

Клинические и морфологические изменения в миокарде у пациентов с постковидным синдромом

Майрина С. В.¹, Макаров И. А.¹, Митрофанова Л. Б.¹, Вонский М. С.^{1,2}, Рунов А. Л.^{1,2}, Папко К. А.¹, Моисеева О. М.¹

Цель. Охарактеризовать клинические проявления и морфологические изменения в миокарде у пациентов с сердечно-сосудистыми осложнениями постковидного синдрома.

Материал и методы. 38 пациентам (I группа) с кардиальными симптомами в постковидном периоде выполнена эндомиокардиальная биопсия (ЭМБ). Больных из I группы разделили на 2 подгруппы в зависимости от наличия или отсутствия морфологически подтвержденного миокардита. Для морфологического сравнения сформирована II группа (41 пациент с выполненной ЭМБ до 2019г, не переносивший COVID-19). II группа также разделена на две подгруппы с и без морфологически подтвержденного миокардита.

Помимо анализа клинических, лабораторных и инструментальных данных, проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование ткани миокарда с антителами к CD3, CD68, CD16, HLA-DR, MHC1, C1q, VP1 энтеровируса, spike protein SARS-CoV-2, АПФ2, Ang1, фактору Виллебранда, VEGF и ПЦР-исследование ткани миокарда после обратной транскрипции. Дополнительно выполнялось иммунофлуоресцентное исследование ткани миокарда с использованием коктейлей антител spike protein SARS-CoV-2/CD16, spike protein SARS-CoV-2/CD68, CD80/CD163. Статистическая обработка выполнялась с использованием библиотек NumPy, SciPy, Pandas и Matplotlib на языке программирования Python.

Результаты. Среди пациентов I группы 65% имели морфологически доказанный лимфоцитарный миокардит (1 подгруппа, n=29). 35% пациентов не имели признаков воспалительных изменений в миокарде (2 подгруппа, n=9). Группа сравнения (II группа) включала 33 пациента с миокардитом (80%) и 8 пациентов (20%) без него. Отмечена выраженная экспрессия CD68⁺-макрофагов в ткани миокарда у пациентов с постковидным синдромом в сравнении со II группой как имеющих морфологические критерии миокардита (p=0,014), так и без них (p=0,007), преимущественно за счёт M2 макрофагов. Более выраженная экспрессия CD68⁺-макрофагов наблюдалась при выполнении ЭМБ на более ранних сроках. В случае выявления в I группе spike protein SARS-CoV-2 на эндотелии и воспалительном инфильтрате иммуногистохимическим методом выполнялась ПЦР ткани миокарда на SARS-CoV-2 (n=5), которая не выявила вирусных частиц SARS-CoV-2 ни в одном из анализируемых образцов.

Заключение. Кардиальные симптомы постковидного синдрома обусловлены ремоделированием миокарда, в т.ч. и у пациентов без морфологически подтвержденного миокардита. Не доказано прямое участие SARS-CoV-2 в развитии миокардита в постостром периоде COVID-19.

Ключевые слова: постковидный синдром, миокардит, эндомиокардиальная биопсия, иммуногистохимия.

Отношения и деятельность: нет.

¹ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург; ²ФГУП Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д. И. Менделеева, Санкт-Петербург, Россия.

Майрина С. В.* — врач-кардиолог, м.н.с. НИО некоронарогенных заболеваний сердца, ORCID: 0000-0002-0015-8620, Макаров И. А. — врач-патологоанатом, ассистент кафедры патологической анатомии ИМО, ORCID: 0000-0001-6175-8403, Митрофанова Л. Б. — д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии ИМО, ORCID: 0000-0003-0735-7822, Вонский М. С. — к.б.н., с.н.с. НИО некоронарогенных заболеваний сердца, руководитель НИО государственных эталонов и стандартных образцов в области биоаналитических и медицинских измерений, ORCID: 0000-0003-4061-7411, Рунов А. Л. — м.н.с. НИО некоронарогенных заболеваний сердца, н.с. НИО государственных эталонов и стандартных образцов в области биоаналитических и медицинских измерений, ORCID: 0000-0001-9496-4414, Папко К. А. — студент IV курса ИМО, ORCID: 0000-0003-1977-4295, Моисеева О. М. — д.м.н., профессор, г.н.с. НИО некоронарогенных заболеваний сердца, ORCID: 0000-0002-7817-3847.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
sonya.spbgmu16@gmail.com

АПФ2 — ангиотензинпревращающий фермент 2, МРТ — магнитно-резонансная томография, МСКТ — мультиспиральная компьютерная томография, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ХСН — хроническая сердечная недостаточность, ЭМБ — эндомиокардиальная биопсия, COVID-19 — новая коронавирусная инфекция, VEGF — фактор роста эндотелия сосудов.

Рукопись получена 25.08.2023

Рецензия получена 28.09.2023

Принята к публикации 17.10.2023



Для цитирования: Майрина С. В., Макаров И. А., Митрофанова Л. Б., Вонский М. С., Рунов А. Л., Папко К. А., Моисеева О. М. Клинические и морфологические изменения в миокарде у пациентов с постковидным синдромом. *Российский кардиологический журнал*. 2023;28(11):5582. doi:10.15829/1560-4071-2023-5582. EDN BMHJRP

Clinical and morphological myocardial changes in patients with post-COVID-19 syndrome

Mairina S. V.¹, Makarov I. A.¹, Mitrofanova L. B.¹, Vonsky M. S.^{1,2}, Runov A. L.^{1,2}, Papko K. A.¹, Moiseeva O. M.¹

Aim. To characterize the clinical manifestations and myocardial morphological changes in patients with cardiovascular complications of post-Covid syndrome.

Material and methods. A total of 38 patients (Group I) with cardiac symptoms in the post-COVID-19 period underwent endomyocardial biopsy (EMB). Patients from group I were divided into 2 subgroups depending on the presence of morphologically verified myocarditis. For morphological comparison, group II was formed (41 patients without COVID-19 and with EMB performed before 2019). Group II was also divided into two subgroups with and without morphologically verified myocarditis.

In addition to the analysis of clinical and paraclinical data, a histological and immunohistochemical study of myocardial tissue was carried out with anti-

CD3, CD68, CD16, HLA-DR, MHC1, C1q, enterovirus VP1, SARS-CoV-2 spike protein, ACE2, Ang1, von Willebrand factor, VEGF antibodies, as well as a PCR of myocardial tissue after reverse transcription. Additionally, an immunofluorescent study of myocardial tissue was performed using antibody cocktails to SARS-CoV-2/CD16 spike protein, SARS-CoV-2/CD68 spike protein, CD80/CD163. Statistical processing was performed using the NumPy, SciPy, Pandas and Matplotlib libraries in the Python programming language.

Results. Among patients in group I, 65% had morphologically verified lymphocytic myocarditis (subgroup 1, n=29). Other 35% of patients had no signs of myocardial inflammation (subgroup 2, n=9). The comparison group (group II) included 33 patients with myocarditis (80%) and 8 patients (20%) without it. There was a pronounced

expression of CD68⁺ macrophages in the myocardial tissue in patients with post-COVID-19 syndrome in comparison with group II, both with morphological criteria for myocarditis ($p=0,014$) and without it ($p=0,007$), mainly due to M2 macrophages. More pronounced expression of CD68⁺ macrophages was observed when EMB was performed at earlier stages. If SARS-CoV-2 spike protein was detected in group I on the endothelium and inflammatory infiltrate by the immunohistochemistry, PCR of myocardial tissue for SARS-CoV-2 ($n=5$) was performed, which did not reveal SARS-CoV-2 particles in any of the analyzed samples.

Conclusion. Cardiac symptoms of post-COVID-19 syndrome are caused by myocardial remodeling, including in patients without morphologically verified myocarditis. The direct involvement of SARS-CoV-2 in the development of myocarditis in the post-acute period of COVID-19 has not been proven.

Keywords: post-COVID-19 syndrome, myocarditis, endomyocardial biopsy, immunohistochemistry.

Relationships and Activities: none.

¹Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg; ²D.I. Mendeleev All-Russian Institute for Metrology, St. Petersburg, Russia.

Mairina S.V.* ORCID: 0000-0002-0015-8620, Makarov I.A. ORCID: 0000-0001-6175-8403, Mitrofanova L.B. ORCID: 0000-0003-0735-7822, Vonsky M.S. ORCID: 0000-0003-4061-7411, Runov A.L. ORCID: 0000-0001-9496-4414, Papko K.A. ORCID: 0000-0003-1977-4295, Moiseeva O.M. ORCID: 0000-0002-7817-3847.

*Corresponding author: sonya.spbgmu16@gmail.com

Received: 25.08.2023 **Revision Received:** 28.09.2023 **Accepted:** 17.10.2023

For citation: Mairina S.V., Makarov I.A., Mitrofanova L.B., Vonsky M.S., Runov A.L., Papko K.A., Moiseeva O.M. Clinical and morphological myocardial changes in patients with post-COVID-19 syndrome. *Russian Journal of Cardiology*. 2023;28(11):5582. doi:10.15829/1560-4071-2023-5582. EDN BMHJRP

Ключевые моменты

- Не подтверждено развитие коронавирус-ассоциированного миокардита ни у одного пациента в постостром периоде коронавирусной инфекции. Кардиальные симптомы постковидного синдрома могут быть следствием ремоделирования миокарда.
- При иммуногистохимическом исследовании экспрессия spike protein SARS-CoV-2 отмечена на клетках воспалительного инфильтрата в ткани миокарда и на эндотелии единичных сосудов, но не подтверждена с помощью полимеразной цепной реакции.
- По данным эндомикардиальной биопсии морфологические проявления постковидного синдрома связаны с увеличением количества CD68⁺-макрофагов в миокарде. Увеличение M2-макрофагов может указывать на репарацию миокарда после повреждения ткани в остром периоде коронавирусной инфекции.

Key messages

- The development of COVID-19-associated myocarditis has not been confirmed in any patient in the post-acute period. Cardiac symptoms of post-COVID-19 syndrome may be a consequence of myocardial remodeling.
- Immunohistochemical study revealed the SARS-CoV-2 spike protein expression on the inflammatory infiltrate cells in the myocardium and endothelium of single vessels, but was not confirmed using PCR.
- According to endomyocardial biopsy, the morphological manifestations of post-COVID-19 syndrome are associated with an increase in the number of CD68⁺ macrophages in the myocardium. An increase in M2 macrophages may indicate myocardial repair after tissue damage during the acute period of coronavirus infection.

По мере того, как мы продолжаем узнавать о последствиях пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19), публикуется все больше сообщений о долгосрочных проявлениях COVID-19. В зарубежной литературе применяется термин "long COVID" ("постковидный синдром"), объединяющий признаки и симптомы, которые сохраняются >4 нед., развиваются во время или после COVID-19 и которые нельзя объяснить альтернативным диагнозом [1].

Ретроспективное когортное исследование почти 275 тыс. выживших после COVID-19 показало, что в течение 6-мес. периода в 57% случаев выявлен постковидный синдром с наиболее распространен-

ными симптомами, такими как одышка, усталость, боль в груди, головная боль, тревога и депрессия [2].

Другое проспективное когортное исследование с участием >150 тыс. человек показывает, что после первых 30 дней после заражения COVID-19 люди подвержены повышенному риску возникновения сердечно-сосудистых заболеваний в сравнении с аналогичной популяцией по типу "случай-контроль" [3].

Цель данного исследования — охарактеризовать клинические проявления и морфологические изменения в миокарде у пациентов с сердечно-сосудистыми осложнениями постковидного синдрома.

Несмотря на значительный объем опубликованных данных о характеристиках и распространенности этого синдрома, его патофизиологии и исходов для пациента, известно по-прежнему недостаточно.

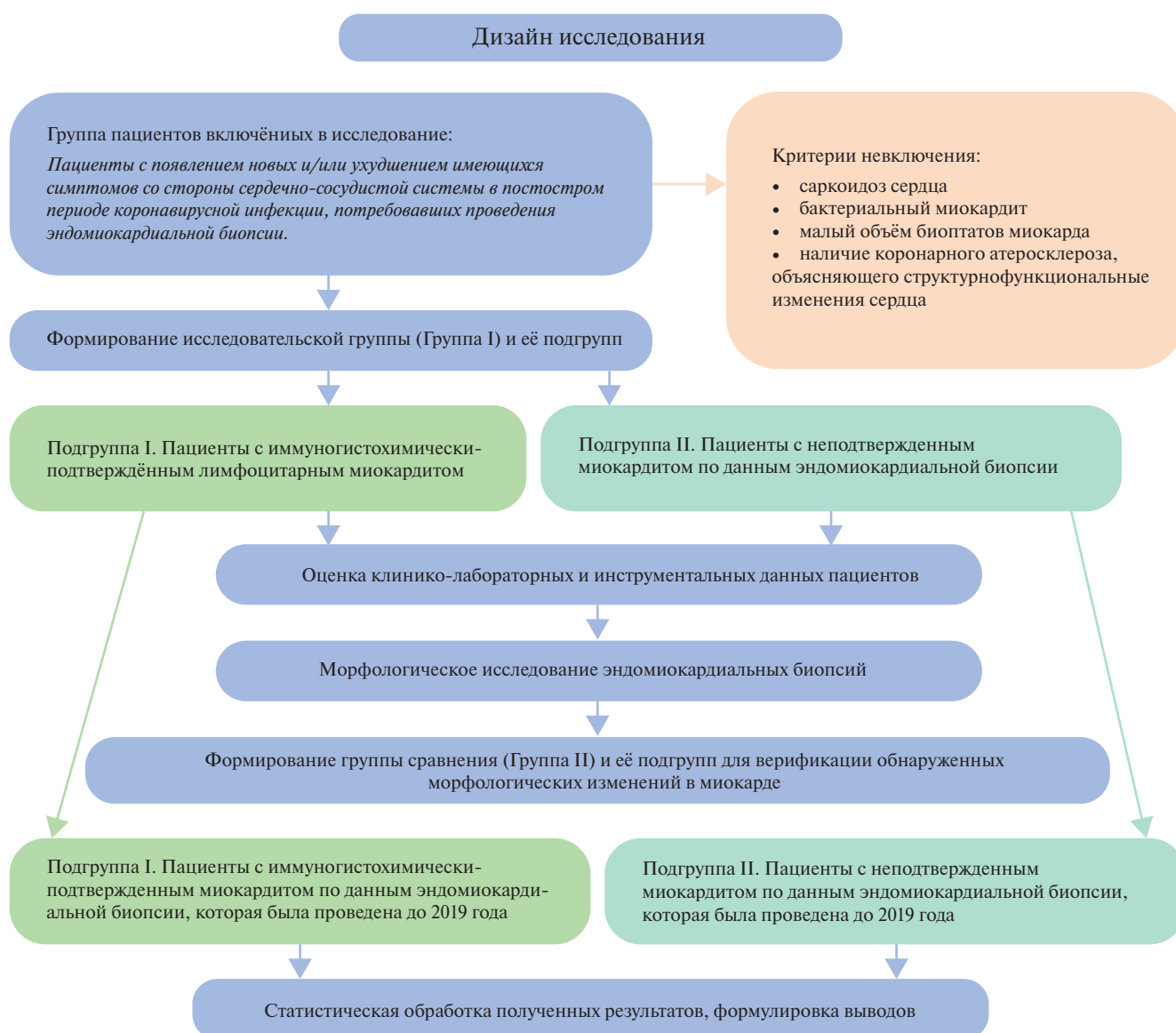


Рис. 1. Дизайн исследования.

В частности, отсутствуют морфологические данные, подтверждающие структурные изменения, характерные для этого синдрома. В нашей работе мы попытались заполнить этот пробел, чтобы предоставить новую информацию для улучшения диагностики и лечения пациентов с постковидным синдромом.

Материал и методы

В анализ проспективной базы данных ФГБУ "НМИЦ им. В. А. Алмазова" Минздрава России за период с 2020 по 2023гг включены 38 пациентов (I группа). Поводом госпитализации в НМИЦ было появление новых и/или ухудшения имеющихся симптомов со стороны сердечно-сосудистой системы у пациентов в постостром периоде COVID-19. Согласно клиническим и диагностическим крите-

риям миокардита выполнялась эндомикардиальная биопсия (ЭМБ) [4].

Клинические проявления включали в себя: боли в грудной клетке неясной этиологии, недавно возникшую и/или прогрессирующую хроническую сердечную недостаточность (ХСН), нарушения ритма, синкопальные состояния, причины которых не установлены. Диагностические критерии включали отрицательную динамику по электрокардиографическим данным, повышение маркеров повреждения миокарда, структурные или функциональные изменения по данным визуализирующих методов: эхокардиографии и магнитно-резонансной томографии (МРТ) сердца с применением критериев Lake Louise [4]. В ряде клинических случаев по показаниям выполнялась коронарография.

Больные из I группы были разделены на 2 подгруппы: 1 подгруппа (n=29) пациенты с морфологически документированным миокардитом и 2 подгруппа (n=9) пациенты без признаков воспалительных изменений в миокарде. Окончательный диагноз подтверждался согласно критериям Европейского общества кардиологов и с учетом наличия воспалительных клеток ≥ 14 клеток/мм², из которых CD3⁺ Т-лимфоцитов ≥ 7 клеток/мм² [4].

Для морфологического сравнения сформирована II группа (n=41) из ЭМБ, проведенных до 2019г. Эта группа также разделена на соответствующие подгруппы: включающие 33 и 8 пациентов с и без морфологически документированного лимфоцитарного миокардита, соответственно.

Критериями невключения для обеих групп были наличие саркоидоза сердца, бактериального или эозинофильного миокардита по данным ЭМБ, малый объем биоптатов миокарда, не позволивший провести дополнительные морфологические исследования, а также наличие коронарного атеросклероза, объясняющего структурно-функциональные изменения сердца. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

В соответствии с законодательством Российской Федерации и локальными актами Центров проведение ретроспективного когортного исследования не требует разрешения локального этического комитета. Исследование отражает повседневную клиническую практику в рамках существующих рекомендаций по ведению пациентов с миокардитами [5].

Всем пациентам из I группы при поступлении в кардиологическое отделение с представлением о предполагаемом миокардите после перенесенной COVID-19 перед ЭМБ выполнялись стандартная эхокардиография, МРТ сердца с контрастным усилением, суточное мониторирование электрокардиограммы для выявления нарушений ритма и проводимости, а также оценивалось наличие сопутствующей патологии, которая могла бы объяснить возникновение или утяжеление клинических проявлений.

Ретроспективно по данным предоставленной медицинской документации на догоспитальном этапе оценивалась тяжесть ранее перенесенной острой COVID-19 по данным мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) органов грудной клетки в остром периоде инфекционного процесса, а также время от перенесенной инфекции до взятия ЭМБ, связь симптомов сердечно-сосудистой патологии с COVID-19, появление или прогрессирование течения ХСН после острой COVID-19.

При анализе ЭМБ проводилось традиционное гистологическое исследование миокарда с окраской гематоксилином и эозином и иммуногистохимическое исследование ткани миокарда с антителами к кластерам дифференцировки лейкоцитов (CD3,

CD68), главному комплексу гистосовместимости II (HLA-DR) и I (MHC1) классов, факторы системы комплемента C1q, белку VP1 энтеровируса. Для 27 пациентов (25 пациентов с морфологически документированным миокардитом и 2 без миокардита) выполнено иммуногистохимическое исследование с антителом к spike SARS-CoV-2, для 27 пациентов (21 пациент с миокардитом и 6 без миокардита) — с антителами к ангиопоэтину 1 (Ang1), фактору Виллебранда, фактору роста эндотелия сосудов (VEGF), для 6 пациентов (4 пациента с миокардитом и 2 без миокардита) — с антителами к ангиотензин-превращающему ферменту 2 (АПФ2), CD16.

Морфометрический анализ во всех группах включал подсчет среднего количества клеток воспалительного инфильтрата на 1 мм² и оценку экспрессии spike protein SARS-CoV-2, HLA-DR, MHC1, C1q, Ang1, фактору Виллебранда и VEGF в баллах (1 — экспрессия на единичных клетках и сосудах до 25%, 2 — экспрессия на 26-50%, 3 — экспрессия на 51-75%, 4 — экспрессия более чем на 75% исследуемых структур). Морфометрический анализ проведен на отсканированных гистологических препаратах с использованием программы Aperio ImageScope v12.3.3.

В случае обнаружения экспрессии spike SARS-CoV-2 с суммой баллов >3 (балл экспрессии на эндотелии + балл экспрессии на воспалительном инфильтрате) проводилось дополнительное иммуногистохимическое исследование с антителами к АПФ2, CD16 и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в ткани миокарда после обратной транскрипции в соответствии с рекомендациями CDC центра Китая для гена *N* и клиники Charité для гена *E* (n=5, 3 пациента с лимфоцитарным миокардитом и 2 пациента без миокардита) [6].

Статистическую обработку результатов нашего исследования мы провели с использованием библиотек NumPy, SciPy, Pandas и Matplotlib на языке программирования Python. Для оценки нормальности распределения использовали тест Шапиро-Уилка. Показатели с нормальным распределением представлены средними значениями с доверительным интервалом, а показатели с отличным от нормального распределением в виде медианы и значений 25-го и 75-го процентилей. При сравнении показателей между группами мы использовали t-критерий Стьюдента, а в случае распределений, отличных от нормальных, использовали пермутационный тест и непараметрический U-критерий Манна-Уитни параллельно. Для выявления корреляционных связей мы использовали метод корреляции Спирмена, т.к. распределения всех исследуемых выборок были отличными от нормального. Различия считали статистически значимыми, если р-значение составляло меньше 0,05. Для сравнения частоты данных в группах мы применяли точный критерий Фишера.

Таблица 1

Клинико-инструментальные и лабораторные данные I группы при поступлении в кардиологический стационар

	Пациенты с миокардитом (1 подгруппа), n=29	Пациенты без миокардита (2 подгруппа), n=9	Уровень значимости (p)
Возраст, лет	42,7 (33,5; 51,9)	49,0 (40,7; 57,3)	0,14
Пол, м:ж	20:9	9:0	0,08
Клинические симптомы			
Болевой синдром, n (%)	10 (34)	4 (44)	0,68
Симптомы сердечной недостаточности, n (%)	28 (97)	9 (100)	1
Кардиогенный шок, n (%)	8 (26)	3 (33)	0,64
Нарушения ритма и проводимости			
БЛПНГ, n (%)	5 (17)	1 (11)	0,69
Фибрилляция/трепетание предсердий, n (%)	7 (24)	1 (11)	0,38
Желудочковая экстрасистолия, n (%)	4 (14)	0 (0)	0,57
Неустойчивая желудочковая тахикардия, n (%)	4 (14)	3 (33)	0,35
Параметры эхокардиографии			
ФВ ЛЖ, %	32,1 (19,5; 44,7)	25,8 (13,4; 38,2)	0,18
ФВ >50%, n (%)	4 (14)	1 (11)	0,04
ФВ ≤49%, n (%)	25 (86)	8 (89)	0,51
КДО ЛЖ, мл	202,3 (142,3; 262,3)	253,2 (181,8; 324,6)	0,12
КСО ЛЖ, мл	131,9 (76,9; 186,9)	193,6 (119,0; 268,2)	>0,05
TAPSE, мм	17,9 (14,8; 21,0)	14,0 (12,3; 15,7)	<0,01
Параметры МРТ сердца			
ФВ ЛЖ, %	n=21 31,0 (15,7; 46,3)	n=6 25,5 (16,6; 34,4)	0,49
Отек миокарда по T2ВИ, n (%)	3 (14)	0 (0)	0,54
LGE, n (%)	21 (100)	6 (100)	0,39
Лабораторные данные			
NT-proBNP, пг/мл	2776 (752; 5560)	2259 (1531; 7309)	0,45
Повышение тропонина, n (%)	3 (10)	0 (0)	0,74

Сокращения: БЛПНГ — блокада левой ножки пучка Гиса, КДО — конечный-диастолический объем, КСО — конечный-систолический объем, ЛЖ — левый желудочек, МРТ — магнитно-резонансная томография, ФВ — фракция выброса, LGE — позднее контрастное усиление, NT-proBNP — N-концевой промозговой натрийуретический пептид, T2ВИ — T2-взвешенное изображение, TAPSE — систолическая экскурсия плоскости кольца трикуспидального клапана.

Результаты

Клинико-инструментальные и лабораторные данные пациентов, перенесших COVID-19 (группа I), представлены в таблице 1.

Лимфоцитарный миокардит верифицирован у 29 больных, ранее перенесших COVID-19 (1 подгруппа). При анализе медицинских данных в этой подгруппе острая фаза COVID-19 у большинства пациентов имела лёгкое или средне-тяжелое течение. Девяти пациентам (31%) МСКТ органов грудной клетки в остром периоде не выполнялось, у остальных пациентов медианный процент поражения лёгочной ткани составил 12,5% (0; 31,5). Только у 2 (7%) пациентов — процент поражения паренхимы легких по данным МСКТ был более 50% (56% и 60%) в остром периоде COVID-19.

Сердечно-сосудистые осложнения у 14 (48%) пациентов с доказанным миокардитом развились в среднем через 1,5 (0,5; 4) мес. после перенесенного инфекционного заболевания. У 9 пациентов (31%) кардиальные симптомы присутствовали и до перенесенной COVID-19 с последующим их прогрессирова-

нием. Функциональный класс ХСН (NYHA) до развития инфекционного процесса составил 2 (2; 3), после — 3 (3; 4). У 6 (21%) пациентов с диагностированной до COVID-19 ХСН ухудшения симптомов заболевания не зарегистрировано.

По данным эхокардиографического исследования при поступлении в стационар у 4 (14%) пациентов выявлена сохранённая фракция выброса левого желудочка, у 25 (86%) исследуемых фракция выброса была снижена с медианным значением 26,5% (23,0; 30,0). В большинстве случаев наблюдалась дилатация левого желудочка (83%). Значимого снижения сократительной способности правого желудочка по данным амплитуды движения фиброзного кольца трикуспидального клапана (TAPSE) не выявлено.

МРТ сердца выполнена 21 пациенту (72%), однако убедительные признаки отека по данным T2-взвешенного изображения выявлены только у 3 больных. На отсроченных постконтрастных изображениях у всех пациентов определялись участки отсроченного контрастирования с неишемическим паттерном.

Таблица 2

Иммуногистохимический профиль миокарда пациентов I группы в постостром периоде COVID-19

	Пациенты с миокардитом (1 подгруппа), n=29	Пациенты без миокардита (2 подгруппа), n=9	Уровень значимости (p), U-критерий	Уровень значимости (p), пермутационный тест
CD3 ⁺ -клетки/мм ²	19,0 (13,0; 27,0)	4,0 (3,0; 5,0)	<0,01	<0,01
CD68 ⁺ -клетки/мм ²	11,5 (8,75; 14,5)	8,0 (5,0; 14,0)	<0,01	<0,01
HLA-DR (в баллах)	3,0 (2,75; 4,0)	1,0 (0,0; 3,0)	0,03	0,01
MHC1 (в баллах)	4,0 (4,0; 4,0)	4,0 (4,0; 4,0)	<0,01	<0,01
C1q (в баллах)	3,0 (2,0; 4,0)	1,0 (1,0; 2,0)	<0,01	<0,01
VP1-EntV (в баллах)	Кардиомиоциты: 2,0 (1,0; 2,0) Эндотелий: 1,0 (1,0; 2,0)	Кардиомиоциты: 0,0 (0,0; 0,0) Эндотелий: 0,0 (0,0; 0,0)	<0,01 <0,01	<0,01 <0,01
VWF в эндотелии (в баллах)	1,0 (1,0; 2,0)	1,0 (1,0; 1,75)	0,67	0,72
Ang1 (в баллах)	Кардиомиоциты: 3,0 (2,0; 4,0) Эндотелий: 3,0 (2,0; 4,0)	Кардиомиоциты: 0,0 (0,0; 0,75) Эндотелий: 4,0 (4,0; 4,0)	<0,01 0,13	<0,01 0,25
VEGF в эндотелии (в баллах)	3,0 (3,0; 4,0)	2,5 (1,25; 3,75)	0,22	0,07
spike protein SARS-CoV-2 (в баллах)	Воспалительный инфильтрат: 1,0 (0,0; 1,25), n=12 Эндотелий: 0,0 (0,0; 1,0), n=8	Воспалительный инфильтрат: 2,0 (1,0; 2,0), n=5 Эндотелий: 1,0 (0,0; 1,0), n=4	0,13 0,42	0,14 0,53

Сокращения: Ang1 — антитело к ангиопоэтину 1, C1q — фактор системы комплемента C1q, HLA-DR — антиген главного комплекса гистосовместимости II класса, MHC1 — антиген главного комплекса гистосовместимости I класса, VEGF — фактор роста эндотелия сосудов.

По лабораторным данным медианное значение N-концевого промозгового натрийуретического пептида составило 2776 (752; 5560) пг/мл, повышение уровня тропонина зарегистрировано лишь у 3 пациентов.

По показаниям коронарография выполнена 22 пациентам (76%), которая не выявила патологических изменений в коронарных артериях.

Все пациенты получали стандартную терапию сердечной недостаточности. В случаях с подтвержденным активным миокардитом без эффекта от стандартной терапии 10 (34%) пациентам назначалась иммуносупрессивная терапия, в виде монотерапии глюкокортикостероидами (преднизолон 30-50 мг/сут. в течение месяца, с последующим снижением) либо в сочетании с цитостатическими препаратами (метотрексат, микофенолата мофетил). Несмотря на лечение, у 2 пациентов зарегистрирован летальный исход, одному успешно выполнена трансплантация сердца.

ЭМБ в подгруппе больных с лимфоцитарным миокардитом выполнена после 3 нед. — 17 мес. от последнего положительного мазка ПЦР из носоглотки на SARS-CoV-2 с медианным значением в 4 (2; 8) мес.

Пять (17%) пациентов из этой подгруппы ранее вакцинированы от SARS-CoV-2, из них у троих диагностирован пограничный лимфоцитарный миокардит (двое вакциной Ковивак, 1 вакциной Спутник V), а у двоих — активный лимфоцитарный миокардит (вакцинация Спутник V). Тем не менее причинно-следственной связи между вакцинацией и развитием миокардита у данных пациентов не установлено. Однако временной промежуток от вакцинации до

появления симптомов сердечной патологии, потребовавших проведения ЭМБ, составил от 1 до 4,5 мес., со средним значением в 2,7 мес., что не исключает возможности развития поствакцинального миокардита. В то же время во всех этих случаях мы выявили экспрессию белка VP1 энтеровируса в кардиомиоцитах, что существенно снижает вероятность этиологической роли вакцинации от SARS-CoV-2 в развитии миокардитов у этих пациентов.

Иммуногистохимический профиль миокарда пациентов в постостром периоде COVID-19 представлен в таблице 2. В первой подгруппе во всех биоптатах миокарда гистологически обнаружен хронический пограничный (n=10) и хронический активный (n=19) лимфоцитарный миокардит, подтвержденный иммуногистохимическим исследованием.

Антигены VP1 энтеровируса были обнаружены на эндотелии и в кардиомиоцитах у 27 (93%) пациентов, медианный уровень экспрессии на эндотелии оценивался в 1 балл, в кардиомиоцитах — в 2 балла. Экспрессия spike protein SARS-CoV-2 обнаружена на эндотелии в 8 из 20 исследуемых случаев (40%) с медианной оценкой в 1 балл, а также в воспалительном инфильтрате в 12 из 20 исследуемых случаев (60%) с медианной оценкой в 1 балл.

Из анамнеза 9 пациентов без морфологически документированного миокардита (2 подгруппа) известно, что острая фаза COVID-19 у большинства пациентов также имела лёгкое или средне-тяжелое течение. У 2 (22%) пациентов отсутствовали данные о МСКТ органов грудной клетки в остром периоде инфекции, у остальных пациентов медианный процент пораже-

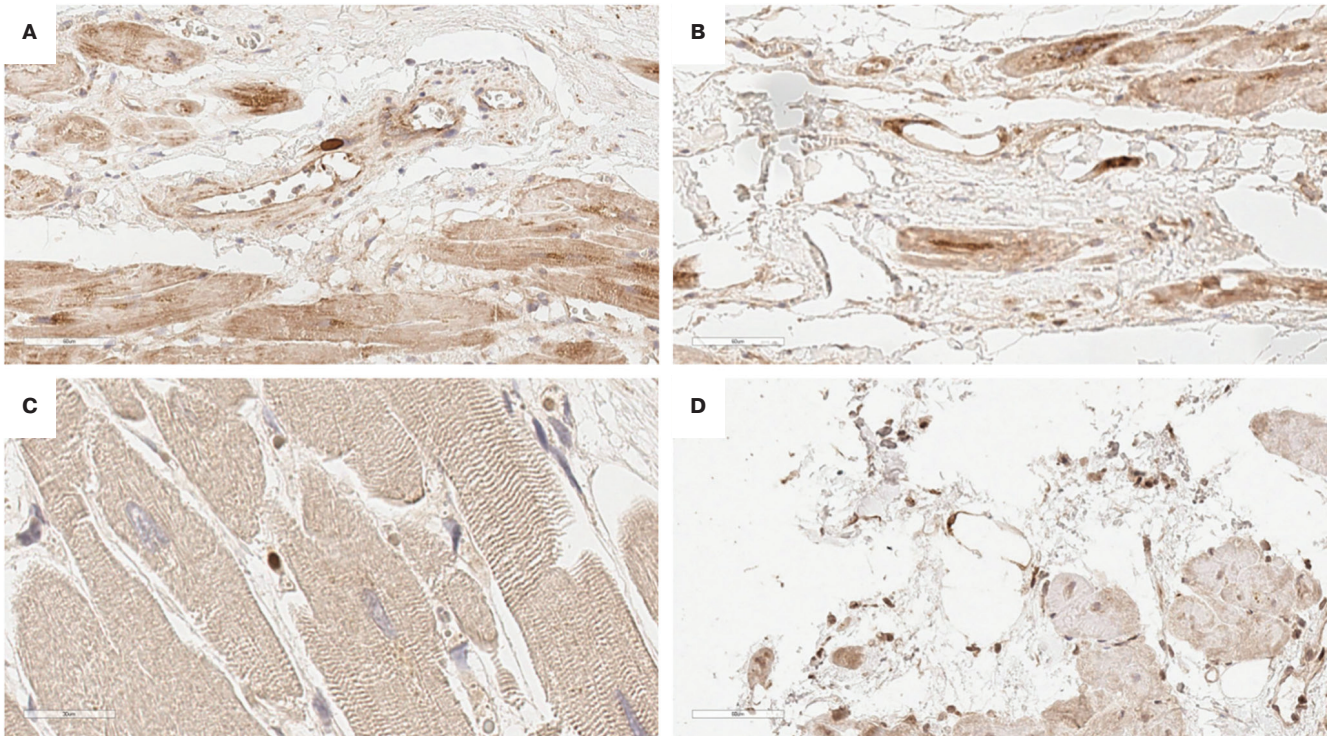


Рис. 2. Экспрессия АПФ2 и spike protein SARS-CoV-2 в эндомикардиальных биоптатах.

Примечание: **А, В** — экспрессия АПФ2 на эндотелии и периваскулярных клетках, увеличение 400. Рисунки **С, D** — экспрессия spike protein SARS-CoV-2 на эндотелии и периваскулярных клетках, **С** — увеличение 800, **D** — увеличение 400.

ния лёгочной ткани составил 25% (10; 29). Только у 1 (11%) пациента процент поражения лёгочной паренхимы по данным МСКТ составил — 60%.

Среди пациентов без миокардита ухудшение течения предсуществующей ХСН после перенесённой COVID-19 зарегистрировано лишь у 1 (11%) пациента, а дебют сердечной недостаточности после COVID-19 диагностирован у 7 (77%) пациентов. Только у 1 пациента не произошло ухудшение течения ХСН после перенесённой COVID-19.

Один (11%) пациент имел сохранную фракцию выброса левого желудочка, у 8 (89%) пациентов сократительная способность была снижена с медианным значением 25% (23; 30). В данной подгруппе отмечалась более выраженная дилатация левого желудочка, также зарегистрировано статистически значимое снижение систолической функции правого желудочка.

При поступлении в кардиологический стационар пациентам 2 подгруппы МРТ сердца выполнена 6 (67%) пациентам, признаков отека миокарда не зарегистрировано, у всех пациентов выявлено отсроченное контрастирование с неишемическим паттерном. В рамках диагностической коронарографии патологических изменений коронарных артерий не выявлено. Повышение уровня маркеров повреждения миокарда не обнаружено. Летальный исход зарегистрирован только у 1 пациента.

В этой подгруппе ЭМБ выполнялась в интервале от 3 нед. до 20 мес. от последнего положительного ПЦР из носоглотки на SARS-CoV-2 с медианным значением 5 (2; 9) мес.

Пять (55%) пациентов из этой подгруппы ранее прошли вакцинацию от SARS-CoV-2: из них 1 пациент вакцинировался Ковивак, а 4 — Спутник V. Время от вакцинации до взятия ЭМБ составляло от 2 до 8 мес. со средним значением в 4,6 мес.

У всех пациентов этой подгруппы по данным ЭМБ лимфоцитарный миокардит морфологически не подтверждён. Антигены VP1 энтеровируса были обнаружены на эндотелии (1 балл) и в кардиомиоцитах (2 балла) только у 1 (11%) пациента. Экспрессия spike protein SARS-CoV-2 была обнаружена на эндотелии в 5 из 7 исследуемых случаев (71%) с медианной оценкой в 1 балл; на воспалительном инфильтрате — в 4 из 7 исследуемых случаев (57%) с медианной оценкой в 2 балла.

В случаях обнаружения экспрессии spike protein SARS-CoV-2 на эндотелии и на воспалительном инфильтрате с суммой баллов >3 (n=5) у пациентов с и без миокардита выполнялась ПЦР ткани миокарда из парафиновых блоков. Во всех случаях PHK SARS-CoV-2 не обнаружено. Также для этих пациентов мы выполнили иммунофлюоресцентное исследование с коктейлем антител к spike protein SARS-CoV-2/CD68 и SARS-CoV-2/CD16. Определена колокализация экс-

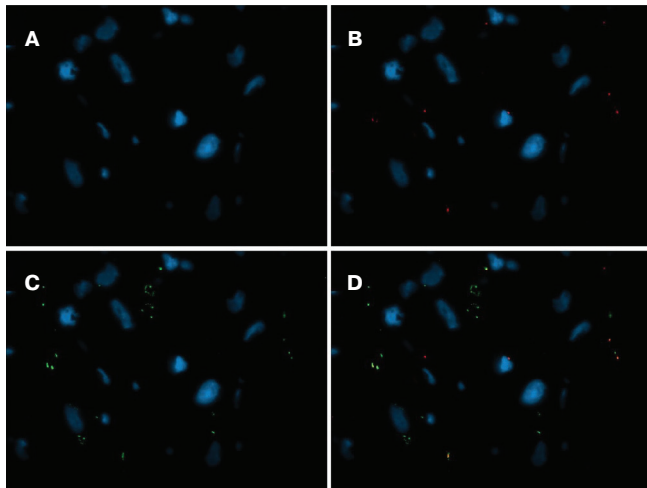


Рис. 3. Репрезентативное изображение иммунофлуоресценции ЭМБ с коктейлями антител CD163/CD80, увеличение 630.

Примечание: **А** — DAPI, **В** — красная флуоресценция CD80⁺-макрофагов, **С** — зелёная флуоресценция CD163⁺-макрофагов, **Д** — красная и зелёная флуоресценция на различных клетках с преобладанием CD163⁺-макрофагов. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

прессии spike protein SARS-CoV-2 и CD16 на мембране отдельных клеток инфильтрата. Экспрессии spike protein SARS-CoV-2 в кардиомиоцитах не обнаружено.

Мы провели иммуногистохимическое исследование с АПФ2, экспрессия которого обнаруживалась лишь на единичных сосудах биоптата и не во всех случаях. Интересно, что в этих же случаях мы также определяли экспрессию spike protein SARS-CoV-2 на эндотелии в ряде интрамиокардиальных сосудов (рис. 2).

Для одного случая из подгруппы с миокардитом и одного пациента из подгруппы без миокардита с экспрессией spike protein SARS-CoV-2 по 3 балла суммарно произведена иммунофлуоресценция с коктейлем антител CD163/CD80 с целью определения соотношения M1/M2 макрофагов в ткани миокарда. По результатам исследования в обоих случаях выявлено преобладание M2 макрофагов над M1 в ткани миокарда (рис. 3).

По результатам статической обработки данных установлено, экспрессия таких маркеров, как VWF, spike protein SARS-CoV-2, Ang1, не зависела от наличия или отсутствия миокардита. Также не обнаружено статистически значимых различий между наличием или отсутствием экспрессии spike protein SARS-CoV-2 и изменениями в экспрессии других маркеров. Процент поражения лёгочной ткани (тяжесть течения острой COVID-19) не коррелировал с ухудшением течения ХСН в постостром периоде COVID-19.

Ухудшение течения ХСН чаще наблюдалось у пациентов с фибрилляцией предсердий и желудочковой тахикардией по сравнению с остальными нарушениями ритма и проводимости ($p < 0,05$).

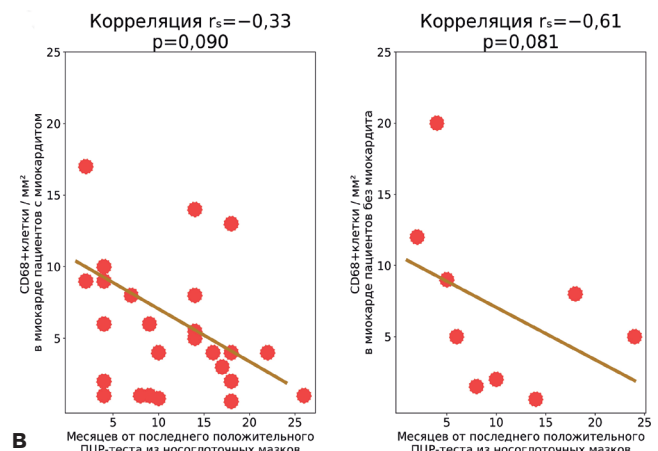
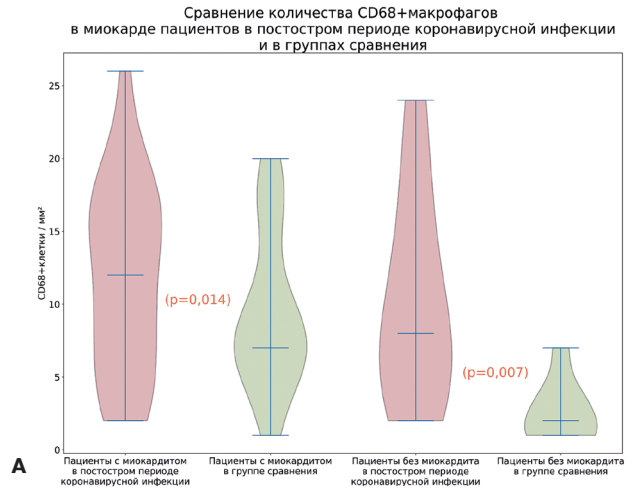


Рис. 4. Сравнительный анализ количества CD68⁺-макрофагов в контрольных подгруппах и подгруппах сравнения (**А**) и корреляционная связь между временем от последней положительной ПЦР из назофарингеальных мазков и количеством макрофагов в строме миокарда (**В**).

Сокращение: ПЦР — полимеразная цепная реакция.

При сравнении I и II групп отмечено увеличение количества CD68⁺-макрофагов на 1 мм² миокарда у пациентов в постостром периоде COVID-19 по сравнению с пациентами, не переносившими COVID-19 ($p = 0,014$ для пациентов с миокардитом, $p = 0,007$ для пациентов без миокардита). Увеличение количества CD68⁺-макрофагов чаще наблюдалось у пациентов с меньшим промежутком времени от последней положительной ПЦР на SARS-CoV-2 до взятия ЭМБ. Связи между выявлением экспрессии SARS-CoV-2 на эндотелии и временем от последней положительной ПЦР не установлено (рис. 4).

Обсуждение

Миокардит рассматривается как одно из проявлений постковидного синдрома [7]. Полученные данные о возникновении миокардита на фоне инфекции SARS-CoV-2 и/или после вакцинации с использованием фрагментов PHK SARS-CoV-2 до сих пор

остаются недостаточными. Информация о развитии миокардита при COVID-19, главным образом, основывается на результатах МРТ сердца, эхокардиографии и повышении уровня тропонина I в остром периоде COVID-19. При этом оценка ЭМБ у пациентов с подозрением на миокардит произведена только в отдельных случаях, в которых не всегда исключалась этиологическая роль других вирусов, и не была доказана прямая этиологическая роль COVID-19 [8, 9]. Ассоциация развития миокардита с острой фазой COVID-19 была в большинстве исследований основным доказательством этиологии SARS-CoV-2.

Литературное описание миокардита, ассоциированного с SARS-CoV-2, также соответствует "типичному" миокардиту, охарактеризованному еще до пандемии по демографическим, клиническим и инструментальным данным [1, 10]. За анализируемый период не зарегистрировано ни одного патогномичного проявления коронавирусного миокардита.

Тяжесть острого периода COVID-19 не влияла на наличие или отсутствие миокардиального воспаления как по литературным данным, так и по данным, полученным в нашей работе [11], что также не поддерживает гипотезу о влиянии инфекционного процесса на развитие миокардита в дальнейшем.

Типичная клиническая ситуация, при которой перенесенная вирусная инфекция через некоторое время запускает симптомы ХСН, наиболее часто встречалась в нашей работе. Однако наличие исходных патологических изменений в миокарде до развития инфекционного процесса ни в одном из исследований не оценивалось. Возможно, инфекция запускает фенотипическое проявление уже ранее существовавших бессимптомных/малосимптомных сердечно-сосудистых заболеваний, как мы видим на примере пациентов, которые описывали симптомы ХСН и до инфекционного процесса, с последующим их усугублением [12].

В нашей работе показано, что клинические и инструментальные данные у пациентов из двух подгрупп (с и без миокардита) не имели значимых различий, кроме более сниженной сократительной способности правого желудочка. В подгруппе пациентов без миокардита чаще встречался болевой синдром и потребность в назначении инотропных препаратов, а также более выраженная дилатация левых камер. Клинические проявления у этой подгруппы пациентов можно объяснить множеством факторов риска развития постковидного синдрома (гипоксия, повреждение легочных микрососудов и т.д.), помимо прямого повреждающего воздействия на миокард. В этом и состоит отличие механизма структурных изменений в миокарде по сравнению с пациентами с документированным миокардитом [13, 14].

В исследовании, проведенном Fox SE, et al., показано, что вирус SARS-CoV-2 приводит к повреждению

эндотелия опосредовано. Вызванная инфекционным агентом воспалительная реакция характеризуется нарушением свертываемости крови на уровне артериол, венул и капилляров, что провоцирует тромбообразование и как следствие ишемию и реперфузионное повреждение вследствие микроциркуляторных нарушений. Кроме того, повреждение эндотелия может привлекать моноциты, активирующие путь комплемента и вызывающие апоптотическое повреждение кардиомиоцитов, инициированное макрофагами [15]. В предыдущих исследованиях мы показали, что основными морфологическими изменениями в остром периоде COVID-19 является эндотелиит и его осложнения в виде тромбозов и кровоизлияний [16, 17]. А в ряде исследований наряду с ангиопатией острого периода показано значимое увеличение CD68⁺-макрофагов в ткани миокарда в остром периоде COVID-19 [15, 18].

В своём исследовании мы также наблюдали увеличение количества CD68⁺-макрофагов при постковидном синдроме, которые условно подразделились на разные подтипы, включая макрофаги M1 и макрофаги M2. Макрофаги M1 считаются провоспалительными, а макрофаги M2 — противовоспалительными. Дифференцировка макрофагов определяется внешними стимулами, так, например, липополисахариды бактерий могут вызывать дифференцировку макрофагов до фенотипа M1, в то время как интерлейкин 4 может вызывать дифференцировку макрофагов до M2 [19].

В неповреждённом миокарде мы должны были увидеть преобладание M2 макрофагов над M1 макрофагами. Однако в нашем исследовании зафиксировано увеличение количества CD68⁺-макрофагов преимущественно за счёт CD163⁺-макрофагов, появление которых связано с активацией врожденного иммунитета на патоген-ассоциированные молекулярные паттерны. В двух случаях иммунофлуоресцентной микроскопии мы также явно видели смещение соотношения M1/M2 макрофагов в пользу противовоспалительных M2 макрофагов. Данные изменения мы связываем с репарацией последствий цитокинового дисбаланса и ангиопатии в остром периоде COVID-19. Эту гипотезу также подтверждает факт о том, что у ряда пациентов с течением времени кардиальные проявления постковидного синдрома исчезают спонтанно. Также важно отметить, что в нашем исследовании обнаружена положительная корреляционная связь между временем от последней положительной ПЦР из назофарингеальных мазков пациента и количеством CD68⁺-макрофагов в ткани миокарда. Это может косвенно указывать на то, что с течением времени от острой фазы COVID-19 происходит восстановление ткани миокарда с полным морфологическим выздоровлением пациентов [20].

Мы предполагаем, что основные клинические симптомы со стороны сердечно-сосудистой системы в постостром периоде COVID-19 также обусловлены местным цитокиновым дисбалансом и последствиями микроциркуляторных нарушений. В частности, болевой синдром можно объяснить воздействием цитокинов на ноцицепторы миокарда, нарушения ритма — местным цитокиновым дисбалансом с избыточной локальной активацией кардиомиоцитов и с формированием очагов re-entry, тогда как одышку и снижение толерантности к физическим нагрузкам — транзиторной сердечной дисфункцией вследствие эндотелиальной дисфункции и ишемического повреждения миокарда.

Этиологическая роль коронавируса в развитии миокардита в нашем исследовании не была доказана ни в одном из случаев. Количественная ПЦР с обратной транскрипцией не выявила РНК SARS-CoV-2 ни в одном из 5 случаев. Иммуногистохимическая экспрессия spike protein SARS-CoV-2 отмечена лишь на клетках воспалительного инфильтрата в ткани миокарда и на эндотелии единичных сосудов. Сохранение экспрессии spike SARS-CoV-2 и отсутствие выявления РНК вируса с помощью ПЦР позволяет предположить, что мы видим лишь эпитопы вируса на мембранах клеток, в то время как сам вирус элиминирован из ткани в постостром периоде COVID-19. С другой стороны, мы не можем однозначно утверждать, что в ткани миокарда не осталось вирусных частиц в минимальном количестве, которые не удалось детектировать посредством количественной ПЦР.

У большинства пациентов в нашем исследовании существует явная связь между COVID-19 и манифестацией клиники миокардита. Однако только у 5 (17%) пациентов из подгруппы миокардита мы не обнаружили экспрессию VP1 энтеровируса, и только в одном случае выявили слабую экспрессию spike protein SARS-CoV-2 на клетках воспалительного инфильтрата с оценкой в 1 балл. Полученные данные указывают на низкую вероятность развития коронавирус-ассоциированного миокардита у этих пациентов и позволяют предположить, что большинство миокардитов из нашей выборки являлись хроническими и клинически дебютировали только в постостром периоде COVID-19.

Этиологическая роль коронавируса в развитии вирус-негативной воспалительной кардиомиопатии также остаётся неясной. В настоящее время активно изучается роль пироптоза в развитии аутовоспаления и связи этих процессов с патогенезом вирус-негативного миокардита [21]. М1-макрофаги в ткани миокарда могут способствовать синтезу NLRP3-инфламмасом, запуская программируемый некроз кардиомиоцитов. В свою очередь обилие молекулярных паттернов, выделяющихся в окружающую ткань, будет способствовать миграции и дифференцировке моноцитов в М1-макрофаги, что может привести к образованию порочного круга заболевания. Данные механизмы требуют дальнейшего изучения и углубленного понимания патофизиологии этих процессов.

Ограничения исследования. В данном исследовании мы не могли учитывать субклиническое течение острой COVID-19 у пациентов, включенных в группы, и возможность ПЦР-негативного течения COVID-19 во время обследования и проведения процедуры ЭМБ.

Заключение

1. Кардиальные симптомы постковидного синдрома могут быть следствием ремоделирования миокарда.

2. Морфологическими проявлениями постковидного синдрома является увеличение количества CD68⁺-макрофагов в строме миокарда. Увеличение М2-макрофагов указывает, на репарацию миокарда после повреждения ткани в остром периоде COVID-19.

3. Экспрессия spike protein SARS-CoV-2 отмечена на клетках воспалительного инфильтрата в ткани миокарда и на эндотелии единичных сосудов, но не подтверждена с помощью ПЦР.

4. По данным проведенного исследования не подтверждено развитие коронавирус-ассоциированного миокардита ни у одного пациента в постостром периоде COVID-19.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

- Khetpal V, Berkowitz J, Vijayakumar S, et al. Long-term Cardiovascular Manifestations and Complications of COVID-19: Spectrum and Approach to Diagnosis and Management. *R I Med J*. 2013;105(7):16-22.
- Taquet M, Dercon Q, Luciano S, et al. Incidence, co-occurrence, and evolution of long-COVID features: A 6-month retrospective cohort study of 273,618 survivors of COVID-19. *PLoS Med*. 2021;18(9):e1003773. doi:10.1371/journal.pmed.1003773.
- Xie Y, Xu E, Bowe B, et al. Long-term cardiovascular outcomes of COVID-19. *Nat Med*. 2022;28(3):583-90. doi:10.1038/s41591-022-01689-3.
- Caforio AL, Pankuweit S, Arbustini E, et al. European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2013;34(33):2636-48, 2648a-2648d. doi:10.1093/eurheartj/ehd210.
- Arutyunov GP, Paleev FN, Moiseeva OM, et al. 2020 Clinical practice guidelines for Myocarditis in adults. *Russian Journal of Cardiology*. 2021;26(11):4790. (In Russ.) Арутюнов Г. П., Палеев Ф. Н., Моисеева О. М. и др. Миокардиты у взрослых. Клинические рекомендации 2020. *Российский кардиологический журнал*. 2021;26(11):4790. doi:10.15829/1560-4071-2021-4790.
- Tao S, Liu X, Feng J, et al. ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens. *Emerging Mic and Inf*. 2020;9(1):1259-68. doi:10.1080/22221751.2020.1772678.

7. Raman B, Bluemke DA, Lüscher TF, et al. Long COVID: post-acute sequelae of COVID-19 with a cardiovascular focus. *Eur Heart J*. 2022;43(11):1157-72. doi:10.1093/eurheartj/ehac031.
8. Ammirati E, Lupi L, Palazzini M, et al. Prevalence, Characteristics, and Outcomes of COVID-19-Associated Acute Myocarditis. *Circulation*. 2022;145(15):1123-39. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056817.
9. Montgomery J, Ryan M, Engler R, et al. Myocarditis Following Immunization With mRNA COVID-19 Vaccines in Members of the US Military. *JAMA Cardiol*. 2021;6(10):1202-6. doi:10.1001/jamacardio.2021.2833.
10. Lindner D, Fitzek A, Bräuninger H, et al. Association of Cardiac Infection With SARS-CoV-2 in Confirmed COVID-19 Autopsy Cases. *JAMA Cardiol*. 2020;5(11):1281-5. doi:10.1001/jamacardio.2020.3551.
11. Dennis A, Wamil M, Alberts J, et al. COVERSCAN study investigators. Multiorgan impairment in low-risk individuals with post-COVID-19 syndrome: a prospective, community-based study. *BMJ Open*. 2021;11(3):e048391. doi:10.1136/bmjopen-2020-048391.
12. Almamlouk R, Kashour T, Obeidat S, et al. COVID-19-Associated cardiac pathology at the postmortem evaluation: a collaborative systematic review. *Clin Microbiol Infect*. 2022;28(8):1066-75. doi:10.1016/j.cmi.2022.03.021.
13. Kim J, Volodarskiy A, Sultana R, et al. Prognostic Utility of Right Ventricular Remodeling Over Conventional Risk Stratification in Patients With COVID-19. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(17):1965-77. doi:10.1016/j.jacc.2020.08.066.
14. Gluckman TJ, Bhavne NM, Allen LA, et al. 2022 ACC Expert Consensus Decision Pathway on Cardiovascular Sequelae of COVID-19 in Adults: Myocarditis and Other Myocardial Involvement, Post-Acute Sequelae of SARS-CoV-2 Infection, and Return to Play: A Report of the American College of Cardiology Solution Set Oversight Committee. *J Am Coll Cardiol*. 2022;79(17):1717-56. doi:10.1016/j.jacc.2022.02.003.
15. Fox SE, Falgout L, Vander Heide RS. COVID-19 myocarditis: quantitative analysis of the inflammatory infiltrate and a proposed mechanism. *Cardiovasc Pathol*. 2021;54:107361. doi:10.1016/j.carpath.2021.107361.
16. Mitrofanova LB, Makarov IA, Runov AL, et al. Clinical, morphological and molecular biological examination of the myocardium in COVID-19 patients. *Russian Journal of Cardiology*. 2022;27(7):4810. (In Russ.) Митрофанова Л. Б., Макаров И. А., Рунов А. Л. и др. Клинико-морфологическое и молекулярно-биологическое исследование миокарда у пациентов с COVID-19. *Российский кардиологический журнал*. 2022;27(7):4810. doi:10.15829/1560-4071-2022-4810.
17. Mitrofanova LB, Makarov IA, Gorshkov AN, et al. Comparative Study of the Myocardium of Patients from Four COVID-19 Waves. *Diagnostics (Basel)*. 2023;13(9):1645. doi:10.3390/diagnostics13091645.
18. Kawakami R, Sakamoto A, Kawai K, et al. Pathological Evidence for SARS-CoV-2 as a Cause of Myocarditis: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 2021;77(3):314-25. doi:10.1016/j.jacc.2020.11.031.
19. Yunna C, Mengru H, Lei W, et al. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol*. 2020;877:173090. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173090.
20. Esposito S, Principi N, Azzari C, et al. Italian intersociety consensus on management of long covid in children. *Ital J Pediatr*. 2022;48(1):42. doi:10.1186/s13052-022-01233-6.
21. Zeng C, Wang R, Tan H. Role of Pyroptosis in Cardiovascular Diseases and its Therapeutic Implications. *Int J Biol Sci*. 2019;15(7):1345-57. doi:10.7150/ijbs.33568.