

На правах рукописи

МАКАРОВ Игорь Александрович

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МИОКАРДЕ
ПРИ ОСТРОЙ И ПОСТОСТРОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ
ИНФЕКЦИИ

3.3.2. Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России

Научный руководитель:

Митрофанова Любовь Борисовна – доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Байков Вадим Валентинович – доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической анатомии с патологоанатомическим отделением, профессор кафедры, Научно-клинический центр патоморфологии, администрация, руководитель.

Насыров Руслан Абдуллаевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической анатомии с курсом судебной медицины им. Д.Д. Лохова, заведующий кафедрой.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации.

Защита состоится «20» февраля 2024 года в 10:00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.028.04 на базе ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д.2) и на официальном сайте www.almazovcentre.ru

Автореферат разослан «__» _____ 202__ г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета 21.1.028.04
Доктор медицинских наук, профессор



Лейдерман
Илья Наумович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, по состоянию на 28 июня 2023 г. было зарегистрировано 767 518 723 подтвержденных случаев заболевания COVID-19, включая 6 947 192 случаев смерти (URL: <https://covid19.who.int/>).

Данные о возможном повреждении миокарда вирусом SARS-CoV-2 стали появляться практически с самого начала пандемии (Kim Y.I et al., 2022; Reddy V. et al., 2020; Yokoo P. et al., 2020). Впоследствии, в литературе появились систематические обзоры и метаанализы, в которых сообщалось, что 8,0% пациентов могут иметь повреждения миокарда на фоне коронавирусной инфекции (Li B. et al., 2020).

В ранних отчетах из Китая отмечалось, что у 7-20% пациентов были повышены уровни сердечных биомаркеров или были выявлены изменения на электрокардиограмме, что указывало на возможность повреждения миокарда (Nguyen M.C. et al., 2021). 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 (Davis H.E. et al., 2021).

Несмотря на столь широкую распространенность симптомов сердечно-сосудистой патологии как в остром, так и в отдаленном периодах коронавирусной инфекции, морфологические доказательства влияния SARS-CoV-2 на сердце ограничены, а точный механизм повреждения миокарда вирусом SARS-CoV-2 изучен не до конца (Basu-Ray I. et al., 2023).

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 клиничко-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 (Yokoo, P. et al., 2020), развитие фульминантного (Chen, C. et al., 2020) или аутоиммунного (Magadum, A. et al., 2020) миокардита, повреждение миокарда, обусловленное цитокиновым штормом (Chang, W.T. et al., 2021), повреждение миокарда, обусловленное системным эндотелиитом (Varga, Z. et al., 2020), гипоксически-ишемические и дисметаболические повреждения миокарда (Adeghate, E.A. et al., 2021), развитие стресс-индуцированной кардиомиопатии (Finsterer, J. et al., 2021).

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 скудны 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 COVID-19 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 эндомикардиальных 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, иммуногистохимического, 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 микроангиопатия 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 НИЛ патоморфологии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, СПб ГБУЗ "Городское патолого-анатомическое бюро", патологоанатомическое отделение ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС 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 явилась 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 иммуногистохимические 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: Всероссийская конференция, посвящённая 80-летию Центральной

патологоанатомической лаборатории МО РФ ВМедА им С.М. Кирова «Актуальные вопросы патологической анатомии в мирное и военное время» 2022; «X Санкт-Петербургская школа Аритмологии-2022»; Всероссийская конференция с международным участием "Алмазовский молодежный медицинский форум" 2023, пленарное заседание Санкт-Петербургского общества патологоанатомов 2023.

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.

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы 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. Группа пациентов с подтвержденной коронавирусной инфекцией при жизни и посмертно от 4-х волн коронавирусной инфекции (n=276), которым проводилось стационарное лечение в центре Алмазова. 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.

2а) исследование эндомиокардиальных биопсий (ЭМБ) в постостром периоде коронавирусной инфекции: группа пациентов с анамнезом

перенесенной коронавирусной инфекцией у которых произошло появление и/или ухудшение симптомов кардиальной патологии в постостром периоде, потребовавших проведение ЭМБ (n=38). Для верификации специфичности найденных изменений в миокарде была сформирована группа сравнения 3, включавшая 42 пациента с появлением симптомов кардиальной патологии, потребовавших проведение ЭМБ до 2019 года.

2б) исследование биопсийного, операционного и секционного материала при трансплантации сердца (ТС) пациентов, перенесших ТС во время пандемии от COVID-19-негативных доноров сердца (n=15).

Методы исследования

Гистологическое и гистохимическое исследование

Парафиновые срезы аутопсийного и биопсийного материала миокарда окрашивались гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по ван Гизону для выявления коллагеновых волокон.

Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование (ИГХИ) проводилось с антителами к CD3, CD45, CD8, CD68, CD16, CD163, CD80, CD34, Ang1, VWF, VEGF, HLA-DR, MHC1, C1q, VP1 EntV, SARS-CoV-2, ACE2.

Иммунофлюоресцентное исследование

Иммунофлюоресцентное исследование проводилось со следующими коктейлями первичных антител: SARS-CoV-2/VP1-EntV, SARS-CoV-2/CD68, SARS-CoV-2/CD16, CD80/CD163.

Электронная микроскопия

Ультратонкие срезы толщиной 60-80 нм полученные с залитого в смолу материала помещались на медные сетки, контрастировались спиртовым раствором уранил-ацетата и водным раствором цитрата свинца. Электронная микроскопия и получение электронных микрофотографий осуществлялось на микроскопе HT7800 (Hitachi, Токио, Япония).

ПЦР-исследование

Рибонуклеиновая кислота (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.

Морфометрия и анализ гистологических данных

Цифровые изображения были получены с помощью сканирующего микроскопа Aperio AT2 (Leica, Германия). Последующая работа с изображениями проводилась с помощью анализатора изображения Aperio ImageScore v.12.4.3.5008 (Германия). Экспрессия CD3, CD45, CD8, CD68, CD16, CD163, CD80 оценивалась как среднее значение позитивных клеток на 1 мм² ткани миокарда. Экспрессия CD34, Ang1, VWF, VEGF, HLA-DR, MHC1, C1q, VP1 EntV, SARS-CoV-2, ACE2 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.

Статистические методы исследования

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. Для описания количественных показателей использовалось среднее значение и 95% уровни доверительного интервала либо медиана и 25% и 75% перцентили. Статистическая значимость различий и корреляционные связи оценивалась с помощью U-критерия Манна-Уитни пермутационного теста, дисперсионного анализа ANOVA, коэффициента Спирмена и t-критерия Стьюдента. Различия между группами были определены как значимые при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аутопсийное исследование

I волна коронавирусной инфекции

Медианный возраст включенных в исследование пациентов составил 74 [60-74] года. 34 (44%) пациента были мужского пола, 43 (56%) – женского. Пациенты поступали в стационар на 5-е [3-6] сутки от начала заболевания и умирали на 18-е [14-20] сутки. Медианная продолжительность госпитализации составляла 13 [11-14] дней.

У 56 (73%) пациентов при поступлении определялась лимфопения. Только у 3 (4%) пациентов уровень С-реактивного белка (СРБ) был в пределах референсных значений и только у 1 (1%) пациента уровень D-димера не превышал референса. Прокальцитониновый тест был сомнительным у 9 (12%) пациентов и положительным у 22 (29%) пациентов. Уровень сердечного тропонина I был выше 1 нг/мл у 14 (18%) пациентов.

Фибрилляция предсердий была самым часто выявляемым нарушением ритма и была зарегистрирована у 30 (39%) пациентов. Фракция выброса левого желудочка по Симпсону была в диапазоне нормальных значений у 46 (60%) пациентов, сохранна у 15 (19%) и снижена у 10 (13%) пациентов.

Сопутствующая патология включала гипертоническую болезнь (ГБ) у 58 (75%) пациентов, ишемическую болезнь сердца (ИБС) у 40 (52%), сахарный диабет (СД) у 12 (16%) и синдром хронической сердечной недостаточности (ХСН) у 35 (45%).

При морфологическом исследовании сердец умерших пациентов в I волну коронавирусной инфекции в 43 случаях (56%) в миокарде и перикарде были выявлены крупные полиморфные клетки, располагающиеся в зоне сосудов (Рисунок 1А), 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.

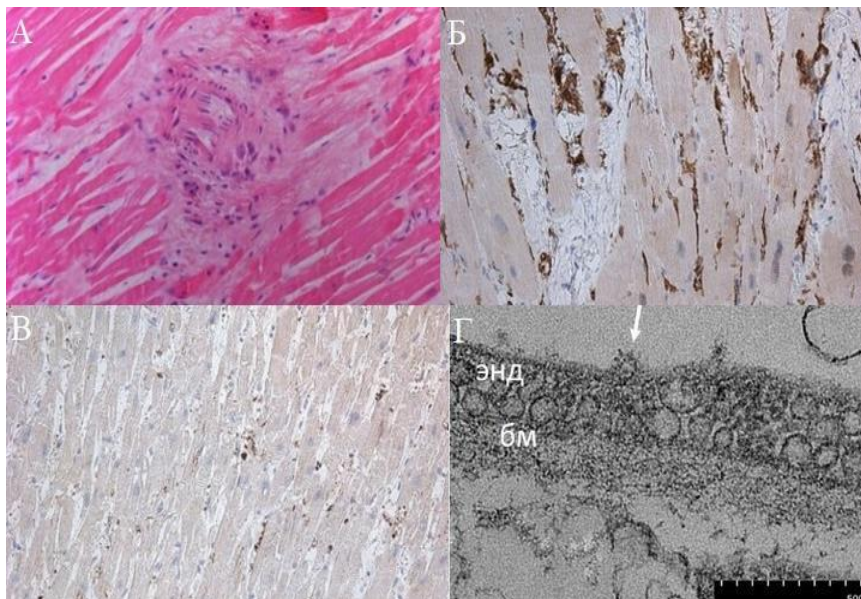


Рисунок 1 – морфологическое исследование миокарда в остром периоде коронавирусной инфекции. А – крупные полиморфные клетки в области сосудов (I волна), гематоксилин-эозин, x200. Б, В – иммуногистохимическое исследование миокарда пациента III волны с антителами к VP1 EntV (Б) и SARS-CoV-2 (В). Б – x 200; В – x 400. Г – электронная микроскопия эндотелия миокарда, предполагаемый вирион SARS-CoV-2 указан белой стрелкой, обозначения: энд – эндотелий; бм – базальная мембрана.

При ИГХИ лимфоцитарный активный миокардит в соответствии с международными критериями был подтвержден только в 8 (53%) из 15

случаев, что составило 10% от общего числа умерших пациентов этой волны. В 6 из 8 случаев была выявлена реакция гуморального иммунитета с экспрессией C1q-компонента комплемента, а в 5 из 8 случаях был выявлен VP1-антиген энтеровирусов преимущественно в стенках сосудов. На крупных полиморфных клетках в зоне сосудов определялась экспрессия CD34. Только часть из этих клеток была макрофагами с экспрессией CD68. Их повышенное количество ($\geq 14/\text{мм}^2$) определялось в 3 из 8 случаев. При гистологическом и иммуногистохимическом исследовании мы не обнаруживали выраженной диффузной лимфоцитарной инфильтрации миокарда. Максимальные очаговые инфильтраты насчитывали 21-37 CD3+T-лимфоцитов/ мм^2 . Ни в одном случае миокардита не было выявлено CD8+T-лимфоцитов. Во всех 8 случаях лимфоцитарного миокардита наблюдалась экспрессия VWF на эндотелии сосудов, Ang1 – на эндотелии и в саркоплазме кардиомиоцитов. Экспрессия VEGF и VP1 EntV на эндотелии и в мышечных волокнах наблюдалась в 7 из 8 случаев. Для пациентов с ИГХИ-подтверждённым миокардитом были проведены ПЦР исследования миокарда левого желудочка: последовательностей генов N и E коронавируса обнаружено не было.

II волна коронавирусной инфекции

Медианный возраст включенных в исследование пациентов составил 74 [66-83] года. 62 (52,1%) пациента были мужского пола, 57 (47,9%) – женского. Пациенты поступали в стационар на 7-е [4-9] сутки от начала заболевания и умирали на 19-е [13-26] сутки. Медианная продолжительность госпитализации составляла 12 [9-15] дней.

У 68 (57%) пациентов при поступлении определялась лимфопения. Только у 1 (1%) пациента уровень СРБ был в пределах референсных значений, а уровень D-димера – у 37 (31%). Прокальцитонинный тест был сомнительным у 17 (14%) пациентов и положительным у 12 (10%) пациентов. У 7 (6%) пациентов уровень сердечного тропонина I был выше 1 нг/мл при поступлении в стационар.

Фибрилляция предсердий была самым часто выявляемым нарушением ритма и была зарегистрирована у 52 (43,7%) пациентов. Фракция выброса левого желудочка по Симпсону была в диапазоне нормальных значений у 47 (40%) пациентов, сохранна у 19 (16%) и снижена у 14 (12%) пациентов.

Сопутствующая сердечно-сосудистая патология включала ГБ, зарегистрированную у 106 (89%) пациентов, ИБС – у 85 (71%), СД – у 54 (45%) и ХСН – у 46 (39%) пациентов.

При морфологическом исследовании сердца были обнаружены в 29 случаях (24%) отёк с фибрином, также в 29 (24%) случаях – кровоизлияния в

строму миокарда. У 27 (23%) пациентов – выраженная фрагментация мышечных волокон, у 28 (24%) пациентов — спазм интрамиокардиальных артерий, у 13 (11%) пациентов — ишемический инфаркт миокарда, у 11 (9%) — некоронарогенные некрозы миокарда, у 10 (7%) — очаговое плазматическое пропитывание стенки интрамуральных артерий, у 7 (6%) — 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.

Лимфоцитарный активный миокардит был подтвержден иммуногистохимически только в одном случае. При ИГХИ была выявлена реакция гуморального иммунитета с экспрессией C1q-компонента комплемента и МНСI, а экспрессии HLA-DR обнаружено не было. Также была выявлена экспрессия VP1 EntV в стенках сосудов и в кардиомиоцитах (4 балла). Максимальные очаговые инфильтраты насчитывали до 123 CD3+T-лимфоцитов/мм², среднее количество CD3+T-лимфоцитов составило 86 клеток/мм², среднее количество CD68+позитивных макрофагов составило 38 клеток/мм². Также 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 SARS-CoV-2 в образцах миокарда этого пациента обнаружена не была. По результатам ПЦР исследования миокарда левого желудочка не было обнаружено присутствия последовательностей генов N и E коронавируса.

III волна коронавирусной инфекции

Медианный возраст включенных в исследование пациентов составил 72 [61-82] года. 25 (32%) пациентов были мужского пола, 53 (68%) - женского. Пациенты поступали в стационар на 8-е [6-10] сутки от начала заболевания и умирали на 20-е [14-26] сутки. Медианная продолжительность госпитализации составляла 12 [8-16] дней.

У 63 (81%) пациентов при поступлении определялась лимфопения. Только у 3 (4%) пациентов уровень СРБ был в пределах референсных значений и только у 33 (42%) пациентов уровень D-димера при поступлении был в пределах референса. Прокальцитониновый тест был сомнительным у 8 (10%) пациентов и положительным у 5 (6%) пациентов. У 3 (4%) пациентов уровень сердечного тропонина I был выше 1 нг/мл.

Фибрилляция предсердий была самым часто выявленным нарушением ритма и была зарегистрирована у 30 (38,5%) пациентов. Фракция выброса

левого желудочка по Симпсону была в диапазоне нормальных значений у 26 (33%) пациентов, сохранна у 4 (5%) и снижена у 8 (10%) пациентов.

Сопутствующая патология включала ГБ, зарегистрированную у 77 (99%) пациентов, ИБС – у 32 (41%), СД – у 38 (49%) и ХСН – у 69 (88%).

При морфологическом исследовании у 28 (36%) пациентов была обнаружена выраженная фрагментация мышечного волокна, у 25 (32%) пациентов — спазм интрамиокардиальных артерий, у 16 (21%) пациентов — очаговое плазматическое пропитывание стенки сосудов, у 13 (17%) — выявлен отёк с фибрином, у 7 (9%) — кровоизлияния в строму миокарда.

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. Крупные полиморфные клетки, располагающиеся в зоне сосудов, не были обнаружены ни в одном случае, равно как и тромбоз интрамиокардиальных артерий.

Лимфоцитарный активный миокардит был заподозрен и подтвержден иммуногистохимически в 5-ти случаях (6%). При ИГХИ 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 EntV (Рисунок 1Б). В двух случаях миокардита мы обнаружили CD8+Т-лимфоциты среди прочего воспалительного инфильтрата. Во всех 5-ти случаях лимфоцитарного миокардита наблюдалась экспрессия VWF, Ang1 и VEGF. Экспрессия SARS-CoV-2 в образцах миокарда этих пациентов была обнаружена в 2-ух случаях только на периваскулярных клетках с оценкой в 1 и 2 балла соответственно (Рисунок 1В).

Для этих пациентов было проведено иммунофлюоресцентное исследование с коктейлем антител VP1-EntV/spike SARS-CoV-2 и обнаружена колокализация этих антигенов как на мембранах эндотелиальных и периваскулярных клеток, так и в кардиомиоцитах. ПЦР исследование миокарда левого желудочка не выявило присутствие последовательностей генов N и E коронавируса.

IV волна коронавирусной инфекции

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: 88-летняя женщина (пациент 1), умершая на 7-ой день госпитализации и 79-летний мужчина (пациент 2), 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 не выявило острых патологических изменений в миокарде. При ИГХИ у пациента 1 в эндотелии сосудов была обнаружена экспрессия SARS-CoV-2, которая подтвердилась ПЦР-тестированием: выявлены субпороговые значения копий РНК коронавируса в миокарде.

При электронной микроскопии на апикальной поверхности некоторых эндотелиоцитов миокарда было обнаружено небольшое количество округлых мембранных частиц, диаметром 75-120 нм, сходных по морфологии с вирионами SARS-CoV-2 (Рисунок 1Г).

Сравнение клиничко-морфологических изменений в различные волны коронавирусной инфекции

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.

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. Клиничко-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 фракция выброса левого желудочка была значимо ниже, чем у пациентов без миокардита.

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 ($p = 4,7E-26$); однако число случаев очагового плазматического пропитывания стенок интрамуральных артерий увеличилось ($p = 6.4E-3$) 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 2).



Рисунок 2 – Соотношение выраженности морфологических изменений в миокарде в I-III волны коронавирусной инфекции

Исследование эндомикардиальных биопсий в постостром периоде коронавирусной инфекции

Острая фаза коронавирусной инфекции у большинства пациентов имела лёгкое или средне-тяжелое течение. В постостром периоде коронавирусной инфекции ухудшение течения предсуществующей ХСН было зарегистрировано у 10 (26%) пациентов, а дебют ХСН после COVID-19 – у 20 (52%). ЭМБ была взята после 3 недель - 20 месяцев от последнего положительного ПЦР из носоглотки на SARS-CoV-2 с медианным значением 5 [2; 9] месяцев.

10 (26%) пациентов из этой группы имели вакцинацию от SARS-CoV-2: из них 3 пациента вакцинировались Ковивак, а 7 – Спутник V. 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, обнаружение экспрессии VP1 EntV во всех случаях, сильно снижает вероятность этиологической роли вакцинации от SARS-CoV-2 в развитии миокардитов у этих пациентов.

В случаях обнаружения экспрессии SARS-CoV-2 на эндотелии и на воспалительном инфильтрате с суммой баллов более 3 ($n = 5$) была

выполнена ПЦР с парафиновых блоков миокарда с отрицательным результатом. Также для этих пациентов выполнено иммунофлюоресцентное исследование с коктейлем антител к SARS-CoV-2/CD68 и SARS-CoV-2/CD16, которое выявило колокализацию экспрессии SARS-CoV-2 и CD16 на мембране отдельных клеток инфильтрата. Экспрессии SARS-CoV-2 в кардиомиоцитах обнаружено не было.

Для одного случая из подгруппы с миокардитом и одного пациента из подгруппы без миокардита с экспрессией SARS-CoV-2 по 3 балла суммарно было произведено иммунофлюоресцентное исследование с коктейлем антител CD163/CD80 с целью определения соотношения M1 / M2 макрофагов. По результатам исследования в обоих случаях выявлено преобладание M2 макрофагов над M1 в миокарде.

Ни в одной из ЭМБ не определялась экспрессия VWF и VEGF в кардиомиоцитах. Не было обнаружено статистически значимых различий между наличием или отсутствием экспрессии SARS-CoV-2 и изменениям в экспрессии других маркеров. Процент поражения лёгочной ткани (тяжесть течения острой коронавирусной инфекции) не коррелировал с ухудшением течения ХСН в постостром периоде коронавирусной инфекции.

Отмечалось увеличение количества CD68-позитивных макрофагов на 1 мм² 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 было обнаружено ($r = -0,08$ для пациентов с миокардитом и $r = -0.29$ для пациентов без миокардита).

Исследование биопсийного, операционного и секционного материала при трансплантации сердца в пандемию COVID-19

Гистологическое исследование ни одного из эксплантированных сердец и последующих ЭМБ ($n = 15$) не выявило признаков ангиопатии, а экспрессия SARS-CoV-2 наблюдалась в 13 из 15 случаев (87%) только на периваскулярных клетках, единичных сосудах и макрофагах.

При исследовании ЭМБ после ТС 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 AMR обнаружено не было. В то же время, за период пандемии 1 пациент умер через 12 дней после ТС от нетипичного криза гуморального отторжения. При этом в миокарде были выявлены множественные мозаичные некроронарогенные некрозы миокарда, кровоизлияния, отёк и плотная моноклеарная инфильтрация во всех стенках миокарда между кардиомиоцитами и в просвете сосудов, представленная преимущественно CD3+, CD68+ и CD16+ клетками. Также была выявлена высокая экспрессия C1q компонента комплемента и экспрессия SARS-CoV-2 на эндотелии и на CD16+клетках.

В другом случае у пациентки с длительным течением AMR2 электронная микроскопия миокарда показала выраженную вакуолизацию цитоплазмы эндотелиоцитов и перицитов, некроз эндотелия и ремоделирование капилляров с единичными округлыми частицами на апикальной поверхности, сходными по морфологии с вирионами SARS-CoV-2.

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что персистенция SARS-CoV-2 в эндотелии может увеличивать риск развития и прогрессирования криза гуморального отторжения трансплантата.

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. 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.

Также в ходе исследования было установлено, что персистенция 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 полимеразно-цепной реакции тканей миокарда, что может свидетельствовать о наличии 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 дискуссионной.

Также 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 MHC1, 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 полимеразная цепная реакция 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 ($p = 4,7E-26$), II – максимальным количеством макрофагов и отеком стромы ($p = 6,0E-26$ и $p = 1.3E-4$ соответственно), а III – числом случаев со спазмом и очаговым плазматическим пропитыванием стенок интрамуральных артерий ($p = 6.4E-3$).
3. Только у 5% пациентов с острым COVID-19 был диагностирован активный лимфоцитарный миокардит. При этом количественная полимеразная цепная реакция не выявила рибонуклеиновую кислоту SARS-CoV-2 в миокарде ни в одном случае, а SARS-CoV-2 экспрессировался

только на единичных, преимущественно эндотелиальных клетках у 3 из 14 пациентов. В то же время, у всех этих больных наблюдалась сверхэкспрессия 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 антителом к SARS-CoV-2 коррелирует с данными количественной полимеразной цепной реакции 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 полимеразной цепной реакции миокарда в отсутствии выявления других кардиотропных вирусов.

3. В случаях затяжного и атипичного криза гуморального отторжения при трансплантации сердца рекомендуется проводить иммуногистохимическое исследование эндомикардиальных биопсий с антителом к 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:

- Исследование динамики морфологических и функциональных изменений в миокарде в последующих волнах коронавирусной инфекции.
- Исследование эпигенетических воздействий, которые могут проявляться долгосрочными осложнениями со стороны сердечно-сосудистой системы.
- Развитие рекомендаций для вторичной и третичной профилактики сердечно-сосудистых осложнений новой коронавирусной инфекции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Морфологическое исследование поджелудочной и щитовидной желез у пациентов II и III волн COVID-19 и молекулярно-биологический анализ щитовидной железы в постковидный период. / О.М. Воробьева, Д.О. Григорьева, К.А. Стерхова, Е.В. Иваниха ... [И.А. Макаров] ... [и др.] // Медлайн.Ру. – 2023. – Т. 24. – С. 147-157.**
2. **Изменение фенотипа кардиомиопатии на фоне миокардита. / И.А. Макаров, К.О. Бородин, Т.А. Макарова, Л.Б. Митрофанова // Медлайн.Ру. – 2022. – Т. 23. – С. 298-311.**
3. Макаров, И.А. Криз атипического гуморального отторжения трансплантата COVID-19 инфицированного донора на 12-е сутки после трансплантации сердца, клинический случай. / И.А. Макаров, Л.Б. Митрофанова // Тезисы Российского национального конгресса кардиологов. – С. 434. URL: <https://scardio.ru/content/activities/2023/CONGRESS/theses.pdf> (дата обращения: 18.09.2023).
4. Макаров, И.А. Персистенция антигенов коронавируса в миокарде в постостром периоде SARS-CoV-2 инфекции. / И.А. Макаров, Л.Б. Митрофанова // Тезисы Российского национального конгресса кардиологов. – С. 459. URL: <https://scardio.ru/content/activities/2023/CONGRESS/theses.pdf> (дата обращения: 18.09.2023).
5. **Экспрессия CD68-позитивных клеток в миокарде при постостром коронавирусном синдроме. / И.А. Макаров, К.А. Папко, Т.А.**

- Макарова, Т.Л. Каронова [и др.] // Медлайн.Ру. – 2023. – Т. 24. – С. 988-999.**
6. Макаров, И.А. Экспрессия иммуногистохимических маркеров ангиогенеза в миокарде в постостром периоде коронавирусной инфекции. / И.А. Макаров, Т.А. Макарова // Трансляционная медицина. – 2023. – Т. 10. – № 2. – Прил. 3. – С. 318.
 7. Клинико-морфологическое и молекулярно-биологическое исследование миокарда у пациентов с COVID-19. / Л.Б. Митрофанова, И.А. Макаров, А.Л. Рунов, М.С. Вонский [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2022. – Т. 27. – № 7. – С. 973-987.
 8. **Морфологическое и молекулярно-биологическое исследование головного мозга у пациентов II и III волн COVID-19 и в постковидном периоде / Л.Б. Митрофанова, О.М. Воробьева, К.А. Стерхова, И.А. Макаров [и др.] // Медлайн.Ру. – 2023. – Т. 24. – С. 1258-1274.**
 9. COVID-19 как потенциальный триггер рефрактерных нарушений ритма и электрического шторма у пациента с дилатационной кардиомиопатией: описание клинического случая / А.М. Осадчий, И.А. Макаров, А.В. Скопцова, Л.Б. Митрофанова [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2023. – Т. 28. – № 9. – С. 98-103.
 10. Папко, К.А. Изучение экспрессии CD68-позитивных клеток в миокарде при постостром коронавирусном синдроме. / К.А. Папко, И.А. Макаров // Трансляционная медицина. – 2023. – Т. 10. – № 2. – Прил. 3. – С. 327.
 11. Morphological Changes in the Myocardium of Patients with Post-Acute Coronavirus Syndrome: A Study of Endomyocardial Biopsies. / I. Makarov, S. Mayrina, T. Makarova, T. Karonova [et al.] // Diagnostics. – 2023. – Т. 13. – Is. 13. – P. 2212.
 12. Comparative Study of the Myocardium of Patients from Four COVID-19 Waves. / L.B. Mitrofanova, I.A. Makarov, A.N. Gorshkov, A.L. Runov [et al.] // Diagnostics. – 2023. – Т. 13. – Is. 9. – P. 1645.
 13. New Scenarios in Heart Transplantation and Persistency of SARS-CoV-2 (Case Report). / L. Mitrofanova, I. Makarov, A. Gorshkov, O. Vorobeveva [et al.] // Life. – 2023. – Т. 13. – Is. 7. – P. 1551.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ГБ — гипертоническая болезнь
- ИБС — ишемическая болезнь сердца
- ИГХИ – иммуногистохимическое исследование
- РНК - рибонуклеиновая кислота
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- СД — сахарный диабет
- ТС – трансплантация сердца
- ХСН — хроническая сердечная недостаточность
- ЭМБ – эндомиокардиальная биопсия
- ACE2 – angiotensin converting enzyme 2
- AMR – antibody-mediated rejection
- Ang – angiotensin
- CD – cluster of differentiation
- МНС – major histocompatibility complex
- VEGF – vascular endothelial growth factor
- VWF – von Willebrand factor