

**Щедрина Анна Юрьевна**

**Определение роли иммунологических биомаркеров  
в диагностике и лечении воспалительной кардиомиопатии.**

14.01.05 – кардиология

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Москва – 2015**

Работа выполнена в ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук

**Скворцов Андрей Александрович**

доктор медицинских наук

**Зыков Кирилл Алексеевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор

профессор кафедры клинической фармакологии и терапии

ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия

последипломного образования» МЗ РФ

**Гиляревский Сергей Руджерович**

Доктор медицинских наук

ведущий научный сотрудник

лаборатории клинической иммунологии

ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

**Пашенков Михаил Владимирович**

**Ведущая организация:** ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»  
Министерства образования и науки Российской Федерации.

Защита состоится «21» января 2016 года в 13.30 на заседании диссертационного ученого совета Д 208.073.04. в ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ по адресу: 121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ (121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а), <http://cardioweb.ru>.

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2015г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук

**Сорокин Евгений Владимирович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Дилатационная кардиомиопатия на протяжении многих лет вызывает особый интерес у клиницистов и исследователей, что обусловлено отсутствием единых подходов к диагностике и лечению, а так же сохраняющейся высокой степенью летальности среди больных с этой патологией. Известно, что смертность больных ДКМП за первый год наблюдения составляет 25%, а 5-летняя достигает 50% [M. Grogan и соавт.1995]. ДКМП объединяет гетерогенную группу заболеваний, однако значительный вклад в ее развитие (до 50% случаев) приносит наличие воспалительного процесса в миокарде [P.Richardson и соавт.1996, U.Kuhl и соавт. 1996, M.Pauschinger и соавт. 2006]. В основе диагностики воспалительной кардиомиопатии лежит стандартное клиническое обследование пациента, включающее ЭКГ, ЭХО-КГ, ХМ-ЭКГ, рентгенографию органов грудной клетки, МРТ сердца с контрастированием. Однако все вышеперечисленные методы неинвазивной диагностики не являются специфичными для ВКМП. «Золотым стандартом» для диагностики активности воспалительного процесса в миокарде с использованием гистологических, иммуногистохимических и молекулярных технологий по-прежнему остается эндомиокардиальная биопсия [Cooper LT с соавт.2007]. Тем не менее, необходимо учитывать, что при проведении ЭМБ в 6% случаев могут возникать осложнения, включая перфорацию и тампонаду сердца (0,1% до 0,5 %), [J. Deckers с соавт 1992, J. Shirani с соавт.1992]. В последние годы одним из важнейших и многообещающих направлений в диагностике ВКМП является изучение роли биологических маркеров, способных отражать воздействие на миокард механических, оксидативных, провоспалительных и других факторов, вызывающих структурные и функциональные изменения в сердечной мышце. Несмотря на большое число проводимых экспериментальных и клинических исследований, посвященных этому направлению, верифицированных маркеров активности воспалительного процесса в миокарде при ВКМП на сегодняшний день не существует.

Пациентам с диагнозом ВКМП показано проведение стандартной терапии ХСН в соответствии с существующими рекомендациями, однако изучение механизмов развития заболевания и прогноза таких больных свидетельствует о недостаточной эффективности такого варианта лечения. Исходя из патогенеза развития заболевания, терапия таких больных также должна быть направлена на элиминацию возможного патогена и купирование воспалительного процесса в миокарде [G.Burch с соавт. 1972].

На сегодняшний день не существует единого подхода к лечению ВКМП. С нашей точки зрения одним из наиболее оптимальных и оправданных вариантов лечения является диагностический и лечебный алгоритм, предусматривающий назначение противовирусной или иммуностропной терапии на основании результатов эндомиокардиальной биопсии [H. Schultheiss с соавт 2006].

Проведенное в 2009г исследование TIMIC продемонстрировало значимый положительный эффект от применения иммуносупрессивной терапии у вирусотрицательных

пациентов с ВКМП [A.Frustaci 2009]. В 2010г было завершено исследование, направленное на определение эффективности применения иммуноглобулина при PVB19-обусловленном воспалительном поражении миокарда. Результаты этого пилотного клинического проекта показали, что введение внутривенного иммуноглобулина может снижать вирусную нагрузку и улучшать сократительную функцию сердца у больных ВКМП [R.Dennert с соавт.2010], что требует проведения дополнительных исследований, направленных на изучение влияния неспецифической противовирусной терапии на клиническое состояние и прогноз пациентов с PVB19-обусловленной ВКМП.

В этой связи, учитывая недостаточную изученность механизмов развития воспалительного поражения миокарда, необходимость выявления неинвазивных маркеров диагностики ВКМП и выработки единых подходов к лечению этой тяжелой патологии, на базе ОЗМСН ФГБУ РК НПК МЗ РФ было организовано и проведено настоящее исследование.

### **Цель исследования**

Изучить роль иммунологических биомаркеров при исследовании эндомикардиальных биоптатов и образцов периферической крови в диагностике ВКМП и оценить эффективность иммунотропной и противовирусной терапии у пациентов с активным воспалительным процессом и вирусной персистенцией в миокарде.

### **Задачи исследования**

1. Оценить выраженность клинических проявлений заболевания у больных ВКМП и нвДКМП, а так же их зависимость от миокардиальной вирусной персистенции.
2. Определить особенности воспалительных изменений у больных ВКМП при исследовании эндомикардиальных кардиобиоптатов гистологическим, иммуногистохимическим и молекулярно-генетическим методом.
3. Оценить диагностическое значение иммунологических биомаркеров в периферической крови у пациентов с ВКМП при их сопоставлении с результатами эндомикардиальной биопсии.
4. Сравнить уровень иммунологических биомаркеров в зависимости от наличия миокардиальной вирусной персистенции у пациентов ВКМП и нвДКМП.
5. Определить эффективность проводимой противовирусной и иммунотропной терапии у пациентов с ВКМП и миокардиальной вирусной персистенцией

### **Научная новизна**

При исследовании эндомикардиальных биоптатов гистологическим, иммуногистохимическим и молекулярно-генетическим методом нами впервые было показано, что для пациентов с миокардиальной вирусной персистенцией характерно значимо большее количество CD4+ Т клеток в миокарде по сравнению с вирусотрицательными больными ВКМП и ДКМП. Установлено, что в миокарде и периферической крови пациентов с воспалительной кардиомиопатией отмечается наименьшая частота экспрессии маркера Т регуляторных клеток транскрипционного фактора FOXP3+, по сравнению с больными ДКМП без признаков активного воспалительного процесса в сердце.

Впервые показано, что ММП-9 является диагностически значимым биомаркером у больных ВКМП, отражающим выраженность как фиброзных, так и воспалительных изменений у данной категории пациентов.

На основании сопоставления результатов исследования эндомикардиальных биоптатов с показателями гуморального иммунитета впервые показано, что такие иммунологические биомаркеры как ММП-9 и вчСРБ в комбинации с С3 и С4 компонентами комплемента целесообразно использовать в качестве неинвазивных маркеров для диагностики ВКМП.

Впервые доказано, что наиболее высокой диагностической ценностью в выявлении ВКМП обладает комбинация следующих биомаркеров: ММП-9, С3 и С4 компонентов комплемента.

Впервые установлено, что концентрация ФНО $\alpha$  и эозинофильного катионного протеина в периферической крови больных ВКМП повышена только у пациентов с наиболее выраженным воспалительным процессом в миокарде ( $>17$  лейкоцитов/ $\text{мм}^2$  миокарда).

### **Практическая значимость**

На основании сопоставления результатов исследования эндомикардиальных биоптатов гистологическим, иммуногистохимическим и молекулярно-генетическим методом и концентраций периферических биомаркеров выявлены диагностически значимые параметры (вчСРБ, С3 компонент комплемента, С4 компонент комплемента, ММП-9, АТ к нативной ДНК), которые могут быть включены в алгоритм лабораторного сопровождения пациентов с воспалительной кардиомиопатией, проведена оценка их чувствительности, специфичности. Согласно полученным данным, у пациентов с ДКМП сочетанное применение таких биомаркеров, как вчСРБ $>1,13$  мг/л, С3 компонента комплемента $>1,2$  г/л и С4 компонента комплемента $>0,256$  г/л позволяет оптимизировать отношение чувствительность/специфичность по сравнению с однофакторным ROC анализом, доводя чувствительность до 61%, специфичность до 94% при диагностике активного воспалительного процесса в миокарде.

Доказано, что шанс выявить признаки активного воспалительного процесса в миокарде у пациентов с ДКМП является наиболее высоким среди всех проанализированных нами биомаркеров при определении концентрации ММП-9  $>680$  нг/мл и составляет 12,3 (95%ДИ 1,65-92,7).

Установлено, что при сочетанном применении таких биомаркеров как ММП-9, С3 и С4 компоненты комплемента у пациентов с ДКМП чувствительность составляет 66% при сохранении высокой специфичности – 94% по отношению к наличию признаков активности воспалительного процесса в миокарде.

Установлено, что только применение иммуносупрессивной терапии в условиях активного воспалительного процесса при отсутствии миокардиальной вирусной персистенции, а также назначение противовирусной/ иммуномодулирующей терапии при наличии вирусного генома в миокарде оказывает значимое положительное влияние на

клинико-функциональное состояние пациентов при присоединении к стандартной терапии ХСН.

### **Внедрение**

Результаты исследования внедрены в научную и практическую работу Отдела заболеваний миокарда и сердечной недостаточности Института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «РКНПК» МЗ России.

### **Апробация работы**

Материалы доложены на межотделенческой конференции Института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ по апробации кандидатских диссертаций 25.05.2015г. Диссертация рекомендована к защите.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, включая 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК. Материалы работы были доложены и обсуждены на конференциях. Российский национальный конгресс кардиологов (2013 – Санкт-Петербург) European conference on heart failure (2014 – Афины, 2015 – Севилья), European cardiology congress (2014-Барселона, 2015 – Лондон).

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 219 публикаций отечественных и зарубежных авторов. Работа содержит 41 таблицу и 31 рисунок.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 67 больных [45 мужчин (62,8%) и 22 женщины (32,8%)] с предполагаемой воспалительной кардиомиопатией, хронической сердечной недостаточностью I-III функционального класса (ФК), сниженной систолической функцией ЛЖ (ФВ ЛЖ < 40%, КДР > 6см) при наличии связи развития заболевания с перенесенной инфекцией. Общая характеристика больных представлена в таблице (Таблица 1).

**Таблица 1.** Общая характеристика больных, M±m; Me[25%;75%]

Общая характеристика больных	
Возраст	45,2±11,6
Длительность заболевания (годы)	2,5[1,0;4,6]
ФК NYHA I	n=8(11,9%)
II	n=44(65,7%)
III	n=15(22,4%)
Тест 6-минутной ходьбы	357±87
ШОКС (баллы)	4,9±1,7
Мин. опросник (баллы)	28[18;47,5]
Средняя чсс (уд/мин)	71,2±8,3
Общее кол-во ЖЭС	421,5[18;21123]
Кол-во пробежек ЖТ	0[0,0;2,0]
Ритм синусовый	n=55(82,1%)
мерцательная аритмия	n=12(34,3%)
ФВ(%)	32,3±6,9
КДО (мл)	223,4±63,5
КСО (мл)	148,9±53,4
E/E'	13,4[10;18,5]
e'(см/с)	4,3[3,0;6,4]

В протокол не включали пациентов с наличием острых и обострением хронических воспалительных заболеваний, артериальной гипертензии, ИБС, пороков сердца, а также тяжёлых сопутствующих соматических патологий (печёночная и почечная недостаточность, онкологические, ревматологические, неврологические заболевания), при злоупотреблении алкоголем.

Пациенты были разделены на 2 группы: в первую группу (n=35;52,2%) включены больные, которым после предварительного обследования в соответствии с рекомендациями [5] была проведена эндомикардиальная биопсия, вторая группа больных включала пациентов (n=32;47,8%), которые отказались от проведения эндомикардиальной биопсии. Результаты эндомикардиальной биопсии сопоставлялись с данными клинического, инструментального и лабораторного обследования с целью выявления биомаркеров активности воспалительного процесса, инфицированности вирусами. В случае выявления в миокарде Эпштейн - Барр вируса, цитомегаловируса, вируса герпеса 1, 2 типа, вируса герпеса 6 типа проводилась терапия препаратом фамцикловир в дозе 1000мг в сутки в течение 10 дней. При выявлении в миокарде генома парвовируса В19 проводилась терапия пентаглобином в суммарной дозе 750мг/кг. При наличии активного воспалительного процесса в миокарде на фоне отсутствия инфицированности вирусами, пациентам проводилась иммуносупрессивная терапия

преднизолоном в дозе 1мг/кг в течение 1 месяца, а затем в дозе 0,33 мг/кг в течение еще 5 месяцев. Эффективность проводимой терапии оценивалась через 6 месяцев.

Физикальное обследование пациентов проводилось на основании общепринятых методик. Исследование биохимического и общего анализа крови позволяли исключить патологию почек, печени. По показаниям проводилась консультация специалистов.

Проводилась оценка функционального класса ХСН, клинического состояния по шкале ШОКС, дистанции в тесте 6-минутной ходьбы, качества жизни с помощью «Миннесотского опросника качества жизни». Инструментальные методы обследования включали ЭКГ в 12 отведениях (на аппарате MAC 5000, GE Healthcare, Германия), трансторакальную эхокардиографию с тканевой миокардиальной доплерографией (на аппарате «VIVID 9» фирмы «General Electric», США), МРТ сердца с контрастированием. (на томографе Magnetom Avanto 1.5T, Siemens AG, Германия), коронароангиографию (на установке «Ангиоскоп С», «Сименс», Германия).

Эндомиокардиальная биопсия выполнялась при отсутствии гемодинамически значимых стенозов в коронарных артериях группе из 35 больных. Феморальным доступом с помощью Cordis bioprome выкусывали кусочек (примерно 1×1,5 мм) эндомиокарда. В среднем брали 4-5 биоптатов. В 31 случае из ПЖ и 4 случаях их ЛЖ. В дальнейшем проводилось исследование биоптатов гистологическим, иммуногистохимическим и молекулярно-генетическим методом. Гистологическое исследование эндомиокардиальных биоптатов проводилось по стандартной методике.

При иммуногистохимическом исследовании препарата применялись коммерческие мышинные моноклональные антитела к моноцитам/макрофагам, к Т-лимфоцитам (CD 45RO+, CD3+, CD4+, CD8+, CD68+ фирма «La Roche», США). Активность воспалительного процесса определяли по критериям классификации Всемирной Федерации Сердца. Проводилась полуколичественная оценка степени фиброза миокарда 1 степень- незначительный фиброз миокарда, 2 степень- умеренный фиброз миокарда, 3 степень- выраженный фиброз миокарда. [V. Maisch с соавт. 1999]. В нашем исследовании: незначительный фиброза- <10% кардиобиоптата, умеренный фиброз - 10-50% кардиобиоптата, выраженный фиброза - >50% кардиобиоптата.

Иммунофлюоресцентное окрашивание клеточных ядер проводилось с использованием красителя DAPI и помещением срезов в среду Aqua polymount (Polyscience Inc., США).

ПЦР в реальном времени проводили с использованием специфических праймеров для FOXP3, GATA3, STAT6 и TBX-21 (t-bet), интеркалирующего красителя "EvaGreen" и набора "ПЦР комплект EvaGreen", "Синтол". Обсчет результатов проводили ΔCt методом. ПЦР в реальном времени для определения ДНК HHV6, Herpes simplex 1,2, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Parvovirus B19 в эндомиокардиальных биоптатах проводили с помощью тест-систем фирмы "Интерлабсервис": "АмплиСенс EBV/CMV/HHV-6-скрин-FL", "АмплиСенс HSV1-2", "АмплиСенс Parvovirus B19-FL", Россия. Использовался прибор для ПЦР-РВ "Rotor Gene 3000" и программное обеспечение к нему - "Rotor-Gene 6.0", Австралия.



**Лабораторные методы обследования.** Проводили ПЦР в реальном времени для определения ДНК HHV6, Herpes simplex 1,2, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, ParvovirusB19 в образцах цельной крови с использованием реагентов фирмы “Интерлабсервис” – “ДНК-Сорб Б”

ПЦР в реальном времени проводили для определения FOXP3 с использованием специфических праймеров для FOXP3 и коммерческого набора "ПЦР комплект EvaGreen"; “Синтол”. Использовались гены "домашнего хозяйства" GAPDH, HPRT, B2M, подобранные с помощью “PrimerBank” Для проведения ПЦР в реальном времени использовали прибор Rotor Gene 3000 и программное обеспечение к нему. Обсчет результатов проводили  $\Delta C_t$  методом.

Исследование уровня вчСРБ, компонентов комплемента С3 и С4, концентрации иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке крови,  $\alpha 1$ -антитрипсина,  $\alpha 2$ -макроглобулина проводили методом нефелометрии на анализаторе белков крови «Беринг Нефелометр» модели BN Pro Spec производства Dade-Behring Marburg GmbH, Германия.

Определение уровня антител к кардиолипину классов IgM и IgG, а так же аутоантител класса IgG к нативной и денатурированной ДНК проводилось методом ИФА с использованием тест систем компании Orgentec Diagnostika GmbH, Германия. Измерение результатов проводили на микропланшетном ридере Anthos-2020.

Уровень IgE определяли с использованием хемилюминесцентного анализатора Immulite 1000. Уровень эозинофильного катионного протеина определяли с использованием хемилюминесцентного анализатора Elecsys 1000 Total. Уровень антител к миокарду определяли методом непрямой иммунофлюоресценции на коммерческих наборах фирмы «ИММСО Diagnostics» (Канада).

Определение уровня циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови проводили методом преципитации полиэтиленгликолем с молекулярной массой 6000Д (ПЭГ 6000). Измеряли оптическую плотность опытных образцов и контролей на планшетном фотометре для ИФА при длине волны 450 нм.

Определение серологических маркеров проводили с использованием наборов для ИФА по определению IgM и IgG к Chlamydia pneumonia и Mycoplasma pneumonia (Savyon, Израиль) на планшетном фотометре Anthos-2020 (Anthos Labtec, Австрия). Определение антител IgG Cytomegalovirus, IgG Epstein-Barr virus и IgG Herpes simplex 1,2 типа проводили с использованием наборов «ДС-ИФА-Анти- ЦМВ-G», «ДС-ИФА-Анти-ВЭБ-VCA-G», «ДС-ИФА-Анти-ВПГ-1,2-G» («КПО Диагностические системы», Россия) на планшетном анализаторе Anthos-2020 ( Anthos Labtee, Австрия).

Исследование уровня ИФН $\gamma$ , ТФР $\beta$ , ФНО $\alpha$ , ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-8 проводилось твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА) с использованием соответствующих наборов eBioscience (США): «Human IFN $\gamma$  High Sensitivity ELISA», «Human TGF $\beta$ 1 Platinum ELISA», «Human TNF $\alpha$  High Sensitivity ELISA», «Human IL-10 Platinum ELISA», «Human IL-6 Platinum ELISA», «Human IL-8 Platinum ELISA».

Определение уровня ММП-9, ТИМП-1 проводилось твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА) с использованием соответствующих наборов eBioscience (США): «Human MMP9 Platinum ELISA» и «Human TIMP1 Platinum ELISA».

Определение уровня ММП-2, ТИМП-2 проводилось твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА) с использованием соответствующих наборов RandD Systems: «Total MMP-2 Quantikine ELISA Kit» и «Total TIMP-2 Quantikine ELISA Kit».

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводилось методом проточной цитофлуорометрии с использованием моноклональных антител с двойной меткой (Beckman Coulter, США).

Определение концентрации NT-proBNP, Тропонина Т в сыворотке проводилось на хемилюминесцентном анализаторе Cobas e 411 (Roche, Швейцария) с использованием коммерческого набора «proBNP II» и «Troponin T hs».

**Статистическая обработка** Статистическая обработка материала проводилась с использованием статистической программы SPSS Statistics 18. В работе использовались следующие методы статистического анализа: оценка распределения количественных признаков проводилась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Параметрические показатели представлены в виде  $M \pm sd$ , где  $M$  - среднее,  $sd$  - стандартное отклонение. Для параметрического сравнения групп применялся  $t$ -критерий Стьюдента. При проведении корреляционного анализа параметрических показателей применялся коэффициент корреляции Пирсона. Непараметрические данные представлены в виде  $Me (LQ;UQ)$ , где  $Me$  - медиана значения, интерквартильный интервал ( $LQ;UQ$ ) с указанием 25-го и 75-го перцентилей их распределения. Для непараметрической оценки достоверности различий между группами применялся непараметрический метод анализа по Манн-Уитни. Для проведения корреляционного анализа непараметрических данных применялся коэффициент Спирмена. Для оценки достоверности изменения показателей на фоне лечения использовался критерий Вилкоксона. Проводилось составление таблиц сопряженности для определения совместного распределения двух переменных. Критерий Фишера применялся с целью выявления связи между ними. Проводился ROC анализ с определением чувствительности и специфичности. Определялось отношение шансов. За минимальный уровень значимости принято  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

При сравнении группы эндомикардиальной биопсии ( $n=35;52,2\%$ ) с группой лабораторного контроля ( $n=32;47,8\%$ ) по основным клинико-демографическим показателям значимых различий выявлено не было, что свидетельствовало о сопоставимости этих 2-х групп.

**Результаты гистологического, иммуногистохимического и ПЦР исследования эндомикардиальных биоптатов.**

В группе эндомикардиальной биопсии в зависимости от количества инфильтрирующих Т клеток Всемирной Федерации Сердца, пациенты были разделены на 2 подгруппы: в первую подгруппу вошли пациенты, у которых было выявлено  $>14$  Т клеток/ $mm^2$

миокарда (была подтверждена ВКМП, n=18), во вторую подгруппу вошли пациенты, у которых было выявлено <14 Т клеток/мм<sup>2</sup> миокарда (пациенты с нвДКМП, n=17). При сравнении подгрупп с ВКМП и нвДКМП в миокарде по основным клинико-демографическим показателям было выявлено, что длительность заболевания в подгруппе пациентов без признаков активного воспалительного процесса в миокарде была в 2,8 раза выше, чем в группе ВКМП (p=0,001), что может быть обусловлено снижением выраженности воспалительных изменений с течением времени. По остальным показателям значимых различий между исследуемыми подгруппами выявлено не было, что не позволяет опираться лишь на данные клинического обследования при постановке диагноза ВКМП.

При иммуногистохимическом исследовании биоптатов было выявлено, что подгруппы ВКМП и нвДКМП значительно различались по общему количеству макрофагов (CD68+) и лимфоцитов (CD4+, CD8+, CD3+) (Таблица 2.)

**Таблица 2.** Различия между группами ВКМП и нвДКМП по количеству клеток различных фенотипов M±m, Me[25%;75%]

Фенотипы клеток	>14 лейкоцитов/мм <sup>2</sup> миокарда	<14 лейкоцитов/мм <sup>2</sup> миокарда	P.
Общее кол-во клеток	20,7±8,6	4,0±2,9	p<0,0001
CD4+	2,0[2,0;4,0]	0[0;2,0]	P=0,01
CD8+	7,1±3,8	2,2±1,7	P<0,0001
CD68+	3,5[0,0;15,5]	0[0;0,6]	P=0,009
CD3+	9,0[7,0;11,0]	0[0;1,0]	P<0,0001

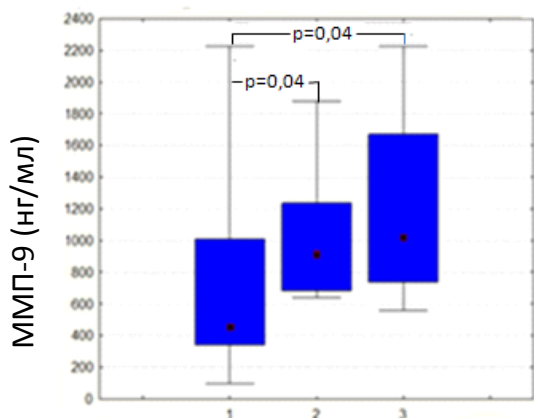
Согласно данным литературы перенос CD4+ от доноров реципиентам является пусковым механизмом развития аутоиммунного миокардита [S.Smith 1993]. Эти клетки также выявляются и при инфекционном процессе в сердце [A. Gangaplara 2012]. Количество CD4+ при хроническом миокардите ассоциировано с увеличением КДО и снижением ФВ. При этом соотношение CD4+/CD8+ имеет тенденцию к снижению через 2 месяца от начала заболевания и сопровождается прогрессированием заболевания [M. Afanasyeva 2004]. В нашей работе средняя длительность заболевания составила 1 год, при этом количество CD4+ Т клеток в кардиобиоптате было в 3,5 раза меньше, чем CD8+ клеток. В подгруппе ВКМП была выявлена тенденция к отрицательной взаимосвязи CD4+ с ФВ% (r=-0,45;p=0,05) и положительной взаимосвязи этого фенотипа клеток с КСО (r=0,4;p=0,06). Таким образом, учитывая данные литературы, а также результаты нашего исследования, можно предположить, что эти эффекторные клетки играют важную роль в развитии ВКМП.

При выполнении гистологического исследования биоптатов выявлено, что количество пациентов с 1 степенью фиброза миокарда составило 20(55,5%) пациентов, со 2 степенью - 11(30,5%), с 3 степенью - 5(13,8%). Таким образом, введенные в протокол пациенты имели преимущественно начальную степень фиброза миокарда. Причем подгруппы ВКМП и нвДКМП были сопоставимы по выраженности фиброза миокарда.

Согласно данным ПЦР, у 21(60%) пациента из 35 были обнаружены вирусные геномы: в 15(71,4%) случаях- PVB 19, в 1(4,7%)- PVB19+CMV, в 1(4,7%)- PVB19+HHV6, в 2(9,5%)- HHV6, в 2(9,5%)- EBV.

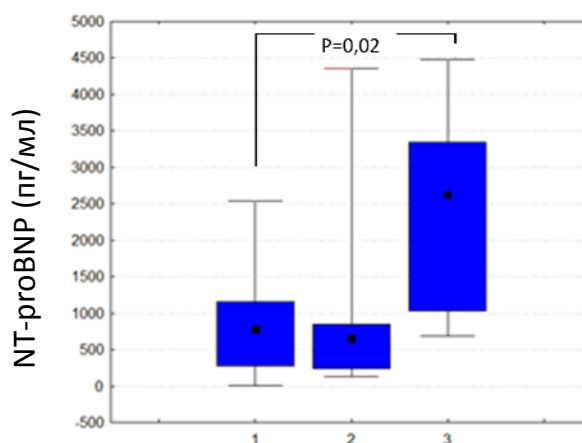
### Различия в концентрациях биомаркеров в зависимости от степени выраженности фиброза миокарда.

Важно отметить, что по мере увеличения степени фиброза миокарда у пациентов отмечалось и увеличение активности ММП-9: при 1 степени фиброза значение ММП-9 составило (440[317;982]) нг/мл, при 2 степени – (910 [681;1334]) нг/мл, при 3 степени (1014[646;1949]) нг/мл. Значимые различия по уровню ММП-9 были выявлены между 1 и 2 степенью ( $p=0,04$ ), а также между 1 и 3 степенью ( $p=0,04$ ) фиброза миокарда, при этом значимых различий между 2 и 3 степенью не зарегистрировано, ( $p=0,8$ ) (Рисунок 1).



Степень фиброза миокарда

**Рисунок 1.** Концентрация ММП-9 (нг/мл), в зависимости от степени фиброза миокарда в группе эндомикардиальной биопсии. (Me[25%;75%],min,max)



Степень фиброза миокарда

**Рисунок 2.** Значения NT-proBNP (пг/мл) в зависимости от степени фиброза миокарда в группе эндомикардиальной биопсии. (Me[25%;75%] min, max)

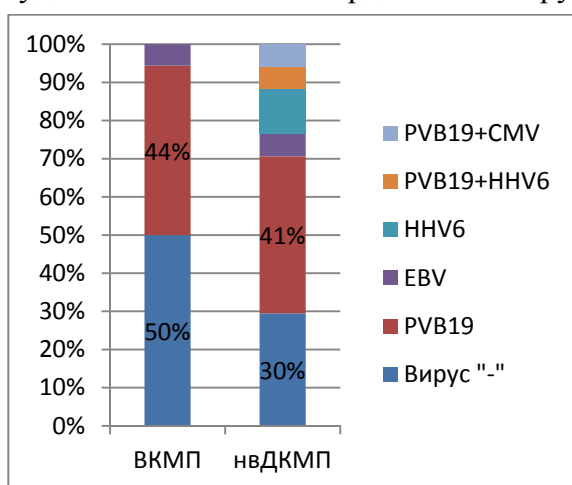
Несмотря на известные профибротические свойства ТФРβ, в нашем исследовании при проведении анализа уровня ТФРβ в зависимости от степени фиброза миокарда значимых различий между 3-я группами выявлено не было, что может быть обусловлено влиянием рецепторного аппарата. Было установлено, что 3 тип рецепторов к ТФРβ ингибирует синтез коллагена 1 типа фибробластами сердца, а также предупреждает развитие миокардиального фиброза у мышей [N.Hermida с соавторами 2009].

### Сравнение подгрупп ВКМП и нвДКМП по молекулярно-генетическим маркерам вирусных инфекций.

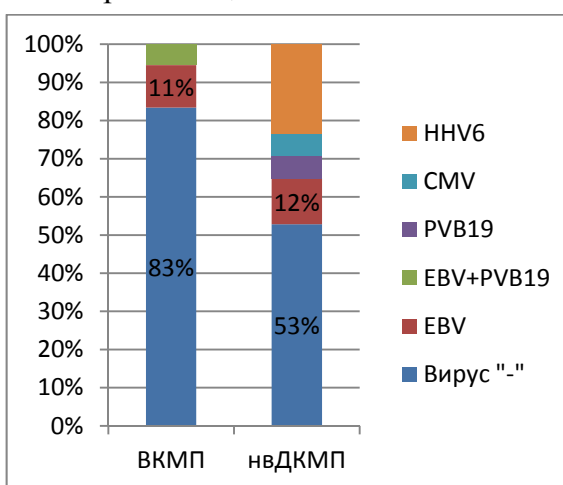
Согласно данным ПЦР-диагностики, полученным при исследовании эндомикардиальных биоптатов, подгруппу пациентов с ВКМП составили 9(50%) вирусологически положительных и 9(50%) вирусотрицательных больных, в то время как подгруппа пациентов с нвДКМП включала 12(70,5%) вирусологически положительных и 5(29,5%) вирусотрицательных больных. Между группами ВКМП и нвДКМП не было выявлено

достоверных различий ( $p=0,5$ ) по частоте встречаемости вирусов в биоптатах (Рисунок 3). При этом в подгруппах вирусоложительных больных ВКМП и нвДКМП преобладал парвовирус В19, что соотносится с литературными данными [S.Pankuweit 2003;U.Kuhl 2005;I.Kinderman 2008]

Согласно результатам ПЦР при исследовании образцов крови, группа ВКМП включала 3(16,6%) вирусоложительных и 15(83,4%) вирусотрицательных больных, в то время как в группе нвДКМП оказалось 8(47%) вирусоложительных и 9 (53%) вирусотрицательных пациентов (Рисунок 4). Лишь у двух ( $n=2$ ; 8%) из 25 (100%) вирусоложительных пациентов по результатам ПЦР диагностики эндомикардиальных биоптатов и образцов крови были выявлены идентичные вирусные геномы одновременно в миокарде и в крови: в одном случае - HHV6, в другом - PVB19. Таким образом, ПЦР диагностика образцов крови не позволяет судить о наличии миокардиальной вирусной персистенции.



**Рисунок 3.** Распределение вирусоложительных и вирусотрицательных пациентов в подгруппах ВКМП и нвДКМП по данным ПЦР диагностики ЭМБ.



**Рисунок 4.** Распределение вирусоложительных и вирусотрицательных пациентов в подгруппах ВКМП и нвДКМП по данным ПЦР диагностики образцов крови.

### Сравнение подгрупп ВКМП и нвДКМП по частоте экспрессии транскрипционных факторов в эндомикардиальных биоптатах и образцах крови.

В ходе исследования эндомикардиальных биоптатов и образцов крови пациентов проводилась оценка экспрессии ряда транскрипционных факторов (FOXP3+, T-bet, GATA3, STAT6), являющихся маркерами Т регуляторных клеток, Tх1, Tх2.

Частота экспрессии FOXP3+ в эндомикардиальных биоптатах у пациентов с ВКМП составила 22,3% ( $n=4$ ), у больных с нвДКМП - 47% случаев ( $n=8$ ), различия были близки к достоверным ( $p=0,06$ ). При исследовании образцов крови пациентов с ВКМП экспрессия FOXP3 была выявлена у 38,8% больных ( $n=7$ ) против 76,4% ( $n=13$ ) у больных с нвДКМП ( $p=0,028$ ). Как известно, основное значение Т регуляторных клеток, маркером которых является транскрипционный фактор FOXP3+, заключается в контроле интенсивности и длительности иммунного ответа за счет регуляции функции эффекторных Т клеток. Согласно

экспериментальным данным при аутоиммунном миокардите отмечается снижение отношения Т регуляторных клеток /Тх17. Кроме того, развитие Коксаки- вирусного миокардита ассоциировано с уменьшением количества Т регуляторных клеток [P.Guede 2012; P.Chen 2012]. Однако, на сегодняшний день доказательная база в отношении протективной роли Т регуляторных клеток при развитии миокардита недостаточна. Согласно полученным нами данным, частота экспрессии FOXP3+ в образцах крови пациентов с ДКМП без признаков активного воспалительного процесса в миокарде была значимо выше, чем в подгруппе больных с ВКМП. Та же тенденция прослеживалась и в кардиобиоптатах.

Между группами ВКМП и нвДКМП не было выявлено значимых различий по частоте экспрессии в эндомиокардиальных биоптатах таких транскрипционных факторов как T-bet, GATA3, STAT6.

### **Сравнение подгрупп ВКМП и нвДКМП по концентрации показателей гуморального, клеточного иммунитета, нейтрофильного фагоцитоза и металлопротеиназной активности. Определение диагностической значимости биомаркеров в выявлении ВКМП.**

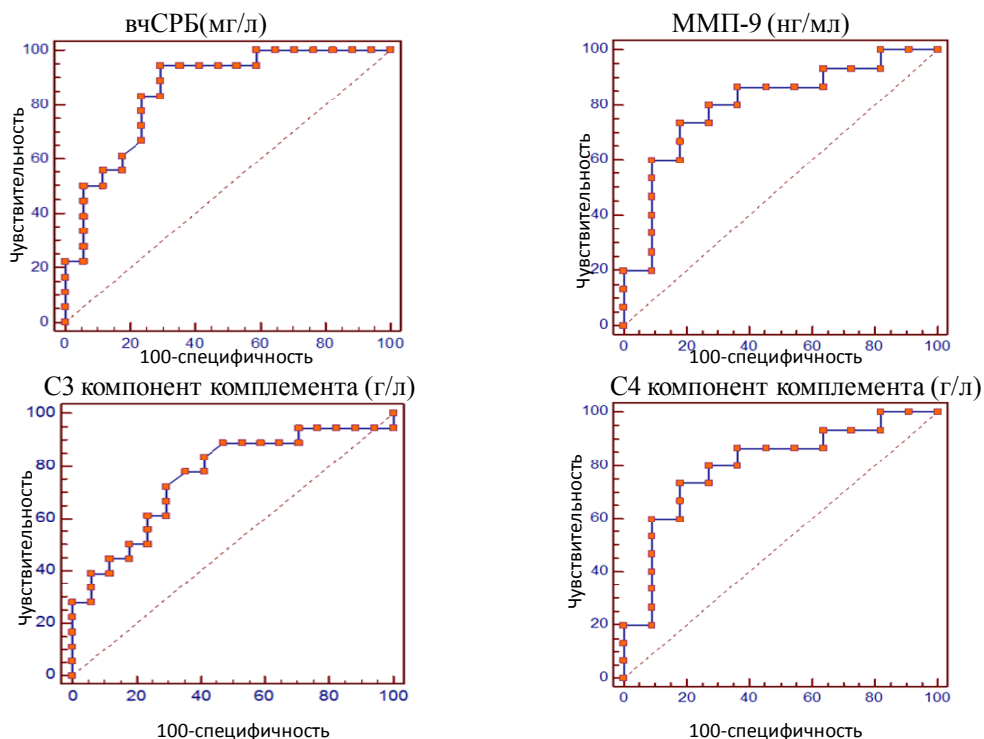
При исследовании показателей гуморального иммунитета оказалось, что процент больных в группе ЭМБ, имеющих превышающие диапазон нормальных значений титры исследуемых параметров, был достаточно не высок. Концентрации вчСРБ, превышающие референсные значения, зарегистрированы у 10(28,6%) пациентов, С3 компонента комплемента – у 0 (0%), С4 компонента комплемента - у 1(2,8%), С1-ингибитора - у 2(5,7%), IgA- у 7(20%), IgM- 4(11,4%), IgG - у 3(8,5%),  $\alpha$ 1- антитрипсина- у 4(11,4%),  $\alpha$ 2-макроглобулина у 1(2,8%), IgE- у 16(45,7%), ЭКП- у 4(11,4%). Активность ЦИК3%, ЦИК4%, РФ, АСЛО у всех пациентов из группы эндомиокардиальной биопсии были в пределах нормальных значений.

При сравнении подгрупп пациентов с ВКМП и нвДКМП по показателям гуморального иммунитета было выявлено, что концентрация вчСРБ была значимо выше у больных с признаками активного воспалительного процесса в миокарде (3,48[1,1;6,14]), чем у больных с отсутствием такового (0,6[0,4;0,9]) мг/л, ( $p=0,0003$ ). При этом в подгруппе ВКМП значения вчСРБ превышали принятые референсные уровни лишь у 10(55%) пациентов, в подгруппе нвДКМП у всех больных концентрация вчСРБ не превышала верхнюю границу нормальных значений.

Sampietro с коллегами в 2005г. показали, что у большинства пациентов с идиопатической ДКМП регистрируются повышенные значения этого белка. Было продемонстрировано, что высокий уровень СРБ регистрируется у пациентов с острым миокардитом и достигает  $6,3\pm 2,1$  мг/л [J.Guo 2008]. Доказан факт локальной продукции СРБ в кардиомиоцитах у больных с кардиомиопатией неишемической этиологии. Продемонстрирована его способность при взаимодействии с Fc рецепторами продуцировать провоспалительные цитокины, а также вызывать экспрессию синтазы оксида азота, вызывающую снижение функциональной активности ЛЖ [TW.DuClos 2000; D.Webb; 2000M.Satoh 2005] . Однако, в литературе не встречаются данные относительно уровня СРБ, который позволил бы предположить у

пациента с морфологическими признаками дилатационной кардиомиопатии наличие воспалительного процесса в миокарде. В нашей работе при проведении ROC анализа значений вчСРБ площадь под кривой составила  $0,8 \pm 0,06$  ( $p < 0,0001$ ), что свидетельствует о диагностической значимости этого биомаркера (Рисунок 5). Чувствительность вчСРБ по отношению к активности воспалительного процесса в миокарде составила 61,1%, специфичность 82,35% при уровне маркера  $> 1,13$  мг/л. Положительное предиктивное значение (+PV) вчСРБ составило 78,6%, отрицательное предиктивное значение (-PV) - 66,7%.

У пациентов с ВКМП концентрации ряда биомаркеров были значимо выше, чем у больных с нВДКМП: соответственно С3 компонент комплемента ( $1,4 \pm 0,27$ ) и ( $1,1 \pm 0,19$ ) г/л, ( $p = 0,01$ ); С4-компонент комплемента  $0,29 [0,24; 0,35]$  и  $(0,22 [0,19; 0,25])$  г/л, ( $p = 0,01$ ). Согласно литературным данным, показатели системы комплемента повышены при миокардиальном воспалении, вследствие активации комплексами вирусный антиген-антитело [T.Sampietro 2005]. Значимый эффект системы комплемента в развитии аутоиммунного миокардита осуществляется за счет локализованных на внешней мембране CD44+CD62L+ субпопуляций Т клеток рецепторов CR1, CR2, которые вовлекаются в экспрессию Т и В клеточных активационных маркеров и пролиферацию аутореактивных к миокарду Т клеток [Z. Кауа 2001]. При проведении ROC анализа значений С3 компонента комплемента площадь под кривой =  $0,7 \pm 0,08$  ( $p = 0,002$ ) (Рисунок 5).



**Рисунок 5.** ROC анализ вчСРБ (мг/л), С3 компонента комплемента (г/л), С4 компонента комплемента (г/л), ММП-9 (г/л).

Чувствительность С3 компонента комплемента по отношению к активности воспалительного процесса в миокарде составила 72,2%, специфичность 70,6% при

оптимальном уровне маркера  $>1,2$  г/л. Положительное предиктивное значение (+PV) С3 компонента комплемента составило 72,2%, отрицательное предиктивное значение (-PV) – 70,6%. При проведении ROC анализа значений С4 компонента комплемента площадь под кривой составила  $0,8 \pm 0,07$  ( $p < 0,0001$ ). Чувствительность С4 компонента комплемента по отношению к активности воспалительного процесса в миокарде находилась в пределах 66,7%, специфичность 81,25% при оптимальном уровне  $>0,256$  г/л. Положительное предиктивное значение (+PV) С4 компонента комплемента составило 80%, отрицательное предиктивное значение (-PV) – 68,4% (Рисунок 5).

При сравнении подгрупп ВКМП и нвДКМП по уровню металлопротеиназной активности было выявлено, что только концентрация ММП-9 была значимо выше в группе пациентов с активным воспалительным процессом в миокарде (925[647;1235]) нг/мл, в сравнении с больными без признаков активного воспаления (440[143;793]) нг/мл, ( $p=0,007$ ). Кроме того, в подгруппе ВКМП обнаружена положительная связь между ММП-9 и общим количеством инфильтрирующих  $1\text{мм}^2$  миокарда клеток и ( $r=0,56$ ,  $p=0,04$ ), а также с  $\text{CD}68^+$ /мм<sup>2</sup> миокарда ( $r=0,5$ ,  $p=0,04$ ). Согласно данным литературы ММП-9 принимает участие в воспалительных процессах и ремоделировании миокарда при болезни Шагаса [R.Gomes 2013]. Показана прямая взаимосвязь ММП-9 с экспрессией ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ТФР $\beta$ , а также с количеством  $\text{CD}3^+$  и  $\text{CD}68^+$  в миокарде [D.Vanhoutte 2013]. Кроме того, провоспалительные свойства ММП-9 подтверждаются ее участием в развитии экспериментального артрита [T.Itoh 2002]. Проведен ROC анализ значений ММП-9, площадь под кривой была достаточно велика -  $0,8 \pm 0,09$  ( $p=0,001$ ). При оптимальном уровне ММП-9  $>680$  нг/мл, чувствительность находилась в пределах 73,3%, специфичность - 81,8%, положительное предиктивное значение (+PV) ММП-9 составило 84,6%, отрицательное предиктивное значение (-PV) – 69,2% (Рисунок 5).

Важно отметить, что при проведении корреляционного анализа в подгруппе ВКМП сильные и умеренные взаимосвязи были выявлены между биомаркерами, концентрации которых были значимо выше у пациентов с ВКМП.

На основании сопоставления результатов исследования эндомиокардиальных биоптатов гистологическим, иммуногистохимическим и молекулярно-генетическим методом и концентраций периферических биомаркеров выявлены диагностически значимые параметры (вчСРБ, С3 компонент комплемента, С4 компонент комплемента, ММП-9, АТ к нативной ДНК), которые могут быть включены в алгоритм лабораторного сопровождения пациентов с воспалительной кардиомиопатией, проведена оценка их чувствительности и специфичности.

Согласно полученным данным, у пациентов с синдромом ДКМП сочетанное применение таких биомаркеров, как вчСРБ  $\geq 1,13$  мг/л, С3 компонент комплемента  $\geq 1,2$  мг/л и С4 компонент комплемента  $\geq 0,256$  (г/л) позволяет оптимизировать отношение чувствительность/специфичность по сравнению с однофакторным ROC анализом, доводя чувствительность до 61%, специфичность до 94% при диагностике активного воспалительного процесса в миокарде (Таблица 3).



**Таблица 3.** Сравнение подгрупп ВКМП и нвДКМП по концентрациям биомаркеров (вчСРБ, С3 и С4 компонентов комплемента),  $M \pm m$ ;  $Me[25\%;75\%]$

Комбинация биомаркеров	ВКМП	нвДКМП	Всего
вчСРБ > 1,13 (мг/л) С3 компонент комплемента > 1,2 (г/л) С4 компонент комплемента > 0,256 (г/л)	n=11 (истинно-положительные)	n=1 (ложноположительные)	n=12
вчСРБ ≤ 1,13 (мг/л) и/или С3 компонент комплемента ≤ 1,2 (г/л) и/или С4 компонент комплемента ≤ 0,256 (г/л)	n=7 (ложно-отрицательные)	n=16 (истинно-отрицательные)	n=23
Всего	n=18	n=17	n=35

В нашей работе впервые было показано, что шанс выявить признаки активного воспалительного процесса в миокарде у пациентов с ДКМП является наиболее высоким среди всех проанализированных нами биомаркеров при определении концентрации ММП-9 > 680 нг/мл и составляет 12,3 (95% ДИ 1,65-92,7). При дальнейшем анализе было установлено, что введение в комбинацию с С3 и С4 компонентами комплемента ММП-9 вместо вчСРБ, повышает чувствительность до 66% при сохранении высокой специфичности-94% по отношению к наличию признаков активности воспалительного процесса в миокарде у пациентов с ДКМП (Таблица 4). Таким образом, выявление комбинации биомаркеров с пороговыми значениями ММП-9 > 680 нг/мл, С3 компонента комплемента > 1,2 г/л и С4 компонента комплемента > 0,256 г/л в 92% случаев будет свидетельствовать о наличии воспалительного процесса в миокарде у больных с синдромом ДКМП при условии отсутствия острых и обострения хронических воспалительных заболеваний. При концентрации одного из биомаркеров ниже указанных пороговых значений вероятность отсутствия миокардиального воспаления составляет 72%.

**Таблица 4.** Сравнение подгрупп ВКМП и нвДКМП по концентрациям биомаркеров (ММП-9, С3 и С4 компонентов комплемента),  $M \pm m$ ;  $Me[25\%;75\%]$

Диагноз	ВКМП	нвДКМП	Всего
ММП-9 > 680 (нг/мл) С3 компонент комплемента > 1,2 (г/л) С4 компонент комплемента > 0,256 (г/л)	n=12 (истинно-положительные)	n=1 (ложноположительные)	n=13
ММП-9 ≤ 680 (нг/мл) и/или С3 компонент комплемента ≤ 1,2 (г/л) и/или С4 компонент комплемента ≤ 0,256 (г/л)	n=6 (ложно-отрицательные)	n=16 (истинно-отрицательные)	n=22
Всего	n=18	n=17	n=35

При определении уровня ЭКП в подгруппах ВКМП (13,5[7,1;19,4]) и нвДКМП (12,6[10,4;19,8]) нг/мл значимых достоверных различий между ними выявлено не было ( $p=0,5$ ). Согласно квартилям общего количества лимфоцитов и макрофагов/мм<sup>2</sup> миокарда, были сформированы 4 группы. Далее мы провели деление пациентов на 2 подгруппы по пороговому значению четвертого квартиля, которое составило 17 лимфоцитов и макрофагов/мм<sup>2</sup> миокарда. В результате было выявлено, что в подгруппе больных (n=11), имевших > 17 клеток/1мм<sup>2</sup> миокарда наблюдались наибольшие значения эозинофильного катионного протеина (19[13,5;29,4]) нг/мл, в сравнении с подгруппой пациентов с наличием

<17лимфоцитов (n=27) и макрофагов/мм<sup>2</sup> миокарда (11,1[6,6;16,6]) нг/мл, (p=0,02). Таким образом, значимое повышение ЭКП наблюдается у пациентов с наиболее выраженным воспалительным процессом в миокарде. Согласно литературным данным в миокарде ЭКП индуцирует выделение гистамина и триптазы из тучных клеток, а также стимулирует продукцию простагландина D<sub>2</sub>, который может способствовать развитию аутоиммунных процессов [V. Patella с соавторами 1996].

В подгруппе пациентов с ВКМП выявлены значимые взаимосвязи между ЭКП и общим количеством лейкоцитов/мм<sup>2</sup> миокарда (r=0,79;p=0,0002), а также с такими фенотипами лимфоцитов как CD68+(r=0,7;p=0,002) и CD3+(r=0,6;p=0,01). Кроме того, сильная взаимосвязь обнаружена между уровнем этого белка и ФНО $\alpha$  (r=0,7;p=0,01), тропонином Т (r=0,5;p=0,04), вчСРБ (r=0,6;p=0,004), С3 компонентом комплемента(r=0,5;p=0,02). Хотя проведенный ROC анализ не показал диагностической значимости данного биомаркера при ВКМП, с нашей точки зрения изучение роли ЭКП в развитии воспалительного процесса и повреждения миокарда является перспективным направлением для дальнейших научных исследований.

При определении уровня ФНО $\alpha$  в подгруппах ВКМП (3,1[1,3;9,7]) и нвДКМП (1,9[3,2;10,3]) значимых достоверных различий между исследуемыми подгруппами выявлено не было (p=0,4). В этой связи аналогично был проведен дополнительный поквартильный анализ. В подгруппе больных (n=8), имеющих  $\geq 17$ клеток/1мм<sup>2</sup> миокарда, значения ФНО $\alpha$  были значимо выше [5,1(3,2;10,3)], (пг/мл), по сравнению с пациентами (n=27), имевшими <17лимфоцитов и макрофагов/1мм<sup>2</sup> миокарда [1,3(0,49;3,19), (пг/мл), p=0,03]. Полученные результаты свидетельствуют о значимом повышении уровня ФНО $\alpha$  только у больных с наиболее выраженным воспалительным процессом в миокарде. Согласно данным M.Satoh (2009г) экспрессия мРНК ФНО $\alpha$  в 2 раза выше в миокарде у пациентов с тяжелым миокардитом, чем у больных с ДКМП и имеет тенденцию к снижению спустя 28-62 дня, однако остается выше, чем у пациентов контрольной группы. Согласно проведенному в нашем исследовании ROC анализу значений ФНО $\alpha$ , площадь под кривой составила 0,6 $\pm$ 0,13 (p=0,3), что свидетельствует об отсутствии диагностической значимости этого маркера при ВКМП.

При проведении сравнения подгрупп пациентов с ВКМП и нвДКМП по показателям аутореактивности показано, что уровень АТ к нативной ДНК составил: (1,6[0,6;2,7]) и 3,2[2,8;6,7] соответственно), (p=0,007). Согласно данным M.Compaigne с соавторами (2008г) АТ к нативной ДНК не являются высокоспецифичными для системной красной волчанки и могут выявляться при иных ревматологических заболеваниях, сопровождаемых развитием плеврита, протеинурии, васкулита, артралгии. Нами был проведен ROC анализ значений АТ к нативной ДНК, площадь под кривой составила 0,75 $\pm$ 0,08 (p=0,008). При оптимальном уровне АТ к нативной ДНК >2,7 Ед/мл, чувствительность равнялась 70,6%, специфичность - 75%, положительное предиктивное значение (+PV) АТ к нативной ДНК составило 75%, отрицательное предиктивное значение (-PV) – 70,6%.

У больных ВКМП по сравнению с группой нвДКМП была значимо выше активность ТФР $\beta$ : 13434[9577;52401] против 9567[6962;9983], (p=0,01), что может свидетельствовать как о

провоспалительных свойствах этого цитокина, которые по данным M. Veldhoen с соавторами (2008г) могут быть обусловлены индукцией дифференцировки CD4+ Т клеток в Th9 и Th17, так и компенсаторным повышением уровня этого биомаркера у пациентов с наличием активного воспалительного процесса в миокарде. Проведен ROC анализ значений ТФРβ, площадь под кривой составила 0,56±0,1, (p=0,6), что указывает на отсутствие диагностической значимости данного биомаркера при ВКМП.

По остальным анализируемым параметрам гуморального иммунитета значимых различий между группами ВКМП и нвДКМП не выявлено. При сравнении подгрупп ВКМП и нвДКМП по показателям клеточного иммунитета было выявлено, что уровень CD3+CD25+% маркера активации лимфоцитов был значимо выше в группе больных с признаками активного воспалительного процесса в миокарде, чем у пациентов с отсутствием такового [6(3,5;9,4 и 0,9(2,3;3,8)],(p=0,008)]. Таким образом в крови больных с ВКМП наблюдается некоторая активация клеточного звена иммунитета, которая не позволяет судить о характере лимфоцитарной миокардиальной инфильтрации у этих пациентов. По уровню показателей нейтрофильного фагоцитоза значимых различий между исследуемыми подгруппами найдено не было.

#### **Сравнение подгрупп вирусологических и вирусотрицательных пациентов согласно данным эндомиокардиальной биопсии.**

Согласно данным ПЦР, полученным при исследовании эндомиокардиальных биоптатов, у 21(60%) пациента в миокарде были выявлены вирусы, 14(40%) больных были вирусотрицательными. При оценке основных параметров клинического состояния значимых различий в исследуемых подгруппах выявлено не было. Показано преобладание CD4+ Т клеток/мм<sup>2</sup> миокарда в подгруппе вирусологических (2,0[0,0;5,5]) по сравнению с подгруппой вирусотрицательных больных (0,5[0,0;2,0]), (p=0,04). По показателям гуморального иммунитета, аутореактивности, металлопротеиназной активности, серологическим маркерам инфекций, активности тропонина Т и NT-proBNP - значимых различий между исследуемыми подгруппами выявлено не было. Таким образом, серологические маркеры вирусных инфекций, а также иные показатели гуморального иммунитета не позволяют судить о миокардиальной вирусной персистенции. При анализе показателей клеточного иммунитета в исследуемых подгруппах пациентов показано, что значения некоторых маркеров были выше в подгруппе вирусологических больных по сравнению с вирусотрицательными пациентами: соответственно CD3-CD(16+56)NK [622(219;279) и 257(148;471)],(p=0,02)]; CD3+/CD95+ [585(272;821) и 685(501;854)],(p=0,04)]. Таким образом, согласно нашим данным только эти периферические клеточные маркеры могут свидетельствовать о наличии миокардиальной вирусной персистенции.

### **Оценка активности предполагаемого воспалительного процесса в миокарде в группе лабораторного контроля.**

Учитывая тот факт, что сочетанное применение вчСРБ и ММП-9 в комбинации с С3 и С4 компонентами комплемента привело к оптимизации чувствительности и специфичности в группе эндомикардиальной биопсии, мы использовали эти биомаркеры для оценки активности предполагаемого воспалительного процесса в миокарде у пациентов группы лабораторного контроля. В результате, группа лабораторного контроля была разделена на две подгруппы: первую составили пациенты ( $n=10;31,2\%$ ) с предполагаемым активным воспалительным процессом в миокарде (вчСРБ $>1,13$  мг/л, С3 компонент комплемента  $>1,2$  г/л, С4 компонент комплемента  $>0,256$  г/л), вторую подгруппу ( $n=22;68,8\%$ ) – больные с предполагаемым отсутствием активного воспалительного процесса в миокарде (вчСРБ $\leq 1,13$  мг/мл и/или С3 компонент комплемента  $\leq 1,2$  г/л, и/или С4 компонент комплемента  $\leq 0,256$  г/л). При сравнении исследуемых подгрупп по показателям гуморального иммунитета было выявлено, что уровни ряда биомаркеров были значимо выше в подгруппе с предполагаемым активным воспалительным процессом в миокарде, чем в подгруппе с предполагаемым отсутствием такового: соответственно ММП-9 [909(699;2035) и 538(345;771) нг/мл, ( $p=0,04$ )]; ЭКП [13,8(10,2;38,2) и 8,6(5,6;13,6) нг/мл, ( $p=0,01$ )].

Аналогично группа лабораторного контроля была разделена на две подгруппы по показателям другой комбинации биомаркеров: первую составили пациенты ( $n=9;28\%$ ) с предполагаемым активным воспалительным процессом в миокарде (ММП-9 $>680$  нг/мл, С3 компонент комплемента  $>1,2$  г/л, С4 компонент комплемента  $>0,256$  г/л), вторую подгруппу ( $n=23;72\%$ ) – больные с предполагаемым отсутствием активного воспалительного процесса в миокарде (ММП-9 $\leq 680$  нг/мл и/или С3 компонент комплемента  $\leq 1,2$  г/л, и/или С4 компонент комплемента  $\leq 0,256$  г/л). При сравнении исследуемых подгрупп по показателям гуморального иммунитета было выявлено, что уровни ряда биомаркеров были значимо выше в подгруппе с предполагаемым активным воспалительным процессом в миокарде, чем в подгруппе с предполагаемым отсутствием такового: вчСРБ [3,8(2,2;8,7) и 0,8(0,3;3,1) мг/л, ( $p<0,0001$ )]; ЭКП [14(10;23) и 8,6(5,6;13,90) нг/мл, ( $p=0,01$ )] соответственно, что является косвенным подтверждением нашего предположения о наличии активного воспалительного процесса в 1 подгруппе больных.

### **Применение противовирусной и иммуотропной терапии на основании результатов эндомикардиальной биопсии.**

Помимо диагностики в нашем исследовании больным ВКМП проводилась специфическая терапия, основанная на данных ЭМБ, в сравнении со стандартным лечением ВКМП. В соответствии с результатами эндомикардиальной биопсии вирусологически положительным больным проводилась противовирусная терапия. Семь пациентов с выявленным в миокарде парвовирусом В19 (PVB19) получали терапию пентаглобином в дозе 750 мг/кг. При выявлении в ЭМБ вируса герпеса 6 типа (HHV6) ( $n=2$ ), вируса Эпштейн-Барра (EBV) ( $n=2$ ), также как и сочетании PVB19 с HHV6 и цитомегаловирусом (CMV) ( $n=2$ ) больным дополнительно

проводилась терапия фамцикловиrom в дозе 1000 мг в сутки в течение 10 дней. В группе пациентов с ВКМП и отсутствием вирусов в миокарде (n=9) проводилась иммуносупрессивная терапия (преднизолон 1мг/кг в течение 1 месяца, последующие 5 месяцев - 0,33 мг/кг веса).

В результате у больных в группе проведения специфической терапии (пентаглобином/фамцикловиrom или преднизолоном) за 6 месяцев наблюдения было выявлено значимое снижение ФК ХСН с  $2,24 \pm 0,5$  до  $1,56 \pm 0,6$  ( $p < 0,0001$ ), увеличение пройденной дистанции при проведении теста 6-минутной ходьбы на 13,5% ( $p = 0,006$ ), уменьшение количества баллов по ШОКС на 45% ( $p < 0,0001$ ), увеличение ФВ ЛЖ на 18% ( $p < 0,0001$ ), снижение концентрации NT-proBNP на 40% ( $\Delta\%$ ) ( $p = 0,02$ ). В группе больных стандартного лечения ХСН достоверных изменений перечисленных показателей установлено не было.

Таким образом, результаты нашей работы свидетельствуют о необходимости проведения специфической противовирусной или иммунотропной терапии в дополнение к стандартному лечению больных ВКМП. Лишь в этом случае мы можем рассчитывать не только на значимое улучшение клинико-функционального состояния и сократимости миокарда ЛЖ, но и на снижение активности маркеров прогноза больных ВКМП и ХСН.

#### ВЫВОДЫ:

1. Выраженность клинико-функциональных проявлений ВКМП и ДКМП не зависит от наличия или отсутствия признаков активного воспалительного процесса в сердце и миокардиальной вирусной персистенции.
2. При хроническом воспалительном процессе в миокарде количество CD8+ Т клеток в 3,5 раза превышает количество CD4+ Т клеток, миокардиальная вирусная персистенция ассоциирована с увеличением числа CD4+ Т клеток. Снижение частоты экспрессии FOXP3+ в периферической крови и кардиобиоптатах пациентов с ВКМП свидетельствует об уменьшении количества Т регуляторных клеток у больных с миокардиальным воспалением.
3. У пациентов с ДКМП определение пороговых значений ММП-9  $> 680$ нг/мл и вчСРБ  $> 1,13$ мг/л в сочетании с С3 компонентом комплемента  $> 1,2$ г/л, С4 компонентом комплемента  $> 0,245$  г/л в периферической крови обладает наиболее высокой диагностической значимостью для выявления активного воспалительного процесса в миокарде.
4. У пациентов с наиболее выраженным воспалительным процессом в миокарде ( $> 17$ лейкоцитов/мм<sup>2</sup> миокарда) наблюдается достоверное увеличение активности ФНО $\alpha$  и ЭКП, что отражает повышение системного воспалительного ответа и свидетельствует о наличии эозинофильного компонента в воспалительной реакции при ВКМП.
5. Пациенты с ВКМП и ДКМП без признаков активного воспалительного процесса в миокарде не различаются по наличию миокардиальной вирусной персистенции. Серологическая и молекулярно-генетическая диагностика образцов крови не позволяет судить о присутствии вируса в миокарде. Основным маркером миокардиальной вирусной

персистенции у пациентов с ДКМП является повышение CD3+/CD95+ и количества НК-клеток.

6. Значимое улучшение клинико-функционального состояния пациентов ВКМП без признаков миокардильной вирусной персистенции наблюдается в случае присоединения к стандартному лечению ХСН терапии глюкокортикостероидами, а у вирусологически положительных больных с ДКМП - противовирусной терапии и введения внутривенных иммуноглобулинов.

#### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ:

1) Выявление комбинации биомаркеров с пороговыми значениями ММП-9 > 680 нг/мл, С3 компонента комплемента > 1,2 г/л и С4 компонента комплемента > 0,256 г/л в 92% случаев будет свидетельствовать о наличии воспалительного процесса в миокарде у больных с синдромом ДКМП при условии отсутствия острых и обострения хронических воспалительных заболеваний. При концентрации одного из биомаркеров ниже указанных пороговых значений вероятность отсутствия миокардиального воспаления составляет 72%.

2) У больных с синдромом ДКМП, не имеющих острых и обострения хронических воспалительных заболеваний, выявление комбинации биомаркеров, включающей vчСРБ > 1,13 мг/л, С3 компонент комплемента > 1,2 г/л и С4 компонент комплемента > 0,256 г/л в 92% случаев будет свидетельствовать о наличии воспалительного процесса в миокарде, при концентрации одного из биомаркеров ниже указанных пороговых значений вероятность отсутствия миокардиального воспаления будет 69%.

3) При выявлении в миокарде молекулярно-генетическим методом вирусов (CMV, EBV, HHV1,2, HHV6) назначение фамцикловира, PVB19- внутривенного иммуноглобулина, а в случае вирусотрицательной ВКМП - терапии системными глюкокортикостероидами целесообразно, так как применение данного подхода в дополнение к стандартной терапии ХСН приводит к значимому улучшению клинико-функционального состояния пациентов.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Масенко В.П., Терещенко С.Н., Скворцов А.А., Нарусов О.Ю., Зыков К.А., Белявский Е.А., Щедрина А.Ю. Воспалительная кардиомиопатия- современное состояние проблемы. Терапевтический архив, 2010, №8:62-71.
2. Терещенко С. Н., Алаева Е. Н., Нарусов О.Ю., Кочетов А.Г., Сафиуллина А.А., Щедрина А.Ю., Середович В. В., Зотова Л.А., Скворцов А.А. Распространенность и диагностика дилатационной кардиомиопатии по данным Российского регистра. Кардиология, 2012; №7, том 52:67-72.
3. Алаева Е.Н., Нарусов О.Ю., Сафиуллина А.А., Щедрина А.Ю., Скворцов А.А., Терещенко С.Н. Эпидемиология дилатационной кардиомиопатии. Кардиология, 2012; №5:56-61.

4. Роль магнитно-резонансной томографии в диагностике воспалительных заболеваний миокарда. Сафиуллина А.А., Нарусов О.Ю., Шария М.А., Ширяев Г.А., Алаева Е.Н., Щедрина А.Ю., Скворцов А.А., Терещенко С.Н. Кардиологический вестник, 2012; 7(1):41-47.
5. Щедрина А.Ю., Скворцов А.А., Зыков К.А., Сафиуллина А.А., Терещенко С.Н. Роль парвовируса В19 в развитии воспалительной кардиомиопатии. Рациональная фармакотерапия в кардиологии, 2013, 9(5):542-550.
6. Куликова Т.Г., Степанова О.В., Валихов М.П., Щедрина А.Ю., Самко А.Н., Масенко В.П., Терещенко С.Н. Резидентные прогениторные кардиальные клетки у пациентов с дилатационной кардиомиопатией и хронической сердечной недостаточностью. Рациональная фармакотерапия в кардиологии, 2014;10(2):203-211.
7. Щедрина А.Ю., Скворцов А.А., Зыков К.А., Нарусов О.Ю., Терещенко С.Н. Роль периферических маркеров гуморального иммунитета в диагностике воспалительной кардиомиопатии и их сопоставление с данными эндомикардиальной биопсии. Трудный пациент, 2015; №10-11
8. A. Shchedrina, A.Safiullina, M.Shariya, O.Narusov, A.Skvortsov, S. Tereschenko. Late gadolinium enhancement on cardiac magnetic resonance imaging in patients with inflammatory cardiomyopathy. European Heart Journal 2013; 34 (Abstract Supplement):1071.
9. A.Y. Shchedrina, A.A. Skvortsov, K.A Zykov, O.Y.Narusov, A.A. Safiullina, E.N.Alaeva, S.N. Tereschenko. Biomarkers role in the diagnosis of virus-positive and virus-negative inflammatory cardiomyopathy. European Journal of Heart Failure. Abstract Supplement 2014; 16 (Suppl.2):33.
10. A.Y.Shchedrina, A.A. Skvortsov, K.A Zykov, O.Y.Narusov, A.A. Safiullina, E.N.Alaeva, S.N. Tereschenko. Significance of biomarkers testing in the verification of the inflammatory cardiomyopathy. European Journal of Heart Failure. Abstract Supplement 2014; 16(Suppl.2):309.
11. A.Y. Shchedrina, A.A. Skvortsov, K.A Zykov, O.Y.Narusov, A.A. Safiullina, E.N.Alaeva, S.N. Tereschenko. Different biomarkers in the diagnosis of the inflammatory cardiomyopathy. European Heart Journal 2014; 35 (Abstract Supplement):1090-1091.
12. Щедрина А.Ю., А.А.Скворцов, К.А. Зыков, О.Ю. Нарусов, С.Н. Терещенко. Сравнение металлопротеиназной активности у больных ДКМП с наличием и отсутствием активного воспалительного процесса в миокарде. Сборник тезисов «Сердечная недостаточность 2014»:стр.30.
13. The role of treg markers detection in patients with inflammatory cardiomyopathy endomyocardial and blood samples. Co-authors: A.A. Skvortsov, K.A Zykov, O.Y.Narusov, A.A. Safiullina. European Journal of Heart Failure. Abstract Supplement 2015; 17(Suppl.1):311.

14.A.Y. Shchedrina, A.A. Skvortsov, K.A Zykov, O.Y.Narusov, A.A. Safiullina, S.N. Tereschenko. HsTNFalpha activity and the severity of inflammation, hypertrophy and fibrosis in pts with inflammatory cardiomyopathy. European Heart Journal 2015; 36 Abstract Supplement:796.

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CD - кластер дифференцировки лимфоцитов  
EBV –Эпштейн- Барр вирус  
E – максимальная скорость раннего диастолического наполнения ЛЖ  
e' –усредненная максимальная тканевая скорость раннего диастолического смещения септальной и латеральной частей кольца митрального клапана  
E/e' –давление наполнения левого желудочка  
HHV1,2– вирусы герпеса 1.2 типа  
HHV6 –вирус герпеса 6 типа  
ИФН $\gamma$  – интерферон  $\gamma$   
RVB19 – парвовирус B19  
вчСРБ – высокочувствительный С - реактивный белок  
ВКМП – воспалительная кардиомиопатия  
ДКМП – дилатационная кардиомиопатия  
ЖЭС – желудочковые экстрасистолы  
ИЛ – интерлейкин  
ИФА – иммуноферментный анализ  
КДО ЛЖ –конечно- диастолический объем левого желудочка  
КСО ЛЖ – конечно- систолический объем левого желудочка  
нвДКМП-Дилатационная кардиомиопатия без признаков воспаления в миокарде  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
ТФР $\beta$  –трансформирующий фактор роста  $\beta$   
Тх–Тхелперы  
ТШХ – тест шести-минутной ходьбы  
ФВ – фракция выброса  
ФК– функциональный класс  
ФНО $\alpha$  –фактор некроза опухоли  $\alpha$   
ХМ-ЭКГ -холтеровское мониторирование ЭКГ  
ХСН– хроническая сердечная недостаточность  
ЦИК 3% ,4% –циркулирующие иммунные комплексы 3%,4%  
Средняя чсс –средняя частота сердечных сокращений  
ЭКГ – электрокардиография  
ЭМБ- эндомиокардиальная биопсия  
ЭКП – эозинофильный катионный протеин  
ЭХО-КГ – эхокардиография