

ИММУНОПРОТЕОМИКА ИНФЕКЦИОННОГО ЭНДОКАРДИТА НАТИВНЫХ КЛАПАНОВ СЕРДЦА

Румбешт В.В.¹, Мационис А.Э.¹, Дюжиков А.А.¹,
Сарвилина И.В.²

¹ Центр кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии Государственного учреждения здравоохранения
«Ростовская областная клиническая больница», г. Ростов-на-Дону

² Отдел медико-биологических исследований Южного научного центра Российской академии наук,
г. Ростов-на-Дону

Резюме. Целью исследования явился анализ наиболее часто регистрируемых иммунных белков плазмы крови, отражающих молекулярные патологические пути развития инфекционного эндокардита нативных клапанов, в совокупности с анализом белков-маркеров основных возбудителей заболевания на основе современной технологической платформы для протеомных исследований. В исследование включено 99 пациентов с ИЭ нативных клапанов сердца. Все больные были обследованы согласно протоколу стационарного обследования, включавшему общеклинические, лабораторные и инструментальные методы исследования. Выделение и идентификация белков микроорганизмов в крови и интраоперационном материале, выявление белков, отражающих функционирование иммунной системы, выполнялись с помощью новых методов для клинической протеомики. Обнаружены специфические белки возбудителей инфекционного эндокардита, являющиеся иммуногенными детерминантами для организма человека и определяющими системный иммунный ответ.

Ключевые слова: инфекционный эндокардит, протеомика, масс-спектрометрия.

Rumbesht V.V., Matsionis A.E., Dyuzhikov A.A., Sarvilina I.V.

IMMUNOPROTEOMICS OF INFECTIOUS ENDOCARDITIS OF NATIVE HEARTVALVES

Abstract. The aim of present study was to analyze the most commonly detected blood plasma immune proteins, that reflect molecular pathways in development of infectious endocarditis of native valves, together with analysis of marker proteins of disease on the base of modern technological platform for clinical proteomics. Ninety-nine patients with infectious endocarditis of native heart valves were included into the study. All the patients were examined according to hospital assessment protocol, including clinical, laboratory and instrumental methods of evaluation. Separation and identification of proteins of microorganisms in blood and materials taken at surgery, detection of proteins related to functioning of immune system, were carried out using new methods of clinical proteomics. We have revealed same proteins, that are specific of pathogens causing infectious endocarditis, that thus representing immunogenic determinants and defining a systemic immune response in the patients. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 1, pp 27-34)

Введение

За последние 10 лет во всем мире отмечается увеличение распространенности и изменение возрастной картины инфекционного эндокардита (ИЭ) нативных клапанов сердца. В настоящее

время ИЭ нативных клапанов сердца встречается в 6,2 случаях на 100 000 человек в возрастном диапазоне от 47 до 69 лет [11]. Причинами динамики эпидемиологических показателей ИЭ являются увеличение числа случаев нозокомиальных эндокардитов, затяжное течение заболевания, применение длительного гемодиализа, стоматологические заболевания, высокая распространенность сахарного диабета.

Вышеперечисленные причины привели к существенным изменениям патоморфологической картины инфекционного эндокардита (ИЭ), что

Адрес для переписки:

Румбешт Виктория Викторовна
344006, г. Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41.
Тел.: 8 (863) 266-43-19.
Факс: 8 (863) 266-56-77.
E-mail: lis@mmbi.krinc.ru

сформировало объективные трудности его диагностики и потребовало разработки новых методов его раннего выявления и подтверждения. Природа клапанных поражений носит разнообразный характер, но нередко достоверную причину болезни, а также причины резистентности к проводимой антибактериальной терапии установить не удастся, что снижает эффективность лечебных и реабилитационных мероприятий.

Как известно, наиболее значимыми для диагностики макроскопическими признаками ИЭ являются полиповидные вегетации или язвенные дефекты в створках клапанов, а гистологическими — пролиферация и набухание эндотелия, некроз с клеточным детритом, нарушение целостности эндотелия, васкуляризация, грануляционная ткань, инфильтрация макрофагами, плазмócитами или нейтрофильными лейкоцитами [1].

Гистологическая картина вегетаций представлена тромбоцитами и фибриновыми тромбами, содержащими полиморфноядерные лейкоциты (ПМЯЛ) и меньшее количество других клеток белой крови. Позже тромб может гиалинизироваться, в этом случае ПМЯЛ становятся более многочисленными по краю вегетации и в окружающей клапан ткани. Также встречаются клетки хронического воспаления или гигантские клетки. Бактериальные колонии и гифы грибов могут быть обнаружены по краю или внутри вегетации, но не всегда видны при различных окрасках, например, в случае назначения антибактериальной терапии. При оценке можно также выявить различную степень процессов организации или кальцификации. Изменения, обнаруживаемые в прилежащей ткани, представляют собой существовавшие ранее повреждения, поражения, вызванные длительностью воздействия инфекции, вирулентностью инфекционного агента, и результирующие осложнения.

Важными являются результаты микробиологического исследования крови (положительные у 85-95% случаев) пациентов при подозрении на острый и подострый эндокардит. Однако все вышеперечисленные методы исследования обладают невысокой чувствительностью и специфичностью для понимания истинной причины развития заболевания и принятия врачом единственного правильного решения, касающегося ведения такого больного.

Возможность регистрации иммунного молекулярного патогенеза в плазме крови и месте поражения клапана в условиях оперативного лечения ИЭ с помощью современных технологических платформ для протеомного анализа открывает широкие возможности для выявления иммуноморфологических параллелей и в последующем могут стать диагностическими маркерами его

ранней диагностики, эффективности антимикробной и иммуномодулирующей терапии.

В связи с этим целью настоящего исследования явился анализ наиболее часто регистрируемых иммунных белков плазмы крови, отражающих молекулярные патологические пути развития ИЭ нативных клапанов, в совокупности с анализом белков-маркеров основных возбудителей заболевания на основе современной технологической платформы для протеомных исследований.

Материалы и методы

В исследование было включено 99 пациентов с ИЭ нативных клапанов сердца, находившихся в отделении кардиохирургии №1 Центра кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии ГУЗ РОКБ г. Ростова-на-Дону за период 2003-2006 гг.

Исследуемую группу составили пациенты различного возраста — от 30 до 68 лет, средний возраст составил $40,83 \pm 1,39$ лет. Среди пациентов преобладали мужчины (75%). Контрольную группу составили 10 здоровых лиц.

Диагноз ИЭ нативных клапанов сердца соответствовал модифицированным критериям Duke [5].

Все больные были обследованы согласно протоколу стационарного обследования, включавшему общеклинические, лабораторные и инструментальные методы исследования на момент поступления пациентов.

В протокол инструментальных обследований была включена трансторакальная эхокардиоскопия (ЭхоКС), которая при необходимости дополнялась проведением чреспищеводной ЭхоКС. Исследования выполнялись на ультразвуковом сканере фирмы Sonos 7500 (Philips, Япония) с применением методики трехмерной реконструкции сердца в реальном масштабе времени. Стандартное эхокардиографическое исследование включало одномерное и двухмерное сканирование с применением доплерографии в импульсном и непрерывных режимах, а также цветное картирование кровотока.

Оперативное лечение было выполнено 97 пациентам по таким показаниям, как прогрессирующая сердечная недостаточность, деструкция клапанов с формированием гемодинамически значимых пороков сердца, персистирующая инфекция. Операции представлены протезированием клапанов механическими и биологическими протезами в условиях искусственного кровообращения. У больных с ИЭ, осложненном тромбоэмболическими осложнениями в артерии нижних конечностей, выполнялись симультанные операции на сердце и сосудах (таблица 1).

Для микробиологического исследования крови в течение суток проводили трехкратный посев крови. Выделение и идентификация ключевых белков микроорганизмов в крови

ТАБЛИЦА 1. ПЕРЕЧЕНЬ ОПЕРАТИВНЫХ ПОСОБИЙ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ ЭНДОКАРДИТЕ

| Вид оперативного вмешательства | Вид протеза (мех./ биол.) | Абсолютное значение | % |
|---|---------------------------|---------------------|-------|
| Протезирование МК | мех. | 38 | 39,2 |
| Протезирование АК | мех. | 25 | 25,76 |
| Протезирование АК, МК | мех. | 8 | 8,25 |
| Протезирование ТК | биол. | 7 | 7,22 |
| Протезирование ТК + пластика ДМЖП | биол. | 2 | 2,06 |
| Протезирование восходящего отдела аорты клапаносодержащим кондуитом | мех. | 2 | 2,06 |
| Протезирование АК, ТК | мех. | 1 | 1,03 |
| Протезирование МК + тромбэктомия из артерий голени | мех. | 2 | 2,06 |
| Протезирование АК + тромбэктомия из артерий голени | мех. | 1 | 1,03 |
| Репротезирование МК | мех./биол. | 5/1 | 6,18 |
| Репротезирование АК | мех. | 3 | 3,09 |
| Репротезирование ТК | мех. | 1 | 1,03 |
| Репротезирование АК, протезирование МК | мех. | 1 | 1,03 |

и интраоперационном материале (резецированный клапан, септические эмболы и тромбы), регистрация факторов резистентности к антибактериальной терапии, выявление белков, отражающих функционирование иммунной системы организма пациента с ИЭ, выполнялись в ходе следующих технологических этапов протеомного анализа плазмы крови пациентов: 1) получение утреннего образца плазмы крови пациентов с ИЭ; 2) выделение из плазмы крови молекул на основе метода аффинной хроматографии (BioRad, Франция) с помощью стандартного набора для клинической протеомики ClinProtStarterKit (Bruker, США), префракционирования плазмы крови (MicroRotorfor Liquid-Phase IEF Cell, BioRad, Франция), одно- (one-dimensional electrophoresis, 1DE) и двумерного (two-dimensional electrophoresis, 2DE) электрофореза в полиакриламидном геле (BioRad, Франция); 3) идентификация и оценка экспрессии белков-антигенов плазмы крови и специфических белков микроорганизмов на основе время-пролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбционной ионизацией (matrix-assisted laser desorption/ionization mass-spectrometry, MALDI-TOF, прибор Autoflex II, Bruker, США), программного обеспечения для протеомики и масс-спектрометрии (PDQuest2D, Flex Control, Flex Analysis 2.x с функцией Auto Xecute, ClinProTools 1.0., Biotoools 3.0.); 4) анализ масс-спектрограмм в он-лайн режиме в интегрированной базе данных Matrix Science (США); 5) создание молекулярного диагностического паттерна на основе статистического анализа результатов исследования. Результаты исследования представлены в виде MALDI-TOF-масс-спектрограмм пептидных фрагментов и белков плазмы крови

и средних значений интенсивности выявленных белков-маркеров функционирования иммунной системы, а также ключевых белков микроорганизмов (М), стандартного отклонения от средних значений интенсивности (SD) с выявленной молекулярной массой белков (Mr, Da) и показателем изоэлектрической точки каждого белка (pI). Обязательным условием включения белка-маркера в диагностический профиль ИЭ нативных клапанов являлся показатель «покрытия сиквенса» при анализе масс-спектрограмм, который составил более 30%. Также учитывался показатель «ожидаемой интенсивности пептидного фингерпринта» для каждого обнаруженного белка, представленный в поисковой системе Mascot Search (UK). Чувствительность MALDI-TOF-масс-спектрометрического метода обнаружения белков в биологической жидкости составляет 10^{-15} моль вещества.

Статистический анализ результатов исследования проводился на основе программы Statistica 6.1 с расчетом выборочного среднего (М), стандартной ошибки среднего (SEM). Оценка нормальности распределения включала критерий Колмогорова—Смирнова.

Результаты

У пациентов с ИЭ нативных клапанов были зарегистрированы общие (лихорадка, ознобы, слабость, усталость, профузное потоотделение по ночам, артралгия, миалгия) и характерные (сердечные шумы, спленомегалия, петехиальная сыпь на ладонях) симптомы ИЭ. Симптомы сопровождалась достоверным повышением СОЭ ($p < 0,01$), лейкоцитозом ($p < 0,01$), тромбоцитопенией ($p < 0,01$), увеличением значений лейкоцитарного индекса интоксикации ($p < 0,05$).

ТАБЛИЦА 2. ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ КОНТРОЛЬНОЙ И ИССЛЕДУЕМОЙ ГРУПП С ИНФЕКЦИОННЫМ ЭНДОКАРДИТОМ НАТИВНЫХ КЛАПАНОВ

| Название белка-маркера | Mr, kDa | Показатель ожидаемой интенсивности пептидного фингерпринта белка-маркера, усл.ед. | |
|---------------------------------|---------|--|---|
| | | Контрольная группа (n = 15) M±SD | Исследуемая группа (n = 15) M±SD |
| Плазма крови | | | |
| Компоненты системы комплемента: | | | |
| - C3 | 64 | 2,5±0,9 x 10 ³ | 4,9±1,2 x 10 ⁷ 1)***2)*** |
| - C4 | 96 | 2,1±0,4 x 10 ² | 5,1±1,1 x 10 ⁴ 1)***2)*** |
| - C9 | 62 | 2,8±0,4 x 10 ² | 4,8±1,1 x 10 ³ 1)***2)*** |
| Маннозосвязывающий лектин | 26 | — | 3,4±0,5 x 10 ³ |
| Белок S | 60 | 3,4±1,1 x 10 ² | 8,0±1,3 x 10 ³ 1)***2)*** |
| Тканевой активатор плазминогена | 63 | 2,8±0,3 x 10 ² | 7,4±1,1 x 10 ³ 1)***2)*** |
| Фибриноген | 52 | — | 8,4±1,5 x 10 ³ |
| Церуллоплазмин | 150 | 2,1±0,3 x 10 ² | 4,7±0,7 x 10 ³ 1)***2)*** |
| Гемопексин | 63 | 1,2±1,2 x 10 ² | 6,8±1,2 x 10 ³ 1)***2)*** |
| Гаптоглобин | 85 | 1,6±1,1 x 10 | 5,7±1,4 x 10 ³ 1)***2)*** |
| IL-6 | 24 | 1,1±0,3 x 10 | 2,2±1,5 x 10 1)*2)* |
| Антагонист рецептора 1 IL-1 | 20 | 0,9±0,1 x 10 | 1,9±0,5 x 10 ² 1)**2)** |
| Фосфолипаза A2 | 13,5 | 1,6±1,1 x 10 | 1,4±0,2 x 10 ² 1)**2)** |
| Трансферрин | 80 | 1,7±1,1 x 10 ³ | 0,8±0,1 x 10 ² 1)**2)** |
| ИФР | 17 | 2,1±0,1 x 10 ³ | 0,8±0,2 x 10 1)***2)*** |
| Фактор XII | 67,8 | 1,9±1,7 x 10 ³ | 1,2±0,2 x 10 ² 1)**2)** |

Примечание. Достоверность различий с контрольной группой при $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

По данным трансторакальной эхокардиоскопии парааннулярные осложнения встречались в исследуемой группе в 10% случаев ИЭ и были представлены абсцессами и фистулами протезов клапанов.

При морфологической оценке по выявлению воспалительной инфильтрации и колоний микроорганизмов или грибов типировали инфекционный процесс. В интраоперационном материале выявлены инфильтрация в ткани клапана и/или колонии микроорганизмов и грибов.

В исследуемой группе пациентов гемокультуры оказались позитивными лишь в 20,4% случаев. Лидирующие позиции в спектре возбудителей

занимали грамположительные микроорганизмы (74%), преимущественно *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus delphi* (52%) и *Streptococcus viridans* (22%). Также были выделены грамотрицательные микроорганизмы из семейства *Enterobacteriaceae* (*E. faecalis*, 17%) и грибы рода *Candida* (*Candida albicans*, 6%). В 3% случаев были выделены ассоциации грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

Культуральное исследование интраоперационного материала позволило выявить преобладание грамположительных возбудителей, преимущественно *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus delphi* (60%). Наряду с ними выделяли *Enterococ-*

ТАБЛИЦА 3. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ИНТРАОПЕРАЦИОННОМ МАТЕРИАЛЕ В ГРУППЕ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННЫМ ЭНДОКАРДИТОМ НАТИВНЫХ КЛАПАНОВ

| Название белка-маркера | Mr, kDa | Показатель ожидаемой интенсивности пептидного фингерпринта белка-маркера, усл.ед. |
|--|---------|---|
| Плазма крови | | |
| <i>S. gordonii</i> , группа <i>S. viridans</i> | | |
| Экстрацеллюлярная аргинин-аминопептидаза | 70 | $4,3 \pm 1,5 \times 10^7$ |
| <i>S. aureus</i> | | |
| Фибронектин-фибриноген-связывающий белок | 65 | $3,9 \pm 1,6 \times 10^6$ |
| <i>C. albicans</i> | | |
| НАДФН-дегидрогеназа | 49 | $2,8 \pm 0,3 \times 10^3$ |
| Интраоперационный материал | | |
| <i>S. gordonii</i> , группа <i>S. viridans</i> | | |
| Экстрацеллюлярная аргинин-аминопептидаза | 70 | $3,5 \pm 1,2 \times 10^4$ |
| Цитоплазматическая глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа | 140 | $4,2 \pm 1,8 \times 10^6$ |
| Изоформы маннозидаз: | | |
| - маннозидаза 1 | 14,9 | $1,2 \pm 0,1 \times 10^3$ |
| - маннозидаза 2 | 15,0 | $4,5 \pm 1,1 \times 10^2$ |
| - маннозидаза 3 | 15,2 | $2,2 \pm 0,5 \times 10^6$ |
| - маннозидаза 4 | 15,4 | $1,7 \pm 0,2 \times 10^4$ |
| - маннозидаза 5 | 15,5 | $1,8 \pm 0,3 \times 10^6$ |
| <i>E. faecalis</i> | | |
| Фосфомевалонат-киназа | 70 | $4,7 \pm 1,2 \times 10^4$ |
| <i>S. aureus</i> | | |
| Аутолизин | 97 | $3,2 \pm 1,5 \times 10^6$ |
| Иммунодоминантный антиген А | 30 | $1,9 \pm 0,2 \times 10^4$ |
| 50S рибосомальный белок | 24 | $2,3 \pm 0,4 \times 10^2$ |
| Фибронектин-фибриноген-связывающий белок | 65 | $2,8 \pm 0,2 \times 10^5$ |
| <i>C. albicans</i> | | |
| Ацетил-КоА-гидролаза | 65 | $2,1 \pm 0,6 \times 10^7$ |
| НАДФН-дегидрогеназа | 49 | $3,8 \pm 0,5 \times 10^6$ |
| Энолаза 1 | 34 | $4,2 \pm 0,2 \times 10^5$ |

cus spp., *Neisseriae spp.*, грибы рода *Candida*. Обнаружение микроорганизмов в интраоперационном материале составило 27,8%. При совместном учете показателей обнаружения бактериальных возбудителей и грибов в крови и интраоперационном материале число культуронегативных случаев уменьшилось (61,2% случаев против 79,6% случаев при изолированной оценке гемокультур).

Протеомный анализ плазмы крови пациентов с ИЭ нативных клапанов и интраоперационного материала позволил изучить системную и локаль-

ную реакцию иммунных факторов организма при этом заболевании. Примеры масс-спектрограмм белков плазмы крови здорового человека и пациента с ИЭ нативных клапанов представлены на рисунках 1, 2, 3.

У пациентов исследуемой группы отмечалось достоверное увеличение интенсивности специфических белков плазмы крови, отвечающих за развитие системной иммунной реакции при ИЭ нативных клапанов, по сравнению с аналогичными белками плазмы крови контрольной

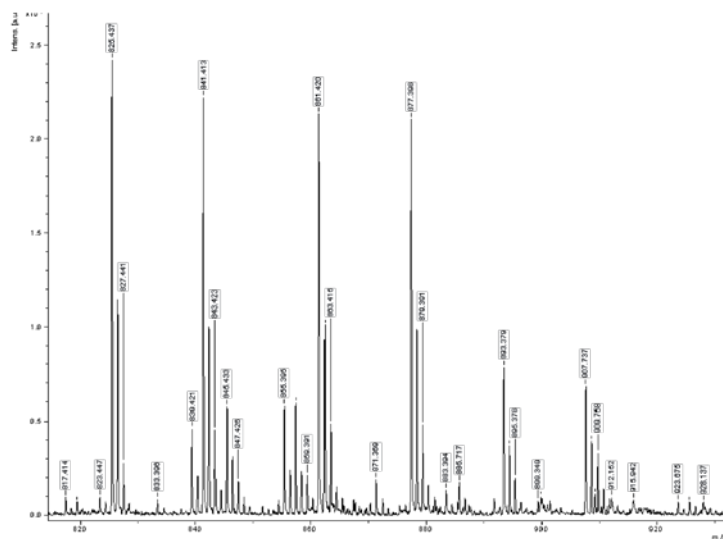


Рисунок 1. Пример масс-спектрограммы некоторых белков плазмы крови здорового человека К., 28 лет (диапазон Mr = 800 Da-9 kDa)

По оси X: m/z – соотношение масса-заряд молекулы; по оси Y: Intens (a.u.) – интенсивность пика масс-спектрограммы.

Отдельные пептидные фрагменты, отражающие наличие некоторых белков в плазме крови (поисковая система Mascot Search, UK): регулятор транскрипции, ядерный белок [m/z = 825,44; 893,38; 907,74]; трансмембранный белок, обеспечивающий нормальное функционирование кохлеарных волосковых клеток [m/z = 845,43; 877,39]; пролин-содержащий белок 13 [m/z = 841,41; 861,42; 885,71].

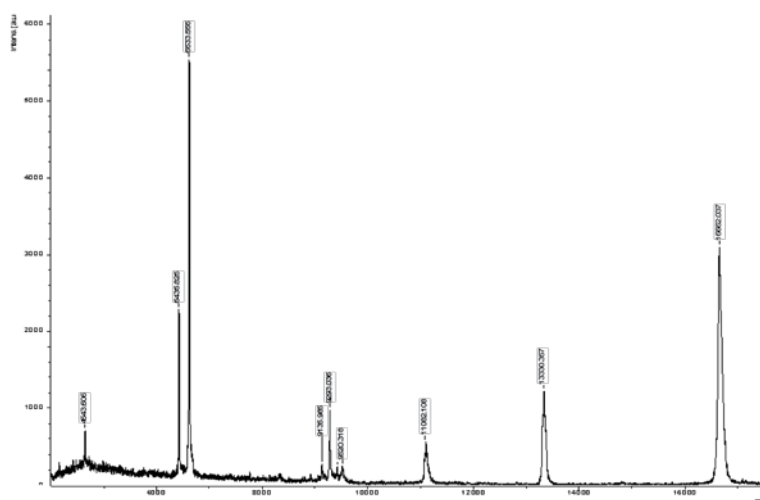


Рисунок 2. Пример масс-спектрограммы некоторых белков плазмы крови здорового человека К., 28 лет (диапазон Mr = 4-20 kDa)

По оси X: m/z – соотношение масса-заряд молекулы; по оси Y: Intens (a.u.) – интенсивность пика масс-спектрограммы.

Отдельные пептидные фрагменты, отражающие наличие некоторых белков в плазме крови (поисковая система Mascot Search, UK): легкая цепь миозин-киназы [m/z = 6436,83; 6633,56]; пролин-содержащий белок 13 [m/z = 16662,04]; белок 2 нейrogenной дифференцировки [m/z = 11062,11]; митохондриальная ацетил-КоА-дегидрогеназа [m/z = 13330,27]; трансферрин [m/z = 4543,60]; инсулиноподобный фактор роста [m/z = 9135,98; 9293,04]; фактор XII [m/z = 9620,31].

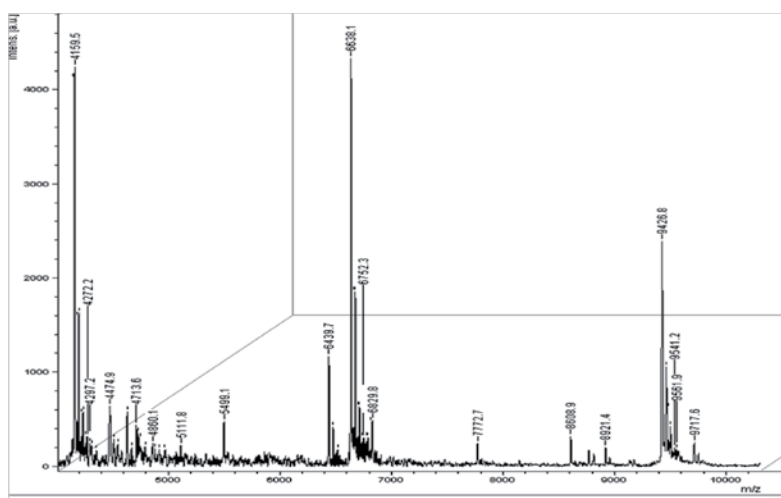


Рисунок 3. Пример масс-спектрограммы некоторых белков плазмы крови пациента с ИЭ нативных клапанов К., 38 лет (диапазон Mr = 4-10 kDa)

По оси X: m/z – соотношение масса-заряд молекулы; по оси Y: Intens (a.u.) – интенсивность пика масс-спектрограммы.

Отдельные пептидные фрагменты, отражающие наличие некоторых белков в плазме крови (поисковая система Mascot Search, UK): компоненты системы комплемента – C3 [m/z = 4159,5; 6638,1], C4 [m/z = 4159,5; 9426,8], C9 [m/z = 4713,6; 9717,6]; маннозосвязывающий лектин [m/z = 5499,1; 9541,2]; белок S [m/z = 4860,1; 9561,9]; тканевой активатор плазминогена [m/z = 5111,8; 8921,4]; фибриноген [m/z = 6439,7]; церулоплазмин [m/z = 4272,2]; гемопексин [m/z = 7772,7]; гаптоглобин [m/z = 6752,3]; интерлейкин-6 [m/z = 6829,8]; фосфолипаза A2 [m/z = 4474,9]; инсулиноподобный фактор роста [m/z = 6752,3].

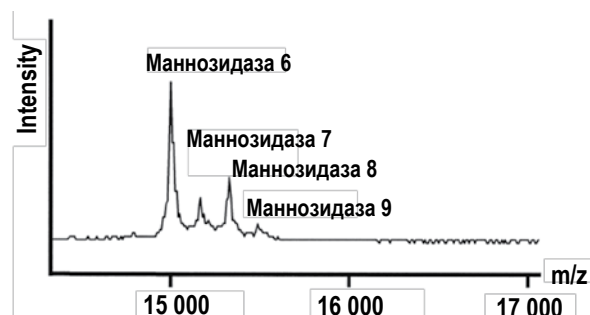


Рисунок 4. Масс-спектрограмма изоформ маннозидаз (6, 7, 8, 9) *S. viridans* (интраоперационный материал)

По оси X: m/z – соотношение масса-заряд молекулы; по оси Y: Intens (a.u.) – интенсивность пика масс-спектрограммы.

группы (таблица 2): компонентов системы комплемента – C3, C4, C9; маннозосвязывающего лектина; компонентов свертывающей и фибринолитической системы – белка S, тканевого активатора плазминогена, фибриногена; транспортных белков – церуллоплазмينا, гемопексина, гаптоглобина; компонентов воспалительной реакции – интерлейкина-6 (IL-6), антагониста рецептора 1 интерлейкина-1 (IL-1), фосфолипазы A2.

У пациентов исследуемой группы отмечалось достоверное снижение интенсивности трансферрина, инсулиноподобного фактора роста (ИФР), фактора XII по сравнению с аналогичными белками плазмы контрольной группы.

Одновременно в плазме крови пациентов исследуемой группы выявлены специфические белки возбудителей ИЭ (таблица 3): экстрацеллюлярная аргинин-аминопептидаза *S. gordonii*, фибронектин-фибриноген-связывающий белок *S. aureus*, НАДФН-дегидрогеназа *C. albicans*. В контрольной группе вышеперечисленные белки возбудителей в плазме крови обнаружены не были.

Молекулярный профиль интраоперационного материала обнаружил наличие специфических белков возбудителей ИЭ нативных клапанов, в том числе, возбудителей, не обнаруженных в ходе культурального исследования: экстрацеллюлярная аргинин-аминопептидаза *S. gordonii*, цитоплазматическая глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа *S. gordonii*, изоформы маннозидаз *S. gordonii* (рисунок 4), фосфомевалонат-киназа *E. faecalis*, аутолизин *S. aureus*, иммунодоминантный антиген A *S. aureus*, 50S рибосомальный белок L6 *S. aureus*, фибронектин-фибриноген-связывающий белок *S. aureus*, ацетил-КоА-гидролаза *C. albicans*, НАДФН-дегидрогеназа *C. albicans*, энлаза 1 *C. albicans*.

С учетом анализа биологической роли и функциональной активности каждого обнаруженного специфического белка возбудителя в плазме крови и интраоперационном материале пациента была сформирована индивидуальная антибактериальная терапия.

Обсуждение

Полученные нами результаты показали, что при применении новых молекулярных технологий и молекулярных методов ранней диагностики ИЭ нативных клапанов можно увеличить выявление этиологического агента с 53,7% до 99% случаев. Обнаруженные нами белки плазмы крови и маркеры возбудителей ИЭ позволяют понять функционирование отдельных звеньев системного и локального иммунного ответа организма пациента. Рассмотрим участие каждого белкового фактора в формировании молекулярного патологического процесса при ИЭ нативных клапанов.

В плазме крови пациентов показано увеличение интенсивности известных острофазовых белков, прежде всего, церуллоплазмينا и сывороточного амилоида A, являющегося прекурсором плазменного амилоида A [7]. Одновременно выявлено комбинированное увеличение интенсивности компонентов единой сигнальной сети – IL-6 и антагониста рецептора 1 IL-1, которые являются стимуляторами продукции острофазовых белков.

Маннозосвязывающий лектин, обнаруженный в плазме крови пациентов, способствует активации всех компонентов комплемента, чем обеспечивает естественную защиту на пути распространения инфекции. Увеличение интенсивности гаптоглобина в плазме крови сопровождается связыванием гемоглобина и снижением его потери через почки. Белок также обеспечивает антиоксидантную и антибактериальную активность при ИЭ. Увеличение интенсивности ИФР в плазме крови способствует активации антиапоптотических процессов, в том числе, в ткани клапанов сердца, а также стабилизации метаболических процессов в эндотелии сосудов, прежде всего, связанных с влиянием на них гликемией [7].

Обнаруженная нами экстрацеллюлярная аргинин-аминопептидаза *Streptococcus gordonii*, являющегося важным этиологическим фактором в развитии подострого ИЭ, способствует формированию тромбов и повреждению ткани на поверхности клапанов сердца [8]. Фосфомевалонаткиназа является одним из 6 ферментов патологического пути мевалоната, включающего биосинтез изопентенил-дифосфата у *E. faecalis* с формированием его ванкомицин-резистентных штаммов, вызывающих ИЭ нативных клапанов сердца [4].

Увеличение активности цитоплазматической иммунореактивной глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *Streptococcus gordonii* при ИЭ свидетельствует об инвазии данного микроорганизма в ткань клапана и защитной реакции возбудителя при воздействии иммунной системы хозяина [9].

Увеличение активности изоформ маннозидаз *Streptococcus gordonii* может свидетельствовать

об интенсивном росте микроорганизмов в сыворотке крови, чему способствует α 1-кислый гликопротеин [2].

Фибронектин-фибриноген-связывающий белок, секретируемый *S. aureus*, вызывает агрегацию тромбоцитов при ИЭ нативных клапанов за счет связывания с активированным гликопротеиновым комплексом на тромбоцитах GPIIb/IIIa [6].

Обнаруженная нами активность аутолизина, секретируемого *S. aureus* свидетельствует о наличии резистентности микроорганизма к аутолизу, в том числе, индуцируемому антибиотиками [3].

Белок энолаза-1 *C. albicans* является иммунодоминантным антигеном и определяет распространение возбудителя в организме человека, а также связывает плазминоген, что способствует дисбалансу в работе свертывающей системы крови при ИЭ нативных клапанов [10]. Ацетил-КоА-гидролаза *C. albicans*, экспрессия которой обнаружена у пациентов в плазме крови, является чувствительной антигенной детерминантой при ИЭ нативных клапанов [12].

Таким образом, настоящее исследование продемонстрировало тот факт, что необходимым является внедрение в клиническую практику современных методов иммунопротеомного анализа биологического материала (плазма крови, интраоперационного материала) организма пациентов с ИЭ нативных клапанов, которые наряду с клиническими и микробиологическими исследованиями позволяют существенно увеличить скорость микробиологической и иммунологической диагностики ИЭ.

Выводы

1) Применение новых молекулярных технологий и молекулярных методов ранней диагностики ИЭ нативных клапанов позволило провести комплексный анализ взаимодействия микроорганизмов с иммунной системой организма пациента и увеличить выявление этиологического агента с 53,7% до 99% случаев.

2) Обнаружены специфические белки возбудителей ИЭ нативных клапанов, являющиеся иммуногенными детерминантами для организма человека и определяющими локальный иммунный ответ: экстрацеллюлярная аргининаминопептидаза *S. gordonii*, цитоплазматическая глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа *S. gordonii*, изоформы маннозидаз *S. gordonii*, фосфомевалонат-киназа *E. faecalis*, аутолизин *S. aureus*, иммунодоминантный антиген A *S. aureus*, 50S рибосомальный белок L6 *S. aureus*, фибронектин-фибриноген-связывающий белок *S. aureus*, ацетил-КоА-гидролаза *C. albicans*, НАДФН-дегидрогеназа *C. albicans*, энолаза 1 *C. albicans*.

3) Необходимым является внедрение в клиническую практику отделений кардиологии и кардиохирургии современных методов иммунопротеомного анализа плазмы крови и интраоперационного материала организма пациентов с инфекционным эндокардитом нативных клапанов.

Список литературы

1. Митрофанова Л.Б., Ковальский Г.Б. Морфологическая характеристика и дифференциальная диагностика заболеваний клапанов сердца // Арх. патологии. — 2007. — № 1. — С. 24-31.
2. Byers H., Tarellil E., Homerl K., Hambley H., Beighton D. Growth of viridans streptococci on human serum al-acid glycoprotein // J. Dent. Res. — 1999. — Vol. 78, N 7. — P. 1370-1380.
3. Boyle-Vavra S., Challapalli M., Daum R. Resistance to autolysis in vancomycin-selected *Staphylococcus aureus* isolates precedes vancomycin-intermediate resistance // Antimicrob. agents chemother. — 2003. — Vol. 47, N 6. — P. 2036-2039.
4. Doun S., Burgner J., Briggs S., Rodwell V. Phosphomevalonate kinase *Enterococcus faecalis* // Protein Sci. — 2005. — Vol. 14. — P. 1134-1139.
5. Durack D., Lukes A., Bright D. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings // Am. J. Med. — 1994. — N 96. — P. 200-209.
6. Fitzgerald J.R., Loughman A., Brennan M., Knobel M., Higgins J., Speziale P., Cox D., Foster T.J. Fibronectin-binding protein (FnBP) mediates *Staphylococcus aureus*-induced platelet aggregation // J. Thromb. Haemost. — 2005. — Vol. 3, Suppl 1.
7. Gabay C., Kushner I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation // N. Engl. J. Med. — 1999. — Vol. 340, N 6. — P. 448-454.
8. Goldstein J., Nelson D., Kordula T., Mayo J., Travis J. Extracellular Arginine Aminopeptidase from *Streptococcus gordonii* FSS2 // Infect. Immun. — 2002. — Vol. 70, N 2. — P. 836-843.
9. Macarthur D., Jacques N. Proteome Analysis of Oral Pathogens // J. Dent. Res. — 2003. — Vol. 82, N 11. — P. 870-876.
10. Mason A., Buckley H., Gorman J. Molecular cloning and characterization of the *Candida albicans* enolase gene // J. Bacteriol. — 1993. — Vol. 175, N 7. — P. 2632-2639.
11. Mylonakis E., Calderwood S. Infective endocarditis in adults // N. Engl. J. Med. — 2001. — Vol. 345, N 18. — P. 1318-1330.
12. Pitarch A., Abian J., Carrascal M., Sanchez M., Nombela C., Gil C. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies // Proteomics. — 2004. — N 4. — P. 3084-3106.

поступила в редакцию 15.04.2007

отправлена на доработку 09.06.2007

принята к печати 29.07.2007