обследованных были выявлены ЦИК, содержащие КАГ (табл.1).

Полученные результаты согласуются с характеристиками больных по длительности заболевания. У больных с минимальной продолжительностью заболевания (первая группа) с наибольшей частотой в сыворотке крови обнаруживался циркулирующий КАГ, который может рассматриваться как аутоантиген. Диффузный характер накопления РФП в миокарде у этих больных может свидетельствовать о текущем воспалительном процессе с элементами деструкции ткани и поступлением в циркуляцию кардиальных аутоантигенов.

Последующий специфический иммунный ответ приводит к накоплению в циркуляции специфических антикардиальных антител (больные второй группы), которые связывают КАГ с формированием иммунных комплексов. Достоверное снижение частоты обнаружения циркулирующего КАГ у больных второй и третьей группы по сравнению с первой и отсутствие нарастания уровня ЦИК косвенно свидетельствует в пользу депозиции образовавшихся иммунных комплексов в органе-мишени.

Следует отметить, что у больных первой группы уровни циркулирующего КАГ прямо коррелировали с уровнями ЦИК ($r=0,65$, $p<0,05$), а у больных второй группы корреляция этих же показателей приобретает обратный характер ($r=-0,70$, $p<0,05$). Возможно, это связано с изменением характера накопления РФП с диффузного на очаговый, если

места накопления РФП совпадают с местами депозиции иммунных комплексов.

Полученные данные позволяют предположить, что у больных второй и третьей группы возрастает роль механизмов иммунного воспаления с участием иммунных комплексов и специфически сенсibilизированных лимфоцитов. Специфическая сенсibilизация лейкоцитов крови к КАГ значительно чаще выявлялась у больных второй группы (у 8 из 10 обследованных) по сравнению с первой (у 6 из 11 обследованных) и третьей (у 3 из 6 обследованных) группами.

У всех трех обследованных больных третьей группы был повышен уровень спонтанной продукции TNF α , а в первой и второй группах повышенный уровень спонтанной продукции TNF α был вы-

явлен лишь у половины обследованных (5 из 12). Только среди больных первой группы обнаружены три пациента с пониженной способностью клеток крови отвечать на индукцию синтеза TNF α (табл.1).

Примечательно, что у 14 из 15 обследованных больных НМ оказался достоверно повышенным уровень спонтанной продукции клетками крови IL-8, который является важнейшим хемокином – хемоаттрактантом гранулоцитов.

Ранее нами была показана способность иммунных комплексов, выделенных из плазмы больных иммунокомплексным заболеванием (ревматоидным артритом), индуцировать продукцию лейкоцитами крови провоспалительных цитокинов [2]. В связи с этим обращает на себя внимание выявленная у больных НМ первой группы прямая корреляция уров-

Табл.1. РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ С КЛИНИЧЕСКИМИ ПРИЗНАКАМИ МАЛОСИМПТОМНОГО НМ И ПАЦИЕНТОВ, СОСТАВИВШИХ КОНТРОЛЬНУЮ ГРУППУ

Группы	№ п/п	ЦИК	КАГ	Обратные титры Ат	Индекс РТМЛ	Продукция цитокинов, пг/мл			
						TNF- α		IL-8	
						Спонтанная	Индукцированная	Спонтанная	Индукцированная
I	1	0,015	3	0	3	15	142	4000	5700
	2	0,04	6	0	5	15	111	2960	4600
	3	0,05	3	0	25	47	580	3280	5000
	4	0,024	3	0	50	15	480	2100	2760
	5	0,08	0	0	43	60	240	7200	4300
	6	0,025	0	32	25	15	15	370	2340
	7	0,055	3	0	16				
	8	0,05	3	0	26				
	9	0,06	0	0	3				
	10	0,035	3	0	0				
	11	0,065	3	8	38				
II	1	0,035	0	0	30	15	244	5200	7800
	2	0,015	6	0	17	15	230	2760	3960
	3	0,03	0	16	27	63	285	4180	1720
	4	0,06	0	16	28	15	330	2400	3900
	5	0,06	0	16	29	65	790	3300	6500
	6	0,055	3	0	25				
	7	0,055	0	16	39	77	580	3040	4200
	8	0,055	0	16	58				
	9	0,065	3	8	48				
	10	0,07	0	16	11				
III	1	0,05	3	0	24	119	720	1960	3040
	2	0,115	0	0	7				
	3	0,02	0	8	55	52	465	3560	2800
	4	0,05	0	0	30	29	380	2560	2880
	5	0,055	0	0	47				
	6	0,035	0	160	16				
Контрольная	1	0,025	0	0	3				
	2	0	0	0	24				
	3	0,035	0	0	8				
	4	0,035	0	0	8				

- I группу составили больные с диффузным накоплением меченых лейкоцитов в миокарде; II группу составили больные с очаговым накоплением меченых лейкоцитов в миокарде; III группу составили больные без отчетливого накопления лейкоцитов.

ней ЦИК и уровней спонтанной продукции TNF α ($r=-0,91$, $p<0,001$) и IL-8 ($r=0,74$, $p<0,01$).

Сопоставление полученных при обследовании больных НМ результатов сцинтиграфии с предварительной меткой аутолейкоцитов и результатов иммунологического обследования позволяет заключить, что в патогенезе этого заболевания действительно можно различать несколько стадий воспалительного процесса. При этом начальная стадия миокардита, протекающая на фоне экстракардиальных очагов инфекции в организме, характеризуется диффузным процессом воспаления в миокарде с высвобождением и поступлением в кровотоки кардиальных антигенов. Следующая стадия патогенеза связана со специфическим иммунным ответом на кардиальные антигены, который проявляется накоплением в циркуляции специфических антител и сенсибилизированных к кардиальному антигену лимфоцитов. Этой стадии патогенеза НМ соответствует очаговый характер воспалительного процесса в миокарде. Повышенная спонтанная продукция IL-8 в культурах цельной крови больных НМ может свидетельствовать о существенной роли этого хемокина в патогенезе заболевания.

Список литературы

1. Артемова А.Г. Феномен торможения миграции лейкоцитов крови морских свинок с гиперчувствительностью замедленного типа. // Бюлл. Эксперим. биол. и медицины. - 1973. - №10. - С.69-71.
2. Кузнецова С.А., Косицкая Л.С., Тихомиров И.И., Дорофейков В.В., Полосухина Е.Р., Барышников А.Ю., Фрейдлин И.С. Влияние иммунных комплексов, выделенных из плазмы больных ревматоидным артритом, на секрецию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов клетками крови здоровых доноров. // Иммунология. - 2000. - №4. - С.48-52.
3. Лаврова Т.Р., Косицкая Л.С., Попова О.Я., Родштейн О.А. Иммунные комплексы с антигенами тканей легких при хронических неспецифических заболеваниях легких. // Терапевтический архив. - 1980. - т.52, №3. - С.32-36.
4. Лефковитц И., Перлис Б. (ред.) Методы исследования в иммунологии. - М.: Мир. - 1981. - С.275-279.
5. Максимов В.А. Миокардиты. Л.: Медицина. - 1979. - 241 с.
6. Новиков Ю.И. О диагностике и дифференциальной диагностике ревматических миокардитов. // Ревматология. - 1984. - №4. - С.56-65.
7. Палеев Н.Р. Миокардиты. В кн. Болезни сердца и сосудов. Под ред. Е.И. Чазова. - М.: Медицина, 1992. - С.178-198.
8. Попова О.Я., Косицкая Л.С. Выявление антигена в субстратах, содержащих иммунные комплексы антиген-антитело. // Журнал микробиол., эпидемиол., иммунол. - 1977. - №8. - С.73-75.
9. Сумароков А.В., Моисеев В.С. Миокардит. В кн. Клиническая кардиология. М. Универсум Паблишинг, - 1995. - С.95-99.
10. Тотолян А.А., Горбачев А.Г., Бобков Ю.А., Смирнов А.Ю., Алешина Л.А. Клиническая лабораторная диагностика: состояние и перспективы. СПб. - 1996. - С.135-136.
11. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. СПб.: Наука, - 2000. - 231 с.
12. Фадеев Н.П., Сухов В.Ю., Шевченко Ю.Л. Способ топической диагностики воспалительных заболеваний сердца. Описание изобретения к патенту РФ М. - 1999. - Бюл. №25 RU2136218C1.
13. Burke A.P., Farb A., Robinowitz M., Virmani R. Serial sectioning and multiple level examination of endomyocardial biopsies for the diagnosis of myocarditis // Mod. Pathol. - 1991/ - Vol.4, №6. - P.690-693.
14. Fenoglio J.J., Ursell P.C., Kellog C.F. Endomyocardial biopsy for diagnosis and classification of myocarditis. // Clin. Cardiol. - 1983. - Vol.6. - P.36-38.
15. Fowles R.E., Mason J.W. Endomyocardial biopsy // Ann.Int.Med. - 1982. - Vol.97. - P.885-894.
16. Jantunen E., Collan Y. Representativity of endomyocardial biopsies: a theoretical approach based on quantitative light microscopy // Cardiology. - 1989. - Vol.76. - P.1-9.
17. Morita H., Kitaura Y., Deguchi H. Coxackie B5 myopericarditis in a young adult: clinical course and endomyocardial biopsy findings // Jpn.Circul.J. - 1983. - Vol.47. - P.1077-1083.
18. Olsen E.G. The role of biopsy in the diagnosis of myocarditis. // Herz. - 1985 - Vol.10. - P.21.
19. Paakkinen S., Vorne M., Lantto T. Detection of inflammation with 99mTcHMPAO labeled leukocytes // Ann.Chir. Gynecol. - 1987. - Vol.76. - P.197-200.
20. Peters A.M., Dampure H.J., Osman S. Clinical experience with 99mTc-hexamethylpropylenamine-oxime for labelling leukocytes and imaging inflammation. // Lancet. - 1986. - Vol.2. - P.946-949.
21. Ramackers J.M., Kotzki P.O., Couret I. The use of technetium-99m hexamethylpropylenamine-oxime labelled granulocytes with single-photon emission tomography imaging in the detection and follow-up of recurrence of infective endocarditis complicating transvenous endocardial pacemaker // Eur.J. Nucl. Med. - 1995. - Vol.22 - P.1351-1354.
22. Witebsky E., Rose N., Shulman S. Studies on organ specificity 1/ The serological specificity of Thyroid extracts // J. Immunol. - 1955. - Vol.75. - 34. - P.181-269.

поступила в редакцию 05.01.2001
принята к печати 05.02.2001