

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Романовская Анна Дмитриевна

**Морфологический субстрат и молекулярно-генетические механизмы
развития миокардитов различной природы**

14.03.02 — Патологическая анатомия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Коган Евгения Алтаровна

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Хронический миокардит как причина возникновения аритмий...	13
1.1.1. Распространённость миокардита.....	15
1.1.2. Классификация миокардита.....	16
1.1.3. Этиология хронического миокардита.....	19
1.1.4. Патогенетические аспекты развития хронического миокардита..	26
1.1.5. Морфология хронического миокардита.....	29
1.2. Миокардит при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.....	35
1.2.1. Распространённость миокардита.....	35
1.2.2. Этиология миокардита.....	37
1.2.3. Патогенетические аспекты миокардита.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.1. Характеристика материала.....	42
2.2. Методы морфологического исследования.....	45
2.3. Методы иммуногистохимического исследования.....	47
2.4. Морфометрический метод.....	51
2.5. Вирусологический метод с использованием полимеразной цепной реакции.....	51
2.6. Статистические методы исследования и обработка данных.....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	54
3.1. Клинико-морфологические особенности хронического миокардита (ХМ).....	54
3.1.1. Клиническая характеристика.....	54
3.1.2. Морфологическая характеристика.....	56
3.1.3. Иммуногистохимическая характеристика.....	64
3.1.4. Вирусологическое исследование.....	79
3.2. Клинико-морфологические особенности миокардита при новой	

коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (KM).....	80
3.2.1. Клиническая характеристика.....	80
3.2.2. Морфологическая характеристика.....	83
3.2.3. Иммуногистохимическая характеристика.....	90
3.2.4. Вирусологическое исследование SARS-CoV-2 в ткани миокарда методом полимеразной цепной реакции.....	101
3.2.5. Иммуногистохимическое исследование белков вируса SARS-CoV-2.....	101
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	105
4.1. Хронический миокардит (ХМ).....	105
4.2. Миокардит при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (KM).....	108
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	114
ВЫВОДЫ.....	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В клинической практике большинство аритмий у пациентов моложе 60 лет без ишемической болезни и пороков сердца относятся к «идиопатическим» (ИА) и могут стать причиной внезапной сердечной смерти у лиц молодого возраста. По данным литературы, в основе таких аритмий лежат некоронарогенные заболевания миокарда (НКЗМ), представляющие собой гетерогенную группу патологий миокарда, не связанных с ишемической болезнью сердца. Отечественные авторы создали наиболее чёткую классификацию НКЗМ, включающую миокардиты, кардиомиопатии (КМП) и миокардиодистрофии, [6, 9, 28].

Миокардит занимает особое место в классификации, что обусловлено его широкой распространённостью, разнообразием форм и неспецифичностью клинических проявлений. В клинических наблюдениях отмечается неуклонный рост заболеваемости миокардитом, особенно среди детей и лиц молодого возраста. А. Frustaci с соавт. с 1983 по 2016 годы исследовали 4582 миокардиальных биоптата и в 37,4% случаев обнаружили миокардит, [3]. В другом исследовании 3055 эндомиокардиальных биопсий, выполненных по различным показаниям, в 17,2% случаев выявлен миокардит, [106]. Смертность при миокардитах составляет, в среднем, 1-7%, [36]. Причинами смерти являются внезапная сердечная смерть, прогрессирующая сердечная недостаточность, аритмии. По данным литературы, от 2 до 42% случаев внезапной сердечной смерти развивается у больных с хроническим миокардитом, [68].

К этиологическим агентам миокардита относят инфекционные, иммунные факторы, эндокринные нарушения, токсические воздействия, [112]. Наиболее часто миокардиты вызываются вирусами (парвовирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус Коксаки В, герпес-вирус и другие), персистенция

которых в крови и в миокарде ассоциируется с прогрессированием желудочковой дисфункции и ухудшением состояния пациента вплоть до внезапной сердечной смерти, [43, 117].

В настоящее время в мире отмечена пандемия новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Самые тяжёлые пациенты умирают от сердечной и лёгочно-сердечной недостаточности. Сердечно-сосудистая манифестация при новой коронавирусной инфекции разнообразна: острый инфаркт миокарда, кардиомиопатия, миокардит, коронарный спазм, [158]. В литературе практически не описана морфологическая картина поражения миокарда, ассоциированного с новой коронавирусной инфекцией, вызванной SARS-CoV-2. В связи с этим крайне актуально более детальное морфологическое изучение патологии миокарда при новой коронавирусной инфекции с целью установления механизма цитопатического действия коронавируса SARS-CoV-2 на клетки миокарда.

СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ТЕМЫ

Патогенетические механизмы и молекулярно-генетическая характеристика хронических миокардитов до сих пор малоизучены. «Золотым стандартом» диагностики является гистологическое исследование эндомиокардиальной биопсии (преимущественно, правого желудочка). Однако на данный момент в литературе встречается крайне мало исследований биоптатов сердца с установлением морфологического субстрата некоронарогенной аритмии и описанием молекулярно-генетических механизмов развития миокардита. В основном, исследования ученых посвящены изучению дополнительных методов диагностики (инструментальной визуализации) указанных заболеваний. В настоящее время не существует общепринятых алгоритмов диагностики миокардита, которые обладают высокой степенью диагностической надежности, [3].

Большинство современных исследований биоптатов миокарда проведено на небольших выборках (35-50 случаев миокардита), спектр морфологических методов недостаточен для полноценной характеристики морфологических изменений (не используется иммуногистохимическое исследование) и молекулярно-генетических механизмов возникновения миокардита. В некоторых исследованиях не изучены этиологические факторы (отсутствует вирусологическое исследование), [186].

Следует отметить особую актуальность исследования состояния миокарда при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, которое позволит объяснить механизм возникновения аритмий, оценить риски их возникновения у пациентов и назначить этиопатогенетически оправданное лечение.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ

Механизм возникновения и морфологический субстрат развития миокардита, в том числе, миокардита при новой коронавирусной инфекции не до конца изучен, в связи с чем **целью нашего исследования** стало:

изучить морфологический и молекулярно-генетический субстрат миокардита, включая миокардит при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Для реализации цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выявить морфологические и иммуногистохимические особенности хронического миокардита у пациентов с нарушениями ритма сердца.
2. Определить клеточный характер инфильтрата при хроническом миокардите, сопровождающемся аритмиями.
3. Выявить молекулярно-генетический субстрат нарушений ритма сердца у пациентов с хроническим миокардитом.
4. Определить морфологические особенности декомпенсированного варианта хронического миокардита.

5. Определить морфологические и иммуногистохимические особенности миокардита, ассоциированного с коронавирусом SARS-CoV-2.

6. Изучить патогенетические механизмы поражения миокарда при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ

Впервые в мире выявлены морфологические перестройки ткани в области проводящей системы сердца в виде субэндокардиального липоматоза с оценкой процента его площади в биоптатах миокарда у пациентов с хроническим миокардитом.

Впервые в мире детально описан иммуногистохимический профиль клеточного инфильтрата в миокарде при хроническом миокардите.

Впервые показаны морфологические особенности миокардита при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Впервые в мировой литературе описаны морфологический и молекулярно-генетический субстрат нарушений ритма сердца на фоне хронического миокардита.

Впервые в мировой литературе представлен молекулярно-генетический субстрат миокардита при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Впервые в отечественной литературе разработан алгоритм морфологической диагностики хронического миокардита у лиц с нарушениями ритма сердца с иммуногистохимическим типированием клеточного инфильтрата и применением гистохимических методов исследования.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Данные, полученные в результате проведенного исследования, могут быть использованы в диагностике идиопатических аритмий, миокардитов различной природы, что важно для совершенствования методов этиотропной и патогенетической поддержки пациентов с хроническими миокардитами, а также с новой коронавирусной инфекцией, вызванной SARS-CoV-2.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование охватывает 100 пациентов с миокардитом, 20 пациентов контрольной группы и включает применение разнообразных морфологических методов исследования (гистологический, гистохимический, иммуногистохимический, морфометрический), вирусологического и клинико-лабораторного исследования с последующей статистической обработкой полученных данных.

Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе Романовской А.Д., получены ею самостоятельно в Институте клинической морфологии и цифровой патологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Автором проведен анализ историй болезни пациентов в исследуемых группах. Автор самостоятельно проводила гистологическое, иммуногистохимическое, морфометрическое исследования. Автором была проведена статистическая обработка и интерпретация результатов молекулярного исследования (полимеразной цепной реакции) пациентов, умерших от новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Результаты перечисленных выше исследований были статистически обработаны с помощью статистических программ и интерпретированы автором.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Морфологическим субстратом нарушений ритма сердца при идиопатических аритмиях является хронический миокардит с инфильтрацией миокарда CD3+ Т-лимфоцитами, CD45+ лимфоцитами и CD68+ макрофагами, апоптоз кардиомиоцитов и склероз эндокарда. Аритмический вариант хронического миокардита морфологически отличается наличием субэндокардиального липоматоза в области проводящей системы сердца.

2. Морфологические особенности декомпенсированного варианта хронического миокардита - воспалительная инфильтрация, состоящая преимущественно из CD3+ Т-лимфоцитов, гипертрофия кардиомиоцитов, отек интерстиция, диффузный мелкоочаговый кардиосклероз и возможное развитие ишемии миокарда вплоть до некроза отдельных кардиомиоцитов.

3. Морфологическими особенностями миокардита при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, является сочетание воспаления миокарда с апоптозом кардиомиоцитов, лимфоцитарным коронариитом, эндотелиитом и васкулитами с микротромбозом мелких веточек коронарных артерий, с последующим присоединением лимфоцитарного эндо- и перикардита, то есть с развитием панкардита сердца. Высокая коэкспрессия TLR 4 и 9 типов в миокарде свидетельствует об активности воспалительного процесса в миокарде и об активации иммунных механизмов воспаления при COVID-19.

4. Идентификация spike-белка и белка нуклеокапсида SARS-CoV-2 в макрофагах инфильтрата в миокарде в сочетании с результатами полимеразной цепной реакции свидетельствует о наличии в ткани миокарда РНК вируса SARS-CoV-2 и обуславливает развитие миокардита.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Автором проведено ретроспективное и проспективное исследование случай-контроль, в которое были включены 120 пациентов. Выводы и практические рекомендации автора диссертации основаны на результатах комплексного морфологического, иммуногистохимического и молекулярного исследований биоптатов миокарда и посмертных образцов миокарда у пациентов с COVID-19. Результаты исследования научно обоснованы. Достоверность полученных результатов подтверждена проведенным статистическим анализом. Проверена первичная документация (истории болезни, результаты морфологического, иммуногистохимического и молекулярного исследований биоптатов, наборы микрофотографий для морфометрического исследования).

Апробация диссертации состоялась на научной конференции Института клинической морфологии и цифровой патологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова «19» января 2022 года.

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ В ПРАКТИКУ

Материалы диссертации используются при чтении лекций и проведении семинарских занятий по патологии сердца для студентов 3-го курса, клинических ординаторов и аспирантов, а также при чтении лекций курса повышения квалификации для врачей-патологоанатомов в Институте клинической морфологии и цифровой патологии (директор Института — д.м.н., академик РАЕН, проф. Демура Т.А.).

ПУБЛИКАЦИИ

Основное содержание диссертационного исследования достаточно полно отражено в 16 научных работах соискателя, в том числе в 6 статьях в журналах, входящих в Scopus, в 1 статье в иностранном издании, в 9 публикациях по материалам международных конференций.

В 2020 году Романовской А.Д. выигран грант «Аспиранты» Российского фонда фундаментальных исследований по теме: «Клинико-морфологические и молекулярно-генетические особенности вирусного миокардита, включая миокардит при COVID-19».

Основные материалы диссертации были доложены и обсуждены на конференциях: XXXII Европейском конгрессе по Патологии (6-8 декабря 2020 г.); XXXIII Европейском конгрессе по Патологии (29-31 августа 2021 г.); Конференция «Путь в науку-2020» (30 октября, 2020 г., Москва), где работа стала лауреатом в секции «Молодые ученые»; Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (12-13 ноября 2020 г., Москва); Российском научном обществе патологоанатомов (май, 2021 г., Москва); Московском научном обществе патологоанатомов (декабрь, 2019 г., Москва).

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация построена по монографическому типу и изложена на 139 страницах машинописи, содержит 20 таблиц, 25 рисунков, 25 диаграмм, 2 схемы. Диссертация состоит из следующих разделов: введения, главы обзора литературы, главы описания материала и методов исследования, главы описания результатов исследования, главы обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 45 отечественных и 142 иностранных источника.

Указанная область и способы исследования соответствуют специальности 14.03.02 – Патологическая анатомия, отрасль науки – медицинские науки (п.1 – **12** «распознавание и характеристика этиологических факторов, определяющих возникновение и развитие конкретных заболеваний (нозологических форм), на основании прижизненных и постмортальных морфологических исследований при использовании современных технических возможностей патологической анатомии»). Диссертационная работа Романовской А.Д. соответствует требованиям п. 14 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Хронический миокардит как причина возникновения аритмий

О.В. Благова с соавт. в 2017 году разработали классификацию НКЗМ, которая является дополнением общепринятой. Новая классификация основывается на двух принципах: ведущий клинический синдром (аритмический, дилатация камер сердца, снижение сократимости без дилатации, микроваскулярная ишемия, псевдоинфарктный синдром, первичная гипертрофия миокарда, рестриктивные изменения, синдром такоцубо, перипартальная кардиомиопатия, минимальные клинические проявления) и основной клинико-патогенетический вариант (кардиомиопатия, миокардит, миокардиодистрофия, их сочетание, вторичная дисфункция миокарда), [4].

Впервые связь воспаления сердца с аритмией и прогрессирующей сердечной недостаточностью была описана в 1806 году французским врачом Corvisart, [77]. Термин «миокардит» предложил немецкий врач J.F. Sobernheim в 1837 году, описывая концепцию воспалительного поражения сердечной мышцы, [165]. В начале XX века была сформирована теория «первичного миокардита», как тяжёлой идиопатической патологии сердца (A. Fiedler). Кроме того, в исследованиях отечественных и зарубежных авторов к 20-м годам XX века отмечалась взаимосвязь миокардита и инфекционных заболеваний (грипп и некоторые другие респираторные инфекции). До 1930-х годов диагноз «миокардит» был универсальным, и клиницисты использовали его для обозначения различных поражений миокарда (включая инфаркт), хотя ещё в 1908 году В.П. Образцовым и Н.Д. Стражеско из диагноза «миокардит» был исключен ишемический кардиосклероз, который является следствием атеросклероза коронарных артерий. В 1936 году Г.Ф. Ланг выделил термин «миокардиодистрофия», так

как при многих сердечных заболеваниях собственно воспаление сердца отсутствует, но наблюдаются дегенеративные процессы. Тогда зачастую неуместное употребление диагноза «миокардит» прекратилось, и до 50-х годов XX века к этому термину возвращались только для обозначения патологии миокарда при дифтерии и ревматизме. В.Х. Василенко утверждал, что миокардиодистрофия – это нарушение обмена веществ, образования и превращения энергии в миокарде, которое связано с экстракардиальными воздействиями, приводит к недостаточной функции миокарда и на ранних стадиях полностью обратимо. В.Х. Василенко также выделяет стадии миокардиодистрофии: нейрофункциональная, обменно-структурная, стадия выраженной сердечной недостаточности (дистрофические процессы приводят к миолизу и кардиосклерозу), [3]. Чёткие критерии миокардиодистрофии (отсутствие воспаления, связь с определёнными патогенетическими факторами, вторичная природа) отличают её от других форм НКЗМ (миокардитов, КМП).

В 1950-х годах миокардит снова вошёл в клиническую практику после публикации работ I. Gore и O. Saphir [97], где при аутопсии обнаруживалось воспаление сердечной мышцы и описывалось, что умершие незадолго до смерти перенесли риккетсиозные или вирусные инфекции. С внедрением в мировую практику методики взятия миокардиальной биопсии (с 1980-х годов) начался современный этап исследования миокардитов.

Согласно определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), миокардит – это воспалительное заболевание миокарда, которое сопровождается нарушением функции сердца и диагностируется на основании установленных гистологических, иммунологических и иммуногистохимических критериев (1995). Это же определение фигурирует в Европейских рекомендациях по диагностике и лечению миокардита 2013 года, [68]. В работах отечественного исследователя Н.Р. Палеева с соавт. встречается более развёрнутое определение миокардита – поражение сердечной мышцы преимущественно воспалительного характера,

обусловленное непосредственным или опосредованным через иммунные механизмы воздействием инфекции, паразитарной или протозойной инвазии, химических или физических факторов, а также возникающих при аллергических и аутоиммунных заболеваниях, [28, 29].

В работе Моисеева В.С. с соавт. указывается, что термин «миокардит» нужно использовать, когда «доказано или обоснованно предполагается наличие воспалительных изменений миокарда инфекционной природы», [26]. Однако ряд отечественных авторов (Благова О.В., Недоступ А.В. и др.) считают, что проследить и выделить чётко иницирующую роль инфекционных заболеваний в генезе миокардитов невозможно, особенно в случаях хронического миокардита, в патогенезе которого присутствуют аутоиммунные процессы, [3].

1.1.1. Распространённость миокардита

В последнее время во всём мире заболеваемость миокардитом неуклонно растёт. В 1950-х годах частота миокардита по данным аутопсии составляла 4-9% [97], в 1970-х годах - 3-10%, [133]. При проведенном в 2013 году исследовании 385 сердец в 18% определялись воспалительные инфильтраты в миокарде, [186].

Современное представление о частоте миокардитов базируется на крупных регистрах зарубежных авторов. А. Frustaci с соавт. с 1983 по 2016 годы исследовали 4582 миокардиальных биоптата и в 37,4% случаев обнаружили миокардит. В другом исследовании 3055 миокардиальных биопсий, выполненных по различным показаниям, в 17,2% случаев выявлен миокардит, [106].

В исследовании биоптатов 190 пациентов с ИА проведено распределение по нозологиям следующим образом: 1) хронический инфекционно-иммунный миокардит (75,7%); 2) генетическая кардиомиопатия (7,9%); 3) сочетание генетических заболеваний с

миокардитом (9,5%); 4) изолированная миокардиодистрофия (1,6%); 5) собственно ИА (5,3%), [6].

Смертность при миокардитах составляет, в среднем, 1-7%, [36]. Причинами смерти являются внезапная сердечная смерть (ВСС), прогрессирующая сердечная недостаточность, аритмии. Среди детей и подростков в 2015 году миокардит стал причиной 12% ВСС (1 случай на 200000 населения в год), у взрослых в мире в 2015 году зарегистрировано 1,56 миллиона случаев острого миокардита, [150]. По данным Peretto G. et al., доля миокардита, не диагностированного при жизни и обнаруживаемого при аутопсии, колеблется от 9 до 44%. При этом у младенцев составляет 2%, у детей - 5%, у спортсменов моложе 40 лет – 4-8%, [146]. По данным литературы, от 2 до 42% случаев внезапной сердечной смерти развивается у больных с миокардитом, [68].

1.1.2. Классификация миокардита

Академик Палеев Н.Р. в своих исследованиях отмечал, что создать единую общепринятую классификацию затруднительно, поскольку патогенетические механизмы до сих пор не до конца ясны, [28, 29].

Первую чёткую классификацию миокардитов предложил Г.Ф. Ланг в 1935 году на XII съезде терапевтов, однако в ней отсутствовали аллергические формы и не были описаны патогенетические особенности различных миокардитов, [22]. В 1951 году Kaufman рассматривал 2 основные группы миокардитов – паренхиматозные и интерстициальные (которые делил на экссудативные и продуктивные). В 1955 году Sydell впервые разработал патогенетическую классификацию, которая включала первично-инфекционные, постинфекционно-гиперергические, аллергические и вследствие нарушений обмена веществ (однако эту группу многие авторы относят к миокардиодистрофиям), [12].

В дальнейшем различными авторами были разработаны классификации, основанные на этиологии (Friedberg, Saphir). Позднее, в 1962 году, Ionas была предложена новая классификация миокардитов, где особое место выделялось патогенезу: миокардиты, при которых микроорганизмы находятся в миокарде; миокардиты, развивающиеся под воздействием токсинов и аллергенов; изолированный миокардит неизвестной этиологии, [13]. Однако и в этой систематизации был ряд недостатков, в частности, не указан ревматический миокардит.

В 1963 году отечественный терапевт-кардиолог А.А. Кедров опубликовал этиопатогенетическую классификацию миокардитов, которой долгое время пользовались во всем мире: гнойничковые, инфекционно-аллергические, токсико-аллергические, ревматические, [14]. Данная систематизация имела как достоинства (выделение ревматического миокардита в отдельную группу), так и недостатки (отсутствие первично-аллергических форм), и позднее претерпела некоторые изменения (из неё был исключен токсико-аллергический миокардит), [12].

В классификации В.А. Максимова (1966 год) рассматривались как ревматические, так и неревматические миокардиты с установлением этиологии и описанием патогенеза, клинических особенностей и течения заболевания. В данной системе был только один недочет – недостаточная роль отводилась инфекционному агенту, [23].

В 1968 году И.М. Ганджа и И.П. Лернер разработали классификацию аллергических миокардитов, которые были разделены на 3 группы: доброкачественные (протекающие латентно); затяжные (склонные к рецидивированию); злокачественные (резистентные к лечению и приводящие к летальному исходу), [12].

Теодори М.И. в 1972 году создал классификацию в зависимости от течения (острые, подострые, хронические и латентные) и в зависимости от роли аллергической составляющей в патогенезе (беспорный, вероятный и возможный аллергический генез). Кроме того, автор впервые выделил в

отдельную группу идиопатический миокардит Абрамова-Фидлера (во всех более ранних классификациях эта форма рассматривалась как крайняя степень проявления любого миокардита) и описал 5 форм этой нозологии: асистолическую, тромбоэмболическую, аритмическую, псевдокоронарную, смешанную, [39].

Одну из наиболее подробных систематизаций предложили П.Н. Юренев и Н.И. Семенович (1972 год). Авторы разделили миокардит по этиологии, патогенезу, течению, морфологии, распространению, клиническим проявлениям, форме. И, наконец, отдельно авторами был описан первичный аллергический миокардит, [45].

В 1978 году Я.Л. Рапопорт разработал гистологическую классификацию миокардита: паренхиматозный, дистрофический, воспалительно-инфильтративный, некротический (деструктивный), гигантоклеточный, [30].

Гуревич М.А. опубликовал в 1979 году одну из наиболее детальных классификаций миокардита, которую дополнил в 1996. Автора крайне подробно описал возможные этиологические агенты и патогенетические варианты миокардитов, [9].

С.И. Саксонов с соавторами в 1987 году описали степени тяжести миокардита: легкая форма (отсутствие недостаточности кровообращения, границы сердце не расширены); средняя и тяжелая формы (наличие недостаточности кровообращения, перикардит), [34].

В 1982 году впервые была опубликована отечественная детальная классификация Н.Р. Палеева с соавторами, которая была несколько изменена в 2002 году. Авторы разделяли миокардиты по этиологии и патогенезу на инфекционно-иммунные и иммунные, аутоиммунные и токсико-иммунные; по распространённости на очаговые и диффузные; по клиническому варианту – псевдокоронарный, декомпенсационный, псевдоклапанный, аритмический, тромбоэмболический, смешанный, малосимптомный; по варианту течения – острый миокардит легкого течения, острый миокардит тяжёлого течения,

рецидивирующий и хронический; по морфологии – альтеративный и экссудативно-пролиферативный. В течение многих лет в России остаётся актуальной именно эта классификация.

В 2013 году Европейское общество кардиологов разработало рекомендации по диагностике и лечению миокардита, в которых была изложена современная классификация миокардитов, [68]. В России и за рубежом наиболее часто применяется классификация Lieberman, в которой миокардит делится на 6 форм: молниеносный, острый, хронический активный, хронический персистирующий, гигантоклеточный, эозинофильный, [3].

В настоящее время в клинике выделяют три варианта хронического миокардита. Аритмический вариант (АВ) характеризуется наличием у пациента аритмий без предшествующей ишемии миокарда и отсутствия поражения коронарных артерий. Для декомпенсированного варианта (ДВ) характерно развитие дилатации камер сердца. Смешанный вариант (СВ), который встречается в клинической практике реже всего, протекает с нарушениями ритма сердца и дилатацией камер сердца.

1.1.3. Этиология хронического миокардита

В современных рекомендациях по диагностике и лечению миокардитов к этиологическим агентам относят инфекционные, иммунные факторы, эндокринные нарушения, токсические воздействия, [112].

Наиболее частым этиологическим фактором неревматических миокардитов являются инфекции, [15, 28, 68, 82, 107, 111, 150]. Инфекционные агенты подразделяются на вирусные, бактериальные, грибковые, паразитарные, риккетсиозные, протозойные, спирохетозные, [15, 88, 112]. Наиболее часто миокардиты вызываются вирусами, персистенция которых в крови и в миокарде ассоциируется с прогрессированием желудочковой дисфункции (стойким и зачастую резистентным к стандартной

терапии снижением фракции выброса левого желудочка, аритмиями) и, как следствие, ухудшением состояния пациента, [43, 117].

Вирусные миокардиты

В настоящее время известно, что большинство случаев некоронарогенной патологии миокарда ассоциировано именно с вирусной инфекцией, [42, 64, 117, 184]. По данным литературы, развитие миокардита инициируют самые различные типы вирусов. Вирусный геном обнаруживается, в среднем, в 25-40% биоптатов сердца у пациентов с клинически выраженным миокардитом, [67, 68, 111, 136, 146]. В Европе и Северной Америке вирусная этиология миокардитов и кардиомиопатий подтверждается примерно в 75% случаев, [126]. Преобладающими возбудителями поражений сердца считают вирусы Коксаки А и В (особенно В3 и В5), аденовирусы, парвовирус В19, а также герпес-вирусы (вирус герпеса человека типа 6, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус, вирус простого герпеса 1, 2 типа). Реже в качестве инфекционных агентов отмечаются вирус гриппа, гепатита С, иммунодефицита человека, [3, 38, 42, 109, 136, 150, 159].

От 10-20% до 30-50% всех миокардитов вызваны воздействием энтеровируса, в частности, вируса Коксаки В, [2, 28, 44, 49, 120, 129, 136, 150, 184]. Классификация энтеровирусов, которые относятся к семейству Picornaviridae, включает 5 групп: полиовирусы, вирусы Коксаки А и Коксаки В, ЕСНО-вирусы, энтеровирусы, [47, 115]. В исследовании Bowles NE et al. методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) биоптатов миокарда от 624 детей и взрослых с острым миокардитом геном энтеровирусов обнаруживался в 14%, [62]. Энтеровирусная инфекция является острым инфекционным заболеванием, вызванным кишечными вирусами, [2, 8, 10, 31]. Энтеровирус реплицируется в эпителиальных клетках и лимфоидных образованиях верхних дыхательных путей и кишечника и гематогенно достигают различных органов-мишеней, соответственно тропизму каждой таксономической единицы, [2, 85, 136, 182]. Миокардит, энцефаломиокардит

и перикардит вызываются вирусами Коксаки группы В (серотип 1-5), реже ЕСНО-вирусами (1, 4, 6, 9, 14, 19, 30 серотипы), ещё реже вирусами Коксаки группы А (2, 4, 8, 9, 16 серотипы), [2, 46, 76, 138, 141]. Вирус Коксаки В обладает тропизмом к поперечно-полосатой мускулатуре, и обычно заболевание начинается с миалгии, а через 2 недели развивается миокардит, [2, 8, 136]. Кроме кардиальных симптомов, часто отмечаются признаки перикардита и плеврита. У пожилых людей признаки миокардита появляются постепенно, сопровождаются кардиалгией, что определенным образом затрудняет диагностику, так как заболевание часто расценивается как ишемическая болезнь сердца, [35, 42, 152]. Энтеровирусы вызывают гибель кардиомиоцитов двумя путями. Первый механизм реализуется через действие энтеровирусной протеазы 2А дистрофин (белок мембраны кардиомиоцита), вызывая нарушение цитоскелета клетки, [54]. Вторым механизмом является атака Коксаки-вирусом специфического рецептора CAR (coxsackievirus-adenovirus receptor) для проникновения в клетку. CAR-рецептор принадлежит к белку семейства иммуноглобулинов с двумя внеклеточными Ig-подобными доменами. CAR-рецептор экспрессируется в головном мозге, сердце, кишечнике и поджелудочной железе, [91, 94, 178]. Содержание CAR в кардиомиоцитах человека может варьировать, и считается, что низкая экспрессия данного рецептора ведет к устойчивости организма (и в частности, тканей сердца) к адено- и энтеровирусной инфекции. И наоборот, стимуляция иммунной системы может повышать экспрессию CAR, что ведет к повышению восприимчивости тканей-мишеней к вирусам, [169]. Кроме того, при энтеровирусной инфекции токсины поражают сосуды, что ведет, в конечном итоге, к повышению проницаемости их стенки, стазу эритроцитов, микротромбозу и, как следствие, развивается гипоксия ткани, дистрофия миокарда, очаги некроза. Вирусная персистенция в миокарде приводит к хроническому воспалению и развитию дилатационной кардиомиопатии, [37, 42]. В середине XX века воспалительные заболевания сердца были, в основном, связаны с вирусом Коксаки типа В, однако к 1995

году на первое место по частоте вышли миокардиты, вызванные аденовирусом, [156].

Аденовирус часто определяется в эндомикардиальных биоптатах, [42, 49, 129, 157, 159]. В вышеупомянутом исследовании Bowles NE et al. аденовирусный геном обнаруживался в 23%, [62]. Аденовирусная инфекция относится к группе острых респираторно-вирусных инфекций и составляет 10-15% в их структуре. Аденовирус является ДНК-содержащим вирусом из рода *Mastadenovirus*, который характеризуется способностью к длительной персистенции в организме, что приводит к развитию хронического поражения клеток с периодическими обострениями, [31]. Существует около 80 серотипов аденовируса. Обычно вирус вызывает лёгкие инфекционные поражения верхних дыхательных путей, конъюнктивы глаз, желудочно-кишечного тракта, [42, 125, 157]. Однако у детей с несовершенным гуморальным иммунитетом или у взрослых с ослабленным иммунным ответом могут развиваться миокардиты, колиты, панкреатиты, циститы, нефриты и энцефалиты. Аденовирус обладает тропизмом к конъюнктиве и эпителию верхних дыхательных путей. Для проникновения в клетку аденовирус связывается со специфическим рецептором CAR или рецептором CD-46. Вирус реплицируется в ядре клетки, используя аппарат репликации хозяина. При поражении миокарда методом ПЦР наиболее часто обнаруживается геном аденовирусов серотипов 2 и 5, [42, 98, 122, 125]. С 2000-х годов у больных миокардитом в крови и в эндомикардиальных биоптатах наиболее часто выделяют парвовирус В19 и вирус герпеса человека 6 типа, [13, 43, 156].

Человеческий парвовирус В19 относится к семейству *Parvoviridae*, семейство эритровирусов, репликация которых происходит в клетках костного мозга и в предшественниках эритроцитов, [43, 49, 59, 102, 130, 163, 166]. Парвовирус В19 вызывает полиорганные поражения (миокардиты, артриты, эндотелиальная дисфункция и васкулиты, гепатиты, апластическая анемия, неврологические нарушения), [92, 116, 135, 137, 163, 167]. В 2005

году Tschöpe С. с соавт. при исследовании эндомикардиальных биоптатов у пациентов с диастолической дисфункцией обнаружили, что в 84% случаев в миокарде выявляется геном парвовируса В19, однако выборка пациентов была небольшой – 37 случаев, [172]. В том же 2005 году Kuhl U. с соавт. провели подобное исследование в Германии: из 245 пациентов с дилатационной кардиомиопатией методом ПЦР в 51,4% случаев был обнаружен геном парвовируса В19, [117]. В 2010 году Vock С.Т. с соавт. обнаружили кардиотропный парвовирус В19 в 64,7% пациентов с доказанным клиническим миокардитом или дилатационной кардиомиопатией (при этом выборка составила 498 случаев), [59]. По данным исследования Щедриной А.Ю. с соавт., у 56,4% пациентов с воспалительной кардиомиопатией обнаруживался парвовирусный геном (выборка составила 38 случаев), [42]. В исследованиях США вирусная нагрузка пациентов с миокардитом распределяется следующим образом (из 38% вирус-положительных пациентов): 22,8% - аденовирус, 13,6% - энтеровирус и 1% - парвовирус В19, [62]. Клеточным рецептором для внедрения парвовируса является Р-антиген группы крови, который располагается на эритроцитах, эритроблестах, мегакариоцитах, клетках эндотелия, миокарда и печени плода. Немаловажным является тот факт, что в кардиомиоцитах взрослого человека данный рецептор отсутствует, [42, 130]. Р-антиген связывается с оболочкой парвовируса В19, однако транслокация вириона в клетку возможна только при участии корецепторов - белка Ки80 и интегрина $\alpha 5\beta 1$. Внедрение парвовируса В19 через рецептор активирует иммунные сигнальные системы (тирозинкиназы p56lck), что способствует активации адаптивного и врожденного иммунного ответа. Это приводит к эндотелиальной дисфункции и вентрикулярному ремоделированию с развитием дилатационной кардиомиопатии. Также парвовирус обладает способностью к репликации в эндотелиальных клетках, что ведёт к прогрессированию дисфункции эндотелия и усугублению нарушения микроциркуляции и некроза кардиомиоцитов, [32, 43, 51, 61, 114, 124, 149,

153]. По данным литературы, помимо дисфункции эндотелия, парвовирус приводит к формированию периваскулярной инфильтрации сердца Т-лимфоцитами и макрофагами, [65]. В исследовании Воск СТ с соавторами показана решающая роль парвовируса В19 в развитии гистологически подтвержденного миокардита. При этом, в статье указано, что данный вирус может реактивироваться герпесвирусной инфекцией, которая сама так же вызывает воспаление сердечной мышцы, [60].

Вирус герпеса относится к ДНК-содержащим вирусам. Семейство герпес-вирусов включает следующие единицы: вирусы простого герпеса 1 и 2 типа, вирус *Varicella-Zoster*, цитомегаловирус, вирус герпеса человека 6 и 7 типа, вирус Эпштейн-Барр и вирус саркомы Капоши, [49, 95]. Кардиотропными являются все представители семейства, наиболее редко миокардит вызывают вирус *Varicella-Zoster*, [86, 129, 140]. Наиболее часто из ДНК-содержащих вирусов вызывают миокардит вирусы герпеса 1 и 2 типа и цитомегаловирус, который тропен к эндотелию сосудов, [41, 87, 96]. Вирус герпеса опасен тем, что почти всё взрослое население инфицировано латентно. Вирус соединяется с клеткой-мишенью путём связывания с клеточным поверхностным рецептором. Вирусный капсид достигает ядра и высвобождается в него через ядерные поры, [123]. Чаще всего встречаются изолированные поражения внутренних органов (печени, почек, поджелудочной железы, сердца) с развитием гепатита, нефрита, панкреатита и миокардита. В литературе описаны редкие случаи сочетанного герпес-вирусного воспаления внутренних органов, например, острого гепатита и острого лимфоцитарного миокардита. При этом активный воспалительный процесс подтверждается морфологической диагностикой (исследованием биоптатов сердца и печени), [181]. Кроме того, в экспериментах на животных было доказано, что комбинация герпес-вирусов с другими инфекционными агентами (например, бактериями) вызывает более выраженные воспалительные реакции, [68].

Миокардиты, вызванные другими инфекционными агентами

В настоящее время врачами и исследователями доказано, что бактериальные миокардиты развиваются значительно реже, чем вирусные. Несмотря на это установлено, что практически любой бактериальный агент может вызывать миокардит с исходом в хроническую его форму. Среди бактериальных агентов при миокардитах встречаются хламидии, коринебактерии, легионеллы, микобактерии туберкулеза, микоплазмы, стафилококки, стрептококки серогруппы А и пневмококки. Основное количество случаев бактериального миокардита связывают с сепсисом и первичным очагом бактериальной инфекции в эндокарде. Однако в последнее время в литературе встречаются описания случаев миокардита, вызванного прямым действием метициллин-резистентного стафилококка или туберкулезной палочки. Причем большинство этих случаев заканчиваются летальным исходом от разрывов желудочков или фатальных аритмий, [36, 68, 150].

Из простейших наиболее часто поражение сердечной мышцы вызывают *Trypanosoma cruzi* (при болезни Шагаса), *Toxoplasma gondii*. Случаи протозойных миокардитов нередки в Центральной и Южной Америке, иногда встречаются по всему миру вследствие миграций населения. Данный вид миокардитов характеризуется развитием характерных гранулём в ткани сердечной мышцы, [68, 150].

К паразитарным инфекциям, которые могут быть ассоциированы с миокардитам, относят трихинеллез и эхинококкоз, [36].

Инфекционные агенты из группы грибов – это возбудители кандидоза, криптококкоза и аспергиллёза, которые встречаются в виде оппортунистических инфекций и способны вызывать миокардит, в основном, у иммуноослабленных пациентов, [36, 68, 150].

1.1.4. Патогенетические аспекты развития хронического миокардита

При миокардитах пусковым механизмом возникновения воспаления являются внедрение вируса в миокард и развитие инфекционного процесса. Для хронизации воспаления необходимо наличие внутриклеточной инфекции, очагов инфекции и изменения иммунной системы организма. В литературе описано 4 патогенетических механизма повреждения кардиомиоцитов инфекционными агентами, [36, 68].

Первый механизм реализуется через прямое кардиомиоцитолизическое действие возбудителя, вследствие его инвазии и репликации в миокарде. Второй механизм – клеточное повреждение циркулирующими токсинами – характерен для системной инфекции. Третий механизм: неспецифическое клеточное повреждение вследствие генерализованного воспаления. Четвертый патогенетический путь связан с клеточным повреждением из-за продукции гуморальной иммунной системой факторов в ответ на воздействующий агент, т.е. имеет место инфекционно-иммунный процесс. В настоящее время именно четвертый механизм связывают с развитием вирусного миокардита. Процесс запускается антигеном, и далее поддерживается вновь вырабатываемыми аутоантигенами или антигенами кардиомиоцитов, которые гомологичны иницирующим антигенам возбудителя. Развивается продолжающаяся иммунная стимуляция повреждения. При этом, активность процесса сохраняется долгое время даже после устранения иницирующего агента. Заболевание развивается в том случае, если в миокард проникает кардиотропный штамм вируса. В экспериментах установлено, что кардиовирулентность вируса может быть кодируемым процессом, картированы первые участки (VP2 или капсидный белок 1В и CVB3 5' NTR), мутации или удаление которых приводит к резкому ослаблению кардиовирулентности вируса, [36].

Миокардит, как любое заболевание, характеризуется стадийностью течения:

1. Стадия виремии достаточно непродолжительна и занимает от нескольких часов до нескольких суток. Внедряясь в миокард, вирус фиксируется на поверхностных рецепторах кардиомиоцитов, затем проникает в ядро клетки. При этом активизируются защитные механизмы организма, что сопровождается увеличением выработки интерферона. Также выделяются вирус-нейтрализующие антитела (Ig M). Далее активируются корцепторы киназы тирозина p56M, связанные с DAF (decay-accelerating factor), макрофаги и Т-лимфоциты, что стимулирует иммунные реакции. CD95-цитолитические Т-лимфоциты (субпопуляция Т-лимфоцитов) способны распознавать DAF- и CAR-молекулы клеток, инфицированных вирусом, и уничтожать их с помощью вырабатываемых цитокинов или порфиринопосредованного цитолиза. В крови циркулируют IgG (антикардиальные антитела), которые вырабатываются CD22-положительными В-лимфоцитами и которые в присутствии Т-лимфоцитов или компонентов комплемента вызывают цитолиз. Через 10–14 дней после начала заболевания воспаление постепенно стихает, вирусы в миокарде не обнаруживаются. Персистенция вирусной ДНК/РНК может определяться ещё в течение 90 дней после инокуляции.

2. Аутоиммунная стадия наступает при длительном присутствии антигена в миокарде или при дефектах иммунной системы. При этом утрачивается специфичность заболевания. Увеличивается выработка антикардиальных антител, усиливаются клеточные иммунные реакции, в крови появляются циркулирующие иммунные комплексы, которые фиксируются в сердечной мышце. Антикардиальные антитела направлены против белков сарколеммы, ламинина, десмина, промежуточных филаментов, тропонинов, в некоторых случаях против ацетилхолиновых рецепторов. Также, циркулируют антитела, направленные на клетки проводящей системы (синоатриального и атриовентрикулярного узлов) и

волокон Пуркинье. Кроме того, непрерывно происходит активация медиаторов воспаления, высвобождение лизосомальных ферментов, молекул адгезии, простагландинов, ацетилхолина, серотонина, брадикинина, кининов, гепарина, гистамина. Все медиаторы приводят к повреждению сосудов микроциркуляторного русла в виде повышения их проницаемости, отека стенки, геморагии. Развивается длительная гипоксия миокарда с микронекрозами, активизируются апоптотические процессы. С 5–6-го дня заболевания начинается синтез коллагеновых волокон и на 10–14-е сутки достигает своего максимума. Все вышеперечисленные факторы способствуют развитию дисфункции миокарда (повышение конечно-диастолического объёма левого желудочка, повышение давления в левом предсердии и лёгочных венах, развитие сердечной недостаточности). Если течение миокардита благоприятно, то в ткани уменьшается интерстициальный отек, клеточная инфильтрация, формируются участки фиброзной ткани, т.е. наступает выздоровление.

3. Стадия хронического воспаления наступает при неблагоприятном развитии событий. Постепенно развивается кардиосклероз, формируется кардиомегалия, усугубляется сердечная недостаточность, [36, 66, 67, 69, 127, 150].

Свой вклад в патогенез миокардита вносят и медиаторы воспаления. Фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), с одной стороны, снижает степень выраженности вирусной нагрузки, но, с другой стороны, повышает выраженность иммунного ответа и вероятность наступления летального исхода. Оксид азота, кроме того, что подавляет репликацию вируса, также усиливает повреждение кардиомиоцитов. Toll-подобные рецепторы (а также фактор дифференциации миелоида MyD88) минимизируют возможность репликации вируса в миокарде, а также способствуют развитию воспаления в сердечной мышце. Компоненты комплемента не только усиливают иммунный ответ, но и регламентируют переход в дилатационную кардиомиопатию, [15].

Кроме этого, вклад в патогенез миокардита могут вносить экстракардиальные факторы:

- гипоксемия из-за обструктивного бронхита, пневмонии, респираторного дистресс-синдрома взрослых либо нейропатических нарушений дыхания;
- циркуляторная гипоксия, развивающаяся вследствие гиповолемии и снижения насосной функции сердца;
- гемическая гипоксия;
- нарушения вегетативной иннервации сердца.
- ДВС-синдром;
- недостаточность надпочечников, [15].

1.1.5. Морфология хронического миокардита

Гистологическая характеристика

Эндомиокардиальная биопсия (ЭМБ) впервые была проведена в 1958 году М. Weinberg, [177]. В настоящее время ЭМБ отнесена в международной литературе к «золотым стандартам» диагностики эндомиокардиальных заболеваний, [11, 50, 70, 84, 88, 93, 161]. Однако результат и постановка окончательного диагноза зависит от места выборки образцов ЭМБ, [33, 57, 150]. Воспаление миокарда может быть диффузным или очаговым, морфологические изменения могут быть локализованы как в мышечных клетках, так и в интерстиции. Морфологически воспаление начинается с дистрофических процессов в кардиомиоцитах, к которым в дальнейшем присоединяются воспалительная инфильтрация и дезорганизация соединительной ткани.

Исследователи за рубежом выделяют несколько морфологических вариантов миокардита на основании состава клеток инфильтрата (Таблица 1), [79, 80, 155].

Таблица 1 - Морфологическая классификация миокардита

Вариант	Характеристика
Лимфоцитарный	<ul style="list-style-type: none"> ○ наиболее частый вариант; ○ вирусопозитивный или вируснегативный; ○ часто присоединяется перикардит.
Гигантоклеточный	<ul style="list-style-type: none"> ○ описан в 1905 г. С. Салтыковым; ○ установлена связь развития с инфекциями, аутоиммунными заболеваниями; ○ выявлены генетические особенности; ○ отмечается неблагоприятный прогноз и течение.
Гиперсенситивный	<ul style="list-style-type: none"> ○ развитие связано с применением лекарственных средств; ○ воспалительный инфильтрат представлен эозинофилами, [19].

В 1985 году 8 американских специалистов рабочей группы по изучению миокардитов приняли стандарт морфологической диагностики миокардита, известный во всем мире как Далласские критерии [52, 150, 160]. Изначально в Далласских критериях оценка гистологического препарата производилась в поле зрения, однако в 1997 году критерии были дополнены Марбургским соглашением комитета экспертов ВОЗ, и оценка производится на площадь препарата 1 мм², [72, 78, 128, 131]. Согласно обновлённым Далласским критериям при первой биопсии диагноз активного (острого) миокардита ставится при обнаружении трёх признаков:

- воспалительного инфильтрата (не менее 14 инфильтрирующих лимфоцитов на 1 мм², преимущественно CD3+T-лимфоциты и до 4 макрофагов);
- выраженного некроза и/или миолиза;
- фиброза (не во всех случаях).

Диагноз пограничного (хронического) миокардита ставится при наличии инфильтрата (не менее 14 лимфоцитов на 1 мм², до 4 макрофагов); некроз и миолиз не выражены, возможен фиброз.

Отсутствие миокардита, по Далласской классификации, соответствует отсутствию воспалительного инфильтрата (либо инфильтрирующих клеток менее 14 на 1 мм²).

Рекомендовано выделять активный миокардит с фиброзом и без него, хронический миокардит также с фиброзом и без него.

Далласская классификация периодически подвергается жёсткой критике. Воспаление миокарда может носить «пятнистый» характер, и добиться взятия ЭМБ в необходимом месте, подозрительном на магнитно-резонансной томограмме (МРТ), крайне сложно. Также, для качественной диагностики необходимо брать не менее 4 образцов ЭМБ, полная достоверность достигается оценкой 8-10 биоптатов. Кроме того, результат биопсии сильно варьируется в зависимости от места выборки образца и от квалификации врача-патологоанатома. Всё это повышает вероятность возникновения ложноотрицательных результатов, [40, 150, 156]. Vaughman KL в своей работе «Смерть критериев Далласа» утверждает, что данные гистопатологические градации миокардитов устарели и требуют пересмотра, поскольку высока вариабельность экспертной интерпретации, частота ошибки выборки и расхождение с другими маркерами нарушений работы сердца. Он приводит данные Chow LH с соавт. и Nauck AJ с соавт., которые сообщали, что у пациентов, умерших от миокардита, положительный результат биоптатов наблюдался только в 25% случаев, [56, 75, 101].

Согласно клиническим рекомендациям Министерства здравоохранения Российской Федерации, диагноз миокардита ставится при наличии воспалительного инфильтрата в пределах миокарда, ассоциированного с дегенерацией и некрозом кардиомиоцитов неишемического генеза. При этом чётко определены иммуногистохимические критерии: наличие более 14 лейкоцитов на 1 мм², в том числе до 4 моноцитов на 1 мм², с наличием CD3+ Т-лимфоцитов более 7 на 1 мм², [15].

Иммуногистохимическая характеристика

Стандартная иммуногистохимическая диагностика миокардита включает характеристику клеточного воспалительного инфильтрата. Для подтверждения диагноза используются следующие маркёры:

1) CD3 – белковый комплекс на поверхности Т-лимфоцитов, который является основным корецептором Т-клеточного рецептора. Данный маркёр используется для верификации миокардита и входит в обновлённый вариант Далласских критериев. Обнаружение ≥ 7 CD3+ Т-лимфоцитов позволяет поставить диагноз «Активный миокардит». Количество CD3+ Т-лимфоцитов также подсчитывают при иммунологическом исследовании крови. По данным литературы, в крови больных миокардитом среди всех лимфоцитов наибольшее количество – это субпопуляция лимфоцитов с антигенной детерминантой CD3+, [16].

2) CD20 – белок, корецептор, расположен на поверхности В-лимфоцитов. Участвует в активации и пролиферации В-лимфоцитов, исчезает при терминальной дифференцировке В-клетки в плазмоцит.

3) CD45 – общий лейкоцитарный антиген идентифицирует лимфоциты;

4) CD68 – маркер моноцитов и гистиоцитов, экспрессируется в цитоплазме моноцитов, макрофагов, тучных клеток, остеобластов, [24].

Кроме стандартных маркёров используются дифференциально-диагностические:

1) Молекулы адгезии ICAM-1, VCAM-1 – маркёр активации эндотелия при миокардите, [147];

2) Винкулин является белком вставочных пластинок, исчезает при тяжёлом миокардите, [134];

3) Дистрофин ассоциирован с мембраной кардиомиоцитов, его содержание снижается при Коксаки-вирусном миокардите, [119].

Этот список в последние годы был дополнен toll-like рецепторами (TLR) - семейством рецепторов врожденного иммунитета, которые находятся

на поверхности иммунокомпетентных клеток (макрофагов, лимфоцитов) и активируются под воздействием различных инфекционных агентов, а также участвуют в патогенезе многих инфекционно-иммунных заболеваний, [20]. TLR-семейство идентифицировано в 1984 году у плодовой мухи *Drosophila melanogaster*. TLR экспрессируются в различных клетках сердца: кардиомиоцитах, эндотелиальных клетках сосудов, гладких миоцитах, [184]. На сегодня у человека известно 10 типов TLR, которые через белки-адаптеры запускают синтез провоспалительных цитокинов и индукцию генов, ответственных за воспалительный ответ клетки. Строение и функция TLR способны влиять на характер ответа макроорганизма на инфекции (в том числе вирусные), [20]. Помимо этого, по данным литературы, известно, что TLR 4 типа играют роль в развитии аутоиммунного энцефаломиелита, системной красной волчанки, ревматоидного артрита, [74]. Высказывается предположение, что TLR 4 типа резидентных иммунных клеток миокарда активируются патоген-ассоциированными молекулярными структурами вирусов и запускают воспалительный процесс сердечной мышцы, стимулируя выработку провоспалительных цитокинов, [63, 184]. Кроме того, TLR4 активирует MyD88-независимый путь и дополнительно способствует экспрессии ИФН- β , оказывая противовирусное действие и усиливая защитный механизм и процесс восстановления ткани миокарда, [184]. В литературе отмечается, что установлена достоверная корреляция степени активности миокардита и TLR: максимальный уровень экспрессии TLR отмечен у больных с активным миокардитом. При этом низкая экспрессия определялась не только у пациентов без миокардита, но и у больных с пограничным миокардитом, [20]. Fairweather et al. сообщил, что TLR4-дефицитные мыши более устойчивы к коксакивирусной инфекции со сниженными воспалительными реакциями, вирусной репликацией и миокардитом по сравнению с мышами дикого типа, [90, 184]. Некоторые исследования показали, что ингибирование сигнальных путей TLR4 может ослаблять воспалительные реакции и апоптоз кардиомиоцитов сердца после

повреждения миокарда, [175, 184]. Оценка цитоплазматической активности TLR производится по степеням: 1 степень – 1-10% позитивно окрашенных кардиомиоцитов, 2 степень – 11-30%; 3 степень – 31-60%; 4 степень – более 60%. У пациентов с воспалительным процессом в миокарде превалирует 4 степень активности TLR, [74].

Детекция вирусного генома в миокарде

Идентификация вирусного генома производится, чаще всего, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), [3, 27, 148, 174]. Комбинация методов ЭМБ и ПЦР значительно облегчает диагностику миокардиту. ПЦР – метод амплификации минимального количества молекул в 1 млн раз и более, который используется для идентификации ДНК/РНК вирусов в миокарде и в крови. Разработано огромное количество анализов ПЦР, более чувствительных к ДНК/РНК вирусов в миокарде, чем стандартные иммуногистохимические диагностические методы определения вирусных белков, [129, 144]. Наряду с достоинствами, метод ПЦР обладает недостатками. Техника ПЦР позволяет только выявить вирусный геном в миокарде без последующей дифференцировки типов инфицированных клеток. Также, методом ПЦР нельзя оценить активность репликации вируса, [129]. Кроме того, не представляется возможным исключить попадание генома вируса с клетками крови, которые всегда присутствуют в образцах ЭМБ, что даёт основание для ложноположительных по миокарду результатов. Устранить последнее помогает одновременное исследование методом ПЦР образцов крови и миокарда: вирусный генез миокардита подтверждается при вирус-негативных образцах крови и вирус-позитивном миокарде, [3, 69]. В литературе советуют всегда проводить одновременное исследование крови и миокарда методом ПЦР для исключения системного инфекционного процесса, [68, 129].

В дополнение к ПЦР иногда применяется метод гибридизации *in situ*, который позволяет определить точное местоположение ДНК/РНК в клетке

или ядре. К недостаткам относятся трудность в стандартизации и возможность неспецифической реакции, [3, 145].

Иногда для детекции вирусного генома в кардиомиоцитах используется метод лазерной микродиссекции с последующим ИГХ-типированием ДНК вируса в миокарде, что позволяет исключить попадание вируса из крови в миокард, [73], и метод секвенирования, способный выявить молекулярный механизм кардиотропизма вирусов, [69].

1.2. Миокардит при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2

1.2.1. Распространённость миокардита

Новая коронавирусная инфекция, вызванная SARS-CoV-2, включает широкий спектр осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы, в том числе, острую сердечно-сосудистую недостаточность, различные типы аритмий, миокардит, острый коронарный синдром и внезапную сердечную смерть, [158, 180]. По данным общемировой статистики, у 19 % пациентов, госпитализируемых с новой коронавирусной инфекцией, наблюдаются признаки поражения сердца (боли в грудной клетке, гипотензия, аритмия, признаки сердечной недостаточности). Причиной смерти при новой коронавирусной инфекции является дыхательная недостаточность, однако сердечно-сосудистая манифестация вносит свой вклад в общую смертность, [105, 121, 133, 143, 158, 183].

По данным литературы, остается неизвестным точное количество случаев вовлечения сердца у госпитализированных с новой коронавирусной инфекцией. Shi S. с соавт. при анализе причин смерти в 51% отмечают летальность от сердечных приступов. В этом самом крупном на данный момент когортном исследовании сообщается, что из 416 пациентов признаки поражения сердца наблюдались клинически у 19,7%, [158].

Для объяснения симптомов и лабораторных изменений чаще всего используется понятие «острое повреждение миокарда». В соответствии с последним европейским консенсусом относительно инфаркта миокарда (2018 г., [171]), острое повреждение может быть диагностировано на основании возрастания уровня биомаркеров (тропонина) в отсутствие ишемии, его морфологическим доказательством является гибель кардиомиоцитов. Очевидно, что это понятие является слишком общим; в частности, некроз миокарда в рамках тяжёлого (в том числе вирусного) миокардита также подпадает под это определение. Вместе с тем, при описании пациентов с коронавирусной инфекцией клиницисты стараются избегать термина «миокардит». Это связано в первую очередь с жесткой приверженностью европейских экспертов по болезням миокарда к обязательной морфологической и иммуногистохимической верификации миокардита, [81, 164].

В литературе крайне ограничено морфологическое описание миокардита у пациентов с новой коронавирусной инфекцией, вызванной SARS-CoV-2. Вероятно, это связано с небольшим количеством аутопсий пациентов с коронавирусной инфекцией. Отдельными авторами сообщается о нескольких случаях клинически диагностированного миокардита без гистологического подтверждения, [99, 104, 108, 185]. Описывается отдельный случай посмертной диагностики лимфоцитарного миокардита с гистологическим подтверждением у пациента из Италии, [154]. В статье Tavazzi G. с соавт. описывается случай сочетания кардиогенного шока и вирусного миокардита, подтверждённого биопсией. У данной пациентки в биоптате отсутствовали признаки некроза кардиомиоцитов, и вирус был обнаружен в макрофагах, но не в клетках миокарда, [170]. В сравнительно давнем исследовании 2009 года Oudit GY с соавторами приводят данные аутопсий 10 пациентов из Канады с атипичной пневмонией SARS-CoV-2. Вирусная РНК обнаружена в 35% образцов сердца, однако о типах

инфицированных клеток не сообщается. Кроме того, в миокарде этих пациентов описан макрофагальный инфильтрат, [142].

В ряде наших статей с соавторами описывается лимфоцитарный миокардит у пациентов с подтверждённой новой коронавирусной инфекцией, вызванной SARS-CoV-2. При этом детально проанализирован иммуногистохимический профиль клеточного инфильтрата, [4, 17, 18, 21, 58].

1.2.2. Этиология миокардита

Коронавирус SARS-CoV-2 содержит 4 структурных белка (S, E, M, N) и демонстрирует сильное связывание с ангиотензинпревращающим ферментом 2 типа (АПФ-2, ACE-2), выраженном в сердце, легких, кишечнике, печени, почках, головном мозге, [139, 168]. АПФ2 – это мембраноассоциированная пептидаза, которая высоко экспрессируется в эпителии кишечника, кардиомиоцитах сердца, эндотелии сосудов, пневмоцитах 1-го и 2-го порядка легких, альвеолярных макрофагах, подоцитах и эпителии канальцев почек, эпителии эндокринной и экзокринной паренхимы поджелудочной железы. В каскаде реакций ренин-ангиотензин-альдостероновой системы АПФ2 выполняет роль катализатора ангиотензина 2 (AT2), истощая его уровень и таким образом снижая сосудосуживающий эффект AT2. Кроме того, продукты деградации AT2 обладают вазодилатирующими, антифиброзными, антипролиферативными и противовоспалительными свойствами. Таким образом, в норме АПФ2 косвенно способствует вазодилатации. Избыточная экспрессия АПФ2 облегчает проникновение вируса в клетку и его репликацию. Инфекция запускается, когда белковый S-шип мембраны присоединяется к АПФ2 в районе участка протеазной активности, тем самым снижая действие АПФ2, происходит отщепление аминокислоты AT2 и его токсическое накопление, развивается мощный сосудосуживающий эффект,

который обуславливает острый респираторный дистресс-синдром и дыхательную недостаточность, [26, 56, 100].

1.2.3. Патогенетические аспекты миокардита

В литературе описаны разнообразные патогенетические механизмы повреждения миокарда при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, [21, 54]:

1) прямое повреждение миокарда, связанное с воздействием вируса на АПФ-2, [179];

2) развитие острого системного воспалительного ответа и цитокинового шторма с высоким уровнем провоспалительных цитокинов в крови;

3) повышение потребления кислорода миокардом из-за системной инфекции в сочетании с нарастающей гипоксией в крови из-за острого респираторного дистресс-синдрома;

4) ишемическое повреждение на фоне атеросклеротических изменений коронарных артерий (либо коронарита) и коагулопатии, ассоциированной с новой коронавирусной инфекцией, вызванной SARS-CoV-2;

5) электролитный дисбаланс (в частности, гипокалиемия), который развивается в результате воздействия вируса на ренин-ангиотензин-альдостероновую систему и способствует развитию тахиаритмий.

Zheng YY с соавт. приводит несколько основных механизмов поражения сердца при коронавирусной инфекции: связывание вируса в миокарде присутствующими там в большом количестве (как и в легких) рецепторами к ангиотензину 2 с последующей дисрегуляцией ренин-ангиотензин-альдостероновой системы; оксидативный стресс, индуцированный гипоксемией, с развитием внутриклеточного ацидоза и дисфункции митохондрий; поражение микроциркуляторного русла (повышенная проницаемость, ангиоспазм, микротромбозы с формированием

дефектов перфузии); синдром системного воспалительного ответа (цитокиновый шторм, неконтролируемое воспаление), [187].

Одним из наиболее частых проявлений поражения сердца при новой коронавирусной инфекции является аритмия. Синусовая тахикардия диагностируется у 16–72 % пациентов. Кроме того, отмечаются случаи брадиаритмии, острого коронарного синдрома и внезапной сердечной смерти, [49, 99, 179]. Возможная патофизиология аритмий при новой коронавирусной инфекции включает в себя, [162]:

- прямое повреждение кардиомиоцитов, нарушающее цитоплазматическую мембрану и, следовательно, электропроводимость;
- инфицирование перикарда с массивным отёком;
- ишемию вследствие коронарита;
- повторные эпизоды аритмии вследствие фибротических процессов в миокарде;
- аритмогенные провоспалительные цитокины (например, ИЛ-6 вызывает смещение плакоглобина – белка десмосом кардиомиоцитов).

Первые три сценария развиваются в острую фазу повреждения сердца и характеризуются, чаще всего, возникновением суправентрикулярных тахи- и брадиаритмий. Аритмии вследствие фиброза или воздействия цитокинов возникают в хроническую фазу в виде вентрикулярных тахиаритмий, [162].

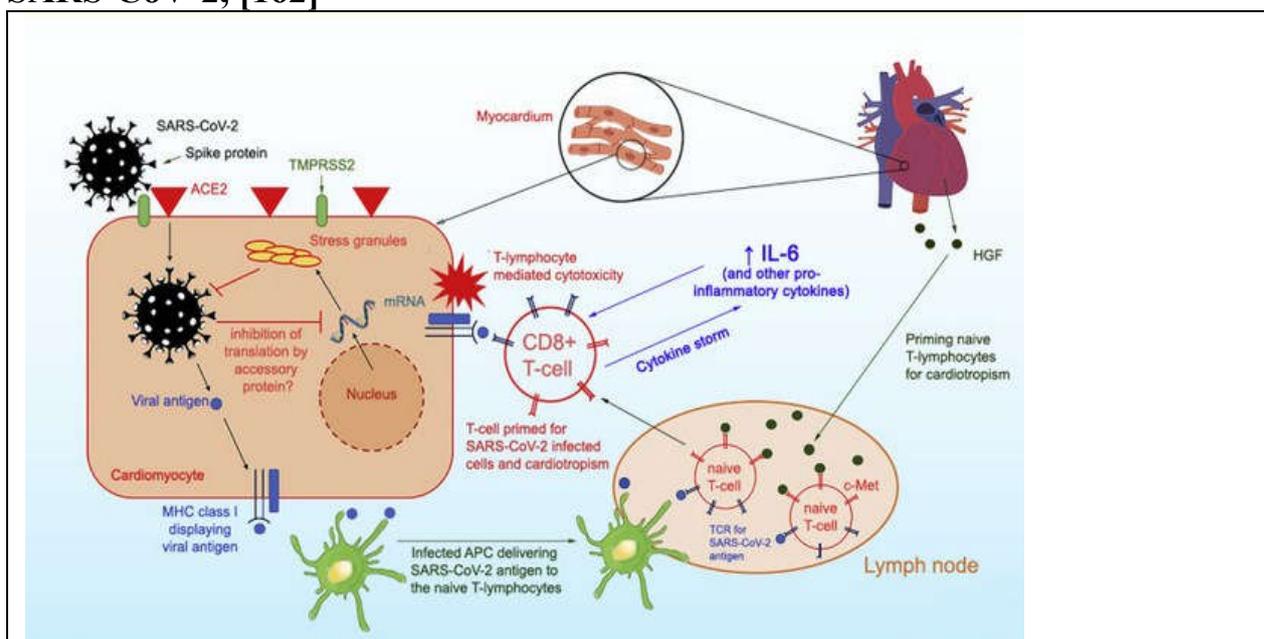
Патофизиология вирусного миокардита представляет собой сочетание прямого вирусного повреждения кардиомиоцитов и Т-лимфоцит-опосредованной цитотоксичности, которые дополняются цитокиновым штормом, [89, 176]. В настоящее время механизм острого воспалительного повреждения миокарда коронавирусом остаётся до конца не ясен. Вероятнее всего, миокардит при новой коронавирусной инфекции развивается в результате действия триады факторов: прямого действия вируса на миокард, цитокинового шторма и аутоиммунного поражения, [83, 151]. Вирус SARS-CoV-2 использует Spike-белок для связывания с рецептором к АПФ2 и входа в кардиомиоцит, тем самым инициируя воспалительный процесс в миокарде,

[113, 173]. До своего связывания с рецептором Spike-белок должен быть расщеплён на S1/S2-сайты (расщепление опосредуется трансмембранным сериновым белком TMPRSS2), и S2-сайт Spike-белка связывается с рецептором к АПФ2, [103].

Chen с соавт. в ходе исследования выявили высокие уровни интерлейкина типов 2, 6, 10 и фактора некроза опухоли среди пациентов с коронавирусной инфекцией, [71]. Высокие уровни цитокинов способствуют генерализации воспаления, в том числе вовлечению в воспалительный процесс миокарда. Интерлейкин-6, являясь центральным медиатором цитокинового шторма, организует цитокиновые реакции иммунных клеток, включая Т-лимфоциты. Происходит активация Т-лимфоцитов и дальнейшее высвобождение воспалительных цитокинов, которые стимулируют ещё большее количество Т-лимфоцитов. Возникает положительная обратная связь активации иммунной системы и повреждения миокарда, [118].

Для наглядной иллюстрации всего вышесказанного мы приводим схему патофизиологических процессов в миокарде при новой коронавирусной инфекции, предложенную Siripanthong V. с соавт. (Схема 1).

Схема 1 - Патофизиологические процессы поражения миокарда вирусом SARS-CoV-2, [162]



Продолжение Схемы 1

ACE2 - ангиотензин-превращающий фермент 2 типа (АПФ2); APC - антигенпрезентирующая клетка; HGF - фактор роста гепатоцитов; IL-6 - интерлейкин 6; MHC - основной комплекс гистосовместимости; TCR - Т-клеточный рецептор.

Вопрос морфологической диагностики хронического миокардита в сочетании с первичными формами КМП до сих пор остаётся открытым и дискуссионным. Описание особенностей структурной перестройки ткани в области проводящей системы при миокардите, включая миокардит при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, позволит скорректировать имеющиеся диагностические и терапевтические алгоритмы, применяемые в кардиологической практике.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика материала

В ретроспективное и проспективное исследование типа случай-контроль были включены 120 пациентов: 68 пациентов, страдающих хроническим миокардитом (ХМ); 32 пациентов с миокардитом при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (КМ); 20 пациентов (контрольная группа), страдающих гипертонической болезнью, пороком сердца и/или ишемической болезнью сердца (Таблица 2).

Таблица 2 - Распределение пациентов по группам исследования

Группа исследования	Группа	Подгруппы хронического миокардита (ХМ)
Пациенты, страдающие хроническим миокардитом (ХМ)	Группа I 68	Аритмический вариант (АВ) – 46
		Декомпенсированный вариант (ДВ) - 19
		Смешанный вариант (СВ) - 3
Пациенты с миокардитом при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2	Группа II 32	
Пациенты, страдающие гипертонической болезнью, пороком сердца, ишемической болезнью сердца (контрольная группа)	Группа III 20	

Всеми пациентами, включёнными в исследование, подписано добровольное информированное согласие на проведение исследования (ЛЭК ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова на основании приказа №470Р от 19 октября 2012 года, выписка из протокола № 03-22).

Критериями включения пациентов в группу исследования I стали возраст старше 18 лет; установленный по ЭКГ и Эхо-КГ клинический диагноз «Нарушения ритма сердца»; клиничко-лабораторные данные, подозрительные в отношении миокардита; выполнение диагностических манипуляций (эндомиокардиальная биопсия).

Критерии включения пациентов в группу исследования II: возраст старше 18 лет; новая коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2, подтверждённая методом ПЦР.

Критериями включения пациентов в контрольную группу явились наличие любой формы ишемической болезни сердца; наличие порока сердца (врожденного/приобретенного); наличие патологии коронарных артерий сердца, гипертонической болезни.

Группа I включала пациентов с хроническим миокардитом (ХМ). В эту группу вошли 68 пациентов с хроническим миокардитом, вызванным различными вирусными агентами, исключая вирус SARS-CoV-2. Данные пациенты были разделены на 3 подгруппы в соответствии с клиническим вариантом течения миокардита: аритмический (46 пациентов), декомпенсированный (19 пациентов), смешанный (3 пациента).

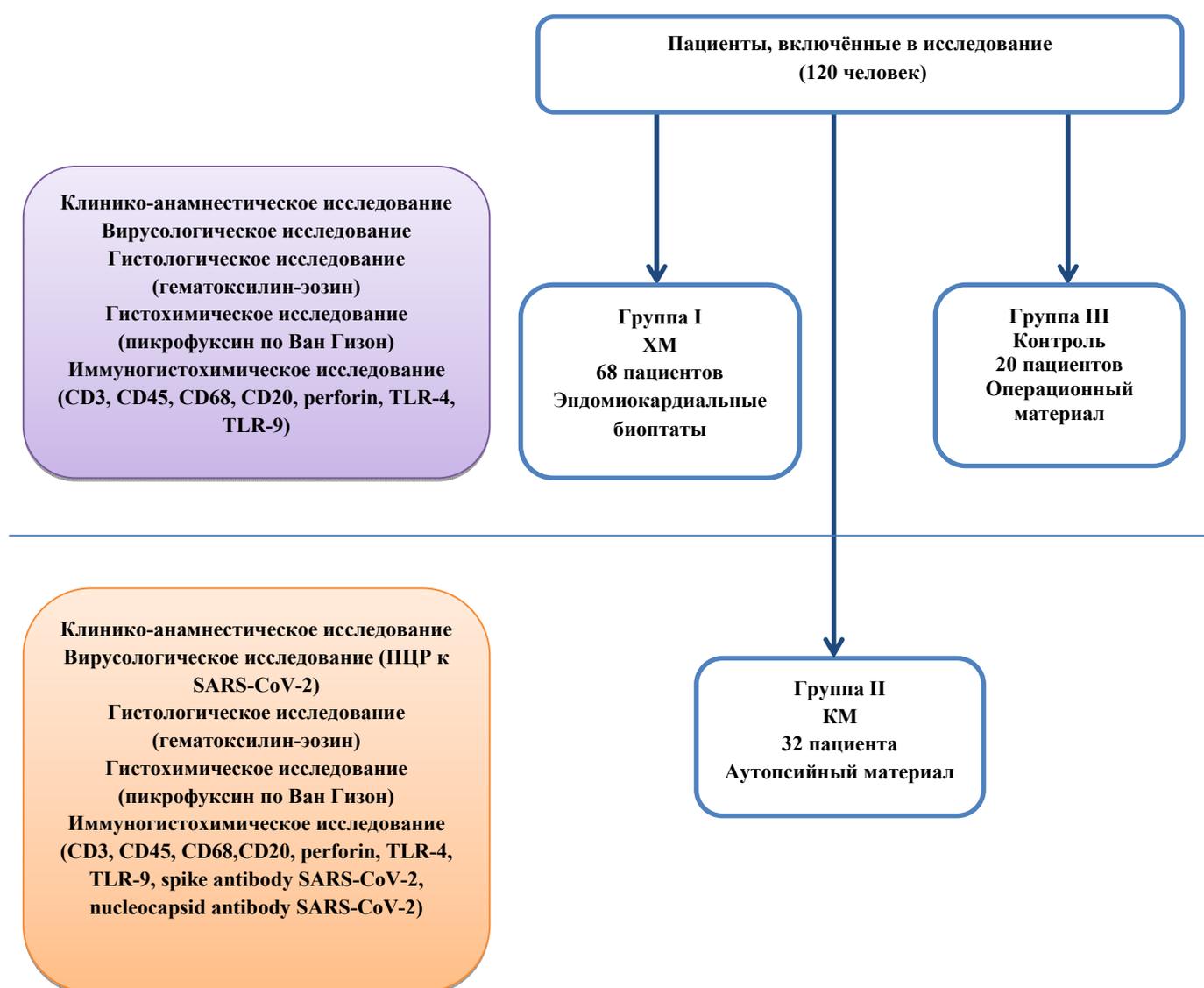
Группа II включала 32 пациента, умершие от проявлений новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 и подтвержденной методом ПЦР. В ходе комплексного патологоанатомического исследования у данных пациентов обнаружен миокардит.

Контрольная группа III состояла из 20 пациентов, страдающих гипертонической болезнью, пороками клапанов сердца, ишемической болезнью сердца. Пациентам проводилась операция по протезированию

клапанов сердца и забор участка ушка левого предсердия для гистологического исследования.

Дизайн ретроспективного и проспективного исследования представлен на Схеме 2.

Схема 2 - Дизайн ретроспективного и проспективного исследования



2.2. Методы морфологического исследования

Морфологическое исследование материала проводилось на базе Института клинической морфологии и цифровой патологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (директор Института - д.м.н., акад. РАЕН, проф. *Демура Т.А.*), Централизованного патологоанатомического отделения Клинического центра ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (заведующая отделением – к.м.н., доц. *Пармонова Н.Б.*) и патологоанатомического отделения ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза» (заведующий отделением – *Березовский Ю.С.*).

Морфологическое исследование проводилось на архивном материале (парафиновые блоки) тканей сердца с 2008 по 2019 гг. и на биопсийном материале правого желудочка (эндокарда, миокарда, перикарда), полученных путём оперативного вмешательства (группа I, XM) по стандартной хирургической методике взятия эндомиокардиальных биопсий (доступ через правую бедренную вену с использованием биопсийных щипцов STANDART 5.5 F 104 FEMORAL, производитель Cordis).

Также морфологическое исследование производилось на аутопсийном материале (группа II, KM) сердец пациентов с подтверждённой новой коронавирусной инфекцией (ПЦР-идентификация вируса SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки). Производился забор образцов ткани правого и левого желудочка.

Материал III группы (контроль) представлял собой ткань ушка левого предсердия, полученную во время хирургического вмешательства по аорто-коронарному шунтированию или установке искусственного клапана сердца.

Морфологическому исследованию сердца было подвергнуто 120 образцов тканей сердца (120 блоков).

Образцы тканей сердца: эндомикардиальные биоптаты (0,1-0,2x0,1-0,2x0,1-0,2 см), аутопсийный материал (1,2x1,0x0,4 см), операционный материал контрольной группы (0,5x0,5x0,3 см) - фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина с фосфатным буфером, дегидратировали в батарее спиртов восходящей концентрации в аппарате гистологической проводки тканей фирмы «Pool Scientific Instruments» (Швейцария), заливали в парафин. Фиксация аутопсийного материала пациентов с идентифицированным SARS-CoV-2 занимала 72 часа. После этого производилась нарезка парафиновых блоков (не менее 20 срезов с каждого блока), срезы толщиной 4 мкм с каждого блока помещали на обычные стёкла и на специальные адгезивные полилизининовые стёкла Super Frost Plus («Mainzel Glaser», Polylysine, Германия). Далее по одному препарату от каждого случая окрашивали *гематоксилином и эозином* по стандартной методике, а также *пикрофуксином по Van Gieson* для выявления компонентов соединительной ткани. Микроскопическое исследование выполнялось с использованием микроскопа Leica Standart.

Микроскопическому исследованию подвергались по 4 образца ткани сердца. В ЭМБ последовательно рассматривались ткани миокарда, эндокарда и мелких веточек коронарных артерий. В аутопсийном и операционном материале оценивалось состояние миокарда, эндокарда, перикарда и коронарных артерий. Анализ миокарда включал оценку состояния кардиомиоцитов и их ядер, их размер, наличие воспалительной инфильтрации (её характер), наличие фибробластических фокусов, фокусов ишемии, липоматоза. Эндокард анализировался путём оценки его толщины, степени выраженности соединительнотканых компонентов, наличия/отсутствия воспалительных инфильтратов. Последовательно анализировались препараты перикарда: толщина перикарда, выраженность соединительной ткани, наличие/отсутствие инфильтратов. Рассматривались веточки коронарных артерий: состояние эндотелия сосудов, наличие

воспалительной инфильтрации, склероз стенки и атеросклеротические изменения.

2.3. Методы иммуногистохимического исследования

Иммуногистохимическому исследованию подвергались парафиновые срезы архивного, биопсийного и аутопсийного материала сердца.

Иммуногистохимические реакции ставились на депарафинированных срезах толщиной 4 мкм, которые помещали на специальные полилизиновые стёкла Super Frost Plus («Mainzel Glaser», Polylysine, Германия). Иммуногистохимическое исследование проводилось по стандартной методике, представленной в Таблице 3. Первичные антитела, используемые в ходе исследования, отражены в Таблице 4. Ставились положительные и отрицательные контрольные реакции. В качестве положительного контроля использовали клетки тканей согласно инструкции соответствующего первичного антитела. Отрицательный контроль представлял собой препараты ткани здорового сердца.

Таблица 3 - Протокол проведения иммуногистохимических реакций

<i>Этап</i>	<i>Характеристика этапа</i>	<i>Время</i>
I этап – депарафини- рование срезов	Выдержать в термостате (60°C).	30
	Провести через батарею спиртов (3 смены).	3x5
	Провести дегидратацию в спиртах: 100% спирт (2 смены), 95% спирт (2 смены).	4x5
	Прополоскать в дистиллированной воде (2 смены).	2x5
II этап – демаскировка антигенов	Приготовить цитратный буфер (Trilogy Cell Marque, разведение 1:100, pH = 6,0).	
	Нагреть цитратный буфер на водяной бане при температуре 98°C	10
	Поместить полилизиновые стёкла с депарафинированными срезами в цитратный буфер.	

Продолжение Таблицы 3

	Прокипятить стёкла на водяной бане при температуре 98°C.	20
	Достать стёкла, оставить остывать при комнатной температуре.	20
	Промыть стёкла в промывочном буфере PBC IHC Wash Buffer (3 смены, разведение 1:20)	3x5
	Обвести срезы парафиновым карандашом	
III этап - ингибирование эндогенной пероксидазы	Приготовить 3% H ₂ O ₂ либо использовать Peroxide Block	
	Инкубировать срезы во влажной камере в 3% H ₂ O ₂ , Peroxide Block	15
	Промыть стёкла в промывочном буфере PBC IHC Wash Buffer (2 смены, разведение 1:20)	2x3
IV этап - первичные антитела	Приготовить сыворотки, разведенные согласно стандартному титру (растворитель - AntKMody Diluent: DXMmond, Tris 1000 мл до 10 %)	
	Инкубировать срезы во влажной камере	30
	Промыть стёкла в промывочном буфере PBC IHC Wash Buffer (2 смены, разведение 1:20)	
V этап - вторичные антитела	Использовать систему детекции Н-Гистофайн Симпл Стейн Макс ПО (Мульти)	
	Инкубировать срезы во влажной камере	30
	Промыть стёкла в промывочном буфере PBC IHC Wash Buffer (2 смены, разведение 1:20)	
VI этап - диаминобензидин	Работать в защитной маске и перчатках.	
	Приготовить раствор диаминобензидина - 1 мл DAB Buffer : 1 капля диаминобензидина (из расчёта 100 мкл на 1 срез).	
	Инкубировать срезы во влажной камере.	5
	Промыть срезы дистиллированной водой (2 смены).	2x5
	Поместить в дистиллированную воду для предотвращения высыхания.	
VII. Окраска ядер и заключение	Окраска ядер 10% гематоксилином.	
	Промывка в воде.	
	Дегидратация в спиртах: 100% спирт (2 смены), 95% спирт (2 смены).	4x5
	Ксилол	5
	Заключение в Дерех с покровным стеклом Mainzel Glaser.	

Таблица 4 - Используемая панель первичных антител для ИГХ-исследования в группах сравнения

Первичные антитела, производитель	Клон, разведение	Назначение первичных антител
CD3, Cell Marque	MRQ-39 1:1000	Пан-Т-лимфоцитарный маркёр реагирует с антигеном, присутствующим на поверхности и в цитоплазме Т-лимфоцитов.
CD20, Cell Marque Кроличы моноклональные	SP32 1:500	Трансмембранный белок в поздних предшественниках В-клеток и зрелых В-клетках, который играет роль в регулировании пролиферации и дифференциации.
CD45, Dako Мышиные моноклональные	4KB5 1:100	Мембранный гликопротеин, общий лейкоцитарный антиген. Экспрессируется на различных типах лимфоцитов.
CD68, Dako Мышиные моноклональные	KP1 1:50	Гликопротеин, экспрессируется на поверхности моноцитов и макрофагов.
Perforin, Cell Marque Мышиные моноклональные	MRQ-23 1:50	Порообразующий белок НК-клеток, приводящий к осмотическому лизису клеток-мишеней и позволяющий гранзимам активировать апоптоз.
TLR-4, Gene Tex Кроличы поликлональные	76B357.1 1:200	Семейство белковых рецепторов, находящихся на поверхности иммунокомпетентных клеток (макрофагов, лимфоцитов) и активирующихся под воздействием инфекционных агентов
TLR-9, Gene Tex Мышиные моноклональные	5G5 1:50	
SARS-CoV-2 nucleocapsid antibody, Gene Tex Кроличы поликлональные	1:500	Белок нуклеокапсида SARS-CoV-2
SARS-CoV-2 spike antibody Gene Tex Кроличы поликлональные	1:500	Spike-белок SARS-CoV-2

Проводилась количественная (с подсчётом числа окрашенных клеток на 1мм^2) и полуколичественная оценка (в баллах) результатов иммуногистохимических реакций, [3, 4, 17, 18, 21].

Согласно обновлённым международным критериям Далласа (2016 год) экспрессия CD3 и CD45 оценивалась при световой микроскопии количественным методом, подсчитывалось количество окрашенных клеток воспалительного инфильтрата на 1мм^2 . Также производилась полуколичественная оценка экспрессии данных маркёров в баллах (Таблица 5, 6).

Таблица 5 - Шкала оценки CD45+ лимфоцитов, [3, 4, 17, 18, 21]

Балл	Количество лимфоцитов на 1мм^2
1 балл	14-29 CD45+ лимфоцитов
2 балла	30-44 CD45+ лимфоцитов
3 балла	≥ 45 CD45+ лимфоцитов

Таблица 6 - Шкала оценки CD3+ Т-лимфоцитов, [3, 4, 17, 18, 21]

Балл	Количество клеток на 1мм^2
1 балл	7-9 CD3+ Т-лимфоцитов
2 балла	10-14 CD3+ Т-лимфоцитов
3 балла	15-19 CD3+ Т-лимфоцитов
4 балла	≥ 20 CD3+ Т-лимфоцитов

Экспрессия CD20, CD68, perforin оценивалась в процентном соотношении окрашенных клеток инфильтрата к общему числу клеток инфильтрата.

Экспрессия TLR-4, TLR-9 анализировалась количественным (процент клеток с положительной экспрессией) и полуколичественными методами (в баллах), (Таблица 7).

Таблица 7 - Шкала оценки окрашивания клеток воспалительного инфильтрата в миокарде на TLR-4, TLR-9, [3, 4, 17, 18, 21]

<i>Балл</i>	<i>Количество клеток с положительной экспрессией от общего числа клеток инфильтрата, %</i>
1 балл	0-24
2 балла	25-49
3 балла	50-75
4 балла	≥75

2.4. Морфометрический метод

Цитоморфометрия гистологических срезов сердца выполнялась с использованием специальной программы для морфометрии PhotoM 1.21. В программе возможна обработка цветных и чёрно-белых фотографий формата .BMP, .JPEG с определением расстояния, диаметра, площади. В группе ХМ проводили анализ 50 микрофотографий, в группе КМ – 30. С помощью программы на микрофотографии выделяли области с липоматозом и рассчитывали площадь выделенных областей: в квадратных пикселях и как процентное отношение площади липоматоза к площади объекта (микрофотографии). В дальнейшем все расчёты анализировались в программе Microsoft Office Excel.

2.5. Вирусологический метод с использованием полимеразной цепной реакции

Исследование проводилось на образцах миокарда I и II группы на базе научно-исследовательского института нормальной и патологической физиологии Российской академии наук (г. Москва). Обнаружение вирусной ДНК/РНК в образцах миокарда проводили с помощью ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Для выделения тотальной ДНК/РНК из тканей, фиксированных в парафине, применяли RNeasy FFPE Kit (QXMGgen, Hilden,

Германия). РТ-ПЦР для SARS-CoV-2 выполняли с помощью набора N2. Для проведения анализа использовали 20 мкл реакционной смеси, состоящей из $2 \times$ Master Mix и RT из набора QuantiTect probe RT-PCR (QXMGgen, Hilden, Германия), набор праймеров/зондов N2 (праймер NIID_2019-nCoV_N_F2, праймер NIID_2019-nCoV_N_R2 и зонд NIID_2019-nCoV_N_P2) и 5 мкл РНК, экстрагированной из образцов тканей, фиксированных в парафине, подвергали ПЦР в амплификаторе QuantStudio 5 (Thermo Scientific, USA). Условия реакции были следующими: 50°C в течение 30 мин, 95°C в течение 15 мин, и 45 циклов 95°C в течение 15 с и 60 °C в течение 1 мин. Для всех образцов, положительных по РТ-ПЦР, были получены значения Ct. Значения Ct образцов сравнивались со значениями Ct контрольных позитивных и негативных образцов, [21].

В группе ХМ типировали вирусы герпетической группы (вирусы простого герпеса 1 и 2 типов, ВЭБ, HHV6, ЦМВ), парвовирус В19, аденовирусы, энтеровирусы, вирус гепатита В и вирус гепатита С.

В группе КМ исследовали присутствие вирусной РНК вируса SARS-CoV-2.

2.6. Статистические методы исследования и обработка данных

Статистическая обработка данных выполнялась на персональном компьютере с использованием электронных таблиц Microsoft Excel и пакета прикладных программ «SPSS Statistics for Windows» (США). Все полученные качественные, количественные, клинические данные обрабатывали с помощью метода вариационной статистики.

В описательной статистике использовались минимальные и максимальные значения, средние арифметические значения, средние квадратические отклонения, средние квадратические ошибки средних значений. С целью сравнения качественных признаков проводился анализ четырехпольной таблицы (критерий хи-квадрат) и точный критерий Фишера.

С целью определения достоверности статистических различий количественных показателей в каждой группе использовался критерий Стьюдента. При исследовании взаимосвязи нескольких признаков выполняли анализ корреляции по Пирсону. Различия считались статистически достоверными при значении p менее 0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Клинико-морфологические особенности хронического миокардита (ХМ)

3.1.1. Клиническая характеристика

Клинико-anamнестический анализ (Таблица 8) проводился для 68 пациентов, страдающих хроническим миокардитом. Возраст пациентов с ХМ колебался от 25 до 78 лет (в среднем, $52,96 \pm 14,06$ лет). Распределение пациентов по полу: лица женского пола составили 48,53% (33 человека), мужского – 51,47% (35 человек).

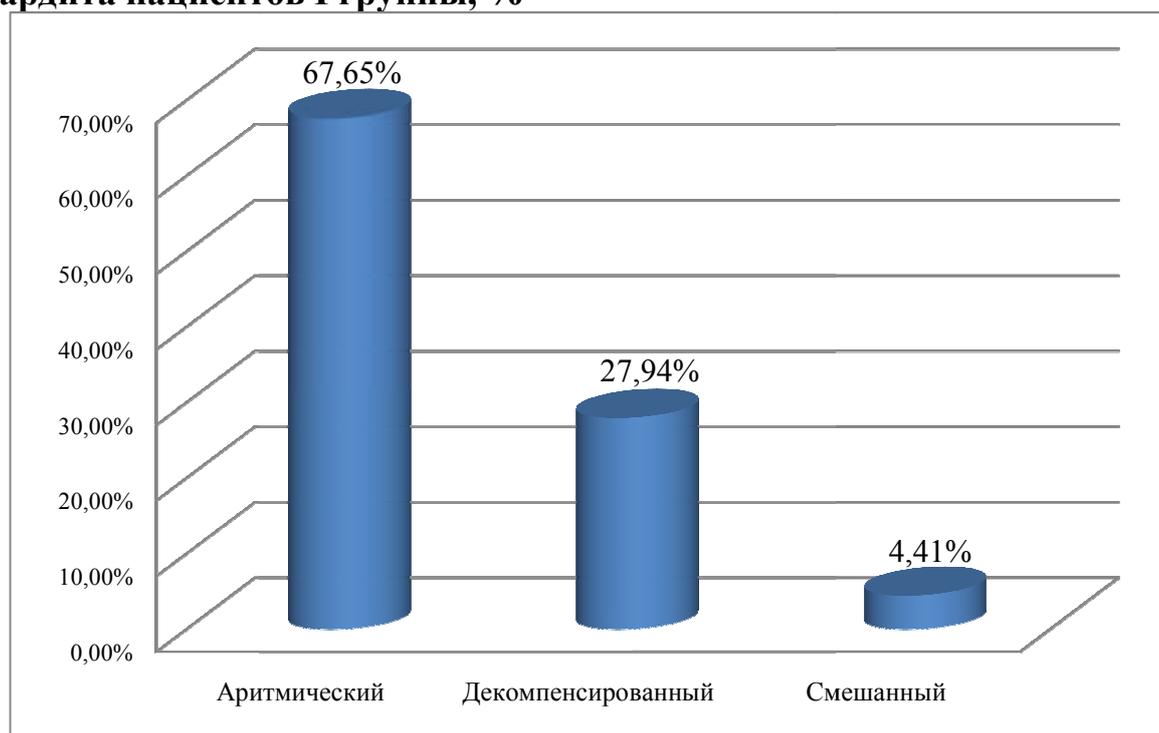
Контрольная группа включала 8 женщин (40%) и 12 мужчин (60%). Возраст пациентов контрольной группы составил от 31 до 75 лет (в среднем, $65,20 \pm 9,57$ лет).

Таблица 8 - Клинико-anamнестические данные пациентов группы ХМ

Параметр	Группа ХМ (n=68)	
	Абс.	%
Возраст, лет	$52,96 \pm 14,06$	-
Женский пол	33	48,53
Мужской пол	35	51,47

Пациенты с ХМ были разделены на 3 подгруппы согласно клиническому варианту течения хронического миокардита. Аритмический вариант (АВ) представлен в 46 (67,64%) случаях, декомпенсированный (ДВ) – в 19 (27,94%), смешанный вариант (СВ) – в 3 (4,41%) наблюдениях (Диаграмма 1).

Диаграмма 1 - Соотношение клинических вариантов хронического миокардита пациентов I группы, %



В группе проведено исследование экстракардиальной патологии по клиническим данным (Таблица 9). Анализ группы ХМ выявил у 1 (1,47%) пациента патологию органов дыхания, у 1 (1,47%) – патологию гемостаза в виде тромбоза лёгочной артерии (ТЭЛА), у 11 (16,17%) - патологию органов мочевыделительной системы в виде хронической болезни почек 3-4 стадии (ХБП), сахарный диабет не диагностирован ни у одного пациента, включённого в исследование.

Таблица 9 - Экстракардиальная патология пациентов с ХМ

Экстракардиальная патология		Группа ХМ (n=68)	
		Абс.	%
Болезни органов дыхания	Альвеолит	1	1,47
Болезни органов мочевыделительной системы	ХБП	11	16,17
Патология гемостаза	ТЭЛА	1	1,47

Таким образом, пациенты с ХМ являются людьми молодого возраста, в клинической картине которых доминируют нарушения ритма сердца (аритмический вариант ХМ). При этом, у данных пациентов в большинстве случаев отсутствует значимая экстракардиальная патология в виде болезней органов дыхания, органов мочевыделительной системы и органов эндокринной системы.

3.1.2. Морфологическая характеристика

Исследование проведено на эндомикардиальных биоптатах.

Эндомикардиальные биоптаты пациентов I группы забирали из свободной стенки правого желудочка, размеры образцов были стандартны и составляли 0,1x0,1x0,1 см. Образцы серовато-белого цвета, эластической консистенции.

Операционный материал III контрольной группы забирали из ушка левого предсердия. При макроскопическом исследовании средние размеры образца составляли 0,5x0,5x0,4 см. Полученные образцы серого цвета, плотноватой консистенции.

При гистологическом исследовании группы ХМ отмечались изменения миокарда, эндо- и перикарда, коронарных артерий. Среди изменений миокарда наблюдались лимфоцитарный миокардит с отёком интерстиция, с дистрофией кардиомиоцитов (гидропической, гиалиново-капельной и жировой), с некрозом отдельных кардиомиоцитов, апоптозом кардиомиоцитов с формированием апоптозных телец, отмечалась неравномерная гипертрофия кардиомиоцитов с полосами пересокращения, липофусциноз кардиомиоцитов, кардиосклероз (постинфарктный крупноочаговый и диффузный мелкоочаговый) (Таблица 10). Проводилась оценка степени выраженности субэндокардиального липоматоза в процентах

от площади микропрепарата с использованием программы для морфометрии PhotoM 1.21.

В III контрольной группе лимфогистиоцитарная инфильтрация в миокарде не обнаружена ни в одном случае, в 18 (90,00%) наблюдениях отмечена дистрофия кардиомиоцитов, в 20 (100,00%) – гипертрофия кардиомиоцитов, в 17 (85,00%) – липофусциноз. Данные морфологические изменения обусловлены пороком сердца пациентов, по поводу которого выполнялось оперативное вмешательство.

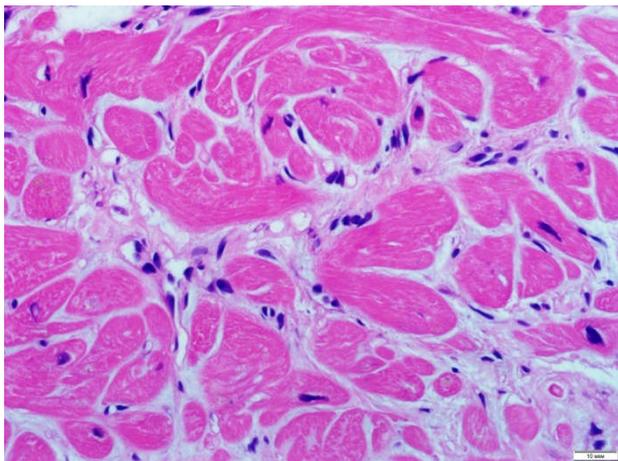
Таблица 10 - Гистологическая характеристика миокарда пациентов группы сравнения (критерий χ^2 , двусторонний метод Фишера)

Гистологический признак	ХМ n=68	χ^2	F	III n=20
Лимфогистиоцитарная инфильтрация	68	-	-	0
Дистрофия кардиомиоцитов	39*	7,219	0,007	18
Некроз	2*	1,480	0,249	2
Апоптоз	20*	0,824	0,437	5
Гипертрофия кардиомиоцитов	58	0,192	0,717	20
Липофусциноз	31*	9,682	0,002	17
Крупноочаговый кардиосклероз	2*	0,199	0,543	1
Диффузный мелкоочаговый кардиосклероз	8*	0,148	0,707	3
Липоматоз	35	8,378	0,004	3
Отёк интерстиция	16*	1,739	0,226	2
Кровоизлияния	1*	0,297	1,000	0

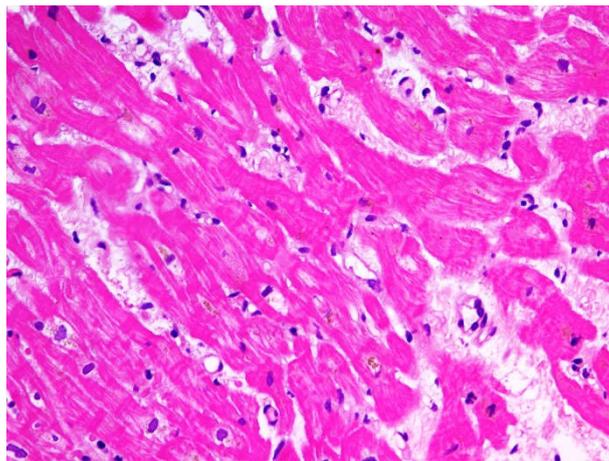
*Различия, статистически достоверные по сравнению с контрольной группой III, $p \leq 0,05$

В группе ХМ в 68 (100,00%) случаях выявлен лимфоцитарный миокардит (Рисунок 1). В нашем исследовании «лимфоцитарный миокардит» ставился при наличии в интерстициальной ткани миокарда лимфогистиоцитарной инфильтрации в количестве лимфоцитов более 14 на 1 мм².

а



б



в

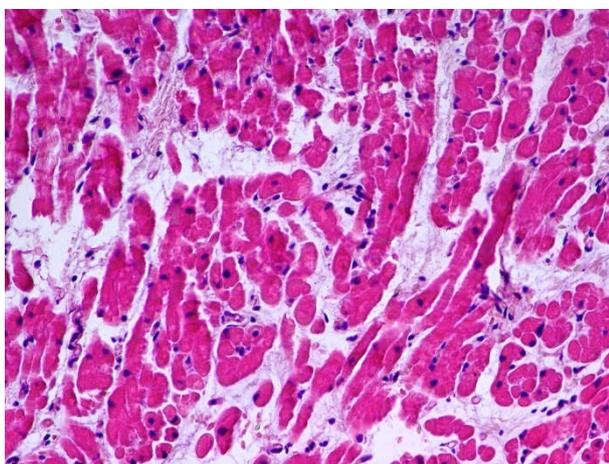


Рисунок 1 - Миокард в группе ХМ, гематоксилин и эозин: а – лимфоцитарный миокардит, аритмический вариант, х400; б – лимфоцитарный миокардит, декомпенсированный вариант, х200; в – лимфоцитарный миокардит, смешанный вариант, х 100.

При ХМ дистрофические изменения кардиомиоцитов (преимущественно белковые дистрофии) обнаружены в 39 (57,4%) случаях, некроз отдельных кардиомиоцитов – у 2 (2,94%) пациентов, апоптозные тельца – в 20 (29,41%) случаях, неравномерная гипертрофия кардиомиоцитов – в 58 (85,29%) наблюдениях, липофусциноз – в 31 (45,59%) случае. Во всех наблюдениях отмечались полосы пересокращения мышечных волокон. У 2 (2,94%) пациентов выявлены обширные поля грубоволокнистой соединительной ткани, в 8 (11,76%) случаях наблюдались диффузные тонкие

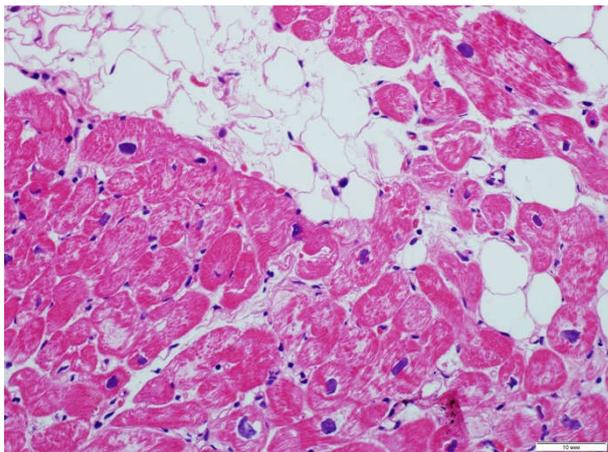
прослойки соединительнотканых волокон. Отёк интерстиция выявлен в 16 (23,53%) случаях. У 1 (1,47%) пациента в строме миокарда обнаружены мелкие диапедезные кровоизлияния.

Субэндокардиальный липоматоз встречался в 35 (51,47%) наблюдениях. При этом липоматоз обнаруживался, преимущественно, в области проводящей системы сердца (ушко правого предсердия). Площадь липоматоза рассчитывалась морфометрически с использованием программы PhotoM 1.21. Средний процент площади липоматоза от площади объекта (микрофотографии) составил $2,47 \pm 3,12\%$.

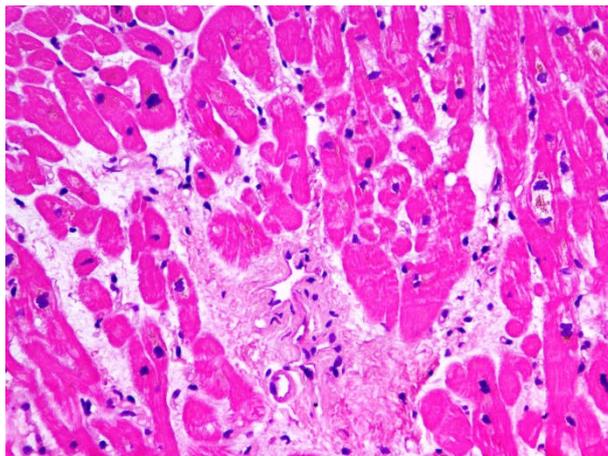
Интерстициальный отёк в миокарде выявлен в 10 (31,25%) случаях, а мелкие кровоизлияния в строме – у 2 (6,25%) пациентов (Рисунок 2).

Проведены параллели между морфологической картиной и клиническим вариантом хронического миокардита. Выявлено, что для АВ характерна более высокая частота дистрофических и апоптотических изменений кардиомиоцитов (69,56% и 30,43%) по сравнению с ДВ (21,05% и 21,05%), соответственно. Липоматоз встречался при АВ в 24 (52,17%) случаях, при ДВ – в 8 (42,10%), а при СВ у 3 (100,00%) пациентов. 2 случая некроза кардиомиоцитов, 5 случаев диффузного мелкоочагового кардиосклероза и 1 случай крупноочагового кардиосклероза относятся к группе ДВ.

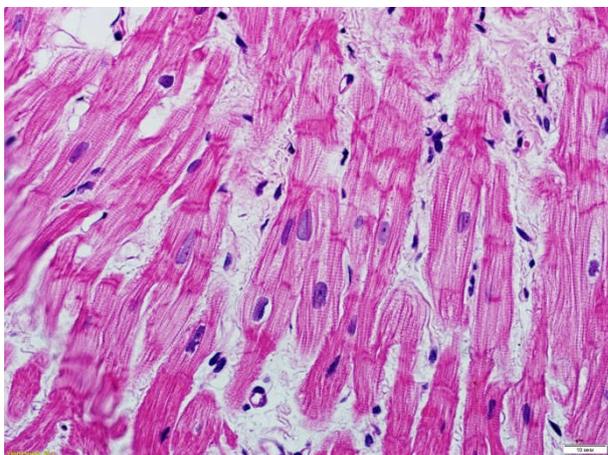
а



б



в



г

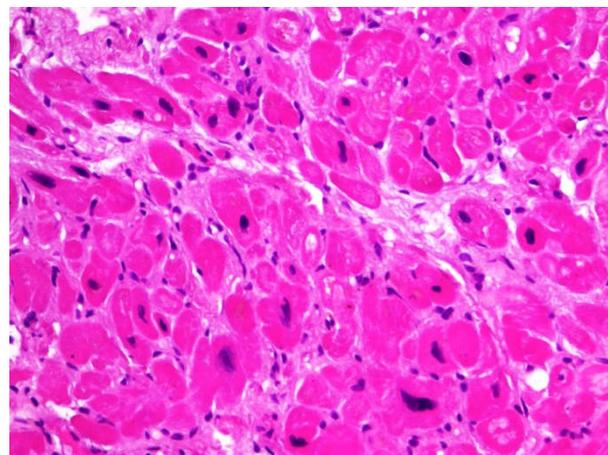


Рисунок 2 - Миокард в группе ХМ и контрольной группе, гематоксилин и эозин: а – субэндокардиальный липоматоз в группе ХМ, х200; б – склероз интерстиция, склероз и гиалиноз коронарных артерий в группе ХМ, х200; в – дистрофические изменения и фрагментация кардиомиоцитов в группе ХМ, х400; г – слабо выраженная гипертрофия кардиомиоцитов в контрольной группе III, х400.

Изменения эндо- и перикарда включали наличие лимфогистиоцитарных инфильтратов, склероза эндокарда, пристеночных тромбов на эндокарде (Таблица 11).

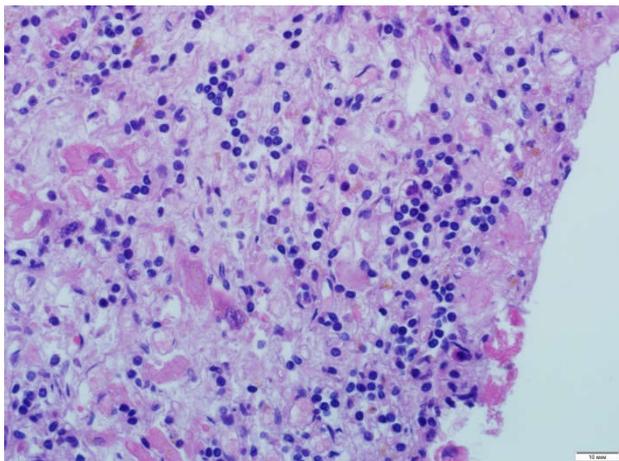
Таблица 11 - Гистологическая характеристика эндо- и перикарда пациентов групп сравнения (критерий χ^2 , двусторонний метод Фишера)

Гистологический признак	ХМ n=68	χ^2	F	III n=20
Лимфогистиоцитарный инфильтрат в эндокарде	9*	2,949	0,112	0
Склероз эндокарда	45*	2,631	0,162	17
Пристеночные тромбы	2*	0,602	1,000	0
Лимфогистиоцитарный инфильтрат в перикарде	0	-	-	0

*Различия, статистически достоверные по сравнению с контрольной группой III, $p \leq 0,05$

Среди пациентов с ХМ лимфогистиоцитарные инфильтраты в эндокарде обнаружены у 9 (13,24%) человек (Рисунок 3). Склероз эндокарда наблюдался у 45 (66,18%) пациентов, пристеночные тромбы, состоящие из фибрина, тромбоцитов, эритроцитов и лейкоцитов – у 2 (2,94%). Лимфоцитарный эндокардит встречался практически с одинаковой частотой при АВ и ДВ (13,04% и 15,78%, соответственно). Склероз эндокарда достоверно чаще встречался при АВ (39 случаев, 84,78%), чем при ДВ (6 пациентов, 31,57%). Обнаруженные в 2 случаях пристеночные тромбы на эндокарде соответствовали АВ миокардита. Патологии эндокарда в случаях СВ миокардита выявлено не было.

а



б

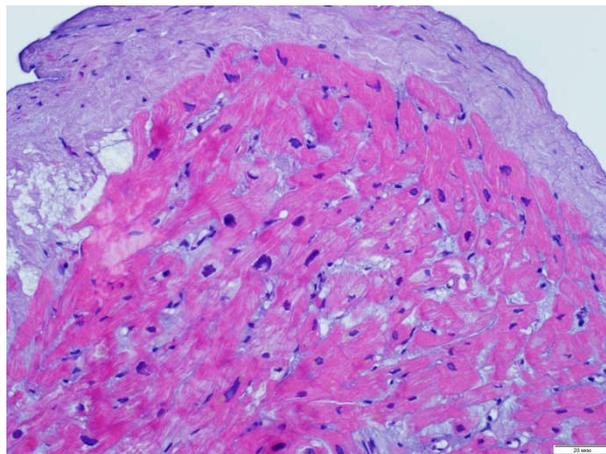


Рисунок 3 - Микрофотографии эндокарда в группе ХМ, гематоксилин и эозин: а – лимфоцитарный эндокардит, х 200; б – склероз эндокарда, х 200.

В группе ХМ деструктивно-продуктивный васкулит обнаруживался у 11 (16,18%) человек, набухание эндотелия с развитием эндотелиита – у 40 (58,82%) пациентов. В 1 (1,47%) случае зафиксирован сладж-феномен, а полнокровие мелких ветвей коронарных артерий не встречалось. Тромбоз или микротромбоз мелких ветвей венечных артерий сердца выявлен в 3 (4,41%) наблюдениях (Таблица 12). При этом, эндотелиит мелких веточек коронарных артерий встречался достоверно чаще при АВ хронического миокардита (28 случаев, 60,86%), чем при ДВ (9 пациентов, 47,36%), а при СВ наблюдался в 3 (100,00%) случаях. Коронариит и микротромбоз мелких веточек коронарных артерий выявлен чаще у пациентов с АВ хронического миокардита.

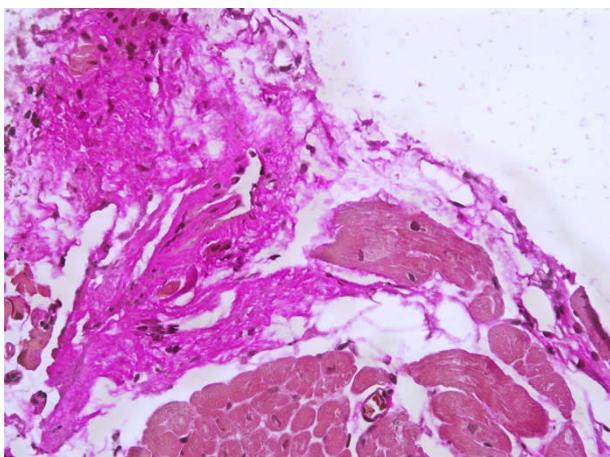
Таблица 12 - Гистологическая характеристика коронарных сосудов пациентов (критерий χ^2 , двусторонний метод Фишера)

Гистологический признак	ХМ n=68	χ^2	F	III n=20
Деструктивно-продуктивный коронарит	11*	1,639	0,283	1
Эндотелиит	40	17,992	0,0002	1
Сладж-феномен	1*	3,414	0,128	2
Тромбоз	3*	0,012	1,000	1

*Различия, статистически достоверные по сравнению с контрольной группой III, $p \leq 0,05$

При окраске пикрофуксином по Ван Гизону в 68 (100%) наблюдениях группы выявлялся периваскулярный и перимускулярный склероз (Рисунок 4).

а



б

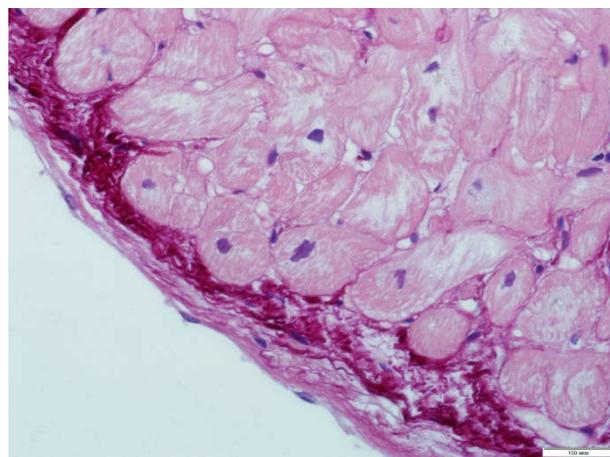


Рисунок 4 - Эндокард и миокард в группе ХМ, пикрофуксин по Ван Гизону: а – склероз интерстиция, x200; б – склероз эндокарда, x400.

Таким образом, каждый клинический вариант ХМ (АВ, ДВ, СВ) помимо лимфоидной инфильтрации в миокарде характеризуется своими гистологическими особенностями.

При АВ ХМ чаще встречается дистрофия и апоптотические изменения кардиомиоцитов, а также субэндокардиальный липоматоз и склероз эндокарда области проводящей системы.

ДВ характеризуется наличием гипертрофии кардиомиоцитов, отёка интерстиция, диффузного мелкоочагового кардиосклероза и возможным развитием ишемии миокарда вплоть до некроза отдельных кардиомиоцитов.

Гистологические особенности СВ включают морфологические характеристики АВ и ДВ.

Патология коронарных сосудов, в частности, в виде эндотелиита и коронарита встречалась достоверно чаще при АВ, чем при ДВ и СВ.

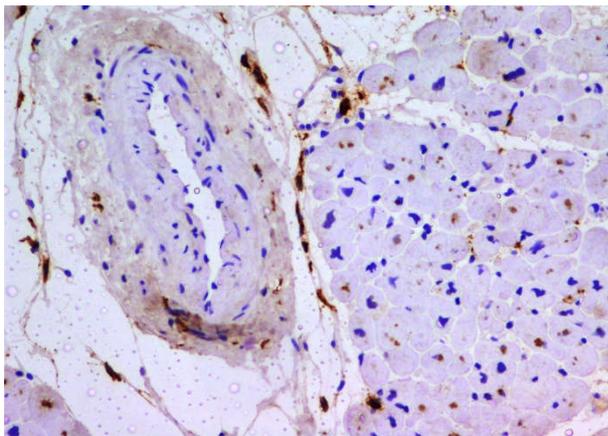
3.1.3. Иммуногистохимическая характеристика

Для иммуногистохимической характеристики клеточного состава инфильтрата была использована стандартная диагностическая панель антител, в которую были включены маркёры Т-лимфоцитов (CD3), лимфоцитов (CD45), В-лимфоцитов (CD20), NK-клеток (perforin), макрофагов (CD68). Для маркёров CD45, CD3, TLR-4, TLR-9 проводилась количественная и полуколичественная оценка с использованием диагностических шкал. Маркёры CD68, CD20, perforin оценивались в процентном соотношении клеток с положительной экспрессией к общему количеству клеток инфильтрата миокарда.

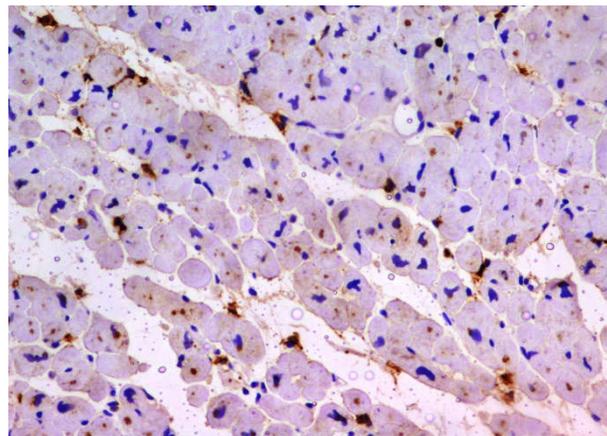
CD45

Общий лейкоцитарный антиген определялся в 68 (100,00%) случаях пациентов с хроническим некоронавирусным миокардитом. Согласно критериям Далласа, в каждом случае выявлено более 14 CD45+ лимфоцитов, что подтверждает диагноз миокардита (Рисунок 5).

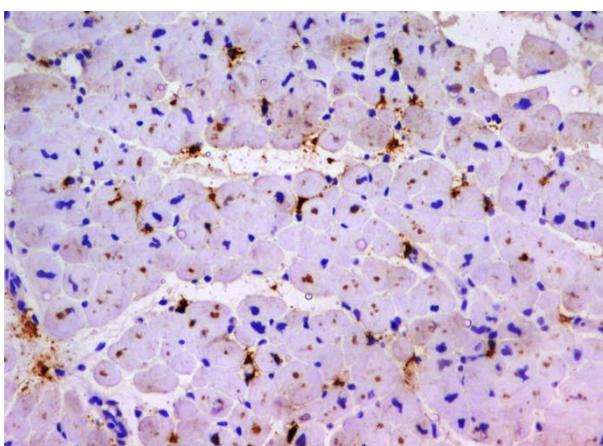
а



б



в



г

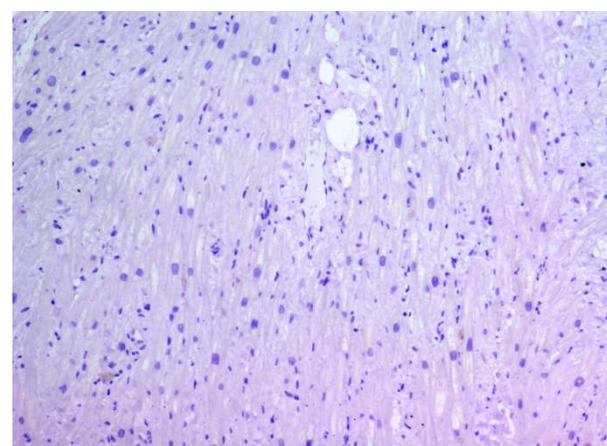
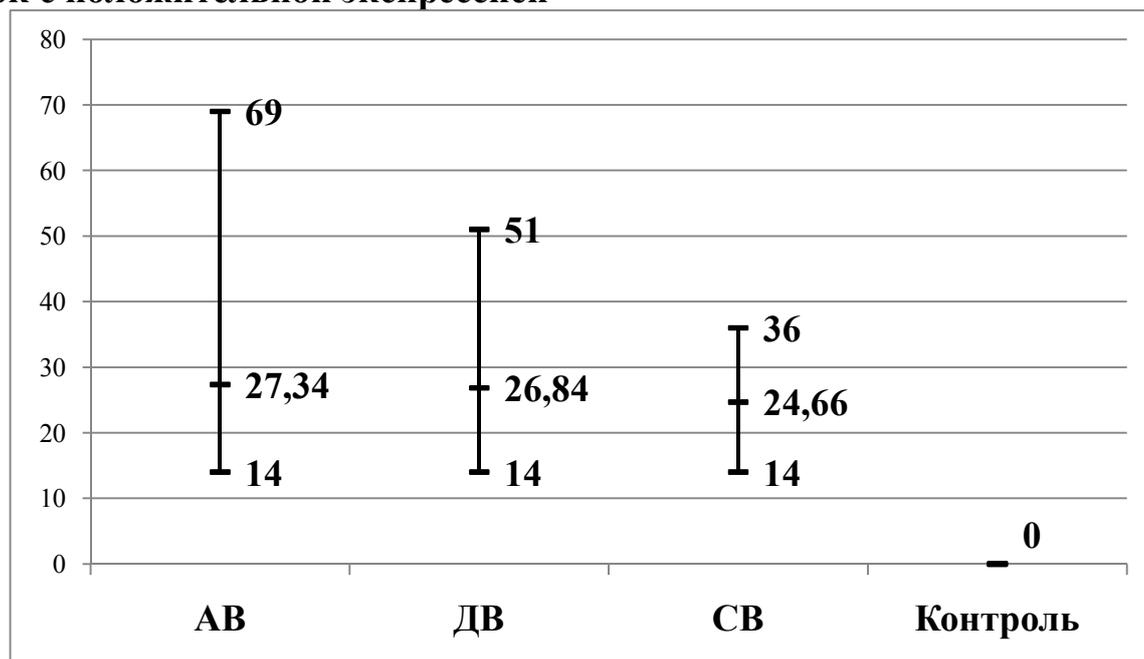


Рисунок 5 - Миокард, CD45+ клетки в группе ХМ и контрольной группе, иммунопероксидазная реакция: а – единичные CD45+ лимфоциты в интерстиции миокарда и в стенке коронарной артерии в группе ХМ, х200; б – умеренное количество CD45+ лимфоцитов в интерстиции миокарда в группе ХМ, х200; в – значительное количество CD45+ лимфоцитов в интерстиции миокарда в группе ХМ, х200; г – отсутствие CD45+ лимфоцитов в интерстиции миокарда в контрольной группе, х100.

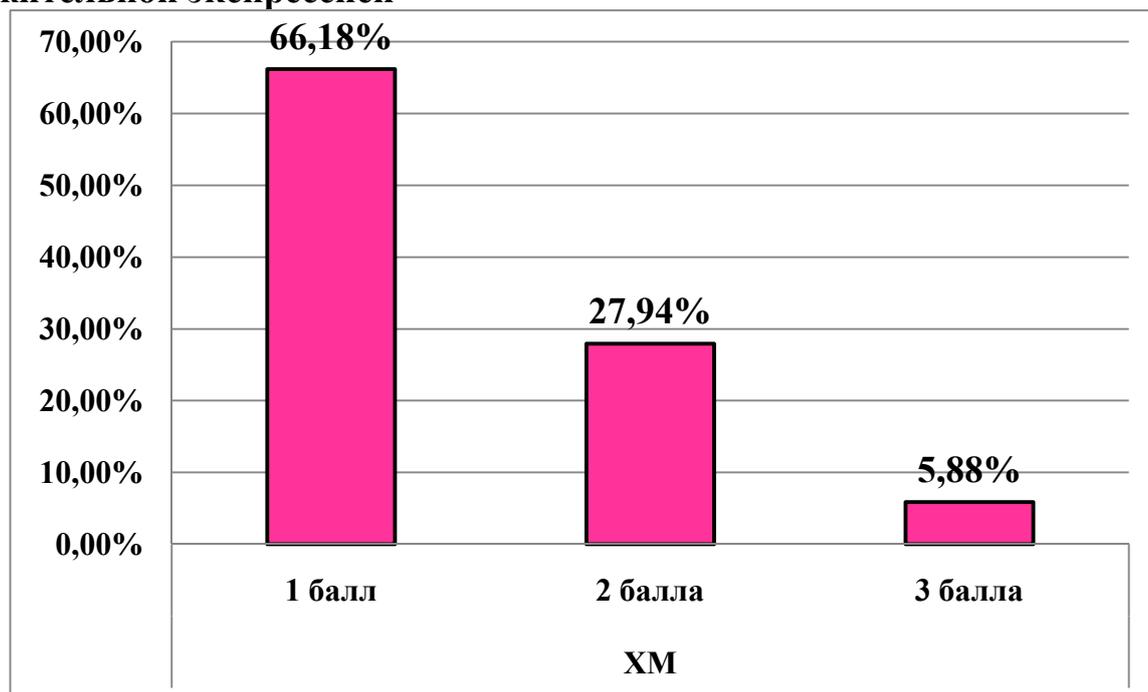
Среднее количество CD45+ лимфоцитов при ХМ составило $27,08 \pm 10,64$ клеток на 1 мм^2 . При сравнении среднего количества CD45+ лимфоцитов при трёх клинических вариантах хронического миокардита, наблюдалась следующая закономерность: наименьшее среднее количество клеток с положительной экспрессией при СВ миокардита ($24,66 \pm 11,01$ клетки на 1 мм^2), наибольшее – при АВ ($27,34 \pm 10,82$ клеток на 1 мм^2). При ДВ миокардита выявлено $26,84 \pm 10,66$ CD45+ клеток ($p < 0,05$) (Диаграмма 2).

Диаграмма 2 - Результаты количественной оценки экспрессии CD45 при АВ, ДВ, СВ миокардита группы ХМ и контрольной группы, количество клеток с положительной экспрессией



При полуколичественной оценке по шкале (Таблица 5) в группе ХМ достоверно чаще выставляли 1 балл (количество лимфоцитов от 14 до 29 на 1 мм²) – 45 (66,18%) случаев, и всего в трети из них зафиксировано менее 20 CD45+ лимфоцитов на 1 мм² - 15 (22,05%) наблюдений. 2 балла выставлено у 19 (27,94%) пациентов, 3 балла (более 45 CD45+ лимфоцитов) – в 4 (5,88%) случаях. Средний балл по подгруппе составил 1,39±0,60. В контрольной группе ни в одном случае не выявлено CD45+ клеток (Диаграмма 3).

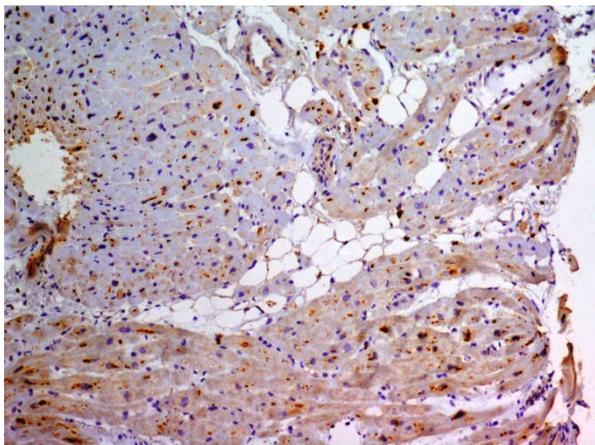
Диаграмма 3. Результаты полуколичественной оценки экспрессии CD45 маркера в миокарде пациентов группы с ХМ, % пациентов с положительной экспрессией



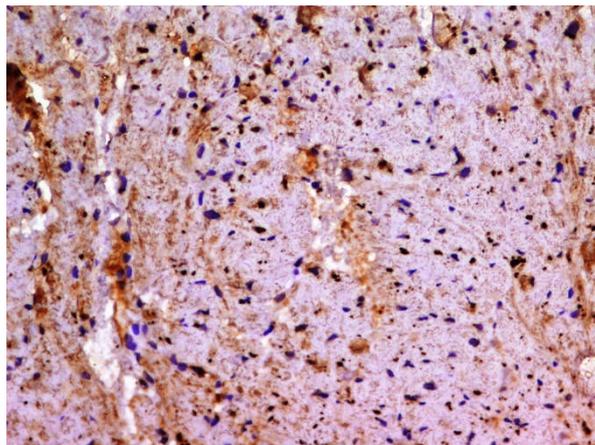
CD3

Маркёр Т-лимфоцитов определялся в клетках инфильтрата в 68 (100%) случаях пациентов с ХМ. Согласно критериям Далласа, в каждом случае выявлено более 7 CD3+ Т-лимфоцитов, что подтверждает диагноз лимфоцитарного миокардита (Рисунок 6).

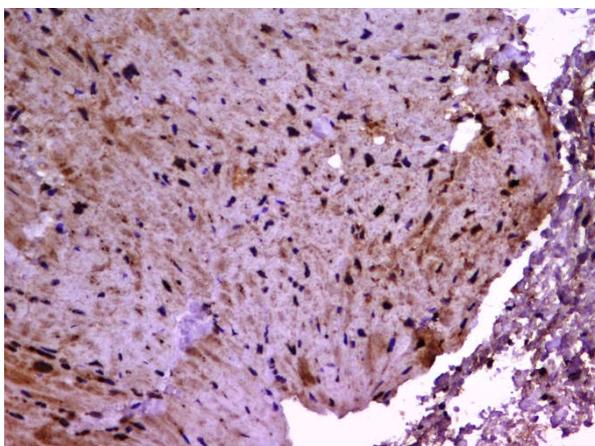
а



б



в



г

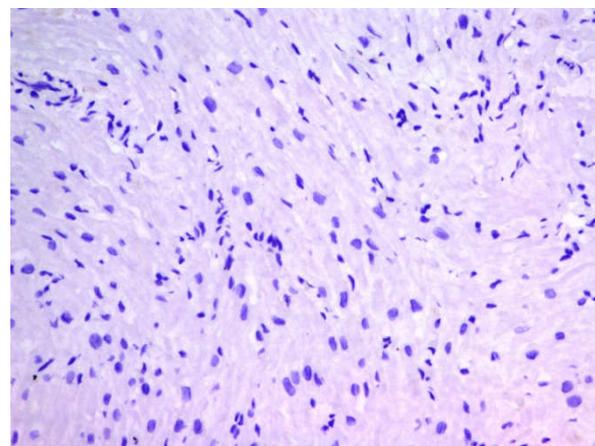
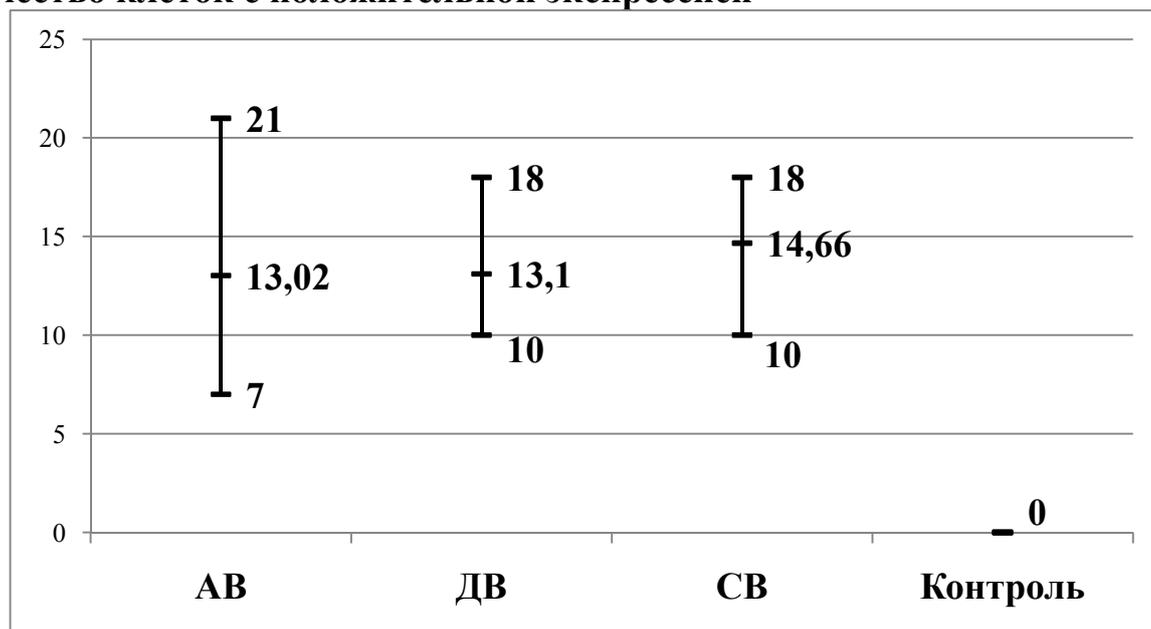


Рисунок 6 - Миокард, CD3+ Т-лимфоциты в группе ХМ и контрольной группе, иммунопероксидазная реакция: а – единичные CD3+ Т-лимфоциты в интерстиции миокарда в группе ХМ, х100; б – умеренное количество CD3+ Т-лимфоцитов в интерстиции миокарда в группе ХМ, х200; в – значительное количество CD3+ Т-лимфоцитов в интерстиции миокарда в группе ХМ, х200; г – отсутствие CD3+ Т-лимфоцитов в интерстиции миокарда в контрольной группе, х100.

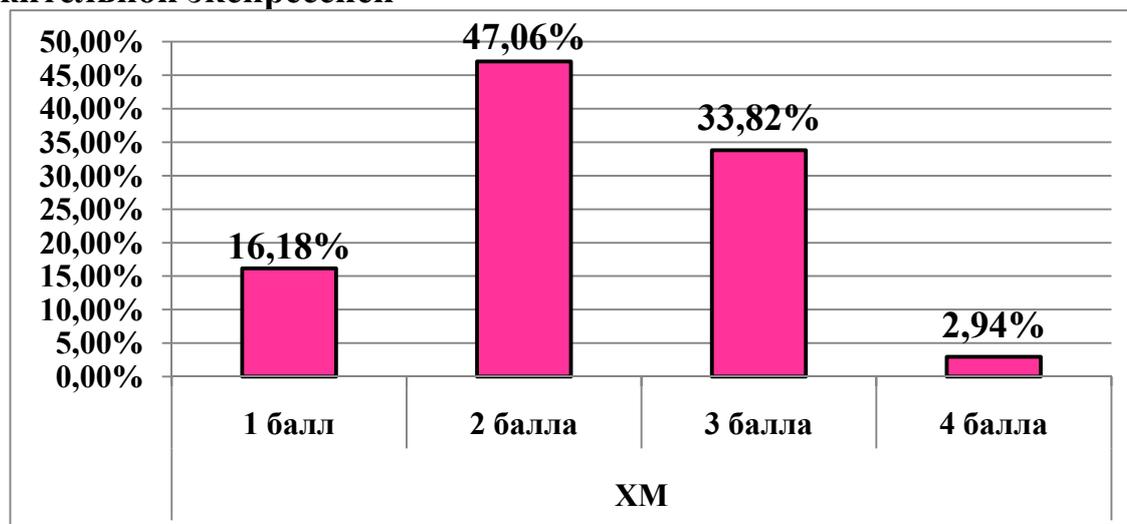
В I группе среднее количество CD3+ Т-лимфоцитов составило $13,12 \pm 3,61$ клеток на 1 мм^2 . Наибольшее среднее количество CD3+ Т-лимфоцитов выявлено в случаях СВ хронического миокардита ($14,66 \pm 4,16$ клеток на 1 мм^2), наименьшее – при АВ ($13,02 \pm 3,32$ клеток на 1 мм^2). ДВ соответствовало $13,10 \pm 4,29$ клеток на 1 мм^2 (Диаграмма 4).

Диаграмма 4 - Результаты количественной оценки экспрессии CD3 при АВ, ДВ, СВ вариантах миокардита группы ХМ и контрольной группы, количество клеток с положительной экспрессией



При полуколичественной оценке по шкале (Таблица 6) в группе ХМ чаще ставили 2 балла - 32 (47,06%) случая и 3 балла - 23 (33,82%) наблюдения, что соответствует умеренной и высокой степени активности воспалительного процесса. 1 балл и 4 балла (низкая и очень высокая степени активности миокардита) встречались значительно реже, в 11 (16,18%) и в 2 (2,94%) случаях, соответственно (Диаграмма 5). Средний балл равен $2,23 \pm 0,75$. В контрольной группе ни в одном случае не выявлено CD3+ клеток.

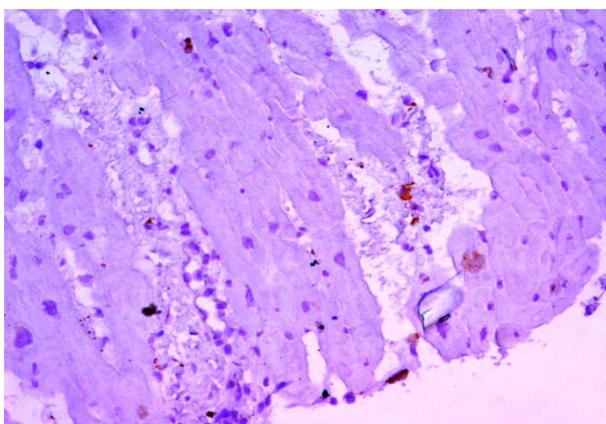
Диаграмма 5 - Результаты полуколичественной оценки экспрессии CD3 маркера в миокарде пациентов групп с ХМ, % пациентов с положительной экспрессией



CD68

Макрофаги в количестве до 50% клеток инфильтрата выявлены в 12 (17,64%) наблюдениях пациентов подгруппы ХМ, при этом 10 случаев соответствовали АВ миокардита, и по 1 случаю – ДВ и СВ. У пациентов контрольной группы положительная экспрессия CD68 не выявлена (Рисунок 7).

а



б

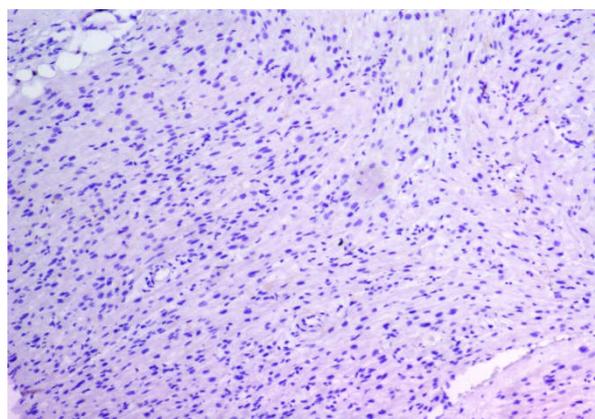


Рисунок 7 - Миокард, CD68+ макрофаги в группе ХМ и контрольной группе, иммунопероксидазная реакция: а – единичные CD68+ макрофаги в интерстиции миокарда в группе ХМ, х200; б – отсутствие CD68+ макрофагов в интерстиции миокарда в контрольной группе, х40.

CD20

В-лимфоциты не выявлены ни в одном случае пациентов с лимфоцитарным миокардитом и пациентов контрольной группы (Рисунок 8).

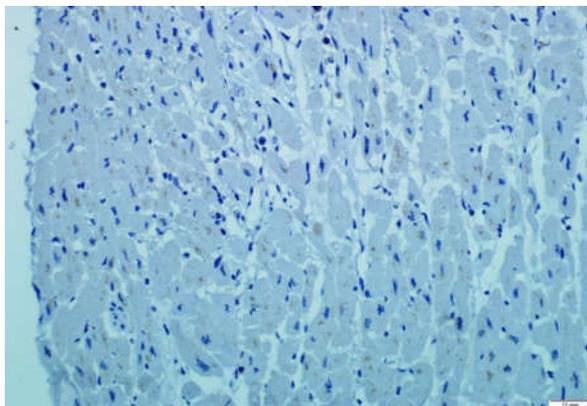
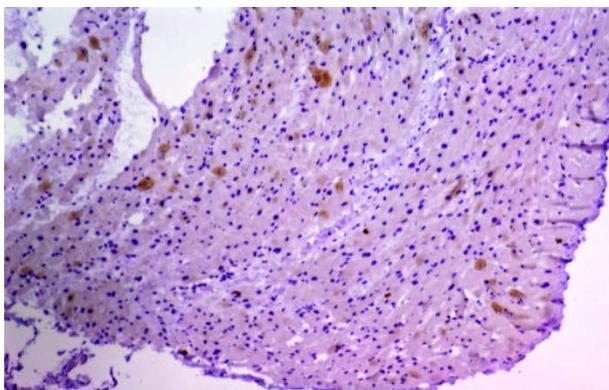


Рисунок 8 - Миокард, отсутствие CD20+ В-лимфоцитов в интерстиции миокарда в группе ХМ, иммунопероксидазная реакция, x100.

Perforin

NK-клетки определялись в 4 (5,88%) случаях группы ХМ. Распространённость составила до 10% клеток в инфильтрате. В контрольной группе ни в одном случае положительная экспрессия перфорина не отмечается (Рисунок 9).

а



б

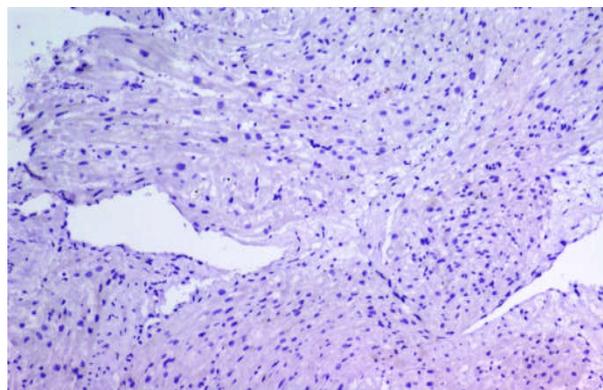


Рисунок 9 - Миокард, NK-клетки в группе ХМ и контрольной группе, иммунопероксидазная реакция: а – единичные NK-клетки в интерстиции миокарда в группе ХМ, x100; б – отсутствие NK-клеток в интерстиции миокарда в контрольной группе, x100.

TLR-4

В 60 (88,23%) случаях группы ХМ отмечена положительная экспрессия лимфоцитов и макрофагов к маркёру TLR 4 типа (Рисунок 10).

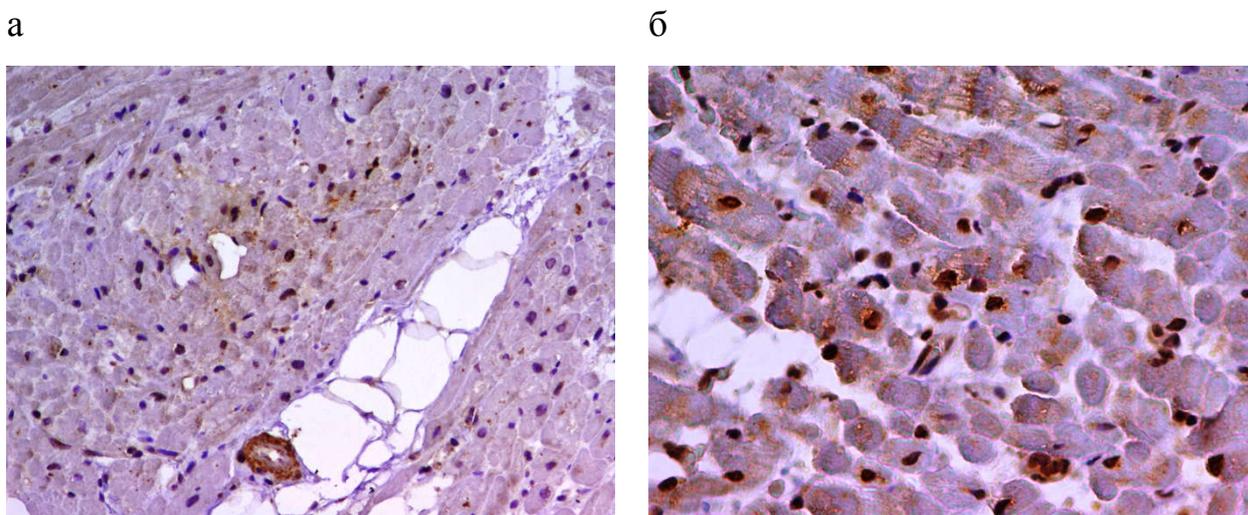
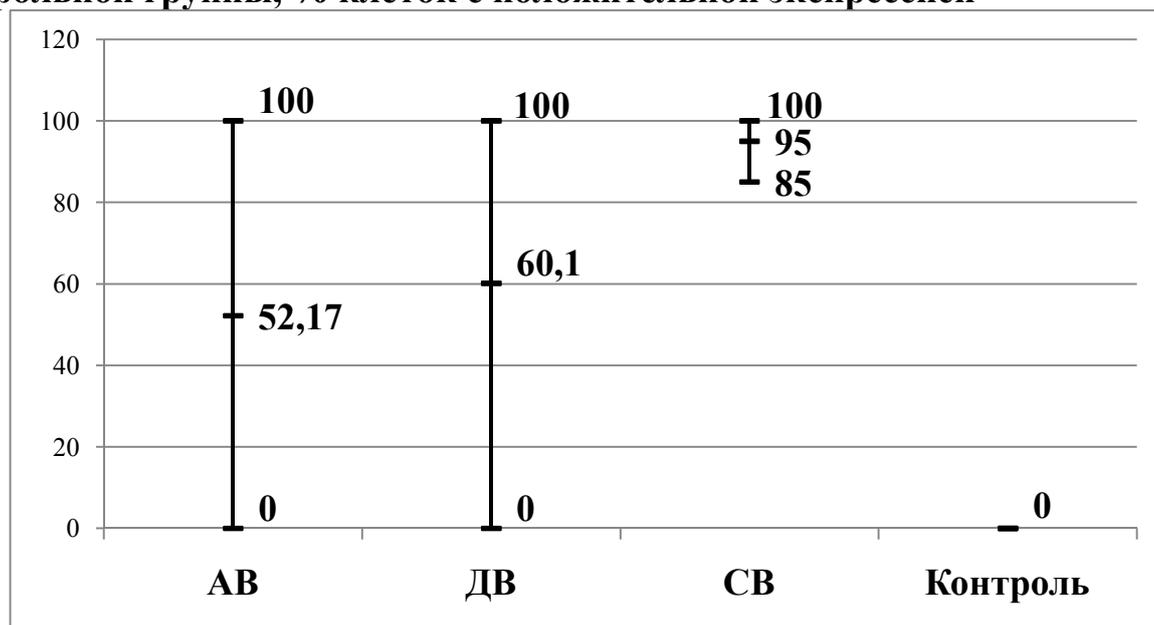


Рисунок 10 - Миокард, экспрессия TLR-4 в группе ХМ (ядерное и цитоплазматическое окрашивание), иммунопероксидазная реакция: а – слабая экспрессия, х 40; б – умеренная экспрессия в клетках инфильтрата, х200.

Проведена количественная (процентное содержание клеток с положительной экспрессией от общего количества клеток инфильтрата) и полуколичественная оценка экспрессии по шкале (Таблица 7).

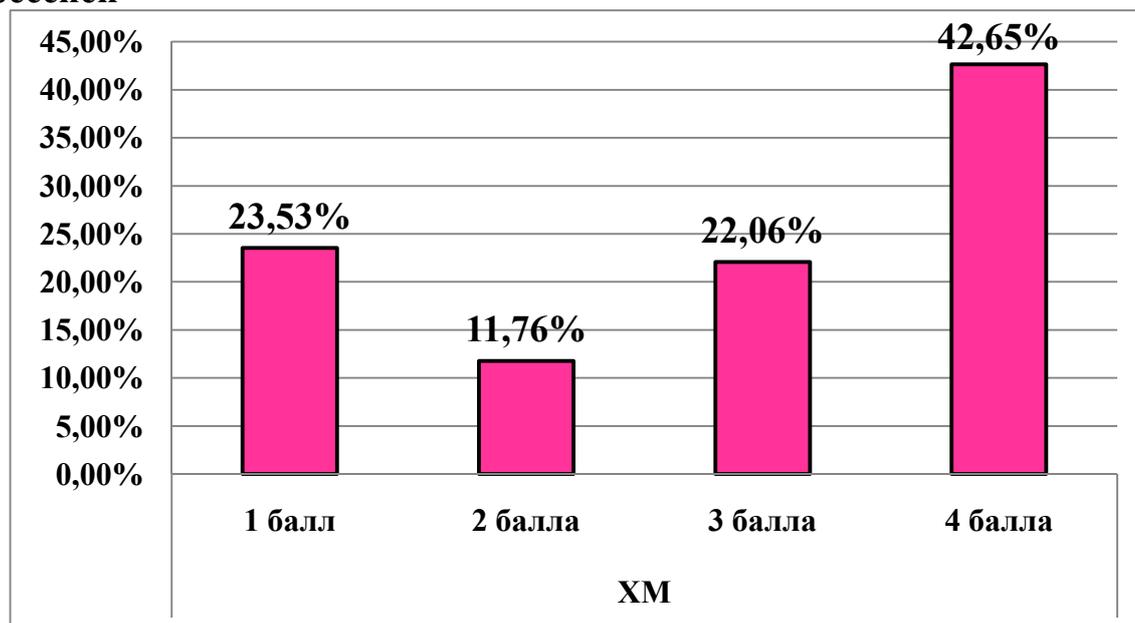
В группе пациентов с ХМ среднее количество клеток инфильтрата с положительной экспрессией составило $56,28 \pm 38,64\%$ клеток от общего количества клеток инфильтрата. Наибольшее количество TLR4+ клеток выявлено при СВ миокардита - $95,00 \pm 8,66\%$, наименьшее – при АВ ($52,17 \pm 40,44\%$), а при ДВ – $60,10 \pm 33,92\%$ (Диаграмма 6).

Диаграмма 6 - Результаты количественной оценки экспрессии TLR4 в миокарде пациентов с АВ, ДВ и СВ миокардита группы ХМ и контрольной группы, % клеток с положительной экспрессией



При полуколичественной оценке в группе хронического миокардита в 29 (42,65%) случаях выставлено 4 балла, в 15 (22,06%) – 3 балла. 1 и 2 балла встречались у 16 (23,52%) и 8 (11,76%) пациентов. При АВ и СВ миокардита достоверно чаще выставляли 4 балла, при ДВ – 3 балла. Средний балл по группе ХМ – $2,83 \pm 1,21$ (Диаграмма 7), что совпадает с данными, опубликованными ранее Коган Е.А., Благовой О.В., [3].

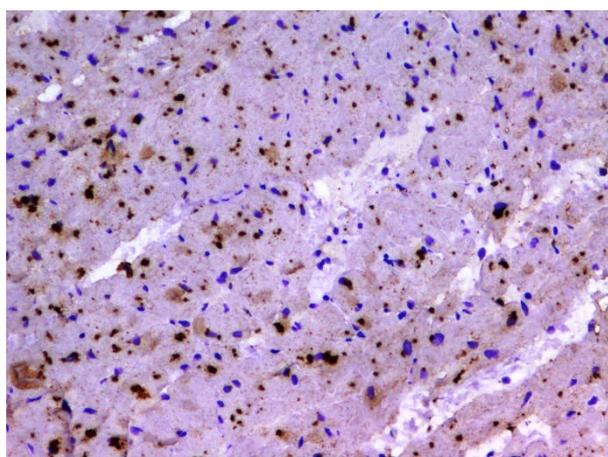
Диаграмма 7 - Результаты полуколичественной оценки экспрессии TLR-4 в миокарде пациентов группы с ХМ, % пациентов с положительной экспрессией



TLR-9

В 62 (91,17 %) случаях группы ХМ отмечена положительная экспрессия лимфоцитов и макрофагов к маркёру TLR 9 типа (Рисунок 11).

а



б

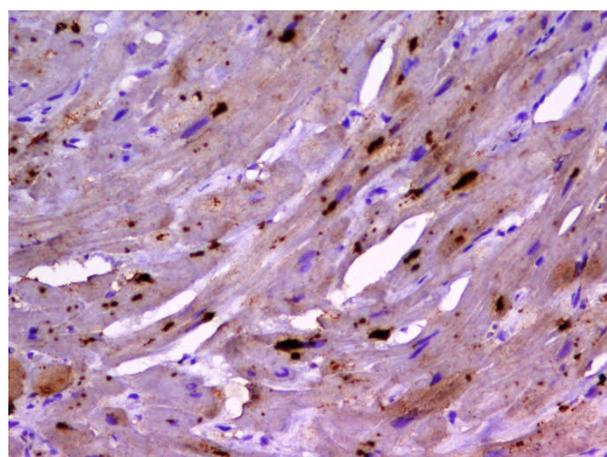
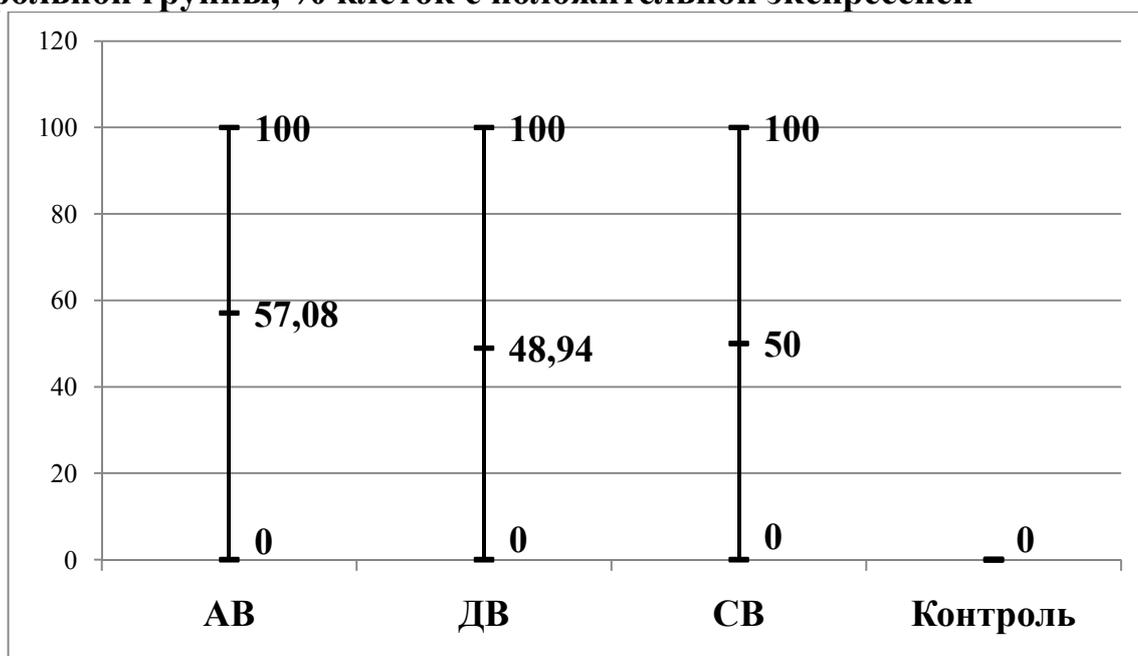


Рисунок 11 - Миокард, экспрессия TLR-9 в группе ХМ (ядерное и цитоплазматическое окрашивание), иммунопероксидазная реакция: а – умеренная экспрессия, x100; б – выраженная экспрессия, x200.

Проведена количественная (процентное содержание клеток с положительной экспрессией от общего количества клеток инфильтрата) и полуколичественная оценка экспрессии по шкале (Таблица 7).

Среднее число клеток с положительной экспрессией при ХМ составило $54,50 \pm 32,46\%$. Распределение количества клеток с положительной экспрессией TLR9 в группе ХМ: наибольшее у пациентов с АВ миокардита ($57,08 \pm 29,46\%$), наименьшее при ДВ ($48,94 \pm 37,69\%$), при СВ – $50,00 \pm 50,00\%$ (Диаграмма 8).

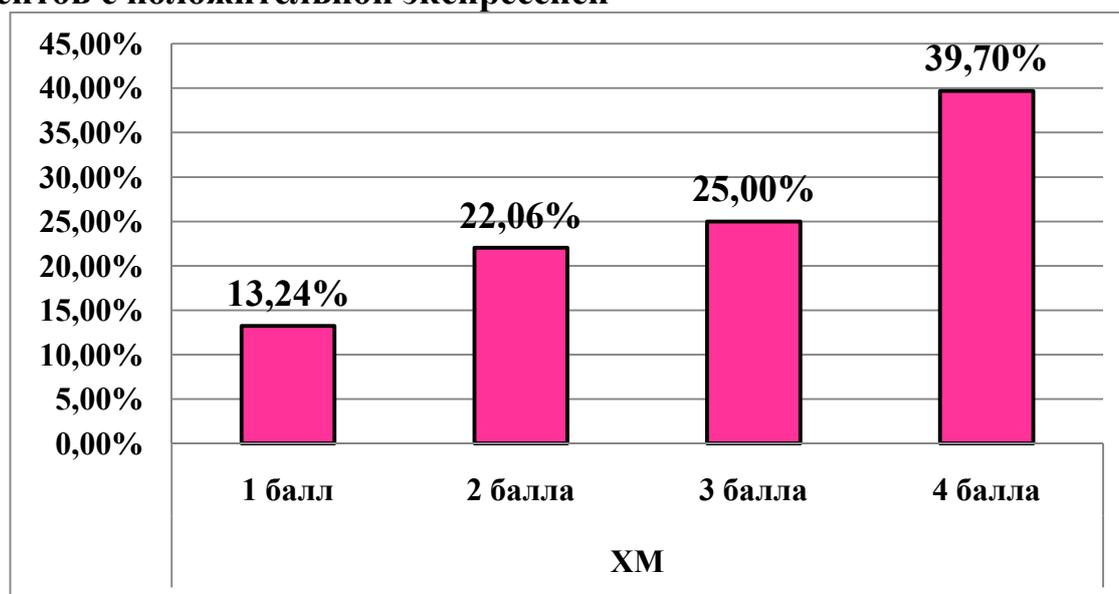
Диаграмма 8 - Результаты количественной оценки экспрессии TLR9 в миокарде пациентов с АВ, ДВ и СВ миокардита группы ХМ и контрольной группы, % клеток с положительной экспрессией



В группе ХМ чаще наблюдалась экспрессия в 4 балла по шкале (75% и более клеток инфильтрата) – 27 (39,70%) наблюдений. Умеренная экспрессия в 2 и 3 балла по шкале наблюдалась в 15 (22,06%) и 17 (25,00%) случаях, соответственно. Низкая экспрессия в 1 балл по шкале отмечена в 9 (13,24%) наблюдениях. При АВ и ДВ миокардита достоверно чаще выставляли 4 балла

(19 и 7 пациентов, соответственно), при СВ выставлено 4, 3 и 1 балл. Средний балл по группе хронического миокардита составил – $2,91 \pm 1,07$ (Диаграмма 9).

Диаграмма 9 - Полуколичественная оценка TLR-9 в миокарде пациентов группы с хроническим лимфоцитарным миокардитом (ХМ), % пациентов с положительной экспрессией



При ИГХ-исследовании III контрольной группы ни в одном случае не выявлено положительной экспрессии маркеров CD3, CD20, CD45, CD68, TLR-4, TLR-9, perforin.

Проведён расширенный корреляционный анализ количественных и полуколичественных данных. Коэффициент корреляции (r) рассчитывался для абсолютного (количество клеток) и относительного (баллы по шкале) показателей каждого маркера.

Выявлена зависимость между экспрессией маркеров CD3, CD45, TLR4 и TLR9 в группе ХМ (Таблица 13).

Таблица 13 - Результаты корреляционного анализа экспрессии маркёров CD3, CD45, TLR4, TLR9 (r)

Корреляция		Группа ХМ	Интерпретация
r (CD3, CD45)	Абс.	-0,02	Отриц. Слабая
	Отн.	-0,02	Отриц. Слабая
r (TLR4, TLR9)	Абс.	0,27	Полож. Слабая
	Отн.	0,18	Полож. Слабая
r (CD3, TLR4)	Абс.	0,45	Полож. Умеренная
	Отн.	0,35	Полож. Умеренная
r (CD3, TLR9)	Абс.	0,38	Полож. Умеренная
	Отн.	0,39	Полож. Умеренная
r (CD45, TLR4)	Абс.	0,10	Полож. Слабая
	Отн.	0,02	Полож. Слабая
r (CD45, TLR9)	Абс.	-0,09	Отриц. Слабая
	Отн.	-0,06	Отриц. Слабая

Наиболее значимая корреляция в группе ХМ выявлена между абсолютным количеством CD3+ Т-лимфоцитов и TLR4+ клеток, а также TLR9+ клеток (Диаграмма 10, 11). Количество CD3+ клеток напрямую коррелирует с экспрессией белков TLR4 и TLR9.

Диаграмма 10 - Корреляционная зависимость CD3+ лимфоцитов и TLR4+ клеток инфильтрата в группе ХМ (r=0,45)

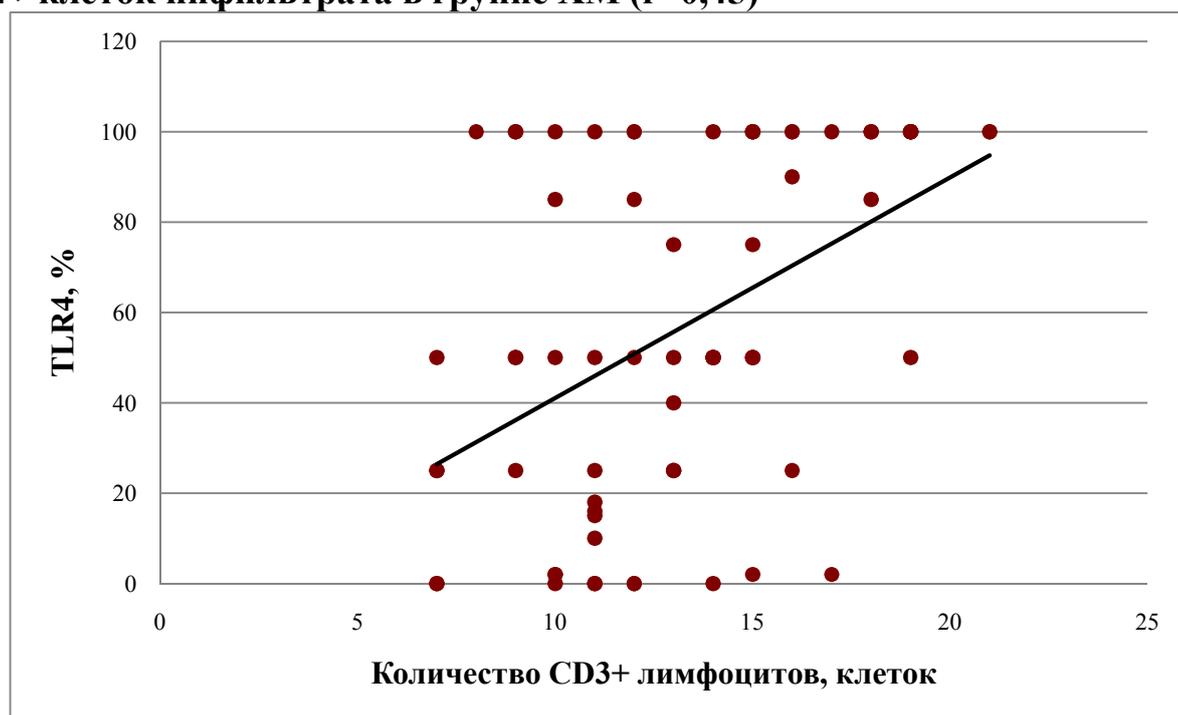
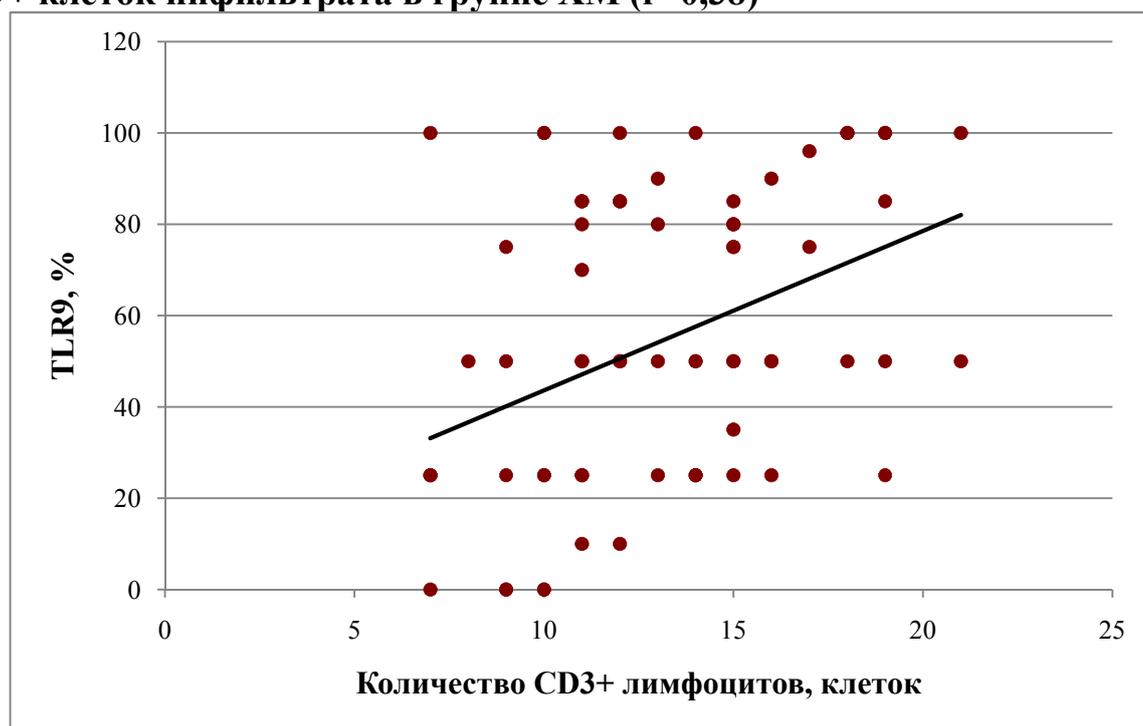


Диаграмма 11 - Корреляционная зависимость CD3+ лимфоцитов и TLR9+ клеток инфильтрата в группе ХМ ($r=0,38$)



Таким образом, иммуногистохимический профиль воспалительного инфильтрата при разных клинических вариантах ХМ различен. Для АВ характерно наибольшее среднее количество CD45+ клеток, но наименьшее количество CD3+ лимфоцитов, чем в группах пациентов с ДВ и СВ. Наибольшее количество CD3+ лимфоцитов соответствует СВ хронического миокардита.

ИГХ-исследование на экспрессию семейства toll-подобных рецепторов также выявило определённую закономерность. При АВ хронического миокардита отмечается наименьшая экспрессия TLR-4 ($52,17 \pm 40,44\%$), чем при ДВ и СВ миокардита, что соответствует минимальной степени воспалительной активности. TLR-4 активируются в ответ на вирусный агент, TLR-9 – на бактериальный. Экспрессия TLR-9 в миокарде пациентов с АВ была немногим выше, чем при других вариантах хронического миокардита. Нами выявлена положительная взаимосвязь между экспрессией CD3 и TLR 4 и 9 типов (коэффициент корреляции r составил 0,45 и 0,38, соответственно),

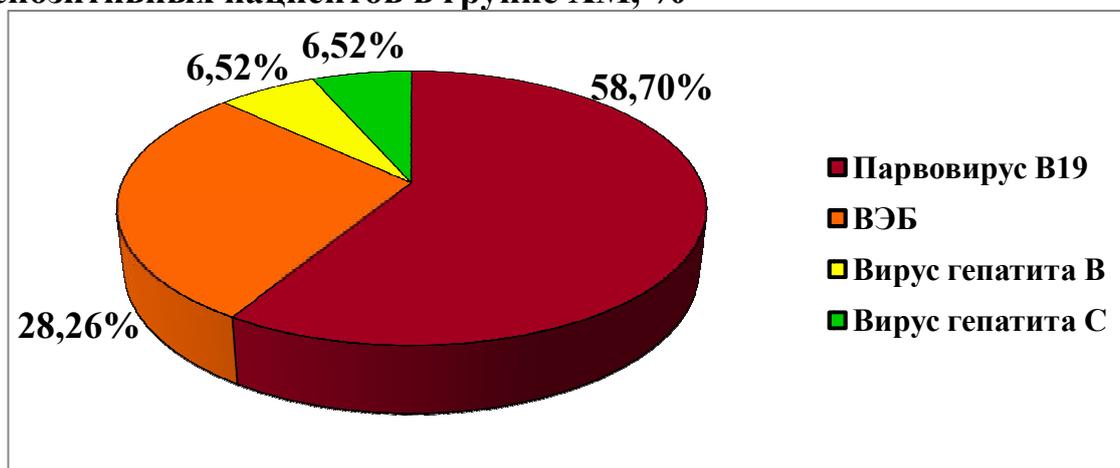
что соответствует данным литературы, поскольку данные маркёры показывают степень воспалительной активности в миокарде.

3.1.4. Вирусологическое исследование

Обнаруженный в миокарде лимфоцитарный инфильтрат свидетельствует о вирусной инфекции, которая была причиной развития хронического воспаления в миокарде. Проводилось типирование вируса в миокарде методом полимеразной цепной реакции.

В 46 (67,65%) случаях в миокарде был обнаружен вирусный геном, 22 (32,35%) пациента оказались вируснегативны. Вероятно, вируснегативные по миокарду пациенты имели отдалённо, в анамнезе острую вирусную инфекцию, от которой пациенты были успешно излечены, но которая спровоцировала развитие хронического миокардита. Вторая вероятная причина отсутствия вирусной нагрузки у части пациентов может быть связана с ответом на этиотропную терапию хронического миокардита. В вирусопозитивных биоптатах идентифицировался парвовирус В19 (27 случаев – 58,70% из вирусопозитивных пациентов), ВЭБ (13 наблюдений – 28,26% из вирусопозитивных пациентов), вирус гепатита В и С (по 3 случая – 6,52% из вирусопозитивных пациентов) (Диаграмма 12).

Диаграмма 12 - Частота идентификации вирусного генома в миокарде у вирусопозитивных пациентов в группе ХМ, %



3.2. Клинико-морфологические особенности миокардита при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (КМ)

3.2.1. Клиническая характеристика

Клинико-anamnestический анализ (Таблица 14) проводился для 32 пациентов, страдающих миокардитом, развившемся при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Возраст пациентов с КМ колебался от 32 до 97 лет (в среднем, $72,70 \pm 15,52$ лет) В этой группе преобладали мужчины: 17 мужчин (53%) и 15 женщин (47%).

Таблица 14 - Клинико-anamnestические данные пациентов с КМ

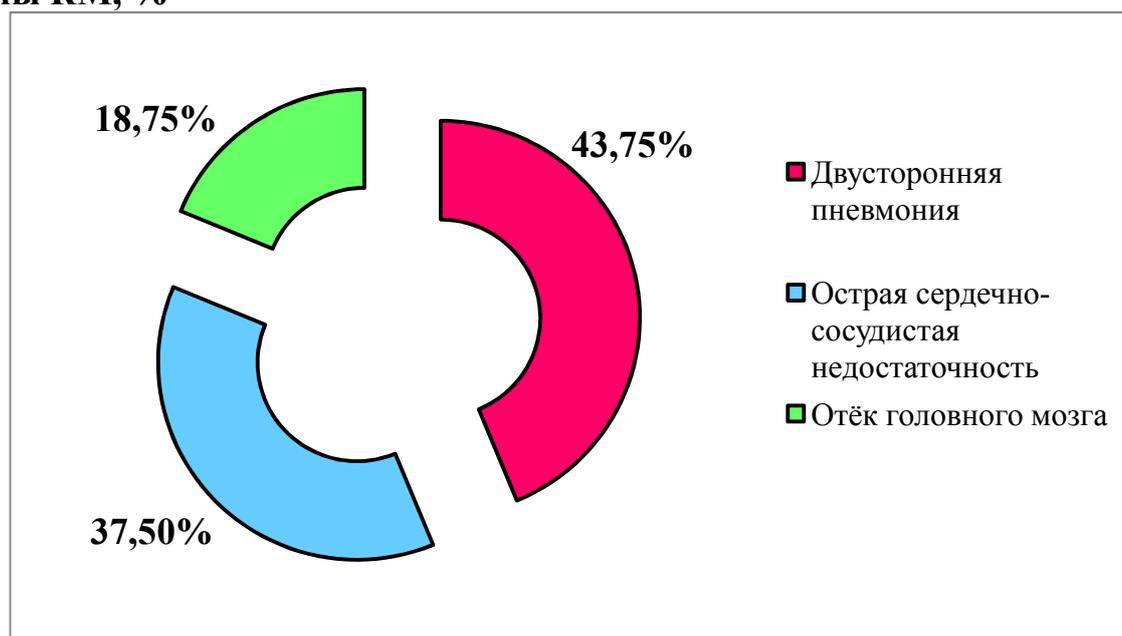
Показатель	Группа КМ (n=32)	
	Абс.	%
Возраст, лет	$72,7 \pm 15,52$	-
Женский пол	15	47,00
Мужской пол	17	53,00

Основным заболеванием клинического диагноза в 32 (100,00%) случаях стала новая коронавирусная инфекция, подтверждённая полимеразной цепной реакцией (вирус SARS-CoV-2).

Летальный исход наступил на 3-30 сутки заболевания новой коронавирусной инфекцией (в среднем, на $13,31 \pm 7,41$ сутки заболевания), на эти же сутки проводилось патологоанатомическое вскрытие.

Причины смерти, установленные в ходе макроскопического исследования (Диаграмма 13) включали двустороннюю пневмонию в 14 случаях (43,75%), острую сердечно-сосудистую недостаточность – 12 наблюдений (37,50%), отёк головного мозга – 6 пациентов (18,75%).

Диаграмма 13 - Частота встречаемости причин смерти у пациентов группы КМ, %



Проведено исследование зависимости причины смерти и количества суток заболевания новой коронавирусной инфекцией, на которые наступил летальный исход (Таблица 15).

Таблица 15 – Причины смерти и количество суток заболевания

Причина смерти	Минимальные сутки наступления летального исхода	Максимальные сутки наступления летального исхода	Средние сутки наступления летального исхода
Двусторонняя пневмония	6	28	12,87±6,37
Острая сердечно-сосудистая недостаточность	3	30	14,91±9,21
Отек головного мозга	6	18	10,25±5,44

Проводился анализ экстракардиальных проявлений новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (Таблица 16). В группе с КМ морфологически у 32 (100%) пациентов выявлена патология органов дыхания, у 31 (96,87%) человека - патология почек.

В этой группе среди патологии дыхательной системы наиболее часто встречался респираторный дистресс-синдром взрослых либо его остаточные явления (РДСВ, 25 человек, 78,12%) и фибринозно-лимфоцитарный альвеолит (15 пациентов, 46,87%) в рамках перенесённой новой коронавирусной инфекции.

Болезни мочевыделительной системы, выявленные при исследовании микропрепаратов, у пациентов группы КМ, включали острую почечную недостаточность (ОПН, 29 человек, 93,54%), мочекаменную болезнь (МКБ, 2 пациента, 6,45%), хронический пиелонефрит (ХПНФ, 4 человека, 12,90%).

У 20 (62,50%) человек морфологически выявлена патология гемостаза в виде тромбоза мелких ветвей лёгочной артерии (ТЭЛА).

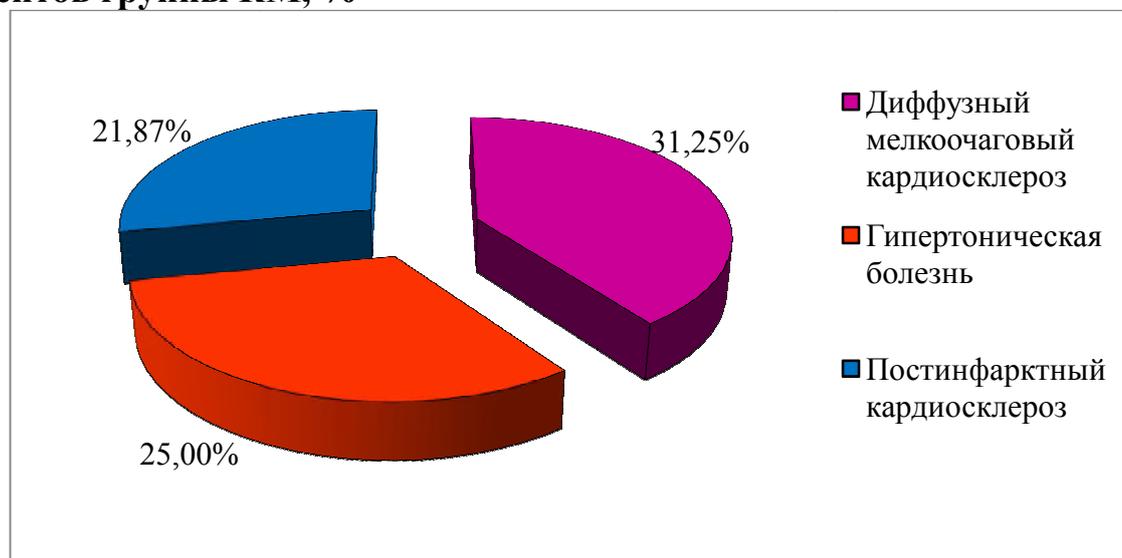
Таблица 16 – Экстракардиальные проявления новой коронавирусной инфекции у пациентов с КМ

Экстракардиальные проявления		Подгруппа КМ (n=32)	
		Абс.	%
Болезни органов дыхания	Альвеолит/пневмонит	15	46,87
	РДСВ	25	78,12
Болезни органов мочевыделительной системы	МКБ	2	6,45
	ОПН	29	93,54
	ХПНФ	4	12,90
Патология гемостаза	ТЭЛА	20	62,50

Сопутствующей предрасполагающей патологией стали диффузный мелкоочаговый кардиосклероз (10 случаев – 31,25%), гипертоническая

болезнь (8 наблюдений – 25,00%) и постинфарктный кардиосклероз (7 пациентов – 21,87%) (Диаграмма 14).

Диаграмма 14 - Частота встречаемости сопутствующего заболевания пациентов группы КМ, %



Таким образом, в группе пациентов с КМ преобладали лица пожилого возраста (старше 65 лет) с морфологически верифицированными осложнениями COVID-19 со стороны органов дыхания (альвеолит, РДСВ), органов мочевыделительной системы (МКБ, ОПН, ХПНФ), органов эндокринной системы и системы гемостаза (ТЭЛА).

3.2.2. Морфологическая характеристика

При макроскопическом исследовании сердец пациентов с КМ средние размеры сердца составили $14,20 \pm 1,76 \times 10,50 \pm 0,64 \times 6,50 \pm 0,22$ см. Масса сердец колебалась от 300 до 430 г, в среднем, составляя $361,65 \pm 35,87$ г. Толщина стенки левого желудочка от 2,2 до 2,9 см, в среднем, $2,50 \pm 0,22$, правого - 0,3–0,5 см, в среднем, $0,40 \pm 0,08$ см. При вскрытии сердец в 22 (68,75%) наблюдениях отмечались дилатация камер и гипертрофия стенки левого желудочка. На эндокарде в 9 (28,12%) случаях наблюдались пристеночные

тромбы. Во всех наблюдениях миокард был дряблой консистенции, на разрезе тёмно-красного цвета, пёстрого вида, с мелкими желтовато-красноватыми/белесоватыми очажками. Перикард отёчный, в 4 (12,50%) случаях утолщен. Количество желтоватой прозрачной жидкости в полости перикарда составило от 17 до 22 мл, в среднем, $19,00 \pm 3,00$ мл.

При гистологическом исследовании отмечались изменения миокарда, эндо- и перикарда, коронарных артерий. Среди изменений миокарда наблюдались лимфоцитарный миокардит с отёком интерстиция, с дистрофией кардиомиоцитов, с апоптозом кардиомиоцитов с формированием апоптозных телец, отмечалась неравномерная гипертрофия кардиомиоцитов с полосами пересокращения, липофусциноз кардиомиоцитов, кардиосклероз (постинфарктный крупноочаговый и диффузный мелкоочаговый) (Таблица 17). Проводилась оценка степени выраженности субэндокардиального липоматоза в процентах от площади микропрепарата с использованием программы для морфометрии PhotoM 1.21.

Таблица 17 - Гистологическая характеристика миокарда пациентов групп сравнения (критерий χ^2 , двусторонний метод Фишера)

Гистологический признак	КМ n=32	χ^2	F	III n=20
Лимфогистиоцитарная инфильтрация	32	-	-	0
Дистрофия кардиомиоцитов	11*	22,80	0,00	18
Некроз	1	0,884	0,560	2
Апоптоз	22	7,015	0,012	5
Гипертрофия кардиомиоцитов	12*	4,589	0,043	20
Липофусциноз	20*	3,036	0,118	17
Крупноочаговый кардиосклероз	7*	0,797	0,637	1
Диффузный мелкоочаговый кардиосклероз	10*	7,558	0,008	3
Липоматоз	7*	0,375	0,722	3
Отёк интерстиция	10*	3,131	0,099	2
Кровоизлияния	2*	1,300	0,517	0

*Различия, статистически достоверные по сравнению с контрольной группой III, $p \leq 0,05$

В группе с КМ в 32 (100%) случаях выявлен лимфоцитарный миокардит (Рисунок 12).

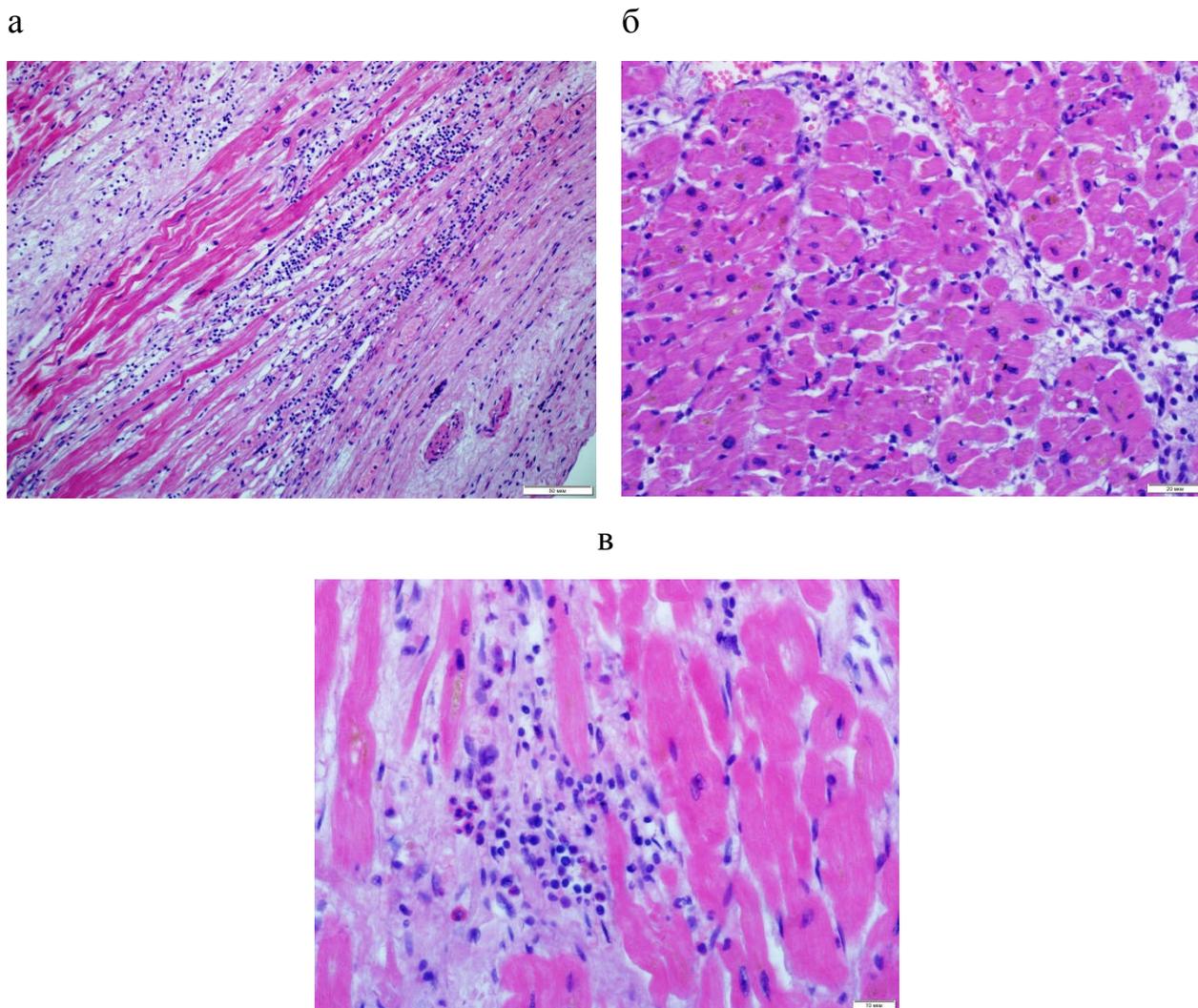


Рисунок 12 - Миокард в группе КМ, гематоксилин и эозин: а - лимфоцитарный миокардит, x100; б - лимфоцитарный миокардит, x200; в - лимфоцитарный миокардит, x400.

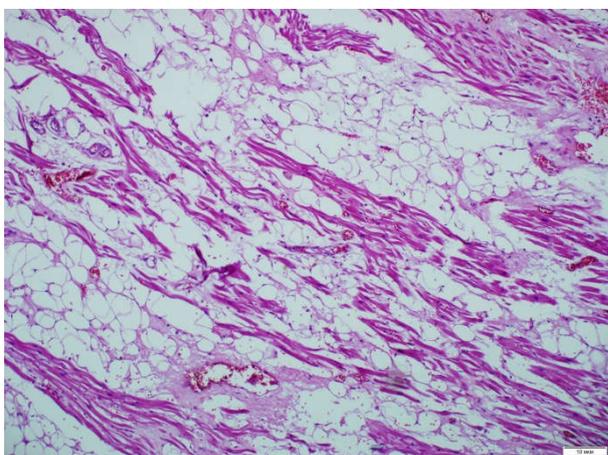
При сравнении с группой ХМ у пациентов с КМ дистрофические и некротические изменения кардиомиоцитов встречались достоверно реже: жировые дистрофии в 11 (34,37%) случаях, некроз отдельных кардиомиоцитов – в 1 (3,12%) наблюдении. Однако выявлена высокая частота апоптоза кардиомиоцитов во II группе (68,75%), что может быть связано с механизмом действия вируса SARS-CoV-2 на кардиомиоциты. При

КМ неравномерная гипертрофия кардиомиоцитов наблюдалась в 12 (37,5%) случаях, гранулы липофусцина определялись в кардиомиоцитах 20 (62,5%) пациентов, что, вероятнее всего, связано с возрастом пациентов и с предсуществующей патологией сердца в виде постинфарктного кардиосклероза и/или гипертонической болезни. Крупноочаговый кардиосклероз выявлен в 7 (21,87%) случаях, диффузный мелкоочаговый кардиосклероз – в 10 (31,25%).

Субэндокардиальный липоматоз обнаружен в 7 (21,88%) наблюдениях. Площадь липоматоза рассчитывалась морфометрически с использованием программы PhotoM 1.21. Средний процент площади липоматоза от площади объекта (микрофотографии) составил $1,21 \pm 1,66\%$, что достоверно ниже, чем в подгруппе хронического миокардита.

Интерстициальный отёк в миокарде выявлен в 10 (31,25%) случаях, а мелкие кровоизлияния в строме – у 2 (6,25%) пациентов (Рисунок 13).

а



б

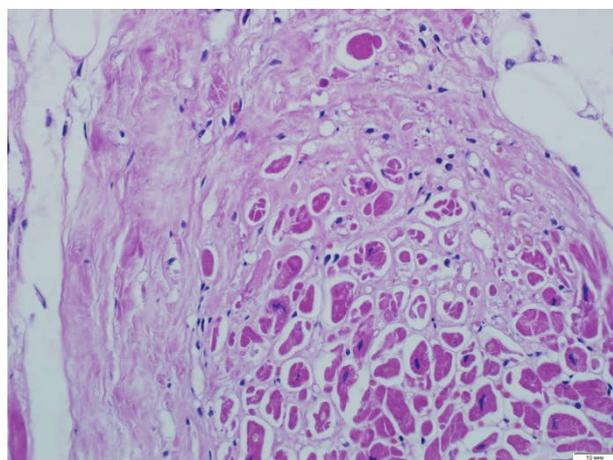


Рисунок 13 - Миокард в группе КМ, гематоксилин и эозин: а – субэндокардиальный липоматоз, х 100; б – склероз интерстиция, х 200.

Изменения эндо- и перикарда включали наличие лимфогистиоцитарных инфильтратов, склероза эндокарда, пристеночных тромбов на эндокарде (Таблица 18).

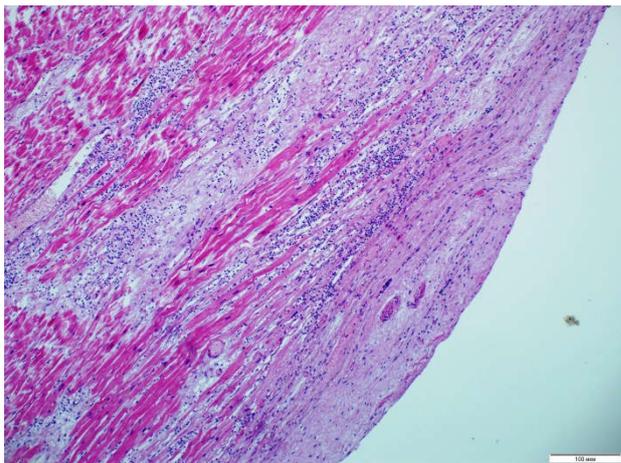
Таблица 18 - Гистологическая характеристика эндо- и перикарда пациентов групп сравнения (критерий χ^2 , двусторонний метод Фишера)

Гистологический признак	КМ n=32	χ^2	F	III n=20
Лимфогистиоцитарный инфильтрат в эндокарде	11*	8,720	0,003	0
Склероз эндокарда	8*	17,749	0,003	17
Пристеночные тромбы	7	5,056	0,350	0
Лимфогистиоцитарный инфильтрат в перикарде	8	5,909	0,017	0

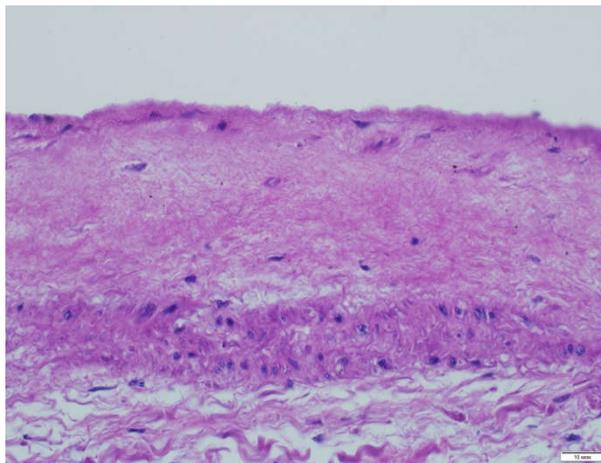
*Различия, статистически достоверные по сравнению с контрольной группой III, $p \leq 0,05$

В группе КМ лимфогистиоцитарный инфильтрат в эндокарде выявлен достоверно чаще, чем в группе ХМ, в 11 (34,37%) случаях, в перикарде – в 8 (25,00%). Склеротические изменения эндокарда встречались в 8 (25,00%) наблюдениях; пристеночные тромбы, состоящие из фибрина, тромбоцитов, эритроцитов и большого количества лимфоцитов – в 7 (21,88%) случаях, что подтверждается и данными макроскопической оценки эндокарда (Рисунок 14).

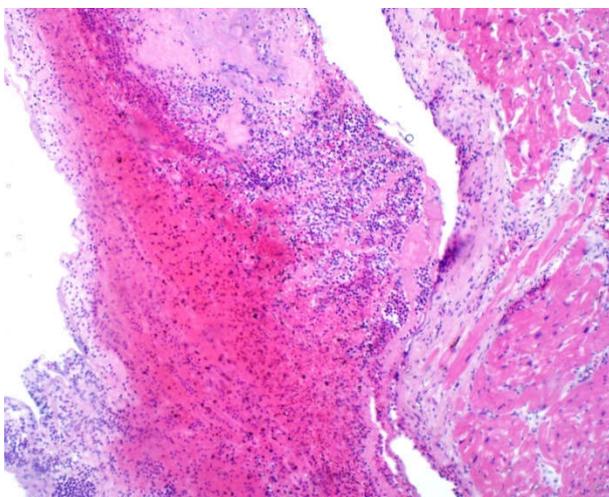
а



б



в



г

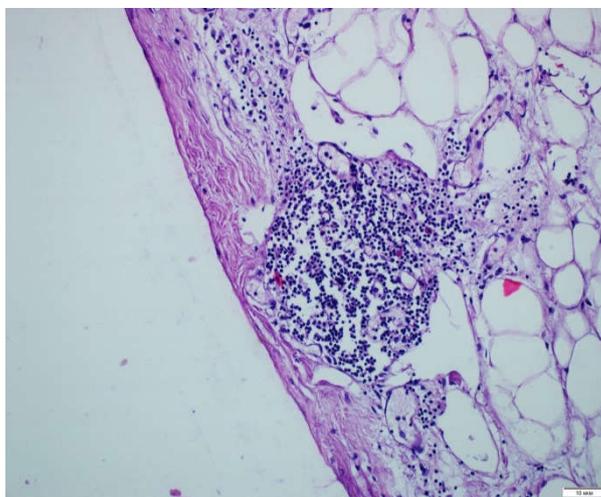


Рисунок 14 - Эндокард и перикард в группе КМ, гематоксилин и эозин: а – лимфоцитарный эндомиокардит, х100; б – склероз эндокарда, х200; в – пристеночный тромб на эндокарде, х100; г – лимфоцитарный перикардит, х100.

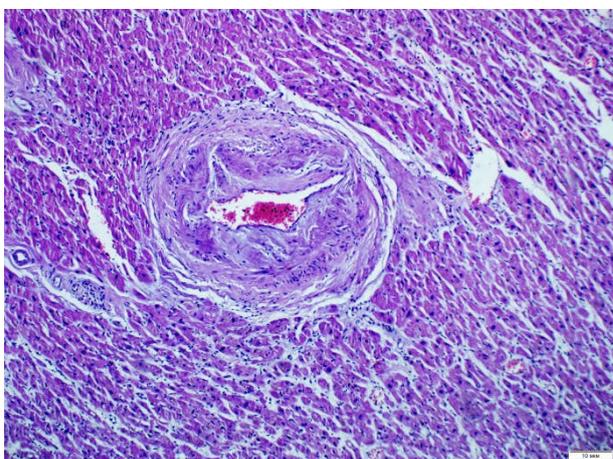
Поражения мелких веточек коронарных артерий встречались достоверно чаще среди пациентов с КМ, чем с ХМ: деструктивно-продуктивный тромбоваскулит (коронариит) наблюдался у 30 (93,75%) человек, эндотелиит – у 2 (6,25%) (Таблица 19). Сладж-феномен выявлен у 12 (37,5%) пациентов, полнокровие – у 20 (62,50%) человек, тромбоз/микротромбоз – в 3 (9,38%) случаях (Рисунок 15).

Таблица 19 - Гистологическая характеристика коронарных сосудов пациентов групп сравнения (критерий χ^2 , двусторонний метод Фишера)

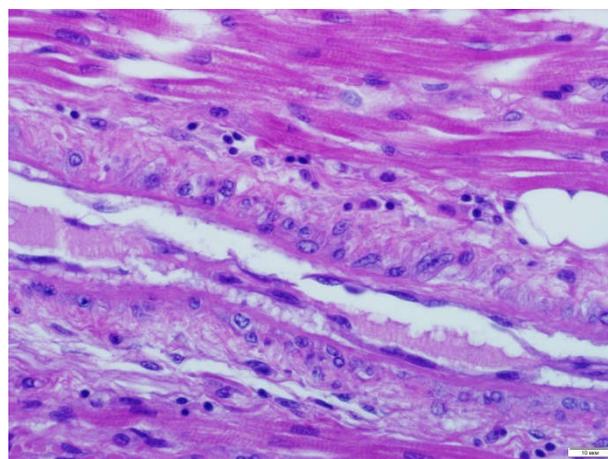
Гистологический признак	КМ n=32	χ^2	F	III n=20
Деструктивно-продуктивный коронарит	30*	40,266	0,0001	1
Эндотелиит	2*	1,692	0,132	1
Сладж-феномен	12*	4,731	0,051	2
Полнокровие	20	20,313	0,0001	0
Тромбоз	3*	0,332	1,000	1

*Различия, статистически достоверные по сравнению с контрольной группой III, $p < 0,05$

а



б



в

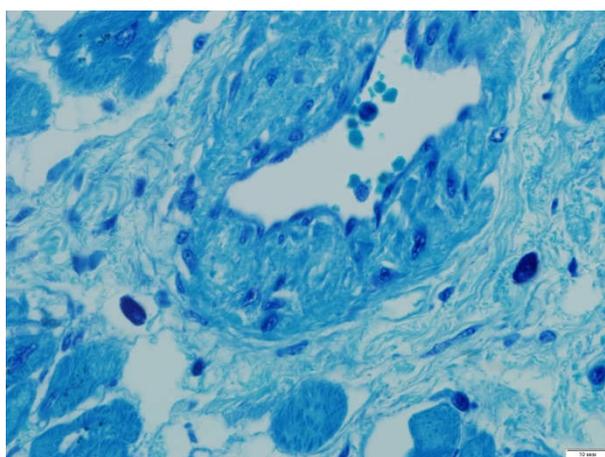


Рисунок 15 - Коронарные артерии в группе КМ: а – деструктивно-продуктивный коронарит мелких ветвей, гематоксилин и эозин, х 100; б – эндотелиит коронарной артерии, гематоксилин и эозин, х 400; в – эндотелиит и инфильтрация тучными клетками мелких ветвей коронарной артерии, толуидиновый синий, х 400.

При окраске пикрофуксином по Ван Гизону в 32 (100%) наблюдениях этой группы выявлялся периваскулярный и перимускулярный склероз (Рисунок 16).

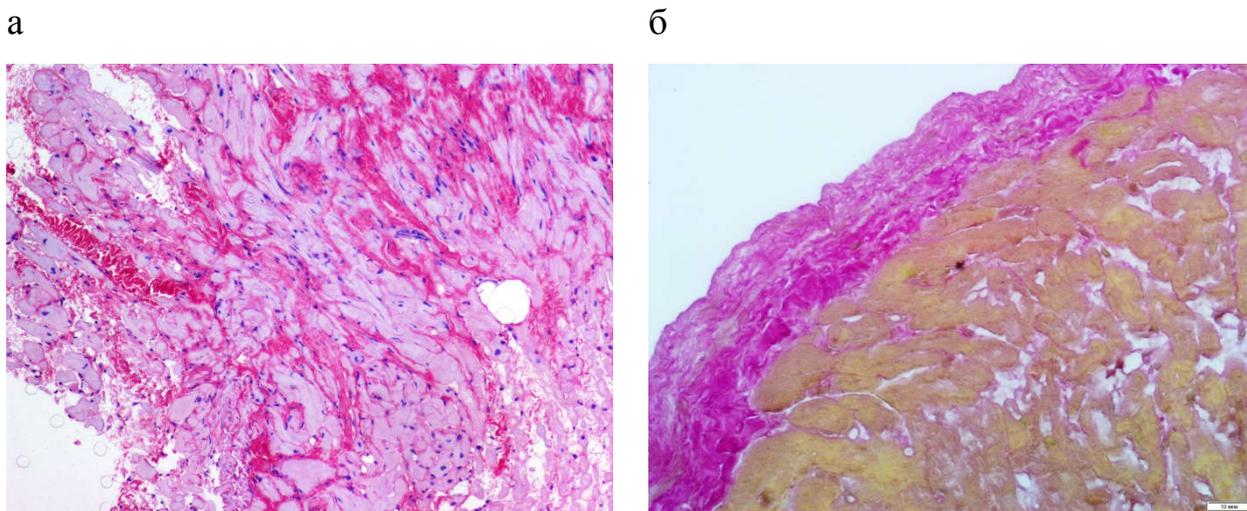


Рисунок 16 - Эндокард и миокард в группе КМ, пикрофуксин по Ван Гизону: а – склероз интерстиция, x100; б – склероз эндокарда, x200.

Таким образом, гистологические особенности миокардита при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, включают: лимфоидную инфильтрацию в миокарде, апоптоз кардиомиоцитов, вовлечение в воспалительный процесс эндо- и перикарда, пристеночные тромбы на эндокарде, коронариит мелких веточек коронарных артерий.

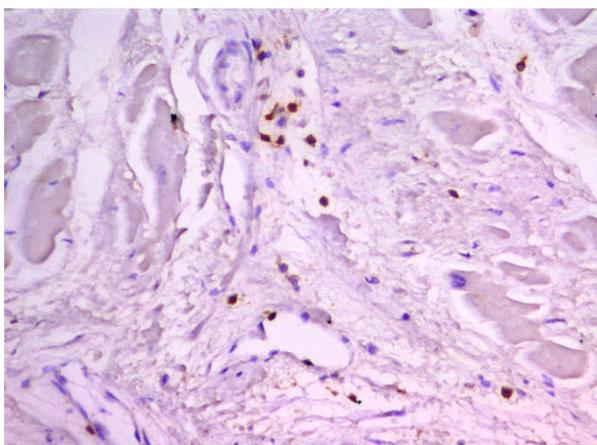
3.2.3. Иммуногистохимическая характеристика

Для иммуногистохимической характеристики клеточного состава инфильтрата в группе с КМ была использована стандартная диагностическая панель антител, которая использовалась для группы с ХМ. Также дополнительно проводилось ИГХ-исследование на специфические белки вируса SARS-CoV-2: spike-белок и белок нуклеокапсида вируса.

CD45

Общий лейкоцитарный антиген определялся в 32 (100,00%) случаях пациентов с КМ. Согласно критериям Далласа, в каждом случае выявлено более 14 CD45+ лимфоцитов, что подтверждает диагноз миокардита (Рисунок 17).

а



б

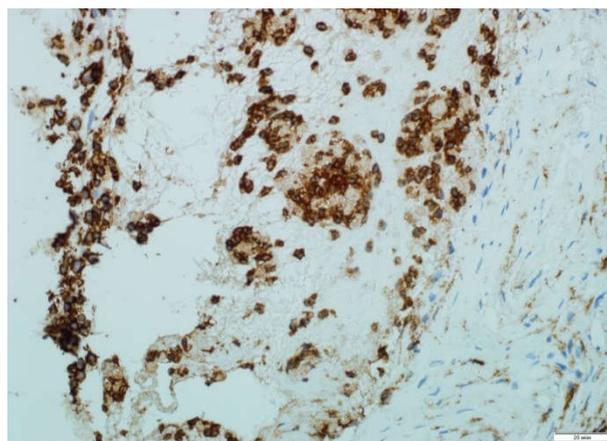
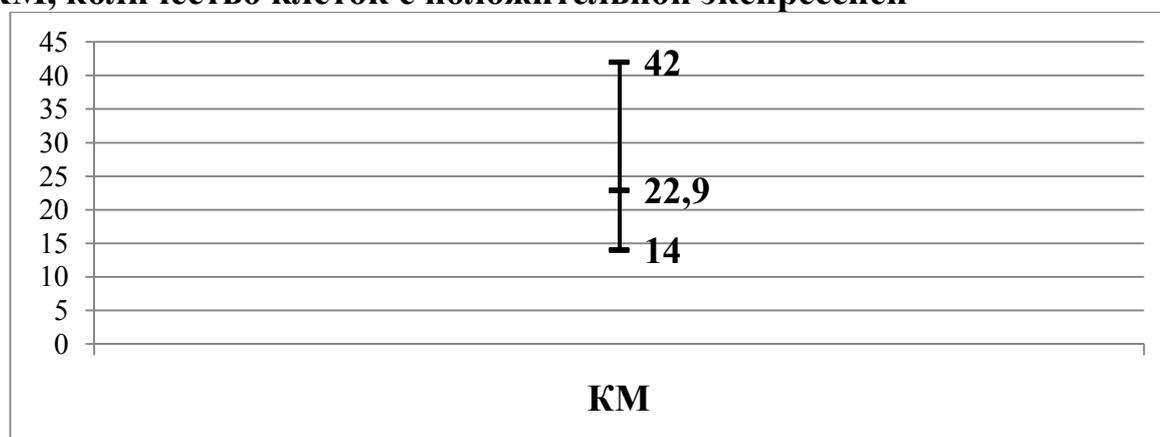


Рисунок 17 - Миокард, CD45+ клетки в группе КМ, иммунопероксидазная реакция: а, б - значительное количество CD45+ лимфоцитов в интерстиции миокарда, x200.

Среднее количество CD45+ лимфоцитов в группе КМ достоверно ниже, чем в группе ХМ, и составило $22,90 \pm 8,22$ клеток на 1 мм^2 ($p < 0,05$) (Диаграмма 15).

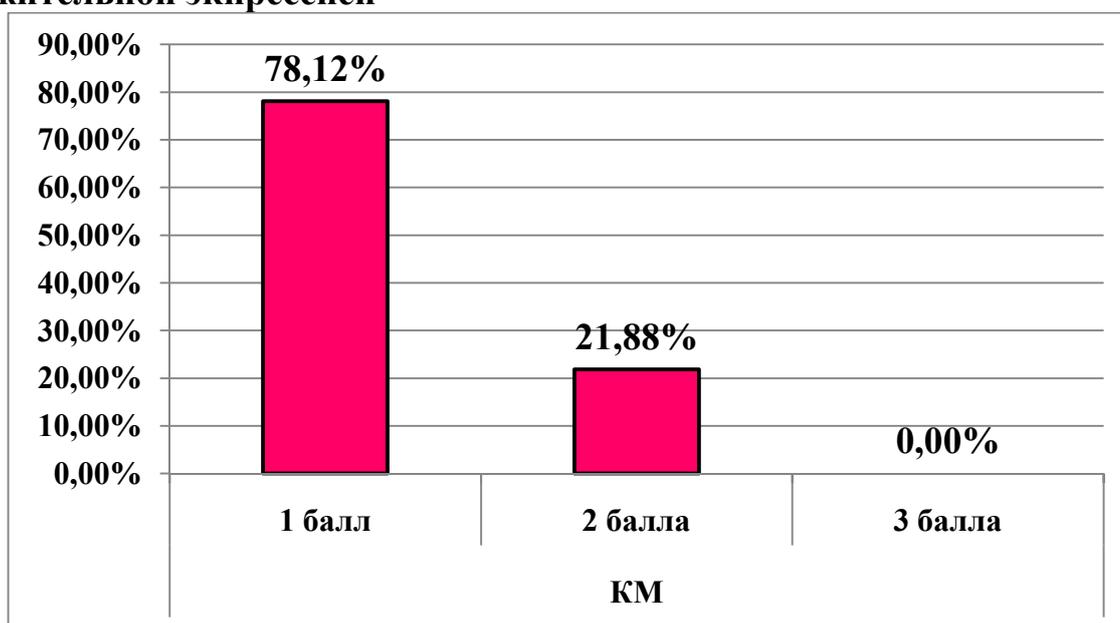
Диаграмма 15 - Результаты количественной оценки экспрессии CD45 при КМ, количество клеток с положительной экспрессией



В группе КМ пациентам были выставлены 1 и 2 балла в 25 (78,12%) и 7 (21,88%) случаях, соответственно. Ни в одном случае не выявлено более 45 CD45+ клеток.

Средний балл полуколичественной оценки в группе КМ достоверно ниже, чем в группе ХМ – $1,21 \pm 0,42$ балла (Диаграмма 16).

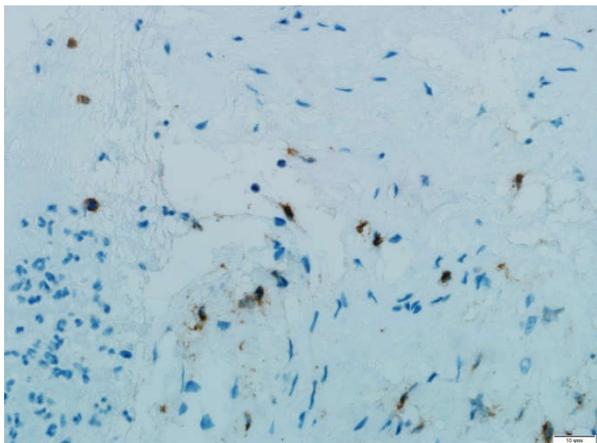
Диаграмма 16 - Результаты полуколичественной оценки экспрессии CD45 маркера в миокарде пациентов с КМ, % пациентов с положительной экспрессией



CD3

Маркёр Т-лимфоцитов определялся в клетках инфильтрата в 100% случаев пациентов с лимфоцитарным миокардитом (группа II). Согласно критериям Далласа, в каждом случае выявлено более 7 CD3+ Т-лимфоцитов, что подтверждает диагноз лимфоцитарного миокардита (Рисунок 18).

а



б

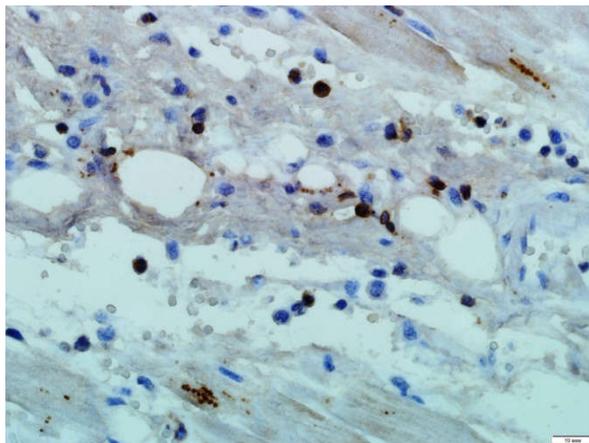
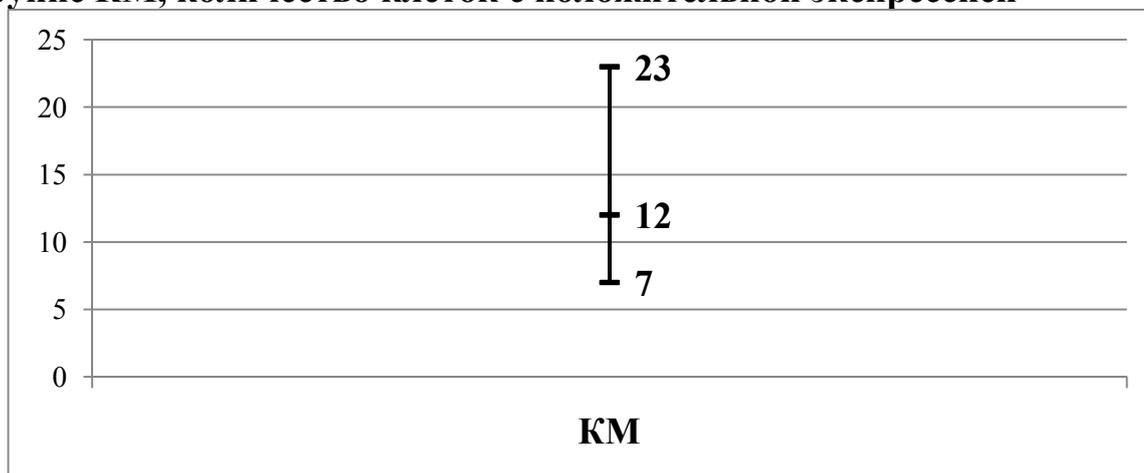


Рисунок 18 - Миокард, CD3+ Т-лимфоциты в группе пациентов с КМ, иммунопероксидазная реакция: а - CD3+ Т-лимфоциты в интерстиции миокарда, x100; б - CD3+ Т-лимфоциты в интерстиции миокарда, x400.

Среднее количество CD3+ Т-лимфоцитов составило $12,00 \pm 4,31$ клеток на 1 мм^2 . (Диаграмма 17).

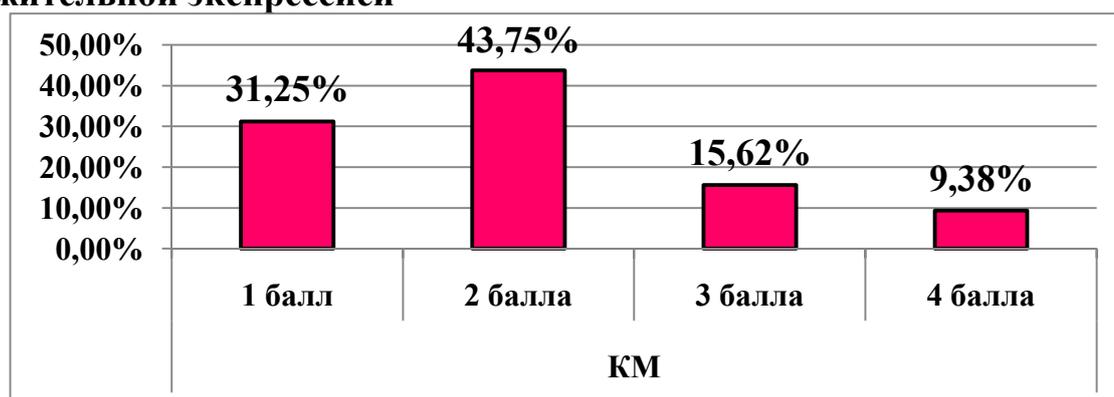
Диаграмма 17 - Результаты количественной оценки экспрессии CD3 в подгруппе КМ, количество клеток с положительной экспрессией



В группе КМ немногим чаще выставляли 2 балла – 14 (43,75%) случаев. 1 балл выявлен у 10 (31,25%) пациентов. Высокая и очень высокая степени активности миокардита с оценками в 3 и 4 балла отмечались в 5 (15,62%) и 3 (9,38%) случаях, соответственно (Диаграмма 15). Средний балл по результатам полуколичественной оценки составил $2,03 \pm 0,93$ балла, что

достоверно ниже, чем в группе ХМ. У пациентов группы КМ, у которых гистологически в эндо- и перикарде были обнаружены лимфогистиоцитарные инфильтраты, CD3+ Т-лимфоциты определялись также в ткани эндо- и перикарда.

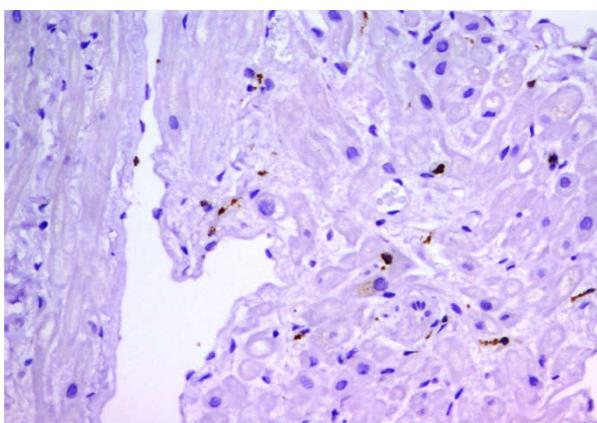
Диаграмма 18 - Результаты полуколичественной оценки экспрессии CD3 маркера в миокарде пациентов группы с КМ, % пациентов с положительной экспрессией



CD68

В группе КМ макрофаги составляли более 50% клеток инфильтрата в 25 (78,12%) случаях, а менее 50% клеток инфильтрата - у 7 (21,88%) пациентов (Рисунок 19).

а



б

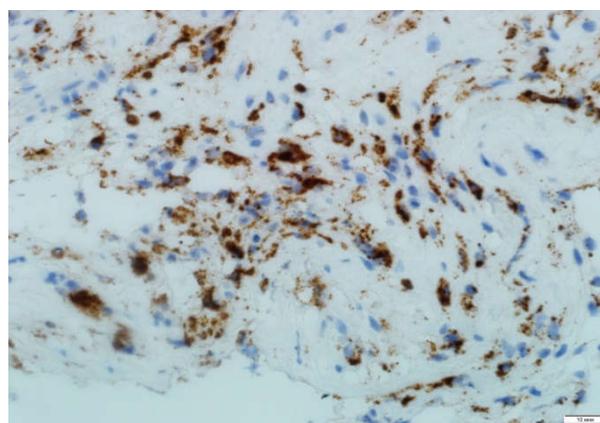


Рисунок 19 - Миокард, CD68+ макрофаги в группе КМ, иммунопероксидазная реакция: а – умеренное количество CD68+ макрофагов в интерстиции миокарда, х200; б - значительное количество CD68+ макрофагов в интерстиции миокарда, х200.

CD20

В-лимфоциты не выявлены ни в одном случае пациентов с КМ (Рис. 20).

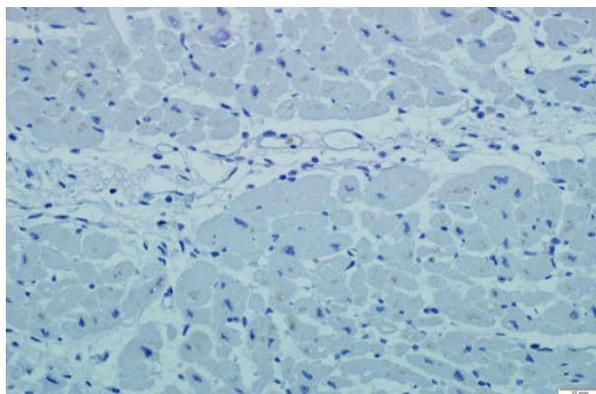
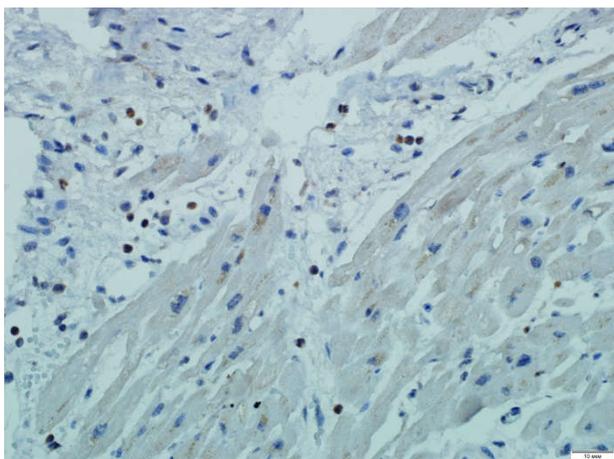


Рисунок 20 - Миокард, отсутствие CD20+ В-лимфоцитов в группе КМ, иммунопероксидазная реакция, x200.

Perforin

В подгруппе КМ НК-клетки выявлены в 6 (18,75%) случаях с распространённостью до 25% клеток инфильтрата (Рисунок 21).

а



б

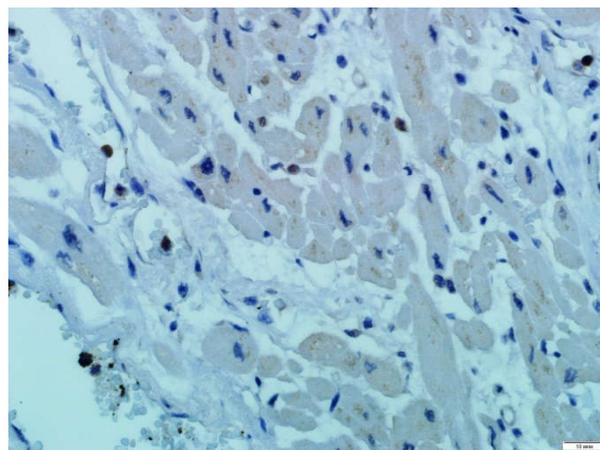


Рисунок 21 - Миокард, НК-клетки в группе КМ, иммунопероксидазная реакция: а – умеренное количество НК-клеток в интерстиции миокарда, x100; б - умеренное количество НК-клеток в интерстиции миокарда, x100.

TLR-4

В 31 (96,87 %) случае этой группы отмечена положительная экспрессия лимфоцитов и макрофагов к маркёру TLR 4 типа (Рисунок 22).

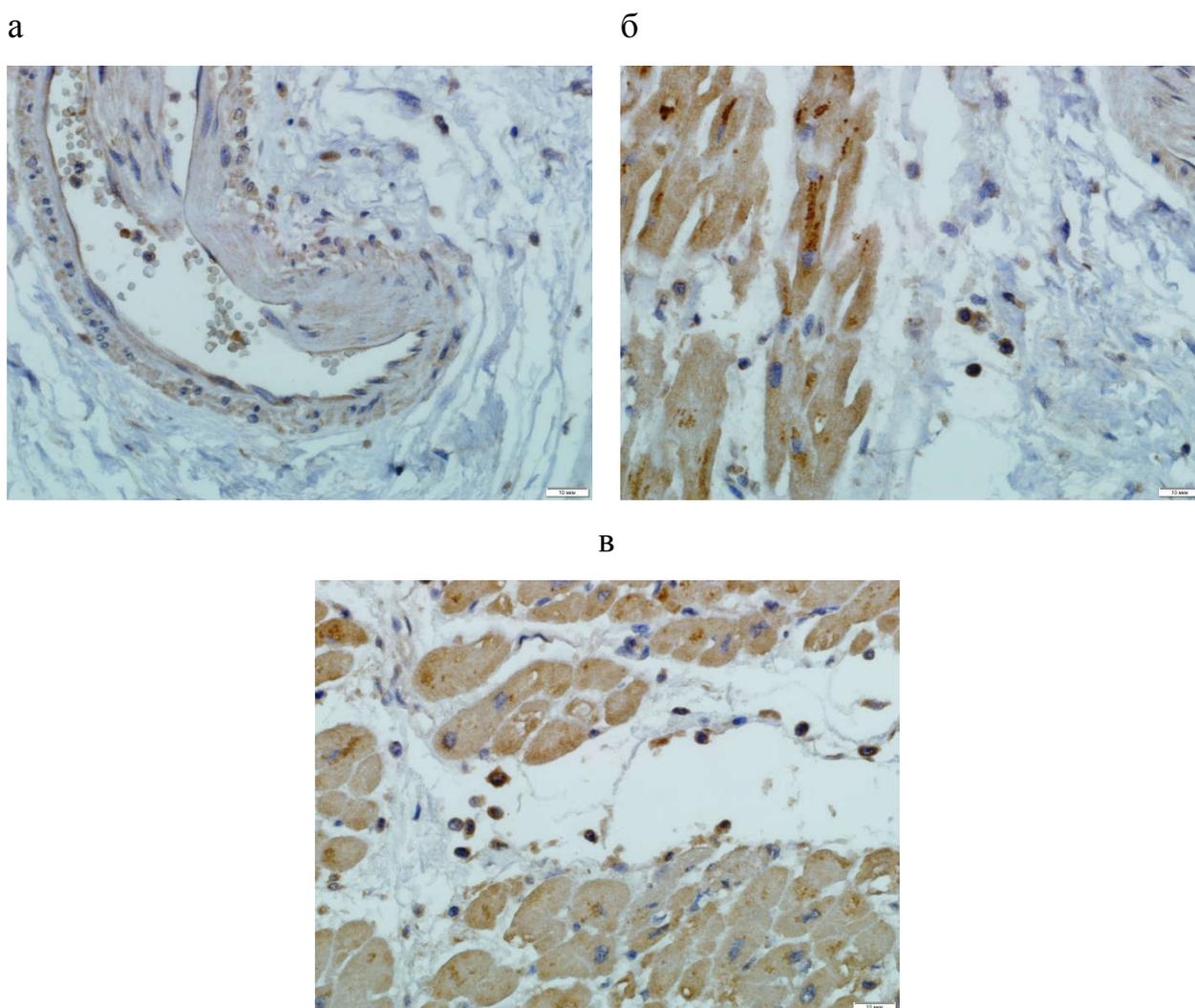
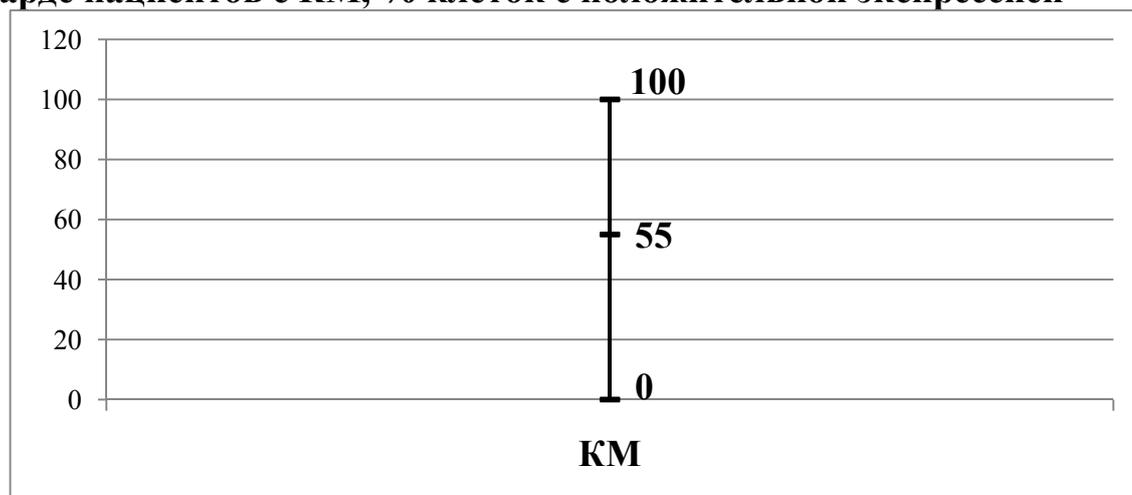


Рисунок 22 - Миокард, экспрессия TLR-4 в группе КМ (ядерное и цитоплазматическое окрашивание), иммунопероксидазная реакция: а – слабая экспрессия, х 40; б – умеренная экспрессия у клетках инфильтрата, х200; в – выраженная экспрессия в клетках инфильтрата, х200.

Проведена количественная (процентное содержание клеток с положительной экспрессией от общего количества клеток инфильтрата) и полуколичественная оценка экспрессии по шкале (Таблица 7).

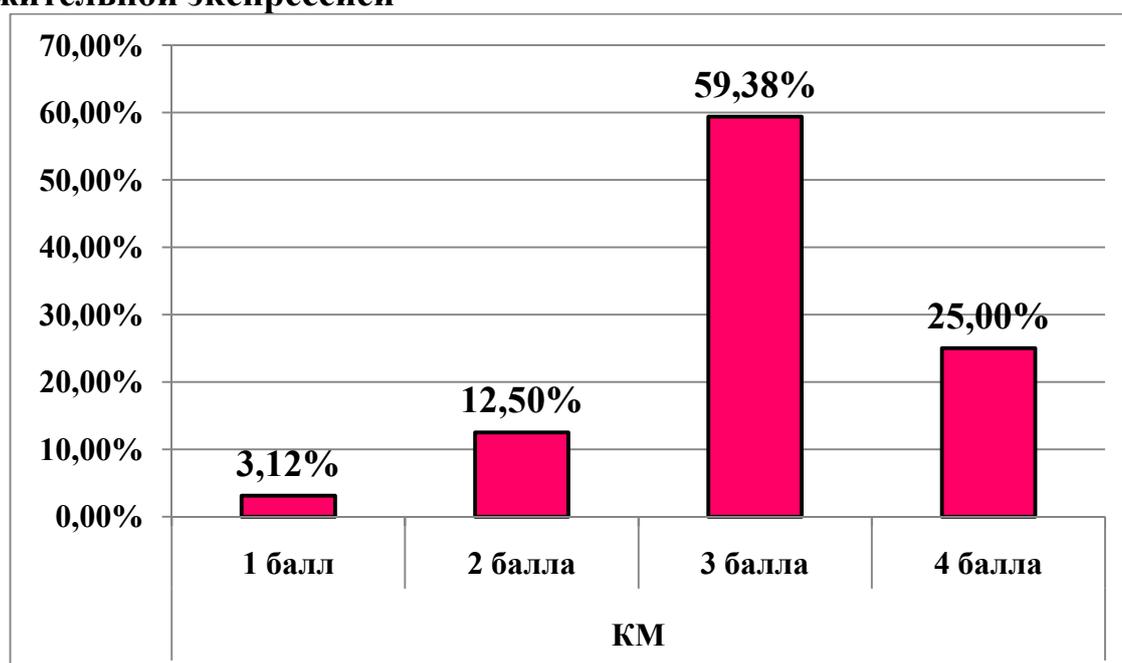
В группе КМ средняя экспрессия составила $55,00 \pm 21,80\%$ (Диаграмма 19).

Диаграмма 19 - Результаты количественной оценки экспрессии TLR4 в миокарде пациентов с КМ, % клеток с положительной экспрессией



В группе КМ 1 балл по шкале экспрессии для TLR-4 выставлен у 1 (3,12%) пациента, 2 балла – у 4 (12,50%), 3 балла - у 19 (59,38%), 4 балла – у 8 (25,00%) человек. Средний балл по группе КМ достоверно выше, чем в группе ХМ, и составил $3,06 \pm 0,71$ (Диаграмма 20).

Диаграмма 20 - Результаты полуколичественной оценки экспрессии TLR-4 в миокарде пациентов группы с КМ, % пациентов с положительной экспрессией



TLR-9

В 32 (100 %) случаях группы КМ отмечена положительная экспрессия лимфоцитов и макрофагов к маркёру TLR 9 типа (Рисунок 23).

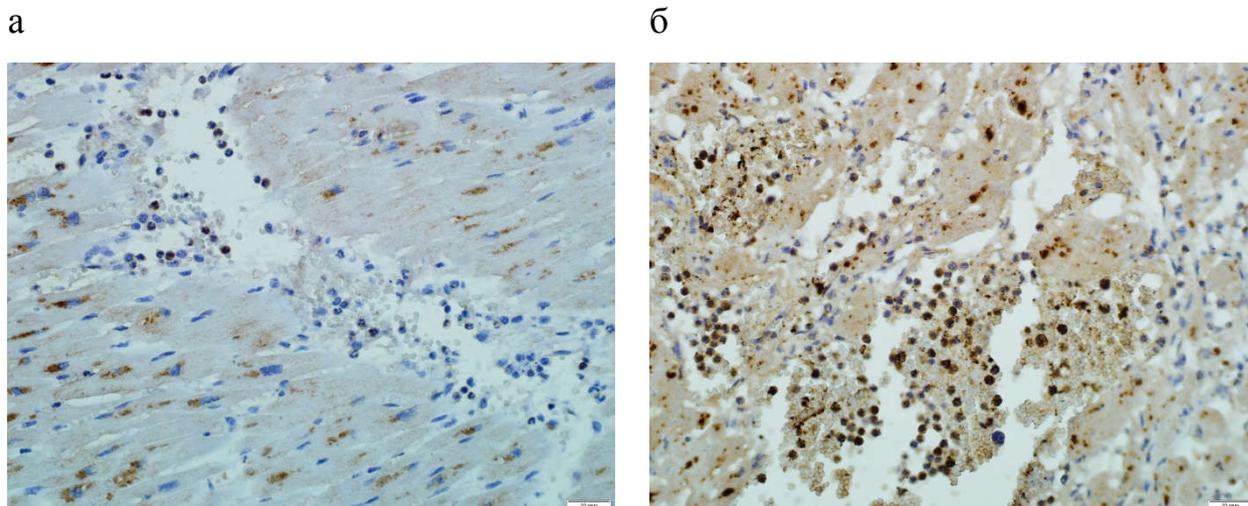
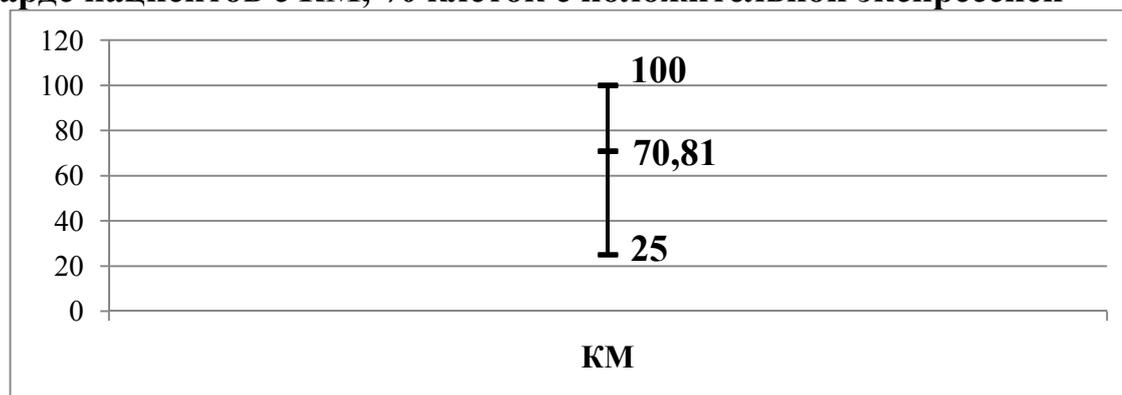


Рисунок 23 - Миокард, экспрессия TLR-9 в группе КМ (ядерное и цитоплазматическое окрашивание), иммунопероксидазная реакция: а – умеренная экспрессия, x100; б – выраженная экспрессия, x100.

Проведена количественная (процентное содержание клеток с положительной экспрессией от общего количества клеток инфильтрата) и полуколичественная оценка экспрессии по шкале (Таблица 7).

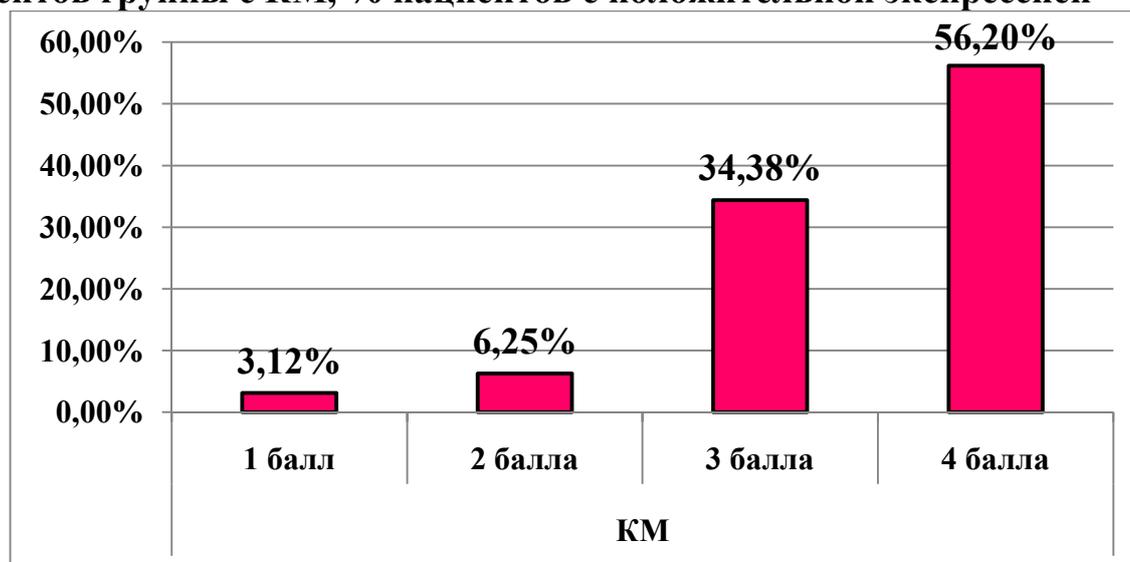
Среднее число клеток с положительной экспрессией в группе КМ составило $70,81 \pm 27,93\%$ (Диаграмма 21).

Диаграмма 21 - Результаты количественной оценки экспрессии TLR9 в миокарде пациентов с КМ, % клеток с положительной экспрессией



В группе КМ экспрессия TLR-9 оценивалась в 1 балл у 1 (3,12%) пациента, 2 балла – в 2 (6,25%), 3 балла – в 11 (34,38%), 4 балла – в 18 (56,25%) случаях. Средний балл в группе КМ также достоверно выше, чем в группе ХМ – $3,43 \pm 0,75$ (Диаграмма 22).

Диаграмма 22 - Полуколичественная оценка TLR-9 в миокарде пациентов группы с КМ, % пациентов с положительной экспрессией



Проведён расширенный корреляционный анализ количественных и полуколичественных данных. Коэффициент корреляции (r) рассчитывался для абсолютного (количество клеток) и относительного (баллы по шкале) показателей каждого маркёра.

Выявлена зависимость между экспрессией маркёров CD3, CD45, TLR4 и TLR9 в группе пациентов с КМ (Таблица 20).

Таблица 20 - Результаты корреляционного анализа экспрессии маркёров CD3, CD45, TLR4, TLR9 (r)

Корреляция		Группа КМ	Интерпретация
r (CD3, CD45)	Абс.	-0,11	Отриц. Слабая
	Отн.	-0,18	Отриц. Слабая
r (TLR4, TLR9)	Абс.	0,46	<i>Полож. Умеренная</i>
	Отн.	0,54	Полож. Заметная
r (CD3, TLR4)	Абс.	0,46	<i>Полож. Умеренная</i>

Продолжение Таблицы 20

	Отн.	0,28	Полож. Слабая
r (CD3, TLR9)	Абс.	0,32	Полож. Умеренная
	Отн.	0,20	Полож. Слабая
r (CD45, TLR4)	Абс.	-0,18	Отриц. Слабая
	Отн.	-0,04	Отриц. Слабая
r (CD45, TLR9)	Абс.	0,20	Полож. Слабая
	Отн.	0,19	Полож. Слабая

В группе КМ наиболее значимая положительная корреляция обнаружена между экспрессией TLR4 и TLR9, абсолютным количеством CD3+лимфоцитов и TLR4+ клеток, абсолютным количеством CD3+ лимфоцитов и TLR9+клеток (Диаграмма 23, 24, 25).

Диаграмма 23 - Корреляционная зависимость TLR4+ и TLR9+ клеток в подгруппе КМ (r=0,46)

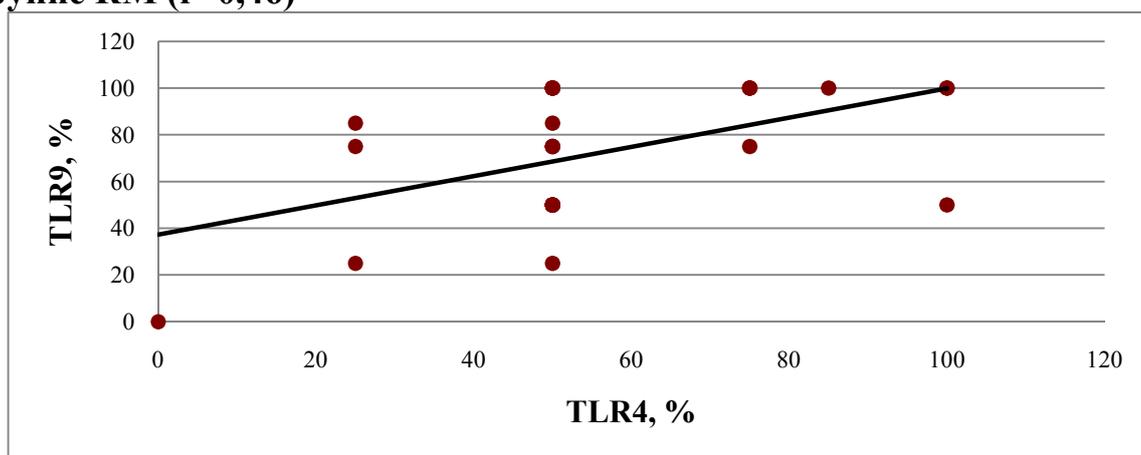


Диаграмма 24 - Корреляционная зависимость CD3+ лимфоцитов и TLR4+ клеток в подгруппе КМ (r=0,46)

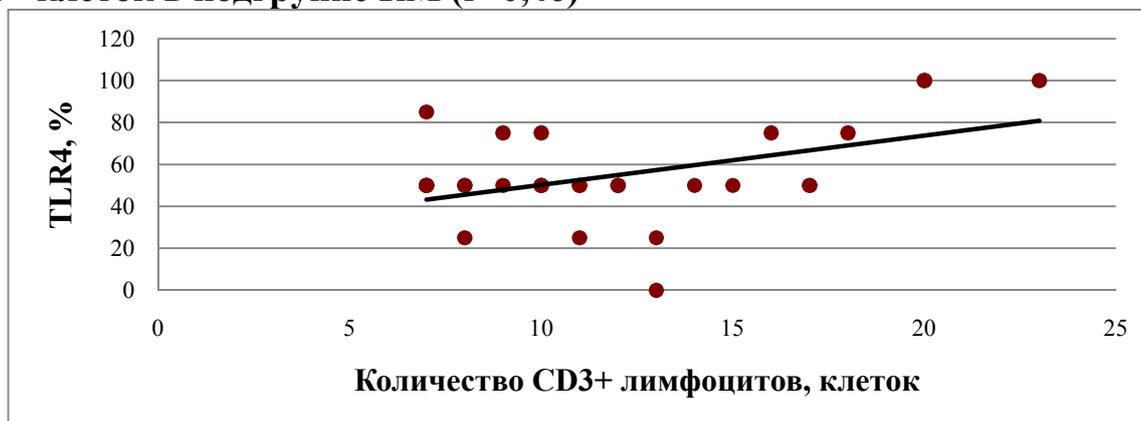
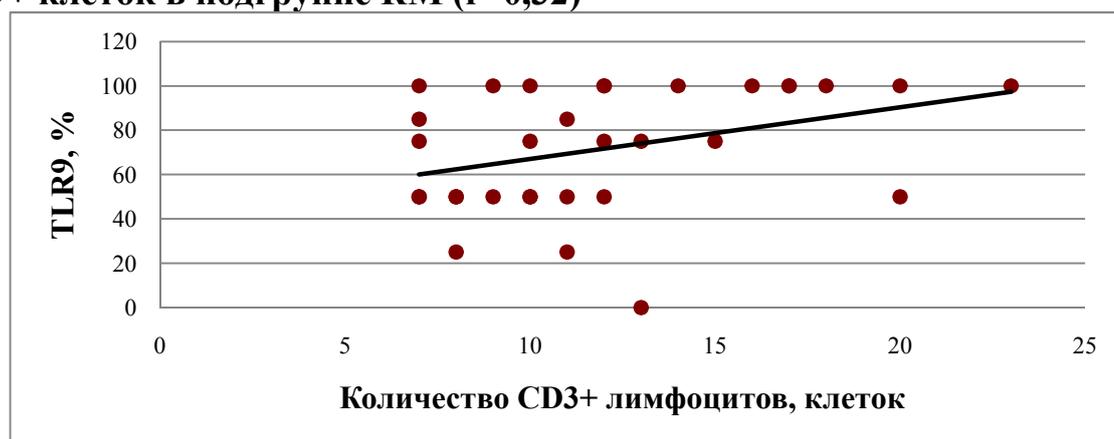


Диаграмма 25 - Корреляционная зависимость CD3+ лимфоцитов и TLR9+ клеток в подгруппе КМ ($r=0,32$)



Таким образом, воспалительные инфильтраты в эндо-, мио- и перикарде состоят преимущественно из CD45+ лимфоцитов и CD68+ макрофагов. Отмечается высокая экспрессия TLR (среднее количество клеток с положительной экспрессией TLR-9 - $70,81 \pm 27,93\%$) в клетках воспалительного инфильтрата (чаще в макрофагах), эндотелии сосудов и кардиомиоцитах.

3.2.4. Вирусологическое исследование вируса SARS-CoV-2 в ткани миокарда методом полимеразной цепной реакции

Вирусологическое исследование (РТ-ПЦР) проводилось на материале подгруппы КМ (32 случая). Произведена качественная оценка присутствия вирусной РНК в ткани миокарда. В 100,00% случаев в ткани миокарда определялась РНК вируса SARS-CoV-2.

3.2.5. Иммуногистохимическое исследование белков вируса SARS-CoV-2

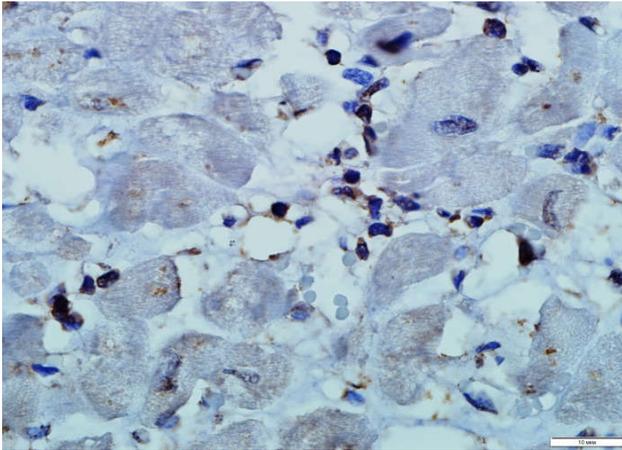
Изучалась экспрессия spike-protein и nucleocapsid-protein SARS-CoV-2 в ткани миокарда. В качестве положительного контроля использовали

парафиновые срезы с cell-pellet block: GTX435640 блок из клеток 293Т с spike-белком; GTX435641 блок из клеток 293Т с nucleocapsid-белком, производство GeneTex.

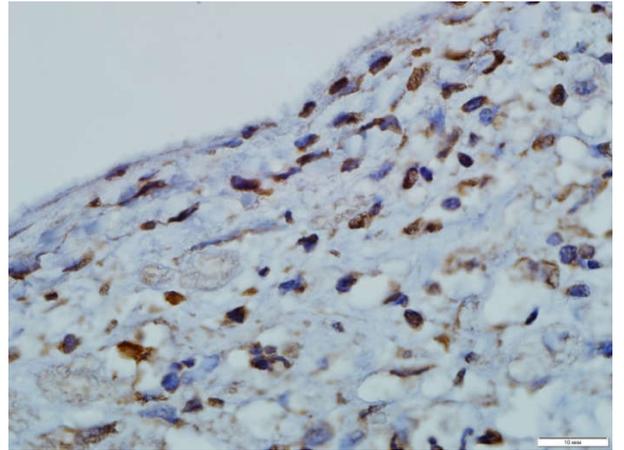
Spike-protein SARS-CoV-2

Положительная экспрессия к spike-белку выявлена в клетках воспалительного инфильтрата миокарда, в эндотелии веточек коронарных артерий и в кардиомиоцитах. Выраженная экспрессия в лимфоцитах и макрофагах воспалительного инфильтрата миокарда определялась в 32 (100%) случаях. Кроме того, выявлена положительная экспрессия в клетках воспалительного инфильтрата в эндокарде и перикарде у пациентов с эндокардитом и перикардитом, соответственно. В эндотелии мелких веточек коронарных артерий экспрессия выявлена в 27 (84,37%) наблюдениях. Кардиомиоциты положительно прореагировали с маркером в 22 (68,75%) случаях (Рисунок 24).

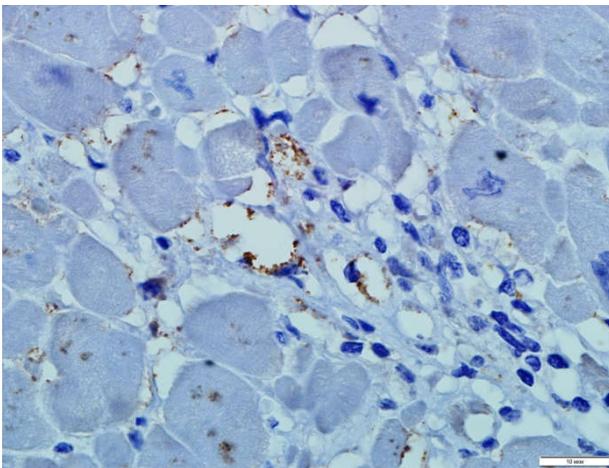
а



б



в



г

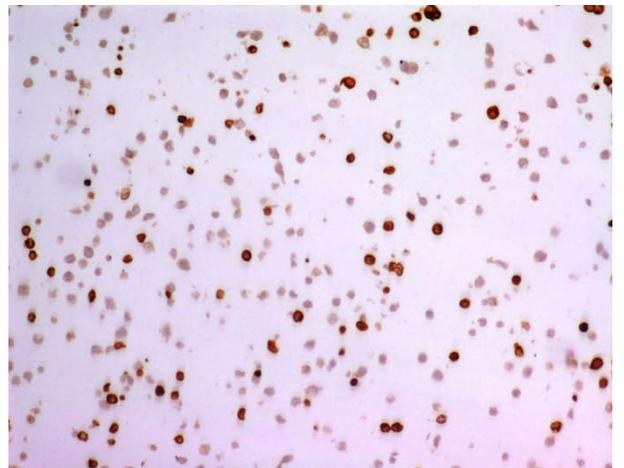


Рисунок 24 - Миокард, эндокард, экспрессия spike-белка SARS-CoV-2 (ядерное и цитоплазматическое окрашивание), иммунопероксидазная реакция: а – выраженная экспрессия в кардиомиоцитах и клетках инфильтрата в миокарде, х200; б – выраженная экспрессия в клетках инфильтрата в эндокарде, х200; в – экспрессия в кардиомиоцитах и в эндотелиоцитах сосудов, х200; г – положительный контроль, блок клеток, х40.

Nucleocapsid-protein SARS-CoV-2

Положительная экспрессия к белку нуклеокапсида SARS-CoV-2 выявлена в миокарде в клетках воспалительного инфильтрата, в эндотелии сосудов и в единичных кардиомиоцитах. Лимфоциты и макрофаги экспрессировали маркер в 28 (87,50%) наблюдениях. У 25 (78,12%) пациентов отмечалась положительная экспрессия к белку в эндотелии

сосудов. В кардиомиоцитах наблюдалась положительная экспрессия к белку нуклеокапсида в 21 (65,62%) случае (Рисунок 25).

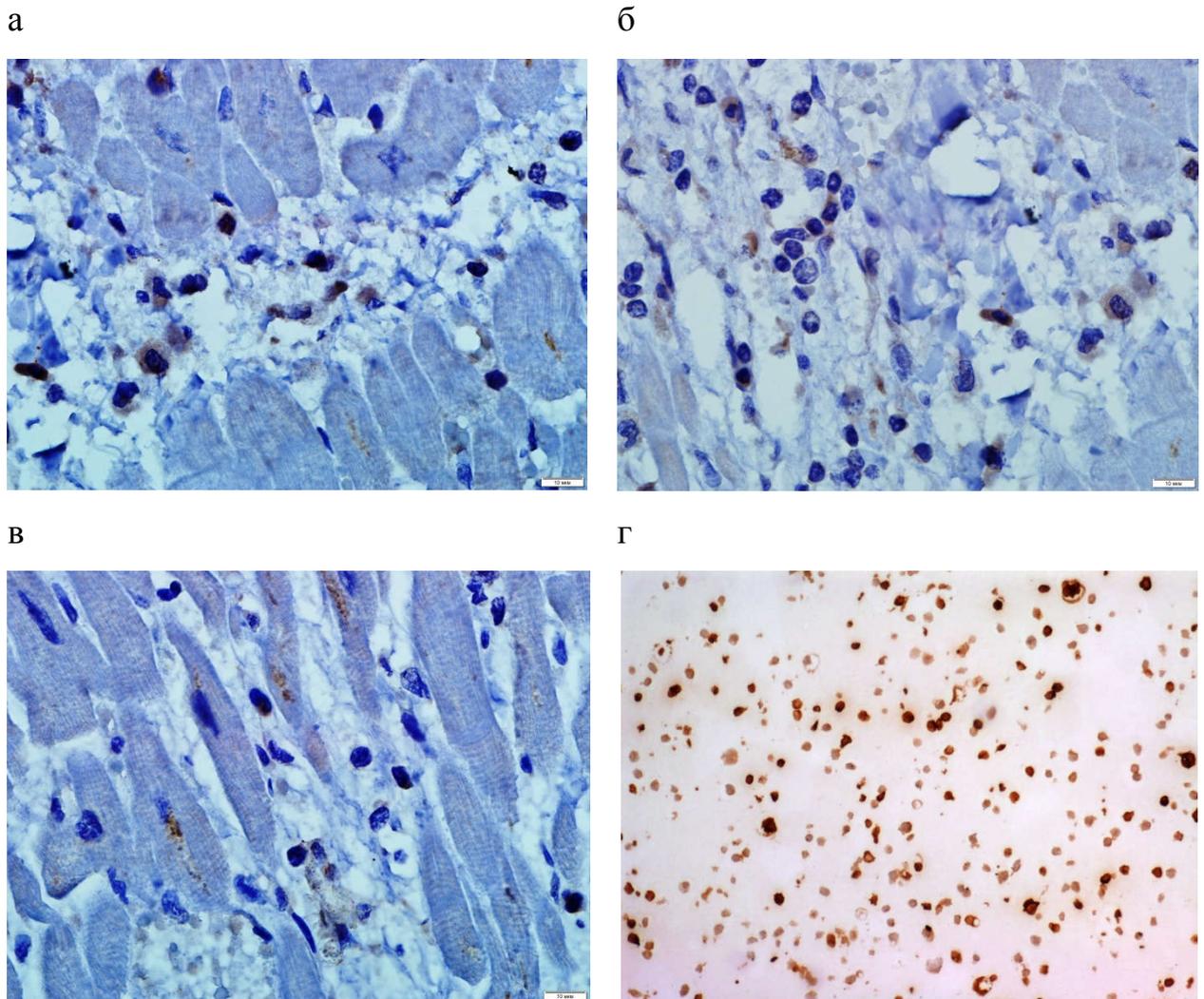


Рисунок 25 - Миокард, экспрессия белка нуклеокапсида SARS-CoV-2 (ядерное и цитоплазматическое окрашивание), иммунопероксидазная реакция: а, б – выраженная экспрессия в макрофагах, х 200; в – умеренная экспрессия в кардиомиоцитах, х200; г – положительный контроль, блок клеток, х40.

Таким образом, иммуногистохимически белки вируса SARS-CoV-2 (spike-белок и белок нуклеокапсида) идентифицированы в кардиомиоцитах, в макрофагах воспалительного инфильтрата и в эндотелии сосудов.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Хронический миокардит (ХМ)

Клинико-anamnestическое исследование пациентов с ХМ подтвердило данные литературы, [6, 9, 50]: причиной аритмий пациентов моложе 60 лет является хронический миокардит (средний возраст наших пациентов составил $52,96 \pm 14,06$ лет). Немногим чаще заболевание встречается у лиц мужского пола, что также описано в предшествующих исследованиях, [3, 5].

Частота встречаемости клинических вариантов хронического некоронавирусного миокардита, описанная в литературе, [1, 3, 5, 6], подтверждается и нашими данными: наиболее распространён АВ с развитием постоянных форм и фатальных аритмий (67,65%), несколько реже – ДВ с дилатацией камер сердца (27,94%), наиболее редко – СВ (4,41%).

Экстракардиальная патология пациентов с хроническим миокардитом некоронавирусной этиологии встречалась достаточно редко и включала патологию органов дыхательной системы (1 случай), хроническую болезнь почек (11 случаев), ТЭЛА (1 случай).

При всех вариантах ХМ определяется лимфоидная инфильтрация в интерстиции миокарда, но количество клеток инфильтрата и иммуногистохимический профиль клеток различен. Кроме того, каждый клинический вариант (АВ, ДВ, СВ) имеет свои гистологические особенности.

При АВ хронического миокардита чаще встречается дистрофия и апоптотические изменения кардиомиоцитов, а также субэндокардиальный липоматоз. Поскольку липоматоз ткани выявляется достоверно чаще у пациентов с АВ хронического миокардита, то можно говорить о том, что морфологическим субстратом аритмий является именно субэндокардиальный липоматоз в области проводящей системы сердца.

ДВ хронического миокардита характеризуется наличием гипертрофии кардиомиоцитов, отёка интерстиция, диффузного мелкоочагового

кардиосклероза и возможным развитием ишемии миокарда вплоть до некроза кардиомиоцитов с последующим развитием крупноочагового кардиосклероза.

При ИГХ-исследовании мы выявили, что в группе ХМ чаще выставлялся 1 балл по количеству CD45+клеток и 2 балла по количеству CD3+ лимфоцитов, что соответствует данным литературы, [1, 3]. Высокое количество CD3+ лимфоцитов свидетельствует о высокой активности воспалительного процесса, [16]. При АВ наибольшее среднее количество CD45+ клеток, но наименьшее количество CD3+ лимфоцитов, чем в группах пациентов с ДВ и СВ.

Наибольшее количество CD3+ лимфоцитов соответствует СВ хронического миокардита, значит, мы можем говорить о том, что этот вариант сопровождается максимальной активностью воспаления. При этом, АВ характеризуется минимальной активностью воспалительного процесса.

ИГХ-исследование на экспрессию семейства toll-подобных рецепторов также выявило интересную закономерность. TLR-4 активируются молекулярными структурами вирусов и запускают каскад воспалительных реакций в миокарде, [63, 184], значит, экспрессия данного маркера связана с активностью воспаления. По данным литературы, максимальный уровень экспрессии напрямую коррелирует с максимальной активностью воспалительного процесса в миокарде, [20], что подтверждается и результатами нашего исследования.

При АВ хронического миокардита отмечается наименьшая экспрессия TLR-4 ($52,17 \pm 40,44\%$), значит, активность воспаления в миокарде ниже, чем при ДВ и СВ миокардита. При СВ хронического миокардита отмечается наибольшая экспрессия TLR-4 ($95,00 \pm 8,66\%$), что подтверждает данные о том, что при СВ хронического миокардита максимальная активность воспалительного процесса (данный тезис в нашем исследовании подтверждается и уровнем экспрессии маркера CD3).

Экспрессия TLR-9 в миокарде пациентов с АВ была немногим выше, чем при других вариантах хронического миокардита. Вероятно, это связано с тем, что TLR 9 типа является маркером врождённого иммунитета, который активируется при воздействии вируса на клетку.

Данные литературы также подтверждают результаты проведённого нами корреляционного анализа результатов ИГХ-реакций. Описано, что CD3 и toll-подобные рецепторы являются индикаторами активности миокардита, [3, 15, 16, 20, 90, 175, 184]. Нами выявлена положительная взаимосвязь между экспрессией CD3 и TLR 4 и 9 типов (коэффициент корреляции r составил 0,45 и 0,38, соответственно), что позволяет сделать выводы о том, что чем выше экспрессия CD3 и TLR (вместе или по отдельности), тем выше активность миокардита.

Согласно результатам ИГХ-исследования, можно сделать вывод, что при АВ хронического миокардита активность воспалительного процесса ниже, значит, клиническая картина обусловлена не столько характером воспалительного инфильтрата, сколько структурной перестройкой ткани миокарда, преимущественно в области проводящей системы сердца.

Также следует сказать о патологии эндокарда при разных вариантах хронического миокардита: склероз эндокарда более характерен для АВ, чем для ДВ и СВ. Вероятно, это связано с перестройкой субэндокардиальных отделов миокарда и развитием липоматоза ткани. Склероз эндокарда, особенно в области проводящей системы сердца, также вносит свой вклад в развитие аритмий у лиц с АВ хронического миокардита.

Патология мелких веточек коронарных артерий в виде коронарита и эндотелиита приводит к ишемизации миокарда, что также играет роль в развитии аритмий (в том числе, фатальных) при хроническом миокардите.

Поскольку эндомиокардиальные биоптаты пациентов с АВ хронического миокардита были взяты из области проводящей системы сердца, то мы можем выделить следующие особенности перестройки ткани миокарда в этой зоне:

1. Нарастающая дистрофия и апоптоз кардиомиоцитов.
2. Субэндокардиальный липоматоз ткани.
3. Склероз эндокарда.

Вышеперечисленные особенности можно назвать морфологическим субстратом развития аритмий у пациентов с хроническим миокардитом.

4.2. Миокардит при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (KM)

Исследования отечественных и зарубежных коллег описывают поражение сердца, в целом, не заостряя внимание на воспалении миокарда, [53, 158, 180]. Отдельные авторы сообщают о нескольких случаях клинически диагностированного миокардита без гистологического подтверждения, [99, 104, 108, 185]. Также описан отдельный случай посмертной диагностики лимфоцитарного миокардита с гистологическим подтверждением у пациента из Италии, [154]. В нашем исследовании впервые проведен клинико-морфологический анализ миокардита при новой коронавирусной инфекции с детальным описанием морфологической картины, [4, 17, 18, 21, 58].

Группа KM сформирована из пациентов, погибших от новой коронавирусной инфекции, у которых гистологически выявлен лимфоцитарный миокардит. Для подтверждения коронавирусной этиологии миокардита нами было проведено ПЦР-исследование на идентификацию РНК SARS-CoV-2: в 100,00% случаев этой подгруппы в ткани миокарда реакция положительна.

Пациенты, вошедшие в данную группу, в анамнезе не имели хронического миокардита, поэтому мы можем предположить, что воспалительный процесс в миокарде развился в рамках течения новой коронавирусной инфекции. В группе несколько преобладали лица мужского

пола, средний возраст оценивался как пожилой, хотя в подгруппу входили лица и молодого возраста (от 32 лет).

Анализ проявлений новой коронавирусной инфекции в данной подгруппе выявил во всех случаях сочетание патологии сердца с заболеваниями органов дыхательной и мочевыделительной систем, что связано с патогенезом новой коронавирусной инфекции и особенностью взаимодействия вируса SARS-CoV-2 с клетками-мишенями, [4, 17, 18, 21, 58, 105, 121, 133, 139, 143, 158, 168, 183]. Вирус посредством spike-белка связывается с рецептором к АПФ2, и поскольку данный рецептор есть в клетках большинства внутренних органов, то вполне закономерно развитие полиорганного поражения.

При морфологическом исследовании сердца макроскопически отмечается увеличение его в размерах ($361,65 \pm 35,87$ г), дилатация камер, гипертрофия стенок правого и левого желудочков, дряблая консистенция и пёстрый вид миокарда на разрезе, что в совокупности является морфологическим субстратом миокардита, развившегося в рамках новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Гистологически в интерстиции миокарда отмечалась диффузная лимфоидная инфильтрация, которая при ИГХ-исследовании представлена преимущественно CD45+ лимфоцитами и CD68+ макрофагами, что свидетельствует о возможном развитии очага хронического воспаления.

При гистологическом исследовании нами выявлена высокая частота апоптоза кардиомиоцитов. Мы предполагаем, что апоптотические изменения связаны с 3CLpro коронавируса – ингибитором аминокатап, влияющего на активность клеточных протеасом, [7].

Для поражения сердца при новой коронавирусной инфекции характерно вовлечение в воспалительный процесс эндо- и перикарда, что подтверждается данными гистологического и ИГХ-исследования (включая ИГХ-реакции на белки вируса). Воспалительные инфильтраты в эндо-, мио- и перикарде состоят преимущественно из лимфоцитов и макрофагов.

Вероятнее всего, вирус может долгое время сохраняться в макрофагах, персистируя в организме и давая начало хроническому течению миокардита и новой коронавирусной инфекции, в целом.

Пристеночные тромбы, выявляемые при макро- и микроскопическом исследовании, свидетельствуют об изменении в системе гемостаза. Для новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, характерно повышение уровня D-димера и увеличение протромбинового времени и АЧТВ, приводящие к развитию распространённого тромбоза, [55, 99]. По данным нашего исследования, в 28,12% случаев макроскопически наблюдаются пристеночные тромбы на эндокарде камер сердца (чаще всего, правого предсердия и левого желудочка), подтверждаемые и гистологически. В 37,5% случаев гистологически обнаруживается сладж-феномен в веточках коронарных артерий, что также подтверждает нарушения в системе гемостаза. Вероятно, данные изменения являются специфической реакцией на вирус SARS-CoV-2, а также осложнением «цитокинового шторма» и системного воспалительного ответа.

Обнаружение РНК коронавируса в миокарде, а также белка нуклеокапсида и spike-белка в кардиомиоцитах подтверждают возможность прямого патогенного действия вируса на кардиомиоциты. Коронавирус SARS-CoV-2 посредством spike-белка связывается с рецептором к АПФ2, тем самым инициируя воспалительный процесс в миокарде. Перед связыванием с рецептором spike-белок расщепляется на S1/S2-сайты (данное расщепление опосредовано трансмембранным сериновым белком TMPRSS2), и с рецептором к АПФ2 связывается S2-сайт spike-белка, [103].

Нами выявлено присутствие белка нуклеокапсида и spike-белка в макрофагах инфильтрата и в эндотелии микрососудов. Наши результаты подтверждаются данными Tavazzi G. с соавт., которые описывают случай вирусного миокардита с обнаружением в макрофагах биоптата миокарда РНК вируса SARS-CoV-2 с помощью ПЦР, [170]. Можно предположить, что при локализации вируса в макрофагах может происходить выброс ими

большого количества цитокинов, что обуславливает у пациента прогрессирование миокардита с ухудшением работы сердца.

В литературе также обсуждаются механизмы повреждения миокарда в результате выброса большого количества цитокинов. Активация TLR, CLR и NOD-подобных рецепторов приводит к цитокиновому шторму, что остаётся одним из возможных путей развития миокардита. В нашем исследовании высокая экспрессия TLR (среднее количество клеток с положительной экспрессией TLR-9 - $70,81 \pm 27,93\%$) в клетках воспалительного инфильтрата, эндотелии сосудов и кардиомиоцитах свидетельствует об участии в повреждении миокарда и реакций врождённого иммунитета, что морфологически подтверждает развитие «цитокинового шторма». Chen с соавт. в ходе исследования выявили высокие уровни интерлейкина типов 2, 6, 10 и фактора некроза опухоли среди пациентов с коронавирусной инфекцией, [71]. Высокие уровни цитокинов способствуют генерализации воспаления, а также вовлечению в воспалительный процесс миокарда. Интерлейкин-6 (ИЛ-6) является центральным медиатором цитокинового шторма и способствует организации цитокиновых реакций иммунных клеток, включая, в первую очередь, Т-лимфоциты. Происходит активация Т-лимфоцитов, а дальнейшее высвобождение воспалительных цитокинов стимулирует ещё большее количество Т-лимфоцитов, что подтверждается данными нашего исследования: среднее количество CD3+ Т-лимфоцитов было достаточно высоким и составило $12,00 \pm 4,31$. Таким образом, формируется положительная обратная связь активации иммунной системы и повреждения миокарда. Кроме того, ИЛ-6 относится к аритмогенным провоспалительным цитокинам, вызывая смещение плакоглобина – белка десмосом кардиомиоцитов. Следовательно, у пациентов с новой коронавирусной инфекцией, вызванной SARS-CoV-2, могут развиваться фатальные аритмии, не связанные с воспалением сердца и поражением непосредственно кардиомиоцитов, а ассоциированные, например, с действием подобных цитокинов или с перикардитом/коронариитом, [163].

Выявленный нами в 93% случаев коронариит мелких веточек артерий позволяет говорить о том, что в патогенезе поражения миокарда при новой коронавирусной инфекции играет роль и ишемическое повреждение.

Следовательно, можно обсуждать три патогенетических механизма развития миокардита при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, которые имели место у пациентов, включённых в наше исследование, [4, 17, 18, 21, 58]:

- 1) вследствие прямого повреждения кардиомиоцитов вирусом;
- 2) из-за ишемического повреждения за счёт коронариитов и коагулопатии с последующей воспалительной реакцией;
- 3) в результате выброса цитокинов клетками воспалительного инфильтрата при цитокиновом шторме.

По данным литературы, также возможен механизм аутоиммунного поражения миокарда, [151].

Проводя *сравнение* хронического миокардита и миокардита при новой коронавирусной инфекции, можно утверждать, что вовлечение сердечной мышцы в воспалительный процесс связано с каждым конкретным этиологическим агентом. Однако в первом случае воспаление является более активным, поскольку мы видим, что среднее количество клеток инфильтрата (CD45+ лимфоцитов и CD3+ Т-лимфоцитов) больше, чем в группе миокардита, вызванного SARS-CoV-2. Для КМ характерно присутствие в клеточном инфильтрате CD68+ макрофагов (более 50% клеток инфильтрата у 25 пациентов).

Дистрофия кардиомиоцитов при КМ встречалась реже, поскольку поражение сердца развивалось достаточно быстро, в некоторых случаях молниеносно.

Меньшая частота липоматоза в группе КМ и меньшая площадь липоматоза по сравнению с ХМ, вероятнее всего, связаны также с высокой скоростью поражения кардиомиоцитов вирусом и развития миокардита.

Для миокардита при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, в отличие от хронического миокардита, характерно развитие микромбоза, эндотелиита и/или коронарита мелких веточек коронарных артерий, а также вовлечение в воспалительный процесс эндо- и перикарда с развитием коронавирусного кардита и панкардита.

В результате нашего исследования мы можем предложить **алгоритм морфологической диагностики** хронического миокардита у пациентов с идиопатическими нарушениями ритма сердца:

1. Лимфоидная инфильтрация должна оцениваться согласно Далласским критериям (более 14 лимфоцитов на 1 мм^2);
2. Необходимо ИГХ-типирование клеток инфильтрата (стандартный набор маркёров: CD3, CD20, CD45, CD68);
3. При выявлении субэндокардиального липоматоза в области проводящей системы сердца необходима оценка степени выраженности липоматоза с использованием морфометрических программ;
4. При наличии у пациента в анамнезе новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, необходимо оценить степень выраженности коронаритов, эндотелиитов в миокарде, ДВС-синдрома, а также наличие/отсутствие инфильтратов в эндо- и перикарде.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время в клинической практике остро стоит вопрос возникновения внезапной сердечной смерти у лиц трудоспособного возраста (моложе 60 лет). Причиной такого состояния, по данным литературы, являются фатальные аритмии. Данные аритмии называют «идиопатическими», поскольку у пациентов отсутствуют достоверные признаки ишемической болезни или пороков сердца. Среди морфологических изменений наиболее часто встречаются хронические миокардиты, вызванные инфекционными агентами или инфекционно-иммунными процессами. В клинических наблюдениях отмечается неуклонный рост заболеваемости миокардитом, особенно среди детей и лиц молодого возраста.

Наше исследование подтвердило, что причиной аритмии у лиц моложе 60 лет без ишемической болезни/пороков сердца является хронический миокардит, и показало основные морфологические и иммуногистохимические особенности при каждом его клиническом варианте. Впервые доказано, что аритмический вариант сопровождается минимальной гистологической активностью воспалительного процесса, а клиническая картина обусловлена морфологическими изменениями в области проводящей системы сердца. При таком варианте хронического миокардита морфологическим субстратом развития аритмии является субэндокардиальный липоматоз, апоптоз кардиомиоцитов и склероз эндокарда в области проводящей системы сердца. Максимальной гистологической активностью, по нашим данным, отличается смешанный вариант хронического миокардита с наибольшим количеством клеток воспалительного инфильтрата, а именно CD3+ Т-лимфоцитов, которые являются иммуногистохимическими маркерами активности воспаления в миокарде. Кроме того, для этого варианта хронического миокардита

характерна наибольшая экспрессия TLR 4 типа, который также является маркёром активности воспаления при миокардите.

Важным аспектом нашего исследования стало изучение особенностей миокардита, развивающегося при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Нами впервые описано, что основные изменения включают развитие лимфоцитарного миокардита с присоединением эндо- и перикардита. Отмечается также большое количество CD68+ макрофагов в составе клеточного инфильтрата (более 50% клеточного инфильтрата у 25 пациентов). Кроме того, особенностью коронавирусного миокардита является наличие коронарита и эндотелиита мелких веточек коронарных артерий, значит, в патогенез миокардита вносит свой вклад и ишемический фактор. Проведённое нами вирусологическое (методом ПЦР) и иммуногистохимическое исследование на белки вируса SARS-CoV-2 подтвердило присутствие вируса в миокарде, тем самым доказывая возможность прямого повреждения миокарда с прогрессированием миокардита и ухудшением работы сердца.

ВЫВОДЫ

1. Среди клинических вариантов хронического миокардита наиболее распространен аритмический вариант (67,65%), реже – декомпенсированный вариант с дилатацией камер сердца (27,94%), наиболее редко – смешанный вариант (4,41%).

2. Морфологическими особенностями аритмического варианта хронического миокардита и «идиопатических» аритмий, в целом, являются воспалительная инфильтрация в миокарде, состоящая преимущественно из CD45+ лимфоцитов, дистрофия и апоптотические изменения кардиомиоцитов, субэндокардиальный липоматоз и склероз эндокарда зоны проводящей системы сердца, что является молекулярно-генетическим субстратом нарушений ритма сердца.

3. Согласно данным ИГХ-исследования, аритмический вариант миокардита сопровождается минимальной воспалительной активностью (наименьшая экспрессия TLR 4 и 9 типов и CD3, которые являются показателем активности воспалительного процесса).

4. Морфологические особенности декомпенсированного варианта хронического миокардита включают воспалительную инфильтрацию, состоящую преимущественно из CD3+ Т-лимфоцитов, гипертрофию кардиомиоцитов, отек интерстиция, диффузный мелкоочаговый кардиосклероз и возможное развитие ишемии миокарда вплоть до некроза отдельных кардиомиоцитов.

5. Морфологическими особенностями миокардита при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, являются лимфоцитарный и лимфомакрофагальный характер инфильтрата (CD3+ Т-лимфоциты и CD68+ макрофаги), апоптотические изменения кардиомиоцитов, лимфоцитарный коронариит и эндотелиит мелких веточек коронарных артерий и присоединение лимфоцитарного эндо- и перикардита с развитием панкардита во многих случаях.

6. Обнаружение РНК SARS-CoV-2 в миокарде методом ПЦР и иммуногистохимическая идентификация spike-белка и белка нуклеокапсида SARS-CoV-2 в кардиомиоцитах свидетельствует о возможности прямого повреждения миокарда коронавирусом.

7. Идентификация spike-белка и белка нуклеокапсида SARS-CoV-2 в макрофагах инфильтрата в миокарде свидетельствует о возможности цитокинового повреждения миокарда.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ACE-2 - angiotensin-converting enzyme 2
CAR - coxsackievirus-adenovirus receptor
CLR – C-lectin receptor
DAF - decay-accelerating factor
ECHO - enteric cytopathogenic human orfhan
ICAM-1 – intercellular adhesion molecule 1
NK – natural killer
NOD - nucleotide oligomerization domain
SARS-CoV-2 - severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2
TLR – toll-like receptor
VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule 1
AB – аритмический вариант хронического миокардита
АПФ-2 – ангиотензинпревращающий фермент 2 типа
AT2 – ангиотензин-2
АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время
ВСС – внезапная сердечная смерть
ВЭБ – вирус Эпштейн-Барр
ДВ – декомпенсированный вариант хронического миокардита
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИА – идиопатическая аритмия
ИЛ-6 – интерлейкин-6
ИФН – интерферон
КМ – миокардит при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2
КМП - кардиомиопатия
МКБ – мочекаменная болезнь
НКЗМ – некоронарогенные заболевания миокарда
ОПН – острая почечная недостаточность

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РДСВ – респираторный дистресс синдром

РНК – рибонуклеиновая кислота

СВ – смешанный вариант хронического миокардита

ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии

ФНО – фактор некроза опухоли

ХБП – хроническая болезнь почек

ХМ – хронический миокардит

ХПНФ – хронический пиелонефрит

ЭМБ – эндомиокардиальная биопсия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиева И. Н., Благова О. В., Гагарина Н. В., Недоступ А. В., Коган Е. А., Седов В. П., Кадочникова В. В., Донников А. Е., Зайденов В. А., Куприянова А. Г., Терновой С. К., Возможности мультиспиральной компьютерной томографии в диагностике миокардита и определении прогноза у больных с синдромом дилатационной кардиомиопатии в сопоставлении с биопсией миокарда. Российский кардиологический журнал 2017, 2 (142): 39-49, <http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2017-2-39-49>
2. Анохин В.А., Сабитова А.М., Кравченко И.Э., Мартынова Т.М. Энтеровирусные инфекции: современные особенности. Практическая медицина. 2014, 9(85):52-59.
3. Благова О.В. Болезни миокарда и перикарда: от синдромов к диагнозу и лечению / М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 884 с.
4. Благова О.В., Коган Е.А., Лутохина Ю.А., Куклева А.Д., Айнетдинова Д.Х., Новосадов В.М. и др. Постковидный миоэндокардит подострого и хронического течения: клинические формы, роль персистенции коронавируса и аутоиммунных механизмов. Кардиология. 2021;61(5):1–16. <https://doi.org/10.18087/cardio.2021.6.n1659>
5. Благова О. В., Недоступ А. В. Классификация некоронарогенных заболеваний сердца: наш взгляд на проблему. Российский кардиологический журнал. 2017; 2(142): 7–21. <http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2017-2-7-21>
6. Благова О.В., Недоступ А.В., В.А. Сулимов, Е.А. Коган, А.Г. Куприянова, В.А. Зайденов, А.Е. Донников, В.В. Кадочникова «Идиопатические» аритмии: возможности комплексной нозологической диагностики и дифференцированного лечения. Кардиология. 2014, 4:28-38.
7. Болевич С.Б., Болевич С.С. Комплексный механизм развития COVID-19. Сеченовский вестник. 2020; 11(2): 50–61. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2020.11.2.50-61>
8. Ботвиньева В.В., Намазова-Баранова Л.С., Гордеева О.Б., Ботвиньев О.К., Коноплева Т.Н. Современные возможности диагностики, профилактики и

лечения энтеровирусной инфекции Коксаки у детей. Педиатрическая фармакология. 2012. Т.9, №3: 40-44.

9. Гуревич М.А. Проблема некоронарогенных заболеваний миокарда в клинической практике. РМЖ.1998. Т.6, N 24: 1523–1531.

10. Демина А. В. и др. Энтеровирусы. Часть 2. Энтеровирусные инфекции: Многообразие клинических проявлений. Бюллетень СО РАМН. 2009; 6 (140): 116–125.

11. Игнатьева Е.С., Рыжкова Д.В., Митрофанова Л.Б., Моисеева О.М. Возможности магнитно-резонансной томографии в диагностике различных клиничко-морфологических форм миокардита. Рос. кардиол. журн. 2017. № 2:30-38.

12. Ильяш М.Г., Базыка О.Е. К вопросу о классификации миокардитов. Український ревматологічний журнал. 2001. №3-4 (5-6): 23-25.

13. Ионаш В. Частная кардиология. Пер. с чешск. Т.2, Прага, 1963. 820 с.

14. Кедров А.А. Болезни сердечной мышцы. М.: Медгиз, 1963.

15. Клинические рекомендации по диагностике и лечению миокардитов. Евразийский кардиологический журнал. 2015. № 3:5-18.

16. В.Н. Коваленко, Е.Г. Несукай, Т.И. Гавриленко, С.В. Чернюк, Л.В. Якушко, Н.А. Рыжкова Особенности иммунного статуса у больных с острым и хроническим диффузным миокардитом, Український кардіологічний журнал. 2011. № 5:7-10.

17. Коган Е. А., Березовский Ю. С., Благова О. В., Куклева А. Д., Богачева Г. А., Курилина Э. В., Калинин Д. В., Багдасарян Т. Р., Семенова Л. А., Грецов Е. М., Эргешов А. Э., Фомин В. В. Миокардит у пациентов с COVID-19, подтвержденный результатами иммуногистохимического исследования // Кардиология, 2020; 60(7): 4-10. <https://doi.org/10.18087/cardio.2020.7.n1209>

18. Коган Е.А., Березовский Ю.С., Куклева А.Д., Курилина Э.В., Семенова Л.А., Благова О.В., Жарков Н.В. Лимфоцитарный миокардит у пациентов с COVID-19 (4 аутопсийных наблюдения) // Архив патологии. 2020. 82(5): 57-62. <https://doi.org/10.17116/patol20208205157>

19. Коган Е.А., Благова О.В., Алиева И.Н., Комаров Р.Н., Куклева А.Д. Клинико-морфологическое наблюдение эндомиокардита Лёффлера // Архив патологии. 2020; 82(3): 47-10. <https://doi.org/10.17116/patol20208203147>
20. Е.А.Коган, О.В.Благова, Н.М. Файзуллина, А.В.Недоступ, В.А. Сулимов., Повышенная экспрессия toll-like-рецепторов 2-го и 9-го типов в миокарде как маркер активного миокардита и возможный предиктор эффективности лечения // Архив патологии. 2018. №1: 11-20. <https://doi.org/10.17116/patol201880111-20>
21. Коган Е.А., Куклева А.Д., Березовский Ю.С., Благова О.В., Жарков Н.В., Айнетдинова Д.Х., Демяшкин Г.А. Клинико-морфологическая характеристика SARS-CoV-2-ассоциированного миокардита, подтвержденного наличием РНК и белков вируса в ткани миокарда. Архив патологии. 2021;83(4):5-13. <https://doi.org/10.17116/patol2021830415>
22. Ланг Г.Ф. Болезни системы кровообращения. Учебник внутренних болезней. Т.1. Ленинград, 1938. 360 с.
23. Максимов В.А. Миокардиты. Медицина, Ленинград, 1979. 239 с.
24. Митрофанова Л.Б. Роль эндомиокардиальной биопсии в диагностике воспалительных заболеваний миокарда, Российский кардиологический журнал. 2016. 1 (129):73-79. <http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-1-73-79>
25. Михайлова Е. В., Данилов А. Н., Чудакова Т. К. и др. Фармакологическая коррекция гемореологических нарушений у больных с острыми респираторными вирусными инфекциями. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2013. № 8: 43—46.
26. Моисеев В.С., Киякбаев Г.К. Кардиомиопатии и миокардиты. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 348 с.
27. Наумова Е.Ю. Сравнительный анализ методов верификации этиологии миокардита при алкогольной кардиомиопатии. Суд.-мед. экспертиза. 2015. Т. 58, № 5: 17-19.
28. Палеев Н. Р., Палеев Ф. Н., Санина Н. П. Миокардиты. Альманах клинической медицины. 2004. 7:118-126.

29. Палеев Ф.Н. Патогенез аутоиммунного миокардита - механизмы повреждения и защиты : автореф. дис. - д-ра мед. наук. М., 2004. 44 с.
30. Рапопорт Я.Л. Патология миокарда. Клиническая медицина. 1978. №6: 7-16.
31. Руководство по инфекционным болезням под ред. В. М. Семенова. М.: Медицинское информационное агентство, 2009. — 752 с.
32. Рунов А., Курчакова Е., Хащевская Д., Моисеева О., Митрофанова Л., Вонский М. Экспрессия вирусных рецепторов и развитие миокардита. Медицинская вирусология. 2016. Том XXX(1): 39-47.
33. Сазонова С.И., Ильюшенкова Ю.Н., Баталов Р.Е. и др. Определение эффективности однофотонной эмиссионной компьютерной томографии с лейкоцитами, меченными ⁹⁹МТс-НМРАО, в диагностике миокардитов: сопоставление результатов сцинтиграфии и данных гистологического исследования. Вестн. рентгенол. 2015. № 4: 29-34.
34. Саксонов С.И., Лев Р.Л. Клинические варианты неревматического миокардита. Клин. Медицина. 1987. №1: 102-106.
35. Самсон А.А. Поражение сердечно-сосудистой системы при инфекционных заболеваниях. Медицина неотложных состояний. 2008. 1 (14):19–24.
36. Скворцов В.В., Тумаренко А.В., Одинцов В.В., Орлов О.В. Скворцова Е.М. Миокардиты. Российский кардиологический журнал. 2009. 1(75): 87-96.
37. Сторожаков Г.И. Руководство по кардиологии: учебное пособие в 3 т. / под ред. Г.И. Сторожакова, А.А. Горбаченкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа – 2009. – Т.3 – 512 с.
38. Стрижаков Л.А., Карпов С.Ю., Фомин В.В. и др. Поражение миокарда, ассоциированное с хроническим гепатитом С: клинические варианты и патогенетические звенья. Терапевтический архив. 2016. 4(88): 105-111. <http://dx.doi.org/10.17116/terarkh2016884105-111>
39. Теодори М.И. Некоторые вопросы клиники, дифференциальной диагностики, и классификации заболеваний миокарда. Кардиология. 1972. №9:5-17.

40. Ю.П. Финогеев, Инфекционные миокардиты (клиника, диагностика, принципы терапии). Журнал инфектологии. 2016. Т. 8, №3: 28-39.
41. Х.С. Хаертынов, Ш.Р. Галеев. Роль цитомегаловирусной инфекции в трансплантации солидных органов. Практическая медицина. 2016. Т.2, № 4 (96): 149-152.
42. Е.В. Шарипова, И.В. Бабаченко, А.С. Левина Поражение сердечно-сосудистой системы при вирусных инфекциях. Журнал инфектологии. 2017. Т. 9, № 4:14-23. <http://dx.doi.org/10.22625/2072-6732-2017-9-4-14-23>
43. А.Ю. Щедрина, А. А. Скворцов, К.А. Зыков, А.А. Сафиуллина, С.Н. Терещенко. Роль парвовируса в 19 в развитии воспалительной кардиомиопатии. Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. 2013. 9(5):542-550.
44. Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции. Методические указания МУ 3.1.1.2363-08. — 2008
45. Юренев П.Н., Семенович Н.И. Клиника и терапия аллергических поражений сердца и сосудов. М.: Медицина. 1972. 252 с.
46. Abed Y, Boivin G. New Saffold cardiovirus in 3 children in Canada. *Emerg Infect Dis.* 2008.14: 834–836.
47. Adams, M.J., King, A.M.Q. and Carstens, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology.* 2013. Vol. 158: 2023-2030.
48. Adriano Nunes Kochi, Ana Paula Tagliari, Giovanni Battista Forleo, Gaetano Michele Fassini, Claudio Tondo. Cardiac and arrhythmic complications in patients with COVID-19. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2020. 31:1003–1008. <https://doi.org/10.1111/jce.14479>
49. Andréoletti L., Lévêque N., Boulagnon C. et al. Viral causes of human myocarditis *Arch. Cardiovasc. Dis.* 2009. Vol. 102, N 6-7: 559-568.
50. Angelini A, Carzolari V, Colabrese F, et al. «Myocarditis, mimicking acute myocardial infarction: role of endomyocardial biopsy in the differential diagnosis» *Heart.* 2000. 84:245-250.

51. Aravindh R., Saikia U.N., Mishra B. et al. Persistence of human parvovirus B19 in tissues from adult individuals: a comparison with serostatus and its clinical utility *Arch. Virol.* 2014. Vol. 159, N 9:2371-2376.
52. Arets HT, Billingham ME, Edwards WD, et al. Myocarditis: a histopathologic definition and classification. *Am. J. Cardivasc. Pathol.* 1987; 1: 3–14.
53. John Baksi, G. Sunthar Kanaganayagam, Sanjay K. Prasad. Arrhythmias in Viral Myocarditis and Pericarditis. 2015. 7(2): 269-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccep.2015.03.009>
54. Badorff C., Lee G.H., Lamphear B.J. et al. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat. Med.* 1999. Vol. 5: 320-326.
55. Manish Bansal. Cardiovascular disease and COVID-19 // *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* 2020. 14:247-250. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.03.013>
56. Baughman K.L. Diagnosis of Myocarditis. *Circulation.* 2006. 113(4):593-595. [doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.589663](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.589663)
57. Bennett M.K., Gilotra N.A., Harrington C., Rao S., Dunn J.M., Freitag T.B., Halushka M.K., Russell S.D. Evaluation of the role of endomyocardial biopsy in 851 patients with unexplained heart failure from 2000-2009. *Circ Heart Fail.* 2013. 6(4): 676-84. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.000087>
58. Olga Blagova, Dilyara Ainetdinova, Alexey Sedov, Yulia Lutokhina, Evgeniya Kogan, Anna Kukleva, Vsevolod Sedov, Alexander Zaitsev, Sergey Vasukov, Svetlana Alexandrova, Natalya Sarkisova. Progressive chronic SARS-CoV-2-positive giant cell myoendocarditis with atrial standstill and sudden cardiac death // *ESC Heart Failure.* 2021. <https://doi.org/10.1002/ehf2.13520>
59. Bock C.T, Klingel K, Kandolf R. Human B19 associated myocarditis. *N Engl J Med.* 2010. 362(13): 1248-9. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0911362>
60. Bock C.T., Düchting A, Utta F, Brunner E, Sy B.T., Klingel K, Lang F, Gawaz M, Felix S.B., Kandolf R. Molecular phenotypes of human parvovirus B19 in patients

- with myocarditis. *World J Cardiol.* 2014. 6(4):183-95.
<https://doi.org/10.4330/wjc.v6.i4.183>
61. Bonsch C, Zurcher C, Lieby P, Kempf C, Ros C. 2010. The Globoside Receptor Triggers Structural Changes in the B19 Virus Capsid That Facilitate Virus Internalization. *J Virol.* 2010. 84(22): 11737-11746.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01143-10>
62. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, et al. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. *J Am Coll Cardiol.* 2003. 42:466-72.
[https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(03\)00648-x](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(03)00648-x)
63. Boza P., Ayala P., Vivar R. et al. Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1 β synthesis, secretion, and degradation. *Mol. Immunol.* 2016. 74:96-105.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.05.001>
64. Braunwald E. Editor. Heart Disease. Textbook of Cardiovascular Medicine. 5th edition. W.B.Saunders Company, 1998.
65. Bultmann BD, Sotlar K, Klingel K. Parvovirus B19. *N Engl J Med.* 2004. 350:2006-2007.
66. Caforio A.L., Bauce B., Boffa G.M. et al. Autoimmunity in myocarditis and dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibody frequency and clinical correlates in a patient series from Italy *G. Ital. Cardiol.* 1997. Vol. 27. P. 106-112.
67. Caforio A.L., Calabrese F., Angelini A. et al. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *Eur. Heart J.* 2007. 28(11): 1326-1333.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm076>
68. Caforio A.L., Pankuweit S., Arbustini E. et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* 2013. 34(33):2636-2648.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh210>

69. Calabrese F., Thiene G. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspects. *Cardiovasc. Res.* 2003. 60(1):11-25. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00475-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00475-9)
70. Casella M., Pizzamiglio F., Dello Russo A. et al. Feasibility of combined unipolar and bipolar voltage maps to improve sensitivity of endomyocardial biopsy. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 2015. 8(3):625-632. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.114.002216>
71. Chen G, Wu D, Guo W, et al. Clinical and immunologic features and moderate forms of coronavirus disease 2019. *J Clin Invest.* 2020. 130(5):2620-9. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>
72. Chimenti C, Frustaci A. Contribution and risks of left ventricular endomyocardial biopsy in patients with cardiomyopathies: a retrospective study over a 28-year period. *Circulation.* 2013. 128(14):1531–41. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.13.001414>
73. Chimenti C., Russo A., Pieroni M. et al. Intramyocyte detection of Epstein-Barr virus genome by laser capture microdissection in patients with inflammatory cardiomyopathy. *Circulation.* 2004. 110(23): 3534-3539. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000148823.08092.0E>
74. Chimenti C., Verardo R., Scopelliti F. et al. Myocardial expression of Toll-like receptor 4 predicts the response to immunosuppressive therapy in patients with virus-negative chronic inflammatory cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Fail.* 2017. 19(7): 915-925. <https://doi.org/10.1002/ejhf.796>
75. Chow LH, Radio SJ, Sears TD, McManus BM. Insensitivity of right ventricular endomyocardial biopsy in the diagnosis of myocarditis. *J Am Coll Cardiol.* 1989.14(4):915–920. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(89\)90465-8](https://doi.org/10.1016/0735-1097(89)90465-8)
76. Chiu CY, Greninger AL, Chen EC et al.. Cultivation and serological characterization of a human Theiler's-like cardiovirus associated with diarrheal disease. *J Virol.* 2010. 84:4407–4414. <https://doi.org/10.1128/JVI.02536-09>
77. Corvisart J.N. An essay on the organic diseases and lesions of the heart and great vessels. Boston: Bradford and the Read. 1812; 299–303.

78. Cooper L.T., Baughman K.L., Feldman A.M. et al. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 2007. 28: 3076–3093. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.186093>
79. Cooper L.T. *Myocarditis. From Bench to Bedside.* New Jersey. Humana Press, 2003. 634 p.
80. Cooper L.T. Jr, Elamm C. Giant cell myocarditis: diagnosis and treatment. *Herz.* 2012. 37(6): 632-636. <https://doi.org/10.1007/s000590050023>
81. Craver R, Huber S, Sandomirsky M, McKenna D, Schieffelin J, Finger L. Fatal Eosinophilic Myocarditis in a Healthy 17-Year-Old Male with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2c). *Fetal Pediatr Pathol.* 2020.1-6. <https://doi.org/10.1080/15513815.2020.1761491>.
82. Cuffe M.S. The heart and infectious disease. *Cardiovascular Medicine.* Lippincott. 1998; 932–946.
83. Cuomo V, Esposito R, Santoro C. Fulminant myocarditis in the time of coronavirus. *Eur Heart J.* 2020. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa354>.
84. Dennert R, Crijns HJ, Heymans S. Acute viral myocarditis. *Eur Heart J.* 2008. 29(17): 2073–82. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn296>
85. Dougherty JD, Park N, Gustin KE et al. Interference with cellular gene expression. In: E Ehrenfeld, E Domingo, RP Roos (Eds.), *The Picornaviruses.* ASM Press. 2010. 165–180.
86. Elikowski W, Marszałek A, Małek-Elikowska M, Ganowicz-Kaatz T, Mozer-Lisewska I. Myopericarditis in a 23-year-old male with herpes zoster. Article in Polish. *Pol Merkur Lekarski.* 2016. 40(236): 97-101.
87. Escher F., Kühl U., Gross U. et al. Aggravation of left ventricular dysfunction in patients with biopsy-proven cardiac human herpesvirus A and B infection. *J. Clin. Virol.* 2015. 63: 1-5. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012773>

88. Escher F., Tschöepe C., Lassner D., Schultheiss H.P. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: from diagnosis to treatment. *Turk. Kardiyol. Dern. Ars.* 2015. 4(8): 739-748. <https://doi.org/10.5543/tkda.2015.47750>
89. Esfandiarei M., McManus B.M. Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annu Rev Pathol.* 2008. 3:127–155. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151534>
90. Fairweather D, Yusung S, Frisancho S, Barrett M, Gatewood S, Steele R et al. IL-12 receptor beta 1 and Toll-like receptor 4 increase IL-1 beta- and IL-18-associated myocarditis and coxsackie virus replication. *J Immunol* 2003.170: 4731–4737. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.9.4731>
91. Fechner H, Haack A, Wang H, et al. Expression of coxsackie adenovirus receptor and alpha-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther.* 1999. 6(9):1520–1535. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301030>
92. Ford J, McEndaffer L, Renshaw R, Molesan A, Kelly K. Parvovirus Infection Is Associated With Myocarditis and Myocardial Fibrosis in Young Dogs. *Vet Pathol.* 2017. 54(6): 964-971. <https://doi.org/10.1177/0300985817725387>.
93. Francis R, Lewis C. Myocardial biopsy: techniques and indications. *Heart.* 2018. 104(11):950–8. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2017-311382>
94. Rong-Fu Chen, Chun-Yi Lee. Adenoviruses Types, Cell Receptors and Local Innate Cytokines in Adenovirus Infection. *International Reviews of Immunology.* 2014. 33(1): 45-53. <https://doi.org/10.3109/08830185.2013.823420>
95. Full F, Ensser A. Early Nuclear Events after Herpesviral Infection. *J Clin Med.* 2019. 8(9): 1408. <https://doi.org/10.3390/jcm8091408>.
96. Glukhovets B.I, Glukhovets N.G, Belitchenko N.V, Sosunova O.A. Immunofluorescence diagnosis of the herpesvirus stillborn infection. *Vopr Virusol.* 2016. 61(5):219-21.
97. Gore I., Saphir O. Myocarditis; a classification of 1402 cases. *Am. Heart J.* 1947. 34(6): 827-830. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(47\)90147-6](https://doi.org/10.1016/0002-8703(47)90147-6)

98. Grumbach IM, Heim A, Pring-Akerblom P, et al. Adenoviruses and enteroviruses as pathogens in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Acta Cardiol.* 1999. 54 (2): 83-8.
99. Tomasz J Guzik, Saidi A Mohiddin, Anthony Dimarco, Vimal Patel, Kostas Savvatis, Federica M Marelli-Berg, Meena S Madhur, Maciej Tomaszewski, Pasquale Maffia, Fulvio D'Acquisto, Stuart A Nicklin, Ali J Marian, Ryszard Nosalski, Eleanor C Murray, Bartlomiej Guzik, Colin Berry, Rhian M Touyz, Reinhold Kreutz, Dao Wen Wang, David Bhella, Orlando Sagliocco, Filippo Crea, Emma C Thomson, Iain B McInnes. COVID-19 and the cardiovascular system: implications for risk assessment, diagnosis, and treatment options. *Cardiovasc Res.* 2020. 116(10): 1666-1687. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa106>
100. Thomas C. Hanff, Michael O. Harhay, Tyler S. Brown, Tyler S. Brown, Amir M. Mohareb. Is There an Association Between COVID-19 Mortality and the Renin-Angiotensin System—a Call for Epidemiologic Investigations. *Clinical Infectious Diseases.* 2020. 71(15): 870-74. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa329>
101. Hauck A.J., Kearney D.L., Edwards W.D. Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error. *Mayo Clin Proc.* 1989. 64:1235–1245. [https://doi.org/10.1016/s0025-6196\(12\)61286-5](https://doi.org/10.1016/s0025-6196(12)61286-5)
102. Heegaard E.D., Brown K.E. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev.* 2002. 15:485-505. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.3.485-505.2002>
103. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 2020. 181:271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.
104. Hu H, Ma F, Wei X, Fang Y. Coronavirus fulminant myocarditis saved with glucocorticoid and human immunoglobulin. *Eur Heart J.* 2020. 42(2): 206. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa190>.
105. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020. 395:497-506

106. Hufnagel G., Pankuweit S., Richter A. et al. The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results // *Herz*. 2000. Vol. 25, N 3. P. 279-285.
107. Kyoko Imanaka-Yoshida. Inflammation in myocardial disease: From myocarditis to dilated cardiomyopathy. *Japan Pathol Int*. 2019. 70(1): 1–11. <https://doi.org/10.1111/pin.12868>.
108. Inciardi RM, Lupi L, Zaccone G, Italia L, Raffo M, Tomasoni D, Cani DS, Cerini M, Farina D, Gavazzi E. Cardiac involvement in a patient with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol*. 2020. 5(7): 819-824. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.1096>.
109. Ivanova S.K, Angelova S.G, Stoyanova A.P, Georgieva I.L, Nikolaeva-Glomb L.K, Mihneva Z.G, Korsun N.S. Serological and Molecular Biological Studies of Parvovirus B19, Coxsackie B Viruses, and Adenoviruses as Potential Cardiotropic Viruses in Bulgaria. *Folia Med (Plovdiv)*. 2016. 58(4):250-256. <https://doi.org/10.1515/folmed-2016-0036>.
110. JCS Joint Working Group. Guidelines for diagnosis and treatment of myocarditis (JCS 2009): digest version. *Circ J*. 2011. 75(3):734–43. <https://doi.org/10.1253/circj.cj-88-0008>
111. Karatolios K., Maisch B., Pankuweit S. Suspected inflammatory cardiomyopathy. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in endomyocardial biopsies with positive serological evidence. *Herz*. 2015. 40(1): 91-95. <https://doi.org/10.1007/s00059-014-4118-x>
112. Julius L. Katzmann, Peter Schlattmann, Angelos G. Rigopoulos, Ewa Noutsias, Boris Bigalke, Matthias Pauschinger, Carsten Tschöpe, Daniel Sedding, P. Christian Schulze, Michel Noutsias, Meta-analysis on the immunohistological detection of inflammatory cardiomyopathy in endomyocardial biopsies. *Heart Failure Reviews*. 2019. 25(2): 277-294. <https://doi.org/10.1007/s10741-019-09835-9>
113. Keidar S, Kaplan M, Gamliel-Lazarovich A. ACE2 of the heart: from angiotensin I to angiotensin (1-7). *Cardiovasc Res*. 2007. 73:463-9. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.09.006>

114. Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A, Bohm M. Update on Myocarditis. *Journal of American College of Cardiology*. 2012. 59(9): 779-792. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.09.074>.
115. Knowles NJ, Hovi T, Hyypia T et al. Picornaviridae. In: AMQ King, MJ Adams, EB Carsten, EJ Lefkowitz (Eds.). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego. 2012. 855–880.
116. Kueth F, Lindner J, Matschke K et al. Prevalence of parvovirus B19 and human bocavirus DNA in the heart of patients with no evidence of dilated cardiomyopathy or myocarditis. *Clin Infect*. 2009. 49:1660-66.
117. Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2005. 111: 887-93. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000155616.07901.35>.
118. Lee D.W., Gardner R., Porter D.L. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*. 2014. 124:188–195. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-552729>
119. Lee G.H., Badorff C., Knowlton K.U. Dissociation of sarcoglycans and the dystrophin carboxyl terminus from the sarcolemma in enteroviral cardiomyopathy. *Circ. Res*. 2000. 87(6): 489-495. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.6.489>
120. Leonor Lopez GL, Chaparro SV, Brozzi N, Badiye A., Heart failure enigma in young man: the acute onset of a frequently encountered condition with an unexpected cause. *BMJ Case Rep*. 2020. 13(1): e233190. <https://doi.org/10.1136/bcr-2019-233190>.
121. Li B, Yang J, Zhao F, et al. Prevalence and impact of cardiovascular metabolic diseases on COVID-19 in China. *Clin Res Cardiol*. 2020. 109(5):531-8. <https://doi.org/10.1007/s00392-020-01626-9>
122. Lion T. *Clin Microbiol*. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Rev*. 2014. 27(3):441-62. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-13>.

123. Liu Y.T., Jih J., Dai X., Bi G.Q., Zhou Z.H. Cryo-EM structures of herpes simplex virus type 1 portal vertex and packaged genome. *Nature*. 2019. 570: 257–261. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1248-6>.
124. Luo Y, Qiu J. Human parvovirus B19: a mechanistic overview of infection and DNA replication. *Future Virol.* 2015. 10(2): 155-167. <https://doi.org/10.2217/fvl.14.103>.
125. Lynch JP 3rd, Fishbein M, Echavarría M. Adenovirus. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011. 32(4):494-511. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1283287>.
126. Magnani JW, Dec GW. Myocarditis: current trend in diagnosis and treatment. *Circulation*. 2006. 113 (6): 876-90. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.584532>.
127. Maisch B. Cardio-Immunology of Myocarditis: Focus on Immune Mechanisms and Treatment Options. *Front. Cardiovasc. Med.* 2019. 6:48. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00048>
128. Maisch B., Beltman Factor S., et al. World Heart Federation consensus conferences' definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): report from two expert committees on histology and viral cardiomyopathy. *Heartbeat*. 1999. 4: 3-4.
129. B. Maisch, S. Pankuweit, Inflammatory dilated cardiomyopathy Etiology and clinical management. *Herz*. 2020. 45(3): 221-229. <https://doi.org/10.1007/s00059-020-04900-8>
130. Maisch B, Pankuweit S. Standard and etiology-directed evidence-based therapies in myocarditis: state of the art and future perspectives. New York: Springer Science. 2012. 18(6): 761-95. <https://doi.org/10.1007/s10741-012-9362-7>
131. Maisch B., Portig I., Ristic A. et al. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report. *Herz*. 2000. 25(3): 200-209. <https://doi.org/10.1007/s000590050007>
132. Medau H.J. [Therapy of myo- and pericarditis] [Article in German] // *Med. Welt*. 1972. Vol. 23, N 35. P. 1131-1134.

133. Mehra MR, Ruschitzka F. COVID-19 illness and heart failure: a missing link? *JACC Heart Fail.* 2020. 8(6):512–4. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2020.03.004>.
134. Melo T.G., Almeida D.S., de Meirelles M.N., Pereira M.C. Trypanosoma cruzi infection disrupts vinculin costameres in cardiomyocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 2004. 83(10): 531-540. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00419>
135. Mittal A, Kuntar S, Vaswani N.D., Kaushik J.S. Acute Necrotizing Encephalopathy of Childhood Associated with Human Parvovirus B19 Infection. *Indian J Pediatr.* 2020. 87(8): 648-49. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03224-z>
136. Oksana Narovlyanskaya, Elizabeth J. Winokur, CEN. Viral Myocarditis. *DIMENS CRIT CARE NURS.* 2020. 39(2):75-80. <https://doi.org/10.1097/DCC.0000000000000402> March/April 2020
137. Needle DB, Mietelka KA. Pathology in practice. Parvoviral myocarditis. *J Am Vet Med Assoc.* 2014. 244(10):1155-7. <https://doi.org/10.2460/javma.244.10.1155>.
138. Nielsen AC, Bottiger B, Banner J et al. Serious invasive Saffold virus infections in children, 2009. *Emerg Infect Dis.* 2012. 18: 7–12. <https://doi.org/10.3201/eid1801.110725>.
139. Nikolich-Zugich J, Knox KS, Rios CT, Natt B, Bhattacharya D, Fain MJ. SARS-CoV-2 and COVID-19 in older adults: what we may expect regarding pathogenesis, immune responses, and outcomes. *GeroScience.* 2020. 42(2):505–14. <https://doi.org/10.1007/s11357-020-00186-0>.
140. Nystrup K.B, Stantchev H. Myocarditis with massive troponin T elevation caused by varicella-zoster infection in a teenager. Article in Danish. *Ugeskr Laeger.* 2014. 176(3A):V07130438.
141. Oberste MS, Gotuzzo E, Blair P et al. Human febrile illness caused by encephalomyocarditis virus infection, Peru. *Emerg Infect Dis.* 2009.15: 640–646. <https://doi.org/10.3201/eid1504.081428>
142. Oudit GY, Kassiri Z, Jiang C, Liu PP, Poutanen SM, Penninger JM, Butany J SARS-coronavirus modulation of myocardial ACE2 expression and inflammation in patients with SARS. *Eur J Clin Invest.* 2009. 39(7): 618-25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02153.x>.

143. Pambuccian SE, The COVID-19 pandemic: Implications for the cytology laboratory. *Journal of the American Society of Cytopathology*. 2020. 9(3):202-211. <https://doi.org/10.1016/j.jasc.2020.03.001>.
144. Pankuweit S, Klingel K. Viral myocarditis: from experimental models to molecular diagnosis in patients. *HeartFailRev*. 2013. 18(6):683–702. <https://doi.org/10.1007/s10741-012-9357-4>
145. Pauschinger M., Chandrasekharan K., Noutsias M. et al. Viral heart disease: molecular diagnosis, clinical prognosis, and treatment strategies. *Med. Microbiol. Immunol*. 2004. 193(2-3): 65-69. <https://doi.org/10.1007/s00430-003-0213-y>.
146. Peretto G, Sala S, Rizzo S, De Luca G, Campochiaro C, Sartorelli S, Bendetti, G, Palmisano A, Esposito A, Tresoldi M, Thiene G, Basso C, Della Bella P, Arrhythmias in Myocarditis: State of the Art. *Heart Rhythm*. 2018. 16(5): 793-801. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2018.11.024>.
147. Prochorec-Sobieszek M., Bilińska Z.T. et al. Assessment of the inflammatory process by endomyocardial biopsy in patients with dilated cardiomyopathy based on pathological and immunohistochemical methods. *Kardiol. Pol*. 2006. 64(5): 479-487.
148. Pollack A, Kontorovich AR, Fuster V, Dec GW. Viral myocarditis—diagnosis, treatment options, and current controversies. *Nat Rev Cardiol*. 2015. 12(11): 670–80. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.108>.
149. Quattrocchi S, Ruprecht N, Bonsch C, Bieli S, Zurcher C, Boller K, Kempf C, Ros C. Characterization of the early steps of human parvovirus B19 infection. *J Virol*. 2012 86(17): 9274-9284. <https://doi.org/10.1128/JVI.01004-12>
150. Razzano D, Fallon JT, Myocarditis: Somethings Old and Something New. *Cardiovascular Pathology*. 2020. 44:107155. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2019.107155>.
151. Reddy J, Massilamany C, Buskiewicz I, Huber SA. Autoimmunity in viral myocarditis. *Curr Opin Rheumatol* 2013. 25:502-8. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283620036>.

152. Reunanen A, et al. Enterovirus, Mycoplasma and other infections as predictors for myocardial infection. *J Intern Med.* 2002 Nov; 252 (5): 421-9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.01052.x>.
153. Sagar S, Liu PP, Cooper LT. Myocarditis. *Lancet.* 2012. 379(9817): 738-747. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60648-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60648-X).
154. Sala S, Peretto G, Gramegna M, Palmisano A, Villatore A, Vignale D, De Cobelli F, Tresoldi M, Cappelletti AM, Basso C, Godino C, Esposito A / Acute myocarditis presenting as a reverse Tako-Tsubo syndrome in a patient with SARS-CoV-2 respiratory infection. *Eur Heart J.* 2020. 41(19): 1861-1862. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa286>.
155. Saltykow S. Über diffuse Myokarditis. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Berl.* 1905. 182: 1-39.
156. Schultz JC, Hilliard AA, Cooper LT Jr, Rihal SC. Diagnosis and Treatment of Viral Myocarditis. *Mayo Clin Proc.* 2009. 84(11):1001-1009 [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(11\)60670-8](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(11)60670-8).
157. Shauer A, Gotsman I, Keren A, Zwas DR, Hellman Y, Durst R, Admon. Acute viral myocarditis: current concepts in diagnosis and treatment. *Isr Med Assoc J.* 2013. 15(3):180-5.
158. Shi S, Qin M, Shen B, et al. Association of cardiac injury with mortality in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol.* 2020. 5(7): 802-810. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.0950>
159. Simpson K.E, Storch G.A, Lee C.K, Ward K.E, Danon S, Simon C.M, Delaney J.W, Tong A, Canter C.E. High Frequency of Detection by PCR of Viral Nucleic Acid in The Blood of Infants Presenting with Clinical Myocarditis. *Pediatr Cardiol.* 2016. 37(2):399-404. <https://doi.org/10.1007/s00246-015-1290-6>.
160. Sinagra G, Anzini M, Pereira NL, Bussani R, Finocchiaro G, Bartunek J, et al. Myocarditis in clinical practice. *Mayo Clin Proc.* 2016. 91(9): 1256–66. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.05.013>
161. G. Sinagra et al. Dilated Cardiomyopathy. *SpringerOpen.* 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-13864-6_9

162. Siripanthong B, Nazarian S, Muser D, et al. Recognizing COVID-19-related myocarditis: the possible pathophysiology and proposed guide-line for diagnosis and management. *Heart Rhythm*. 2020. 17(9): 1463-1471. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2020.05.001>.
163. Nanev Slavov, Katia Kaori Otaguiri, Dimas Tadeu Covas, Simone Kashima Prevalence and Viral Load of Human Parvovirus B19 (B19V) Among Blood Donors in South-East Brazil Svetoslav. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2016. 32 (1): S323–S325. <https://doi.org/10.1007/s12288-015-0607-1>
164. Smith S.C., Ladenson J.H., Mason J.W., et al. Elevations of cardiac troponin I associated with myocarditis. *Circulation*. 1997. 95: 163–168.
165. J. F. Sobernheim. Akute idiopathische Herzentzündung. Praktische Diagnostik der inneren Krankheiten mit vorzüglicher Rücksicht auf pathologische Anatomie bearbeitet. Berlin, 1837.
166. Stewart GC, Lopez-Molina J, Gottumukkala RV et al. Myocardial Parvovirus B19 persistence: lack of association with clinicopathologic phenotype in adults with heart failure. *Circ Heart Fail*. 2011. 4(1):71-8 <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.958249>
167. Su C.C., Hsu T.C., Hsiao C.H., Chiu C.C., Tzang B.S. Effects of antibodies against human parvovirus B19 on angiogenic signaling. *Mol Med Rep*. 2020. 21(3): 1320-1327. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.10921>.
168. Tai W, He L, Zhang X, Pu J, Voronin D, Jiang S, et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol*. 2020. 17(6):613–20. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0400-4>
169. Tatrai E, Bedi K, Kovalszky I, Hartyanszky I, Laszik A, Acsady G, Sotonyi P, Hubau M. No mutation but high mRNA expression of Coxsackie-Adenovirus Receptor was observed in both dilated and ischemic cardiomyopathy. *Forensic Science International*. 2011. 212: 47-50. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.05.010>

170. Tavazzi G, Pellegrini C, Maurelli M, Belliato M, Sciutti F, Bottazzi A, Sepe PA, Resasco T, Camporotondo R, Bruno R, et al. Myocardial localization of coronavirus in COVID-19 cardiogenic shock. *Eur J Heart Fail.* 2020. 22(5): 911-915. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1828>.
171. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA et al. ESC Scientific Document Group. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J.* 2019. 40(3):237–269. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy462>
172. Tschöpe C, Bock CT, Kasner M et al. High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation.* 2005. 111(7): 879-86 <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000155615.68924.B3>
173. Turner AJ, Hiscox JA, Hooper NM. ACE2: from vasopeptidase to SARS-virus receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 2004. 25:291-4. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.04.001>
174. Vigneswaran T.V., Brown J.R., Breuer J., Burch M. Parvovirus B19 myocarditis in children: an observational study. *Arch. Dis. Child.* 2016. 101(2): 177-180. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-308080>
175. Wang C, Sun H, Song Y, Ma Z, Zhang G, Gu X et al. Pterostilbene attenuates inflammation in rat heart subjected to ischemia-reperfusion: role of TLR4/NF-kappaB signaling pathway. *Int J Clin Exp. Med.* 2015. 8: 1737–1746.
176. Wei X, Fang Y, Hu H, Immune-mediated mechanism in coronavirus fulminant myocarditis. *Eur Heart J.* 2020. pii: ehaa333. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa333>.
177. Weinberg M., Fell E.H., Lynfield J. Diagnostic biopsy of the pericardium and myocardium. *AMA Arch. Surg.* 1958. 76: 825-829.
178. Wolfrum N, Greber UF. Adenovirus signalling in entry. *Cell Microbiol.* 2013. 15(1):53–62. <https://doi.org/10.1111/cmi.12053>
179. Xiong T.Y, Redwood S, Prendergast B, Chen M. Coronaviruses and the cardiovascular system: acute and long-term implications. 2020. *Eur Heart J.* 0: 1-3. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa231>

180. Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020. 8:420-2. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X)
181. Yamamoto T, Kenzaka T, Matsumoto M, Nishio R, Kawasaki S, Akita H. A case report of myocarditis combined with hepatitis caused by herpes simplex virus. *BMC Cardiovasc Disord*. 2018. 18(1):134. <https://doi.org/10.1186/s12872-018-0869-2>.
182. Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J et al. (2009). Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med*. 2009. 15: 30–41. <https://doi.org/10.1038/nm.1992>
183. Yang J, Zheng Y, Gou X, Pu K, Chen Z, Guo Q, et al. Prevalence of comorbidities in the novel Wuhan coronavirus (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2020. 94: 91–5.
184. Yang Y, Lv J, Jiang S, Ma Z, Wang D, Hu W, Deng C, Fan C, Di S, Sun Y, Yi W. The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. *Cell Death Dis*. 2016. 7:e2234. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.140>
185. Zeng JH, Liu XY, Yuan J, Wang F, Wu W, Li J, Wang L, Gao H, Wang Y, Dong C, et al. First case of COVID-19 complicated with fulminant myocarditis complication: case report and insights. *Infection*. 2020. 48(5): 773-777. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01424-5>.
186. Zhang M., Tavora F., Zhang Y. et al. The role of focal myocardial inflammation in sudden unexpected cardiac and noncardiac deaths - a clinicopathological study // *Int. J. Legal Med*. 2013. Vol. 127, N 1. P. 131-138.
187. Zheng YY, Ma YT, Zhang JY, Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol*. 2020. 17(5): 259-260. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0360-5>.