

lek. Mateusz Kuffner

Obraz morfologiczny jednostki mięśniowo-naczyniowej w przebiegu wirusowej choroby serca wywołanej przez parwovirusa B19

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Małgorzata Frontczak-Baniewicz

Promotor pomocniczy: dr n. med. Magdalena Gewartowska



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Streszczenie

Wirusowe infekcje mięśnia sercowego mogą być przyczyną wielu poważnych stanów. Są to m. in. ostre zapalenie mięśnia sercowego oraz kardiomiopatia rozstrzeniowa, a więc choroby, które bardzo często doprowadzają do wystąpienia objawów niewydolności serca (NS). Ta z kolei jest bardzo istotnym problemem klinicznym i ekonomicznym, gdyż szacuje się, że cierpi na nią obecnie nawet 1,2 miliona Polaków. Niewydolność serca jest najczęstszą przyczyną hospitalizacji w naszym kraju, a jej leczenie kosztuje niemal 2 miliardy złotych rocznie. Rokowanie co do przeżycia chorych z zaawansowaną niewydolnością układu krążenia jest gorsze niż w większości chorób nowotworowych.

Wirusowe choroby serca rozwijają się w związku ze zmianami w komórkach mięśnia sercowego, zachodzącymi najczęściej w wyniku reakcji autoimmunologicznej wywołanej przez wirusy na drodze mimikry molekularnej. Jedynym narzędziem diagnostycznym umożliwiającym dokładną analizę tych zmian jest biopsja mięśnia sercowego (EMB). Metoda ta odgrywa istotną rolę w diagnostyce zapaleń mięśnia sercowego oraz pozapalnej kardiomiopatii rozstrzeniowej. Materiał uzyskany na drodze EMB powinien być poddany diagnostyce histologicznej, immunohistochemicznej i wirusologicznej. Bardzo cenna okazuje się także diagnostyka ultrastrukturalna przy wykorzystaniu transmisyjnej mikroskopii elektronowej, jednakże obecnie niewiele ośrodków może sobie na nią pozwolić ze względów organizacyjnych oraz finansowych.

Wśród wirusów wykazujących duże powinowactwo do mięśnia sercowego najczęściej wymienia się parwowirusa B19 (B19V), ludzkie herpeswirusy typu 6, wirusa Epsteina-Barr, cytomegalowirusa, wirusa Cocksackie typu B oraz inne enterowirusy i adenowirusy. Wirusem najczęściej wykrywanym w materiale biopsyjnym mięśnia sercowego pobranym od pacjentów z kardiomiopatią rozstrzeniową jest parwowirus B19. Od dawna jest on wiązany z indukcją procesu chorobowego, doprowadzającego do rozstrzeni lewej komory, jednakże znajomość patomechanizmu tego procesu pozostaje ograniczona. Materiał genetyczny B19V jest wykrywany w komórkach śródbłonna naczyniowego, nie ma go natomiast w kardiomiocytach, co sugeruje wpływ wirusa na indukcję niedokrwienia. Uważa się, że koinfekcja B19V z innym wirusem kardiotropowym może pogarszać przebieg zakażenia, prawdopodobnie poprzez reaktywację replikacji B19V. Dotychczas nie wyjaśniono, jakie zmiany zachodzą w budowie ultrastrukturalnej mięśnia sercowego w wyniku infekcji wirusowych i czy zmiany te różnią się w zależności od gatunku wirusa.

Pomimo trwających od wieków badań nad trójwymiarową architekturą serca, szczegóły organizacji kardiomiocytów w ścianie mięśnia sercowego nadal nie zostały w pełni poznane. Również przebieg zmian patologicznych zachodzących w miokardium na poziomie subkomórkowym nie został dotychczas dobrze wyjaśniony. Zgłębieniu tej wiedzy ma służyć wprowadzenie pojęcia jednostki mięśniowo-naczyniowej (CVU), które jest rozwinięciem myśli funkcjonalnego połączenia kardiomiocytów z komórkami śródbłonka naczyniowego. Jednostka ta określana jest jako podstawowy strukturalny i funkcjonalny element mięśnia sercowego, składający się z kardiomiocytów, fibroblastów oraz naczyń krwionośnych wraz z pericytem. Niniejsza praca powstała, aby określić zakres zmian ultrastrukturalnych w CVU w przebiegu wirusowej choroby serca wywołanej przez parwowirusa B19.

Podstawowym celem prowadzonych badań była analiza zmian ultrastrukturalnych poszczególnych elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej w przebiegu infekcji mięśnia sercowego parwowirusem B19.

Cele szczegółowe obejmowały:

- Opracowanie schematu zmian zachodzących w mięśniu sercowym w przebiegu infekcji parwowirusem B19.
- Określenie, czy istnieje korelacja zmian w morfologii jednostki mięśniowo-naczyniowej na poziomie ultrastrukturalnym w zależności od liczby kopii parwowirusa B19 w EMB, klinicznego stanu chorych, wyników badania echokardiograficznego oraz od wyników badań laboratoryjnych.

Badana populacja została podzielona na 2 grupy: chorzy, u których wykryto DNA B19V w materiale biopsyjnym oraz pacjenci, u których nie stwierdzono materiału genetycznego parwowirusa B19. Szczegółowej analizie poddano chorych z potwierdzoną obecnością B19V. Ta grupa została porównana z grupą kontrolną, którą stanowili pacjenci z rozstrzenią lewej komory i zachowaną frakcją wyrzutową, u których nie stwierdzono obecności materiału genetycznego wirusów. W kolejnej fazie badania sprawdzono, czy istnieje bezpośrednia korelacja pomiędzy frakcją wyrzutową lewej komory a liczbą kopii B19V w badanym materiale oraz dokonano opisu zmian ultrastrukturalnych, które zostały zaobserwowane w mikroskopii elektronowej, w zależności od kopijności parwowirusa B19, wybranych kryteriów klinicznych, wyników badań obrazowych i laboratoryjnych. W następnym etapie analizy, aby ustalić przebieg zmian morfologicznych w CVU

w przebiegu infekcji B19V, chorych z tej grupy podzielono na 4 podgrupy w zależności od frakcji wyrzutowej lewej komory oraz od liczby kopii wirusa w biopsji miokardium.

Wszyscy pacjenci mieli wykonywane badania nieinwazyjne, które wchodziły w zakres rutynowej diagnostyki niewydolności serca i zostali ocenieni wg klasyfikacji NYHA pod względem nasilenia objawów niewydolności układu krążenia. Wszyscy chorzy mieli także wykonaną angiografię tętnic wieńcowych. Diagnostyka pacjentów uwzględnionych w niniejszym badaniu obejmowała wykonanie biopsji mięśnia lewej komory. Materiał biopsyjny oceniany był wg kryteriów Dallas oraz wg immunohistochemicznych kryteriów WHO pod kątem obecności stanu zapalnego, a do identyfikacji materiału genetycznego wirusów w miokardium wykorzystano qPCR i RT-qPCR. Próbkę od każdego pacjenta oceniane były przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Analizę statystyczną zgromadzonych danych wykonano w środowisku programistycznym GNU R.

Wyniki:

- 1) W materiale biopsyjnym od pacjentów z kopijnością B19V na poziomie <500 w obrazie ultrastrukturalnym obserwowano m.in. destrukcję aparatu kurczliwego, morfologiczne cechy stresu oksydacyjnego i obrzęku siateczki śródplazmatycznej, liczne wgłobienia otoczki jądrowej. Najbardziej charakterystyczną cechą w tej grupie chorych była jednak znaczna degradacja grzebieni mitochondrialnych. Część mitochondriów układała się w konglomeraty, w obrębie których obserwowano morfologiczne cechy fuzji. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej obecne były bardzo liczne włókienka kolagenowe. Naczynia kapilarne charakteryzowały się bardzo wąskim światłem i hipertroficznym śródbłonkiem o cechach nekrozy. Formowały one struktury o charakterze pętli, których światło najczęściej było całkowicie zamknięte.
- 2) W grupie chorych z pośrednią kopijnością B19V obserwowano często przerwane miofibryle i cechy poszerzenia szorstkiej siateczki śródplazmatycznej. Mitochondria w kardiomiocytach były liczne, zdegenerowane, z częściowo uszkodzonymi grzebieniami. Niektóre z nich miały przerwany błonę zewnętrzną, a w ich pobliżu znajdowały się skupiska glikogenu otoczone pojedynczą błoną plazmatyczną. Obserwowano również mitochondria o morfologii ciał mielinopodobnych. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej licznie występowały naczynia o charakterze pętli, a także drobnowłókienny materiał i fibroblasty.

Komórki śródbłónka wykazywały często cechy hipertrofii i zawierały elektronowo gęste ziarnistości lub duże wakuole.

- 3) U pacjentów z poziomem kopijności B19V >5000 obserwowano zanik aparatu kurczliwego na znacznym obszarze komórki, a cytoplazmę wypełniały liczne skupiska ziaren glikogenu. Mitochondria w pobliżu takich skupisk charakteryzowały się jasną elektronowo macierzą, przerwana błoną zewnętrzną i mocno uszkodzonymi grzebieniami. Niektóre mitochondria były całkowicie pozbawione zewnętrznej błony. Charakterystyczne zmiany obserwowano również w jądrach kardiomiocytów. Poszerzona była przestrzeń pomiędzy błonami jądrowymi, często zawierała ona amorficzny materiał, a w otoczkach jądrowych występowały liczne wgłobienia. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej obecne były liczne fibroblasty, włókienka kolagenowe i elastynowe oraz włókienka o morfologii amyloidu i desminy. Naczynia kapilarne charakteryzowały się wysokim, hipertroficznym śródbłonkiem i bardzo wąskim światłem.
- 4) Patologiczne zmiany ultrastruktury elementów jednostki mięśniowo naczyniowej były bardziej nasilone u chorych z większym stopniem zaawansowania objawów niewydolności serca, a także u chorych z wyższym poziomem NT-proBNP i troponiny I. Końcoworozkurczowy wymiar lewej komory oraz jej frakcja wyrzutowa nie były bezpośrednio związane z patologiami w obrębie CVU.
- 5) Cechy podziału mitochondriów były znacznie bardziej nasilone w grupie chorych z prawidłową frakcją wyrzutową lewej komory i wysokim poziomem kopijności B19V w porównaniu z chorymi z niską frakcją i małą liczbą kopii B19V.
- 6) Wśród pacjentów z wysoką kopijnością parwowirusa większa część naczyń była zwężona przy niskiej LVEF w porównaniu do prawidłowej frakcji wyrzutowej.
- 7) Grupa z prawidłową frakcją wyrzutową lewej komory i wysokim poziomem kopijności B19V miała istotnie mniejszą szerokość lewego przedsionka od pozostałych grup. Ci sami chorzy mieli istotnie wyższe TAPSE od pacjentów z niską LVEF.
- 8) Pacjenci z niską LVEF i niską kopijnością B19V mieli bardziej nasiloną niedomykalność mitralną od pozostałych chorych. Zaburzenia kurczliwości mięśnia lewej komory także były bardziej nasilone w tej grupie w porównaniu do chorych z prawidłową LVEF.
- 9) Grupa G4 przedstawiała pierwszy etap wirusowej infekcji serca – intensywna replikacja wirusa z prawidłową LVEF. Następnie obserwowano rozstrzeń lewej

komory i upośledzenie jej funkcji skurczowej (grupa G3), a w dalszym etapie infekcji wirus kończył proces aktywnej replikacji (G1). Grupa G2 obrazowała postulowaną w literaturze populację chorych, w której parwovirus B19 jest jedynie pozostałością po infekcji przebytej w przeszłości, ale nie wywołuje on zmian patologicznych w miokardium.

- 10) Wirusowe DNA/RNA wykryto w 52,6% badanych bioptatów mięśnia sercowego. W 67,6% wykrytym wirusem był B19V, a w 14,1% próbek wykryto kwasy nukleinowe dwóch wirusów. Tylko w jednym wypadku B19V nie był jednym z wirusów koinfekujących.
- 11) Nie stwierdzono korelacji pomiędzy frakcją wyrzutową lewej komory a liczbą kopii parwovirusa B19 wykrytą w materiale biopsyjnym pobranym od poszczególnych pacjentów.

Wnioski:

- 1) Na poziomie mikroskopii świetlnej nie stwierdzono istotnych różnic w badanych grupach, natomiast bardzo ważnym jej uzupełnieniem okazało się badanie przy użyciu mikroskopii elektronowej.
- 2) Obraz zmian ultrastrukturalnych poszczególnych elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej u pacjentów z wirusową chorobą serca spowodowaną przez parwovirusa B19 różnił się w porównaniu do chorych z rozstrzenią lewej komory, u których nie stwierdzono obecności wirusowego materiału genetycznego. Patologie obserwowane były w aparacie kurczliwym, mitochondriach i jądrach komórkowych kardiomiocytów. Zmiany ultrastrukturalne dotyczyły również przestrzeni zewnątrzkomórkowej i naczyń włosowatych.
- 3) Patologiczne zmiany w morfologii elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej były związane z liczbą kopii parwovirusa B19 w EMB, z nasileniem objawów niewydolności serca wg skali NYHA, a także z poziomem NT-proBNP i troponiny I w surowicy krwi obwodowej, jednakże niemożliwe było stworzenie systematyki obserwowanych zmian.
- 4) Grupa chorych z kopijnością B19V <500 reprezentowała „zejściowy” obraz infekcji parwovirusem B19, ze znacznym stopniem destrukcji mięśnia sercowego i niepomyślnym rokowaniem. Znaczny stopień uszkodzenia kardiomiocytów był wtórny do patologii w obrębie naczyń kapilarnych, będących przyczyną niedokrwienia.