

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР ИМЕНИ В.А. АЛМАЗОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

Макаров Игорь Александрович

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МИОКАРДЕ ПРИ ОСТРОЙ И  
ПОСТОСТРОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

### 3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
Митрофанова Любовь Борисовна  
доктор медицинских наук, профессор

Санкт-Петербург – 2023

## Содержание

Введение .....	4
Глава 1. Современные представления о коронавирусной инфекции (обзор литературы).....	14
1.1 Краткие данные об эпидемиологии заболевания .....	14
1.2 Нарушения иммунного ответа при коронавирусной инфекции .....	16
1.3 Эндотелиальная дисфункция при COVID-19.....	22
1.4 Повреждение миокарда при коронавирусной инфекции.....	28
1.5 Миокардит при коронавирусной инфекции .....	31
1.6 Постострый коронавирусный синдром.....	34
Глава 2. Материалы и методы исследования .....	38
2.1 Дизайн исследования .....	38
2.1.1 Аутопсийное исследование.....	38
2.1.2 Исследование эндомиокардиальных биопсий .....	40
2.1.3 Исследование биопсийного, операционного и секционного материала при трансплантации сердца .....	43
2.2 Гистологическое исследование .....	49
2.3 Иммуногистохимическое исследование и морфометрический анализ .....	50
2.4 Иммунофлюоресцентное исследование .....	52
2.5 Электронная микроскопия .....	53
2.6 ПЦР-исследование .....	54
2.7 Статистическая обработка данных.....	57
2.8 Благодарности .....	59

Глава 3. Результаты собственных исследований .....	62
3.1 Аутопсийное исследование.....	62
3.1.1 I волна коронавирусной инфекции .....	62
3.1.2 II волна коронавирусной инфекции .....	83
3.1.3 III волна коронавирусной инфекции.....	97
3.1.4 IV волна коронавирусной инфекции .....	114
3.1.5 Сравнение клинико-морфологических изменений в различные волны коронавирусной инфекции.....	117
3.2 Исследование эндомиокардиальных биопсий .....	132
3.2.1 Пациенты с хроническим лимфоцитарным миокардитом .....	132
3.2.2 Пациенты без лимфоцитарного миокардита.....	136
3.3 Трансплантация сердца во время пандемии SARS-CoV-2 .....	144
3.3.1 Первый клинический случай атипичного течения криза гуморального отторжения.....	145
3.3.2 Второй клинический случай атипичного течения криза гуморального отторжения.....	151
Глава 4. Обсуждение результатов исследований.....	155
Заключение .....	176
Выводы .....	178
Практические рекомендации.....	180
Перспективы дальнейшей разработки темы.....	181
Список сокращений .....	182
Список использованной литературы.....	185

## Введение

### Актуальность темы исследования

В декабре 2019 года появился новый коронавирус 2-го типа (SARS-CoV-2), вызывающий тяжелый острый респираторный синдром. Его высокая степень передачи привела к многочисленным негативным последствиям для всего мирового сообщества. Профилактические меры, такие как использование масок, соблюдение социальной дистанции и вакцинация, помогли сдержать пандемию. Тем не менее, появление новых вариантов SARS-CoV-2, таких как "Омикрон", "Кентавр", "Арктур" и др., а также повторные случаи заболевания COVID-19, вызывают дополнительные опасения. Во всем мире, согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), по состоянию на 18 сентября 2023 г. было зарегистрировано 770 563 467 подтвержденных случаев заболевания COVID-19, включая 6 957 216 случаев смерти [34].

Данные о возможном повреждении миокарда вирусом SARS-CoV-2 стали появляться практически с самого начала пандемии [96, 144, 184]. Впоследствии, в литературе появились систематические обзоры и метаанализы, по данным которых определялось, что 8,0% (95% доверительный интервал 4,1–12,0%) пациентов могут иметь повреждения миокарда на фоне коронавирусной инфекции [104].

В ранних отчетах из Китая отмечалось, что у 7-20% пациентов были повышенны уровни сердечных биомаркеров или были выявлены изменения на электрокардиограмме, что указывало на возможность повреждения миокарда [127]. Изучение влияния новой коронавирусной инфекции на миокард имеет большую актуальность в свете высокой распространенности COVID-19 и его потенциальных кардиологических осложнений. Понимание механизмов поражения сердечно-сосудистой системы при COVID-19 поможет в разработке эффективных стратегий

диагностики, лечения и профилактики сердечных осложнений у пациентов с этим заболеванием.

На сегодняшний день, когда пандемия коронавирусной инфекции отошла на второй план, на первое место выходят последствия перенесенной коронавирусной инфекции, в том числе и со стороны сердечно-сосудистой системы. В международном онлайн-опросе, проведенном Davis et al. у 37 из 3762 пациентов сердечные симптомы, включая боль в груди (~53%), учащенное сердцебиение (~68%), обмороки (~13%), наблюдались примерно у 86% пациентов в течение 7 месяцев после заражения. Синдром постуральной ортостатической тахикардии был отмечен у 31% пациентов [55].

Несмотря на столь широкую распространенность клинически значимых повреждений миокарда как в остром, так и в отдаленном периодах коронавирусной инфекции, морфологические доказательства влияния SARS-CoV-2 на миокард ограничены, а точный механизм повреждения миокарда вирусом SARS-CoV-2 изучен не до конца [20].

Это обусловлено такими факторами, как высокая загруженность патологоанатомов во время пандемии коронавирусной инфекции, ограниченностью медицинских ресурсов, отсутствием проведения патологоанатомических вскрытий пациентов с COVID-19 в некоторых странах, отсутствием адекватного забора биоматериала при вскрытии, трудностью получения ткани миокарда от пациентов с отдаленными последствиями коронавирусной инфекции.

Только комплексное клинико-морфологическое исследование сердца способно прояснить патогенез воздействия SARS-CoV-2 на миокард и сформировать теоретическую базу патогенетической терапии сердечно-сосудистых осложнений новой коронавирусной инфекции.

## Степень разработанности темы исследования

Исследование патоморфологии повреждения миокарда при коронавирусной инфекции проводилось многими авторами, однако эти работы в основном ограничиваются описаниями клинических случаев или их небольших серий, а анализ с привлечением нескольких морфологических и молекулярно-биологических методик выполнялся на выборке небольшого объема.

На сегодняшний день определены основные теории воздействия коронавируса на миокард, они включают: прямое повреждение кардиомиоцитов вирусом SARS-CoV-2 [184], развитие фульминантного [43] или аутоиммунного [112] миокардита, повреждение миокарда, обусловленное цитокиновым штормом [41], повреждение миокарда, обусловленное системным эндотелиитом [170], гипоксически-ишемические и дисметаболические повреждения миокарда [11], развитие стресс-индужированной кардиомиопатии [66].

Тем не менее, в настоящее время отсутствует единое мнение о патогенетическом воздействии коронавируса на сердце и плохо изучены его основные морфологические проявления.

Более того, исследования миокарда в отсроченном периоде коронавирусной инфекции крайне скучны и противоречивы.

Таким образом, в настоящее время корреляции между морфологическими изменениями в ткани миокарда и клиническими симптомами болезни остаются недостаточно изученными, описание гистологических повреждений в сердце при коронавирусной инфекции являются нечеткими, а данные о патогенезе отсроченных проявлений новой коронавирусной инфекции крайне противоречивы. Вследствие вышеназванных причин возникают трудности в лечении пациентов с сердечно-сосудистыми проявлениями коронавирусной инфекции и в морфологической диагностике поражения миокарда при COVID-19.

## Цель исследования

Изучение морфологических изменений в сердце у пациентов с острым и постострым COVID-19

## Задачи исследования

1. Изучить морфологические проявления острой коронавирусной инфекции в миокарде.
2. Сравнить изменения в сердце при разных волнах COVID-19 и выявить наиболее характерные морфологические черты в каждой группе.
3. Доказать наличие SARS-CoV-2 в миокарде с конкретной локализацией вируса в тех или иных клетках.
4. Выявить SARS-CoV-2 в эндомиокардиальных биопсиях у перенесших коронавирусную инфекцию и доказать персистенцию вируса.
5. Определить наличие, патогенез и частоту встречаемости миокардита при коронавирусной инфекции.

## Научная новизна результатов исследования

Подтверждена ведущая роль ангиопатии в патогенезе повреждения миокарда при острой коронавирусной инфекции. Установлено, что морфологическим проявлением острого COVID-19 в миокарде является активация эндотелия, дисэндотелиоз и его осложнения в виде тромбозов, кровоизлияний и некрозов. Впервые доказано, что миокардит наблюдается только в 5% случаев. При этом во

всех случаях определяется сверхэкспрессия антигенов энтеровирусов, а прямая этиологическая роль коронавируса в развитии миокардита не доказана. Доказано, что антигены SARS-CoV-2 локализуются преимущественно в эндотелии, перицитах и макрофагах миокарда. Впервые установлено, что морфологическим проявлением постострого COVID-19 в миокарде является достоверное увеличение количества CD68+макрофагов и снижение/исчезновение экспрессии маркеров активации эндотелия сосудов. Подтверждена способность SARS-CoV-2 персистировать в эндотелии сосудов и эндокарда. Впервые доказана способность коронавируса в состоянии непродуктивной персистенции стимулировать и утяжелять течение криза гуморального отторжения при трансплантации сердца.

## Теоретическая и практическая значимость исследования

Проведено комплексное клинико-морфологическое исследование сердца с использованием всех доступных на сегодняшний день уровней (макроскопического, гистологического, гистохимического, имmunогистохимического, иммунофлюоресцентного, ультраструктурного) и молекулярно-биологического анализа у пациентов четырех волн острого и постострого COVID-19, что позволило выявить основные проявления болезни в миокарде и определить особенности, свойственные для каждого из этих периодов пандемии. Полученные данные позволили повысить точность диагностики коронавирусного повреждения миокарда и предоставили теоретическую базу для патогенетической терапии этих пациентов. Так, дисэндотелиоз и тромботическая микроangiопатия диктуют необходимость применения антикоагулянтной терапии, а репарация ткани миокарда в постостром периоде определяет необходимость выжидательной тактики при ведении пациентов.

Полученная информация о персистенции SARS-CoV-2 в эндотелии позволит снизить риск развития и прогрессирования криза гуморального отторжения

трансплантированного сердца. Доказанное увеличение количества первичных опухолей сердца после коронавирусной инфекции будет способствовать пристальному вниманию к этой проблеме и их раннему выявлению.

Результаты исследования внедрены в работу научно-исследовательской лаборатории патоморфологии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

## Методология и методы исследования

Методы и методология исследования строятся на принципах доказательной медицины, и в рамках этого подхода был спланирован дизайн поперечного ретроспективного исследования. Теоретической основой диссертационного исследования являлись результаты научных работ, посвященные изучению патоморфологических проявлений воздействия коронавируса на ткани миокарда. Эти исследования послужили основой для определения целей и задач моего собственного исследования.

Больные с острой коронавирусной инфекцией и с постострым коронавирусным синдромом стали объектами исследования, а предметом — ткань миокарда. В рамках диссертационного исследования применялись разнообразные методы: общенаучные методы, такие как наблюдения, сравнение, дедукция, индукция, анализ и синтез; специальные методы, такие как гистологические, гистохимические и имmunогистохимические исследования, флуоресцентная и электронная микроскопия, полимеразно-цепная реакция и медицинская статистика.

Диссертационное исследование было одобрено Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России (протокол № 11-22 от 28.11.2022).

## Положения, выносимые на защиту

1. Основным морфологическим проявлением острого COVID-19 в миокарде является дисэндотелиоз с ремоделированием капилляров, обусловленный инфицированием SARS-CoV-2 эндотелия и приводящий к тромбозам, кровоизлияниям и некрозам.
2. Прямая этиологическая роль коронавируса в развитии миокардита сомнительна. SARS-CoV-2 является триггером прогрессии лимфоцитарного энтеровирусного миокардита
3. Каждая из волн COVID-19 характеризуется преобладанием того или иного морфологического признака в сердце со снижением интенсивности повреждения миокарда к четвертой волне.
4. Постострый COVID-19 в миокарде обусловлен непродуктивной персистенцией коронавируса в эндотелии и проявляется макрофагальной инфильтрацией стромы.
5. Персистенция SARS-CoV-2 в эндотелиоцитах сосудов сердца повышает риск развития и прогрессирования криза гуморального отторжения при его трансплантации.

## Степень достоверности и апробация результатов

Надежность и достоверность выводов данного исследования обеспечивается не только большим, репрезентативным объемом выборки, но и применением современных методов и адекватных приемов статистической обработки данных.

Основные результаты работы доложены и обсуждены на конференциях:

1. Всероссийская конференция, посвящённая 80-летию Центральной патологоанатомической лаборатории Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации «Актуальные вопросы патологической анатомии в мирное и военное время» Существует ли ковидный миокардит? Морфологические и молекулярно-биологические исследования миокарда при COVID-19.” 22.04.2022
2. X Санкт-Петербургская школа Аритмологии-2022. “Методы приготовления, окрашивания и исследования эндомиокардиальных препаратов. Ограничения эндомиокардиальной биопсии.” 12.10.2022
3. Пленарное заседание Санкт-Петербургского общества патологоанатомов. “Постковидный синдром. Исследование эндомиокардиальных биопсий.” 21.02.2023
4. Всероссийская конференция с международным участием "Алмазовский молодежный медицинский форум" 2023. “Экспрессия иммуногистохимических маркеров ангиогенеза в миокарде в постостром периоде коронавирусной инфекции” (автор и докладчик)
5. Всероссийская конференция с международным участием "Алмазовский молодежный медицинский форум" 2023. “Изучение экспрессии CD68-позитивных клеток в миокарде при постостром коронавирусном синдроме” (научный руководитель)

Результаты исследования внедрены в практическую работу патологоанатомического отделения Университетской клиники, в учебный процесс кафедры патологической анатомии с клиникой ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, а также в практическую работу СПб ГБУЗ "Городское

патолого-анатомическое бюро", патологоанатомического отделения ФГБУ ВЦЭРМ им А.М. Никифорова МЧС России.

### Личный вклад автора

Автор предложил и сформулировал тему, разработал исследовательский дизайн, собрал образцы для проведения гистологических, гистохимических и иммуногистохимических исследований, а также для флуоресцентной и электронной микроскопии. После этого автор провел анализ данных, полученных вышеперечисленными методами, и выполнение морфометрической и статистической обработки. Кроме того, весь текст диссертации и ряд научных публикаций по теме диссертации был написан автором самостоятельно.

### Публикации

По материалам диссертационного исследования опубликовано 13 научных работ, из них 4 – в журналах, рекомендуемых ВАК при Минобрнауки России из Перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук по специальности 3.3.2. Патологическая анатомия.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности «патологическая анатомия» по следующим пунктам:

П.1 Распознавание и характеристика этиологических факторов, определяющих возникновение и развитие конкретных заболеваний

(нозологических форм), на основании прижизненных и постмортальных патологоанатомических исследований клеток, тканей, органов и организма при использовании современных методических и технологических возможностей морфологии в сочетании с молекулярной биологией, молекулярной генетикой и эпигенетикой.

П.2. Научный анализ патологических процессов, лежащих в основе заболевания, прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов.

П.3. Исследование структурных, молекулярно-клеточных и молекулярно-генетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ персонализированной патогенетической терапии и профилактики.

П.5. Совершенствование клинико-морфологических классификаций болезней с их симптомами и синдромами, определяемыми спецификой этиологических факторов. Разработка теории диагноза.

## Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 209 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы. Работа содержит 47 рисунков и 16 таблиц. Библиографический указатель включает 188 источников, из них 8 отечественных и 180 зарубежных.

# Глава 1. Современные представления о коронавирусной инфекции (обзор литературы)

## 1.1 Краткие данные об эпидемиологии заболевания

Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) – это высококонтагиозный и патогенный вирус, который появился в конце 2019 года и стал причиной глобальной эпидемии острого респираторного заболевания, известного как коронавирусная болезнь 2019 (COVID-19). Этот вирус представляет серьезную угрозу здоровью человека и общественной безопасности, поэтому его изучение и борьба с ним стали приоритетом для многих стран мира.

Коронавирусы – это разнообразная группа вирусов, которые могут поражать множество различных животных, включая человека. Некоторые из них могут вызывать легкие респираторные инфекции, тогда как другие – тяжелые заболевания, такие как тяжелый острый респираторный синдром (SARS) и ближневосточный респираторный синдром (MERS). В 2019 году появился новый коронавирус, SARS-CoV-2, который вызвал эпидемию COVID-19. SARS-CoV-2 распространился по всему миру очень быстро и значительно превзошел SARS и MERS по количеству зараженных и по зонам эпидемиологического распространения [52, 178].

С помощью современных методов анализа генетического материала ученые из Китая смогли идентифицировать возбудителя тяжелой пневмонии, которая впервые была замечена в конце 2019 - начале 2020 года. Исследования метагеномной РНК и выделение вируса из образцов жидкости бронхоальвеолярного лаважа у таких пациентов привели к выводу, что новое заболевание вызывает бета-коронавирус, который никогда ранее не был

обнаружен. Эти данные были объявлены публично 9 января 2020 года, а уже через несколько дней опубликованы на сайте Virological и базе данных GISAID [78].

Несмотря на то, что в начале было высказано предположение о том, что вспышка заболевания связана с оптовым рынком морепродуктов Huanan, впоследствии были выявлены и другие случаи инфекции. Несколько семейных очагов инфекции и внутрибольничные инфекции свидетельствовали о передаче вируса от человека к человеку [40, 45].

Совпадение вспышки с приближением лунного Нового года и поездками между городами также способствовали распространению вируса по Китаю. Вскоре заболевание распространилось на другие города провинции Хубэй и другие части Китая, а затем быстро распространилось по всем 34 провинциям страны. В конце января врачи Китая ежедневно диагностировали тысячи новых случаев, и 30 января ВОЗ объявила вспышку COVID-19 чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение [64].

11 февраля Международный комитет по таксономии вирусов официально назвал новый коронавирус «SARS-CoV-2», а ВОЗ назвала болезнь «COVID-19». Эти названия были приняты мировым сообществом и с тех пор широко используются для обозначения этого заболевания [50].

Дополнительная информация, полученная на протяжении пандемии COVID-19, позволила сделать вывод, что к COVID-19 восприимчивы практически все люди. Средний возраст пациентов составляет около 50 лет, однако возрастной фактор не всегда является определяющим для развития тяжелых клинических проявлений. В целом пожилые мужчины, страдающие хроническими заболеваниями, имеют больший риск развития тяжелого респираторного заболевания. В то же время, у большинства молодых людей и детей заболевание протекает в легкой форме либо бессимптомно [87, 107].

Ранние симптомы инфекции включают лихорадку, утомляемость, сухой кашель, головную боль, диарею, боль в горле, боль в груди, озноб, тошноту и рвоту. Также в первые волны коронавирусной инфекции часто наблюдались нарушения обоняния и вкуса [45, 75, 173].

У большинства людей признаки заболевания проявляются после инкубационного периода от 1 до 14 дней, в большинстве случаев - около 5 дней. Одышка и пневмония чаще развиваются через 8 дней после начала заболевания [179].

Хотя известно, что SARS-CoV-2 может вызывать серьезное поражение легких, включая пневмонию и острый респираторный дистресс-синдром, в настоящее время наблюдается множество внелегочных проявлений COVID-19. По данным литературы существует возможность поражения кроветворной, сердечно-сосудистой, гепатобилиарной, нервной и мочевыделительной систем, а также глаз и кожи человека. Такие изменения могут быть следствием либо внелегочной репликации SARS-CoV-2, как это было отмечено для других зоонозных коронавирусов, либо широко распространенных иммунопатологических последствий заболевания [81, 85].

На основании широкого спектра клинических проявлений у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, новая коронавирусная инфекция в настоящее время считается полиорганным заболеванием, включающим поражение сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной и других систем органов [134].

## 1.2 Нарушения иммунного ответа при коронавирусной инфекции

SARS-CoV-2 – это вирус, состоящий из одной цепи положительной РНК и четырёх основных типов белков: нуклеокапсидный, мембранный, оболочечный и шиповидный. Особенностью этого вируса является шиповидный белок, состоящий

из двух субъединиц, S1 и S2, которые необходимы для входа вируса в клетки. Считается, что субъединица S1 связывается с рецептором аngiotензинпревращающего фермента-2 (АПФ2), в то время как S2 расщепляется трансмембранный сериновой протеазой-2 (TMPRSS2), обеспечивая слияние вируса с клеточной мембраной [100].

Шиповидный белок защищен от иммунной системы благодаря сложному гликозилированию и модулирует конформационную динамику рецептор-связывающего домена, расположенного на S1, что обеспечивает вирусные взаимодействия с АПФ2 [38].

Количество вируса в тканях наиболее высоко в тех местах, где экспрессируются оба белка (АПФ2 и TMPRSS2). Это эпителий трахеобронхиального дерева, пневмоциты 2 типа, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки тонкой и толстой кишки. Такое распределение восприимчивости клеток, частично объясняет совокупность симптомов, обычно наблюдающихся у пациентов с COVID-19 [161].

Помимо АПФ2 и TMPRSS2 существует ряд других белков, которые способствуют проникновению вируса в клетки путем специфического связывания. Сочетанная локализация АПФ2 с катепсином L обнаруживается в пневмоцитах 1-го типа, энteroцитах, кардиомиоцитах и плаценте. Катепсины активируют воспалительные каскады IL-1 $\beta$  и NLRP3, которые могут вызвать апоптоз или пироптоз, а также играют важную роль в ремоделировании матрикса, рекрутировании нейтрофилов и экстренном миелопоэзе. Гепарансульфат облегчает прикрепление вируса к клеткам, а фуриноподобные сайты расщепления на шиповидном белке способствуют репликации вируса в легких. Нейропилин-1 связывает субстраты производных фурина и облегчает проникновение вируса в эпителий слизистой носа. Кроме того, АПФ2 может экспрессироваться с провоспалительными протеазами, такими как фурин, PCSK5 и PCSK7 [36, 47].

Последние исследования показали, что натуральные киллеры (NK-клетки) могут быть потенциальной мишенью для SARS-CoV-2 посредством CD16-зависимого пути. При инфекции SARS-CoV-2 NK-клетки приобретают провоспалительный фенотип, что знаменуется подавлением CD16 клеток как у пациентов в острой фазе заболевания, так и у выздоравливающих [82].

CD16 подавляется в диммерных NK-клетках после их активации клетками-мишениями или после перекрестного связывания CD16 с антителами, что приводит к увеличению продукции IFN- $\gamma$  ( $\gamma$ -интерферона). Кроме того, было показано, что CD56- и CD16- негативные NK-клетки пролиферируют на ранних стадиях инфекции SARS-CoV-2, а затем их популяция быстро уменьшается у пациентов с легким течением заболевания [80, 147].

Инфекция SARS-CoV-2 часто сопровождается нарушениями иммунной системы и повреждением тканей. Это связано с тремя основными группами изменений в организме, которые вызывают aberrантные реакции в ответ на вирусную инфекцию.

Первая группа изменений связана с гуморальным иммунодефицитом и дефектами В-клеток. Это происходит из-за того, что SARS-CoV-2 напрямую атакует и инфицирует В-клетки, что приводит к ухудшению их функций и снижению уровня иммуноглобулинов, необходимых для борьбы с инфекцией.

Вторая группа изменений связана с гипервоспалительным состоянием, которое характеризуется высокими уровнями цитокинов, таких как IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , и утратой субпопуляций Т-клеток. Эти цитокины вызывают сильный воспалительный ответ и приводят к повреждению тканей, в том числе легких, сердца и почек.

Третья группа изменений связана с повреждением комплемента и связанными с ним нейтрофильными внеклеточными ловушками (NETs) и системным тромбозом. Показано, что при SARS-CoV-2 инфекции может происходить

неконтролируемая активация системы комплемента, что приводит к выраженному повреждению тканей и к развитию системного тромбоза [60].

Показано, что мононуклеарные клетки периферической крови проявляют повышенный профиль экспрессии IFN I типа, который коррелирует с вирусной нагрузкой на ранних стадиях коронавирусной инфекции, после чего уровень IFN I типа снижается по мере снижения вирусной нагрузки в организме человека. Однако у пациентов с тяжелым течением COVID-19 ответ, связанный с IFN, имеет тенденцию к уменьшению или быть отсроченным [22].

В этих условиях субоптимальные ответы, опосредованные с IFN (интерферонами), могут быть связаны с генетическими факторами, наличием нейтрализующих аутоантител или истощением количества дендритных клеток, которые продуцируют толл-подобный рецептор 7 типа (TLR7), способствующий обнаружению одноцепочечных вирусных рибонуклеиновых кислот и отвечающий за реакции, связанные с IFN [156].

Уровни интерферонов различаются в разных тканях и играют важную роль в борьбе организма с COVID-19. Как уже было сказано, IFN I типа является ключевы в ранней стадии инфекции. Его повышенный уровень также наблюдается у пациентов с продолжающейся репликацией вируса. IFN II типа, в свою очередь, ассоциируются с тяжелым течением заболевания во всех локализациях, тогда как IFN III типа обычно присутствуют в верхних дыхательных путях у пациентов с лёгким течением болезни и высокой вирусной нагрузкой [122].

Вероятно, ответные реакции в верхних дыхательных путях, связанные с IFN III типа, могут способствовать элиминации SARS-CoV-2. Однако, если противовирусный иммунный ответ не способен элиминировать патоген, баланс смещается в сторону провоспалительного состояния, которое поддерживается IFN I и II типов в нижних дыхательных путях [158].

Тяжелые формы заболевания могут быть результатом неудачной противовирусной активности, которую контролирует IFN. В исследовании на животной модели было показано, что успешное противостояние вирусу SARS-CoV-2 связано с увеличением количества макрофагов M1, обладающих противовирусным профилем. Это проявляется в повышении уровней IL-1 $\beta$ , CXCL8 и IFN I на ранних стадиях заболевания, а затем переключении на противовоспалительный ответ макрофагов M2 на стадии разрешения заболевания. В то же время, более старые животные, хоть и борются с вирусом, но имеют более высокую вирусную нагрузку в дыхательных путях и, как правило, у них развиваются более тяжелые формы заболевания [101].

По-видимому это связано с активацией Т-клеток и макрофагальным ответом M1 без своевременного перехода к фазе разрешения, опосредованной макрофагами M2. Устойчивый CXCL10, который секretируют эти макрофаги, действует как хемоаттрактант для моноцитов/макрофагов, NK-клеток и Т-клеток, вызывая провоспалительную активацию. Все это указывает на то, что тяжелая форма COVID-19 у людей может быть результатом стойкого ответа M1 без сдвига M2 [94].

Большую роль в патогенезе коронавирусной инфекции принято уделять цитокиновому ответу организма. Так было показано, что уровни IL-2, IL-7, IL-10, TNF- $\alpha$ , G-CSF, IP-10, MCP-1, MIP-1A были значительно выше у пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции по сравнению с легким течением болезни. В то время как IL-4, IL-10, IL-17 и TNF находились в пределах нормы [40].

Уровни TNF и IFN, в основном секрецируемыми Th1 и NK-клетками, существенно не отличались между пациентами с легким и тяжелым течением коронавирусной инфекции. Однако повышение уровня IL-6 наблюдалось более чем у 75% пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции [162].

Инфекция SARS-CoV-2 приводит к нарушению баланса между врожденным и адаптивным иммунитетом, что проявляется более ярко у пациентов с тяжелыми

симптомами. Легкая форма заболевания характеризуется активным адаптивным иммунным ответом с мобилизацией плазмобластов и CD8+ Т-клеток [22].

Однако при более тяжелом течении заболевания преобладает врожденный иммунитет, который вызывает выработку воспалительных цитокинов, таких как IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , и сопровождается лимфопенией, снижением уровня CD4+ и CD8+ Т-клеток [156].

У пациентов с тяжелым течением COVID-19 также отмечается повышенное количество незрелых форм нейтрофилов, что повышает риск повреждения тканей, подавления иммунитета, тромбоза и кровотечений. Также тяжелая инфекция SARS-CoV-2 вызывает значительное снижение числа CD4+ Т-клеток, сопровождающееся изменением субпопуляций Т-клеток с повышением соотношения наивных CD4 + Т-клеток к клеткам памяти и снижением популяции Т-регуляторных клеток, особенно тех, которые модулируют аллергические реакции и аутоиммунитет [168].

Кроме того, инфекция SARS-CoV-2 стимулирует различные подтипы Т-клеток, такие как Th1, Th2 и Th17, что приводит к выработке провоспалительных цитокинов, включая IL-17, IL-21, IL-22 и G-CSF. Изменения в Т-клетках сочетаются со снижением эволюции В-клеток в зародышевых центрах. Пациенты с тяжелым течением болезни также характеризуются повышенным количеством LAG3-позитивных Т-клеток, которые дополнительно снижают цитотоксические эффекты CD8+ Т-клеток и подавляют IFN-опосредованные ответы. Аномальные циркулирующие моноциты вырабатывают S100A8 и S100A9, которые запускают экстренный миелопоэз, подавляют нормальную функцию Т-клеток и задерживают элиминацию вируса. Повышенные уровни IFN- $\alpha$  также активируют NK-клетки, стимулируя интерферон-опосредованные ответы, которые могут привести к дисфункции и потере NK-клеток [156].

Новые данные показывают, что тяжелая форма COVID-19 может быть результатом нарушения иммунного ответа с задержкой элиминации вируса, а не

чрезмерной иммунной реакции и поствирусного цитокинового шторма, как предполагалось ранее [28].

Некоторые авторы, уделяют внимание нейтрофильным внеклеточным ловушкам (NETs) как одному из звеньев патогенеза коронавирусной инфекции. NETs представляют собой сложные трехмерные структуры, состоящие из распутанных нитей хроматина, способные улавливать и уничтожать патогены с помощью цитруллинированных гистонов, антимикробных белков и цитокинов, присутствующих в них. Нейтрофилы во время апоптоза высвобождают эти сети, которые способны захватывать и обезвреживать вирусы, посредством связи с антивирусными белками, что приводит к элиминации вирусных частиц из организма человека. Однако, образование этих ловушек может стать нерегулируемым и привести к повреждению клеток. Считается, что такая реакция может быть вызвана жизнеспособным SARS-CoV-2 и может являться одним из нескольких компонентов врожденного иммунитета, который повреждается при коронавирусной инфекции [154].

Пациенты с тяжелой формой COVID-19 имеют повышенное количество NETs в плазме, трахеальных аспиратах, легочной ткани и в артериальных тромбах по сравнению с тканями от пациентов, страдающих другими легочными заболеваниями, не связанными с SARS-CoV-2 [136].

### 1.3 Эндотелиальная дисфункция при COVID-19

Эндотелий является широко распространенным органом человеческого тела, играющим важную роль в поддержании гомеостаза тканей. Он вырабатывает различные вазоактивные молекулы, которые контролируют тонкий баланс между протромботическими и антитромботическими, пропролиферативными и антипролиферативными, а также провоспалительными и противовоспалительными реакциями. Физиологические функции эндотелия включают поддержание

целостности барьера, регуляцию сосудистого тонуса и гемостаза, а также поддержание противовоспалительного, антиоксидантного и антитромботического гомеостаза. Ключевым механизмом поддержания эндотелиального гомеостаза является оксид азота (NO), который является одним из наиболее важных сосудорасширяющих веществ. Он продуцируется сосудистым эндотелием под действием эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и нескольких кофакторов. Кроме того, NO обладает антитромботическим действием, предотвращая адгезию лейкоцитов и тромбоцитов к активированному эндотелию, тем самым ингибируя иммунотромбоз и развитие атеросклеротических бляшек [67].

Эндотелиальная дисфункция – это состояние, при котором снижается биодоступность оксида азота и увеличивается количество сосудосуживающих веществ, таких как эндотелин-1 (ET1), ангиотензин II (Ang II) и другие. Это частично происходит из-за снижения продукции оксида азота, а также из-за большого количества активных форм кислорода, которые инактивируют eNOS и вызывают ее ферментативное разобщение. Эндотелиальные клетки также могут противостоять активным формам кислорода, увеличивая экспрессию супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и гемооксигеназы-1. Современное определение эндотелиальной дисфункции включает в себя несколько клеточно-молекулярных и метаболомных изменений, в том числе окислительный стресс, воспаление, адгезию лейкоцитов, дисфункцию митохондрий, старение и нарушение регуляции метаболизма эндотелиальных клеток [180].

Эффект инфекции SARS-CoV-2 на сосуды частично обусловлен связыванием вируса с АПФ2, важным компонентом ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, который превращает вазоактивный AngII в Ang I. АПФ2 является первым идентифицированным рецептором, ответственным за проникновение SARS-CoV-2 в клетки хозяина, включая и эндотелиальные клетки. Анализ аутопсийных образцов легких и клеточных культур показал, что высокая экспрессия АПФ2, TMPRSS2 и дисэндотелиоз (эндотелиит в англоязычной литературе) были

обнаружены в капиллярах, но меньше в артериолах/венулах у пациентов с COVID-19 по сравнению с пациентами без COVID-19 [95].

Эндотелий в легких обычно имеет минимальный уровень экспрессии АПФ2. Однако с возрастом экспрессия этого маркера увеличивается [109].

Кроме того, CD209L/L-SIGN был идентифицирован как еще один рецептор, опосредующий проникновение SARS-CoV-2 в клетки человека. Механически L-SIGN взаимодействует с N-гликанами с высоким содержанием маннозы на рецептор-связывающем домене spike SARS-CoV-2 Ca<sup>2+</sup>-зависимым образом. Кроме того, удаление сайта N-гликозилирования в N92 L-SIGN усиливает связывание S-RBD с L-SIGN. Эти двойные функциональные механизмы предполагают важную роль L-SIGN в качестве молекулярного моста между АПФ2 и шиповидным белком SARS-CoV-2, позволяющим заразить пациентов вирусом. Таким образом, экспрессия АПФ2 в сосудах является гетерогенной и зависит от множества различных факторов [15, 98].

Существует множество морфологических данных подтверждающих прямую вирусную инфекцию эндотелиальных клеток. Так электронная микроскопия тканей почек, сердца, печени показывает наличие эндотелиита и вирусных частиц в эндотелиальных клетках и в моноцитах [159, 165, 170, 174].

В многочисленных сообщениях было отмечено, что вирус SARS-CoV-2 может вызывать глубокие функциональные изменения и повреждение эндотелиальных клеток через взаимодействие с шиповидным и нуклеокапсидным белками. Инфицирование шиповидным белком S1 может активировать эндотелий микрососудов легких человека, вызывая повышенную экспрессию прокоагулянтных белков и цитокинов/хемокинов. Также отмечено, что нуклеокапсидный белок SARS-CoV-2 может способствовать активации эндотелия через сигнальные пути TLR2/NF-κB и МАРК [102, 140].

В некоторых исследованиях все большую роль в развитии эндотелиита при COVID-19 отдают перицитам. Перициты и эндотелиальные клетки взаимодействуют между собой путем высвобождения медиаторов. Недавнее доказательство того, что перициты высоко экспрессируют АПФ2, предполагает, что эти клетки, вероятно, оказывают еще одно важное воздействие на эндотелий, регулируя баланс между Ang II и Ang I-VII. Инфекция перицитов SARS-CoV-2 приводит к внутреннему цитоплазматическому поглощению АПФ2 и в конечном итоге к гибели клеток. Потеря поверхностного АПФ2 сдвигнет гуморальный баланс в сторону эффектов Ang II. Инфекция перицитов дополнитель но повреждает и эндотелиальный барьер, приводя к увеличению микроциркуляционной проницаемости и к облегчению миграции воспалительных клеток из кровотока. Более того, перициты могут вызвать тромбоз посредством выделения тканевого фактора из инфицированных перицитов. Сокращение вазоактивных перицитов может уменьшать капиллярный поток, способствуя длительной ишемии и в ряде случаев способствовать развитию некрозов ткани [29, 146].

Также по данным литературы высокие уровни IL-6, TNF- $\alpha$ , ICAM-1 и каспазы-1 были обнаружены в тканях легких пациентов с COVID-19. Кроме того, при инфицировании SARS-CoV-2 микрососудах головного мозга человека было выявлено повышение экспрессии маркеров активации эндотелия, таких как RELB (субъединица p50) и TNF- $\alpha$ .

Эти данные указывают на развитие гипервоспаления в тканях инфицированных SARS-CoV-2, которое приводит к повреждению и гибели эндотелиальных клеток (например, посредством пироптоза) [124, 166].

Также при локальном гипервоспалении возможны нарушения в структуре гликокаликса эндотелиальных клеток, что приводит к эндотелииту и его последствиям, таким как тромбозы, артериальная гипертензия, острая респираторная недостаточность, острое повреждение почек и др. [160, 181].

Развитие цитокинового шторма при коронавирусной инфекции может способствовать увеличению эндотелиальной проницаемости. Есть литературные данные о том, что дисбаланс цитокинов способен приводить к утрате целостности различных типов соединительных белков, включая VE-кадгерин, ZO-1,  $\beta$ -катенин и белки щелевых контактов. Кроме того, инфекция SARS-CoV-2 приводит к снижению экспрессии белков плотных контактов ZO-1, occluding и claudin 5 и к развитию гиперпроницаемости гистогематических барьеров, последствием чего является экстравазация воспалительных и иммунных клеточных инфильтратов [142, 182].

Кроме того, инфицирование эндотелия SARS-CoV-2 приводит к высвобождению и проангиогенных факторов. Так по данным литературы в тканях легких пациентов с COVID-19 наблюдался значительно более высокий уровень ангиогенеза по сравнению с пациентами с гриппом, а исследование плазмы пациентов с коронавирусной инфекцией выявило повышенные уровни VEGF-A [10, 137].

Эндотелиальное старение также считается важным аспектом эндотелиальной дисфункции. Клеточное старение является первичной реакцией на стресс в инфицированных вирусом эндотелиальных клетках. Как и другие типы клеточного старения, вирус-индукционное старение связано с секреторным фенотипом, ассоциированным со старением (SASP), о чем свидетельствует повышенная секреция провоспалительных цитокинов, прокоагуляционных факторов и VEGF. Повышенный уровень VEGF у стареющего эндотелия является мощным триггером ангиогенеза в тканях пациентов с COVID-19 [114].

Тромботические осложнения, такие как тромбоэмболия лёгочной артерии, венозная тромбоэмболия, инсульт и инфаркт миокарда, нередко встречаются при COVID-19. Эти осложнения связаны с активацией системы свертывания крови, патогенез которой не до конца изучен, но, вероятно, связан с цитокиновым штормом и нарушением регуляции иммунного ответа. Наряду с гиперкоагуляцией

и эндотелиальной дисфункцией, неподвижность критически больных пациентов и связанный с ней венозный застой усугубляют риск венозного тромбоза [24, 171].

Митохондриальная дисфункция в эндотелиальных клетках может возникнуть на фоне вирусной инфекции, и инфекция SARS-CoV-2 не является исключением. Недавнее исследование показало, что COVID-19 вызывает выработку супероксидных анионов и высвобождение митохондриальной ДНК (мтДНК), что приводит к активации TLR9 и NF-B, ответственных за экспрессию воспалительных генов [51].

Другое исследование показало, что инфекция SARS-CoV-2 в микрососудистых эндотелиальных клетках головного мозга человека увеличивает секрецию ангиогенных факторов и изменяет митохондриальную динамику, в том числе увеличивает экспрессию митофузина-2, ответственного за поддержание митохондриальной архитектуры, метаболизма и передачи сигналов [168].

Недавние исследования показали, что активация комплемента связана с воспалением, повреждением эндотелия, гиперкоагуляцией и тромбозом, вызванными инфекцией SARS-CoV-2. У пациентов с тяжелой формой COVID-19 был обнаружен повышенный уровень С3а, что индуцировало активацию CD16 + цитотоксических Т-клеток и способствовало повреждению эндотелия и высвобождению хемоаттрактантных белков моноцитов [108].

Остается выяснить, участвуют ли другие механизмы в патогенезе ангиопатии при коронавирусной инфекции, такие как длинные некодирующие РНК, кольцевые РНК, метилирование РНК, сопутствующая микробиота, метаболомные изменения и механизмы эпигенетической памяти [149].

## 1.4 Повреждение миокарда при коронавирусной инфекции

С самых первых дней начала пандемии новой коронавирусной инфекции, стало отчетливо заметно, что увеличение уровня сердечных биомаркеров, таких как сердечный тропонин и натрийуретические пептиды у пациентов ассоциировано с тяжелым течением инфекции и неблагоприятным прогнозом [31].

Несмотря на то, что ранние рекомендации различных кардиологических сообществ предлагали ограничить тестирование сердечных биомаркеров на фоне острого течения COVID-19, множество медицинских учреждений продолжали использовать биомаркеры повреждения миокарда как простой и экономически выгодный метод для определения риска развития острых коронарных событий и прогрессирования синдрома сердечной недостаточности у госпитализированных пациентов [42].

Частота повреждения миокарда среди госпитализированных пациентов с COVID-19 значительно варьирует, находясь в широких пределах от 13% до 41% и часто сопровождается высокой смертностью от сердечно-сосудистых осложнений [71]. Несмотря на это, частота развития миокардитов остается плохо изученной и неопределенной, согласно данным текущих научных публикаций [175].

По данным литературы инфекция SARS-CoV-2 может как непосредственно участвовать в развитии сердечно-сосудистых осложнений, так и косвенно повреждать миокард [59]. Ведущими осложнениями коронавирусной инфекции со стороны сердечно-сосудистой системы принято считать острый коронарный синдром, декомпенсацию сердечной недостаточности, возникновение аритмий и кардиогенного шока, а также тромботические осложнения [48].

Морфологические признаки повреждения миокарда при коронавирусной инфекции в настоящее время изучено недостаточно, однако мы уже имеем ряд предполагаемых механизмов, реализация которых способна вызвать альтерацию

ткани миокарда. В некоторых источниках литературы описывается прямое повреждение кардиомиоцитов вирусом SARS-CoV-2 которое трактуется как миокардит, связанный с вирусной инфекцией [13, 43]. Также было опубликовано несколько исследований, свидетельствующих о фульминантном миокардите у пациентов с COVID-19 [86, 188]. В этих исследованиях предполагается, что прямая инфекция миокарда опосредуется через взаимодействие вируса с рецептором АПФ2. Более того, в *in-vitro* исследовании доказали, что SARS-CoV-2 напрямую может вызывать апоптоз кардиомиоцитов [150].

Тем не менее, патофизиология прямого повреждения кардиомиоцитов коронавирусом на сегодняшний день не ясна. Несмотря на то, что в одном исследовании были обнаружены частицы вирусного генома в кардиомиоцитах [88], большинство авторов сходятся во мнении, что SARS-CoV-2 находится внутри макрофагов или в интерстициальных клетках, а способность вируса поражать кардиомиоциты сомнительна [91, 105].

Также многие исследователи сходятся на том, что SARS-CoV-2 может вызывать повреждение эндотелиальных клеток и приводить к нарушению кровотока, к образованию тромбов в повреждённых сосудах. В аутопсийном исследовании пациентов умерших от COVID-19 были обнаружены отложения фибрина и активация терминальной части каскада комплемента, что подтверждало наличие воспаления эндотелия [77].

Гиперкоагуляция и воспаление могут привести к ишемии миокарда, вызванной тромботическим событием (инфаркт миокарда I типа) или из-за несоответствия между снабжением миокарда кислородом и его потребностью (инфаркт миокарда II типа). По данным литературы, у пациентов с анамнезом сердечно-сосудистых заболеваний, выше риск ишемии миокарда во время вирусных инфекций, чем у пациентов без сердечно-сосудистых заболеваний [111].

В различных исследованиях было показано, что системное воспаление может вызывать повреждение миокарда, не связанное с прямой вирусной инфильтрацией

кардиомиоцитов, что указывает на связь между повреждением миокарда и цитокиновым штормом. Среди всех цитокинов, IL-6 занимает важное место при COVID-19, не только благодаря своему стимулирующему действию во время цитокинового шторма, но и благодаря своим сердечно-сосудистым эффектам [132].

Некоторые исследования показали, что IL-6 вызывает сердечную дисфункцию путем снижения сократительной способности папиллярных мышц. Кроме того, IL-6 связан с возникновением аритмий, более высокими уровнями биомаркеров повреждения миокарда, сердечным фиброзом, легочной гипертензией [57, 163].

Воспаление, эндотелиальная дисфункция, ишемия и прямое повреждение миокарда - это основные структурные изменения, которые обычно возникают у пациентов с COVID-19 и могут приводить к развитию сердечных аритмий и к удлинению интервала QT. Наиболее частой аритмии, которая наблюдается у пациентов с COVID-19, является синусовая тахикардия, которая, вероятно, связана с различными факторами (гипоперфузия, гипоксия, лихорадка и др.). Второй наиболее частой аритмии является фибрилляция предсердий, которая встречается у 10-14% госпитализированных пациентов и у 22% пациентов с COVID-19 в критическом состоянии. Фибрилляция предсердий является независимым предиктором тяжести повреждения миокарда и неблагоприятных исходов у пациентов с COVID-19 [9, 23].

Желудочковые аритмии также возникают у пациентов с COVID-19. По данным литературы их частота находится в диапазоне 6% госпитализированных пациентов, что аналогично частоте желудочковых нарушений при инфекции гриппа [63].

## 1.5 Миокардит при коронавирусной инфекции

С самого начала пандемии коронавирусной инфекции были высказаны опасения о возможном развитии миокардита у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2. Несмотря на множество публикаций, которые свидетельствуют о возникновении миокардита у пациентов с COVID-19, в настоящее время прямая этиологическая роль коронавируса не доказана. Большинство исследований, описывающих поражение сердечной мышцы у пациентов с COVID-19, основаны на данных эхокардиографии и МРТ, и часто не учитывают другие возможные причины развития миокардита. Распространенность миокардита среди госпитализированных пациентов с COVID-19 значительно варьировалась в зависимости от критериев, используемых для диагностики разными авторами. Так по данным одного из первых исследований частоты и роли миокардита при коронавирусной инфекции по данным историй болезни было выявлено, что из 718 365 пациентов с COVID-19 у 35 820 (5,0%) развился впервые возникший миокардит и у 10 706 (1,5%) развился впервые возникший перикардит [30].

Однако более поздние исследования с использованием МРТ сердца и эндомиокардиальных биопсий сообщают о распространенности миокардита при коронавирусной инфекции в 0,15-0,45% [26, 167].

По данным многоцентрового исследования Ammirati E. и др. средняя распространенность миокардита составила 2,4 случая на 1000 госпитализированных пациентов с COVID-19 при учете определенных/вероятных случаев миокардита и 4,1 случая на 1000 при учете возможных случаев миокардита. 57% пациентов с миокардитом не имели значительного повреждения легких, вызванного COVID-19. Фульминантный миокардит был выявлен в 38,9% исследуемой популяции (среди пациентов с миокардитом). Пациенты с коронавирусной пневмонией и миокардитом имели большую вероятность развития

гемодинамической нестабильности и потребности в поддержке дыхания и кровообращения [14].

Важно отметить, что несмотря на многочисленные исследования, до сих пор неясно, вызывает ли SARS-CoV-2 миокардит, поскольку некоторые исследователи не обнаруживали геномы SARS-CoV-2 с помощью RT-qPCR в миокарде пациентов [113].

В исследовании Dal Ferro M. и др была произведена оценка воспалительного инфильтрата в миокарде пациентов, умерших от коронавирусной инфекции. Лимфоцитарный перикардит легкой и средней степени тяжести был выявлен примерно в одной трети случаев. Активный лимфоцитарный миокардит был диагностирован только в одном случае ( $n=314$ ), а одиночные или множественные очаги локализованного миокардита были характерны для двух образцов ( $n=354$ ) с разным преобладанием лимфоцитов CD4, CD8 и CD16. У всех пациентов с повышением высокочувствительного сердечного тропонина при поступлении ( $n=19$ ) было выявлено среднетяжелое и тяжелое поражение миокарда, включающее некрозы кардиомиоцитов, апоптоз, утрату поперечной исчерченности и фиброз. Однако у подавляющего большинства пациентов ( $n=15$ ) не было выявлено воспалительного инфильтрата в строме миокарда, в то время как у остальных четырех пациентов был выявлен легкий перикардит. В то же время анализ ОТ-ПЦР не выявил присутствия вирусного генома ни в одном из исследуемых образцов, хотя на редких клетках (макрофаги, эндотелиальные клетки и перициты) была выявлена имmunогистохимическая экспрессия spike protein SARS-CoV-2. Авторы исследования пришли к выводу, что гистологические изменения сердца могут быть вызваны разными причинами и являются неспецифическими. Почти у половины включенных в исследование пациентов были выраженные нарушения дыхательной функции и системная гипоксия. В результате этого возникает острая “гипоксическая кардиомиопатия”, которая может привести к некрозу и апоптозу, учитывая наличие выделения большого количества вирус-индукционных проапоптотических хемокинов. Также было

обнаружено, что вирусная диссеминация во время виремии может вызвать транзиторный тромбоз микрососудов и способствовать повреждению и некрозу миокарда [53].

Также при ультраструктурном исследовании миокарда не получено согласованных сведений по данным литературы, так как надёжное обнаружение вирионов SARS-CoV-2 с помощью электронной микроскопии (ЭМ) осложняется структурным сходством между вирионами и внутриклеточными компонентами клеток. Также остаётся неясным может ли SARS-CoV-2 вызывать продуктивное инфицирование кардиомиоцитов или же он может находиться в мышечном волокне только транзиторно. Так в исследовании Bulfamante G.P. и др. показана возможность присутствия вирионов SARS-CoV-2 в миокарде умерших пациентов без какой-либо клинической патологии и гистологически подтверждённого миокардита. В этом исследовании вирусная РНК была обнаружена методом цифровой ПЦР во всех образцах сердца COVID-19, а иммуногистохимия с использованием антитела к нуклеокапсидному белку коронавируса выявила экспрессию как в саркоплазме некоторых кардиомиоцитов так и в интерстициальных клетках миокарда. Однако кардиомиоциты с экспрессией нуклеокапсидного белка SARS-CoV-2 не имели никаких морфологических признаков повреждения. Ультраструктурное исследование ткани миокарда выявило во внутриклеточном пространстве между саркомерами и сарколеммой кардиомиоцитов одиночные и/или сгруппированные сферические частицы диаметром около 130 нм с электронно-плотной периферией, характеризующейся коронообразными небольшими внешними выступами и морфологией, совместимой с SARS-CoV-2 [32].

## 1.6 Постострый коронавирусный синдром

Несмотря на то, что на сегодняшний день мы видим значимое снижение заболеваемости и смертности от COVID-19, на первый план выходят осложнения от перенесённой коронавирусной инфекции. Хотя большинство людей имеют полное клиническое выздоровление и возвращаются к обычной жизни в течение первых 1-4 недель от начала болезни, некоторые пациенты испытывают долгосрочные проявления, требующие дополнительного внимания и изучения. Сохранение симптомов болезни или появление новых признаков заболевания после 4 недель от начала симптомов коронавирусной инфекции принято называть постострым коронавирусным синдромом (PASC) [138].

PASC был впервые описан весной 2020 года в контексте исследования длительных симптомов COVID-19, проведенного группой ученых на основе мультицентрового опросного исследования пациентов [145]. Распространенность PASC по данным некоторых исследований оценивается в 10% от выживших пациентов [79].

Критериями диагноза PASC является наличие 1 и более стойких клинических симптомов из symptomокомплекса PASC, которые не могли бы быть объяснены сопутствующей патологией пациента. Симптомокомплекс включает стойкую усталость, боли в мышцах и суставах, снижение толерантности к физическим нагрузкам, сохранение субфебрилитета, одышку, сердцебиение, чувство “замирания” сердца, внезапные обмороки, кашель, боль в груди, нарушение сна, депрессию, диффузную алопецию, продолжительную утрату вкуса и запаха, высыпания на коже различного характера [125, 129].

Согласно принятым критериям Медицинского центра Университета Цинциннати, определяющим характеристики длительного синдрома COVID-19 (постострого коронавирусного синдрома), существует пять различных категорий,

которые основываются на разных аспектах начальных симптомов, времени появления симптомов, продолжительности и периоде восстановления.

- Тип 1 включает пациентов, у которых продолжительность выздоровления зависит от тяжести острой инфекции, наличия органных осложнений и сопутствующих заболеваний.
- Тип 2 характеризуется симптомами, сохраняющимися в течение 6-ти недель после начала болезни.
- Тип 3 характеризуется периодом ремиссии или почти полным выздоровлением, за которым следует рецидив симптомов, продолжающихся не менее 3-ёх (3А) или не менее 6-ти (3В) месяцев.
- Тип 4 относится к пациентам, которые изначально не имеют симптомов при положительном teste на SARS-CoV-2, но затем симптомы дебютируют через 1-3 месяца (4А) или, по крайней мере, через 3 и более месяца (4В).
- Тип 5 включает пациентов, у которых при острой форме инфекции отсутствуют симптомы или они минимальны, но которые умирают в течение следующих 12 месяцев [21].

Несколько другую классификацию PASC предложили Amenta E.V., так постострые проявления COVID-19 были разделены на три категории. Важно отметить, что первые две категории не являются взаимоисключающими:

- Остаточные симптомы, которые продолжаются после выздоровления от острой инфекции.
- Органная дисфункция, которая сохраняется после первоначального выздоровления.
- Новые симптомы или синдромы, которые развиваются после начальной бессимптомной или легкой инфекции [12].

Кроме того, Fernández-de-Las-Peñas C. и др. рассмотрели невыявленные случаи PASC и предложили следующую временную классификацию: симптомы, потенциально связанные с инфекцией (до 4–5 недель); острые пост-COVID-симптомы (с 5-й по 12-ю неделю); длительные пост-COVID-симптомы (с 12-й до 24-й недели); стойкие пост-COVID-симптомы (продолжающиеся более 24 недель) [65].

Одними из ведущих проявлений постострого коронавирусного синдрома являются поражение дыхательной и сердечно-сосудистой систем. По результатам многоцентрового исследования Kotecha T. и др. у выздоровевших пациентов с COVID-19, повреждение миокарда было обнаружено приблизительно в 50% случаев. Авторы выделяют три основных паттерна повреждения миокарда: миокардит, ишемическая патология и неишемический неспецифический рубец; у 6% больных была выявлена сочетанная патология. Глобальных функциональных желудочковых последствий в виде значимого снижения фракции выброса и TAPSE обнаружено не было [99].

В противоположность этому в недавнем немецком исследовании, проведенном на выздоровевших пациентах с COVID-19, были выявлены сердечные аномалии у 78% пациентов, включая снижение фракции выброса левого желудочка и более высокие объемы левого желудочка. Более того, эндомиокардиальная биопсия у пациентов с поражением сердца, выявленным по МРТ, показала активное лимфоцитарное воспаление. Также по данным МРТ сердца выздоровевших пациентов от COVID-19 были обнаружены изменения, которые могут стать причиной возникновения будущих аритмий или прогрессирования сердечной недостаточности. Наблюдаемые аномалии включали снижение фракции выброса левого желудочка и более высокие объемы левого желудочка [139].

Морфологические изменения в миокарде у пациентов в постостром периоде коронавирусной инфекции остаются недостаточно изученными. В настоящее время, нет достаточного количества масштабных исследований на эту тему, и

основная информация о состоянии миокарда при постостром коронавирусном синдроме базируется лишь на описаниях отдельных клинических случаев. Большинство описанных морфологических изменений выявлены по данным МРТ-исследований, которые не всегда обеспечивают возможность получения детальной картины морфологических изменений миокарда в постостром периоде коронавирусной инфекции.

Таким образом, анализ литературы показал, что в настоящее время клинические и морфологические представления о изменениях в миокарде в остром и в постостром периодах коронавирусной инфекции вызывают некоторые споры и разногласия, а объём изученных данных еще не достаточен для формирования точных и высокодоказательных выводов.

Морфологические изменения в миокарде у пациентов с PASC остаются недостаточно изученными. В настоящее время нет адекватных исследований на эту тему, а основная информация базируется лишь на описаниях отдельных клинических случаев. Большинство изменений выявлены по данным МРТ и эхокардиографии, которые не всегда соответствуют действительной гистологической картине.

## Глава 2. Материалы и методы исследования

### 2.1 Дизайн исследования

Данная работа представляет собой поперечное ретроспективное исследование. Работа разделена на две части: 1) аутопсийное исследование сердца пациентов, умерших от острого респираторного дистресс-синдрома при COVID-19; 2) исследование эндомиокардиальных биопсий в постострому периоде коронавирусной инфекции и дополнительное исследование биопсийного, операционного и секционного материала при трансплантации сердца пациентов, перенесших трансплантацию во время пандемии коронавирусной инфекции.

#### 2.1.1 Аутопсийное исследование

В исследование включена группа пациентов с подтверждённой коронавирусной инфекцией при жизни и посмертно от 4-ёх волн коронавирусной инфекции ( $n=276$ ), которым проводилось стационарное лечение в центре Алмазова.

Для этих пациентов были проанализированы клинические, лабораторные и инструментальные данные обследования, проведено стандартное гистологическое исследование не менее чем 2-ух образцов миокарда для каждого случая. В случае подозрения на миокардит было выполнено имmunогистохимическое исследование ткани миокарда с антителами к CD3 (кроличье поликлональное антитело, DAKO, Nottingham, Великобритания; разведение 1:100), CD45 (мышиное моноклональное антитело, клон 2B11e+PD7/26; DAKO, Nottingham, Великобритания; разведение 1:400), CD8 (мышиное моноклональное антитело, клон 1A5; Leica Biosystems, Великобритания; разведение 1:20), CD68 (мышиное моноклональное антитело, клон PG-M1; DAKO, Carpinteria, CA, США; разведение 1:25), CD34 (мышиное

моноклональное антитело, клон QBEnd/10; DAKO, Великобритания; разведение 1:50), Ang1 (кроличье поликлональное антитело, Abnova, Walnut, США; разведение 1:50), VWF (мышиное моноклональное антитело, клон F8/86; RTU; Diagnostic BioSystems, Slough, Великобритания; разведение 1:50), VEGF (мышиное моноклональное антитело, клон VG1; Diagnostic BioSystems, Slough, Великобритания; разведение 1:50), HLA-DR (мышиное моноклональное антитело, клон LN3; Leica, США; разведение 1:150), MHC1 (мышиное моноклональное антитело, клон EMR8-5; Abcam, Waltham, MA, США; разведение 1:1000), C1q (кроличье поликлональное антитело, Diagnostic BioSystems, Slough, Великобритания; разведение 1:100), VP1 EntV (мышиное моноклональное антитело, клон 5-D8/1; DAKO; Великобритания; разведение 1:25), и Spike SARS-CoV-2 (кроличье поликлональное антитело; Genetex, Hsinchu City, Тайвань; разведение 1:100).

Иммунофлуоресцентную микроскопию (ИФ) проводили на парафиновых срезах миокарда трех пациентов с миокардитом, в случаях где с помощью ИГХ была подтверждена экспрессия VP1 EntV и spike SARS-CoV-2 со следующим коктейлем антител: VP1 EntV / spike SARS-CoV-2 (антитела и разведения, как описано выше).

Электронная микроскопия была выполнена для 2-ух образцов миокарда пациентов IV волны коронавирусной инфекции. Материал был забран в первые 6 часов после смерти. Для каждого случая были приготовлены по 2 образца для электронной микроскопии и была произведена оценка не менее 60 полей зрения электронного микроскопа для каждого образца.

В образцах миокарда пациентов с подтвержденным иммуногистохимическим исследованием миокардитом ( $n=14$ ) содержание геномной РНК SARS-CoV-2 измерялось с использованием капельной цифровой полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (RT-ddPCR, двухэтапный).

Для верификации специфичности найденных изменений в миокарде были сформированы группы сравнения.

Группа сравнения 1 (n=15): сердца реципиентов после трансплантации сердца с некоронавирусным миокардитом и клинико-инструментальные данные обследования этих пациентов.

Группа сравнения 2 (n=10): сердца пациентов, умерших от острого респираторного дистресс синдрома до 2019 года.

Для всех случаев из групп сравнения было выполнено традиционное гистологическое исследование миокарда (не менее 2-ух образцов для каждого случая), для группы сравнения 1 также было выполнено иммуногистохимическое исследование с вышеописанными антителами.

### 2.1.2 Исследование эндомиокардиальных биопсий

В исследование включена группа пациентов с анамнезом перенесенной коронавирусной инфекцией у которых произошло появление и/или ухудшение симптомов кардиальной патологии, потребовавших проведение ЭМБ (n=38). Все пациенты клинически рассматривались как пациенты с предполагаемым миокардитом в PASC в соответствии с клиническими рекомендациями 2020 г (Таблица 1) [2].

Таблица 1 – Клинические критерии предполагаемого миокардита

Клинические проявления:	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Боли в грудной клетки, перикардит или клиника инфаркта миокарда</li> <li>– Недавно возникшая сердечная недостаточность (до 3 месяцев)</li> <li>– Клиника сердечной недостаточности более 3 месяцев</li> <li>– Аритмия, синкопальные состояния или внезапная смерть, причины которых не установлены</li> <li>– Кардиогенный шок, причина которого неясна</li> </ul>
Диагностические критерии:	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Особенности электрокардиографии;</li> <li>– Повышение уровня кардиоэнзимов;</li> <li>– Региональные и глобальные нарушения сократительной способности миокарда по эхокардиографическим данным или по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ)</li> <li>– МРТ-критерии Лейк-Луиза</li> </ul>
<p>Диагноз миокардита возможен, если <math>\geq 1</math> клинический + <math>\geq 1</math> диагностический критерии, при отсутствии значимого поражения коронарного русла и/или известного ранее существующего сердечно-сосудистого заболевания. Если пациент не имеет симптомов, должно быть выполнено <math>\geq 2</math> диагностических критериев</p>	

Для этих пациентов были проанализированы клинические, лабораторные и инструментальные данные обследования, проведено стандартное гистологическое исследование ЭМБ. В связи с небольшим объемом биоптатов, количество оцениваемых полей зрения было от 3 до 5. Для всех пациентов также было выполнено имmunогистохимическое исследование ткани миокарда с антителами к CD3, CD45, VP1 EntV, HLA-DR. Для 22 пациентов дополнительно было выполнено иммуногистохимическое исследование с антителами к CD68, Ang1, VWF, VEGF,

MHC1, C1q, и Spike SARS-CoV-2 (антитела и разведения, как описано выше). Для 10 пациентов было проведено иммуногистохимическое исследование ткани миокарда с антителами к CD80 (мышиное моноклональное антитело, клон 2D10.4; Thermo Fisher Scientific; США; разведение 1:100), CD163 (кроличье моноклональное антитело, клон EPR19518; Abcam, Великобритания; разведение 1:100), АПФ2 (мышиное поликлональное антитело; Abnova, Walnut, США; разведение 1:50), CD16 (мышиное моноклональное антитело, клон SP175; Abcam, Великобритания; разведение 1:50).

Иммунофлуоресцентную микроскопию (ИФ) проводили на парафиновых срезах миокарда двух пациентов, в случаях где с помощью ИГХ была подтверждена экспрессия spike SARS-CoV-2 со следующими коктейлями антител: CD16 / Spike SARS-CoV-2, CD80 / CD163, CD68 / spike SARS-CoV-2 (антитела и разведения, как описано выше).

В образцах миокарда пациентов с высокой иммуногистохимической экспрессией spike SARS-CoV-2 ( $n=6$ ) содержание геномной РНК SARS-CoV-2 измерялось с использованием капельной цифровой полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (RT-ddPCR, двухэтапный).

Для верификации специфичности найденных изменений в миокарде были сформирована группа сравнения.

Группа сравнения 3 ( $n=42$ ): пациенты с появлением симптомов кардиальной патологии, потребовавших проведение ЭМБ до 2019 года. Всем пациентам из этой группы было проведено традиционное гистологическое исследование и иммуногистохимическое исследование с антителами к CD3, CD45, CD68, Ang1, VWF, VEGF, HLA-DR, MHC1, C1q, VP1 EntV, АПФ2 и spike SARS-CoV-2 (антитела и разведения, как описано выше).

### 2.1.3 Исследование биопсийного, операционного и секционного материала при трансплантации сердца

В исследование включена группа пациентов ( $n=15$ ) с трансплантацией сердца (ТС) во время пандемии коронавирусной инфекции от COVID-19-негативных доноров сердца. Также отдельно описан случай трансплантации сердца с атипичным кризом гуморального отторжения трансплантата на фоне персистенции антигенов коронавируса в ткани миокарда. Для этих пациентов были проанализированы клинические, лабораторные и инструментальные данные обследования, проведено стандартное гистологическое исследование ЭМБ и материала эксплантированных сердец, а для секционного случая – дополнительно аутопсийного материала. В связи с небольшим объемом биоптатов, количество оцениваемых полей зрения было от 3 до 5. Для всех пациентов также было выполнено иммуногистохимическое исследование ткани миокарда с антителами к CD68 и spike SARS-CoV-2, для секционного случая дополнительно проводилось иммуногистохимическое исследование с антителами к CD16, C1q, HLA-DR, CD3 (антитела и разведения, как описано выше).

Электронная микроскопия была выполнена для 1-го образца. Материал был забран прижизненно, в течение 5-ти минут после забора был помещен в фиксирующий раствор. Для оценки приготовлены по 2 образца для электронной микроскопии и выполнено исследование не менее 40 полей зрения электронного микроскопа для каждого образца.

Количественная характеристика объема проведенного диссертационного исследования составила 21942 измерения. Подробное количественное описание измерений указано ниже (Таблица 2 и 3).

Таблица 2 – Количественная характеристика оценки данных из историй болезни

Количество наблюдений	Аутопсийное исследование	Исследование эндомиокардиальных биопсий	Исследование материала при трансплантации сердца
Данные анамнеза заболевания	291	38	16
Данные анамнеза жизни	291	38	16
Данные эпидемиологического анамнеза	291	38	16
Данные КТ лёгких	276	38	0
Данные эхокардиографии	291	38	16
Данные ЭКГ	276	38	16
Уровень сывороточного тропонина I	291	38	16
Уровень С-реактивного белка	276	38	16
Уровень прокальцитонина	276	38	16
Уровень D-димера	276	38	16

Таблица 2 (продолжение) – Количественная характеристика оценки данных из историй болезни

Количество наблюдений	Аутопсийное исследование	Исследование эндомиокардиальных биопсий	Исследование материала при трансплантации сердца
Параметры клинического анализа крови, включая лейкоцитарную формулу	276	38	16
ПЦР-исследование образцов эндомиокардиальных биопсий на кардиотропные вирусы	0	16	2
Итого	3111	434	162
Суммарно количественная оценка данных историй болезни	3707		

Таблица 3 – Количественная характеристика морфометрических методов исследования

Количество наблюдений	Аутопсийное исследование	Исследование эндомиокардиальных биопсий	Исследование материала при трансплантации сердца
Количество срезов для гистологического исследования	1242	38	25
Количество полей зрения	12420	114	145
Гистологическое исследование препаратов, окрашенных по Ван Гизону	45	38	25
Количество полей зрения	450	114	145
Количество срезов для иммуногистохимического исследования	348	297	18
Количество полей зрения	3480	891	75
Количество срезов для иммунофлюоресцентного исследования	3	6	0
Количество полей зрения	30	30	0

Таблица 3 (продолжение) – Количественная характеристика морфометрических методов исследования

Количество наблюдений	Аутопсийное исследование	Исследование эндомиокардиальных биопсий	Исследование материала при трансплантации сердца
Количество срезов для ультраструктурного исследования	4	0	2
Количество полей зрения	240	0	80
ПЦР-исследование	14	5	2
Итого	16634	1154	447
Суммарно морфометрических исследований		18235	

Общий дизайн диссертационного исследования представлен на Рисунке 1.

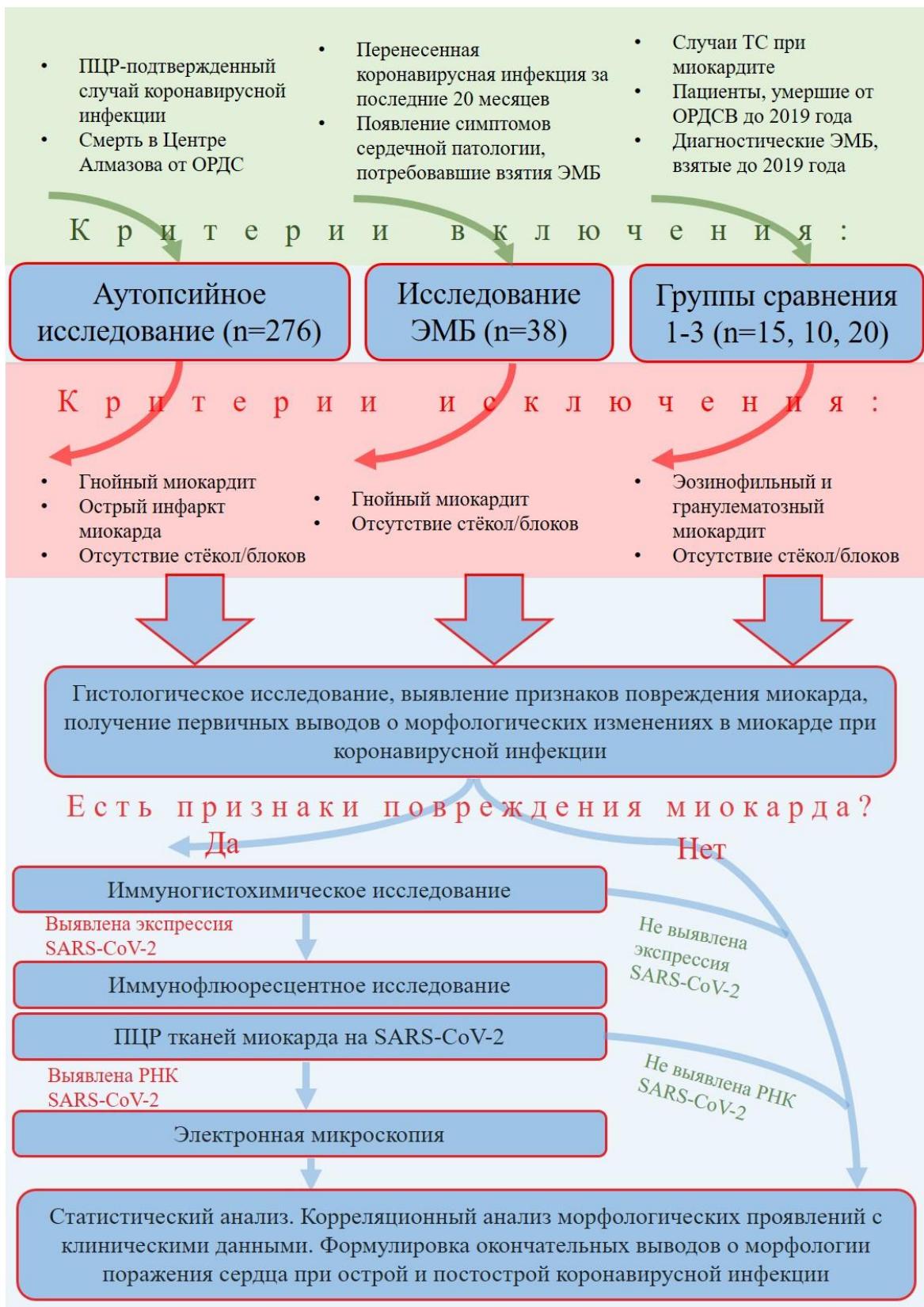


Рисунок 1 – Дизайн исследования

## 2.2 Гистологическое исследование

Материал был фиксирован в 10% забуференном формалине в течение 24 часов. Затем производилась промывка и обезвоживание материала в несколько этапов с использованием изопропилового спирта различной концентрации (IsoPrep, БиоВитрум, Россия) с использованием гистопроцессора Leica TP1020 при +60°C.

Затем материал заливался парафином с использованием заливочной станции Leica EG1150H, и из него изготавливались срезы толщиной 2-3 микрона с помощью ротационного микротома Leica RM2125RT. Полученные срезы помещались на предварительно очищенные и обезжиренные предметные стекла, после чего высушивались в течение часа и депарафинизировались. Регидратация срезов производилась последовательными погружениями в ксиол, этанол и дистиллированную воду. Микропрепараты окрашивались гематоксилином и эозином с использованием гистостейнера Leica ST5020. Окрашивание пикрофуксином по методу Ван Гизона выполнялось с использованием реактивов фирмы БиоВитрум (Россия). Завершительное покрытие срезов осуществлялось с помощью аппарата Leica CV5030.

При гистологическом исследовании для аутопсийного материала было произведено изучение не менее 10 полей зрения и не менее 4 фрагментов миокарда для каждого включенного в исследование пациента; для биопсийного материала - не менее 3-4 полей зрения (в зависимости от объема материала). При гистологической оценке исследовались следующие изменения в ткани миокарда: некрозы, кровоизлияния, отёк, плазматическое пропитывание, спазм сосудов, тромбоз, набухание эндотелия, воспалительные инфильтраты в строме, фрагментация мышечных волокон, дистрофия мышечного волокна, утрата поперечной исчерченности, контрактуры, миоцитолиз, отложение амилоида, гликогена, железа в миокарде. В ЭМБ трансплантированных сердец исключался криз клеточного и гуморального отторжения, эффект Quilty. При исследовании

срезов окрашенных пикрофуксином по Ван Гизону оценивалась выраженность фиброза миокарда.

## 2.3 Иммуногистохимическое исследование и морфометрический анализ

После проведения депарафинизации и регидратации срезы подвергались обработке 3%-ной перекисью водорода в течение 5 минут и впоследствии промывались дистиллированной водой. Демаскировка антигенов осуществлялась путем подвергания срезов кипячению в растворе ЭДТА (рН 9,0) в водяной бане Thermo. После этой процедуры срезы промывали 2 раза в течение 5 минут в трис-буфере с добавлением Tween 20, после чего их инкубировали в 5%-ном бычьем сывороточном альбумине в течение 20 минут. Инкубация с первичными антителами длилась 18 часов, а с вторичными антителами – 30 минут. После завершения инкубации в антителах срезы дважды промывали в трис-буфере, содержащем Tween 20, по 5 минут на каждый раз. Затем микропрепараты окрашивались гематоксилином, промывались в дистиллированной воде и заключались под покровными стеклами.

Оценка экспрессии иммуногистохимических маркеров производилась с помощью микроскопа Leica DM 1000 (Япония) и на отсканированных гистологических препаратах с помощью гистосканера Aperio AT 2 (США). Экспрессия CD3, CD45, CD8, CD68, CD16, CD163, CD80 оценивалась как среднее значение позитивных клеток на 1 мм<sup>2</sup> ткани миокарда. С этой целью выполнялась оценка всех полей зрения гистологического среза с подсчетом суммарного количества позитивных клеток. Затем с помощью программы Aperio Image Scope вычислялась площадь всего среза препарата в мм<sup>2</sup> и производился перерасчет позитивных клеток на 1 мм<sup>2</sup>.

Экспрессия CD34, Ang1, VWF, VEGF, HLA-DR, MHC1, C1q, VP1 EntV, spike SARS-CoV-2, АПФ2 оценивалась в баллах отдельно по каждой локализации (если

применимо): в кардиомиоцитах, в сосудах, в эндотелии. Баллы экспрессии выставлялись следующим образом: 0 баллов при отсутствии экспрессии, 1 балл при экспрессии на 1-25% оцениваемых структур, 2 балла при экспрессии в 26-50% структур, 3 балла – 51-75% структур, 4 балла – экспрессия более 76% структур (Рисунок 2-4).

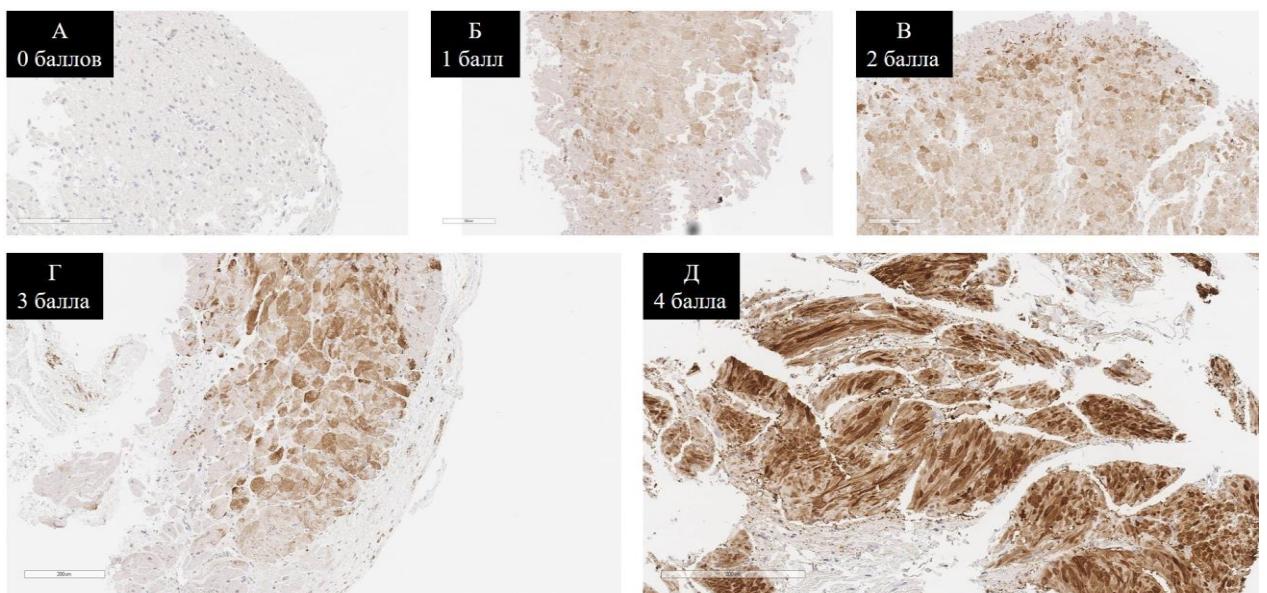


Рисунок 2 – Условная шкала оценки экспрессии маркеров в кардиомиоцитах на примере VP1-EntV

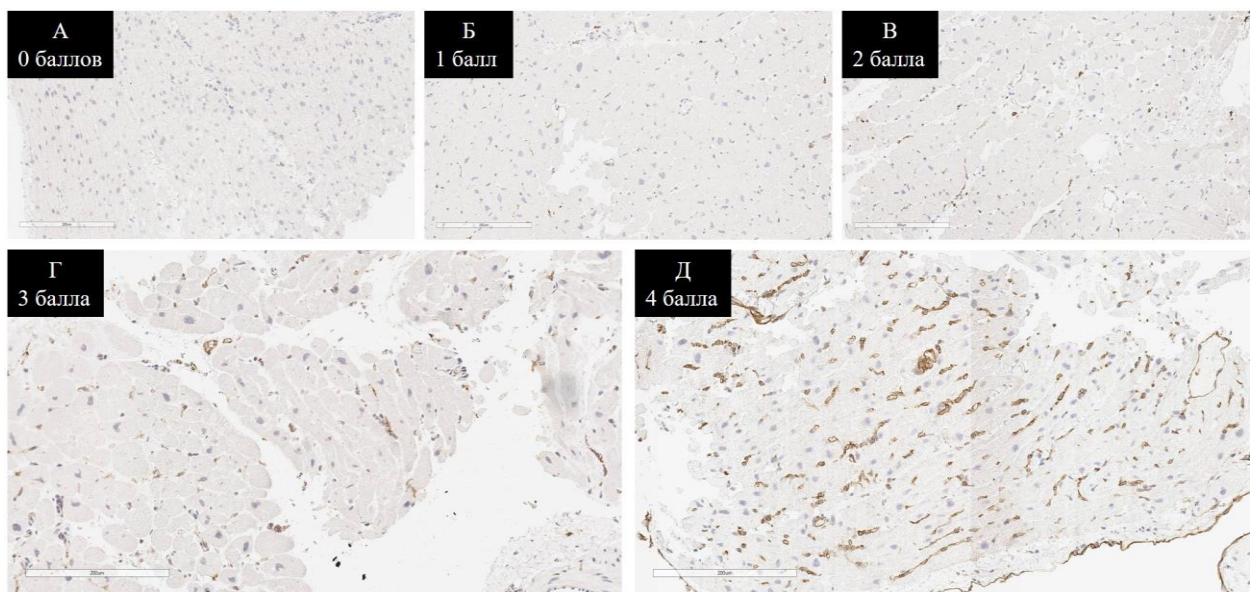


Рисунок 3 – Условная шкала оценки экспрессии маркеров на сосудах на примере HLA-DR

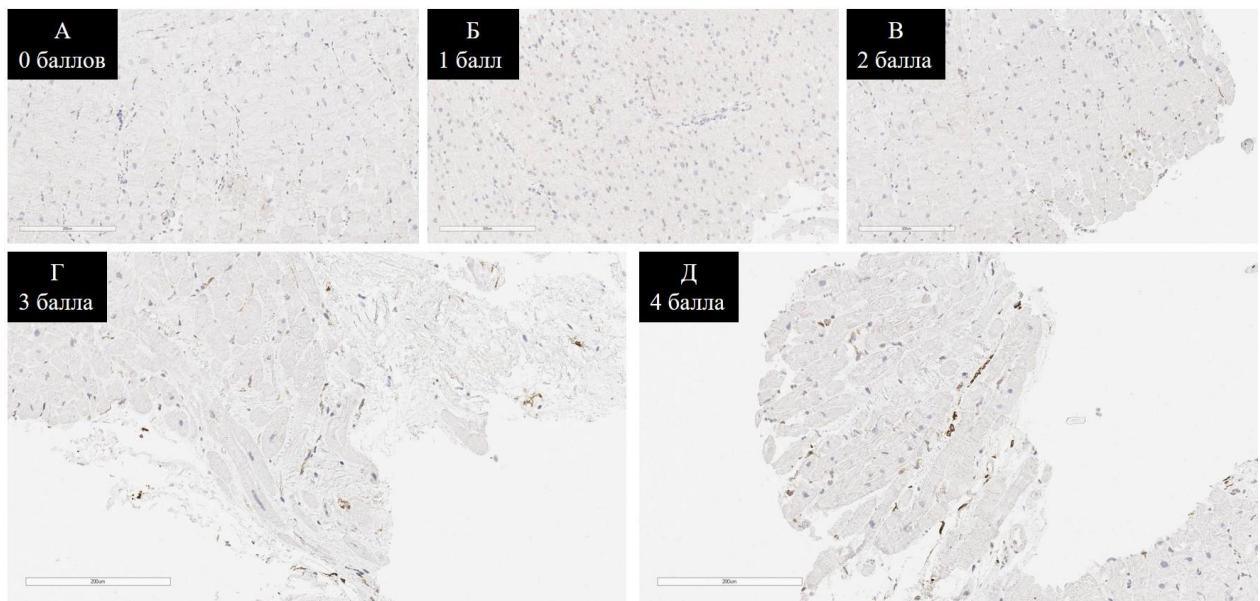


Рисунок 4 – Условная шкала оценки экспрессии маркеров на воспалительном инфильтрате на примере spike SARS-CoV-2

## 2.4 Иммунофлюоресцентное исследование

Для проведения исследования использовались депарафинизированные срезы толщиной в диапазоне от 4 до 10 микрон. Демаскировка антигенов осуществлялась в 0,01М цитратного буфера с pH 6,0, с последующей промывкой в Трис-буфере, содержащем Tween 20. Перед нанесением антител срезы инкубировали в блокирующей сыворотке в течение 30 минут, после чего производилась промывка. Использовались следующие сочетания первичных антител: spike SARS-CoV-2 и VP1-EntV, spike SARS-CoV-2 и CD68, spike SARS-CoV-2 и CD16, CD80 и CD163. Инкубация с первыми и вторыми первичными антителами проводилась при комнатной температуре и длилась по 1 часу, далее срезы промывались и производилась инкубация со вторичными антителами. Первые вторичные антитела – AlexaFluor 647® (Abcam, Великобритания), дававшие красную флюоресценцию; вторые вторичные антитела – AlexaFluor 488® (Abcam, Великобритания), дававшие зеленую флюоресценцию. После промывки образцы дополнительно окрашивали

DAPI (AppliChem, Германия) и заключали в среду DAKO. Микропрепараты исследовались с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B.

При оценке иммунофлюоресценции для коктейлей spike SARS-CoV-2 и VP1-EntV, spike SARS-CoV-2 и CD68, spike SARS-CoV-2 и CD16, spike SARS-CoV-2 и CD34 производился поиск колокализации этих маркеров на мемbrane клеток, а также поиск отдельно окрашенных клеток. При оценке иммунофлюоресценции для коктейлей CD80 и CD163 производилось количественное сравнение и выявление преобладания одного из типов клеток в ткани миокарда.

## 2.5 Электронная микроскопия

Материал для электронной микроскопии был забран посмертно в течение первых 6-ти часов после смерти в аутопсийной части исследования и прижизненно в исследовании эндомиокардиальных биопсий. Процесс фиксации образцов для микроскопии включал три последовательных этапа. На первом этапе образцы подвергались фиксации в 2,5% растворе глютарового альдегида в 0,1M фосфатном буфере (PBS) в течение 60 минут. Этот этап включал использование фрагментов миокарда размером не превышающим 1-2 мм в наибольшем измерении. Затем, кусочки вновь помещались в PBS на 30 минут. После этого образцы погружались в 1% раствор OsO<sub>4</sub> на 60 минут, за последующей 30-минутной промывкой в PBS.

После вышеописанных этапов обработки, материал подвергался дегидратации в ряде увеличивающихся концентраций этанола (30%, 50%, 70%, 96%) в течение 15 минут, с двумя промывками по 20 минут и двумя по 30 минут соответственно. Все эти процессы инкубации проводились при температуре +4°C. На третьем этапе, фрагменты подвергались последовательным этапам обработки, включая погружение в раствор спирта и ацетона в соотношении 1:1 на 30 минут, а затем в ацетон на 30 минут. Далее, образцы инкубировались в растворе ацетона с смолой в соотношении 3:1 в течение двух часов, затем в соотношении 1:1 в течение 8-10

часов, и, наконец, в соотношении 1:3 в течение 120 минут. В конечном этапе, образцы погружались в чистую смолу на 90 минут при температуре 45 градусов.

Кусочки затем заливались чистой смолой при температуре 56°C в течение 24 часов. После чего производилось изготовление ультратонких срезов с толщиной 60-80 нм с использованием ультратома Leica UC7 и их размещение на медных сетках. Для контрастирования, срезы подвергались обработке спиртовым раствором уранил-ацетата в темноте в течение 20 минут, затем промывались в дистиллированной воде и подвергались контрастированию водным раствором цитрата свинца без присутствия углекислого газа в течение 5 минут. После этого образцы возвращались в дистиллированную воду. Электронная микроскопия и получение электронных микрофотографий осуществлялись с использованием микроскопа HT7800 (Hitachi, Токио, Япония).

## 2.6 ПЦР-исследование

РНК была выделена из 5-мкм срезов с парафиновых блоков ткани левого желудочка с использованием набора AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (QiaGen, Венло, Нидерланды, 80234) согласно инструкции производителя. Обратную транскрипцию проводили с помощью RevertAid H. набора для синтеза сДНК Minus First Strand (ThermoScientific, Waltham, MA, USA, K1632) со специфическими праймерами для генов N и E и случайными гексамерными праймерами. Капельная цифровая ПЦР была выполнена на цифровой капельной системе Bio-rad QX200 с супермиксом ddPCR для зондов (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США, #1863026). Реакционную смесь для ПЦР TaqMan собирали из 2× супермиксов для зонда (без dUTP) (Bio-Rad), 20× смеси праймеров и зондов (конечные концентрации 900 и 250 нМ соответственно) и матрицы (переменный объем, сДНК клинический образец или линейный стандарт ДНК) в конечном объеме 20 мкл. Двадцать микролитров из каждой реакционной смеси превращали в капли с помощью генератора капель

QX200 (Bio-Rad). Образцы с разделенными каплями затем переносили в 96-луночный планшет, запечатывали и циклировали в термоциклире T100 (Bio-Rad) по следующему протоколу циклов: 95°C в течение 10 мин (активация ДНК-полимеразы), затем 40 циклов 94°C в течение 30 с (денатурация) и 60°C в течение 1 мин с последующей бесконечной 4-градусной выдержкой. Затем зацикленный планшет переносили и считывали в каналах FAM и HEX с помощью ридера QX200 (Bio-Rad). Чтобы избежать риска вирусной инфекции и ложноположительных результатов, потенциально связанных с лабораторным загрязнением, все эксперименты проводились внутри бокса биобезопасности в лаборатории биобезопасности с отрицательным давлением с использованием наконечников с фильтром.

Линейный динамический диапазон анализа RT-PCR и ddPCR оценивали с использованием серийных разведений линейного стандарта ДНК, содержащего целевую область. Анализ данных ddPCR проводили с помощью программного обеспечения для анализа Quanta Soft v.1.7.4.0917 (Bio-Rad) для расчета концентрации мишени. Положительные популяции для каждого праймера/зонда идентифицируют с использованием положительных и отрицательных контролей с одиночными (т.е. не мультиплексированными) наборами праймер-зондов (Таблица 4).

Таблица 4 – Праймеры, используемые при проведении ПЦР-исследования

Исследуемый ген	Присоединение Genbank	Имя	Последовательность (от 5' до 3')
E	NC_045512.2	E-F1	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
		E-R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA
		E-P1	FAM-ACACTAGCCATCCTACTGCGCTTCG-RTQ1
N	NC_045512.2	N1	GGGAACTTCTCCTGCTAGAAT
		N2	CAGACATTTGCTCTCAAGCTG
		N3	FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-RTQ1
Act	NM_001101.5	Act-F	ACCGAGCGCGGCTACAG
		Act-R	5'-GGCCATCTCTGCTCGAAGT-3'
		Act-Pr	FAM-AGCGGGAAATCGTGCCTGACATTA-RTQ1

## 2.7 Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных производился с помощью программы Statistica v.10 (Россия), а также с помощью библиотек NumPy, SciPy, Pandas и Matplotlib на языке программирования Python 3.9 в блокноте Jupyter Notebook.

В случае нормального распределения для описания количественных показателей использовалось среднее значение и 95% уровня доверительного интервала. При наличии распределения, отличного от нормального, количественные величины оценивались с помощью медианы и 25% и 75% перцентилей. Выбросы в выборках детектировались с помощью построения коробчатых диаграмм в диапазоне более чем 1,5 межквартильного размаха от 25% и 75% перцентилей выборки. При обнаружении выбросов в выборках их причины тщательно анализировались и, при возможности, данные значения заменялись медианными значениями выборки для последующего анализа.

В данном исследовании наблюдалось отклонение распределения большинства выборок от нормального. Из-за этого для оценки статистической значимости различий по количественным характеристикам мы применяли непараметрические методы, такие как U-критерий Манна-Уитни для независимых выборок, пермутационный тест и дисперсионный анализ ANOVA (см. Рисунок 5). В случае, если данные имели нормальное распределение, мы использовали t-критерий Стьюдента. Статистическую значимость различий между группами считали достигнутой при  $p < 0,05$ .

```

# Импорт библиотек
from scipy.stats import mannwhitneyu
from mlxtend.evaluate import permutation_test
import numpy as np
# Установка уровня значимости
alpha = 0.05
# Переменные array1 и array2 содержат информацию о том, какие
выборки сравниваем
array1 = wave_3['Ejection fraction %']
array2 = wave_3_myo['Ejection fraction %']
# Проведение статистических тестов
observed_diff = np.nanmean(array1) - np.nanmean(array2)
stat, p = mannwhitneyu(array1, array2, alternative='two-sided',
use_continuity=False)
n_permutations = 1000
perm_test = permutation_test(array1, array2, method='approximate',
num_rounds=n_permutations, seed=0)
# Вывод результатов
print('Критерий Манна-Уитни:')
print('U-критерий = %.1f, p-value = %.3f' % (stat, p))
if p > alpha: print('Нет статистически значимых различий между
выборками')
else: print('Существуют статистически значимые различия между
выборками')
print()
print('Пермутационный тест:')
print('Полученная разница:', round(observed_diff, 3), 'p-value:',
round(perm_test, 3))
if (perm_test < alpha): print('Существуют статистически значимые
различия между выборками')
else: print('Нет статистически значимых различий между выборками')

```

Рисунок 5 – Пример кода для сравнения двух выборок с использованием коэффициента Манна-Уитни и пермутационного теста

Для проверки наличия связи между двумя переменными мы применяли ранговый корреляционный анализ Спирмена. Силу этой связи мы интерпретировали, ориентируясь на шкалу Чеддока (см. Таблица 5). Положительное значение коэффициента корреляции ( $r$ ) указывало на прямую связь между переменными, а отрицательное – на обратную.

Таблица 5 – Шкала Чеддока

Значение коэффициента корреляции $r$	Значимость связи
$< 0,3$	Слабая
0,3-0,5	Умеренная
0,5-0,7	Заметная
0,7-0,9	Высокая
$> 0,9$	Весьма высокая

Для определения наличия связи между качественными характеристиками, которые мы изучали, мы использовали коэффициент контингенции. Для сравнения частоты появления определенных характеристик в выборках мы применяли таблицы сопряженности и критерий  $\chi^2$  Пирсона. В некоторых случаях использовался биномиальный критерий.

## 2.8 Благодарности

Автор выражает благодарность за помощь в исследованиях:

- Моисеевой Ольге Михайловне – доктору медицинских наук, профессору, ФГБУ "НМИЦ им. В.А. Алмазова" Минздрава России (далее – Центр Алмазова), директору Института сердца и сосудов, руководителю и главному научному сотруднику отдела некоронарогенных заболеваний сердца – за помощь в анализе клинических данных и предоставлении доступа к коллекции

забанкированных биообразцов в научно-исследовательской группе биобанкирования;

- Горшкову Андрею Николаевичу – кандидату медицинских наук, ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, заведующему лабораторией внутриклеточного сигналинга и транспорта – за помощь в проведении электронной микроскопии;
- Вонскому Максиму Сергеевичу – кандидату медицинских наук, ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева», руководителю Научно-исследовательского отдела государственных эталонов и стандартных образцов в области биоаналитических и медицинских измерений – за помощь в проведении ПЦР-исследований тканей миокарда;
- Писаревой Марии Михайловне – кандидату медицинских наук, ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, ведущему научному сотруднику – за помощь в проведении ПЦР-исследований эндомиокардиальных биопсий;
- Комиссарову Андрею Борисовичу – ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, заведующему Лабораторией молекулярной вирусологии – за помощь в проведении ПЦР-исследований эндомиокардиальных биопсий;
- Майриной Софье Вадимовне – младшему научному сотруднику научно-исследовательской лаборатории соединительнотканых дисплазий Центра Алмазова – за помощь в анализе клинических данных;
- Рунову Андрею Леонидовичу – инженеру Научно-исследовательского отдела государственных эталонов и стандартных образцов в области биоаналитических и медицинских измерений ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева» – за помощь в проведении ПЦР-исследований эндомиокардиальных биопсий;

- Миренбург Виктории Геннадьевне – лабораторному технику Научно-исследовательской лаборатории патоморфологии Центр Алмазова – за подготовку тканей и приготовление микропрепаратов для гистологического, иммуногистохимического и иммунофлюоресцентного исследования.

Автор выражает благодарность и признательность сотрудникам Центра Алмазова за сотрудничество и ответственный подход в проведении научного исследования.

## Глава 3. Результаты собственных исследований

### 3.1 Аутопсийное исследование

#### 3.1.1 I волна коронавирусной инфекции

Первый случай заражения SARS-CoV-2 в Санкт-Петербурге был зарегистрирован 5 марта 2020 года, что ознаменовало начало первой волны коронавирусной инфекции в Санкт-Петербурге [19].

Центр Алмазова принимал пациентов в первую волну коронавирусной инфекции в период с мая по август 2020 года. По данным эпидемиологических и генетических исследований в этот период в Санкт-Петербурге выявлялись В.1 линии коронавируса (альфа-штамм) и его подварианты. В Санкт-Петербурге в это время наиболее часто выявляемыми мутациями в гене N коронавируса были AP1 - R203K G204R [6].

В первую волну коронавирусной инфекции в Центр Алмазова поступило около 1800 пациентов, у 178 был летальный исход. Вследствие масштабной эпидемиологической работы городских служб, необходимости в стандартизации подходов к диагностике, лечению и стационарному менеджменту пациентов, часть аутопсийного материала была изъята для дальнейшего изучения и оказалась недоступна для исследования. В данное исследование включены только 77 пациентов из первой волны коронавирусной инфекции с летальным исходом госпитализации.

Медианный возраст включенных в исследование пациентов составил 74 года (межквартильный размах: 60-74 лет), средний возраст - 70,38 лет. 34 (44%) пациента были мужского пола, 43 (56%) - женского.

Пациенты поступали в стационар на 5-е сутки от начала заболевания (межквартильный размах 3-6 суток) и умирали на 18-е сутки (межквартильный размах 14-20). Медианная продолжительность госпитализации составляла 13 дней (межквартильный размах 11-14 дней). Стоит обратить внимание на одного пациента, поступившего в стационар на 32-е сутки после появления симптомов болезни: резкий выброс из данных, отклонение более чем на 1,5 межквартильного размаха от верхнего квартиля выборки (Рисунок 6).

## I волна коронавирусной инфекции

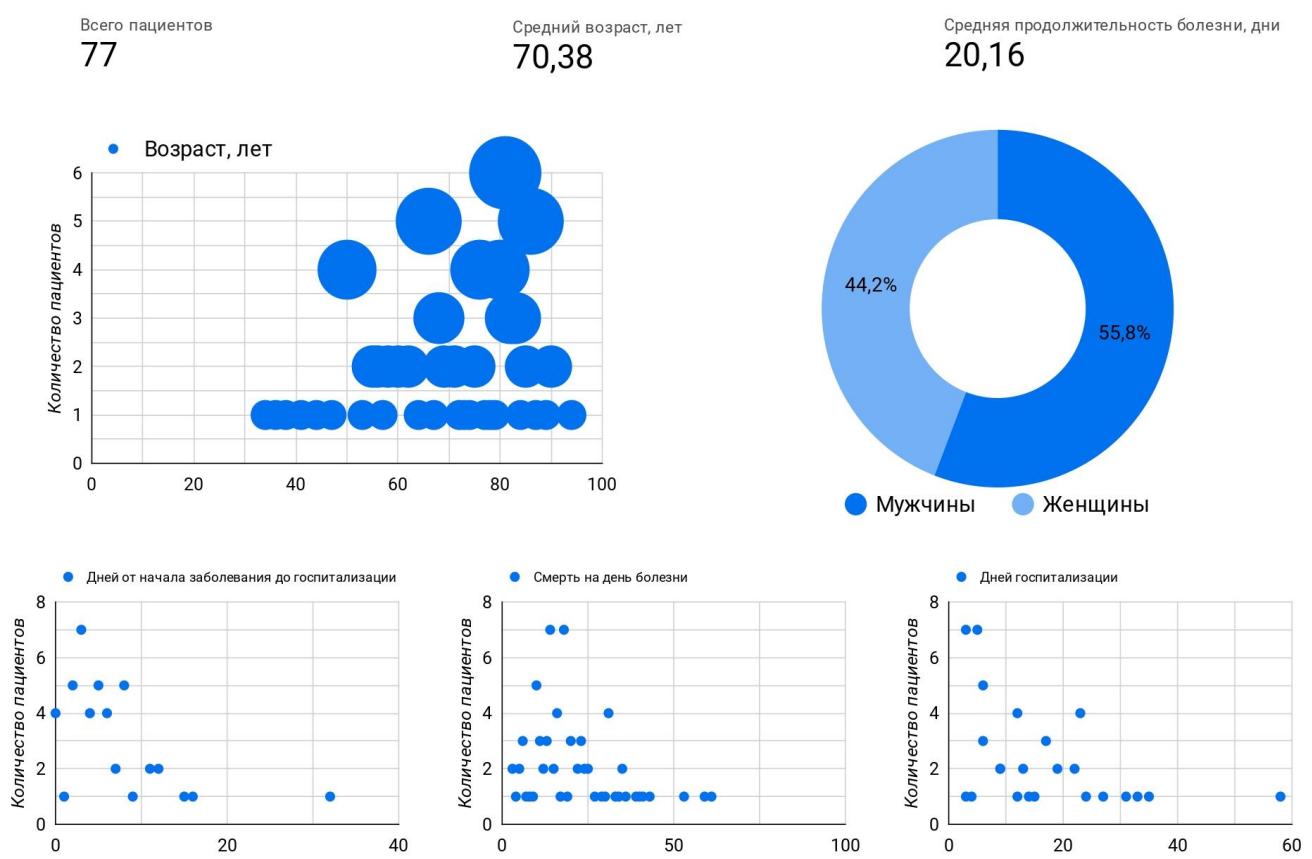


Рисунок 6 – Клинико-эпидемиологические показатели пациентов I волны коронавирусной инфекции

Выдержка из анамнеза заболевания: «считает себя больной с 19.05.20, когда была госпитализирована в СЗГМУ им. Мечникова по поводу новой коронавирусной инфекции. Предъявила жалобы на общую слабость, одышку, повышение температуры тела до 39,0 С. За время госпитализации получала

этиотропную терапию в виде Азитромицина, Амоксициллина, также противовоспалительную, антигипертензивную и ангиоагулянтную терапию. Положительный мазок на COVID-19 от 21, 26, 31.05. Отрицательный мазок от 11.06. 16.06.20 выписана в удовлетворительном состоянии на амбулаторное лечение. 20.06.20 при плановом осмотре участкового терапевта по тяжести состояния (одышка, слабость, температура тела до 38,5 С) вызвана бригада СМП, на который пациентка госпитализирована в ФГБУ НМИЦ им В.А. Алмазова».

В ходе госпитализации в Центре Алмазова пациентка прогрессивно ухудшалась с нарастанием явлений полиорганной недостаточности, клиники септического шока. Смерть наступила на 59-е сутки от появления симптомов коронавирусной инфекции и на 27-е сутки госпитализации в Центре. При аутопсийном исследовании не было обнаружено признаков коронавирусной инфекции в лёгких, что также было подтверждено отрицательным результатом посмертной ПЦР трахеи и лёгких, однако была выявлена холангiocарцинома левой и правой долей печени размером  $6,5 \times 5,4 \times 5,0$  см с множественными внутриорганными метастазами, прорастанием в общий желчевыводящий проток, воротную вену печени, pT4N0M0.

С учётом того, что смерть пациентки прямо не связана с перенесённой коронавирусной инфекцией данные о сроках госпитализации для последующей статистической обработки мы можем заменить на медианные значения.

Также следует обратить внимание на выброс данных в структуре продолжительности госпитализации (58 дней). Пациентка с анамнезом неходжкинской лимфомы с множественными курсами полихимиотерапии поступила в Центр на 3-и сутки после появления симптомов коронавирусной инфекции с клиникой прогрессирующей дыхательной недостаточности. При поступлении процент поражения лёгочной ткани был 68%. Пациентка в ходе госпитализации получала антибактериальную, противовоспалительную, дезинтоксикационную терапию и специфическую терапию: Гидроксихлорохин 400

мг 2 раза в сутки 3 недели, Лопинавир 200 мг 2 раза в сутки 14 дней, Тоцилизумаб 8 мг/кг в/в капельно 1 раз, Руксолитиниб 5 мг 2 раза в сутки 7 дней. Несмотря на все исчерпанные резервы терапии на контрольных КТ лёгких отмечалась отрицательная динамика в виде увеличения зон консолидации лёгочной паренхимы с прогрессированием вовлечения лёгочной ткани в процесс до 95%. В связи с выраженной лёгочно-сердечной недостаточностью пациентка была переведена на ЭКМО и ИВЛ через 30 дней после госпитализации. Впоследствии состояние пациентки не улучшалось, смерть зафиксирована на 58-е сутки от госпитализации (28 из которых пациентка провела на ЭКМО и ИВЛ). При патологоанатомическом исследовании была подтверждена вирусная субтотальная пневмония, посмертные ПЦР трахеи и лёгких также выявили РНК коронавируса. В связи с тем, что пациентка умерла от ОРДСВ на фоне коронавирусной инфекции мы считаем невозможным заменить данные на медианные значения. Несмотря на это, столь высокую длительность госпитализации можно объяснить нетипичным менеджментом пациента для пациентов первой волны коронавирусной инфекции.

При поступлении течение коронавирусной инфекции по данным КТ определялось как лёгкое (процент поражения лёгочной ткани менее 25%) у 13 (77%) пациентов, как средне-тяжёлое (процент поражения лёгочной ткани 25-50%) у 9 (12%) пациентов, как тяжёлое (процент поражения лёгочной ткани 50-75%) у 10 (13%) пациентов, как крайне-тяжелое (процент поражения лёгочной ткани более 75%) у 37 (48%) пациентов. У 8 пациентов КТ лёгких выполнено не было вследствие крайне-тяжелого состояния и необходимости в ИВЛ с момента поступления в стационар.

22 (29%) пациентов имели нормальный уровень насыщения крови кислородом (более 95%), 14 (18%) пациентов имели уровень сатурации 92-95%, у 7 (9%) пациентов определялась тяжелая дыхательная недостаточность ( $spO_2$  менее 70%). У 34 (44%) сатурация измерялась на фоне кислородной поддержки, вследствие выраженной дыхательной недостаточности.

Всем пациентам было произведено стандартное лабораторное обследование при поступлении, включающее клинический анализ крови, общий анализ мочи, уровни СРБ, ферритина, тропонина I, прокальцитонина, D-димера, АЛТ, АСТ, креатинина, мочевины, МНО, маркеров вирусных гепатитов и микрореакцию.

У 21 (27%) пациентов при поступлении определялся нормальный уровень лимфоцитов в периферической крови (более  $1 \times 10^9/\text{л}$  клеток), у 56 (73%) пациентов определялась лимфопения.

Только у 3 (4%) пациентов уровень СРБ был в пределах референсных значений (0-5 мг/л), у 29% пациентов было умеренное повышение уровня СРБ (5-49 мг/л), у 45 (58%) пациентов определялось выраженное повышение уровня СРБ (более 50 мг/л).

Только у 1 (1%) пациента уровень D-димера при поступлении был в пределах референсных значений (до 0,5 мкг/мл) и только у 3 (4%) уровень ферритина был в пределах референса (до 150 нг/мл). Прокальцитониновый тест был отрицательный у 46 (60%) пациентов при поступлении (уровень прокальцитонина менее 0,5 нг/мл), сомнительный у 9 (12%) пациентов (уровень прокальцитонина 0,5-2,0 нг/мл) и положительным у 22 (29%) пациентов (уровень прокальцитонина более 2,0 нг/мл).

У 63 (82%) пациентов уровень Тропонина I при поступлении был в пределах референсных значений (менее 1 нг/мл), у 14 (18%) пациентов уровень сердечного тропонина I был выше 1 нг/мл (Рисунок 7).

## I волна коронавирусной инфекции, обследование при поступлении

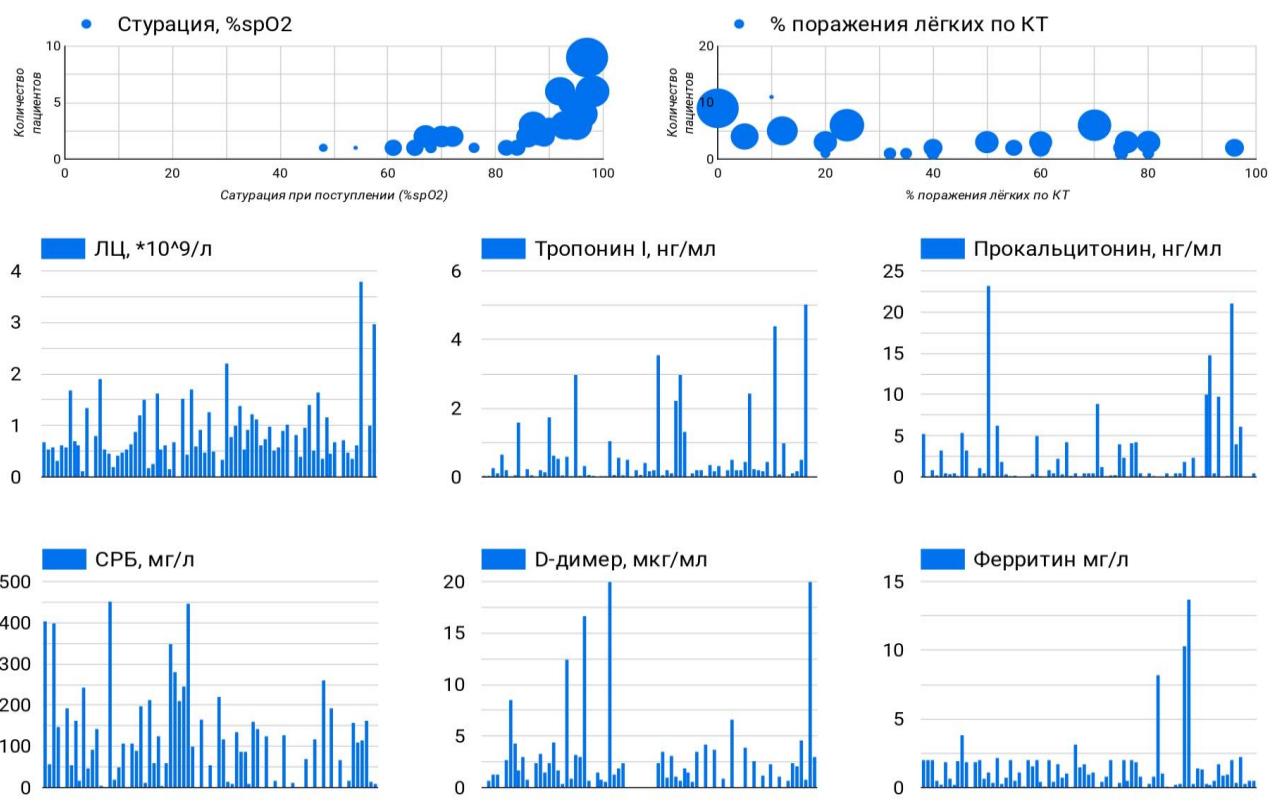


Рисунок 7 – Лабораторно-инструментальное обследование пациентов в I волну коронавирусной инфекции. Аббревиатуры: ЛЦ – лимфоциты, КТ – компьютерная томография, СРБ – С-реактивный белок

Всем пациентам при поступлении в стационар была выполнена электрокардиография. Фибрилляция предсердий была самым часто выявляемым нарушением ритма и была зарегистрирована у 30 (39%) пациентов. Предсердная экстрасистолия, блокада передне-верхнего разветвления левой ножки пучка Гиса, полная блокада левой ножки пучка Гиса, атриовентрикулярная блокада II степени, желудочковая тахикардия были выявлены у 3 (4%) пациентов (каждая). Остальные нарушения ритма и проводимости сердца встречались лишь у единичных пациентов из выборки.

Эхокардиография была выполнена у 71 (92%) пациентов. Фракция выброса левого желудочка по Симпсону была в диапазоне нормальных значений (более

55%) у 46 (60%) пациентов, сохранна (40-55%) у 15 (19%) и снижена (менее 40%) у 10 (13%) пациентов.

Сопутствующая сердечно-сосудистая патология включала в себя гипертоническую болезнь (ГБ), ишемическую болезнь сердца (ИБС), сахарный диабет (СД) и синдром хронической сердечной недостаточности (ХСН). ГБ была диагностирована у 58 (75%) пациентов, из них у 48 (62%) пациентов была выставлена III стадия, а у 10 (13%) II. I стадия ГБ не была выставлена ни у одного из пациентов. Возможно, это можно объяснить тяжестью состояния пациентов и высокой загруженностью медицинского персонала во время первой волны коронавирусной инфекции. ИБС была задокументирована у 40 (52%) пациентов, СД - у 12 (16%) пациентов. ХСН I стадии была диагностирована у 1 (1%) пациентов, II стадии - у 21 (27%), III стадии - у 13 (17%) пациентов (Рисунок 8).

В соответствии с временными клиническими рекомендациями от 06.04.2020 по диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции лечение пациентов в первую волну осуществлялось следующим образом (Таблица 5) [3].

### I волна коронавирусной инфекции, сопутствующая сердечно-сосудистая патология



Рисунок 8 – Сопутствующая сердечно-сосудистая патология у пациентов I волны коронавирусной инфекции. Аббревиатуры: АВ-2 (3) – атриовентрикулярная блокада 2-ой (3-ей) степени, БПВРЛНПГ – блокада передне-верхнего разветвления левой ножки пучка Гиса, ГБ – гипертоническая болезнь, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ЖТ – желудочковая тахикардия, ПБЛНПГ – полная блокада левой ножки пучка Гиса, СА блокада – синоатриальная блокада, СССУ – синдром слабости синусового узла, ХСН – хроническая сердечная недостаточность

Таблица 5 – Схемы лечения пациентов в I волну коронавирусной инфекции

Форма заболевания	Схемы лечения
Легкие формы и средне-тяжелые формы (пневмония без дыхательной недостаточности) у пациентов младше 60 лет без сопутствующих хронических заболеваний	Схема 1: Гидроксихлорохин Схема 2: Хлорохин Схема 3: Мефлохин
Средне-тяжелые формы (пневмония без дыхательной недостаточности) у пациентов старше 60 лет или пациентов с сопутствующими хроническими заболеваниями	Схема 1: Гидроксихлорохин + азитромицин Схема 2: Мефлохин + азитромицин Схема 3: Лопинарвир/ритонавир + рекомбинантный интерферон бета-1b
Тяжелые формы (пневмония с развитием дыхательной недостаточности, ОРДС, сепсис)	Схема 1: Гидроксихлорохин+азитромицин +/- тоцилизумаб (сарилумаб) Схема 2: Мефлохин+азитромицин +/- тоцилизумаб (сарилумаб) Схема 3: Лопинавир/ритонавир + рекомбинантный интерферон бета-1b +/- тоцилизумаб (сарилумаб)

Терапия вышеописанными препаратами осуществлялась следующими режимами введения:

- Гидроксихлорохин 400 мг 2 раза в день per os через 12 часов в первый день, затем 200 мг 2 раза в день per os через 12 часов в течение 6 дней.

- Хлорохин 500 мг 2 раза в день per os через 12 часов в течение 7 дней.
- Мефлохин 250 мг каждые 8 часов per os 1-ый день, 250 мг каждые 12 ч per os 2-ой день, 250 мг 1 раз в день per os в 3-ий и 7-ой дни.
- Азитромицин 500 мг per os 1 раз в сутки 5 дней.
- Лопинавир+Ритонавир 400 мг +100 мг per os каждые 12 часов 14 дней.
- Рекомбинантный интерферон бета-1b 8 млн МЕ подкожно через день в течение 14 дней
- Тоцилизумаб 400 мг разведенный в 100-500 мл физиологического раствора (0,9% хлорид натрия), внутривенно капельно в течение 60 минут, однократно. В некоторых случаях препарат вводили повторно в том же режиме через 12 часов от первого введения.
- Сарилумаб 200 мг разведенный в 100-500 мл физиологического раствора (0,9% хлорид натрия), внутривенно капельно в течение 60 минут, однократно. В некоторых случаях препарат вводили повторно в том же режиме через 12 часов от первого введения.

Лекарственный мониторинг включал в себя ЭКГ с анализом корrigированного QT, анализ почечной функции (креатинин, мочевина), печеночной функции (АЛТ, АСТ), миоцитолиза (тропонин I), лейко- и тромбоцитопении (клинический анализ крови).

Наиболее частыми осложнениями коронавирусной инфекции в ходе госпитализации за исключением ОРДСВ стали: тромбоэмболия лёгочной артерии (36 (47%) пациентов), гнойно-септические осложнения (14 (18%) пациентов) и острый инфаркт миокарда (9 (12%) пациентов).

Далее представлена модель типового течения коронавирусной инфекции у пациента из нашей выборки.

Больной 55 лет, госпитализирован в Центр Алмазова с анамнезом ИБС: ПИКС (ОИМ от 2019 года), ГБ III стадии поступает с прогрессирующей клиникой дыхательной недостаточности (сатурация 88%) на 6-е сутки от возникновения первых симптомов, с жалобами на сухой кашель, одышку, слабость, потерю обоняния, слабость и выраженную сонливость. Выполнено КТ лёгких: КТ-признаки двусторонней полисегментарной вирусной пневмонии с поражением 70% лёгочной паренхимы, высокая вероятность COVID-19. По данным лабораторного обследования: нормальный Д-димер, высокий СРБ, гиперлейкоцитоз с палочкоядерным сдвигом, нормохромная анемия, отрицательный прокальцитониновый тест, тропонин I - в пределах референса.

Пациент получал дезинтоксикационную, обезболивающую и противовоспалительную терапию, оксигенотерапию (парацетамол или НПВС), Азитромицин 500 мг 1 раз в день, Гидроксихлорохин 400 мг 2 раза в день в первый день, затем 200 мг 2 раза в день в течение 6 дней. Несмотря на проводимую терапию состояние пациента прогredientно ухудшается, на 4-е сутки пациенту *ex juvantibus* назначали дексаметазон 8 мг 1 раз в сутки внутривенно капельно, предварительно с разведением в 400 мл физиологического раствора. На 7-е сутки в связи с выраженной дыхательной недостаточностью, диагностированным тромбозом вен нижних конечностей пациент переводится в отделение реанимации, где назначалась антикоагулянтная терапия: Фраксипарин подкожно 0,4 мг 2 раза в сутки, противовоспалительная терапия: Метилпреднизолон: 100мг мг/сутки, специфическая терапия: Интерферон бета-1b 8 млн МЕ подкожно. На 9-е сутки по данным УЗИ-ДГ вен нижних конечностей определяется прогрессирование тромбоза, также у пациента отмечена макрогематурия, нарастание маркеров воспаления. В связи с этими данными инициирована гемокоррекция: Альбумин 20% 50 мл внутривенно через 12 часов, антибактериальная терапия Имипенем-циластин: 0,5 г внутривенно через 12 часов, Лопинавир + Ритонавир 200 мг + 50 мг *per os* через 12 часов, отменена терапия метилпреднизолоном, пациент переведен на ИВЛ.

На 13-е сутки у пациента по монитору фиксируется расширение желудочковых комплексов с переходом в идиовентрикулярный ритм и асистолию. Незамедлительно начат комплекс реанимационных мероприятий: непрямой массаж сердца на фоне ИВЛ в режиме vol.control с параметрами ДО 550 мл ЧД 35 в мин, ПДКВ 15 см H<sub>2</sub>O, FiO<sub>2</sub> 100%. Введено в/в Sol. Adrenalini 5,0 мг дробно по 1 мг, Sol. Atropini 3,0 мг дробно по 1 мг. Реанимационные мероприятия в течение 30 мин без эффекта. Отсутствует сердечная деятельность - по монитору асистолия, отсутствует пульс на магистральных артериях, артериальное давление при измерении отсутствует, зрачки максимально расширены, реакции на свет нет, корнеальный рефлекс отсутствует, гипостаз в отлогих частях тела, констатирована биологическая смерть больного.

Морфологическое исследование сердец умерших пациентов I волны коронавирусной инфекции выявило основные изменения в миокарде. Так в 43 случаях (56%) в миокарде и перикарде были выявлены крупные полиморфные клетки, располагающиеся в зоне сосудов, у 37 (48%) больных наблюдались множественные кровоизлияния в миокард, у 22 (29%) — выраженная фрагментация мышечных волокон, у 14 (18%) пациентов — ишемический инфаркт миокарда, в том числе 1 случай инфаркта миокарда с замедленной организацией, также у 8 (10%) наблюдалось очаговое плазматическое пропитывание стенки сосуда, у 13 (17%) — некоронарогенные некрозы (Рисунок 9). Особое внимание обращали на себя крупные клетки в зоне сосудов, наблюдавшиеся у 43 (56%) пациентов. Они были разной формы, с гипертрофированными, полиморфными ядрами, с явными признаками пролиферации, но часть из них была некротизирована.

### I волна коронавирусной инфекции, морфологические изменения в миокарде

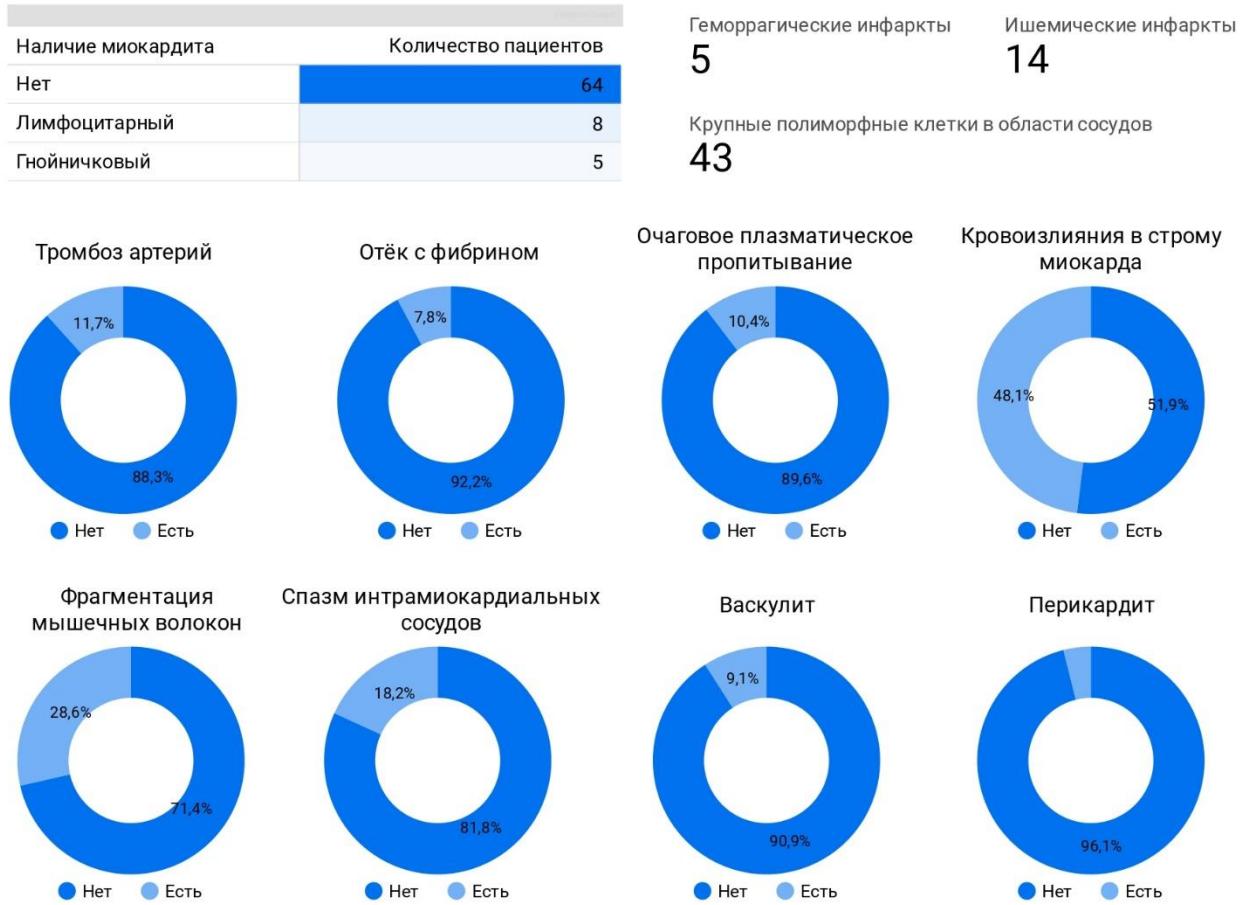


Рисунок 9 – Гистологическое исследование миокарда умерших пациентов, I волна

Остальные морфологические изменения были выявлены реже. Так у 5 (6%) пациентов был выявлен геморрагический инфаркт миокарда, у 9 (12%) — тромбы в интрамуральных артериях, у 6 (8%) — выраженный отек стромы с отложением фибрина в интерстиции, у 7 (9%) — инфильтративный васкулит, у 3 (4%) — лимфоцитарный перикардит, у 4 (5%) — лейкоцитарные стазы (Рисунок 10).

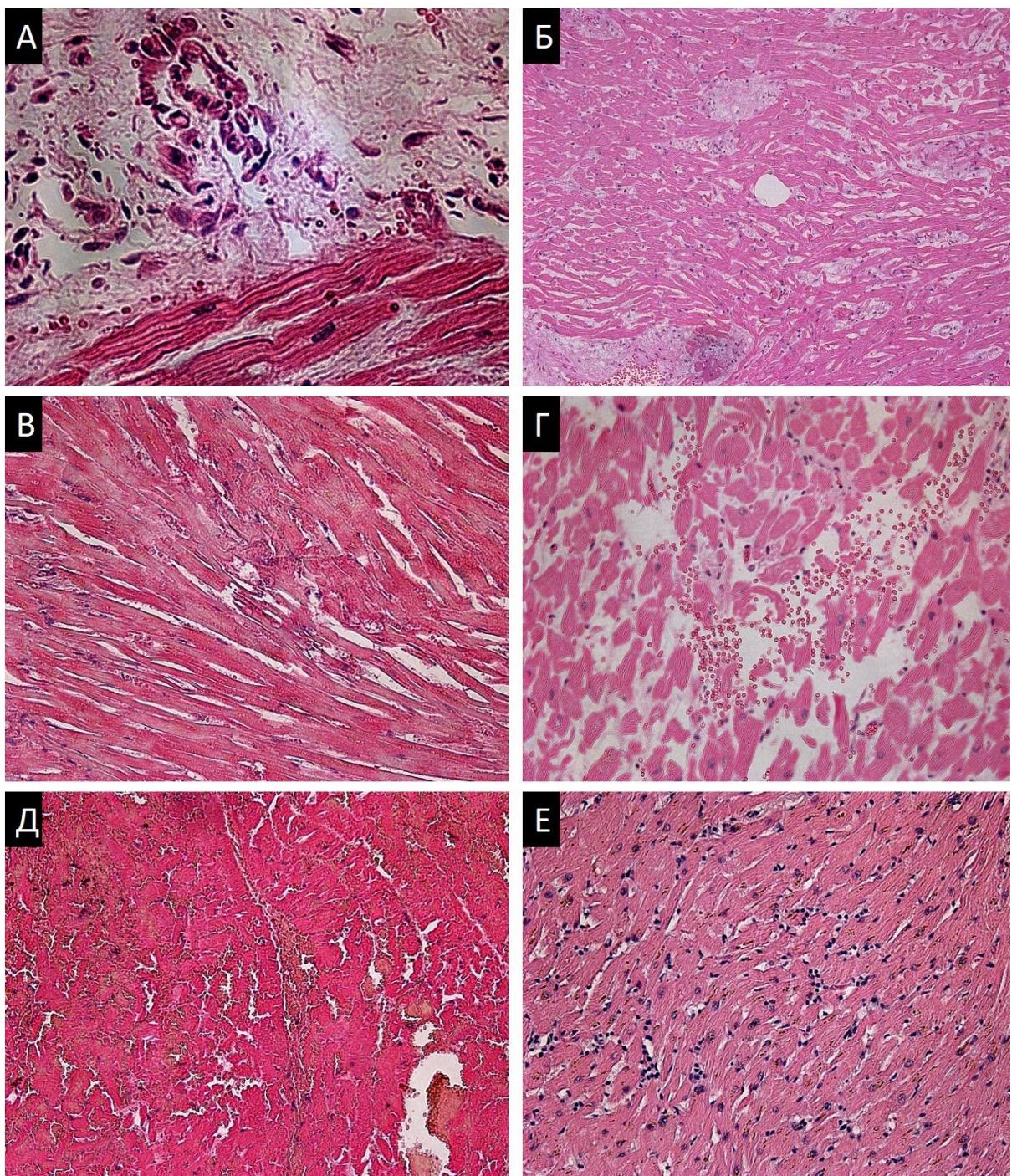


Рисунок 10 – Основные морфологические изменения в миокарде у пациентов I волны коронавирусной инфекции. А – крупные полиморфные клетки в зоне сосудов, увеличение 400; Б – очаговое плазматическое пропитывание, увеличение 100; В – ишемические некрозы миокарда; Г – кровоизлияния в ткань миокарда и фрагментация мышечных волокон. Д – геморрагические некрозы миокарда; Е – лимфоцитарный миокардит с агрессивным внедрением лимфоцитов в саркоплазму. В-Е увеличение 200. А-Е – окраска гематоксилин-эозин

Изменения в миокарде, свидетельствующие о хронических заболеваниях сердца включали в себя выраженную гипертрофию миокарда у 20 (26%) пациентов,

выраженное атеросклеротическое поражение коронарных артерий у 36 (47%) пациентов, постинфарктные рубцы у 14 (18%) пациентов, диффузный мелкоочаговый кардиосклероз у 18 (24%) пациентов, липоматоз у 2 (3%) пациентов.

Активный лимфоцитарный миокардит был заподозрен при гистологическом исследовании в 15 (19%) случаях, в то время как гнойничковый миокардит диагностировали в 5 (6%) случаях. С помощью иммуногистохимии, проведенной в соответствии с международными стандартами, лимфоцитарный миокардит подтвердился только в 8 (53%) из 15 случаев. Это составило всего 10% от общего числа умерших пациентов I волны.

Иммуногистохимические исследования также выявило, что в 6 из 8 случаев была обнаружена реакция гуморального иммунитета, проявившаяся в экспрессии C1q-компонента комплемента. В 5 из 8 случаев обнаружили VP1-антиген энтеровирусов, в основном на эндотелии. На крупных полиморфных клетках по перipherии сосудов отмечалась экспрессия CD34, и лишь некоторые из этих клеток были макрофагами, экспрессирующими CD68. Увеличение CD68+клеток (более или равно 14/мм<sup>2</sup>) наблюдалось в 3 из 8 случаев. Гистологический и иммуногистохимический анализ не выявил ярко выраженной диффузной лимфоцитарной инфильтрации миокарда. Максимальное количество очаговых инфильтратов составляло от 21 до 37 CD3+Т-лимфоцитов/мм<sup>2</sup>. В ни одном из случаев не обнаружили CD8+Т-лимфоцитов. Во всех 8 случаях лимфоцитарного миокардита отмечалась экспрессия VWF на эндотелии сосудов и Ang1 на эндотелии и в саркоплазме кардиомиоцитов. Экспрессия VEGF наблюдалась на эндотелии и в мышечных волокнах в 4 случаях, только на эндотелии – в 3 случаях, и отсутствовала в 1 случае (Рисунок 11). Морфологические показатели пациентов с гистологическим диагнозом вирусного миокардита представлены в таблице 6.

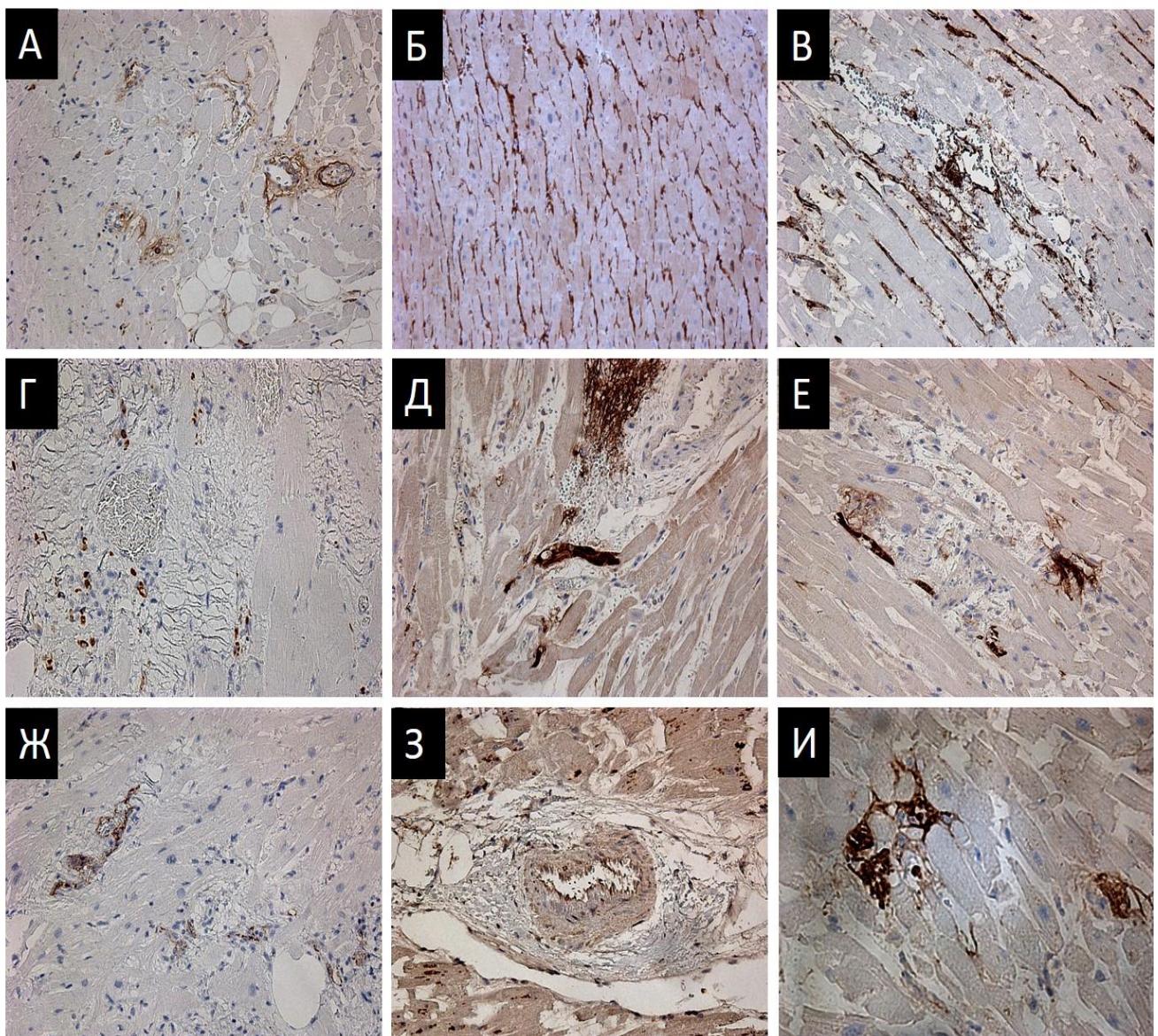


Рисунок 11 – Иммуногистохимический профиль исследования миокарда пациентов I волны коронавирусной инфекции. А: экспрессия С1q-компонента комплемента на сосудах и клетках инфильтрата. Б: экспрессия VP1-энтеровирусов на эндотелии (выраженная) и в саркоплазме кардиомиоцитов (умеренная). В: экспрессия CD34 на гипертрофированных полиморфных клетках и на эндотелии. Г: экспрессия CD68 на макрофагах отсутствие экспрессии на гипертрофированных полиморфных клетках. Д, Е: экспрессия VEGF на эндотелии и на гипертрофированных полиморфных клетках, очаговая экспрессия в саркоплазме кардиомиоцитов. Ж: экспрессия VWF (фактора фон Виллебранда) на эндотелии. З, И: экспрессия Ang1 на эндотелии сосудов и гранулярная экспрессия в единичных кардиомиоцитах; (коричневое окрашивание) х200; х400

Таблица 6 – Морфологические показатели пациентов с гистологическим диагнозом вирусного миокардита

№	Изменения в миокарде	CD3 / мм <sup>2</sup>	CD68 / мм <sup>2</sup>	MH C1, балл	HLA -DR, балл	C1q, балл	VP1 EntV, балл	VEGF, балл	Ang1, балл	VWF, балл
1	Фрагментация мышечных волокон	2	1	0	0	0	0	0	Э 3, К 0	0
2	Лимфоцитарный миокардит	15	1	4	2	0	0	0	Э 2, К 4	3
3	Некрозы, тромбы в артериях и на эндокарде	5	5	3	2	0	0	Э 1, К 2	Э 1, К 4	2
4	Лимфоцитарный миоперикардит	20	8	4	2	2	Э 4, К 2	Э 4, К 0	Э 4, К 4	3
5	Острый инфаркт миокарда, лимфоцитарный миокардит	15	32	3	0	2	Э 4, К 0	Э 2, К 2	Э 4, К 3	4
6	Некрозы, тромбоз, лимфоцитарный миокардит	11	6	3	0	1	0	Э 4, К 2	Э 4, К 4	1

Таблица 6 (продолжение) – Морфологические показатели пациентов с гистологическим диагнозом вирусного миокардита

№	Изменения в миокарде	CD3 / мм <sup>2</sup>	CD68 / мм <sup>2</sup>	MHC1, балл	HLA-DR, балл	C1q, балл	VP1 EntV, балл	VE GF, балл	Ang1, балл	VWF, балл
7	Некрозы, тромбы в артериях	3	4	3	0	0	0	Э 3, К 0	Э 3, К 3	1
8	Фрагментация мышечных волокон	3	22	2	0	0	0	Э 4, К 0	Э 4, К 4	4
9	Некрозы, тромбы в артериях	5	5	4	0	1	0	Э 1, К 0	Э 2, К 2	2
10	Лимфоцитарный миокардит	8	14	4	1	2	Э 4, К 0	Э 4, К 0	Э 4, К 2	4
11	Гнойничковый миокардит, тромбы в артериях	48	2	4	3	3	Э 4, К 0	Э 4, К 2	Э 4, К 4	4
12	Некрозы, тромбоз, лимфоцитарный миокардит	37	2	4	3	3	Э 4, К 3	Э 4, К 2	Э 2, К 4	1
13	Лимфоцитарный миокардит	21	0	4	4	0	0	Э 3, К 1	Э 4, К 4	1

Таблица 6 (продолжение) – Морфологические показатели пациентов с гистологическим диагнозом вирусного миокардита

№	Изменения в миокарде	CD3 / мм <sup>2</sup>	CD68 / мм <sup>2</sup>	MHC1, балл	HLA -DR, балл	C1q, балл	VP1 EntV, балл	VE GF, балл	Ang1, балл	VWF, балл
14	Лимфоцитарный миокардит	16	20	4	0	3	Э 4, К 0	Э 3, К 0	Э 4, К 4	4
15	Фрагментация мышечных волокон	5	2	4	0	1	Э 4, К 2	Э 4, К 2	Э 4, К 4	4

Аббревиатуры: Э – экспрессия на эндотелии; К – экспрессия в кардиомиоцитах

У большинства больных с миокардитами, подтвержденными иммуногистохимическим анализом, было повышение тропонина I, за исключением 2-х случаев. Фракцию выброса левого желудочка у пациентов с миокардитом трудно оценить в связи с тем, что эхокардиографическое исследование проводилось не всем. В большинстве случаев у пациентов с гистологическим подозрением на миокардит мы наблюдали лимфопению. В 7 из 8 случаев иммуногистохимически доказанного миокардита регистрировались нарушения ритма и проводимости (Таблица 7).

Таблица 7 – Клинико-лабораторные и инструментальные показатели умерших пациентов с гистологическим диагнозом вирусного миокардита

Параметр	Пациенты с иммуногистохимически подтверждённым хроническим лимфоцитарным миокардитом (n=8)
Возраст, лет	62 [61–68]
Время от появления симптомов до поступления в стационар, дни	4 [4–10]
Время от появления симптомов до смерти, дни	23 [20–23]
C-реактивный белок, мг/л	124.5 [161.0–250.0]
D-димер, мкг/мл	1.5 [1.3–4.9]
Тропонин I, нг/мл	270 [120–390]
Ферритин, мкг/л	1246 [420–3175]
Прокальцитонин, нг/мл	0.44 [0.35–0.94]
Лимфоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	0.59 [0.56–1.58]
Процент поражения лёгких по данным КТ при поступлении, %	83 [70–85]
SpO <sub>2</sub> , %	89 [85–91]

Таблица 7 (продолжение) – Клинико-лабораторные и инструментальные показатели умерших пациентов с гистологическим диагнозом вирусного миокардита

Параметр	Пациенты с иммуногистохимически подтверждённым хроническим лимфоцитарным миокардитом (n=8)
Фракция выброса левого желудочка при поступлении, %	62 [61–68]
Нарушения ритма и проводимости	Полная блокада передне-верхнего разветвления левой ножки пучка Гиса – 2 случая; фибрилляция предсердий – 3 случая; неполная блокада правой ножки пучка Гиса – 2 случая

У больных с коронавирусной инфекцией, независимо от наличия или отсутствия миокардита, мы наблюдали экспрессию Ang1, VEGF и VWF. Замечено, что в некоторых случаях экспрессия Ang1 и VEGF наблюдалась не только в эндотелии, но также и в кардиомиоцитах. Следовательно, наиболее распространенными изменениями в миокарде в острый период первой волны коронавирусной инфекции являлась активация, пролиферация и гипертрофия эндотелия сосудов с дисплазией и некрозом (дисэндотелиоз), а также проявления ангиопатии, включая некрозы, кровоизлияния и тромбозы. Лимфоцитарный миокардит выявлен в 10% случаев. Для всех 8-ми пациентов, у которых был подтвержден иммуногистохимический диагноз лимфоцитарного миокардита, мы провели ПЦР-исследование тканей миокарда левого желудочка, извлеченных из FFPE-препарата. Ни в одном из исследованных случаев мы не обнаружили наличие генетических последовательностей коронавируса N и E.

### 3.1.2 II волна коронавирусной инфекции

Вторая волна коронавирусной инфекции в Санкт-Петербурге начиналась с сентября 2020 года по март 2021 года. Центр Алмазова принимал пациентов во вторую волну коронавирусной инфекции в период с декабря 2020 года по середину февраля 2021 года. По данным эпидемиологических и генетических исследований в этот период в Санкт-Петербурге выявлялись B.1.397, B.1.317 линии коронавируса и их подварианты [19].

Во вторую волну коронавирусной инфекции в Центр Алмазова поступило около 1400 пациентов, у 119 был летальный исход. В данное исследование были включены все пациенты из второй волны коронавирусной инфекцией с летальным исходом госпитализации.

Медианный возраст включенных в исследование пациентов составил 74 года (межквартильный размах: 66-83 лет), средний возраст - 73,9 лет. 62 (52,1%) пациента были мужского пола, 57 (47,9%) – женского.

Пациенты поступали в стационар на 7-е сутки от начала заболевания (межквартильный размах 4-9 суток) и умирали на 19-е сутки (межквартильный размах 13-26). Медианная продолжительность госпитализации составляла 12 дней (межквартильный размах 9-15 дней). Стоит обратить внимание на одного пациента, поступившего в стационар на 60-е сутки после появления клинических симптомов болезни (резкий выброс из данных, отклонение более чем на 1,5 межквартильного размаха от верхнего квартиля выборки). Выдержка из истории болезни:

Пациентка 82-ух лет поступила в Центр Алмазова на 60-е сутки заболевания. Первые симптомы включали заложенность носа, першение в горле, редкий сухой кашель и повышение температуры до субфебрильных значений. На 8-е сутки болезни состояние пациентки с положительной динамикой в виде исчезновения заложенности носа и першения в горле, однако редкий сухой кашель сохранялся.

На 14-е сутки температура нормализовалась, однако сухой кашель стал приступообразным и продолжался в течение следующих 30-ти дней. На 50-е сутки заболевания пациентка вновь стала отмечать повышение температуры до фебрильных значений, присоединилась аносмия. На 55-е сутки появилась выраженная одышка, слабость, кашель стал малопродуктивным, частым, также появились жалобы на боли за грудиной не купирующиеся нитроглицерином с иррадиацией в левую лопатку. Пациентка самостоятельно не лечилась, доставлена бригадой СМП в Центр Алмазова на 60-е сутки после появления первых симптомов. При поступлении был положительный мазок из носоглотки на РНК SARS-CoV-2, поражение лёгких по КТ – 72%, тропонин – 8,7 нг/мл, по эхокардиографии - акинезия передне-перегородочной области левого желудочка. В ходе госпитализации у пациентки прогрессировала дыхательная и сердечно-сосудистая недостаточность, несмотря на терапию Тоцилизумабом 400 мг, ИВЛ, инотропную поддержку. Пациентка умерла на 66-е сутки после появления первых клинических симптомов. При патологоанатомическом исследовании были выявлены острый инфаркт миокарда давностью около 7-ми дней, ОРДСВ и двусторонняя субтотальная вирусная пневмония. Посмертная ПЦР трахеи и лёгких также подтвердила наличие РНК коронавируса.

Несмотря на то, что пациентка умерла от ОРДСВ на фоне коронавирусной инфекции данные анамнеза не позволяют утверждать, что все 60 дней до госпитализации пациентка непрерывно переносила коронавирусную инфекцию, также отсутствие ПЦР тестирования на РНК SARS-CoV-2 при первых симптомах болезни не позволяет нам однозначно определить роль коронавируса в начале болезни. В связи с этим, мы считаем возможным заменить выбросы в данных на медианные значения для этого пациента (Рисунок 12).

## II волна коронавирусной инфекции

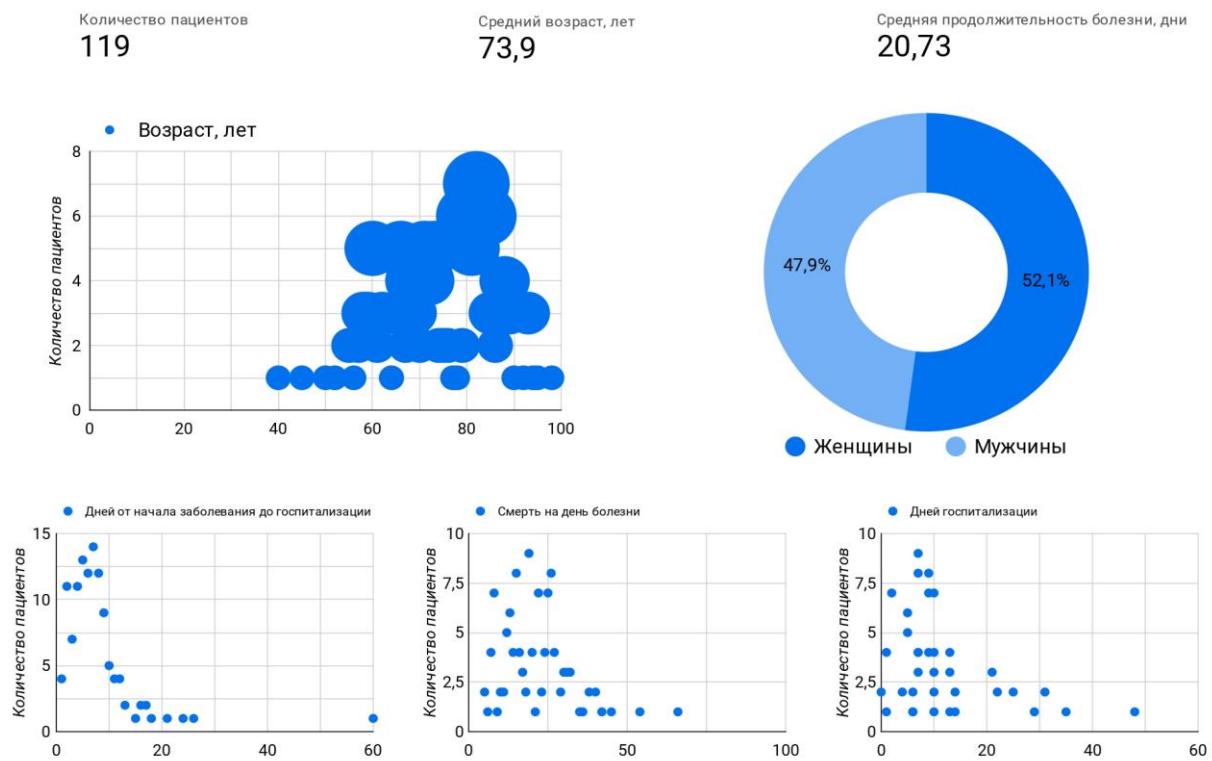


Рисунок 12 – Клинико-эпидемиологические показатели пациентов II волны коронавирусной инфекции

При поступлении течение коронавирусной инфекции по данным КТ определялось как лёгкое (процент поражения лёгочной ткани менее 25%) у 24 (20%) пациентов, как средне-тяжёлое (процент поражения лёгочной ткани 25-50%) у 38 (32%) пациентов, как тяжёлое (процент поражения лёгочной ткани 50-75%) у 33 (28%) пациентов, как крайне-тяжелое (процент поражения лёгочной ткани более 75%) у 24 (20%) пациентов.

14 (12%) пациентов имели нормальный уровень насыщения крови кислородом (более 95%), 40 (34%) пациентов имели уровень сатурации 92-95%, у 7 (6%) пациентов определялась тяжелая дыхательная недостаточность ( $spO_2$  менее 70%). У 58 (49%) сатурация измерялась на фоне кислородной поддержки, вследствие выраженной дыхательной недостаточности.

Всем пациентам было произведено стандартное лабораторное обследование при поступлении, включающее клинический анализ крови, общий анализ мочи, уровни СРБ, ферритина, тропонина I, прокальцитонина, D-димера, АЛТ, АСТ, креатинина, мочевины, МНО, маркеров вирусных гепатитов и микрореакцию.

У 51 (42%) пациентов при поступлении определялся нормальный уровень лимфоцитов в периферической крови (более  $1*10^9/\text{л}$  клеток), у 68 (57%) пациентов определялась лимфопения. Стоит обратить внимание на 1 пациента с резким выбросом уровня лимфоцитов из выборки -  $11,58 \times 10^9/\text{л}$  клеток. Эта пациентка с хроническим лимфолейкозом III стадии по Rai с двуростковой цитопенией и гепатосplenомегалией. Данная сопутствующая патология не является типичной для пациентов нашей выборки, вследствие этого, данный уровень лимфоцитов для последующего статистического анализа мы считаем целесообразным заменить на медианные значения.

Только у 1 (1%) пациента уровень СРБ был в пределах референсных значений (0-5 мг/л), у 37 (31%) пациентов было умеренное повышение уровня СРБ (5-49 мг/л), у 81 (68%) пациентов определялось выраженное повышение уровня СРБ (более 50 мг/л).

У 37 (31%) пациента уровень D-димера при поступлении был в пределах референсных значений (до 0,5 мкг/мл) и только у 10 (8%) уровень ферритина был в пределах референса (до 150 нг/мл). Прокальцитониновый тест был отрицательный у 90 (76%) пациентов при поступлении (уровень прокальцитонина менее 0,5 нг/мл), сомнительный у 17 (14%) пациентов (уровень прокальцитонина 0,5-2,0 нг/мл) и положительным у 12 (10%) пациентов (уровень прокальцитонина более 2,0 нг/мл).

У 111 (93%) пациентов уровень Тропонина I при поступлении был в пределах референсных значений (менее 1 нг/мл), у 7 (6%) пациентов уровень сердечного тропонина I был выше 1 нг/мл (Рисунок 13).

## II волна коронавирусной инфекции, обследование при поступлении

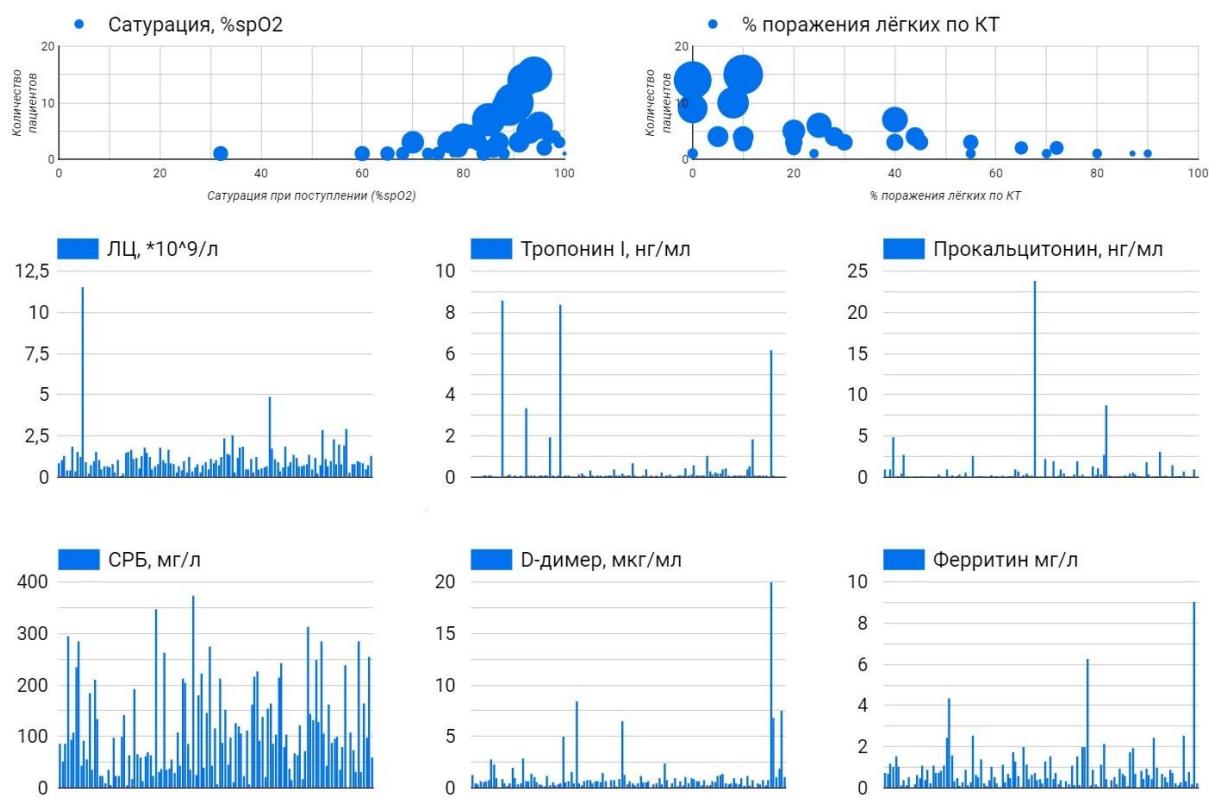


Рисунок 13 – Лабораторно-инструментальное обследование пациентов во II волну коронавирусной инфекции. Аббревиатуры: ЛЦ – лимфоциты, КТ – компьютерная томография, СРБ – С-реактивный белок

Всем пациентам при поступлении в стационар была выполнена электрокардиография. Фибрилляция предсердий была самым часто выявляемым нарушением ритма и была зарегистрирована у 52 (43,7%) пациентов. Полная блокада правой ножки пучка Гиса была самым частым нарушением проводимости и определялась у 12 (10%) пациентов. Полная блокада левой ножки и блокада передне-верхнего разветвления левой ножки пучка Гиса встречались у 7 (6%) и 6 (5%) пациентов соответственно. АВ-блокада I степени и предсердная экстрасистолия встречались у 6 (5%) пациентов. Остальные нарушения ритма и проводимости сердца встречались лишь у единичных пациентов из выборки.

Эхокардиография была выполнена у 80 (67%) пациентов. Фракция выброса левого желудочка по Симпсону была в диапазоне нормальных значений (более

55%) у 47 (40%) пациентов, сохранна (40-55%) у 19 (16%) и снижена (менее 40%) у 14 (12%) пациентов.

Сопутствующая сердечно-сосудистая патология включала в себя гипертоническую болезнь (ГБ), ишемическую болезнь сердца (ИБС), сахарный диабет (СД) и синдром хронической сердечной недостаточности (ХСН). ГБ была диагностирована у 106 (89%) пациентов, из них у 95 (80%) пациентов была выставлена III стадия, а у 11 (9%) II. I стадия ГБ не была выставлена ни у одного из пациентов. ИБС была задокументирована у 85 (71%) пациентов, СД - у 54 (45%) пациентов. ХСН I стадии была диагностирована у 4 (3%) пациентов, II стадии - у 31 (26%), III стадии - у 11 (9%) пациентов (Рисунок 14).

В соответствии с временными клиническими рекомендациями от 26.10.2020 по диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции лечение пациентов во вторую волну осуществлялось следующим образом (Таблица 8) [4].

## II волна коронавирусной инфекции, сопутствующая сердечно-сосудистая патология



Рисунок 14 – Сопутствующая сердечно-сосудистая патология у пациентов II волны коронавирусной инфекции. Аббревиатуры: АВ – атриовентрикулярная блокада, БПВРЛНПГ – блокада передне-верхнего разветвления левой ножки пучка Гиса, ГБ – гипертоническая болезнь, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ЖТ – желудочковая тахикардия, НБПНПГ – неполная блокада правой ножки пучка Гиса, ПБЛНПГ – полная блокада левой ножки пучка Гиса, ПБПНПГ – полная блокада правой ножки пучка Гиса, СССУ – синдром слабости синусового узла, ХСН – хроническая сердечная недостаточность

Таблица 8 – Схемы лечения пациентов во II волну коронавирусной инфекции

Форма заболевания	Схемы лечения
Легкие формы заболевания	Схема 1: Фавипиравир + ИФН- $\alpha$ , интраназальные формы + Эноксапарин натрия
	Схема 2: Гидроксихлорохин + ИФН- $\alpha$ , интраназальные формы + Эноксапарин натрия
	Схема 3: Умифеновир + ИФН- $\alpha$ , интраназальные формы + Эноксапарин натрия
Средне-тяжёлое течение	Схема 1: Фавипиравир + Барицитиниб или Тофацитиниб + Эноксапарин натрия
	Схема 2: Ремдесивир + Барицитиниб или Тофацитиниб + Эноксапарин натрия
	Схема 3: Гидроксихлорохин + Барицитиниб или Тофацитиниб + Эноксапарин натрия
	Схема 4: Фавипиравир + Олокизумаб или Левилимаб + Эноксапарин натрия
	Схема 5: Ремдесивир + Олокизумаб или Левилимаб + Эноксапарин натрия
	Схема 6: Гидроксихлорохин + Олокизумаб или Левилимаб + Эноксапарин натрия

Таблица 8 (продолжение) – Схемы лечения пациентов во II волну коронавирусной инфекции

Форма заболевания	Схемы лечения
Тяжелые формы	Схема 1: Фавипиравир + Тоцилизумаб или Сарилумаб + Эноксапарин натрия
Крайне-тяжелые формы с развитием цитокинового шторма	Схема 1: Метилпреднизолон + Тоцилизумаб или Сарилумаб + Эноксапарин натрия
	Схема 2: Дексаметазон + Тоцилизумаб или Сарилумаб + Эноксапарин натрия
	Схема 3: Метилпреднизолон или Дексаметазон + Канакинумаб + Эноксапарин натрия

Терапия вышеописанными препаратами осуществлялась следующими режимами введения:

- Гидроксихлорохин: аналогично I волне.
- Фавипиравир: для пациентов с массой тела < 75 кг: per os по 1600 мг 2 р/сут в 1-й день и далее по 600 мг 2 р/сут со 2 по 10 день. Для пациентов с массой тела 75 кг и более: per os по 1800 мг 2 раза/сут в 1-й день, далее по 800 мг 2 раза/сут со 2 по 10 день.
- ИФН- $\alpha$ , интраназальные формы: по 3 капли в каждый носовой ход (3000 МЕ) 5 раз в сутки в течение 5 дней
- Эноксапарин натрия: подкожно 100 анти-Ха МЕ (1 мг)/кг 2 раза в сутки, при клиренсе креатинина менее 30 мл/мин - 100 анти-Ха МЕ (1 мг)/кг 1 раз в сутки

- Умифеновир: per os 200 мг каждые 6 часов в течение 5-7 дней
- Барицитиниб: per os 4 мг 1 раз в сутки в течение 7-14 дней
- Тофацитиниб: per os 10 мг 2 раза в сутки в течение 7-14 дней
- Ремдесивир: 1-й день - 200 мг растворенные в 0,9 % натрия хлорида внутривенно капельно 1 раз в сутки. Со 2-го дня - 100 мг растворенные в 0,9 % натрия хлорида внутривенно капельно 1 раз в сутки до 10-ти дней.
- Тоцилизумаб: аналогично I волне.
- Сарилумаб: аналогично I волне.
- Метилпреднизолон: 1 мг/кг внутривенно каждые 12 часов в течение 3-ёх суток, с постепенным снижением дозы на 20-25% на введение каждые 1-2 суток в течение 3-4 суток, далее на 50% каждые 1-2 суток до полной отмены.
- Дексаметазон: по 10 мг внутривенно каждые 12 часов в течение 3-х суток с постепенным снижением дозы на 20-25% на введение каждые 1-2 суток, в течение 3-4 суток, далее на 50% каждые 1-2 суток до полной отмены.
- Канакинумаб: 4-8 мг/кг развести в 250 мл 5% раствора глюкозы, внутривенно капельно однократно. В некоторых случаях препарат вводили повторно в том же режиме через 12 часов от первого введения.

Лекарственный мониторинг был аналогичен пациентам первой волны коронавирусной инфекции.

Наиболее частыми осложнениями коронавирусной инфекции в ходе госпитализации за исключением ОРДСВ стали: геморрагический синдром (у 12 (10%) пациентов), тромбоэмболия лёгочной артерии (у 7 (6%) пациентов), гнойно-септические осложнения (у 6 (5%) пациентов) и спонтанный пневмоторакс (у 5 (4%) пациентов).

Морфологическое исследование сердец умерших пациентов выявило основные изменения в миокарде у пациентов этой волны (Рисунок 15).

### II волна коронавирусной инфекции, морфологические изменения в миокарде



Рисунок 15 – Гистологическое исследование миокарда пациентов, умерших во II волну коронавирусной инфекции

Так в 29 случаях (24%) в миокарде был выявлен отёк с фибрином, также в 29 (24%) случаев определялись кровоизлияния в строму миокарда. У 27 (23%) обнаружена выраженная фрагментация мышечных волокон, у 28 (24%) пациентов — спазм интрамиокардиальных артерий. У 13 (11%) пациентов — ишемический инфаркт миокарда, у 11 (9%) — некоронарогенные некрозы миокарда.

Остальные морфологические изменения были выявлены реже. Так у 10 (7%) — очаговое плазматическое пропитывание стенки, у 7 (6%) пациентов был выявлен геморрагический инфаркт миокарда, у 8 (7%) — тромбы в интрамуральных артериях, у 5 (3%) — инфильтративный васкулит, у 6 (4%) — лимфоцитарный

перикардит, у 5 (4%) — лейкоцитарные стазы. Наличие крупных полиморфных клеток, располагающихся в зоне сосудов было обнаружено только в 1 (1%) случае.

Изменения в миокарде, свидетельствующие о хронических заболеваниях сердца включали в себя выраженную гипертрофию миокарда у 71 (60%) пациентов, выраженное атеросклеротическое поражение коронарных артерий у 68 (57%) пациентов, постинфарктные рубцы у 31 (26%) пациентов, диффузный мелкоочаговый кардиосклероз у 75 (63%) пациентов, липоматоз у 12 (10%) пациентов (Рисунок 16).

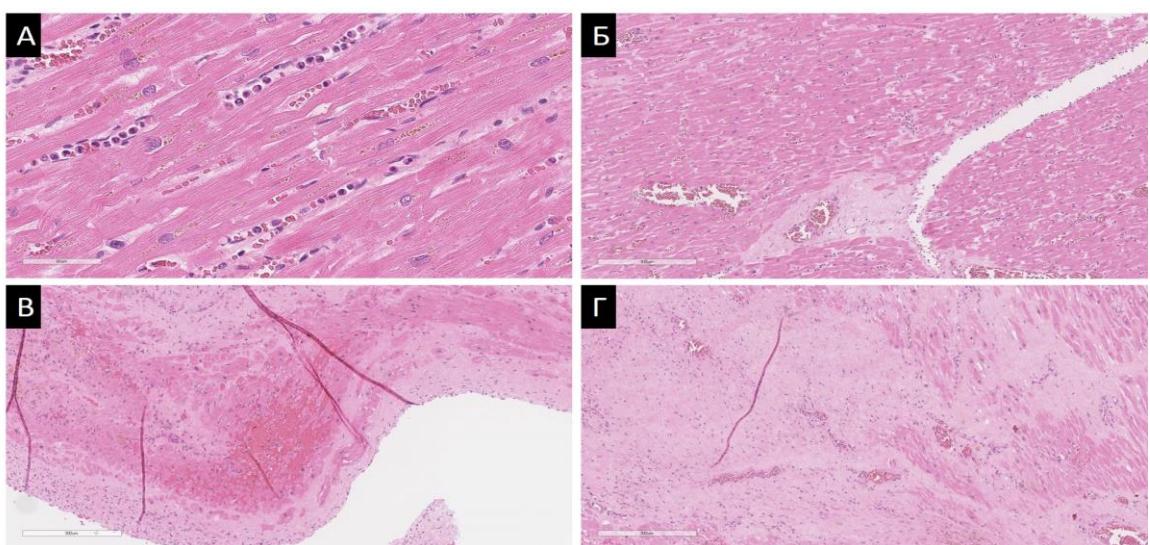


Рисунок 16 – Морфологические изменения в миокарде у пациентов II волны коронавирусной инфекции. А – лейкоцитарные стазы в миокарде; увеличение 200; Б – фрагментация мышечных волокон и очаговые кровоизлияния в строму; увеличение 100; В – кровоизлияния в строму миокарда; увеличение 200; Г – постинфарктный кардиосклероз; увеличение 100. Окраска гематоксилин-эозин

Лимфоцитарный активный миокардит был заподозрен и подтвержден иммуногистохимически только в одном случае (менее 1%). У данного пациента определялся активный лимфоцитарный миокардит с выраженной воспалительной реакцией в миокарде. При иммуногистохимическом исследовании была выявлена реакция гуморального иммунитета с экспрессией С1q-компонента комплемента и MHC I, однако экспрессии HLA-DR обнаружено не было. Также была выявлена диффузная интенсивная экспрессия VP1-антитела энтеровирусов в стенках сосудов

и в кардиомиоцитах (4 балла по условной шкале). Максимальные очаговые инфильтраты насчитывали до 123 CD3+Т-лимфоцитов/мм<sup>2</sup>, среднее количество CD3+Т-лимфоцитов составило 86 клеток/мм<sup>2</sup>. В данном случае не было выявлено CD8+Т-лимфоцитов, среднее количество CD68+позитивных макрофагов составило 38 клеток/мм<sup>2</sup>. Также в этом случае наблюдалась экспрессия VWF на эндотелии сосудов с оценкой в 3 балла по условной шкале, Ang1 – на эндотелии и в саркоплазме кардиомиоцитов (по 4 балла), экспрессия VEGF только на эндотелии с оценкой в 4 балла по условной шкале. Иммуногистохимическая экспрессия spike SARS-CoV-2 в образцах миокарда этого пациента обнаружена не была (Рисунок 17). Для этого пациента мы провели ПЦР исследование миокарда левого желудочка, по результатам которого не было обнаружено присутствия последовательностей генов N и E коронавируса.

У пациента с лимфоцитарном миокардитом по клиническим данным была нормальная ФВ ЛЖ (65%), лимфопения ( $0,5 \times 10^9/\text{л}$ ), нормальный уровень тропонина I. Нарушений ритма и проводимости зарегистрировано не было.

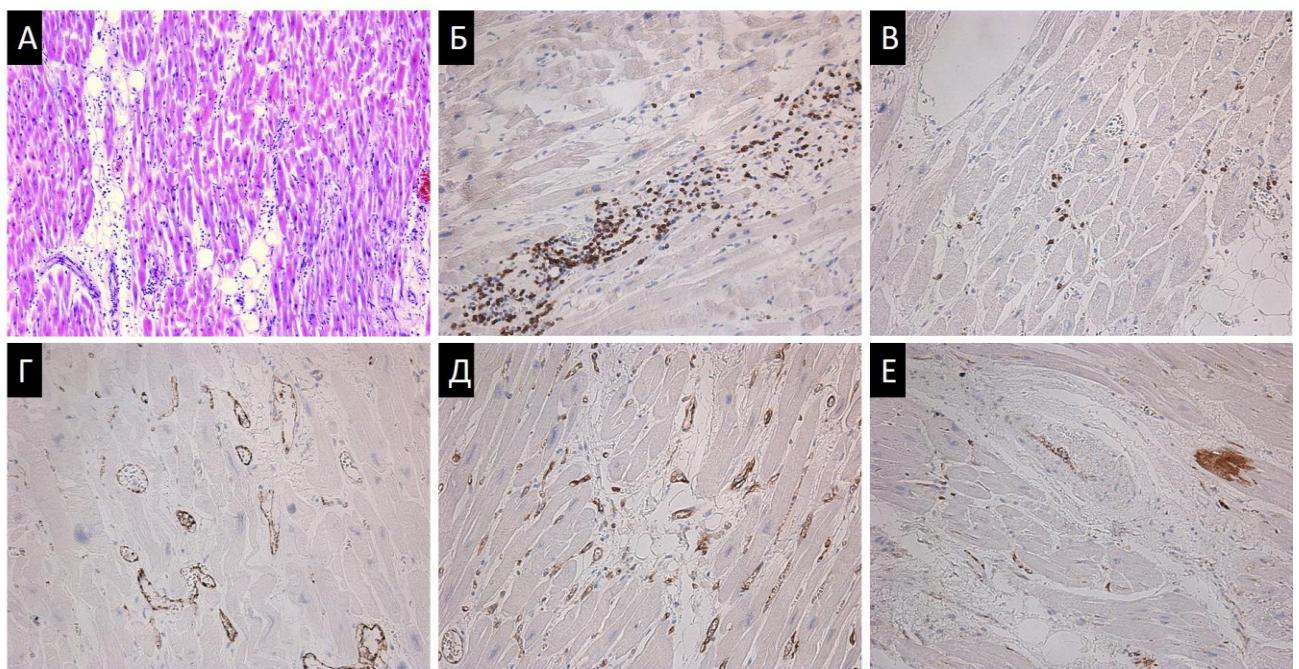


Рисунок 17 – Морфологическое исследование сердца пациента с миокардитом во II волну коронавирусной инфекции. А – агрессивная мононуклеарная инфильтрация миокарда, липоматоз, дистрофия и некроз кардиомиоцитов; окраска гематоксилин-эозин; Б – иммуноокрашивание с CD3: до 123 CD3+Т-лимфоцитов/мм<sup>2</sup>, среднее количество CD3+Т-лимфоцитов составило 86 клеток/мм<sup>2</sup>; В – иммуноокрашивание с CD68: среднее количество 38 клеток/мм<sup>2</sup>; Г-Е – иммуноокрашивание с VWF, VEGF и Ang1 соответственно. А-Е – увеличение 200

У пациента с лимфоцитарном миокардитом по клиническим данным была сохранная ФВ ЛЖ (65%), лимфопения ( $0,5 \times 10^9/\text{л}$ ), нормальный уровень тропонина I. Нарушений ритма и проводимости зарегистрировано не было.

В целом у умерших больных с коронавирусной инфекцией во вторую волну без гистологически верифицированного миокардита мы также выявили экспрессию Ang1, VEGF, VWF. Таким образом, наиболее частыми находками в сердце во вторую волну коронавирусной инфекции были выраженный отек стромы с выпотом фибрина, кровоизлияния и спазм сосудов. Оставались также признаки активации эндотелия сосудов, но без дисплазии и гипертрофии клеток. Выраженная эндотелиальная пролиферация и проявления ангиопатии по сравнению с первой волной выявлялись реже. Лимфоцитарный миокардит был выявлен всего у 1 пациента (1% случаев).

### 3.1.3 III волна коронавирусной инфекции

Третья волна коронавирусной инфекции в Санкт-Петербурге начиналась с июня 2021 года по сентябрь 2021 года. Центр Алмазова принимал пациентов в третью волну коронавирусной инфекции в период с 25 июня по сентябрь 2021 года. По данным эпидемиологических и генетических исследований в этот период в Санкт-Петербурге выявлялись только B.1.617.2 линия коронавируса (дельташтамм). 4 пациентов из этой волны были полностью вакцинированы Спутник V [19].

В третью волну коронавирусной инфекции в Центр Алмазова поступило 792 пациента, у 78 был летальный исход. В данное исследование были включены все пациенты из второй волны коронавирусной инфекцией с летальным исходом госпитализации.

Медианный возраст включенных в исследование пациентов составил 72 года (межквартильный размах: 61-82 лет), средний возраст - 71 год. 25 (32%) пациентов были мужского пола, 53 (68%) - женского.

Пациенты поступали в стационар на 8-е сутки от начала заболевания (межквартильный размах 6-10 суток) и умирали на 20-е сутки (межквартильный размах 14-26). Медианная продолжительность госпитализации составляла 12 дней (межквартильный размах 8-16 дней) (Рисунок 18).

### III волна коронавирусной инфекции

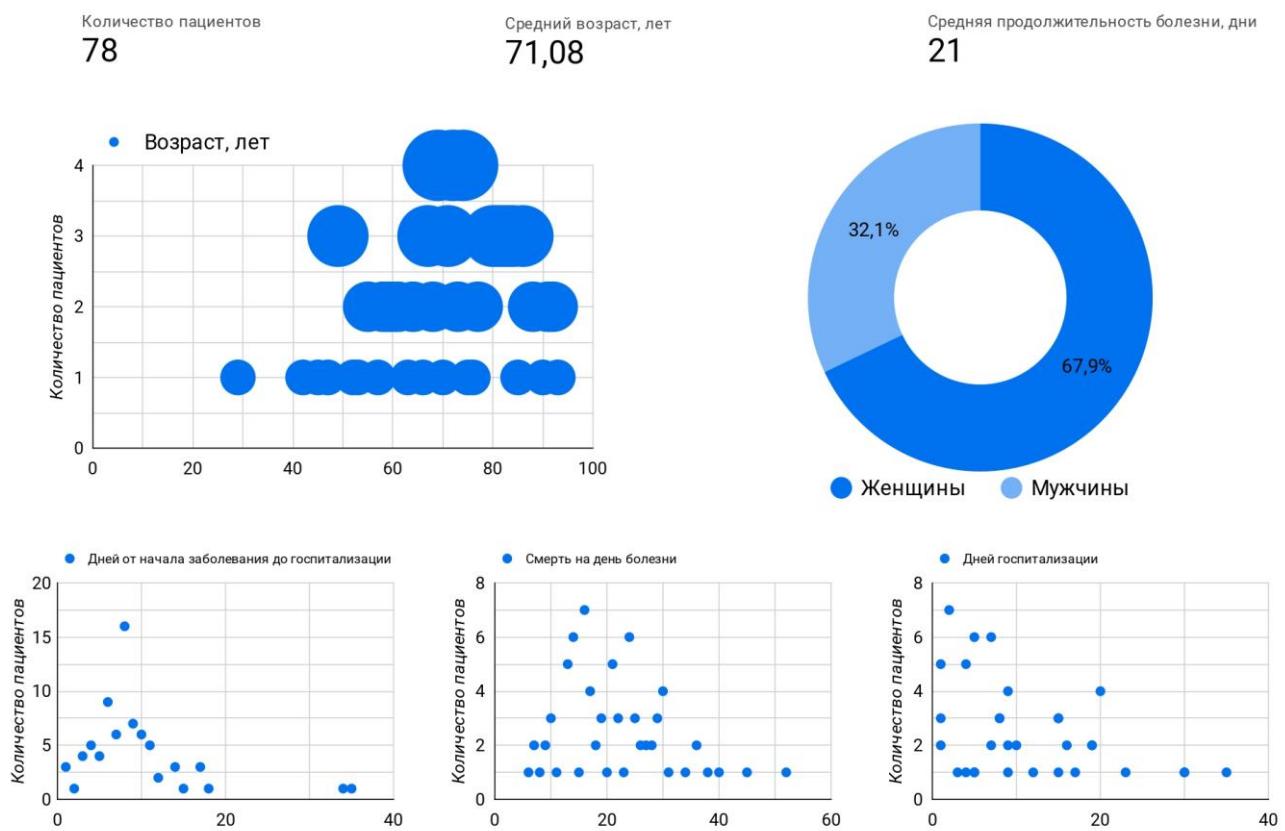


Рисунок 18 – Клинико-эпидемиологические показатели пациентов III волны коронавирусной инфекции

Стоит обратить внимание на двух пациентов, поступивших в стационар на 34-е и 35-е сутки после появления клинических симптомов болезни (резкий выброс из данных, отклонение более чем на 1,5 межквартильного размаха от верхнего квартиля выборки). Выдержка из истории болезни:

Пациент 1: считает себя больной с 02.06.2021г., когда впервые появились жалобы на кашель, одышку, повышение температуры тела до 38 С, по поводу чего обратилась за медицинской помощью к участковому терапевту: назначено симптоматическое и противовирусное лечение. На фоне проводимой терапии состояние со слабоположительной динамикой в виде снижения интенсивности кашля и одышки, однако повышение температуры до субфебрильных значений сохранялось. 06.07.2021г. повторный вызов участкового терапевта, по поводу

ухудшения состояния в виде нарастающей одышки и усиления сухого кашля. По данным КТ лёгких: КТ-картина полисегментарной вирусной пневмонии обоих лёгких (высокая вероятность COVID-19, КТ-2, 25% вовлечения паренхимы). В связи с прогрессирующим ухудшением состояния и данными КТ была госпитализирована в Центр на 35-е сутки после появления симптомов.

Пациент 2: Пациентка с длительным анамнезом гипертонической болезни III стадии, хронической сердечной недостаточности ІІв стадии 2 функционального класса, ХОБЛ эмфизематозный фенотип, стала отмечать прогрессирующую одышку и сухой кашель, по поводу чего была госпитализирована на 4-е сутки от начала симптомов в СПб ГБУЗ "Городскую Покровскую больницу", где была диагностирована двусторонняя полисегментарная пневмония средней степени тяжести КТ 2 степени. В связи с положительной динамикой от лечения и отрицательной ПЦР на РНК COVID-19 на 27-е сутки заболевания, пациентка была выписана на амбулаторное лечение. После выписки из стационара больная передвигалась только в пределах кровати. На 34-е сутки заболевания сын отметил появление одышки при двигательной активности в пределах кровати - одышку вызывал поворот в постели, движения, по поводу чего с представлением об ОКС пациентка была экстренно госпитализирована в Центр Алмазова. По результатам обследования данных в пользу острых форм ИБС не получено, тяжесть состояния при поступлении обусловлена эксикозом. Проводилась инфузационная терапия с отчетливым положительным эффектом. На 39-е сутки была выявлена РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР. На 38-е сутки после появления первых симптомов внезапно развилась брадисистолия, при начатых реанимационных мероприятиях – эпизод фибрилляции желудочков, купированный электроимпульсной терапией. В дальнейшем отмечалась бинодальная слабость с развитием брадисистолии, начата временная электрокардиостимуляция. Несмотря на проводимую терапию летальный исход наступил при явлениях нарастающей сердечно-сосудистой недостаточности на 38-е сутки заболевания.

Несмотря на то, что оба пациента умерли от ОРДСВ на фоне коронавирусной инфекции данные анамнеза первого пациента указывают на нетипичное протекание коронавирусной инфекции для пациентов III волны коронавируса, более того в связи с отсутствием данных о ПЦР-тестировании на РНК SARS-CoV-2 в начале болезни, мы не можем утверждать, что пациентка на протяжении 35 дней до госпитализации переносила коронавирусную инфекцию. В связи с вышеописанным мы считаем возможным заменить данные о сроках госпитализации для этой пациентки на медианные значения выборки. Потребность в госпитализации у второй пациентки наступила на 4-е сутки от начала болезни, и выброс в данных в этом случае обусловлен первоначальной госпитализацией в другой стационар. В связи с этим, эпидемиологические данные о поступлении и смерти для этой пациентки мы считаем возможным заменить на 4-е сутки и 35-е сутки.

При поступлении течение коронавирусной инфекции по данным КТ определялось как лёгкое (процент поражения лёгочной ткани менее 25%) у 21 (27%) пациентов, как средне-тяжёлое (процент поражения лёгочной ткани 25-50%) у 24 (31%) пациентов, как тяжёлое (процент поражения лёгочной ткани 50-75%) у 20 (26%) пациентов, как крайне-тяжелое (процент поражения лёгочной ткани более 75%) у 13 (16%) пациентов.

11 (14%) пациентов имели нормальный уровень насыщения крови кислородом (более 95%), 22 (28%) пациентов имели уровень сатурации 92-95%, у 2 (3%) пациентов определялась тяжелая дыхательная недостаточность ( $spO_2$  менее 70%). У 43 (55%) сатурация измерялась на фоне кислородной поддержки, вследствие выраженной дыхательной недостаточности.

Всем пациентам было произведено стандартное лабораторное обследование при поступлении, включающее клинический анализ крови, общий анализ мочи, уровни СРБ, ферритина, тропонина I, прокальцитонина, D-димера, АЛТ, АСТ, креатинина, мочевины, МНО, маркеров вирусных гепатитов и микрореакцию.

У 15 (19%) пациентов при поступлении определялся нормальный уровень лимфоцитов в периферической крови (более  $1 \times 10^9/\text{л}$  клеток), у 63 (81%) пациентов определялась лимфопения. Стоит обратить внимание на 1 пациента с резким выбросом уровня лимфоцитов из выборки -  $4.7 \times 10^9/\text{л}$  клеток. Эта пациентка с хроническим лимфолейкозом III стадии по Rai с тяжелой двусторонней цитопенией и гепатосplenомегалией. Данная сопутствующая патология не является типичной для пациентов нашей выборки, вследствие этого, данный уровень лимфоцитов для последующего статистического анализа мы считаем целесообразным заменить на медианные значения.

Только у 3 (4%) пациентов уровень СРБ был в пределах референсных значений (0-5 мг/л), у 26 (33%) пациентов было умеренное повышение уровня СРБ (5-49 мг/л), у 49 (63%) пациентов определялось выраженное повышение уровня СРБ (более 50 мг/л).

У 33 (42%) пациентов уровень D-димера при поступлении был в пределах референсных значений (до 0,5 мкг/мл) и только у 5 (6%) пациентов уровень ферритина был в пределах референса (до 150 нг/мл). Прокальцитониновый тест был отрицательный у 65 (83%) пациентов при поступлении (уровень прокальцитонина менее 0,5 нг/мл), сомнительный у 8 (10%) пациентов (уровень прокальцитонина 0,5-2,0 нг/мл) и положительным у 5 (6%) пациентов (уровень прокальцитонина более 2,0 нг/мл).

У 73 (94%) пациентов уровень Тропонина I при поступлении был в пределах референсных значений (менее 1 нг/мл), у 3 (4%) пациентов уровень сердечного тропонина I был выше 1 нг/мл, у 2 (3%) пациентов уровень Тропонина I не измерялся во время госпитализации (Рисунок 19).

Всем пациентам при поступлении в стационар была выполнена электрокардиография. Фибрилляция предсердий была самым часто выявленным нарушением ритма и была зарегистрирована у 30 (38,5%) пациентов. Полная блокада левой ножки пучка Гиса была самым частым нарушением проводимости и

определялась у 10 (13%) пациентов. Полная блокада правой ножки встречалась у 9 (12%). Желудочковая экстрасистолия и блокада передне-верхнего разветвления левой ножки пучка Гиса встречались у 5 (6%) пациентов. Остальные нарушения ритма и проводимости сердца встречались лишь у единичных пациентов из выборки.

### III волна коронавирусной инфекции, обследование при поступлении

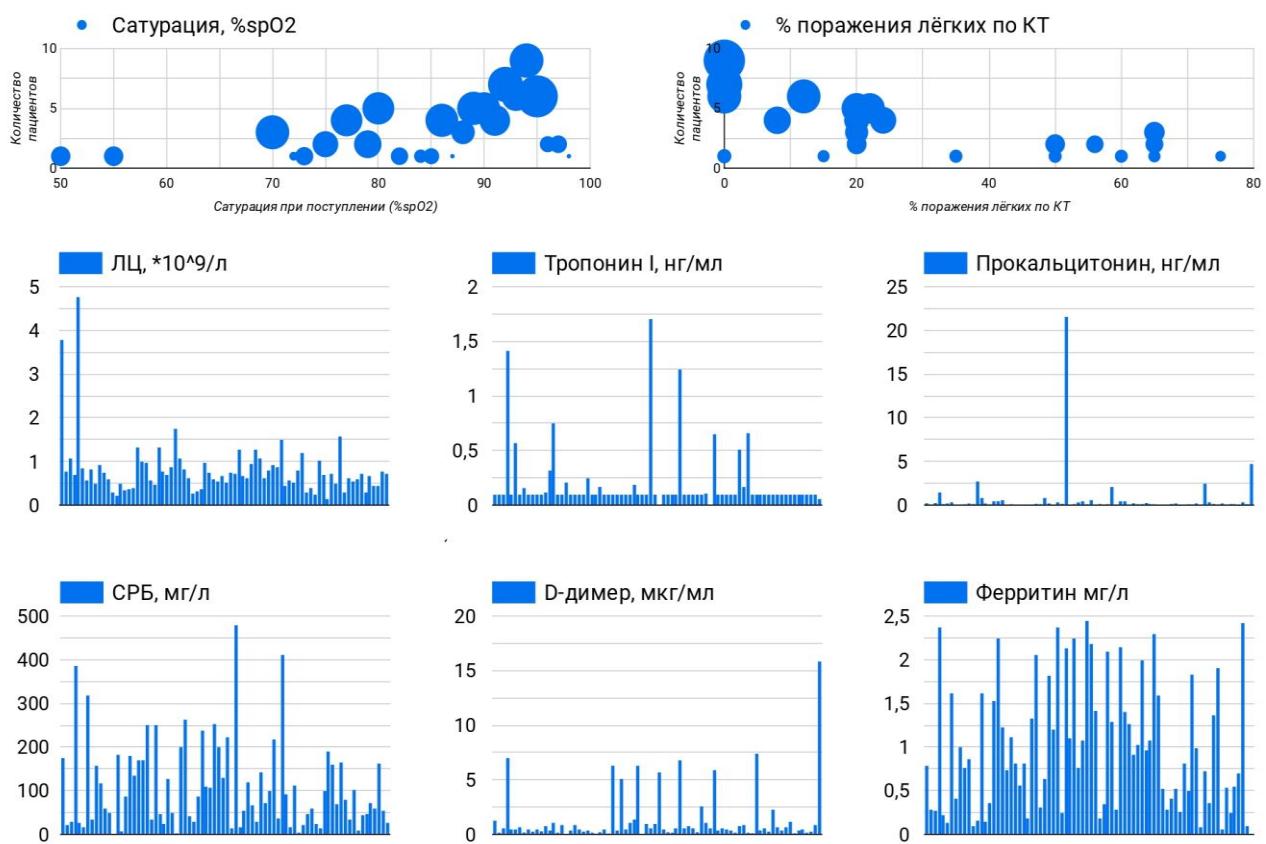


Рисунок 19 – Лабораторно-инструментальное обследование пациентов в III волну коронавирусной инфекции. Аббревиатуры: КТ – компьютерная томография, ЛЦ – лимфоциты, СРБ – С-реактивный белок

Эхокардиография была выполнена у 38 (49%) пациентов. Фракция выброса левого желудочка по Симпсону была в диапазоне нормальных значений (более 55%) у 26 (33%) пациентов, сохранна (40-55%) у 4 (5%) и снижена (менее 40%) у 8 (10%) пациентов.

Сопутствующая сердечно-сосудистая патология включала в себя ГБ, ИБС, СД и ХСН. ГБ была диагностирована у 77 (99%) пациентов, из них у 56 (72%) пациентов была выставлена III стадия, у 15 (19%) II, у 2 (3%) I стадия ГБ. ИБС была задокументирована у 32 (41%) пациентов, СД - у 38 (49%) пациентов. ХСН I стадии была диагностирована у 1 (1%) пациентов, II стадии - у 22 (28%), III стадии - у 42 (54%) пациентов (Рисунок 20).

#### III волна коронавирусной инфекции, сопутствующая сердечно-сосудистая патология

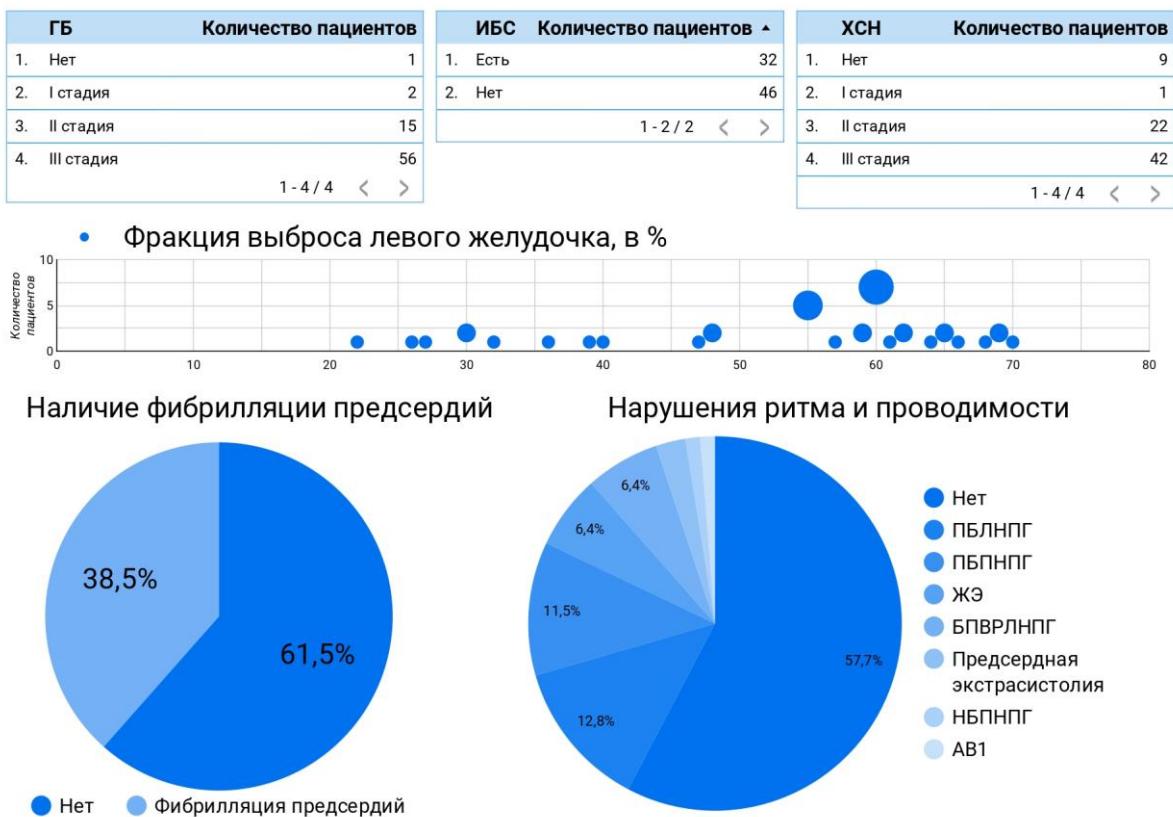


Рисунок 20 – Сопутствующая сердечно-сосудистая патология у пациентов III волны коронавирусной инфекции. Аббревиатуры: АВ-1 – атриовентрикулярная блокада 1-ой степени, БПВРЛНПГ – блокада передне-верхнего разветвления левой ножки пучка Гиса, ГБ – гипертоническая болезнь, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ЖЭ – желудочковая экстрасистолия, НБПНПГ – неполная блокада правой ножки пучка Гиса, ПБЛНПГ – полная блокада левой ножки пучка Гиса, ХСН – хроническая сердечная недостаточность

В соответствии с временными клиническими рекомендациями от 07.05.2021 по диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции лечение пациентов в третью волну осуществлялось следующим образом (Таблица 9) [5].

Таблица 9 – Схемы лечения пациентов в III волну коронавирусной инфекции

Форма заболевания	Схемы лечения
Легкие формы заболевания	Схема 1: Фавипиравир + ИФН- $\alpha$ , интраназальные формы + Эноксапарин натрия
	Схема 2: Гидроксихлорохин + ИФН- $\alpha$ , интраназальные формы + Эноксапарин натрия
	Схема 3: Умифеновир + ИФН- $\alpha$ , интраназальные формы + Эноксапарин натрия
Средне-тяжёлое течение	Схема 1: Фавипиравир + Барицитиниб или Тофацитиниб или Нетакимаб + Эноксапарин натрия
	Схема 2: Ремдесивир + Барицитиниб или Нетакимаб + Эноксапарин натрия
	Схема 3: Фавипиравир + Олокизумаб или Левилимаб + Эноксапарин натрия
Тяжелые формы	Схема 1: Фавипиравир + Тоцилизумаб или Сарилумаб + Эноксапарин натрия
	Схема 2: Ремдесивир + Тоцилизумаб или Сарилумаб + Эноксапарин натрия

Таблица 9 (продолжение) – Схемы лечения пациентов в III волну коронавирусной инфекции

Форма заболевания	Схемы лечения
Крайне-тяжелые формы с развитием цитокинового шторма	Схема 1: Метилпреднизолон + Тоцилизумаб или Сарилумаб + Эноксапарин натрия
	Схема 2: Дексаметазон + Тоцилизумаб или Сарилумаб + Эноксапарин натрия
	Схема 3: Метилпреднизолон или Дексаметазон + Канакинумаб + Эноксапарин натрия
	Схема 4: Метилпреднизолон или Дексаметазон + Эноксапарин натрия
	Схема 5: Тоцилизумаб или Сарилумаб или Канакинумаб + Эноксапарин натрия
	Схема 6: Метилпреднизолон или Дексаметазон + Левилимаб + Эноксапарин натрия

Терапия вышеописанными препаратами осуществлялась режимами введения аналогичными для второй волны. Режим введения дополнительных препаратов (не использовавшихся во II волну):

- Нетакимаб: 120 мг подкожно 1 раз в неделю на неделях 0, 1 и 2
- Левилимаб: 324 мг с помощью шприц-ручки подкожно однократно
- Олокизумаб: внутривенно раствор препарата 160 мг/мл - 0,8 мл однократно

Лекарственный мониторинг был аналогичен пациентам первой волны коронавирусной инфекции.

Наиболее частыми осложнениями коронавирусной инфекции в ходе госпитализации за исключением ОРДСВ стали: геморрагический синдром (у 10 (8%) пациентов), тромбоэмболия лёгочной артерии (у 5 (6%) пациентов), гноино-септические осложнения (у 5 (6%) пациентов) и спонтанный пневмоторакс (у 4 (5%) пациентов).

Морфологическое исследование сердец умерших пациентов выявило основные изменения в миокарде у пациентов этой волны (Рисунок 21).

### III волна коронавирусной инфекции, морфологические изменения в миокарде

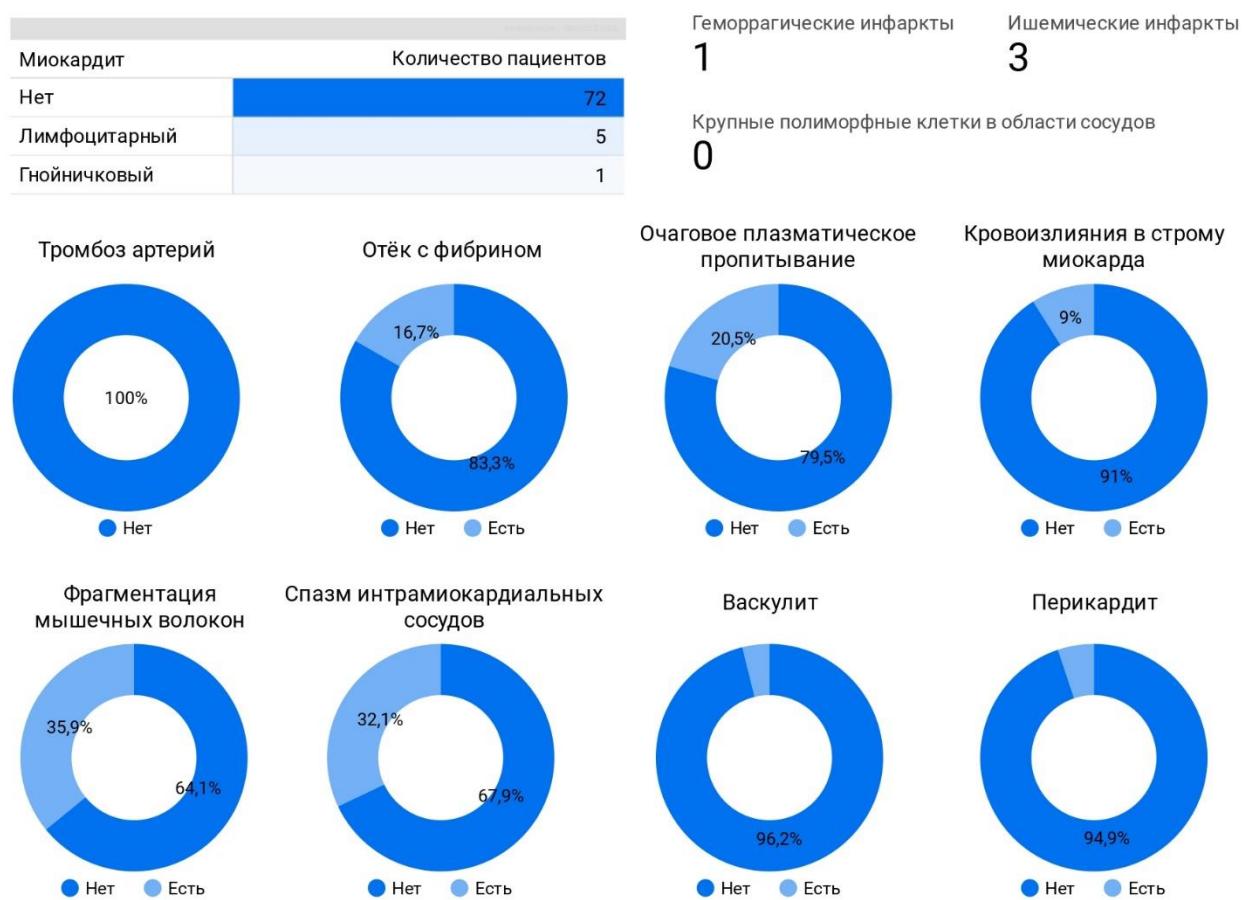


Рисунок 21 – Гистологическое исследование миокарда пациентов, умерших в III волну коронавирусной инфекции

Так у 28 (36%) пациентов обнаружена выраженная фрагментация мышечного волокна, у 25 (32%) пациентов — спазм интрамиокардиальных артерий, у 16 (21%) пациентов выявлено очаговое плазматическое пропитывание стенки сосудов, в 13 случаях (17%) в миокарде был выявлен отёк с фибрином, также в 7 (9%) случаев определялись кровоизлияния в строму миокарда (Рисунок 22).

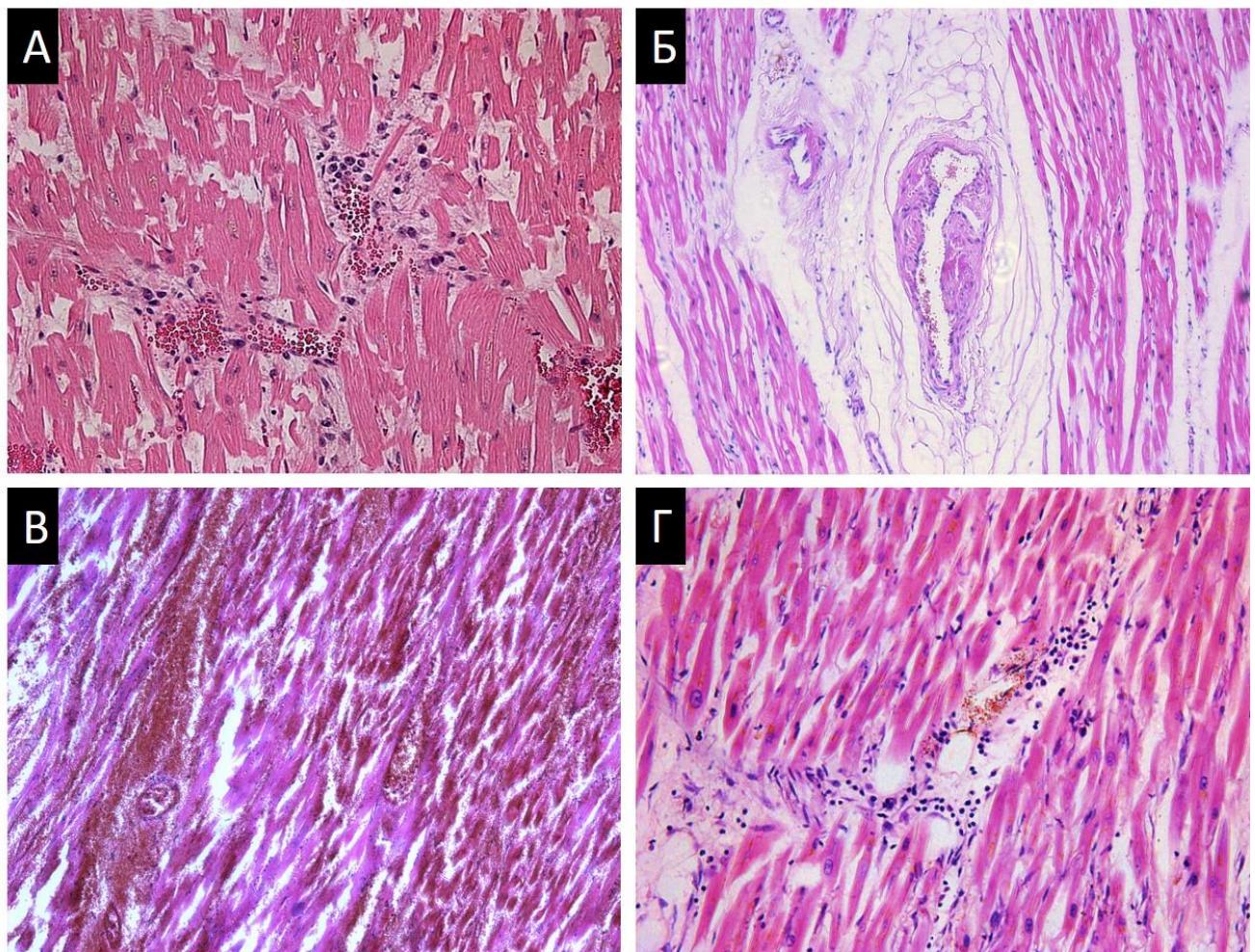


Рисунок 22 – Гистологические изменения в миокарде пациентов III волны коронавирусной инфекции. А – фрагментация мышечных волокон и периваскулярная воспалительная инфильтрация; Б – спазм артерий и очаговое плазматическое пропитывание; В – кровоизлияния в строму миокарда; Г – лимфоцитарный миокардит. А-Г – окраска гематоксилин-эозин, увеличение 200

Остальные морфологические изменения были выявлены реже. Так у 3 (4%) — ишемические инфаркты миокарда, у 3 (4%) — инфильтративный васкулит, у 4 (5%) — лимфоцитарный перикардит, у 5 (6%) — лейкоцитарные стазы, у 1(1%) —

геморрагические инфаркты. Наличие крупных полиморфных клеток, располагающихся в зоне сосудов не было обнаружено ни в одном случае, равно как и тромбоз интрамиокардиальных артерий.

Изменения в миокарде, свидетельствующие о хронических заболеваниях сердца включали в себя выраженную гипертрофию миокарда у 27 (35%) пациентов, выраженное атеросклеротическое поражение коронарных артерий у 29 (37%) пациентов, постинфарктные рубцы у 7 (9%) пациентов, диффузный мелкоочаговый кардиосклероз у 30 (38%) пациентов, липоматоз у 5 (6%) пациентов.

Лимфоцитарный активный миокардит был заподозрен и подтвержден иммуногистохимически в 5-ти случаях (6%). При иммуногистохимическом исследовании в 100% случаев была выявлена реакция гуморального иммунитета с экспрессией C1q-компонента комплемента, MHC I и HLA-DR. Также во всех случаях был выявлен VP1-антителен энтеровирусов. В двух случаях миокардита мы обнаружили CD8+T-лимфоциты среди прочего воспалительного инфильтрата. Во всех 5-ти случаях лимфоцитарного миокардита наблюдалась экспрессия VWF, Ang1 и VEGF. Иммуногистохимическая экспрессия spike SARS-CoV-2 в образцах миокарда этих пациентов была обнаружена в 2-ух случаях только на параваскулярных клетках с оценкой в 1 и 2 балла соответственно (Рисунок 23). Морфологические показатели пациентов с гистологическим диагнозом вирусного миокардита представлены в таблице 10.

Только у 2 (40%) больных с миокардитами, подтвержденными иммуногистохимическим анализом, было повышение тропонина I. Фракция выброса левого желудочка у пациентов с миокардитом была сохранена или нормальна. В большинстве случаев у пациентов с гистологическим подозрением на миокардит мы наблюдали лимфопению. В 3 случаях иммуногистохимически доказанного миокардита наблюдались нарушения ритма и проводимости. Ниже представлена таблица с описанием клинического и лабораторно-

инструментального обследования пациентов с гистологическим диагнозом лимфоцитарного миокардита (Таблица 11).

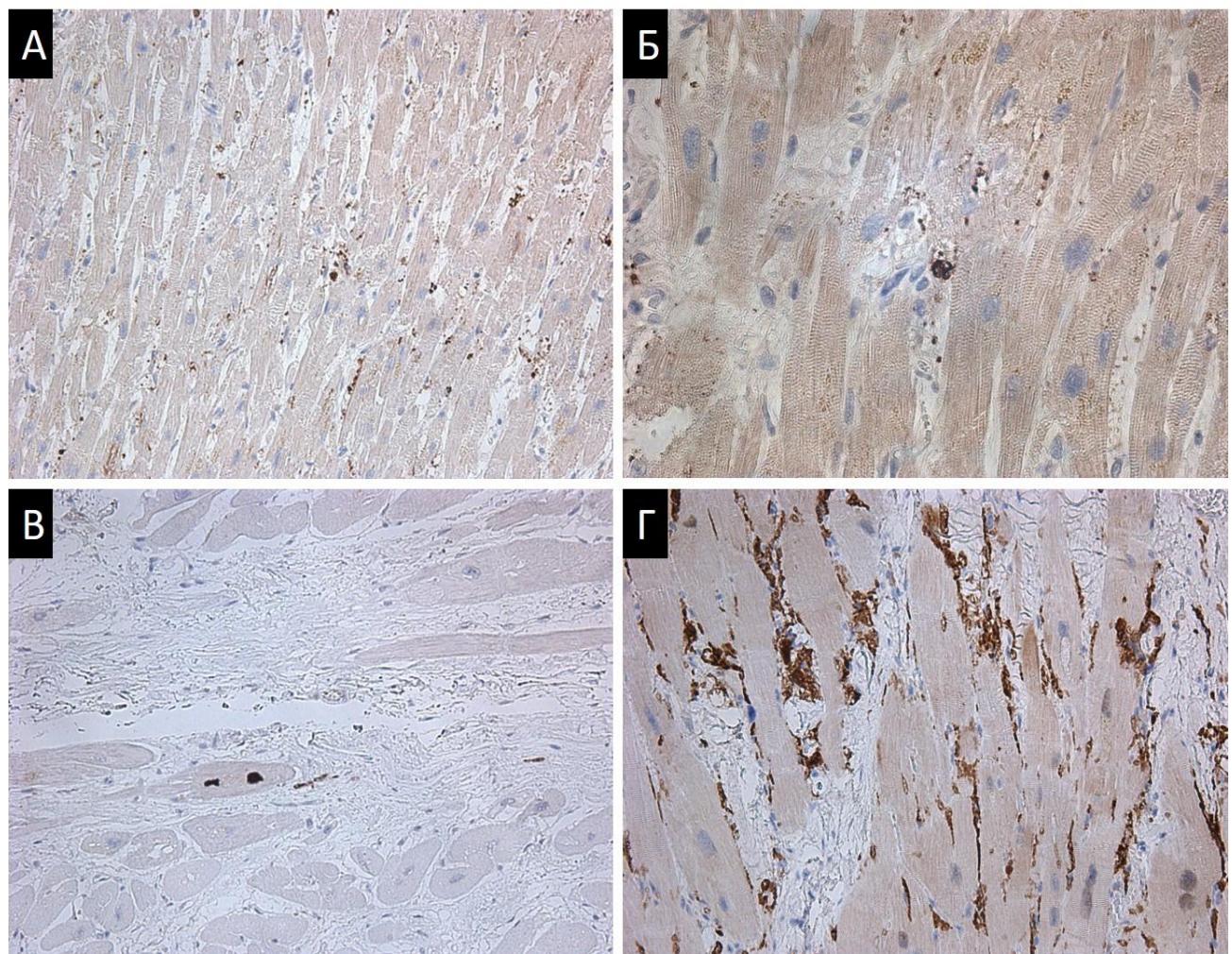


Рисунок 23 – Иммуногистохимическое исследование пациента III волны с подтвержденным иммуногистохимией миокардитом. А-В – экспрессия spike SARS-CoV-2 на эндотелии, периваскулярных клетках и на единичных кардиомиоцитах. Г – экспрессия VP1-EntV на эндотелии сосудов у этого же пациента. А-Г – увеличение 400

Таблица 10 – Морфологические показатели пациентов с гистологическим диагнозом вирусного миокардита

№	Изменения в миокарде	CD3 / мм <sup>2</sup>	CD68 / мм <sup>2</sup>	MH C1, балл	HLA-DR, балл	C1q, балл	VP1 EntV, балл	VEGF, балл	Ang1, балл	VWF, балл
1	Лимфоцитарный миокардит Диффузный кардиосклероз	19	56	4	4	4	Э 0, К 4	Э 1, К 0	Э 4, К 4	3
2	Лимфоцитарный миокардит	29	33	4	2	2	Э 0, К 2	Э 1, К 0	Э 4, К 4	4
3	Лимфоцитарный миокардит	7	25	4	2	2	Э 4, К 0	Э 4, К 4	Э 4, К 4	3
4	Лимфоцитарный миокардит	18	30	3	2	2	Э 4, К 0	Э 4, К 3	Э 4, К 4	3
5	Лимфоцитарный миокардит Выраженный фиброз эндокарда	98	41	4	4	4	Э 1, К 1	Э 4, К 4	Э 4, К 4	4

Аббревиатуры: Э – экспрессия на эндотелии; К – экспрессия в кардиомиоцитах

Таблица 11 – Клинико-лабораторные и инструментальные показатели умерших пациентов с гистологическим диагнозом вирусного миокардита

Параметр	Пациенты с иммуногистохимически подтверждённым хроническим лимфоцитарным миокардитом (n=8)
Возраст, лет	62 [61–68]
Время от появления симптомов до поступления в стационар, дни	4 [4–10]
Время от появления симптомов до смерти, дни	23 [20–23]
C-реактивный белок, мг/л	124.5 [161.0–250.0]
D-димер, мкг/мл	1.5 [1.3–4.9]
Тропонин I, нг/мл	270 [120–390]
Ферритин, мкг/л	1246 [420–3175]
Прокальцитонин, нг/мл	0.44 [0.35–0.94]
Лимфоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	0.59 [0.56–1.58]
Процент поражения лёгких по данным КТ при поступлении, %	83 [70–85]
SpO <sub>2</sub> , %	89 [85–91]

Таблица 11 (продолжение) – Клинико-лабораторные и инструментальные показатели умерших пациентов с гистологическим диагнозом вирусного миокардита

Параметр	Пациенты с иммуногистохимически подтверждённым хроническим лимфоцитарным миокардитом (n=8)
Фракция выброса левого желудочка при поступлении, %	62 [61–68]
Нарушения ритма и проводимости	Сочетание полной блокады передне-верхнего разветвления левой ножки пучка Гиса с желудочковой экстрасистолией и фибрилляцией предсердий, ЖЭ, ФП – 1 случай; фибрилляция предсердий – 2 случая

У умерших больных с коронавирусной инфекцией в третью волну без гистологически верифицированного миокардита мы также выявили экспрессию Ang1, VEGF, VWF. Таким образом, наиболее частыми находками в сердце в третью волну коронавирусной инфекции были активированный эндотелий сосудов. Выраженная эндотелиальная пролиферация и проявления ангиопатии по сравнению с первой волной выявлялись реже. Лимфоцитарный миокардит был выявлен у 5 пациентов (6% случаев). Также для пациентов с иммуногистохимически подтвержденным миокардитом мы провели ПЦР исследование тканей миокарда левого желудочка, выделенных из FFPE препаратов, по результатам которого не было обнаружено присутствия последовательностей генов N и E коронавируса.

Для двух пациентов из III волны коронавирусной инфекции, у которых была обнаружена экспрессия spike SARS-CoV-2 на эндотелии и параваскулярных клетках миокарда мы провели иммунофлюоресцентное исследование с коктейлем антител VP1-EntV / spike SARS-CoV-2 и обнаружили колокализацию этих

антител как на мембранах эндотелиальных и параваскулярных клеток, так и в кардиомиоцитах (Рисунок 24, 25).

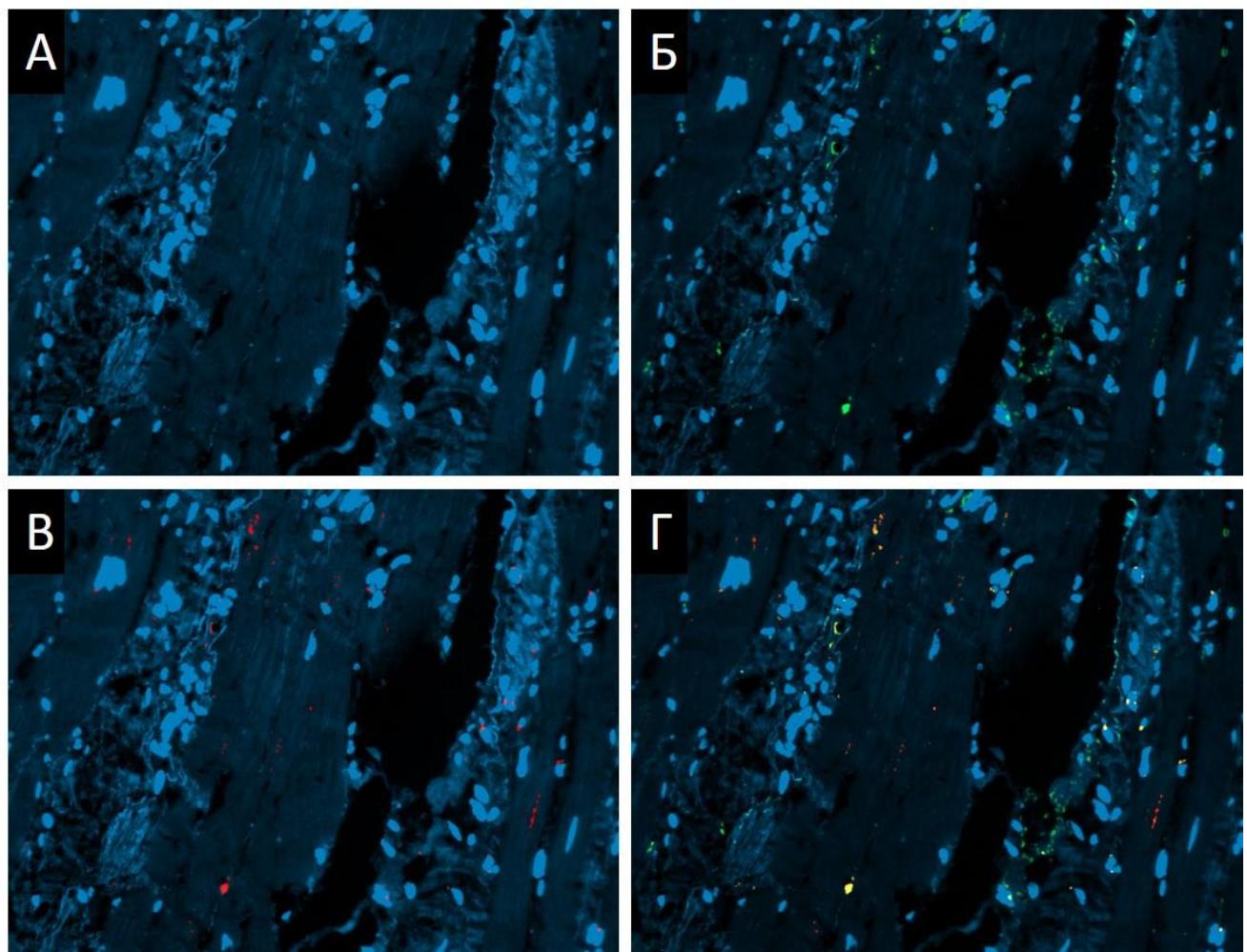


Рисунок 24 – Иммунофлюоресцентное исследование миокарда с коктейлем антител VP1-EntV / spike SARS-CoV-2. Колокализация антигенов вирусов в эндотелии. Зелёное свечение – spike SARS-CoV-2, красное – VP1-EntV, жёлтое и оранжевое свечение – колокализация маркеров.

Ядра контрастированы DAPI; увеличение 200

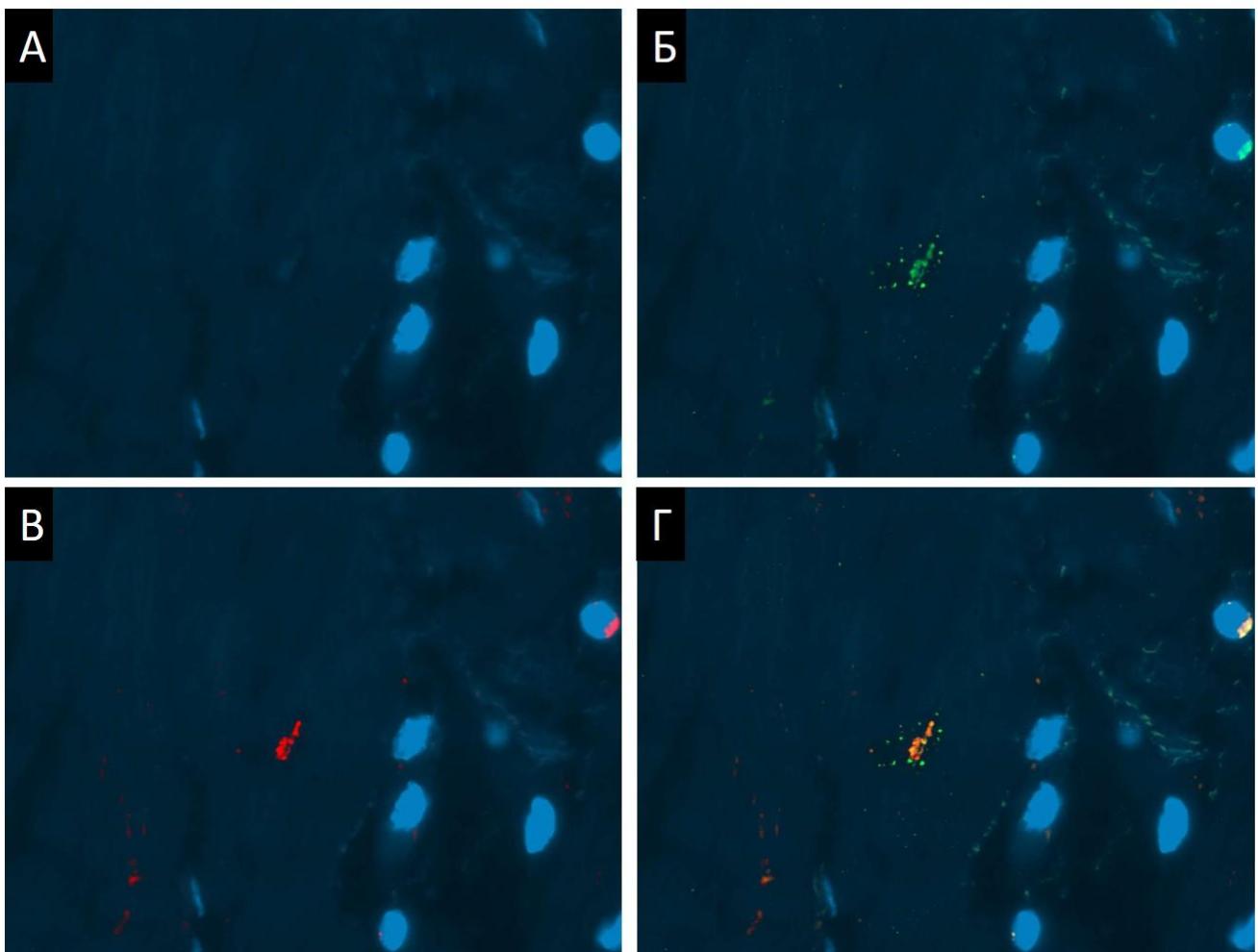


Рисунок 25 – Иммунофлюоресцентное исследование миокарда с коктейлем антител VP1-EntV / spike SARS-CoV-2. Колокализация антигенов вирусов в саркоплазме кардиомиоцитов. Зелёное свечение – spike SARS-CoV-2, красное свечение – VP1-EntV, жёлтое и оранжевое свечение – колокализация маркеров. Ядра контрастированы DAPI; увеличение 630

### 3.1.4 IV волна коронавирусной инфекции

Четвертая волна коронавирусной инфекции в Санкт-Петербурге началась с июня 2021 года по сентябрь 2021 года. Центр Алмазова принимал пациентов в третью волну коронавирусной инфекции в период с февраля по апрель 2022 года. По данным эпидемиологических и генетических исследований в этот период в Санкт-Петербурге выявлялись преимущественно B.1.1.529 линия коронавируса (омикрон-штамм) и B.1.617.2 линия коронавируса (дельта-штамм) [1].

В исследование были включены два пациента из IV волны коронавируса, которым удалось провести патологоанатомическое вскрытие через 30 минут после смерти и забрать образцы миокарда для проведения электронной микроскопии в период до 6 часов от момента смерти. В связи с тем, что в исследование включены пациенты, проходившие лечение не в Центре, клиническая информация о течении заболевания крайне ограничена. Включенные пациенты были: 88-летняя женщина, умершая на 7-ой день госпитализации и 79-летний мужчина, умерший на 45-ый день госпитализации. В обоих случаях причиной смерти стал острый респираторный дистресс синдром взрослых на фоне субтотальной вирусной пневмонией, подтвержденной посмертным ПЦР тестированием на РНК SARS-CoV-2 в образцах трахеи и лёгких. Посмертное секвенирование генома РНК SARS-CoV-2 в обоих случаях выявило B.1.1.529 линию коронавируса.

Гистологическое исследование в обоих случаях не выявило острых патологических изменений в миокарде. При иммуногистохимическом исследовании у пациента 1 в эндотелии сосудов миокарда была обнаружена экспрессия Spike SARS-CoV-2. Для обоих пациентов было проведено ПЦР исследование тканей миокарда, у пациента 1 были выявлены субпороговые значения копий РНК коронавируса в ткани миокарда (Таблица 12).

Таблица 12 – ПЦР-исследование тканей миокарда пациентов IV волны

Образец миокарда	Cq ORF1	Cq ORF8	Cq N
1	31,10	32,85	34,27
2	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено

При электронной микроскопии тканей миокарда мы обнаружили небольшое количество округлых мембранных частиц, диаметром 75-120нм, сходных по морфологии с вирионами SARS-CoV-2, на апикальной поверхности некоторых

эндотелиоцитов миокарда у данной пациентки (Рисунок 26). Однако, из-за теоретической возможности ошибочной идентификации клеточных структур на ультратонких срезах аутопсий, полная достоверность полученных данных была не достигнута. Тем не менее, данные о субпороговом уровне РНК коронавируса по результатам ПЦР-исследования и иммуногистохимическое обнаружение антигенов SARS-CoV-2 в эндотелии сосудов этой больной позволяют утверждать, что все-таки ультраструктурные частицы соответствуют вирионам коронавируса SARS-CoV-2. Стоит также отметить, что второй пациент, у которого результат ПЦР на SARS-CoV-2 был отрицательным, не имел подобных частиц в эндотелии миокарда при электронно-микроскопическом исследовании его аутопсии.

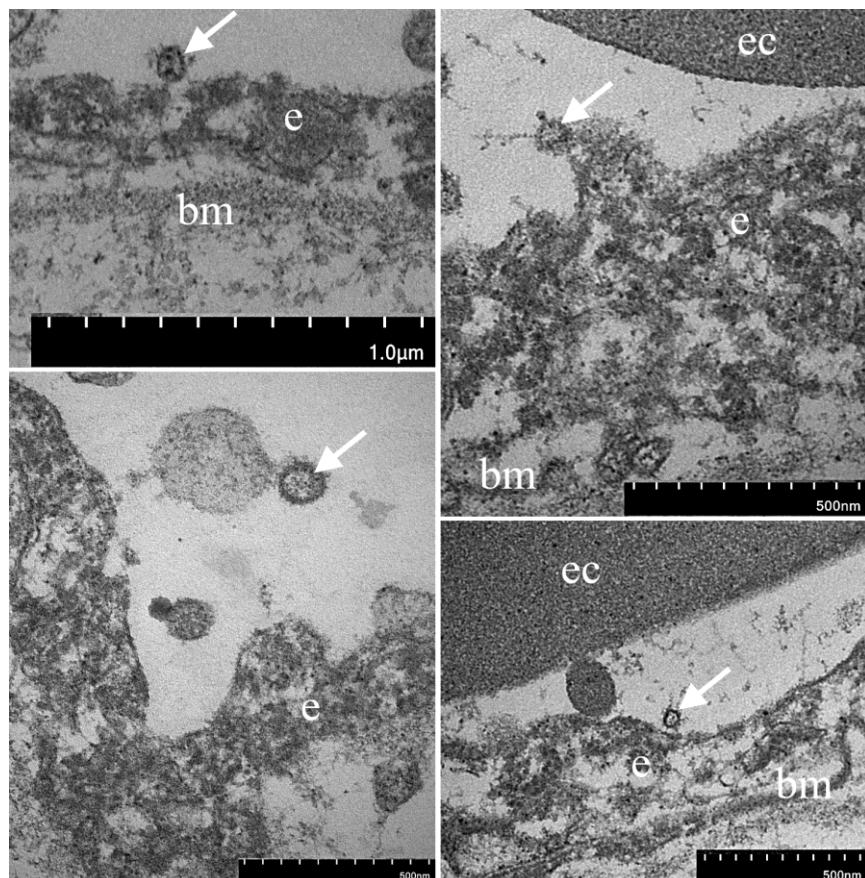


Рисунок 26 – Электронно-микроскопическое исследование сосудов миокарда. На апикальной поверхности эндотелиоцитов обнаруживаются мембранные частицы, морфологически сходные с вирионами SARS-CoV-2 (стрелки). Условные обозначения: е – эндотелиоциты, bm – базальная мембрана, ec – эритроциты

### 3.1.5 Сравнение клинико-морфологических изменений в различные волны коронавирусной инфекции

Наиболее частыми симптомами у поступавших в стационар пациентов всех четырех волн были симптомы интоксикационного синдрома в виде головных болей, слабости, мышечных болей, снижение аппетита и недомогание. Эти симптомы встречались практически у 100% пациентов, за исключением пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции, у которых собрать анамнез было невозможно. 2-ым по распространенности симптомом был сухой или влажный кашель, присутствующий более чем у 90% пациентов. Следующими по распространенности симптомами были одышка и ощущение заложенности в грудной клетке, встречающаяся более чем у 75% пациентов. Также частыми симптомами были тошнота, рвота, диарея, аносмия. Более редкими симптомами были ощущение горечи во рту, отёк лица, онемение конечностей и мигренозные головные боли. Значимых корреляций между наличием тех или иных симптомов и наличием миокардита не выявлено (при  $p < 0,05$ ).

Статистически достоверно (при  $p < 0,05$ ) у пациентов разных волн коронавирусной инфекции наблюдались некоторые различия в изменениях клинико-лабораторных показателей (Таблица 13). Так, пациенты в первую волну коронавирусной инфекции раньше поступали в стационар (время от появления симптомов до поступления в стационар), имели более высокие уровни D-димера, тропонина I, процента поражения лёгких по данным КТ по сравнению с пациентами II и III волн. Более того, пациенты I волны имели более выраженную лимфопению, чем пациенты II волны. Стоит отметить, что фракция выброса левого желудочка была минимальной у пациентов второй волны коронавирусной инфекции, что может быть объяснено преобладанием пациентов с сопутствующей сердечно-сосудистой патологией в нашей выборке (Рисунок 27). Полученные данные подтверждают более тяжёлое течение первой волны коронавируса по сравнению с последующими. Между второй и третьей волной статистически

значимых изменений в клинико-лабораторных показателях пациентов за исключением фракции выброса левого желудочка обнаружено не было.

Таблица 13 (I часть) – Статистическая оценка изменений клинических, лабораторных и инструментальных показателей в различных волнах коронавирусной инфекции

Параметры	Сравнение I и II волны		
	p-value (U-критерий)	p-value (пермутационный тест)	Значимость связи
Возраст	0.114	0.066	не значима
Время от появления симптомов до поступления в стационар	0.000	0.001	значима
Время от появления симптомов до смерти	0.243	0.580	не значима
C-реактивный белок	0.117	0.788	не значима
D-димер	0.010	0.001	значима
Тропонин I	0.018	0.000	значима
Ферритин	0.052	0.082	не значима
Прокальцитонин	0.369	0.468	не значима
Лимфоциты	0.001	0.015	значима

Таблица 13 (I часть, продолжение) – Статистическая оценка изменений клинических, лабораторных и инструментальных показателей в различных волнах коронавирусной инфекции

Параметры	Сравнение I и II волны		
	p-value (U-критерий)	p-value (пермутационный тест)	Значимость связи
Процент поражения лёгких по данным КТ при поступлении	0.020	0.048	значима
SpO2	0.433	0.061	не значима
Фракция выброса левого желудочка при поступлении	0.000	0.001	значима

Таблица 13 (II часть) – Статистическая оценка изменений клинических, лабораторных и инструментальных показателей в различных волнах коронавирусной инфекции

Параметры	Сравнение I и III волны		
	p-value (U-критерий)	p-value (пермутационный тест)	Значимость связи
Возраст	0.890	0.763	не значима
Время от появления симптомов до поступления в стационар	0.000	0.002	значима
Время от появления симптомов до смерти	0.129	0.380	не значима

Таблица 13 (II часть, продолжение) – Статистическая оценка изменений клинических, лабораторных и инструментальных показателей в различных волнах коронавирусной инфекции

Параметры	Сравнение I и III волны		
	p-value (U-критерий)	p-value (пермутационный тест)	Значимость связи
C-реактивный белок	0.154	0.686	не значима
D-димер	0.081	0.117	значима
Тропонин I	0.633	0.051	не значима
Ферритин	0.344	0.402	не значима
Прокальцитонин	0.051	0.066	не значима
Лимфоциты	0.486	0.680	не значима
Процент поражения лёгких по данным КТ при поступлении	0.009	0.006	значима
SpO2	0.696	0.060	значима
Фракция выброса левого желудочка при поступлении	0.000	0.000	значима

Таблица 13 (III часть) – Статистическая оценка изменений клинических, лабораторных и инструментальных показателей в различных волнах коронавирусной инфекции

Параметры	Сравнение II и III волны		
	p-value (U-критерий)	p-value (пермутационный тест)	Значимость связи
Возраст	0.141	0.164	не значима
Время от появления симптомов до поступления в стационар	0.130	0.236	не значима
Время от появления симптомов до смерти	0.555	0.701	не значима
C-реактивный белок	0.893	0.768	не значима
D-димер	0.256	0.290	не значима
Тропонин I	0.525	0.717	не значима
Ферритин	0.546	0.260	не значима
Прокальцитонин	0.052	0.134	не значима
Лимфоциты	0.061	0.885	не значима
Процент поражения лёгких по данным КТ при поступлении	0.143	0.163	не значима

Таблица 13 (III часть, продолжение) – Статистическая оценка изменений клинических, лабораторных и инструментальных показателей в различных волнах коронавирусной инфекции

Параметры	Сравнение II и III волны		
	p-value (U-критерий)	p-value (пермутационный тест)	Значимость связи
SpO2	0.642	0.649	не значима
Фракция выброса левого желудочка при поступлении	0.018	0.009	значима

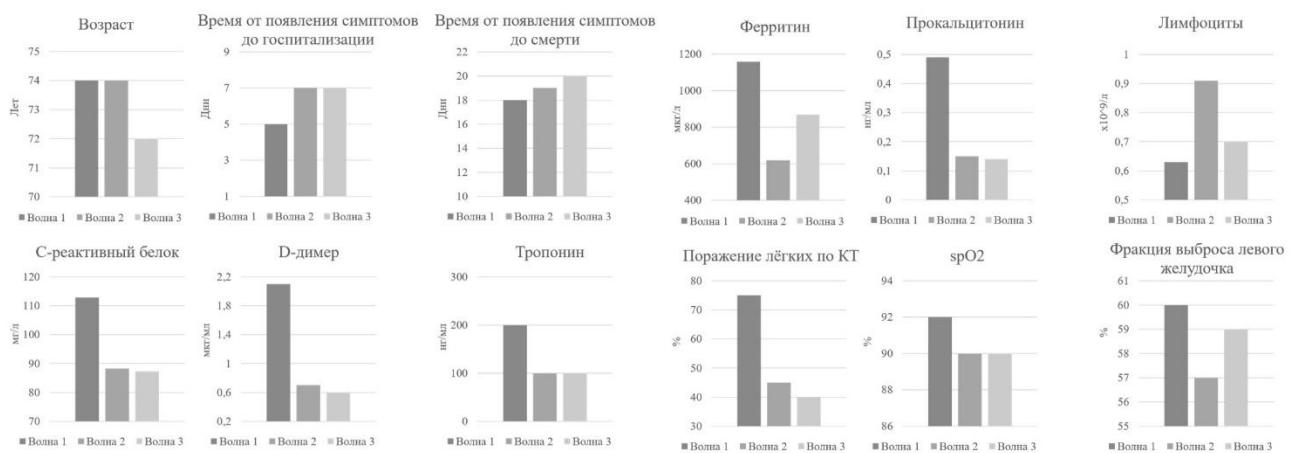


Рисунок 27 – Изменения в клинико-лабораторных данных в разные волны коронавирусной инфекции

Пациенты с гистологически верифицированным миокардитом были моложе, чем пациенты без миокардита в первую и вторую волны коронавируса, и старше, чем пациенты без миокардита в третьей волне коронавируса. Клинико-лабораторное обследование пациентов не выявило статистически значимых различий между пациентами с миокардитом и без него в различные волны коронавирусной инфекции, за исключением фракции выброса левого желудочка в первую волну: у пациентов с миокардитом ФВЛЖ была значимо ниже, чем у пациентов без миокардита (Таблица 14; Рисунок 28).

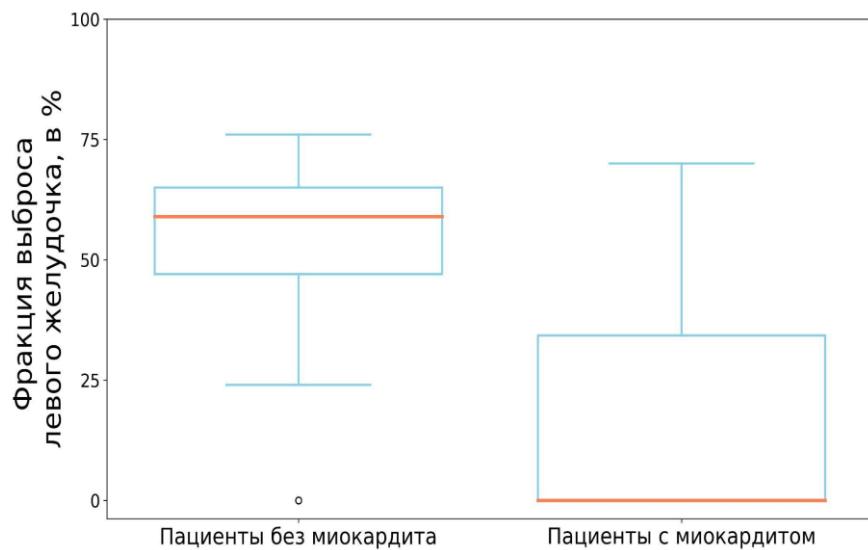


Рисунок 28 – Статистически значимые различия в фракции выброса левого желудочка у пациентов с и без лимфоцитарным миокардитом в I волну коронавирусной инфекции

Таблица 14 (I часть) – Статистическая оценка клинических, лабораторных и инструментальных показателей пациентов в связи с наличием или отсутствием миокардита для пациентов первой и третьей волн коронавирусной инфекции

Параметр	U-критерий Манна-Уитни		Пермутационный тест	
	I волна	I волна	I волна	I волна
	p-value	Значимость связи	p-value	Значимость связи
Возраст	0.236	не значима	0.389	не значима
Время от появления симптомов до поступления в стационар	0.282	не значима	0.561	не значима
Время от появления симптомов до смерти	0.783	не значима	0.703	не значима

Таблица 14 (I часть, продолжение) – Статистическая оценка клинических, лабораторных и инструментальных показателей пациентов в связи с наличием или отсутствием миокардита для пациентов первой и третьей волн коронавирусной инфекции

Параметр	U-критерий Манна-Уитни		Пермутационный тест	
	I волна		I волна	
	p-value	Значимость связи	p-value	Значимость связи
С-реактивный белок	0.175	не значима	0.284	не значима
D-димер	0.254	не значима	0.306	не значима
Тропонин I	0.213	не значима	0.320	не значима
Ферритин	0.354	не значима	0.405	не значима
Прокальцитонин	0.245	не значима	0.182	не значима
Лимфоциты	0.848	не значима	0.609	не значима
Процент поражения лёгких по данным КТ при поступлении	0.221	не значима	0.181	не значима
SpO <sub>2</sub>	0.993	не значима	0.223	не значима
Фракция выброса левого желудочка при поступлении	0.004	значима	0.000	значима

Таблица 14 (II часть) – Статистическая оценка клинических, лабораторных и инструментальных показателей пациентов в связи с наличием или отсутствием миокардита для пациентов первой и третьей волн коронавирусной инфекции

Параметр	U-критерий Манна-Уитни		Пермутационный тест	
	III волна	III волна	p-value	Значимость связи
Возраст	0.275	не значима	0.312	не значима
Время от появления симптомов до поступления в стационар	0.689	не значима	0.962	не значима
Время от появления симптомов до смерти	0.791	не значима	0.737	не значима
C-реактивный белок	0.262	не значима	0.262	не значима
D-димер	0.348	не значима	0.934	не значима
Тропонин I	0.724	не значима	0.120	не значима
Ферритин	0.458	не значима	0.502	не значима
Прокальцитонин	0.799	не значима	0.819	не значима
Лимфоциты	0.919	не значима	0.580	не значима
Процент поражения лёгких по данным КТ при поступлении	0.902	не значима	0.853	не значима

Таблица 14 (II часть, продолжение) – Статистическая оценка клинических, лабораторных и инструментальных показателей пациентов в связи с наличием или отсутствием миокардита для пациентов первой и третьей волн коронавирусной инфекции

Параметр	U-критерий Манна-Уитни		Пермутационный тест	
	III волна		III волна	
	p-value	Значимость связи	p-value	Значимость связи
SpO2	0.402	не значима	0.846	не значима
Фракция выброса левого желудочка при поступлении	0.170	не значима	0.130	не значима

Гистологическое исследование образцов миокарда выявило активный миокардит у 5% (14/276) пациентов, госпитализированных по поводу коронавирусной инфекции во время четырех волн. При имmunогистохимическом исследовании ткани миокарда пациентов с миокардитом была выявлена экспрессия белка энтеровируса VP1 в миокарде у 86% (12/14) пациентов и экспрессия белка SARS-CoV-2 Spike в одиночных клетках у 22% (3/14) пациентов. Анализ RT-qPCR не выявил РНК SARS-CoV-2 в миокарде ни в одном из случаев миокардита волны I–III. При этом ОТ-ЦПЦР в одном из двух случаев в IV волне выявила слабоположительную реакцию на SARS-CoV-2, но морфологически миокардит у данного пациента не подтвердился. Электронограммы продемонстрировали отдельные структуры, похожие на вирусные частицы. Сосудистые нарушения миокарда были одинаковыми у всех пациентов трех волн. Они проявлялись (суммарно у 276 больных) либо деструкцией стенки с кровоизлияниями в 28% случаев, либо тромбозом в 7% случаев с некрозом миокарда. Очаговое плазматическое пропитывание интимы интрамуральных артерий определялось в 15% случаев, инфильтративный васкулит - в 3%. Гипертрофированные полиморфные эндотелиальные клетки с дисплазией встречались в большей

степени, 56% (43/77), образцов первой волны. С помощью иммуногистохимии активация эндотелия была подтверждена экспрессией МНС1, VWF, Ang1 и VEGF во всех образцах миокарда.

Мы провели изучение корреляционных взаимосвязей между изучаемыми нами признаками повреждения миокарда для пациентов первых трёх волн коронавирусной инфекции. В первой волне коронавирусной инфекции мы определили наличие заметной корреляции между наличием ишемического инфаркта и увеличением количества макрофагов в строме ( $r = 0.64$ ), заметную корреляцию между фрагментацией мышечных волокон и гипертрофией кардиомиоцитов ( $r = 0.56$ ); умеренную корреляцию между тромбами в артериях и ишемическим инфарктом ( $r = 0.46$ ), между кровоизлиянием в строму миокарда и ишемическим инфарктом ( $r = 0.49$ ), между ишемическим инфарктом и наличием васкулита ( $r = 0.44$ ), между ишемическим инфарктом и фрагментацией мышечных волокон ( $r = 0.37$ ) (Рисунок 29).

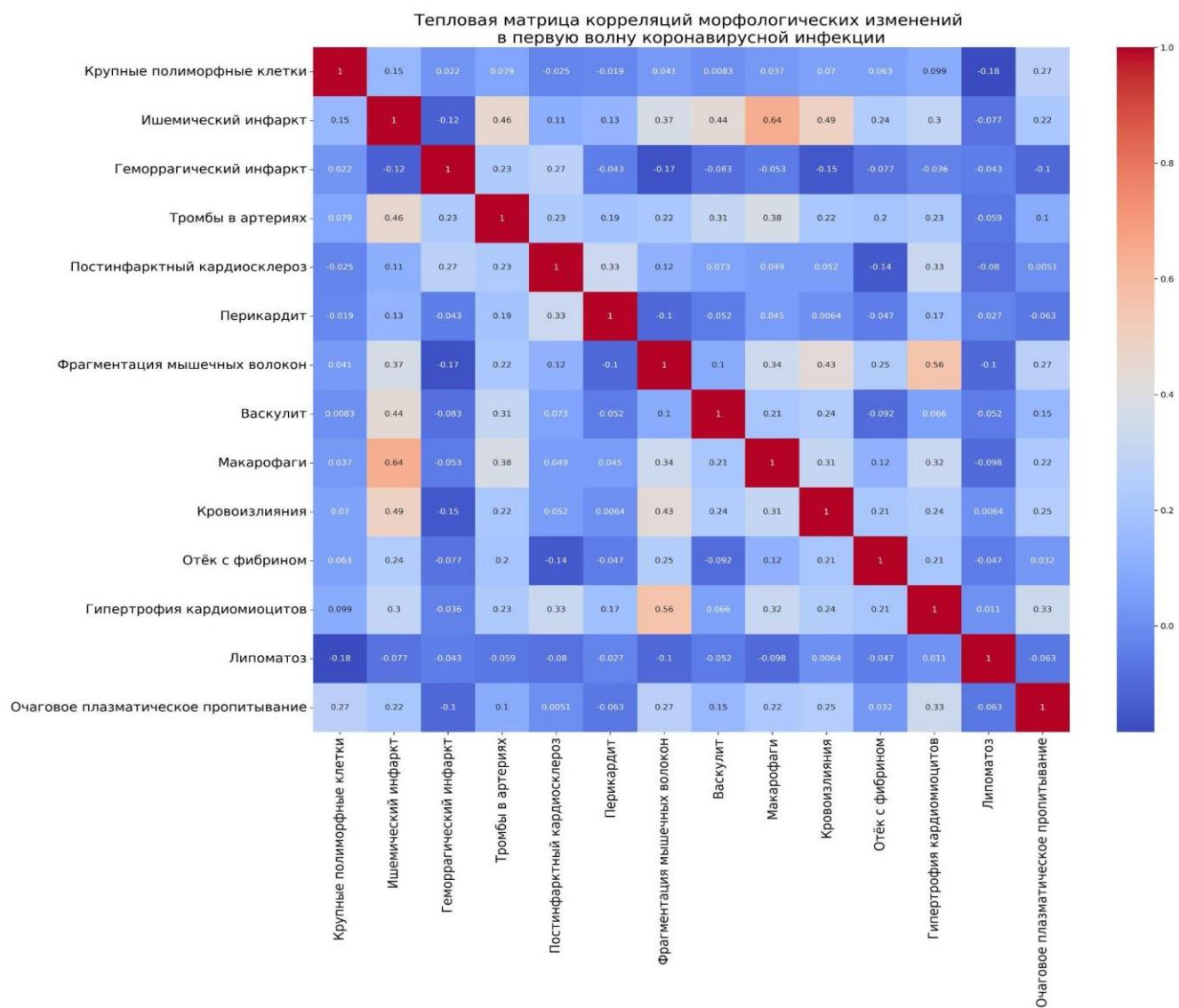


Рисунок 29 – Корреляционные связи между морфологическими изменениями в миокарде в I волну коронавирусной инфекции

Для пациентов второй волны коронавирусной инфекции мы обнаружили положительные заметные корреляции между наличием ишемического и геморрагического инфаркта миокарда ( $r = 0.66$ ), умеренные корреляции между гипертрофией миокарда и наличием постинфарктного кардиосклероза ( $r = 0.32$ ), между кровоизлияниями в строму миокарда и отёком стромы с фибрином ( $r = 0.36$ ) (Рисунок 30).

Тепловая матрица корреляций морфологических изменений во вторую волну коронавирусной инфекции

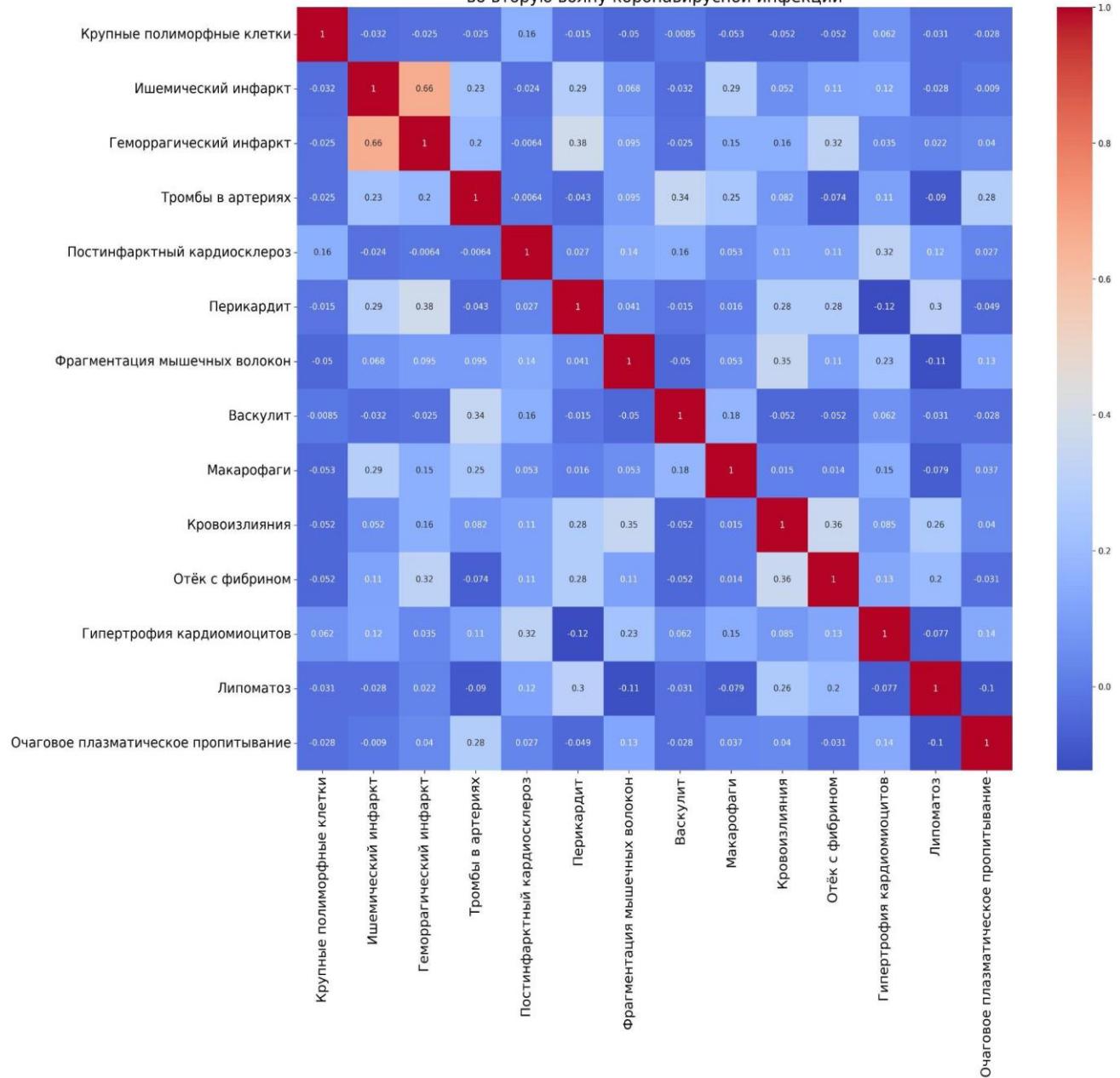


Рисунок 30 – Корреляционные связи между морфологическими изменениями в миокарде в II волну коронавирусной инфекции

В третью волну коронавирусной инфекции мы также обнаружили заметные положительные корреляции между наличием ишемического и геморрагического инфаркта миокарда ( $r = 0.57$ ), умеренную корреляцию между отёком стромы с фибрином и очаговым плазматическим пропитыванием ( $r = 0.31$ ) (Рисунок 31).

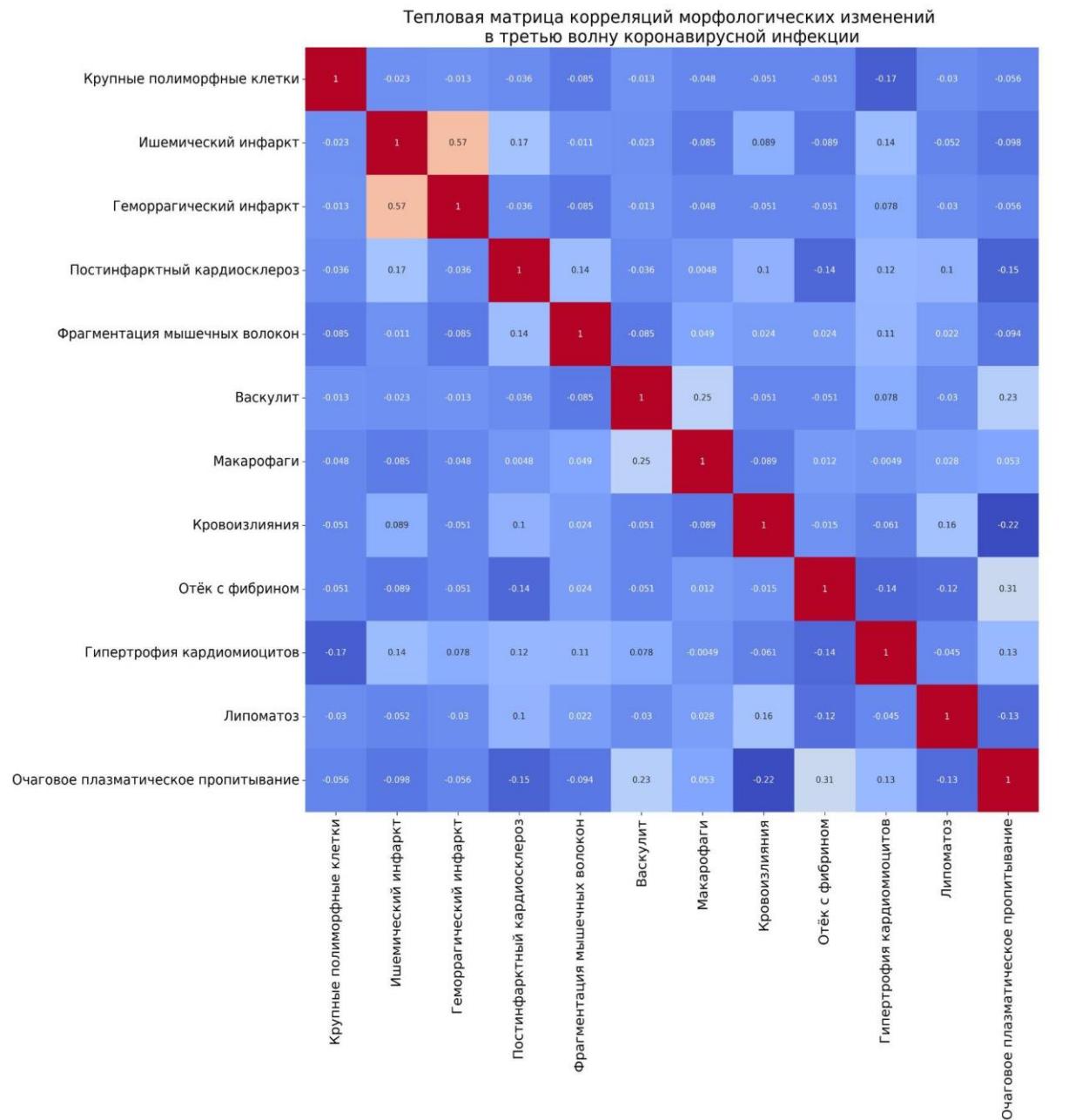


Рисунок 31 – Корреляционные связи между морфологическими изменениями в миокарде в III волну коронавирусной инфекции

Сравнительный анализ пациентов первой волны COVID-19 и пациентов второй и третьей волн показал, что доля пациентов с миокардитом уменьшилась ( $p < 0,05$ ). Количество макрофагов в миокардиальной строме было максимальным во второй волне ( $p = 6,0E-26$ ). В III волне оно уменьшилось по сравнению с I и II волнами ( $p = 0,008$ ). Количество осложнений дисэндотелиоза – тромбозов и некоронарных некрозов достоверно уменьшилось уже к II и III волне ( $p=0,001$  и  $p=0,017$  соответственно). Также резко уменьшилось количество

гипертрофированных диспластических эндотелиоцитов во вторую и третью волны коронавирусной инфекции ( $p = 4,7\text{E-}26$ ); однако число случаев очагового плазматического пропитывания стенок интрамуральных артерий увеличилось ( $p = 6,4\text{E-}3$ ) в миокарде пациентов III волны коронавирусной инфекции. К III волне уменьшилось количество пациентов с некоронарными некрозами миокарда ( $p=0,017$ ) и тромбозами интрамуральных артерий ( $p=0,001$ ) (Рисунок 32).

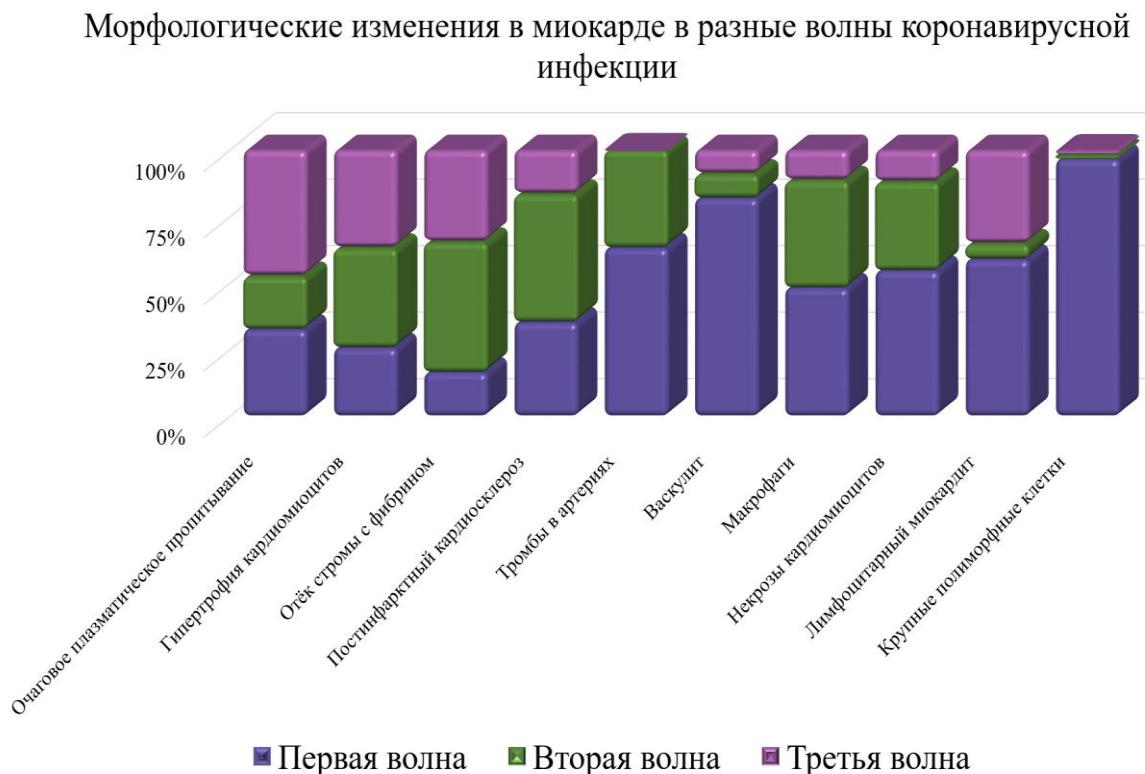


Рисунок 32 – Морфологические изменения в миокарде в I-III волны коронавирусной инфекции

### 3.2 Исследование эндомиокардиальных биопсий

#### 3.2.1 Пациенты с хроническим лимфоцитарным миокардитом

Острая фаза коронавирусной инфекции у большинства пациентов имела лёгкое или средне-тяжелое течение. У 9 (31%) пациентов нет данных о проводимом КТ в острый период, у остальных пациентов медианный процент поражения лёгочной ткани был 12,5 [0; 31,5]%. Только у 2 (7%) пациентов процент поражения лёгочной паренхимы по КТ был более 50%: 56% и 60%.

У пациентов в подгруппе с хроническим лимфоцитарным миокардитом ухудшение течения предсуществующей ХСН после перенесённой коронавирусной инфекции было зарегистрировано у 9 (31%) пациентов, а дебют ХСН после COVID-19 был диагностирован у 13 (45%) пациентов. У 6 (21%) пациентов с диагностированной ХСН до COVID-19 ухудшения клиники сердечной недостаточности не определялось. Только у одного пациента не было диагностировано ХСН ни до, ни после перенесённой коронавирусной инфекции.

Самым частым нарушением ритма и проводимости для пациентов этой подгруппы была фибрилляция предсердий, которая была отмечена у 7 (24%) пациентов. ПБЛНПГ была выявлена у 5 (17%) пациентов, у 4 (14%) пациентов была выявлена желудочковая тахикардия, также у 4 (14%) - желудочковая экстрасистолия. Остальные нарушения ритма и проводимости были диагностированы только у отдельных пациентов.

Только у 4 (14%) пациентов ФВ ЛЖ была сохранена, у 25 (86%) ФВ ЛЖ была снижена с медианным значением 26,5 [23; 30] %.

В этой группе ЭМБ у пациентов была взята после 3 недель - 17 месяцев от последнего положительного мазка ПЦР из носоглотки на SARS-CoV-2 с медианным значением в 4 [2; 8] месяцев (Рисунок 33).

## Описательный анализ подгруппы пациентов с лимфоцитарным миокардитом

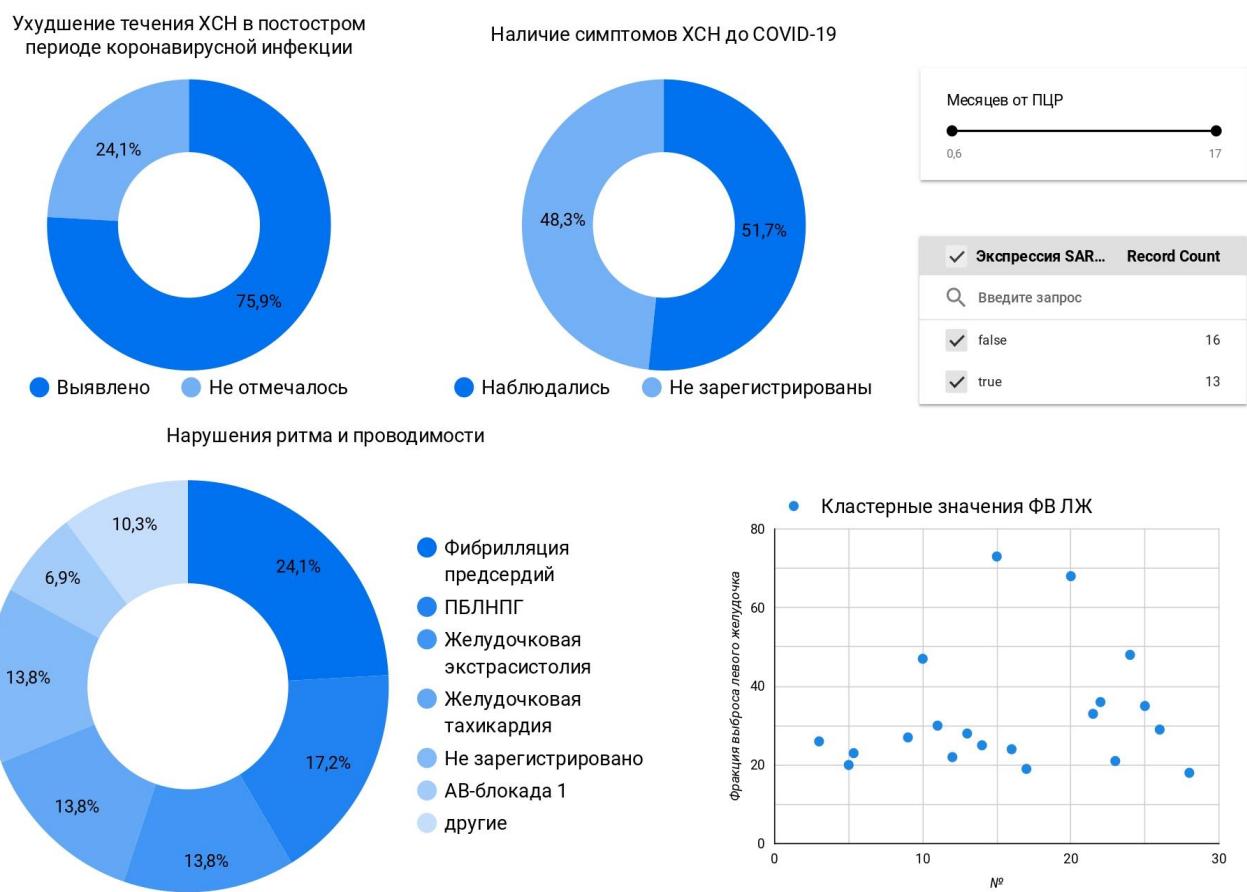


Рисунок 33 – Основные клинические параметры пациентов с миокардитом в PASC.

Аббревиатуры: АВ- блокада – атриовентрикулярная блокада, ПБЛНПГ – полная блокада левой ножки пучка Гиса, ПЦР – полимеразно-цепная реакция, ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, PASC – постострочный коронавирусный синдром

5 (17%) пациентов из этой подгруппы имели в анамнезе вакцинацию от SARS-CoV-2: из них у 3 пациентов был диагностирован пограничный лимфоцитарный миокардит (2 случая пациентов вакцинированных Ковивак, 1 случай вакцинации Спутник V), а у 2 - активный лимфоцитарный миокардит (вакцинация Спутник V). Тем не менее клинической связи между вакцинацией и развитием миокардита у данных пациентов обнаружено не было. Однако временной промежуток от вакцинации до появления симптомов сердечной патологии, потребовавших проведения ЭМБ был от 1 до 4,5 месяцев, со средним значением в 2,7 месяцев, что не исключает возможности развития поствакцинального миокардита. В то же

время, во всех этих случаях мы выявили экспрессию VP1-EntV в кардиомиоцитах, что сильно снижает вероятность этиологической роли вакцинации от SARS-CoV-2 в развитии миокардитов у этих пациентов.

Во всех исследуемых ЭМБ гистологически был обнаружен хронический пограничный и хронический активный лимфоцитарный миокардит, подтверждённый иммуногистохимическим исследованием. Основные параметры иммуногистохимического исследования представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Морфометрическое иммуногистохимическое исследование эндомиокардиальных биопсий у пациентов с PASC

Маркер	Пациенты без миокардита	Пограничный миокардит	Активный миокардит
CD3 клетки / мм <sup>2</sup>	4.0 [3.0; 5.0]	11.5 [8.0; 22.25]	20.0 [16.5; 31.0]
CD68 клетки / мм <sup>2</sup>	8.0 [5.0; 14.0]	11.0 [8.25; 15.5]	12.0 [10.0; 17.5]
HLA-DR (в баллах)	1.0 [0.0; 3.0]	3.0 [2.25; 4.0]	3.0 [3.0; 4.0]
MHCI (в баллах)	4.0 [4.0; 4.0]	4.0 [4.0; 4.0]	4.0 [4.0; 4.0]
C1q (в баллах)	1.0 [1.0; 2.0]	2.0 [2.0; 3.0]	3.0 [2.0; 4.0]
VP1-EntV в сосудах в баллах	0.0 [0.0; 0.0]	1.0 [1.0; 2.0]	1.0 [0.0; 1.5]
VP1-EntV в кардиомиоцитах в баллах	0.0 [0.0; 0.0]	1.5 [1.0; 2.0]	2.0 [1.0; 2.0]

Таблица 15 (продолжение) – Морфометрическое иммуногистохимическое исследование эндомиокардиальных биопсий у пациентов с PASC

Маркер	Пациенты без миокардита	Пограничный миокардит	Активный миокардит
VWF в сосудах в баллах	1.0 [1.0; 1.75]	1.0 [1.0; 2.0]	1.0 [1.0; 1.5]
VWF в кардиомиоцитах в баллах	0.0 [0.0; 0.0]	0.0 [0.0; 0.0]	0.0 [0.0; 0.0]
Ang1 в сосудах в баллах	4.0 [4.0; 4.0]	4.0 [3.0; 4.0]	2.0 [1.0; 2.5]
Ang1 в кардиомиоцитах в баллах	0.0 [0.0; 0.75]	2.0 [2.0; 3.0]	3.0 [2.0; 4.0]
VEGF в сосудах в баллах	2.5 [1.25; 3.75]	3.0 [3.0; 3.0]	4.0 [3.0; 4.0]
VEGF в кардиомиоцитах в баллах	0.0 [0.0; 0.0]	0.0 [0.0; 0.0]	0.0 [0.0; 0.0]
spike SARS-CoV-2 на клетках инфильтрата в баллах	2.0 [1.0; 2.0]	0.0 [0.0; 1.0]	1.0 [0.0; 1.25]
spike SARS-CoV-2 на эндотелии в баллах	1.0 [0.0; 1.0]	0.0 [0.0; 1.0]	0.0 [0.0; 1.0]

### 3.2.2 Пациенты без лимфоцитарного миокардита

Острая фаза коронавирусной инфекции у большинства пациентов также имела лёгкое или средне-тяжелое течение. У 2 (22%) пациентов нет данных о проводимом КТ в острый период, у остальных пациентов медианный процент поражения лёгочной ткани был 25 [10; 29%]. Только у 1 (11%) пациентов процент поражения лёгочной паренхимы по КТ был более 50%: 60%.

У пациентов в подгруппе без миокардита ухудшение течения предсуществующей ХСН после перенесённой коронавирусной инфекции было зарегистрировано только у 1 (11%) пациентов, а дебют ХСН после COVID-19 был диагностирован у 7 (77%) пациентов. Только у одного пациента не произошло ухудшение течения ХСН после перенесённой коронавирусной инфекции.

Самым частым нарушением ритма и проводимости для пациентов этой подгруппы была желудочковая тахикардия, которая была отмечена у 3 (33%) пациентов. Фибрилляция предсердий была выявлена только у 1 (11%) пациента.

Только у 1 (11%) пациента ФВ ЛЖ была сохранена, у 8 (89%) ФВ ЛЖ была снижена с медианным значением 25 (23; 30) %.

В этой группе ЭМБ у пациентов была взята после 3 недель – 20 месяцев от последнего положительного ПЦР из носоглотки на SARS-CoV-2 с медианным значением 5 [2; 9] месяцев (Рисунок 34).

### Описательный анализ подгруппы пациентов без миокардита

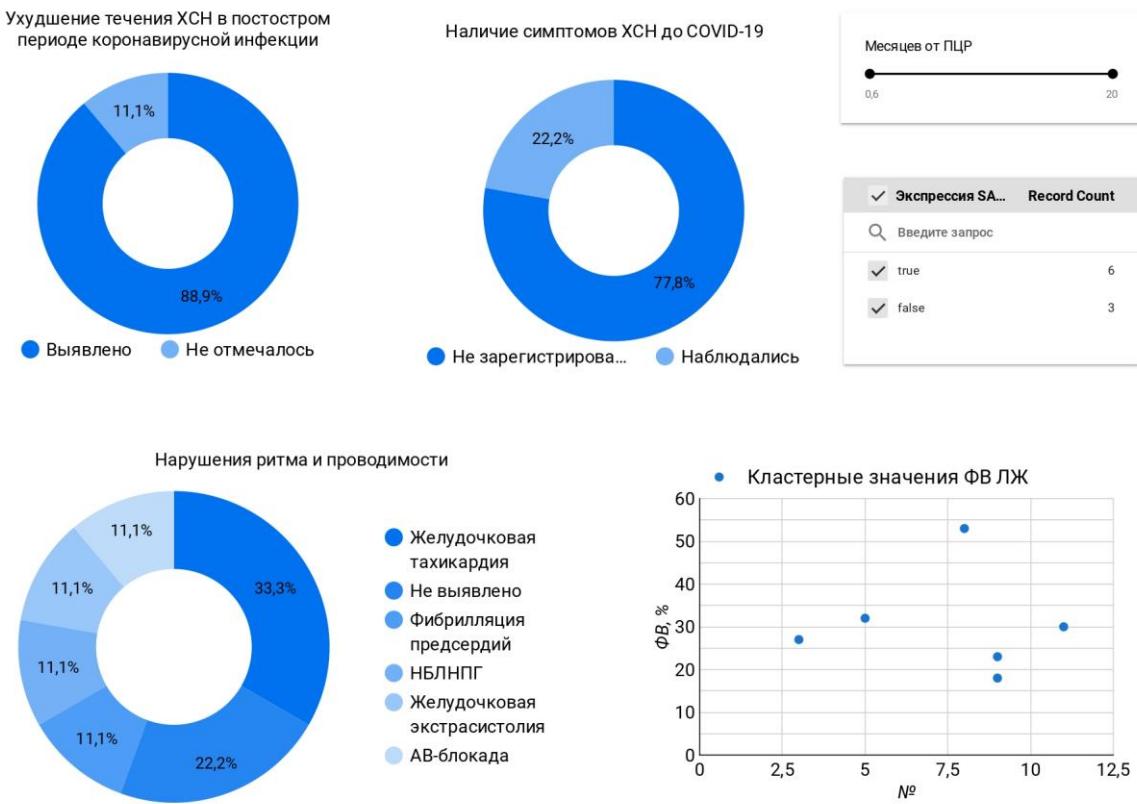


Рисунок 34 – Основные клинические параметры пациентов без миокардита в PASC.

Аббревиатуры: НБЛНПГ – неполная блокада левой ножки пучка Гиса, ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, PASC – постострочный коронавирусный синдром

5 (55%) пациентов из этой группы имели вакцинацию от SARS-CoV-2: из них 1 пациент вакцинировался Ковивак, а 3 – Спутник V. Время от вакцинации до взятия ЭМБ составляло от 2 до 8 месяцев со средним значением в 4,6 месяцев.

Основные параметры иммуногистохимического исследования представлены в таблице 16.

В случаях обнаружения экспрессии spike SARS-CoV-2 на эндотелии и на воспалительном инфильтрате с суммой баллов более 3 ( $n = 5$ ) мы выполнили ПЦР ткани с парафиновых блоков миокарда. Во всех случаях ПЦР исследование не обнаружило РНК SARS-CoV-2. Также для этих пациентов мы выполнили иммунофлюоресцентное исследование с коктейлем антител к spike SARS-CoV-2 /

CD68 и spike SARS-CoV-2 / CD16. Мы определили колокализацию экспрессии spike SARS-CoV-2 и CD16 на мемbrane отдельных клеток инфильтрата. Экспрессии spike SARS-CoV-2 в кардиомиоцитах мы не обнаружили (Рисунок 35).

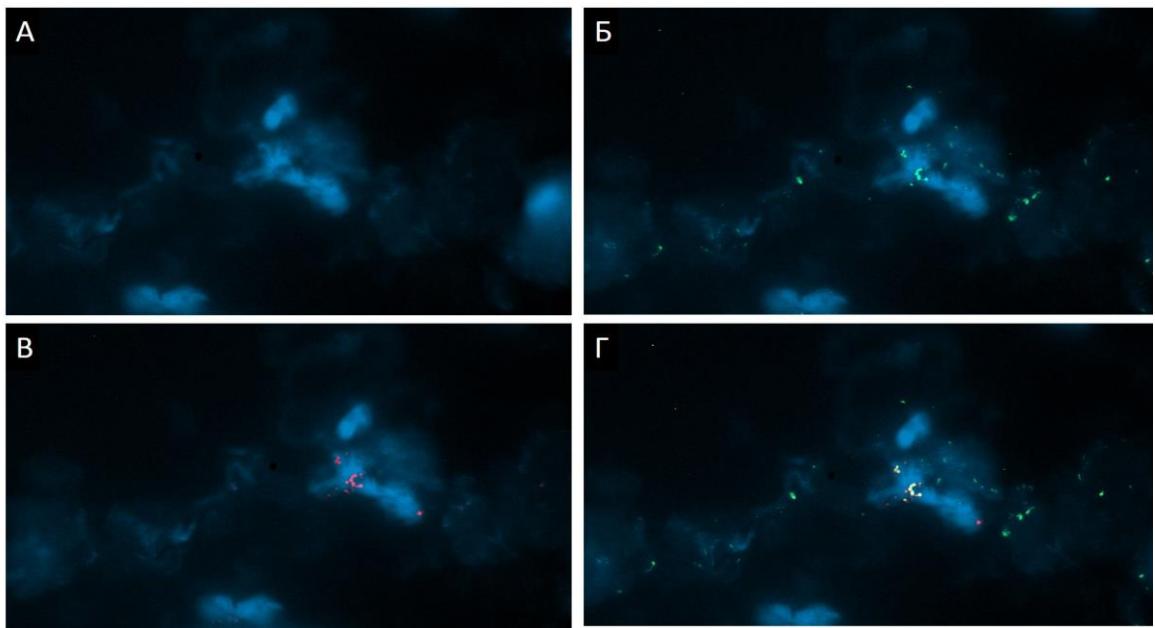


Рисунок 35 – Иммунофлюоресцентное исследование миокарда с коктейлем антител spike SARS-CoV-2 / CD16. Зелёное свечение – CD16, красное свечение – spike SARS-CoV-2, жёлтое и оранжевое – колокализация маркеров. Ядра контрастированы DAPI; увеличение 630

Также мы провели иммуногистохимическое исследование с АПФ2 и обнаружили экспрессию лишь на единичных сосудах в ЭМБ и не во всех случаях. Интересно, что в этих же случаях мы также определяли экспрессию spike SARS-CoV-2 на эндотелии некоторых интрамиокардиальных сосудов (Рисунок 36).

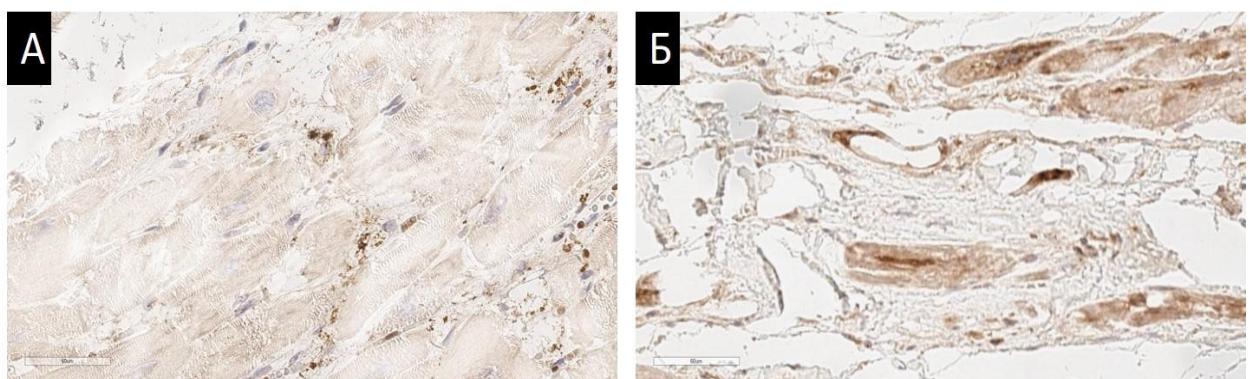


Рисунок 36 – Иммуногистохимическое исследование с SARS-CoV-2 (А) и АПФ2 (Б). Экспрессия маркеров на редких параваскулярных клетках, увеличение 400

Для одного случая из подгруппы с миокардитом и одного пациента из подгруппы без миокардита с экспрессией spike protein SARS-CoV-2 по 3 балла суммарно мы произвели иммунофлюоресцию с коктейлем антител CD163 / CD80 с целью определяется соотношения M1 / M2 макрофагов в ткани миокарда. По результатам исследования в обоих случаях мы выявили преобладание M2 макрофагов над M1 в ткани миокарда (Рисунок 37).

Для проведения статистического анализа данных мы сформировали группы сравнения из ЭМБ взятых до 2019 года. Сравнительная характеристика клинических, лабораторных и инструментальных показателей пациентов представлена в таблице 16.

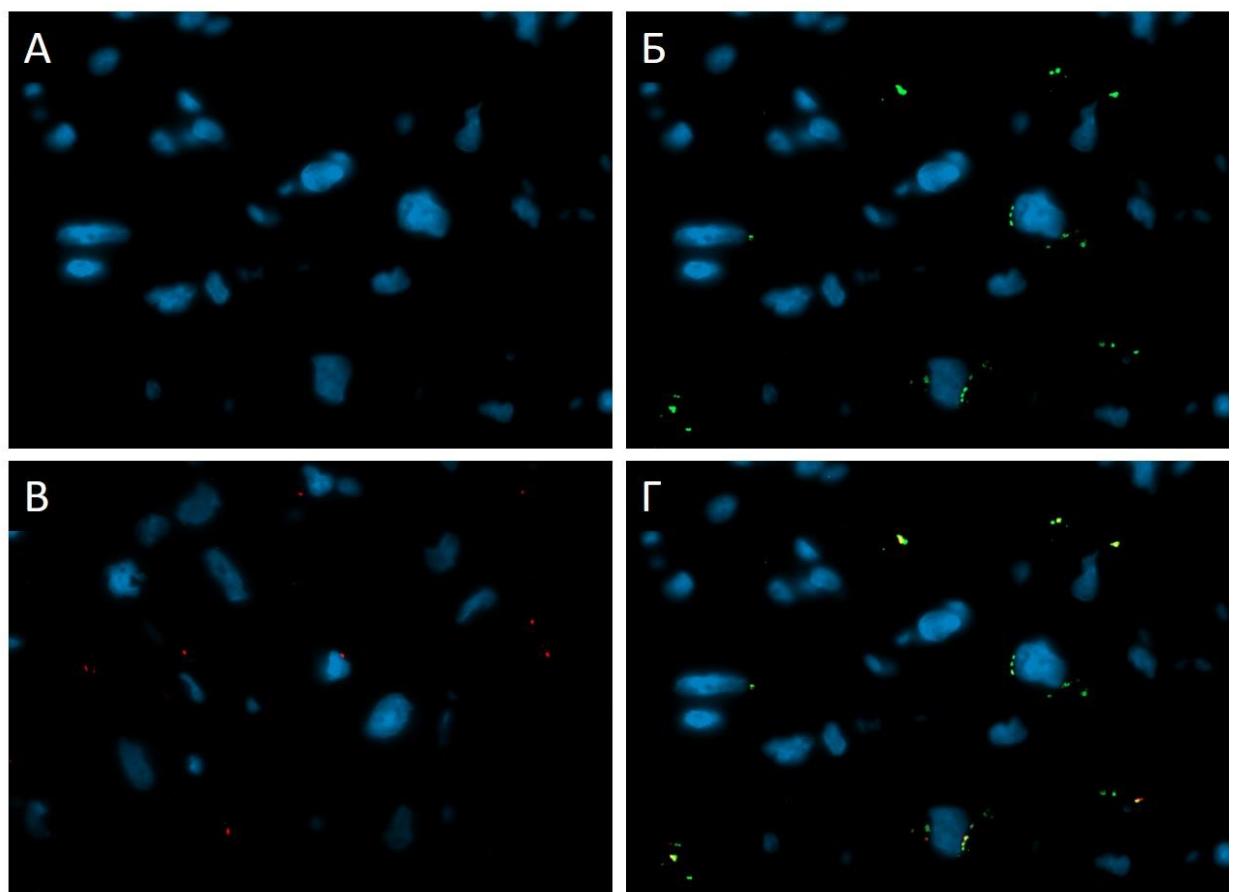


Рисунок 37 – Иммунофлюоресцентное исследование миокарда с коктейлем антител CD163 / CD80. Зелёное свечение – CD163, красное свечение – CD80, жёлтое и оранжевое свечение – колокализация маркеров. Ядра были контрастированы DAPI, увеличение 630

Таблица 16 – Клинико-лабораторные и инструментальные параметры пациентов из групп контроля и сравнения

Параметр	Пациенты с миокардитом в PASC (n=29)	Пациенты с миокардитом в группе сравнения (n=33)	Пациенты без миокардита в PASC (n=9)	Пациенты без миокардита в группе сравнения (n=8)
Возраст, лет (n, 25% и 75% перцентили)	35 [32; 44]	38 [30; 45]	42 [38; 46]	41 [36; 48]
Клиническое подозрение на миокардит (n, %)	29 (100%)	33 (100%)	9 (100%)	8 (100%)
Повышение Тропонина I > 100 нг/л (n, %)	5 (17%)	7 (21%)	0	1 (13%)
Клиника хронической сердечной недостаточности (n, %)	23 (79%)	27 (82%)	8 (89%)	8 (100%)
Желудочковые нарушения ритма (n, %)	6 (21%)	9 (27%)	3 (33%)	2 (25%)
Связь с вирусной инфекцией (n, %)	29 (100%)	30 (91%)	9 (100%)	6 (75%)

Таблица 16 (продолжение) – Клинико-лабораторные и инструментальные параметры пациентов из групп контроля и сравнения

Параметр	Пациенты с миокардитом в PASC (n=29)	Пациенты с миокардитом в группе сравнения (n=33)	Пациенты без миокардита в PASC (n=9)	Пациенты без миокардита в группе сравнения (n=8)
Связь с вакцинацией (n, %)	0	0	0	0
Фракция выброса левого желудочка (50, 25% и 75% перцентили, в %)	28 [23; 33]	26 [20; 34]	27 [23; 30]	26 [22; 38]
Фенотип дилатационной кардиомиопатии (n, %)	12 (41%)	17 (52%)	7 (78%)	4 (50%)

По результатом статической обработки данных мы определили, что Ang1 в сосудах чаще экспрессировался в случае отсутствия миокардита, чем при активном лимфоцитарном миокардите ( $p$ -значение = 0.001). Ни в одном из случаев не определялась экспрессия VWF и VEGF в кардиомиоцитах. Не было обнаружено статистически значимых различий между наличием или отсутствием экспрессии spike SARS-CoV-2 и изменениям в экспрессии других маркеров. Процент поражения лёгочной ткани (тяжёлость течения острой коронавирусной инфекции) не коррелировала с ухудшением течения ХСН в постостром периоде коронавирусной инфекции.

Статистически достоверно при  $p < 0.05$ , что ухудшение течения ХСН чаще наблюдалось у пациентов с фибрилляцией предсердий и желудочковой тахикардией по сравнению с остальными нарушениями ритма и проводимости.

При сравнении контрольных подгрупп с подгруппами сравнения отмечается увеличение количества CD68-позитивных макрофагов на 1  $\text{мм}^2$  миокарда у пациентов в постостром периоде коронавирусной инфекции по сравнению с пациентами, не переносившими коронавирусную инфекцию ( $p = 0.014$  для пациентов с миокардитом,  $p = 0.007$  для пациентов без миокардита). Увеличение количества CD68-позитивных макрофагов чаще наблюдалось у пациентов, с меньшим промежутком времени от последней положительной ПЦР на SARS-CoV-2 до взятия ЭМБ ( $r = -0,33$  для пациентов с миокардитом и  $r = -0,61$  для пациентов без миокардита). Корреляции между обнаружением экспрессии SARS-CoV-2 на эндотелии и временем от последней положительной ПЦР не обнаружено ( $r = -0,08$  для пациентов с миокардитом и  $r = -0,29$  для пациентов без миокардита) (Рисунок 38).

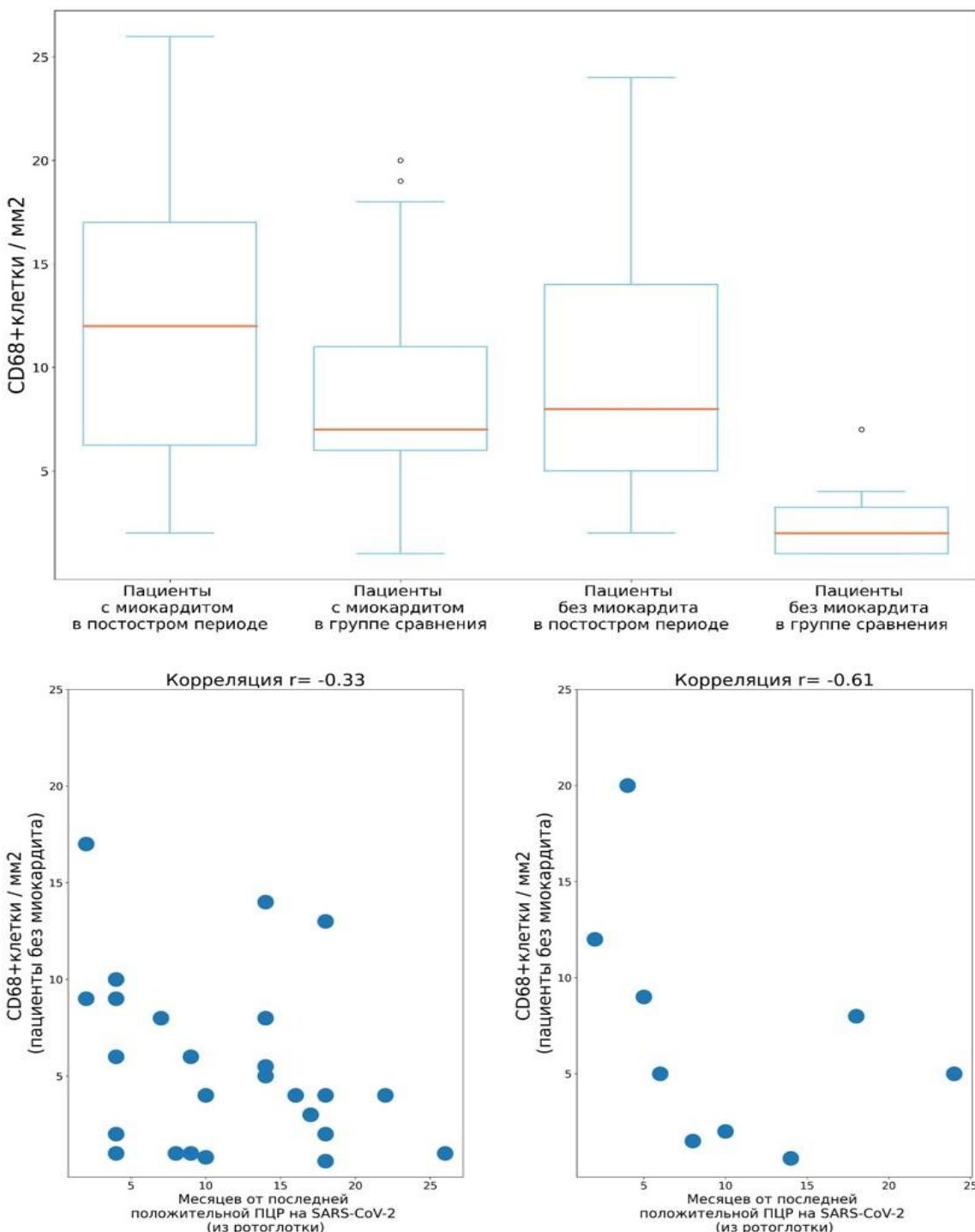


Рисунок 38 – Сравнительный анализ количества CD68+макрофагов в контрольных подгруппах и подгруппах сравнения. Корреляционная связь между временем от последней положительной полимеразно-цепной реакции (ПЦР) из назофарингеальных мазков и количеством макрофагов в строме миокарда

### 3.3 Трансплантация сердца во время пандемии SARS-CoV-2

Дополнительно к основной части исследования мы проанализировали небольшую выборку пациентов, которым была проведена трансплантация сердца во время пандемии коронавирусной инфекции. В период пандемии всем донорам проводилось экспресс ПЦР-тестирование на SARS-CoV-2 из мазков ротоглотки. Однако ПЦР-исследования тканей миокарда не проводилось. В исследование был включен материал от 15 пациентов: эксплантированные сердца и эндомиокардиальные биопсии, которые брали с целью оценки клеточного и гуморального отторжения трансплантата в послеоперационном периоде, а также 1 секционный случай.

Гистологическое исследование ни одного из эксплантированных сердец ( $n = 15$ ) не выявило признаков ангиопатии, а экспрессия spike SARS-CoV-2 наблюдалась лишь в единичных случаях и только в параваскулярных клетках (1-2 балла по условной шкале).

При исследовании эндомиокардиальных биопсий после трансплантации мы выявляли признаки гуморального отторжения трансплантата (AMR2) у 5 (33%) пациентов, которые были успешно купированы стандартной терапией и через 2-4 недели в контрольных ЭМБ признаков гуморального отторжения обнаружено не было. Для всех 15-ти пациентов мы провели иммуногистохимическое исследование биоптатов с spike SARS-CoV-2 и обнаружили экспрессию шиповатого белка коронавируса в 13 из 15 случаев (87%) только на периваскулярных клетках, единичных сосудах и макрофагах. Ни в одном случае экспрессии spike SARS-CoV-2 в кардиомиоцитах обнаружено не было (Рисунок 39).

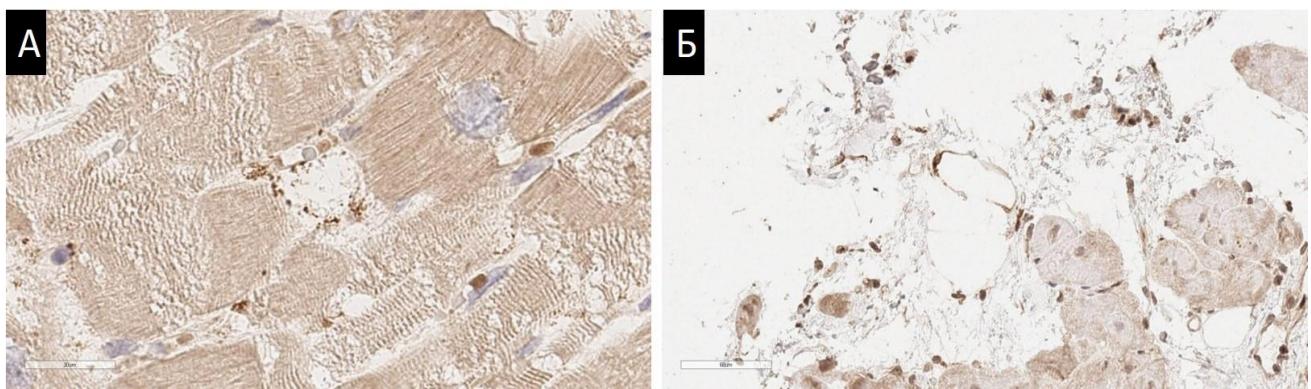


Рисунок 39 – Иммуногистохимическое исследование эндомиокардиальных биопсий после трансплантации сердца с антителом к spike SARS-CoV-2. А – экспрессия в эндотелии (гранулярная, фокальная) и периваскулярных клетках; увеличение 800; Б – экспрессия в эндотелии и воспалительном инфильтрате; увеличение 400

Полученные данные согласуются с распространенностью возникновения гуморального отторжения трансплантата в докоронавирусную эру, что говорит об отсутствии вклада коронавируса в развитие отторжения трансплантата, но во всех 5 случаях ИГХИ с антителом к SARS-CoV-2 была инициирована клиницистами, так как по их мнению предполагаемый криз гуморального отторжения протекал не совсем типично. Данная настороженность кардиологов появилась после двух случаев.

### 3.3.1 Первый клинический случай атипичного течения криза гуморального отторжения

Женщина 28 лет на сроке беременности 34 недель перенесла коронавирусную инфекцию с двусторонней пневмонией. Через 10 дней после клинического выздоровления пациентку стали беспокоить симптомы ХСН. При обследовании были обнаружены двусторонняя интерстициальная пневмония и гидроторакс, синусовая тахикардия, неспецифические изменения зубца Т, выраженная дилатация всех камер сердца, признаки гипертрофии левого желудочка. Фракция выброса левого желудочка составила 37%. При ЭМБ не было признаков

миокардита и экспрессии SARS-CoV-2 в миокарде. На 39 неделе беременности была проведена операция родоразрешения путем Кесарева сечения, ребенок родился здоровым. В послеродовом периоде у пациентки сохранялась ХСН, присоединились рецидивирующие пароксизмы трепетания предсердий. В связи с терминальной ХСН была выполнена трансплантация сердца, во время которой в предсердии донорского сердца была диагностирована полиповидная фибролипома  $2 \times 0,7$  см, которую удалили с фрагментом миокарда – площадкой  $0,4 \times 0,3$  см (Рисунок 40).

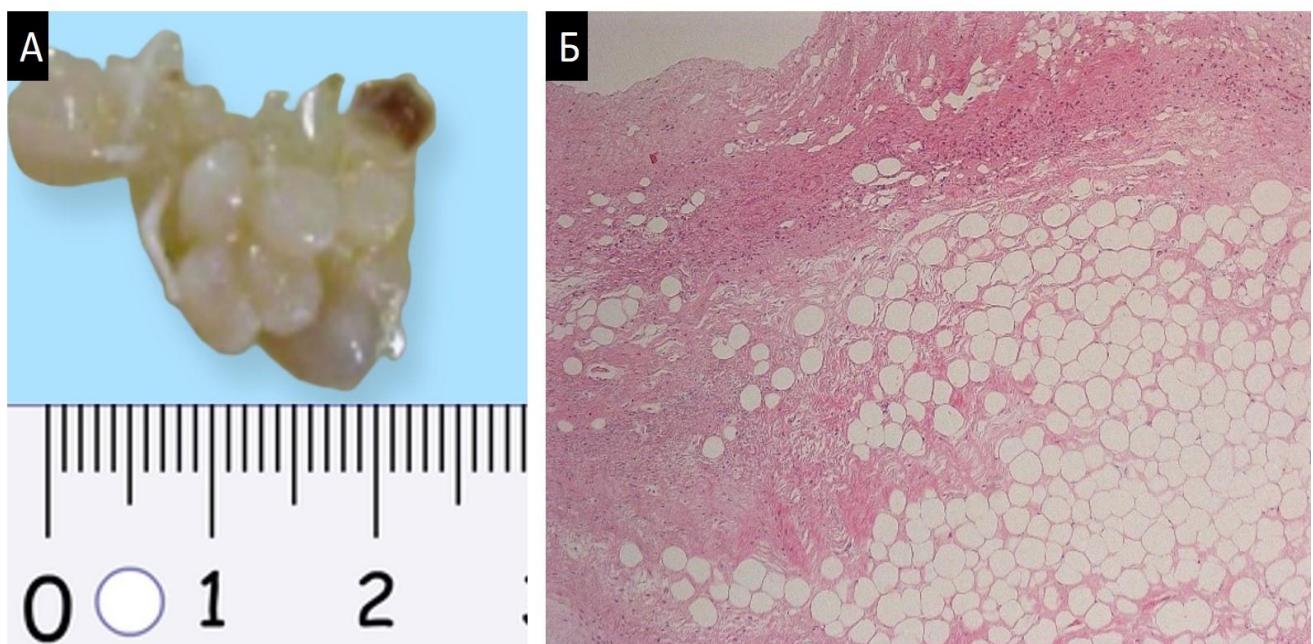


Рисунок 40 – Фибролипома предсердия донора. А – макроскопический вид образования; Б – гистологическое исследование образования, окраска гематоскилин-эозин, увеличение 40

Сердце реципиента было шаровидной формы, размерами  $11,0 \times 11,0 \times 6,0$  см, массой 387 г, коронарные артерии без стенозов, с гладкой белой интимой, полости сердца расширены. Обращала на себя внимание повышенная трабекулярность обоих желудочков, между некоторыми трабекулами определялись пристеночные тромботические массы (Рисунок 41). Истинная толщина задней и боковой стенок левого желудочка в верхушечной и средней трети была 0,6 см, толщина трабекул – 1,6 см. На разрезе миокард был однородный, волокнистый, коричневый.

При гистологическом исследовании был поставлен диагноз врожденной кардимиопатии – некомпактного миокарда левого желудочка, межтрабекулярный париетальный вентрикулярный тромбэндокардит (постковидный?), очаговый острый миокардит. Иммуногистохимическое исследование с антителом к spike SARS-CoV-2 не выявило экспрессии вируса.

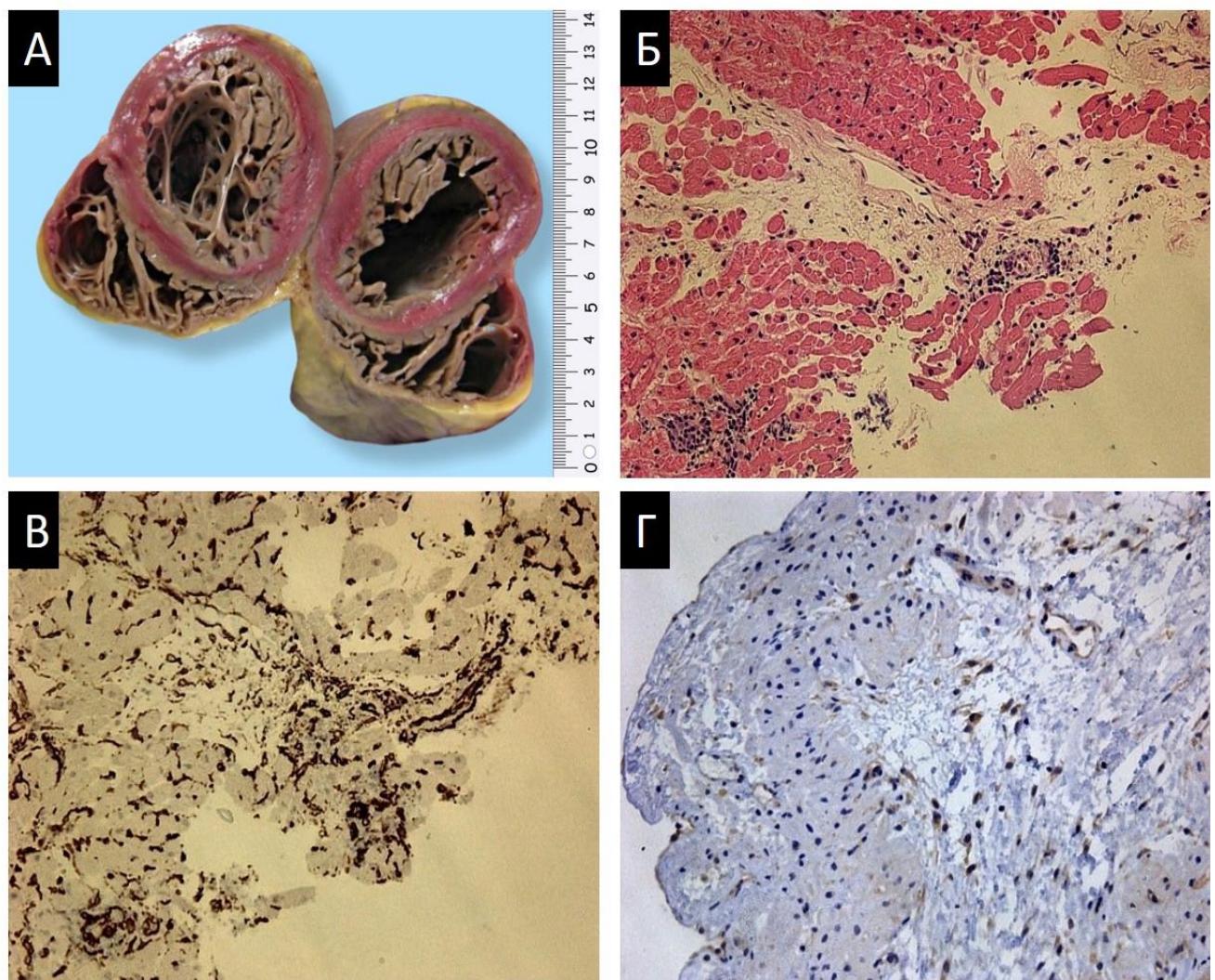


Рисунок 41 – Некомпактный миокард левого желудочка: толщина компактного слоя – 0,6 см, некомпактного слоя – 1,6 см. Б. Вторая эндомиокардиальная биопсия донорского сердца: инфильтративный васкулит, макрофаги в просвете сосудов, окраска гематоксилин-эозином; х200. С. Иммуногистохимическое исследование с CD34: экспрессия в эндотелии и в крупных полиморфных эндотелиальных клетках; х200. Д. Экспрессия spike SARS-CoV-2 в цитоплазме крупных полиморфных эндотелиальных клеток; х200

Через 8 дней после трансплантации сердца была выполнена ЭМБ: AMR2 (H+, I+), R0. В ЭМБ через 20 дней после ТС признаки криза гуморального отторжения AMR2 (H+, I+) сохранялись. В обеих биопсиях наблюдались периваскулярные крупные, полиморфные клетки с гипертрофированными ядрами.

Иммуногистохимическое исследование по экспрессии на них CD34 определило, что это активированные эндотелиоциты, в которых выявляется spike SARS-CoV-2. При сравнительной количественной ПЦР в нативном биоптате миокарда в 3 специализированных лабораториях РНК вируса не была выявлена.

Также было проведено ультраструктурное исследование биоптата № 2 через 20 дней после ТС. Мы обнаружили явные признаки ультраструктурного ремоделирования кровеносных капилляров. Многие эндотелиальные клетки имели неправильную форму, с неровной и изрезанной поверхностью просвета и большими ядрами неправильной формы, выступающими в просвет кровеносного капилляра. Цитоплазма была заполнена многочисленными мембранными везикулами, как связанными, так и не связанными с плазматической мембраной, что указывает на активацию эндотелия. Отростки перицитов находились в тесном контакте с капиллярами. Как и эндотелиальные клетки, отростки перицитов содержали множество везикул и вакуолей размером до 1 мкм.

Наблюдаемая цитоплазматическая вакуолизация может быть транзиторной или необратимой, последняя обычно наблюдается в клетках, инфицированных бактериальными или вирусными агентами. Просвет части капилляров был полностью закупорен фибриллярным материалом умеренной электронной плотности, предположительно фибрином. В некоторых капиллярах были обнаружены макрофаги, содержащие множественные фагоцитарные вакуоли. В то время как большинство кардиомиоцитов сохраняло нормальную ультраструктурную организацию, некоторые из них демонстрировали признаки некротической гибели, т.е. разрыв плазматической мембраны и высвобождение внутриклеточных органелл (Рисунок 42).

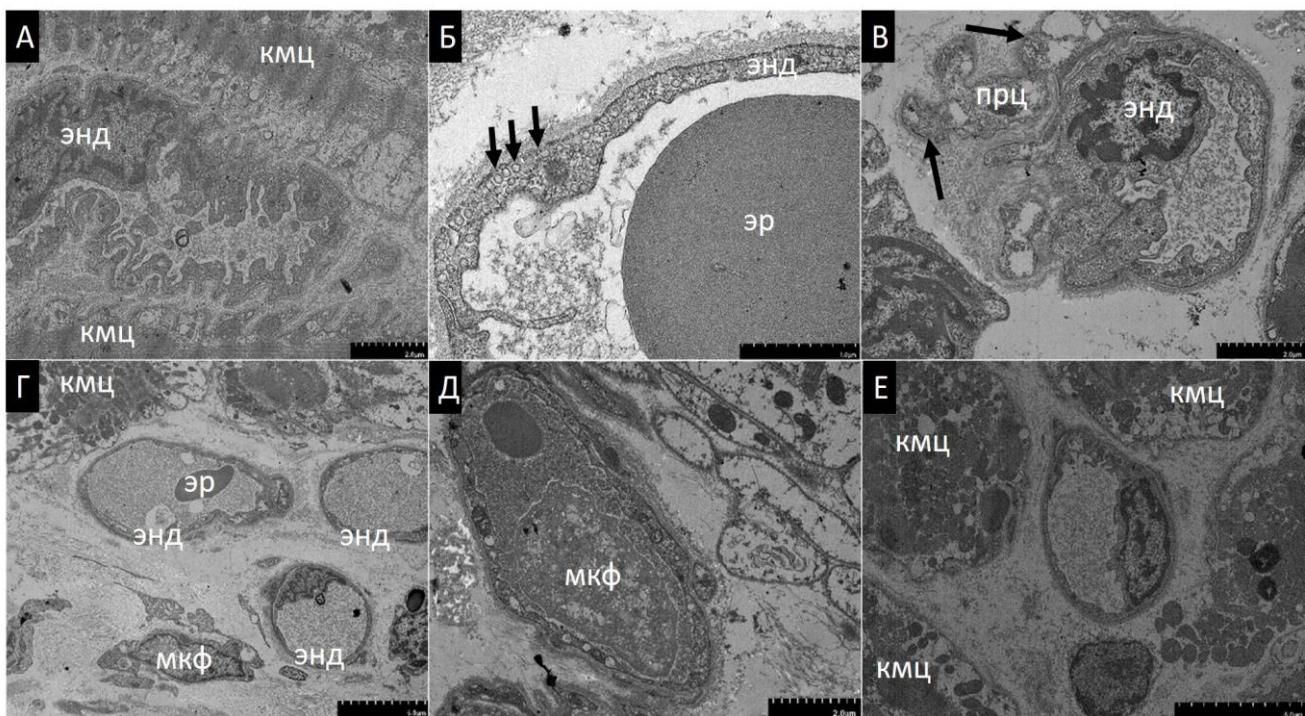


Рисунок 42 – Ультраструктурное исследование второй эндомиокардиальной биопсии донорского сердца. А. Эндотелиальные клетки неправильной формы с изрезанной штапообразной внутренней поверхностью и неправильными формами ядром, выступающим в просвет кровеносного капилляра. Б. Огромное количество мембранных везикул в цитоплазме эндотелиальной клетки (стрелки). В. Перицитные отростки (стрелки) в тесном контакте с кровеносным капилляром. Отростки содержат крупные вакуоли размером до 1 мкм. Г. Закупорка просвета капилляров фибриллярным материалом средней электронной плотности, предположительно фибрином. Д. Макрофаг, содержащий множественные фагоцитарные вакуоли в просвете капилляра. Е. Некроз кардиомиоцита с разрывом плазматической мембраны и выходом внутриклеточных органелл во внеклеточное пространство. Сокращения: КМЦ – кардиомиоцит, эр – эритроцит, мкф – макрофаг, энд – эндотелиоцит, прц – перицит

На одном из срезов мы обнаружили круглую частицу размером 100 нм с явными признаками морфологического сходства с вирионом SARS-CoV-2, ассоцииированную с апикальной поверхностью эндотелиальной клетки (Рисунок 43А). Известно, что некоторые из вышеупомянутых ультраструктурных изменений, обнаруженных при ЭМБ, являются гистопатологическими признаками AMR2. По данным эндомиокардиальной биопсии №3 через 34 дня после трансплантации сердца – R1/1Afocal, AMR0, периваскулярных крупных, полиморфных клеток с гипертрофированными ядрами не обнаруживалось. В

послеоперационном периоде сократительная способность левого желудочка сохранена, синусовый ритм в течение всего времени наблюдения.

Мы выполнили дополнительное иммуногистохимическое исследование ЭМБ реципиента с антителом к spike SARS-CoV-2 до трансплантации сердца для того, чтобы быть уверенными, что это не случай long COVID. Было проведено иммуногистохимическое исследование с антителом к этому вирусу в миокардиальной площадке полиповидной фибролипомы донора, иссеченной во время трансплантации сердца, и в ЭМБ пациентки до трансплантации сердца. Экспрессия антигена вируса была обнаружена только в сердце донора (Рисунок 43Б).

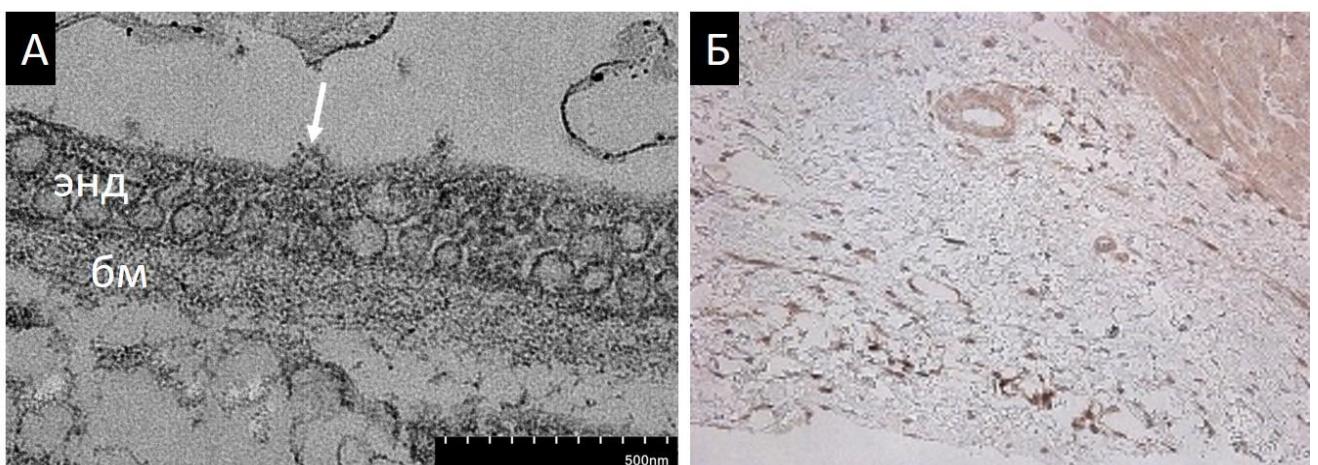


Рисунок 43 – Вторая эндомиокардиальная биопсия донорского сердца. Круглая частица размером 100 нм с явными признаками морфологического сходства с вирионом SARS-CoV-2 (стрелка), ассоциированная с апикальной поверхностью эндотелия. В. Экспрессия spike SARS-CoV-2 в цитоплазме эндотелиальных клеток полиповидной фибролипомы миокарда; x100.

Сокращения: энд – эндотелий, бм – базальная мембрана

Таким образом, была доказана персистенция и передача SARS-CoV-2 от донора с утяжелением течения криза гуморального отторжения.

### 3.3.2 Второй клинический случай атипичного течения криза гуморального отторжения

Пациент 44-ёх лет поступил в клинику с ранее установленным диагнозом гипертрофической кардиомиопатии с рестриктивным фенотипом без обструкции выходного тракта левого желудочка и с постоянной формой фибрилляций предсердий по поводу декомпенсации хронической сердечной недостаточности. Пациент был обследован по протоколу ТС, противопоказаний не было выявлено, был включён в лист ожидания трансплантата.

В связи с предложением донорского сердца, была проведена ТС. Морфологическое исследование эксплантированного сердца показало сочетание фенотипов гипертрофической и рестриктивной кардиомиопатии, а также наличие вторичного активного хронического лимфоцитарного миокардита (Рисунок 44).

Иммуносупрессивная терапия после ТС была исходно четырехкомпонентная: базиликсимаб (0 сутки), преднизолон, таクロлимус (с 3-их суток), микофенолаты. Послеоперационный период осложнился развитием внутрибольничной пневмонии, что диктовало необходимость отмены базиликсимаба на 4-е сутки и пропуск приема микофеноловой кислоты. Таクロлимус на 10-е сутки после ТС был в целевом диапазоне (12,2 нг/мл).

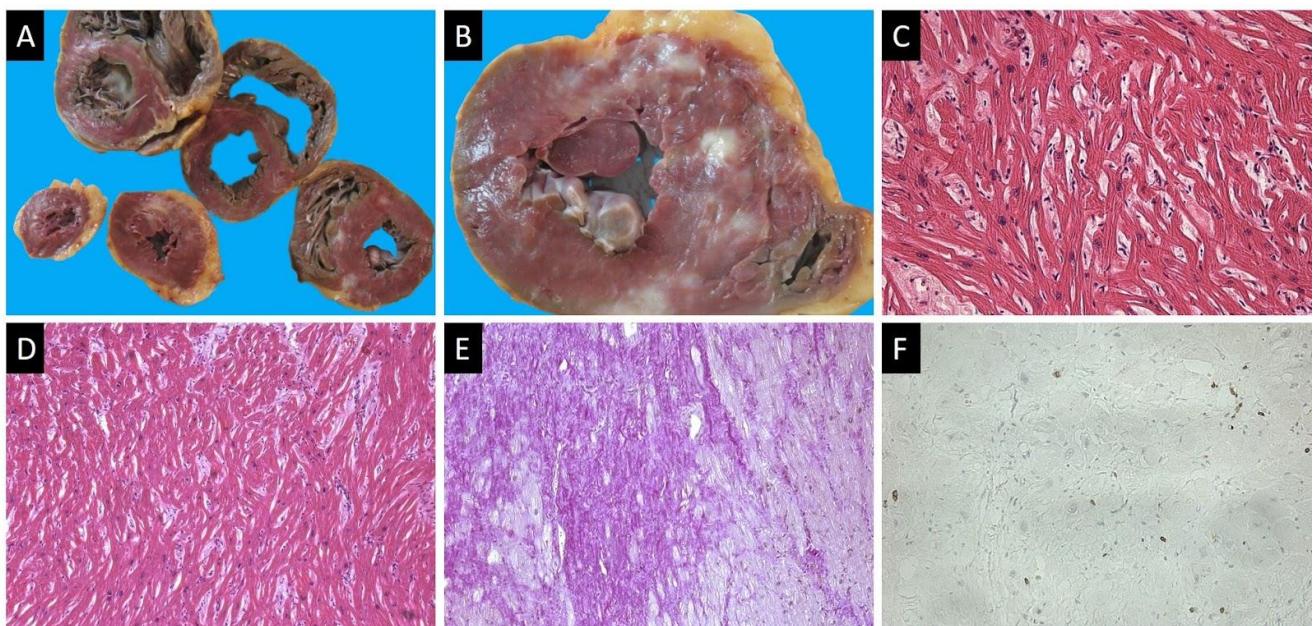


Рисунок 44 – Морфологическое исследование сердца реципиента после трансплантации сердца. А, Б – макроскопический вид миокарда на разрезе: определяются множественные звёздчатые фокусы кардиосклероза на фоне ригидного миокарда. В, Г – дискомплексация мышечного волокна, перимускулярный кардиосклероз, мононуклеарная инфильтрация в интерстиции с агрессивным внедрением в саркоплазму кардиомиоцитов, окраска гематоксилин-эозин, В – x400, Г – x200. Д – выраженный крупноочаговый кардиосклероз и перимускулярный фиброз-оплётка, окраска пикрофуксином по Ван-Гизону, x100. Е – иммуноокрашивание с антителом к CD3: определяется более 14 CD3+клеток на 1 мм<sup>2</sup> миокарда, x200

На 12-е сутки после ТС у пациента произошло резкое падение гемодинамики, по поводу чего проводились реанимационные мероприятия, которые оказались неуспешными. При аутопсии в сердце донора определялись множественные мозаичные некронарогенные некрозы миокарда, кровоизлияния в миокард, выраженный отёк миокарда и плотная мононуклеарная инфильтрация во всех стенках миокарда между кардиомиоцитами и в просвете сосудов, а также слущенный эндотелий интрамиокардиальных сосудов (Рисунок 45). При иммуногистохимическом исследовании было установлено, что инфильтрат представляет собой преимущественно CD3+, CD68+ и CD16+ клетки. Была выявлена высокая экспрессия C1q компонента комплемента и экспрессия spike SARS-CoV-2 на эндотелии и на CD16+клетках (Рисунок 46). На основании

вышеописанных изменений было установлено, что смерть пациента наступила от антительного криза гуморального отторжения (AMR 3).

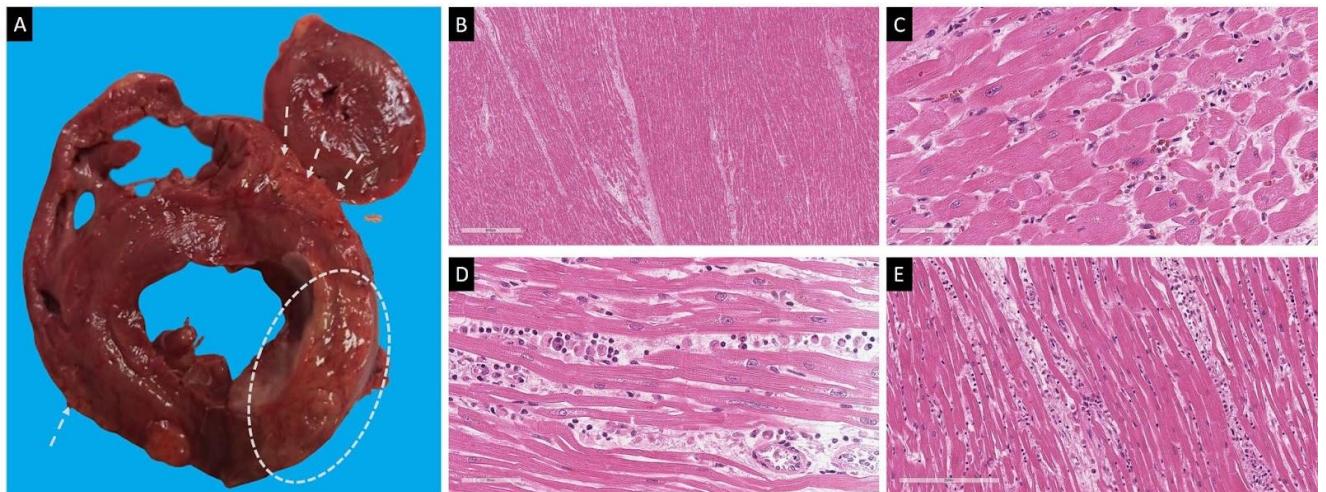


Рисунок 45 – Морфологическое исследование сердца донора после трансплантации (автопсийное исследование). А – макроскопический вид среза сердца: на фоне волокнистого красно-коричневого миокарда определяются множественные коричнево-жёлтые выбухающие участки с утратой волокнистого строения (указаны пунктирными стрелками и пунктиром). Б-Д – гистологическое исследование, окраска гематоскилин-эозин. Б – миокард левого желудочка: выраженные перимускулярные мононуклеарные инфильтраты, отёк стромы; х40. В – миокард правого желудочка: выраженный отёк, эритроцитарные экстравазаты, мононуклеарная инфильтрация; х400. Г, Д – миокард межжелудочковой перегородки с выраженным мононуклеарными инфильтратами, субтотальным слущиванием эндотелия сосудов, отёком и многочисленными эритроцитарными экстравазатами, Г – х400, Д – х100

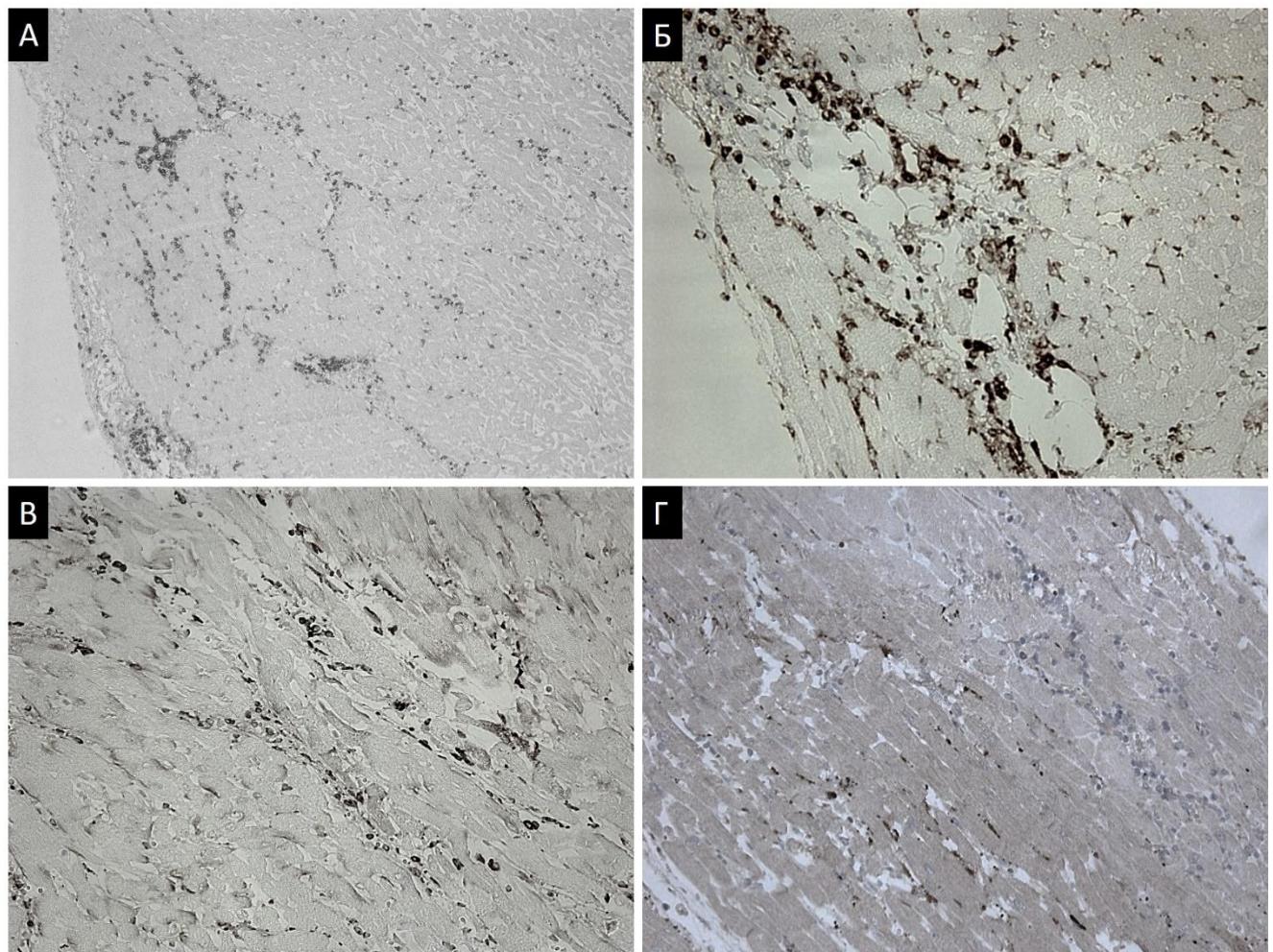


Рисунок 46 – Иммуногистохимическое исследование сердца донора (аутопсийное исследование), x200. А – иммуноокрашивание с CD3. Б – иммуноокрашивание с CD16. В – иммуноокрашивание с С1q компонентом комплемента. Г – иммуноокрашивание с spike SARS-CoV-2

Таким образом, морфологическое исследование сердца при трансплантации показало, что перsistенция SARS-CoV-2 в эндотелии может увеличивать риск развития и прогрессирования криза гуморального отторжения.

## Глава 4. Обсуждение результатов исследований

Согласно нашему мнению, главным фактором, обуславливающим изменения миокарда в остром периоде коронавирусной инфекции, является дисэндотелиоз, который проявляется эндотелиитом (гипертрофия, гиперплазия, дисплазия и повреждение эндотелия), а также его осложнениями в виде тромбозов и кровоизлияний. В частности Varga Z, et al. также описывают признаки эндотелиита в различных органах: в легких, сердце, почках и кишечнике. Авторы считают возникновение эндотелиита прямым следствием вирусного поражения и воспалительной реакции в организме, а также причиной системных микроциркуляторные нарушений различных органов [170].

Результаты нашего исследования показали, что морфологические проявления так называемого эндотелиита или дисэндотелиоза и его последствий в виде некрозов и кровоизлияний к 3 волне достоверно уменьшились, но на первое место вышел признак «очаговое плазматическое пропитывание интимы интрамуральных артерий». Наиболее вероятно, что этот признак является следствием длительного спазма артерий. Он может отражать как сопутствующую сердечно-сосудистую патологию, так и лечение.

Более широкую распространенность явлений эндотелиита в первую волну коронавируса можно объяснить отсутствием антикоагулянтной терапии в схемах лечения пациентов этой волны. Во вторую волну коронавирусной инфекции антикоагулянтная терапия назначалась всем пациентом на стационарном этапе лечения, а в третью волну - даже части пациентов на амбулаторном этапе и всем пациентам в стационаре. Необходимость использования антикоагулянтной терапии обосновывается как прямыми фармакологическими эффектами в виде предотвращения развития тромботической ангиопатии, лизиса уже имеющихся тромбов, вазодилатацией и ангиопротекцией, так и возможной способностью некоторых антикоагулянтов напрямую связываться с шиповидным белком

коронавируса и препятствовать проникновению вируса в клетку. Эффективность антикоагулянтной терапии пациентов с новой коронавирусной инфекцией была подтверждена во многих ретроспективных исследованиях и широко обсуждалась в литературе [97, 130, 131, 172].

Также одной из возможных причин высокой распространенности некоронарогенных некрозов миокарда, васкулита и тромбоза в первую волну коронавирусной инфекции можно частично объяснить активным использованием гидроксихлорохина и хлорохина в лечении. Хотя кардиотоксичность этих препаратов дискутабельна: с одной стороны они могут способствовать удлинению QT, появлению аритмий, некрозов кардиомиоцитов, а с другой стороны эти препараты рассматриваются как потенциальная мишень для снижения площади инфаркта миокарда в острейшем периоде заболевания [117].

Крупное ретроспективное исследование Cohen IV et al. показывает увеличение частоты нежелательных явлений со стороны сердечно-сосудистой системы при использовании гидроскихлорохина и хлорохина, особенно в сочетании с приёмом нестероидной противовоспалительной терапии и более старшими возрастными группами [49].

Исходя из вышеописанного, мы можем сделать вывод о том, что терапия гидроскихлорохином / хлорохином в сочетании с нестероидными противовоспалительными препаратами и в отсутствии антикоагулянтной терапии являлось одним из факторов, возможно ведущим, в более тяжелое и распространенное проявление ангиопатии у пациентов I волны по сравнению с остальными волнами коронавирусной инфекции.

Также возможными факторами, влияющими на более “лёгкое” течение II и последующих волн коронавирусной инфекции можно назвать: появление антител к коронавирусу, профилактические и эпидемиологические мероприятия, раннее выявление и лечение пациентов с коронавирусной инфекцией, более низкая нагрузка на медицинский персонал во II и последующие волны коронавирусной

инфекции, более эффективный менеджмент пациентов, более высокая доступность лекарственных препаратов, ослабление вирулентности новых штаммов коронавируса, смещения в распределении и структуре пациентов.

По результатам нашего исследования мы выявили основные факторы смертности пациентов с коронавирусной инфекцией: пожилой возраст (в нашем исследовании средний возраст умерших был 76 лет), сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания, лимфопения, высокий уровень прокальцитонина и С-реактивного белка, более высокий процент поражения лёгочной паренхимы по данным компьютерной томографии (в нашем исследовании средний процент поражения лёгких был 55%). Наши выводы согласуются с литературными данными о факторах смертности пациентов с коронавирусной инфекцией, таких как пожилой возраст, повышение температуры выше 37,8°C, снижение сатурации менее 92%, двусторонние лёгочные инфильтраты, лабораторные признаки системного воспаления и/или дыхательной, сердечной, почечной и/или печеночной недостаточности, а также сопутствующая сердечно-сосудистая, лёгочная патология и сахарный диабет [8].

Возникновение миокардита на фоне инфекции SARS-CoV-2 и / или после вакцинации с использованием фрагментов РНК SARS-CoV-2 до сих пор остается предметом дискуссии. Данные о развитии миокардита при коронавирусной инфекции, главным образом, основываются на результатах МРТ, эхокардиографических исследований сердца и повышения уровня тропонина I в остром периоде коронавирусной инфекции. Однако, оценка ЭМБ у пациентов с подозрением на миокардит была произведена только в отдельных случаях, где не всегда была исключена этиологическая роль других вирусов, а также не была доказана прямая этиологическая роль коронавирусной инфекции. Ассоциация развития миокардита с острой fazой коронавирусной инфекции являлась в большинстве исследований основным доказательством этиологии SARS-CoV-2 [14, 123, 135, 139].

Однако, полученные данные о патогенезе развития коронавирусной инфекции все ещё остаются недостаточными. Исследователи представили несколько механизмов, которые могут способствовать возникновению миокардита и других форм поражения миокарда в контексте SARS-CoV-2. Среди них можно выделить прямую инвазию вируса в кардиомиоциты, воспалительные или иммунные реакции организма и микрососудистую ангиопатию [91, 177].

Морфологические признаки миокардита в нашем исследовании были выявлены всего в 5 % случаев, что согласуется с прижизненными исследованиями других авторов [30].

При этом мы не получили доказательств, что миокардит был вызван коронавирусной инфекцией, так как ни в одном случае количественная полимеразно-цепная реакция не обнаружила РНК SARS-CoV-2 в миокарде, а иммуногистохимическое исследование выявило spike SARS-CoV-2 только на единичных клетках в 3 из 14 случаев. Наше мнение о том, что на сегодняшний день нет четких доказательств коронавирусного миокардита совпадает с мнением других исследователей [35, 70].

Наиболее вероятно, что коронавирусная инфекция явилась триггером активации других вирусов, например, энтеровирусов. На наш взгляд не случайно в 72% случаев мы видели в миокарде экспрессию VP1-капсида энтеровирусов, преобладающую в сосудистых стенках. Следовательно, возможна активация латентной энтеровирусной инфекции, описанной у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, например, с ишемической болезнью сердца, как вследствие SARS-CoV-2 инфекции либо опосредованно за счет нарушения иммунного ответа [16].

Кроме того, доказано, что эндогенные протеазы коронавирусов и энтеровирусов имеют сходство по своей структуре и функциям, таким образом, лекарственные средства и антитела, которые связываются с активным сайтом, потенциально могут воздействовать на обе вирусные группы [116].

При анализе электронной микроскопии миокарда у двух пациентов IV волны COVID-19 в эндотелии были обнаружены отдельные структуры, сходные с вирусными частицами. Один из этих пациентов также имел слабоположительную ПЦР реакцию на SARS-CoV-2. На основании всех наших результатов – полимеразно-цепной реакции, иммуногистохимического исследования и ультраструктурного исследования, мы предполагаем, что COVID-19 инфекция в миокарде скорее является временной, чем прямой причиной повреждения кардиомиоцитов. Это согласуется с литературными данными, где также обсуждалось предположение о том, что вирус может быть связан с эндотелиальным повреждением [56, 142].

Несмотря на то, что мы редко выявляли миокардит в целом, число таких больных уменьшалось во второй и третьей волнах. Однако сохранялись иммуногистохимические признаки активации эндотелия, в том числе повышенная экспрессия Ang1, VEGF и VWF. VEGF и Ang1 являются двумя основными факторами ангиогенеза, которые в настоящее время изучаются в аспектах возможного лечения инфаркта миокарда. Известно, что одновременная коэкспрессия VEGF и Ang1, вызванная гипоксией, может значительно улучшить перфузию и функциональное состояние миокарда. Это достигается путем стимуляции ангиогенеза, активации кардиомиоцитов, инициирования процессов выживания и снижения клеточного апоптоза. Эти изменения могут быть вызваны как ишемическими, так и гипоксическими факторами, что согласуется с представлением о том, что эндотелий является основной целью коронавирусной инфекции в миокарде [54, 143, 164].

Кроме того, известно, что увеличение уровня фактора Виллебранда у мышей сопровождается формированием тромбов в сердце и легких как при гипоксии, так и при COVID-19 [120]. Важно отметить, что VWF играет ключевую роль в адгезии и агрегации тромбоцитов при атеросклерозе коронарных артерий. Результаты многочисленных исследований подтверждают, что фактор Виллебранда является важным индикатором неблагоприятных сердечных событий, включая летальные

исходы. Его уровень повышается при острой коронарной патологии и не только служит маркером, но и играет значительную роль в развитии инфаркта миокарда. Основная функция фактора Виллебранда в тромбозе делает его перспективной мишенью для исследования новых антитромботических препаратов [157].

У большинства пациентов с подтвержденными иммуногистохимическими миокардитами наблюдались нарушения сердечного ритма и проводимости, такие как неполная блокада правой ножки пучка Гиса, полная блокада передне-верхнего разветвления левой ножки пучка Гиса, фибрилляция предсердий или экстрасистолия предсердий. Один из пациентов также имел желудочковую экстрасистолию, которая ассоциировалась с острым инфарктом миокарда. Важно отметить, что эти нарушения ритма не могут быть полностью объяснены наличием миокардита. Существует несколько факторов, способных вызвать аритмии при коронавирусной инфекции:

- Гипокалиемия или гипомагниемия, возникающие как результат самой инфекции (например, из-за диареи), особенно у тяжелобольных пациентов, или в результате определенных видов лечения, таких как диуретическая терапия.
- Фармакотерапевтические препараты, применяемые для лечения COVID-19 и связанные с риском удлинения интервала QT и развитием torsades de pointes, особенно хлорохина и гидроксихлорохина.
- Прямое воздействие цитокинов на миокард, вызывающее электрофизиологические изменения.
- Резкое ухудшение функции почек и последующие электролитные нарушения [83, 155].

Важно также учитывать последствия эндотелиита, такие как кровоизлияния, некоронарогенные некрозы миокарда и геморрагические и ишемические инфаркты

миокарда, которые могут также способствовать нарушениям сердечного ритма и проводимости.

Наконец, не стоит забывать о последствиях эндотелиита: кровоизлияниях, некоронарогенных некрозах миокарда, геморрагических и ишемических инфарктах миокарда. Все эти изменения также способны привести к нарушениям ритма и проводимости.

На данный момент известно, что SARS-CoV-2 – это вирус, содержащий одноцепочечную РНК. S-белок на внешней мемbrane коронавируса взаимодействует с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2) [74]. АПФ2 играет важную роль в регулировании системы ренин-ангиотензин-альдостерон, превращая сосудосуживающий и провоспалительный ангиотензин II (Ang II) в более благоприятные для организма ангиотензины. Когда вирус попадает внутрь клетки, он использует механизмы клетки-хозяина для создания своих белков, включая РНК-зависимую-РНК-полимеразу, что необходимо для вирусной РНК-репликации. После синтеза структурных белков и сборки вирусных частиц, новый вирус покидает клетку через процесс экзоцитоза. Это активирует врожденный иммунный ответ, который может повредить пораженные клетки-хозяина [106].

АПФ2 экспрессируется в различных тканях, включая сердце, легкие, гладкую мускулатуру желудочно-кишечного тракта, печень, почки и иммунные клетки. Угнетение АПФ2, вызванное вирусом, снижает его противовоспалительное действие и усиливает воспалительное действие ангиотензина II. Это особенно важно для пациентов с артериальной гипертензией, ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом, которые составляют основную часть нашей выборки. Кроме того, рецепторы АПФ2, в частности в эндотелии, являются основными мишениями для вируса, что объясняет высокий уровень инфицирования эндотелиальных клеток SARS-CoV-2. Интересно, что SARS-CoV-2 способен инфицировать органы человека напрямую в *in vitro* культурных моделях тканей человека [151].

Согласно литературным данным, предыдущие исследования аутопсийного материала у пациентов с тяжелым острым респираторным синдромом показали наличие коронавируса SARS-CoV-2 в сердце в 7 случаях (35%) из 20 исследованных сердец [165, 176]. Однако до сих пор проведено всего несколько исследований, в которых была обнаружена геномная РНК SARS-CoV-2 в тканях миокарда [92].

Формалиновая фиксация тканей часто приводит к более выраженной деградации одноцепочечной РНК по сравнению с ДНК. Это может вызывать ложноотрицательные результаты при поиске низкокопийных РНК-мишеней в подобных препаратах. Кроме того, в нашем исследовании мы столкнулись с ограниченным количеством доступного материала для оценки содержания нуклеиновых кислот в образцах FFPE. Для этой оценки мы измеряли концентрацию копий последовательности в генах  $\beta$ -глобина и  $\beta$ -актина. В исследованных образцах концентрация копий гена  $\beta$ -глобина составила  $70\pm40$  мкл<sup>-1</sup>, а мРНК  $\beta$ -актина –  $3500\pm1400$  мкл<sup>-1</sup>.

Учитывая, что среднее содержание РНК на клетку составляет примерно 20 пг, а также учитывая результаты, связанные с оценкой числа копий геномов, мы определили содержание пригодной для метода цПЦР РНК в извлеченном материале в размере  $700\pm400$  пг/мкл. Исследование Lindner D, et al. подтверждает, что в 33% аутопсийных образцах у пациентов с подтвержденным SARS-CoV-2 было обнаружено менее 1 тыс. копий на микрограмм выделенной тотальной РНК, в то время как только 20% образцов имели более 80 тыс. копий на микрограмм РНК. Следовательно, типичное содержание РНК коронавируса в препаратах составляет приблизительно 0,001 копии на пикограмм выделенной тотальной РНК [105].

В нашем исследовании мы обнаружили, что в 4 из 14 образцов, исследованных с использованием метода ОТ-цПЦР, амплификация происходила только в одной микрокапле из 15-20 тыс. Это не позволяет нам сделать вывод о наличии РНК коронавируса. Однако этот результат может быть интерпретирован как

ложноотрицательный из-за ограниченного количества РНК, доступного для исследования.

Следует отметить, что в докладе о 104 пациентах с инфекцией COVID-19, страдающих острой сердечной недостаточностью и подвергшихся эндомиокардиальной биопсии, только у 5 из них был выявлен положительный результат на геном SARS-CoV-2 в ткани миокарда при типичных признаках миокардита, таких как выраженное воспаление, микрососудистые изменения, тромбоз и некроз миокарда [76]. Weckbach LT, et al. не обнаружили РНК SARS-CoV-2 ни в одной эндомиокардиальной биопсии при помощи количественной ПЦР в реальном времени, однако выявили повышенное количество макрофагов [175].

В острой фазе коронавирусной инфекции острые коронарные события могут произойти вследствие резкого увеличения потребности миокарда в кислороде, вызванного инфекцией, что напоминает инфаркт миокарда типа 2. С другой стороны, циркулирующие цитокины, высвобождаемые в период тяжелого системного воспалительного стресса, могут спровоцировать нестабильность и разрыв атеросклеротической бляшки. Также пациенты, страдающие сердечной недостаточностью, могут испытать декомпенсацию гемодинамики во время стресса, вызванного тяжелыми инфекционными заболеваниями [27].

Кроме того, как показывают клеточные и экспериментальные модели инфекции SARS-CoV-2 на животных, а также анализы транскрипционных и сывороточных профилей пациентов с COVID-19, наблюдается уникальный и несоответствующий обычному воспалительный ответ. Этот реакция характеризуется низкими уровнями интерферонов I и III типов, аналогично повышенным хемокинам и высокой экспрессией IL-6. Предполагается, что снижение врожденной противовирусной защиты в сочетании с избыточным высвобождением воспалительных цитокинов составляют основные и доминирующие черты COVID-19 [25].

Широкий спектр провоспалительных цитокинов, таких как IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, интерферон- $\gamma$  и фактор некроза опухоли  $\alpha$ , высвобождается во время инфекции COVID-19, особенно в тяжелых случаях. Основываясь на текущих исследованиях, можно предположить, что эти цитокины высвобождаются в ответ на связывание вируса с рецепторами АПФ2, которые также находятся в поджелудочной железе [84, 103, 118].

Исследование, проведенное Fox SE et al., обнаружило, что вирус SARS-CoV-2 вызывает у зараженных пациентов уникальную воспалительную реакцию, которая приводит к повреждению эндотелия. В сердце такое повреждение может нарушить свертываемость крови на уровне артериол, венул и капилляров, спровоцировав тромбоз и, как следствие, ишемию и реперфузию. Кроме того, повреждение эндотелия может привлекать неклассические моноциты, что активирует путь комплемента и вызывает апоптотическое повреждение, инициированное макрофагами [68, 69].

Некоторые исследования показали значимое увеличение CD68+макрофагов в ткани миокарда в остром периоде коронавирусной инфекции [68, 91].

Мы в своём исследовании также наблюдаем сохранение повышения количества CD68+макрофагов в постостром периоде коронавирусной инфекции, однако, популяция макрофагов является гетерогенной. Они условно подразделяются на разные подтипы, включая макрофаги M1 и макрофаги M2. Макрофаги M1 считаются провоспалительными, а макрофаги M2 - противовоспалительными. Дифференцировка макрофагов определяется внешними стимулами, так например, липополисахариды бактерий могут вызывать дифференцировку макрофагов до фенотипа M1, в то время как интерлейкин 4 может вызывать дифференцировку макрофагов до M2 [186].

Известно, что в сердце, помимо кардиомиоцитов, находятся резидентные макрофаги, играющие важную роль в его функционировании. Исследования показывают, что при ишемии миокарда количество макрофагов увеличивается, что

говорит об их вовлеченности в репарацию сердечной ткани [17]. Резидентные макрофаги формируются из эмбриональных предшественников и обладают способностью к самообновлению без участия моноцитов [121]. Кроме того, они отличаются от моноцитов своими функциями и экспрессией определенных генов. Резидентные макрофаги сердца, как правило, имеют черты M2 и экспрессируют CD206, CD163, CD11b. Их основной функцией в условиях заболевания является восстановление миокарда, что происходит за счет активации ангиогенеза, миграции и пролиферации фибробластов [58]. Также этот тип макрофагов экспрессирует ряд противовоспалительных генов, снижающих воспалительный ответ в поврежденной ткани [152].

Помимо этого, M2-макрофаги, секretируя TGF- $\beta$  и факторы роста фибробластов, косвенно активируют миофибробласти для производства коллагена и работают вместе с ними для высвобождения матриксных металлопротеаз (MMPs). В некоторых исследованиях было показано, что макрофаги могут напрямую способствовать фиброзу путём синтеза коллагена VIII типа [72].

M1-макрофаги могут значительно активировать синтез металлопротеаз MMP 1, 3, 7, 10, 14 и 25, секретировать ряд хемокинов и цитокинов, таких как IL-1 $\beta$ , IL-6, фактор некроза опухоли TNF- $\alpha$  и хемокиновый (CC-участок) лиганд CCL-3 и CCL- 4 для усиления воспаления и активации кардиомиоцитов и эндотелиальных клеток [93].

В неповреждённом миокарде мы должны увидеть преобладание M2 макрофагов над M1 макрофагами. В нашем исследовании мы задокументировали увеличение количества CD68+макрофагов преимущественно за счёт CD163+M2-макрофагов. В двух случаях иммунофлюоресцентной микроскопии мы также явно видели смещение соотношения M1/M2 макрофагов в пользу противовоспалительных M2 макрофагов. Данные изменения мы связываем с репарацией последствий цитокинового дисбаланса и ангиопатии в остром периоде коронавирусной инфекции, которая уходит в постостром периоде коронавирусной

инфекции, о чем свидетельствует снижение уровня экспрессии маркеров активации эндотелия, таких как VEGF, VWF, Ang1 и C1q. В нашем предыдущем исследовании мы показали, что уровни экспрессии вышеуказанных маркеров повышаются в остром периоде коронавирусной инфекции [7].

Это согласуется с литературными данными о том, что повреждение миокарда в остром периоде коронавирусной инфекции обусловлено системными проявлениями цитокинового шторма и генерализованной ангиопатией [91].

Более того, гипотезу о том, что в постостром периоде коронавирусной инфекции мы видим лишь репарацию последствий ангиопатии подтверждает факт о том, что у ряда пациентов с течением времени кардиальные проявления постострого коронавирусного синдрома исчезают спонтанно. Также важно отметить, что в нашем исследовании мы обнаружили положительную корреляционную связь между временем от последней положительной ПЦР из назофарингиальных мазков пациента и количеством CD68+макрофагов в ткани миокарда. Это может косвенно свидетельствовать о том, что с течением времени от острой фазы коронавирусной инфекции в ряде случаев происходит восстановление ткани миокарда с полным морфологическим выздоровлением пациентов [62].

Мы считаем, что основные клинические симптомы постострого коронавирусного синдрома со стороны сердечно-сосудистой системы в постостром периоде коронавирусной инфекции также обусловлены местным цитокиновым дисбалансом и последствиями ангиопатии. Таким образом болевой синдром можно объяснить воздействием цитокинов на ноцицепторы миокарда, аритмии - местным цитокиновым дисбалансом с избыточной локальной активацией кардиомиоцитов и с формированием очагов re-entry, одышку и снижение толерантности к физическим нагрузкам - транзиторной сердечной дисфункцией вследствие последствий ангиопатии и ишемического повреждения миокарда.

Прямая этиологическая роль коронавируса в развитии миокардита в нашем исследовании не была доказана ни в одном из случаев. ОТ-цПЦР не обнаружила

РНК SARS-CoV-2 ни в одном из 5 случаев. Имmunогистохимическая экспрессия spike SARS-CoV-2 обнаруживалась лишь на воспалительном инфильтрате в ткани миокарда и на эндотелии единичных сосудов.

Широко известно, что основными путями проникновения SARS-CoV-2 в клетку являются рецепторы АПФ2 и CD16. Иммунофлюоресцентное исследование с коктейлем CD16 / spike SARS-CoV-2 подтвердило, что вирусные антигены и CD16 имеют локализацию на мембране клеток.

Рецептор АПФ2 слабо распространен в ткани миокарда и выявляется преимущественно на перицитах [146].

Экспрессия АПФ2 и spike SARS-CoV-2 наблюдалась нами на одних и тех же сосудах миокарда, что подтверждает возможность инфицирования вирусом перицитов с последующей перицит-ассоциированной ангиопатией, которая, по нашим данным, выражалась явной активацией эндотелия в остром периоде коронавирусной инфекции [119] и остаточной активацией эндотелия в постостром периоде коронавирусной инфекции с экспрессией МНС1, VWF, Ang1, VEGF, C1q в части случаев.

Сохранение экспрессии spike SARS-CoV-2 и отсутствие выявления РНК вируса с помощью ПЦР позволяет предположить, что мы видим лишь эпитопы вируса на мембранных клетках, в то время как сам вирус элиминирован из ткани в постостром периоде коронавирусной инфекции. С другой стороны, мы не можем однозначно утверждать, что в ткани миокарда не осталось вирусных частиц в минимальном количестве, не позволяющим детектировать его посредством количественной ПЦР.

У большинства пациентов в нашем исследовании существует явная связь между коронавирусной инфекцией и манифестацией клиники миокардита. Однако, только у одного пациента мы диагностировали активный лимфоцитарный миокардит, отсутствие экспрессии VP1-EntV и обнаружили слабую экспрессию

spike SARS-CoV-2 на воспалительном инфильтрате с оценкой в 1 балл. Низкий уровень экспрессии spike SARS-CoV-2 в этом случае и наличие экспрессии VP1-EntV у большинства остальных пациентов сильно снижают возможность развития коронавирус-ассоциированного миокардита у пациентов из нашей выборки и позволяют предположить, что большинство лимфоцитарных миокардитов являлись хроническими и клинически дебютировали только в постостром периоде коронавирусной инфекции. Логично предположить, что SARS-CoV-2 является триггером активации миокардита.

Этиологическая роль коронавируса в развитии вирус-негативной воспалительной кардиомиопатии также остаётся неясной. В настоящее время активно изучается роль пироптоза в развитии аутовоспаления и связи этих процессов с патогенезом вирус-негативного миокардита [187].

Хронизация воспалительного процесса и персистенция вируса в миокарде являются факторами неблагоприятного прогноза для пациентов [2].

В случаях, когда альтерация миокарда не полностью устранена, есть вероятность продолжения воспалительных процессов и преобладания M1-фенотипа макрофагов в ткани миокарда. M1-макрофаги в ткани миокарда могут способствовать синтезу NLRP3-инфламмасом, запуская программируемый некроз кардиомиоцитов. В свою очередь обилие DAMPs, выделяющихся в окружающую ткань будет способствовать миграции и дифференцировке моноцитов в M1-макрофаги, что может привести к образованию т.н. порочного круга болезни. Более того, SARS-CoV-2 экспрессирует минимум 3 белка (E, ORF3a и ORF8b), способные напрямую активировать инфламмасому NLRP3. Белок E вызывает нарушение внутриклеточного ионного баланса клетки, повреждение митохондрий и образование активных форм кислорода, что совместно приводит к активации NLRP3. Белки E и ORF3a стимулируют передачу сигналов NF-κB. Активация NF-κB приводит к экспрессии воспалительных цитокинов и хемокинов, включая IL-1β, IL-18 и IL-8, и доводит экспрессию NLRP3 до ее функционального уровня. Данный

процесс ведет к образованию пор газдермин-Д на клеточной мембране, которые вызывают пироптоз и способствуют высвобождению цитозольного содержимого во внеклеточное пространство, что в свою очередь может способствовать усилению воспалительной реакции и притоку М1-макрофагов в зону повреждения. Данные механизмы требуют дальнейшего изучения и углубленного понимания патофизиологии этих процессов.

Дополнительно, мы не обнаружили значимых различий в гистологической картине и содержании макрофагов между вакцинированными и невакцинированными пациентами. Это может свидетельствовать о том, что вакцина не влияет на процессы репарации в миокарде, и не вызывает дополнительных изменений в гистологической картине, которые могут повлиять на функцию сердца.

Наш взгляд на патогенез воздействия коронавирусной инфекции на миокард в разные периоды представлен на рисунке 47.

Пандемия коронавирусной инфекции также обозначила ряд вопросов об особенностях трансплантации сердца во время и после перенесенной инфекции COVID-19. Подавляющее большинство реципиентов с COVID-19, описанных в литературе, перенесли трансплантацию органа задолго до заражения вирусом, в среднем более 26 месяцев или даже 6,64 года [18, 133].

Случаи заражения в перитрансплантационном периоде единичны. Qin J. et al. описали COVID-19 у реципиента при трансплантации печени в периоперационный период. Авторы объясняют данный случай нераспознанной до трансплантации инфекцией [141].

Подавляющему большинству авторов не удалось зарегистрировать случаи передачи коронавируса от донора реципиенту при трансплантации нелёгочных органов, однако некоторые авторы описывают случаи передачи коронавируса реципиенту в ходе трансплантации легких. Следует отметить, что анамнестически

таких у доноров не было симптомов инфекции и ПЦР тестирование донора было отрицательно [90, 127, 153, 185].

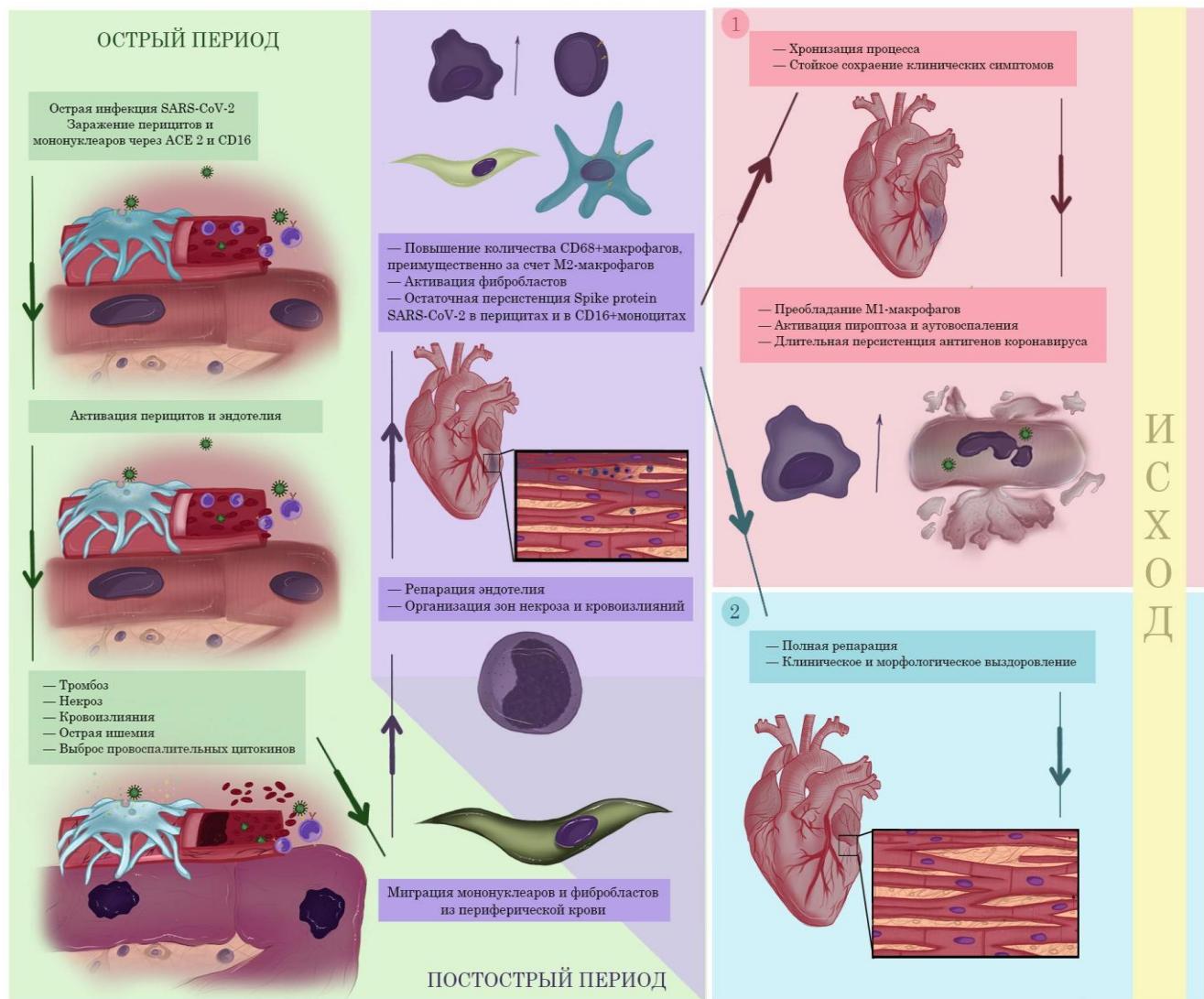


Рисунок 47 – Предполагаемый патогенез воздействия коронавируса на миокард

Мы провели анализ случаев передачи коронавируса во время трансплантации сердца, задокументированных в литературе.

Chih L. et al описывали 5 случаев ТС от доноров с положительным ПЦР-тестом назофарингеального мазка за 1 день до проведения трансплантации и положительными ПЦР-тестами бронхоальвеолярного лаважа в день трансплантации. Реципиент после ТС не обследовался и доказательств инфицирования реципиента не предоставлено. Осложнения в раннем

послеоперационном периоде включали наличие первичной дисфункции трансплантата только у одного пациента [46].

Jashari R. et al описывали 2 случая ТС от доноров с положительными ПЦР-тестами назофарингеального мазка в день трансплантации и отрицательными ПЦР-тестами ткани миокарда в день трансплантации. В первую ЭМБ после трансплантации было проведено ПЦР-исследование ткани миокарда на РНК SARS-CoV-2 – вируса обнаружено не было. Осложнений от процедуры ТС задокументировано не было [89].

Castro-Varela A. et al описывали 6 случаев ТС от доноров с положительными ПЦР-тестами назофарингеального мазка за 1-7 дней до трансплантации. После ТС реципиентам исследовали ПЦР назофарингеальных мазков: РНК SARS-CoV-2 обнаружено не было. Осложнения от процедуры ТС включали: 3 случая – первичная дисфункция трансплантата; 1 случай – диффузное повреждение кардиомиоцитов, перикардит, смерть [39].

Eichenberger E. M. et al описывали 9 случаев ТС от доноров с положительными ПЦР-тестами назофарингеального мазка за 1-7 дней до трансплантации. После ТС реципиентам исследовали ПЦР назофарингеальных мазков: РНК SARS-CoV-2 обнаружено не было. В одном случае исследовалась экспрессия spike SARS-CoV-2 в ЭМБ после ТС: обнаружение антигенов коронавируса в ткани миокарда. Осложнения от процедуры ТС включали: 1 случай – массивные кровотечения и геморрагический инфаркт миокарда [61].

Vaidya, G. N. et al. описывали 117 случаев ТС от доноров с положительными ПЦР-тестами назофарингеального мазка за 0-14 дней до трансплантации. После ТС реципиентам исследовали ПЦР назофарингеальных мазков: РНК SARS-CoV-2 обнаружено не было. Осложнения от процедуры ТС включали: 6 случаев – первичная дисфункция трансплантата; 9 случаев – смерть в раннем послеоперационном периоде от инфекционных осложнений (кроме инфекции SARS-CoV-2) [169].

Neidlinger N. A. et al. описывали 1 случай ТС от доноров с положительными ПЦР-тестом стула и отрицательным ПЦР-тестом назофарингеального мазка в день трансплантации. После ТС реципиенту исследовали ПЦР назофарингеальных мазков: РНК SARS-CoV-2 обнаружено не было. Осложнения от процедуры ТС не задокументированы [126].

Madan S. et al. описывали 150 случаев ТС от доноров с положительными ПЦР-тестами назофарингеального мазка за 0-2 дня до трансплантации. После ТС реципиентам исследовали ПЦР назофарингеальных мазков: РНК SARS-CoV-2 обнаружено не было. Осложнения от процедуры ТС не задокументированы [110].

На основании данных предыдущих исследований можно сделать вывод, что в большинстве случаев трансплантацию сердца выполняли в течение 0-7 дней после последнего положительного мазка из носоглотки. Однако ПЦР-тестирование ткани миокарда проводилось лишь в единичных случаях. Точно так же анализ посттрансплантационной эндомиокардиальной биопсии на антигены коронавируса проводился лишь в нескольких случаях. Несмотря на эти ограниченные данные, ни у одного из пациентов не было выявлено системной коронавирусной инфекции после трансплантации сердца.

Кроме того, ни в одном из зарегистрированных случаев наличие коронавирусной инфекции у донора не повлияло на исходы у реципиентов. Таким образом, трансплантация сердца от доноров с коронавирусной инфекцией представляется скорее относительно безопасной процедурой, чем рискованной.

В описанном нами клиническом случае показано, что в сердце донора была выявлена экспрессия белков коронавируса, в то время как в сердце пациентки до трансплантации — нет. Возможно, имеет место передача коронавируса от донора, но нельзя полностью исключить реинфекцию SARS-CoV-2 или повторное заражение больной. В то же время, нам недоступны какие-либо клинические данные о доноре.

Более того, длительность персистенции коронавируса в тканях, в том числе и в миокарде остается изучаемым вопросом. Длительная персистенция вируса в дыхательных путях в единичных случаях может достигать 4-5 месяцев, а в исследовании эндомиокардиальных биопсий мы обнаружили персистенцию коронавируса в миокарде в течение 20 месяцев от начала острой инфекции [73].

Пациенты с иммуносупрессией троны к более длительной персистенции коронавируса. Самая большая продолжительность выделения жизнеспособного вируса из мазка из носоглотки, о которой сообщалось в литературе, составляла около 8 месяцев у пациента с неходжкинской лимфомой [148]. Также Sepulcri C et al описывают клинический случай с выявлением виремии на протяжении 8 месяцев после инфицирования [148].

У некоторых реципиентов трансплантатов паренхиматозных органов также выявлялись положительные результаты ПЦР-тестирования на COVID-19 длительное время после инфекции [115].

Риск передачи COVID-19 от донора к реципиенту остается неизвестным. В нашем случае персистенция вируса в миокарде донора составляла до 34 дней после трансплантации сердца, что подтверждается отсутствием признаков эндотелиита и эндотелиоза в ЭМБ на 34-ый день после трансплантации сердца.

В нашем случае электронная микроскопия ЭМБ донорского сердца после трансплантации сердца выявила изменения не только в эндотелиоцитах, но и в перицитах.

Ряд вирусов реплицируется в сосудистых клетках и/или иммунных клетках, циркулирующих в сосудистой системе. Кроме того, способность проникать в кровоток и вызывать виремию необходима для передачи многих вирусов. Более того, АПФ2, входной рецептор для SARS-CoV-2, высоко экспрессируется в эндотелии и перицитах сердца человека [33]. Причем эндотелиальные клетки

имеют очень слабую экспрессию АПФ2, в то время как перициты – одну из самых высоких среди других клеток [37].

Таким образом, перициты с высокой экспрессией АПФ2 могут являться клетками-мишениями для SARS-CoV-2. Их повреждение может привести к дисфункции капиллярных эндотелиальных клеток, вызывая дисфункцию микрососудов в целом и к микроваскулопатии. А у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями также была обнаружена повышенная экспрессия АПФ2, что повышает риск более тяжелого течения инфекции у этой когорты пациентов [44].

Инфицированные SARS-CoV-2 перициты могут влиять на сосудистую функцию и вазореактивность, а также высвобождать растворимые медиаторы, способные активировать эндотелиальные клетки *in vitro*. Гибель клеток перицитов сердца возникает на более поздних стадиях инфекции в сочетании с воспалительной реакцией в эндотелиальных клетках может привести к потере целостности эндотелия, дисфункции эндотелиальных клеток, обнажению базальной мембранны, высвобождению субэндотелиального коллагена, активации тромбогенеза и хемотаксису гранулоцитов и макрофагов [29].

С другой стороны известно, что гуморальное отторжение трансплантата возникает из-за антителного иммунного ответа к эндотелию трансплантированного сердца. Антитела обычно направлены против молекул человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса I или класса II. Связывание донор-специфических антител с аллотрансплантатом вызывает активацию классического пути каскада комплемента, формирование мембран-атакующего комплекса и, впоследствии, к повреждению и лизису эндотелия. В некоторых случаях активация комплемента может привести к активации эндотелия, способствуя дальнейшему воспалению. Фрагменты системы комплемента, С3а и С5а, оказывают прямое воздействие на эндотелиальные клетки, а также являются хемоаттрактантами, рекрутируя нейтрофилы и макрофаги. Также высвобождение

субэндотелиального коллагена и продуктов цитоплазмы лизированного эндотелия активируют внешний и внутренний пути коагуляции, приводя к развитию тромботической микроангиопатии [46].

Исходя из вышесказанного, мы можем сделать вывод о том, что морфологические проявления как острого периода коронавирусной инфекцией в миокарде, так и гуморального отторжения трансплантата крайне схожи между собой: это тромботическая микроангиопатия, макрофагальная и гранулоцитарная инфильтрация стромы, продуктивный васкулит, а в тяжелых случаях геморрагические некрозы и обширные кровоизлияния в ткань миокарда. Таким образом, в случае развития морфологических признаков криза гуморального отторжения у пациента с острой коронавирусной инфекций следует исключить коронавирусную этиологию морфологических изменений в миокарде.

Также важно обозначить, что трансплантация сердца на фоне перенесенной коронавирусной инфекцией по-видимому является безопасной процедурой и не ассоциирована с увеличением частоты осложнений в посттрансплантационном периоде. Данные литературы свидетельствуют и о том, что трансплантация сердца возможна на фоне острой коронавирусной инфекции донора и не ассоциируется с увеличением количества осложнений и неблагоприятных исходов в послеоперационном периоде.

Наше исследование показало, что экспрессия spike SARS-CoV-2 в эндомиокардиальных биоптатах после трансплантации сердца является скорее отражением постострого периода коронавирусной инфекции и антигенной презентаций клеток макрофагального ряда, чем активированной инфекцией SARS-CoV-2 в сердцах доноров.

## Заключение

Результаты исследования освещают морфологические изменения в миокарде у пациентов с COVID-19. Так было установлено, что в острой фазе инфекции наиболее характерным изменением является эндотелиит и его осложнения в виде тромбозов и кровоизлияний. Однако, оказалось, что характер и тяжесть этих изменений также связаны и с наличием предшествующих сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь и клапанные пороки.

Исследование также осветило интересные различия в морфологии миокарда в разные волны пандемии. Оказалось, что эти различия не столько связаны с разными штаммами вируса, сколько с различными подходами к лечению пациентов. В остром периоде заболевания, эндотелиит и его осложнения в виде тромбозов и кровоизлияний преобладают в морфологической картине. Эти изменения могут быть снижены с помощью антикоагулянтной терапии, что подчеркивает её важность. В тоже время мы косвенно показали, что сочетание гидроксихлорохина / хлорохина с нестероидными противовоспалительными препаратами малоэффективно в лечении последствий дисэндотелиоза и более того, способно увеличить частоту развития повреждений миокарда на фоне коронавирусной инфекции, что было отмечено у пациентов I волны коронавирусной инфекции.

Также в ходе исследования было установлено, что перsistенция антигенов и вирионов SARS-CoV-2 в миокарде может быть долгосрочной. Вирионы и антигены вируса локализуются на клетках макрофагального ряда, а также на эндотелии сосудов и перицитах. Вирионы также обнаруживались в цитоплазме кардиомиоцитов, но их наличие, скорее всего, является abortивной инфекцией периода виремии.

Однако, несмотря на наличие антигенов в миокарде, мы не обнаружили вирусной нагрузки по результатам ПЦР исследования, что может

свидетельствовать о наличии в ткани миокарда только фрагментов коронавируса в виде эпитопов на макрофагах. Это дает основание предполагать, что прямая этиологическая роль коронавирусной инфекции в развитии миокардита является сомнительной.

Также данные исследования ставят под сомнение и роль коронавирусной инфекции в развитии аутоиммунного миокардита, однако, возможность развития аутовоспаления в ткани миокарда в постостром периоде коронавирусной инфекции остаётся дискутабельной.

Другие важные аспекты, выявленные в ходе исследования, связаны с трансплантацией сердца. В ряде случаев в ткани миокарда донорского сердца были обнаружили антигены коронавируса. Более того, в случаях тяжелого течения криза гуморального отторжения трансплантата была выявлена высокая инфильтрация тканей миокарда CD16+клетками, большая часть из которых также экспрессировала и антигены коронавируса. Таким образом, данное исследование обозначило коронавирусную инфекцию как возможный триггер развития AMR. Однако, возможность передачи жизнеспособного SARS-CoV-2 от донора к реципиенту при проведении трансплантации сомнительна.

Результаты исследования подчеркивают сложность и разнообразие морфологических изменений в миокарде при разных фазах течения коронавирусной инфекции и у разных категорий пациентов. Полученные данные помогают лучше понять морфологические аспекты COVID-19 в миокарде и подчеркивают важность дальнейших исследований в этой области для разработки более эффективных подходов к лечению и уходу за пациентами с COVID-19.

## Выводы

1. Комплексное морфологическое исследование с использованием гистологического, иммуногистохимического, иммунофлюоресцентного и ультраструктурного методов установило, что основным морфологическим проявлением COVID-19 в миокарде является дисэндотелиоз, представленный гипертрофией, гиперплазией, дисплазией, вакуольной дистрофией и некрозом эндотелиоцитов с ремоделированием капилляров, а также активацией эндотелия с экспрессией МНС1, VWF, Ang1, VEGF, C1q.
2. Сравнительный клинико-морфологический анализ миокарда 276 пациентов, умерших во время четырех волн COVID-19, показал, что хотя вирус все еще определяется в миокарде при подпороговых значениях ПЦР у пациентов IV волны, количество осложнений дисэндотелиоза – тромбозов и некоронарных некрозов достоверно уменьшилось уже к III волне ( $p = 0,001$  и  $p = 0,017$  соответственно) ровно как и количество миокардитов ( $p < 0,05$ ). При этом I волна достоверно отличалась гипертрофированным эндотелием в состоянии дисплазии и некрозами миокарда ( $p = 4,7\text{E-}26$ ), II – максимальным количеством макрофагов и отеком стромы ( $p = 6,0\text{E-}26$  и  $p = 1,3\text{E-}4$  соответственно), а III – числом случаев со спазмом и очаговым плазматическим пропитыванием стенок интрамуральных артерий ( $p = 6,4\text{E-}3$ ).
3. Только у 5% пациентов с острым COVID-19 был диагностирован активный лимфоцитарный миокардит. При этом количественная ПЦР не выявила РНК SARS-CoV-2 в миокарде ни в одном случае, а spike SARS-CoV-2 экспрессировался только на единичных, преимущественно эндотелиальных клетках у 3 из 14 пациентов. В то же время, у всех этих больных наблюдалась сверэкспрессия VP1-капсида энтеровирусов в сердце.
4. Иммуногистохимическое исследование и электронная микроскопия показали, что антигены и вирионы SARS-CoV-2 в миокарде локализуются

преимущественно в эндотелии, перицитах, макрофагах и крайне редко – в кардиомиоцитах. При этом нахождение вирионов является скорее транзиторным и отражает период виремии, а непродуктивная персистенция коронавируса может наблюдаться в срок до 20 месяцев от перенесённой острой инфекции COVID-19 и увеличивать риск возникновения, нетипичного протекания и прогрессии криза гуморального отторжения при трансплантации сердца.

5. Постострый период коронавирусной инфекции в сердце обусловлен персистенцией SARS-CoV-2 в эндотелии, перицитах и макрофагах и характеризуется достоверным увеличением числа макрофагов ( $p = 0,014$ ) за счет M2-макрофагов и снижением экспрессии VWF, Ang1, VEGF, C1q.

## **Практические рекомендации**

1. Иммуногистохимическое исследование с антителами к spike SARS-CoV-2 коррелирует с данными количественной ПЦР миокарда и является адекватным, но не достаточным для определения этиологии заболевания.
2. Морфологический диагноз коронавирусного миокардита может быть поставлен пациенту только при подтверждении данными гистологического, иммуногистохимического исследования и количественной ПЦР миокарда в отсутствии выявления других кардиотропных вирусов.
3. В случаях затяжного и атипичного криза гуморального отторжения при трансплантации сердца рекомендуется проводить иммуногистохимическое исследование эндомиокардиальных биопсий с антителом к spike SARS-CoV-2 для исключения персистенции вируса.

## Перспективы дальнейшей разработки темы

Исследование морфологических изменений в миокарде при острой и постострой коронавирусной инфекции предоставило важные научные выводы и предполагает ряд перспективных направлений для будущих исследований и практического применения:

1. Исследование динамики морфологических и функциональных изменений в миокарде в последующих волнах коронавирусной инфекции. Данные исследования помогут на ранних этапах волнообразного течения инфекции выявлять более вирулентные штаммы вируса в отношении повреждения сердечно-сосудистой системы и диктовать необходимость более интенсивной ангиопротективной терапии у данных пациентов.
2. Исследование эпигенетических воздействий. Эпигенетические изменения, вызванные коронавирусной инфекцией, могут иметь долгосрочные воздействия на сердечно-сосудистую систему. Дальнейшие исследования должны сосредоточиться на выявлении и понимании этих эффектов, а также на возможностях проявления отсроченных осложнений COVID-19.
3. Проспективное исследование долгосрочных эффектов. Проспективные исследования могут изучить функциональные и структурные изменения в миокарде на протяжении длительного времени, что может способствовать разработке эффективных стратегий реабилитации и лечения пациентов.
4. Развитие рекомендаций для вторичной и третичной профилактики. Дальнейшая разработка темы может включать создание более конкретных и персонализированных рекомендаций по физической активности и питанию для пациентов, перенесших коронавирусную инфекцию. Это может способствовать улучшению здоровья сердечно-сосудистой системы и снижению риска развития осложнений.

## Список сокращений

АПФ2 – ангиотензинпревращающий фермент-2

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГБ — гипертоническая болезнь

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС — ишемическая болезнь сердца

ИГХ – иммуногистохимия

ИФ – иммунофлюоресценция

КТ — компьютерная томография

ЛЖ – левый желудочек

МРТ – магнитно-резонансная томография

НБПНПГ — неполная блокада правой ножки пучка Гиса

ОПН — острая почечная недостаточность

ПБПВРЛНПГ — полная блокада передне-верхнего разветвления левой ножки пучка Гиса

ПИКС — постинфарктный кардиосклероз

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СД — сахарный диабет

ТС – трансплантация сердца

ФВ — фракция выброса

ФП — фибрилляция предсердий

ХСН — хроническая сердечная недостаточность

ХМЭКГ — холтеровское мониторирование электрокардиографии

ЦВБ — цереброваскулярная болезнь

ЭКГ — электрокардиография

ЭМБ — эндоциркулярная биопсия

ЭХО-КГ — эхокардиография

ЭМ — электронная микроскопия

AMR — antibody-mediated rejection

Ang — angiopoietin

CD — cluster of differentiation

COVID-19 — coronavirus disease 2019

DAMPs — damage-associated molecular patterns

ddPCR — droplet digital polymerase chain reaction

IFN — interferon

IL — interleukin

NETs — neutrophil extracellular traps

PAMPs — pathogen-associated molecular patterns

PASC — post-acute sequelae of COVID-19

TNF – tumor necrosis factor

TMPRSS2 – трансмембранный сериновая протеаза-2

VEGF – vascular endothelial growth factor

VWF – von Willebrand factor

## Список использованной литературы

1. COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение II: динамика циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2 / В.Г. Акимкин, А.Ю. Попова, К.Ф. Хафизов [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2022. — Т. 99. — №4. — С. 381-396.
2. Миокардиты у взрослых. Клинические рекомендации / Г. П. Арутюнов, Ф. Н. Палеев, О. М. Моисеева [и др.] // Российский кардиологический журнал. — 2021. — Т. 26. — №11. — С. 136-182.
3. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 6 (24.06.2020). Режим доступа: [https://fdiworlddental.org/sites/default/files/2020-11/vremennye\\_metodicheskie\\_rekomendacii\\_-\\_profilaktika\\_diagnostika\\_i\\_lechenie\\_novoy\\_koronavirusnoy\\_infekcii\\_covid\\_-19.pdf](https://fdiworlddental.org/sites/default/files/2020-11/vremennye_metodicheskie_rekomendacii_-_profilaktika_diagnostika_i_lechenie_novoy_koronavirusnoy_infekcii_covid_-19.pdf) (дата обращения: 10.07.2023).
4. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 9 (26.10.2020). Режим доступа: [https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attachess/000/052/548/original/%D0%9C%D0%A0\\_COVID-19\\_%28v.9%29.pdf](https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attachess/000/052/548/original/%D0%9C%D0%A0_COVID-19_%28v.9%29.pdf) (дата обращения: 10.07.2023).
5. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 11 (07.05.2021). Режим доступа: <http://nasci.ru/?id=40123&download=1> (дата обращения: 10.07.2023).
6. Кирьянов, С. А. Распространение вариантов с частыми мутациями в гене капсидного белка N в российских изолятах SARS-CoV-2 / С. А Кирьянов, Т. А. Левина, М. Ю. Кириллов // Вестник РГМУ. — 2020. — №4. — С. 21-26.

7. Клинико-морфологическое и молекулярно-биологическое исследование миокарда у пациентов с COVID-19 / Л.Б. Митрофанова, И.А. Макаров, А.Л. Рунов [и др.] // Российский кардиологический журнал. — 2022. — Т. 27. — №7. — С. 147-157.
8. Факторы риска тяжелого течения и летального исхода COVID-19 / С.Г. Щербак, Т.А. Камилова, А.С. Голота [и др.] // Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. — 2022. — Т. 4. — №1. — С. 14-36.
9. Clinical and cardiac characteristics of COVID-19 mortalities in a diverse New York City Cohort / M.P. Abrams, E.Y. Wan, M.P. Waase [et al.] // Journal of cardiovascular electrophysiology. — 2020. — Vol. 31. — Is. 12. — P. 3086-3096.
10. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19 / M. Ackermann, S.E. Verleden, M. Kuehnel [et al.] // The New England journal of medicine. — 2020. — Vol. 383. — Is. 2. — P. 120-128.
11. Adeghate, E.A. Mechanisms of COVID-19-induced heart failure: a short review / E.A. Adeghate, N. Eid, J. Singh // Heart failure reviews. — 2021. — Vol. 26. — Is. 2. — P. 363-369.
12. Postacute COVID-19: An Overview and Approach to Classification / E.M. Amenta, A. Spallone, M.C. Rodriguez-Barradas [et al.] // Open forum infectious diseases. — 2020. — Vol. 7. — Is. 12. — P. 509.
13. Management of Acute Myocarditis and Chronic Inflammatory Cardiomyopathy: An Expert Consensus Document / E. Ammirati, M. Frigerio, E.D. Adler [et al.] // Circulation. Heart failure. — 2020. — Vol. 13. — Is. 11. — P. e007405.
14. Prevalence, Characteristics, and Outcomes of COVID-19-Associated Acute Myocarditis / E. Ammirati, L. Lupi, M. Palazzini [et al.] // Circulation. — 2022. — Vol. 145. — Is. 15. — P. 1123-1139.

15. CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN Act as Receptors for SARS-CoV-2 / R. Amraei, W. Yin, M.A. Napoleon [et al.] // ACS central science. — 2021. — Vol. 7. — Is. 7. — P. 1156-1165.
16. Enteroviruses can persist with or without active viral replication in cardiac tissue of patients with end-stage ischemic or dilated cardiomyopathy / L. Andréoletti, T. Bourlet, D. Moukassa [et al.] // The Journal of infectious diseases. — 2000. — Vol. 182. — Is. 4. — P. 1222-1227.
17. The distribution of cardiac macrophages in myocardial ischaemia and cardiomyopathy / M. Azzawi, S.W. Kan, V. Hillier [et al.] // Histopathology. — 2005. — Vol. 46. — Is. 3. — P. 314-319.
18. COVID-19 and Solid Organ Transplantation: A Review Article / Y. Azzi, R. Bartash, J. Scalea [et al.] // Transplantation. — 2021. — Vol. 105. — Is. 1. — P. 37-55.
19. COVID-19 pandemic in Saint Petersburg, Russia: Combining population-based serological study and surveillance data / A. Barchuk, D. Skougarevskiy, A. Kouprianov [et al.] // PloS one. — 2022. — Vol. 17. — Is. 6. — P. e0266945.
20. Basu-Ray, I. Cardiac Manifestations of Coronavirus (COVID-19) / I. Basu-Ray, N.K. Almaddah, A. Adeboye // In: StatPearls [Internet]. — 2023. — Treasure Island. — StatPearls Publishing
21. Becker, R.C. COVID-19 and its sequelae: a platform for optimal patient care, discovery and training / R.C. Becker // Journal of thrombosis and thrombolysis. — 2021. — Vol. 51. — Is. 3. — P. 587-594.
22. Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8+ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease / L. Bergamaschi, F. Mescia, L. Turner [et al.] // Immunity. — 2021. — Vol. 54. — Is. 6. — P. 1257-1275.

23. Electrocardiographic features of 431 consecutive, critically ill COVID-19 patients: an insight into the mechanisms of cardiac involvement / M. Bertini, R. Ferrari, G. Guardigli [et al.] // Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology. — 2020. — Vol. 22. — Is. 12. — P. 1848-1854.
24. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up: JACC State-of-the-Art Review / B. Bikdeli, M.V. Madhavan, D. Jimenez [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. — 2020. — Vol. 75. — Is. 23. — P. 2950-2973.
25. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19 / D. Blanco-Melo, B.E. Nilsson-Payant, W.C. Liu [et al.] // Cell. — 2020. — Vol. 181. — Is. 5. — P. 1036-1045.
26. Association Between COVID-19 and Myocarditis Using Hospital-Based Administrative Data - United States, March 2020-January 2021 / T.K. Boehmer, L. Kompaniyets, A.M. Lavery [et al.] // MMWR. Morbidity and mortality weekly report. — 2021. — Vol. 70. — Is. 35. — P. 1228-1232.
27. Association of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) With Myocardial Injury and Mortality / R.O. Bonow, G.C. Fonarow, P.T. O'Gara [et al.] // JAMA cardiology. — 2020. — Vol. 5. — Is. 7. — P. 751-753.
28. Borczuk, A.C. The pathogenesis of coronavirus-19 disease / A.C. Borczuk, R.K. Yantiss // Journal of biomedical science. — 2022. — Vol. 29. — Is. 1. — P. 87.
29. Human Cardiac Pericytes Are Susceptible to SARS-CoV-2 Infection / B.D. Brumback, O. Dmytrenko, A.N. Robinson [et al.] // JACC. Basic to translational science. — 2023. — Vol. 8. — Is. 2. — P. 109-120.

30. Prevalence and clinical outcomes of myocarditis and pericarditis in 718,365 COVID-19 patients / B.J.R. Buckley, S.L. Harrison, E. Fazio-Eynullayeva [et al.] // European journal of clinical investigation. — 2021. — Vol. 51. — Is. 11. — P. e13679.
31. Bularga, A. Mechanisms of Myocardial Injury in COVID-19 / A. Bularga, A.R. Chapman, N.L. Mills // Clinical chemistry. — 2021. — Vol. 67. — Is. 8. — P. 1044-1046.
32. Evidence of SARS-CoV-2 Transcriptional Activity in Cardiomyocytes of COVID-19 Patients without Clinical Signs of Cardiac Involvement / G.P. Bulfamante, G.L. Perrucci, M. Falleni [et al.] // Biomedicines. — 2020. — Vol. 8. — Is. 12.
33. The emerging role of perivascular cells (pericytes) in viral pathogenesis / T. Butsabong, M. Felippe, P. Campagnolo [et al.] // The Journal of general virology. — 2021. — Vol. 102. — Is. 8.
34. COVID-19 Data Explorer: [website] / World Health Organization. - Geneva: World Health Organization, [2020-]. - Updated regularly. - URL: <https://covid19.who.int/> (accessed on: 18.09.2023). - Text: electronic
35. Clinically Suspected and Biopsy-Proven Myocarditis Temporally Associated with SARS-CoV-2 Infection / A.L.P. Caforio, A. Baritussio, C. Basso [et al.] // Annual review of medicine. — 2022. — Vol. 73. — P. 149-166.
36. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity / L. Cantuti-Castelvetri, R. Ojha, L.D. Pedro [et al.] // Science (New York, N.Y.). — 2020. — Vol. 370. — Is. 6518. — P. 856-860.
37. Pericyte alteration sheds light on micro-vasculopathy in COVID-19 infection / N. Cardot-Leccia, T. Hubiche, J. Dellamonica [et al.] // Intensive care medicine. — 2020. — Vol. 46. — Is. 9. — P. 1777-1778.

38. Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein / L. Casalino, Z. Gaieb, J.A. Goldsmith [et al.] // ACS central science. — 2020. — Vol. 6. — Is. 10. — P. 1722-1734.
39. Heart Transplantation from COVID-19-Positive Donors: A Word of Caution / A. Castro-Varela, C. Gallego-Navarro, E. Bhaimia [et al.] // Transplantation proceedings. — 2023. — Vol. 55. — Is. 3. — P. 533-539.
40. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster / J.F. Chan, S. Yuan, K.H. Kok [et al.] // Lancet (London, England). — 2020. — Vol. 395. — Is. 10223. — P. 514-523.
41. Cardiac Involvement of COVID-19: A Comprehensive Review / W.T. Chang, H.S. Toh, C.T. Liao [et al.] // The American journal of the medical sciences. — 2021. — Vol. 361. — Is. 1. — P. 14-22.
42. Chapman, A.R. High-Sensitivity Cardiac Troponin Can Be an Ally in the Fight Against COVID-19 / A.R. Chapman, A. Bularga, N.L. Mills // Circulation. — 2020. — Vol. 141. — Is. 22. — P. 1733-1735.
43. Chen, C. SARS-CoV-2: a potential novel etiology of fulminant myocarditis / C. Chen, Y. Zhou, D.W. Wang // Herz. — 2020. — Vol. 45. — Is. 3. — P. 230-232.
44. The ACE2 expression in human heart indicates new potential mechanism of heart injury among patients infected with SARS-CoV-2 / L. Chen, X. Li, M. Chen [et al.] // Cardiovascular research. — 2020. — Vol. 116. — Is. 6. — P. 1097-1100.
45. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study / N. Chen, M. Zhou, X. Dong [et al.] // Lancet (London, England). — 2020. — Vol. 395. — Is. 10223. — P. 507-513.

46. Antibody-mediated rejection: an evolving entity in heart transplantation / S. Chih, A. Chruscinski, H.J. Ross [et al.] // Journal of transplantation. — 2012. — Vol. 2012. — P. 210210.
47. Host and viral determinants for efficient SARS-CoV-2 infection of the human lung / H. Chu, B. Hu, X. Huang [et al.] // Nature communications. — 2021. — Vol. 12. — Is. 1. — P. 134.
48. COVID-19 and Cardiovascular Disease / K.J. Clerkin, J.A. Fried, J. Raikhelkar [et al.] // Circulation. — 2020. — Vol. 141. — Is. 20. — P. 1648-1655.
49. Cardiac adverse events associated with chloroquine and hydroxychloroquine exposure in 20 years of drug safety surveillance reports / I.V. Cohen, T. Makunts, T. Moumedjian [et al.] // Scientific reports. — 2020. — Vol. 10. — Is. 1. — P. 19199.
50. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 / Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses // Nature microbiology. — 2020. — Vol. 5. — Is. 4. — P. 536-544.
51. Mitochondrial DNA and TLR9 activation contribute to SARS-CoV-2-induced endothelial cell damage / T.J. Costa, S.R. Potje, T.F.C. Fraga-Silva [et al.] // Vascular pharmacology. — 2022. — Vol. 142. — P. 106946.
52. Cui, J. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses / J. Cui, F. Li, Z.L. Shi // Nature reviews. Microbiology. — 2019. — Vol. 17. — Is. 3. — P. 181-192.
53. SARS-CoV-2, myocardial injury and inflammation: insights from a large clinical and autopsy study / F. Dal, R. Bussani, A. Paldino [et al.] // Clinical research in cardiology. — 2021. — Vol. 110. — Is. 11. — P. 1822-1831.

54. Angiopoietin-1 promotes cardiac and skeletal myocyte survival through integrins / S.M. Dallabrida, N. Ismail, J.R. Oberle [et al.] // Circulation research. — 2005. — Vol. 96. — Is. 4. — P. e8-24.
55. Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact / H.E. Davis, G.S. Assaf, L. McCorkell [et al.] // EClinicalMedicine. — 2021. — Vol. 38. — P. 101019.
56. Endothelial Dysfunction and SARS-CoV-2 Infection: Association and Therapeutic Strategies / H. Deng, T.X. Tang, D. Chen [et al.] // Pathogens (Basel, Switzerland). — 2021. — Vol. 10. — Is. 5.
57. Arrhythmias and COVID-19: A Review / P. Dherange, J. Lang, P. Qian [et al.] // JACC. Clinical electrophysiology. — 2020. — Vol. 6. — Is. 9. — P. 1193-1204.
58. Self-renewing resident cardiac macrophages limit adverse remodeling following myocardial infarction / S.A. Dick, J.A. Macklin, S. Nejat [et al.] // Nature immunology. — 2019. — Vol. 20. — Is. 1. — P. 29-39.
59. Cardiovascular Considerations for Patients, Health Care Workers, and Health Systems During the COVID-19 Pandemic / E. Driggin, M.V. Madhavan, B. Bikdeli [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. — 2020. — Vol. 75. — Is. 18. — P. 2352-2371.
60. Identification of Distinct Immunophenotypes in Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients / T. Dupont, S. Caillat-Zucman, V. Fremeaux-Bacchi [et al.] // Chest. — 2021. — Vol. 159. — Is. 5. — P. 1884-1893.
61. Transplanting thoracic COVID-19 positive donors: An institutional protocol and report of the first 14 cases / E.M. Eichenberger, A.C. Coniglio, C. Milano [et al.] // The Journal of heart and lung transplantation. — 2022. — Vol. 41. — Is. 10. — P. 1376-1381.

62. Italian intersociety consensus on management of long covid in children / S. Esposito, N. Principi, C. Azzari [et al.] // *Italian journal of pediatrics*. — 2022. — Vol. 48. — Is. 1. — P. 42.
63. Estabragh, Z.R. The cardiovascular manifestations of influenza: a systematic review / Z.R. Estabragh, M.A. Mamas // *International journal of cardiology*. — 2013. — Vol. 167. — Is. 6. — P. 2397-403.
64. Note from the editors: World Health Organization declares novel coronavirus (2019-nCoV) sixth public health emergency of international concern / Eurosurveillance editorial team // *Euro Surveill*. — 2020. — Vol. 25. — Is. 5.
65. Defining Post-COVID Symptoms (Post-Acute COVID, Long COVID, Persistent Post-COVID): An Integrative Classification / C. Fernández-de-Las-Peñas, D. Palacios-Ceña, V. Gómez-Mayordomo [et al.] // *International journal of environmental research and public health*. — 2021. — Vol. 18. — Is. 5.
66. Finsterer, J. SARS-CoV-2 triggered Takotsubo in 38 patients / J. Finsterer, C. Stöllberger // *Journal of medical virology*. — 2021. — Vol. 93. — Is. 3. — P. 1236-1238.
67. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Oxidative Stress in COVID-19-Mechanisms and Therapeutic Targets / A. Fodor, B. Tiperciuc, C. Login [et al.] // *Oxidative medicine and cellular longevity*. — 2021. — Vol. 2021.
68. Fox, S.E. COVID-19 myocarditis: quantitative analysis of the inflammatory infiltrate and a proposed mechanism / S.E. Fox, L. Falgout, H.e.i.d.e. Vander // *Cardiovascular pathology*. — 2021. — Vol. 54. — P. 107361.
69. Pulmonary and cardiac pathology in African American patients with COVID-19: an autopsy series from New Orleans / S.E. Fox, A. Akmatbekov, J.L. Harbert [et al.] // *The Lancet. Respiratory medicine*. — 2020. — Vol. 8. — Is. 7. — P. 681-686.

70. COVID-19-Associated Myocarditis: An Evolving Concern in Cardiology and Beyond / M. Fraser, A.C.C. Agdamag, V.R. Maharaj [et al.] // *Biology*. — 2022. — Vol. 11. — Is. 4.
71. Friedrich, M.G. What we (don't) know about myocardial injury after COVID-19 / M.G. Friedrich, L.T. Cooper // *European heart journal*. — 2021. — Vol. 42. — Is. 19. — P. 1879-1882.
72. The Roles of Macrophages in Heart Regeneration and Repair After Injury / Y. Gao, N. Qian, J. Xu [et al.] // *Frontiers in cardiovascular medicine*. — 2021. — Vol. 8. — P. 744615.
73. Gaspar-Rodríguez, A. Coronavirus persistence in human respiratory tract and cell culture: An overview / A. Gaspar-Rodríguez, A. Padilla-González, E. Rivera-Toledo // *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. — 2021. — Vol. 25. — Is. 5. — P. 101632.
74. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2 / M. Gheblawi, K. Wang, A. Viveiros [et al.] // *Circulation research*. — 2020. — Vol. 126. — Is. 10. — P. 1456-1474.
75. Self-reported Olfactory and Taste Disorders in Patients With Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 Infection: A Cross-sectional Study / A. Giacomelli, L. Pezzati, F. Conti [et al.] // *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. — 2020. — Vol. 71. — Is. 15. — P. 889-890.
76. Coronavirus and Cardiovascular Disease, Myocardial Injury, and Arrhythmia: JACC Focus Seminar / G. Giustino, S.P. Pinney, A. Lala [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. — 2020. — Vol. 76. — Is. 17. — P. 2011-2023.

77. Return-to-work, disabilities and occupational health in the age of COVID-19 / D. Godeau, A. Petit, I. Richard [et al.] // Scandinavian journal of work, environment & health. — 2021. — Vol. 47. — Is. 5. — P. 408-409.
78. Gralinski, L.E. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV / L.E. Gralinski, V.D. Menachery // Viruses. — 2020. — Vol. 12. — Is. 2.
79. Greenhalgh, T. Management of post-acute covid-19 in primary care / T. Greenhalgh, M. Knight, C. A'Court [et al.] // BMJ (Clinical research ed.). — 2020. — Vol. 370. — P. m3026.
80. Grzywacz, B. CD56(dim)CD16(+) NK cells downregulate CD16 following target cell induced activation of matrix metalloproteinases / B. Grzywacz, N. Kataria, M.R. Verneris // Leukemia. — 2007. — Vol. 21. — Is. 2. — P. 356-359.
81. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China / W.J. Guan, Z.Y. Ni, Y. Hu [et al.] // The New England journal of medicine. — 2020. — Vol. 382. — Is. 18. — P. 1708-1720.
82. Identifying SARS-CoV-2 'memory' NK cells from COVID-19 convalescent donors for adoptive cell therapy / L. Herrera, M. Martin-Inaraja, S. Santos [et al.] // Immunology. — 2022. — Vol. 165. — Is. 2. — P. 234-249.
83. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19 / J.S. Hirsch, J.H. Ng, D.W. Ross [et al.] // Kidney international. — 2020. — Vol. 98. — Is. 1. — P. 209-218.
84. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality / S. Hojyo, M. Uchida, K. Tanaka [et al.] // Inflammation and regeneration. — 2020. — Vol. 40. — P. 37.
85. Holmes, K.V. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy / K.V. Holmes // The Journal of clinical investigation. — 2003. — Vol. 111. — Is. 11. — P. 1605-1609.

86. Coronavirus fulminant myocarditis treated with glucocorticoid and human immunoglobulin / H. Hu, F. Ma, X. Wei [et al.] // European heart journal. — 2021. — Vol. 42. — Is. 2. — P. 206.
87. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China / C. Huang, Y. Wang, X. Li [et al.] // Lancet (London, England). — 2020. — Vol. 395. — Is. 10223. — P. 497-506.
88. Coronavirus disease (COVID-19) associated delayed-onset fulminant myocarditis in patient with a history of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection / H. Ishikura, J. Maruyama, K. Hoshino [et al.] // Journal of infection and chemotherapy. — 2021. — Vol. 27. — Is. 12. — P. 1760-1764.
89. The risk of transmission of the novel coronavirus (SARS-CoV-2) with human heart valve transplantation: evaluation of cardio-vascular tissues from two consecutive heart donors with asymptomatic COVID-19 / R. Jashari, E. Van, J. Vanhaebost [et al.] // Cell and tissue banking. — 2021. — Vol. 22. — Is. 4. — P. 665-674.
90. Donor to recipient transmission of SARS-CoV-2 by lung transplantation despite negative donor upper respiratory tract testing / D.R. Kaul, A.L. Valesano, J.G. Petrie [et al.] // American journal of transplantation. — 2021. — Vol. 21. — Is. 8. — P. 2885-2889.
91. Pathological Evidence for SARS-CoV-2 as a Cause of Myocarditis: JACC Review Topic of the Week / R. Kawakami, A. Sakamoto, K. Kawai [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. — 2021. — Vol. 77. — Is. 3. — P. 314-325.
92. COVID-19-related myocarditis in a 21-year-old female patient / I.C. Kim, J.Y. Kim, H.A. Kim [et al.] // European heart journal. — 2020. — Vol. 41. — Is. 19. — P. 1859.

93. Macrophage Polarization in Cardiac Tissue Repair Following Myocardial Infarction / Y. Kim, S. Nurakhayev, A. Nurkesh [et al.] // International journal of molecular sciences. — 2021. — Vol. 22. — Is. 5.
94. Age-dependent pathogenic characteristics of SARS-CoV-2 infection in ferrets / Y.I. Kim, K.M. Yu, J.Y. Koh [et al.] // Nature communications. — 2022. — Vol. 13. — Is. 1. — P. 21.
95. Interferon-alpha or -beta facilitates SARS-CoV-2 pulmonary vascular infection by inducing ACE2 / T. Klouda, Y. Hao, H. Kim [et al.] // Angiogenesis. — 2022. — Vol. 25. — Is. 2. — P. 225-240.
96. Cardiac and arrhythmic complications in patients with COVID-19 / A.N. Kochi, A.P. Tagliari, G.B. Forleo [et al.] // Journal of cardiovascular electrophysiology. — 2020. — Vol. 31. — Is. 5. — P. 1003-1008.
97. Komiyama, M. Anticoagulant Therapy for Patients with Coronavirus Disease 2019: Urgent Need for Enhanced Awareness / M. Komiyama, K. Hasegawa // European cardiology. — 2020. — Vol. 15. — P. e58.
98. L-SIGN is a receptor on liver sinusoidal endothelial cells for SARS-CoV-2 virus / Y. Kondo, J.L. Larabee, L. Gao [et al.] // JCI insight. — 2021. — Vol. 6. — Is. 14.
99. Patterns of myocardial injury in recovered troponin-positive COVID-19 patients assessed by cardiovascular magnetic resonance / T. Kotecha, D.S. Knight, Y. Razvi [et al.] // European heart journal. — 2021. — Vol. 42. — Is. 19. — P. 1866-1878.
100. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor / J. Lan, J. Ge, J. Yu [et al.] // Nature. — 2020. — Vol. 581. — Is. 7807. — P. 215-220.
101. Single-cell transcriptome of bronchoalveolar lavage fluid reveals sequential change of macrophages during SARS-CoV-2 infection in ferrets / J.S. Lee, J.Y. Koh, K. Yi [et al.] // Nature communications. — 2021. — Vol. 12. — Is. 1. — P. 4567.

102. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE 2 / Y. Lei, J. Zhang, C.R. Schiavon [et al.] // Circulation research. — 2021. — Vol. 128. — Is. 9. — P. 1323-1326.
103. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection / W.K. Leung, K.F. To, P.K. Chan [et al.] // Gastroenterology. — 2003. — Vol. 125. — Is. 4. — P. 1011-1017.
104. Prevalence and impact of cardiovascular metabolic diseases on COVID-19 in China / B. Li, J. Yang, F. Zhao [et al.] // Clinical research in cardiology. — 2020. — Vol. 109. — Is. 5. — P. 531-538.
105. Association of Cardiac Infection With SARS-CoV-2 in Confirmed COVID-19 Autopsy Cases / D. Lindner, A. Fitzek, H. Bräuninger [et al.] // JAMA cardiology. — 2020. — Vol. 5. — Is. 11. — P. 1281-1285.
106. The Science Underlying COVID-19: Implications for the Cardiovascular System / P.P. Liu, A. Blet, D. Smyth [et al.] // Circulation. — 2020. — Vol. 142. — Is. 1. — P. 68-78.
107. SARS-CoV-2 Infection in Children / X. Lu, L. Zhang, H. Du [et al.] // The New England journal of medicine. — 2020. — Vol. 382. — Is. 17. — P. 1663-1665.
108. Increased complement activation is a distinctive feature of severe SARS-CoV-2 infection / L. Ma, S.K. Sahu, M. Cano [et al.] // Science immunology. — 2021. — Vol. 6. — Is. 59.
109. Single-cell transcriptomic atlas of primate cardiopulmonary aging / S. Ma, S. Sun, J. Li [et al.] // Cell research. — 2021. — Vol. 31. — Is. 4. — P. 415-432.
110. Early Outcomes of Adult Heart Transplantation From COVID-19 Infected Donors / S. Madan, M.A.G. Chan, O. Saeed [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. — 2023. — Vol. 81. — Is. 24. — P. 2344-2357.

111. Influenza epidemics and acute respiratory disease activity are associated with a surge in autopsy-confirmed coronary heart disease death: results from 8 years of autopsies in 34,892 subjects / M. Madjid, C.C. Miller, V.V. Zarubaev [et al.] // European heart journal. — 2007. — Vol. 28. — Is. 10. — P. 1205-1210.
112. Magadum, A. Cardiovascular Manifestations of COVID-19 Infection / A. Magadum, R. Kishore // Cells. — 2020. — Vol. 9. — Is. 11.
113. Myocardial Pathology in COVID-19-Associated Cardiac Injury: A Systematic Review / A. Maiese, P. Frati, D.u.c.a. Del [et al.] // Diagnostics (Basel, Switzerland). — 2021. — Vol. 11. — Is. 9.
114. Relationship Between Endothelial and Angiogenesis Biomarkers Envisage Mortality in a Prospective Cohort of COVID-19 Patients Requiring Respiratory Support / F. Maldonado, D. Morales, C. Díaz-Papapietro [et al.] // Frontiers in medicine. — 2022. — Vol. 9. — Is. 1. — P. 826218.
115. Viral shedding prolongation in a kidney transplant patient with COVID-19 pneumonia / Z. Man, Z. Jing, S. Huibo [et al.] // American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. — 2020. — Vol. 20. — Is. 9. — P. 2626-2627.
116. Enteroviruses and coronaviruses: similarities and therapeutic targets / V. Marjomäki, K. Kalander, M. Hellman [et al.] // Expert opinion on therapeutic targets. — 2021. — Vol. 25. — Is. 6. — P. 479-489.
117. Hydroxychloroquine Attenuates Myocardial Ischemic and Post-Ischemic Reperfusion Injury by Inhibiting the Toll-Like Receptor 9 - Type I Interferon Pathway / K.M. Marsh, R. Rastogi, A. Zhang [et al.] // Cardiology and cardiovascular medicine. — 2022. — Vol. 6. — Is. 4. — P. 416-423.

118. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression / P. Mehta, D.F. McAuley, M. Brown [et al.] // Lancet (London, England). — 2020. — Vol. 395. — Is. 10229. — P. 1033-1034.
119. Comparative Study of the Myocardium of Patients from Four COVID-19 Waves / L.B. Mitrofanova, I.A. Makarov, A.N. Gorshkov [et al.] // Diagnostics (Basel, Switzerland). — 2023. — Vol. 13. — Is. 9. — P. 1645.
120. Endothelial cells of different organs exhibit heterogeneity in von Willebrand factor expression in response to hypoxia / A. Mojiri, P. Alavi, C.a.r.r.i.l.l.o. Lorenzana [et al.] // Atherosclerosis. — 2019. — Vol. 282. — Is. 1. — P. 1-10.
121. Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age / K. Molawi, Y. Wolf, P.K. Kandalla [et al.] // The Journal of experimental medicine. — 2014. — Vol. 211. — Is. 11. — P. 2151-2158.
122. Interferon gamma, TGF- $\beta$ 1 and RANTES expression in upper airway samples from SARS-CoV-2 infected patients / V. Montalvo, R. Valdés, J. Muné [et al.] // Clinical immunology (Orlando, Fla.). — 2020. — Vol. 220. — P. 108576.
123. Myocarditis Following Immunization With mRNA COVID-19 Vaccines in Members of the US Military / J. Montgomery, M. Ryan, R. Engler [et al.] // JAMA cardiology. — 2021. — Vol. 6. — Is. 10. — P. 1202-1206.
124. Endothelial Dysfunction and Thrombosis in Patients With COVID-19-Brief Report / S. Nagashima, M.C. Mendes, M. Camargo [et al.] // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. — 2020. — Vol. 40. — Is. 10. — P. 2404-2407.
125. Post-acute COVID-19 syndrome / A. Nalbandian, K. Sehgal, A. Gupta [et al.] // Nature medicine. — 2021. — Vol. 27. — Is. 4. — P. 601-615.
126. Organ recovery from deceased donors with prior COVID-19: A case series / N.A. Neidlinger, J.A. Smith, A.M. D'Alessandro [et al.] // Transplant infectious disease. — 2021. — Vol. 23. — Is. 2. — P. e13503.

127. Transplant of SARS-CoV-2-infected Living Donor Liver: Case Report / M.C. Nguyen, E.J. Lee, R.K. Avery [et al.] // *Transplantation direct.* — 2021. — Vol. 7. — Is. 8. — P. e721.
128. COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives / M. Nishiga, D.W. Wang, Y. Han [et al.] // *Nature reviews. Cardiology.* — 2020. — Vol. 17. — Is. 9. — P. 543-558.
129. Cardiac postacute sequelae symptoms of SARS-CoV-2 in community-dwelling adults: cross-sectional study / O. Ogungbe, N.A. Gilotra, P.M., Davidson [et al.] // — Text: electronic // *Open Heart.* — 2022. — №9. — URL: <https://openheart.bmj.com/content/9/2/e002084/> (accessed on: 10.07.2023)
130. Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: A report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis / M. Panigada, N. Bottino, P. Tagliabue [et al.] // *Journal of thrombosis and haemostasis.* — 2020. — Vol. 18. — Is. 7. — P. 1738-1742.
131. Association of Treatment Dose Anticoagulation With In-Hospital Survival Among Hospitalized Patients With COVID-19 / I. Paranjpe, V. Fuster, A. Lala [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology.* — 2020. — Vol. 76. — Is. 1. — P. 122-124.
132. Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock / N. Pathan, C.A. Hemingway, A.A. Alizadeh [et al.] // *Lancet.* — 2004. — Vol. 363. — Is. 9404. — P. 203-209.
133. COVID-19 in solid organ transplant recipients: Initial report from the US epicenter / M.R. Pereira, S. Mohan, D.J. Cohen [et al.] // *American journal of transplantation.* — 2020. — Vol. 20. — Is. 7. — P. 1800-1808.

134. Post-acute sequelae of covid-19 six to 12 months after infection: population based study / R.S. Peter, A. Nieters, H.G. Kräusslich [et al.] // BMJ (Clinical research ed.). — 2022. — Vol. 379. — P. e071050.
135. Cardiovascular Magnetic Resonance for Patients With COVID-19 / S.E. Petersen, M.G. Friedrich, T. Leiner [et al.] // JACC. Cardiovascular imaging. — 2022. — Vol. 15. — Is. 4. — P. 685-699.
136. Association of Neutrophil Activation, More Than Platelet Activation, With Thrombotic Complications in Coronavirus Disease 2019 / E. Petito, E. Falcinelli, U. Paliani [et al.] // The Journal of infectious diseases. — 2021. — Vol. 223. — Is. 6. — P. 933-944.
137. Circulating markers of angiogenesis and endotheliopathy in COVID-19 / A.B. Pine, M.L. Meizlish, G. Goshua [et al.] // Pulmonary circulation. — 2020. — Vol. 10. — Is. 4. — P. 2045894020966547.
138. Proal, A.D. Long COVID or Post-acute Sequelae of COVID-19 (PASC): An Overview of Biological Factors That May Contribute to Persistent Symptoms / A.D. Proal, M.B. VanElzakker // Frontiers in microbiology. — 2021. — Vol. 12. — P. 698169.
139. Outcomes of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Patients Recently Recovered From Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) / V.O. Puntmann, M.L. Carerj, I. Wieters [et al.] // JAMA cardiology. — 2020. — Vol. 5. — Is. 11. — P. 1265-1273.
140. Direct Activation of Endothelial Cells by SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Is Blocked by Simvastatin / Y. Qian, T. Lei, P.S. Patel [et al.] // Journal of virology. — 2021. — Vol. 95. — Is. 23. — P. e0139621.

141. Perioperative Presentation of COVID-19 Disease in a Liver Transplant Recipient / J. Qin, H. Wang, X. Qin [et al.] // Hepatology (Baltimore, Md.). — 2020. — Vol. 72. — Is. 4. — P. 1491-1493.
142. Effect of SARS-CoV-2 proteins on vascular permeability / R. Rauti, M. Shahoha, Y. Leichtmann-Bardoogo [et al.] // eLife. — 2021. — Vol. 10.
143. Early effects of hypoxia/reoxygenation on VEGF, ang-1, ang-2 and their receptors in the rat myocardium: implications for myocardial angiogenesis / P.S. Ray, T. Estrada-Hernandez, H. Sasaki [et al.] // Molecular and cellular biochemistry. — 2000. — Vol. 213. — Is. 1-2. — P. 145-53.
144. Wide complex tachycardia in a COVID-19 patient: What is the mechanism / V. Reddy, V. Reddy, S. Mangat [et al.] // Journal of electrocardiology. — 2020. — Vol. 60. — P. 200-202.
145. Report: What Does COVID-19 Recovery Actually Look Like?: [website] / Patient-Led Research Collaborative. — London, UK. [2020]. — Unupdated. — URL: <https://patientresearchcovid19.com/research/report-1/> (accessed on: 10.07.2023). — Text: electronic.
146. Role of angiotensin-converting enzyme 2 and pericytes in cardiac complications of COVID-19 infection / F.A. Robinson, R.P. Mihealsick, B.M. Wagener [et al.] // American journal of physiology. Heart and circulatory physiology. — 2020. — Vol. 319. — Is. 5. — P. H1059-H1068.
147. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17) / R. Romee, B. Foley, T. Lenvik [et al.] // Blood. — 2013. — Vol. 121. — Is. 18. — P. 3599-608.
148. The Longest Persistence of Viable SARS-CoV-2 With Recurrence of Viremia and Relapsing Symptomatic COVID-19 in an Immunocompromised Patient-A Case

- Study / C. Sepulcri, C. Dentone, M. Mikulska [et al.] // Open forum infectious diseases. — 2021. — Vol. 8. — Is. 11. — P. 217.
149. Endothelial Immunity Trained by Coronavirus Infections, DAMP Stimulations and Regulated by Anti-Oxidant NRF2 May Contribute to Inflammations, Myelopoiesis, COVID-19 Cytokine Storms and Thromboembolism / Y. Shao, J. Saredy, K. Xu [et al.] // Frontiers in immunology. — 2021. — Vol. 12. — Is. . — P. 653110.
150. Human iPSC-Derived Cardiomyocytes Are Susceptible to SARS-CoV-2 Infection / A. Sharma, G. Garcia, Y. Wang [et al.] // Cell reports. Medicine. — 2020. — Vol. 1. — Is. 4. — P. 100052.
151. Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China / S. Shi, M. Qin, B. Shen [et al.] // JAMA cardiology. — 2020. — Vol. 5. — Is. 7. — P. 802-810.
152. Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart / M. Shiraishi, Y. Shintani, Y. Shintani [et al.] // The Journal of clinical investigation. — 2016. — Vol. 126. — Is. 6. — P. 2151-2166.
153. Successful heart and kidney transplantation from a deceased donor with PCR positive COVID-19 / R. Sigler, M. Shah, G. Schnickel [et al.] // Transplant infectious disease. — 2021. — Vol. 23. — Is. 5. — P. e13707.
154. Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis / P. Skendros, A. Mitsios, A. Chrysanthopoulou [et al.] // The Journal of clinical investigation. — 2020. — Vol. 130. — Is. 11. — P. 6151-6157.
155. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination / L. Smeeth, S.L. Thomas, A.J. Hall [et al.] // The New England journal of medicine. — 2004. — Vol. 351. — Is. 25. — P. 2611-2618.

156. Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19 / J.W. Song, C. Zhang, X. Fan [et al.] // Nature communications. — 2020. — Vol. 11. — Is. 1. — P. 3410.
157. Spiel, A.O. von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes / A.O. Spiel, J.C. Gilbert, B. Jilma // Circulation. — 2008. — Vol. 117. — Is. 11. — P. 1449-59.
158. The interferon landscape along the respiratory tract impacts the severity of COVID-19 / B. Sposito, A. Broggi, L. Pandolfi [et al.] // Cell. — 2021. — Vol. 184. — Is. 19. — P. 4953-4968.
159. Direct evidence of SARS-CoV-2 in gut endothelium / K. Stahl, J.H. Bräsen, M.M. Hooper [et al.] // Intensive care medicine. — 2020. — Vol. 46. — Is. 11. — P. 2081-2082.
160. Injury to the Endothelial Glycocalyx in Critically Ill Patients with COVID-19 / K. Stahl, P.A. Gronski, Y. Kiyan [et al.] // American journal of respiratory and critical care medicine. — 2020. — Vol. 202. — Is. 8. — P. 1178-1181.
161. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes / W. Sungnak, N. Huang, C. Bécavin [et al.] // Nature medicine. — 2020. — Vol. 26. — Is. 5. — P. 681-687.
162. Suxin, W. Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP) / W. Suxin, Yi. Qingjie, F. Shibing [et al.] // Text: electronic [Internet]. medRxiv preprint. - 2020. - URL: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.10.20021832v1.full.pdf+html/> (accessed on: 10.07.2023)

163. Ectopic upregulation of membrane-bound IL6R drives vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension / Y. Tamura, C. Phan, L. Tu [et al.] // The Journal of clinical investigation. — 2018. — Vol. 128. — Is. 5. — P. 1956-1970.
164. Coexpression of VEGF and angiopoietin-1 promotes angiogenesis and cardiomyocyte proliferation reduces apoptosis in porcine myocardial infarction (MI) heart / Z. Tao, B. Chen, X. Tan [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2011. — Vol. 108. — Is. 5. — P. 2064-2069.
165. Myocardial localization of coronavirus in COVID-19 cardiogenic shock / G. Tavazzi, C. Pellegrini, M. Maurelli [et al.] // European journal of heart failure. — 2020. — Vol. 22. — Is. 5. — P. 911-915.
166. SARS-CoV-2 infection of human brain microvascular endothelial cells leads to inflammatory activation through NF-κB non-canonical pathway and mitochondrial remodeling / S. Torices, C.S. Motta, R.o.s.a. da [et al.] // bioRxiv : the preprint server for biology. — 2022. (accessed on: 10.07.2023)
167. The Incidence of Myocarditis and Pericarditis in Post COVID-19 Unvaccinated Patients-A Large Population-Based Study / O. Tuvali, S. Tshori, E. Derazne [et al.] // Journal of clinical medicine. — 2022. — Vol. 11. — Is. 8.
168. Single-cell multi-omics reveals dyssynchrony of the innate and adaptive immune system in progressive COVID-19 / A. Unterman, T.S. Sumida, N. Nouri [et al.] // Nature communications. — 2022. — Vol. 13. — Is. 1. — P. 440.
169. Patterns and outcomes of COVID-19 donor utilization for heart transplant / G.N. Vaidya, P. Anaya, M. Ignaszewski [et al.] // Clinical transplantation. — 2023. — Vol. 37. — Is. 4. — P. e14917.

170. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19 / Z. Varga, A.J. Flammer, P. Steiger [et al.] // Lancet (London, England). — 2020. — Vol. 395. — Is. 10234. — P. 1417-1418.
171. Hypercoagulation and Antithrombotic Treatment in Coronavirus 2019: A New Challenge / F. Violi, D. Pastori, R. Cangemi [et al.] // Thrombosis and haemostasis. — 2020. — Vol. 120. — Is. 6. — P. 949-956.
172. Correction of Anticoagulant Therapy in Patients with Severe COVID-19 Virus Infection Using a Thrombodynamics Coagulation Assay / T.S. Vuimo, S.V. Tsarenko, E.V. Filimonova [et al.] // Clinical and applied thrombosis/hemostasis. — 2022. — Vol. 28.
173. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China / D. Wang, B. Hu, C. Hu [et al.] // JAMA. — 2020. — Vol. 323. — Is. 11. — P. 1061-1069.
174. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19 / Y. Wang, S. Liu, H. Liu [et al.] // Journal of hepatology. — 2020. — Vol. 73. — Is. 4. — P. 807-816.
175. Myocardial Inflammation and Dysfunction in COVID-19-Associated Myocardial Injury / L.T. Weckbach, A. Curta, S. Bieber [et al.] // Circulation. Cardiovascular imaging. — 2021. — Vol. 14. — Is. 1. — P. e012220.
176. Evidence of SARS-CoV-2 mRNA in endomyocardial biopsies of patients with clinically suspected myocarditis tested negative for COVID-19 in nasopharyngeal swab / P. Wenzel, S. Kopp, S. Göbel [et al.] // Cardiovascular research. — 2020. — Vol. 116. — Is. 10. — P. 1661-1663.
177. 2022 ACC Expert Consensus Decision Pathway on Cardiovascular Sequelae of COVID-19 in Adults: Myocarditis and Other Myocardial Involvement, Post-Acute Sequelae of SARS-CoV-2 Infection, and Return to Play: A Report of the American

- College of Cardiology Solution Set Oversight Committee / Writing Committee, T.J. Gluckman, N.M. Bhave [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. — 2022. — Vol. 79. — Is. 17. — P. 1717-1756.
178. Wu, J.T. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study / J.T. Wu, K. Leung, G.M. Leung // Lancet. — 2020. — Vol. 395. — Is. 10225. — P. 689-697.
179. Wu, Z. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention / Z. Wu, J.M. McGoogan // JAMA. — 2020. — Vol. 323. — Is. 13. — P. 1239-1242.
180. Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies / S. Xu, I. Ilyas, P.J. Little [et al.] // Pharmacological reviews. — 2021. — Vol. 73. — Is. 3. — P. 924-967.
181. Yamaoka-Tojo, M. Vascular Endothelial Glycocalyx Damage in COVID-19 / M. Yamaoka-Tojo // International journal of molecular sciences. — 2020. — Vol. 21. — Is. 24.
182. SARS-CoV-2 productively infects human brain microvascular endothelial cells / R.C. Yang, K. Huang, H.P. Zhang [et al.] // Journal of neuroinflammation. — 2022. — Vol. 19. — Is. 1. — P. 149.
183. Direct mechanisms of SARS-CoV-2-induced cardiomyocyte damage: an update / Y. Yang, Z. Wei, C. Xiong [et al.] // Virology journal. — 2022. — Vol. 19. — Is. 1. — P. 108.
184. COVID-19 myocarditis: a case report / P. Yokoo, E.K.U.N. Fonseca, N.e.t.o. Sasdelli [et al.] // Einstein (Sao Paulo, Brazil). — 2020. — Vol. 18.

185. Coronavirus Disease 2019 Positivity Immediately After Lung Transplantation: A Case Report / Y. Yokoyama, Y. Terada, R.G. Nava [et al.] // Transplantation proceedings. — 2022. — Vol. 54. — Is. 6. — P. 1572-1574.
186. Yunna, C. Macrophage M1/M2 polarization / C. Yunna, H. Mengru, W. Lei [et al.] // European journal of pharmacology. — 2020. — Vol. 877.
187. Zeng, C. Role of Pyroptosis in Cardiovascular Diseases and its Therapeutic Implications / C. Zeng, R. Wang, H. Tan // International journal of biological sciences. — 2019. — Vol. 15. — Is. 7. — P. 1345-1357.
188. First case of COVID-19 complicated with fulminant myocarditis: a case report and insights / J.H. Zeng, Y.X. Liu, J. Yuan [et al.] // Infection. — 2020. — Vol. 48. — Is. 5. — P. 773-777.