

lek. Mateusz Kuffner

# **Obraz morfologiczny jednostki mięśniowo-naczyniowej w przebiegu wirusowej choroby serca wywołanej przez parwowirusa B19**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Małgorzata Frontczak-Baniewicz

Promotor pomocniczy: dr n. med. Magdalena Gewartowska



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową  
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2022

<http://rcin.org.pl>



*Składam serdeczne podziękowania*

*dr hab. n. med. Małgorzacie Frontczak-Baniewicz  
za możliwość rozwoju naukowego, opiekę merytoryczną  
na każdym etapie powstawania niniejszej pracy,  
wiele trafnych uwag i ogromną życzliwość*

*dr n. med. Magdalenie Gewartowskiej  
za cenne wskazówki i pomoc w przygotowaniu dysertacji*

*dr hab. n. med. Agnieszce Pawlak  
za umożliwienie mi udziału w tym wyjątkowym projekcie  
oraz liczne wskazówki merytoryczne*

*dr hab. n. med. Maciejowi Przybylskiemu  
za wprowadzenie w świat wirusologii i biologii molekularnej*

*dr hab. Krzysztofowi Przednówkowi  
za pomoc w opracowaniu statystycznym zebranych danych*

*Pragnę również podziękować mojej Rodzinie, a w szczególności Żonie Oli  
za wyrozumiałość, wsparcie i nieustającą wiarę w moje możliwości*

Badania stanowiące przedmiot niniejszej rozprawy doktorskiej były finansowane z grantu przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN/2014/13/B/NZ4/03832).

## Spis treści

1. Wykaz skrótów stosowanych w pracy .....	7
2. Streszczenie.....	11
2.1. Abstract .....	17
3. Wstęp .....	23
3.1. Wirusowe choroby mięśnia sercowego .....	23
3.2. Zapalenie mięśnia sercowego.....	25
3.2.1. Diagnostyka i leczenie zapaleń mięśnia sercowego .....	27
3.2.2. Parwovirus B19 .....	31
3.3. Kardiomiopatia rozstrzeniowa .....	33
3.4. Niewydolność serca.....	35
3.5. Jednostka mięśniowo-naczyniowa .....	37
4. Cele pracy .....	41
4.1. Podstawowy cel pracy .....	41
4.2. Dodatkowe cele pracy .....	41
5. Innowacyjność rozprawy doktorskiej .....	42
6. Metodyka .....	43
6.1. Dane medyczne i badana populacja .....	43
6.2. Diagnostyka nieinwazyjna .....	46
6.3. Diagnostyka inwazyjna .....	47
6.4. Diagnostyka materiału biopsyjnego .....	48
6.5. Metody statystyczne .....	50
7. Wyniki.....	51
7.1. Charakterystyka populacji.....	51
7.2. B19V vs grupa kontrolna .....	53

7.2.1. Parametry antropometryczne .....	53
7.2.2. Objawy niewydolności układu krążenia .....	53
7.2.3. Badania laboratoryjne .....	55
7.2.4. Badanie echokardiograficzne .....	57
7.2.5. Badanie histopatologiczne .....	60
7.3. Korelacja LVEF i kopijności B19V .....	61
7.4. Mikroskopia elektronowa.....	62
7.4.1. Obraz zmian ultrastrukturalnych w zależności od liczby kopii B19V .....	62
7.4.2. Obraz zmian ultrastrukturalnych w zależności od wybranych parametrów klinicznych, wyników badań obrazowych i laboratoryjnych .....	75
7.4.3. Podsumowanie analizy mikroskopowo-elektronowej .....	94
7.5. Ustalenie przebiegu infekcji parwowirusem B19 .....	95
7.5.1. Analiza zmian w obrębie elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej.....	95
7.5.2. Badanie echokardiograficzne .....	99
7.5.3. Zaburzenia kurczliwości i przerost mięśnia .....	102
8. Dyskusja.....	105
8.1. Ograniczenia pracy.....	117
9. Wnioski .....	118
10. Bibliografia .....	119

## 1. Wykaz skrótów stosowanych w pracy

A – fala A

AcT – czas akceleracji przepływu w tętnicy płucnej (ang. acceleration time)

ALT – aminotransferaza alaninowa

AR – niedomykalność zastawki aortalnej (ang. aortic regurgitation)

AST – aminotransferaza asparaginianowa

ATP – adenzynotryfosforan

AV Vmax – prędkość maksymalna przepływu przez zastawkę aortalną

beta-blokery – antagoniści receptora beta-adrenergicznego

BMI – wskaźnik masy ciała (ang. body mass index)

B19V – parwovirus B19 (ang. B19 virus)

CK-MB – frakcja sercowa kinazy kreatynowej (ang. creatine kinase myocardial band)

CMV – cytomegalowirus (ang. cytomegalovirus)

CPK – kinaza fosfokreatynowa (ang. creatine phosphokinase)

CRP – białko C-reaktywne (ang. C-reactive protein)

CSK MSWiA – Centralny Szpital Kliniczny Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji

CVU – jednostka mięśniowo-naczyniowa (ang. cardiovascular unit)

DCM – kardiomiopatia rozstrzeniowa (ang. dilated cardiomyopathy)

EBV – wirus Epsteina-Barr (ang. Epstein-Barr virus)

ECMO – pozaustrojowe utlenowanie krwi (ang. extracorporeal membrane oxygenation)

EDTA – kwas wersenowy lub inaczej edetynowy (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)

eGFR – przesączanie kłębuszkowe (ang. estimated glomerular filtration rate)

E – fala E

E' – fala E'

EKG – elektrokardiogram

EMB – biopsja endomiokardialna (ang. endomyocardial biopsy)

ESC – Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ang. European Society of Cardiology)

EV – enterowirusy

E/A – stosunek fali E do fali A

E/E' – stosunek fali E do fali E'

FT3 – wolna trójiodotyronina

FT4 – wolna tyroksyna

G6PD – dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (ang. glucose-6-phosphate dehydrogenase)

HAdV – ludzkie adenowirusy (ang. human adenoviruses)

HDL – lipoproteina wysokiej gęstości (ang. high-density lipoprotein)

HGB – hemoglobina

HHV-6 – ludzki herpeswirus typu 6 (ang. human herpesvirus type 6)

HCT – hematokryt

IMDiK – Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej

IVIG – dożylny wlew immunoglobulin (ang. intravenous immunoglobulin)

IVS – grubość przegrody międzykomorowej (ang. intraventricular septum)

K<sup>+</sup> – poziom potasu we krwi



LA – lewy przedsionek/szerokość lewego przedsionka (ang. left atrium)

LDL – lipoproteina niskiej gęstości (ang. low-density lipoprotein)

LV – lewa komora (ang. left ventricle)

LVEDd – wymiar końcoworozkurczowy lewej komory (ang. left ventricular end-diastolic diameter)

LVEF – frakcja wyrzutowa lewej komory (ang. left ventricular ejection fraction)

MC – zapalenie mięśnia sercowego (ang. myocarditis)

MCH – średnia masa hemoglobiny w erytrocytach (ang. mean corpuscular hemoglobin)

MCHC – średnie stężenie hemoglobiny w erytrocytach (ang. mean corpuscular hemoglobin concentration)

MCV – średnia objętość krwinek czerwonych (ang. mean corpuscular volume)

MPV – średnia objętość płytek krwi (ang. mean platelet volume)

MR – niedomykalność zastawki mitralnej (ang. mitral regurgitation)

MRI – rezonans magnetyczny (ang. magnetic resonance imaging)

Na<sup>+</sup> – poziom sodu we krwi

NS – niewydolność serca

NT-proBNP – N-końcowy peptyd natriuretyczny typu B

NYHA – Nowojorskie Towarzystwo Kardiologiczne (ang. New York Heart Association)

PAN – Polska Akademia Nauk

PDW – wskaźnik anizocytozy płytek krwi (ang. platelet distribution width)

PLT – płytki krwi (ang. platelets)

PR – niedomykalność zastawki pnia płucnego (ang. pulmonary regurgitation)

PTK – Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

PW – grubość tylnej ściany lewej komory (ang. posterior wall)

RBC – erytrocyty (ang. red blood cells)

RDW – wskaźnik anizocytozy krwinek czerwonych (ang. red cell distribution width)

RV – prawa komora/szerokość prawej komory (ang. right ventricle)

TAPSE – ruchomość pierścienia trójdzielnego (ang. tricuspid annular plane systolic excursion)

TEM – transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. transmission electron microscopy)

TG – trójglicerydy

TR – niedomykalność zastawki trójdzielnej (ang. tricuspid regurgitation)

TSH – hormon tyreotropowy (ang. thyroid-stimulating hormone)

TTE – echokardiografia przezklatkowa (ang. transthoracic echocardiogram)

VHD – wirusowa choroba serca (ang. viral heart disease)

VT – częstoskurcz komorowy (ang. ventricular tachycardia)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organisation)

## 2. Streszczenie

Wirusowe infekcje mięśnia sercowego mogą być przyczyną wielu poważnych stanów. Są to m. in. ostre zapalenie mięśnia sercowego oraz kardiomiopatia rozstrzeniowa, a więc choroby, które bardzo często doprowadzają do wystąpienia objawów niewydolności serca (NS). Ta z kolei jest bardzo istotnym problemem klinicznym i ekonomicznym, gdyż szacuje się, że cierpi na nią obecnie nawet 1,2 miliona Polaków. Niewydolność serca jest najczęstszą przyczyną hospitalizacji w naszym kraju, a jej leczenie kosztuje niemal 2 miliardy złotych rocznie. Rokowanie co do przeżycia chorych z zaawansowaną niewydolnością układu krążenia jest gorsze niż w większości chorób nowotworowych.

Wirusowe choroby serca rozwijają się w związku ze zmianami w komórkach mięśnia sercowego, zachodzącymi najczęściej w wyniku reakcji autoimmunologicznej wywołanej przez wirusy na drodze mimikry molekularnej. Jedynym narzędziem diagnostycznym umożliwiającym dokładną analizę tych zmian jest biopsja mięśnia sercowego (EMB). Metoda ta odgrywa istotną rolę w diagnostyce zapaleń mięśnia sercowego oraz pozapalnej kardiomiopatii rozstrzeniowej. Materiał uzyskany na drodze EMB powinien być poddany diagnostyce histologicznej, immunohistochemicznej i wirusologicznej. Bardzo cenna okazuje się także diagnostyka ultrastrukturalna przy wykorzystaniu transmisyjnej mikroskopii elektronowej, jednakże obecnie niewiele ośrodków może sobie na nią pozwolić ze względów organizacyjnych oraz finansowych.

Wśród wirusów wykazujących duże powinowactwo do mięśnia sercowego najczęściej wymienia się parwowirusa B19 (B19V), ludzkie herpeswirusy typu 6, wirusa Epsteina-Barr, cytomegalowirusa, wirusa Coxsackie typu B oraz inne enterowirusy i adenowirusy. Wirusem najczęściej wykrywanym w materiale biopsyjnym mięśnia sercowego pobranym od pacjentów z kardiomiopatią rozstrzeniową jest parwowirus B19. Od dawna jest on wiązany z indukcją procesu chorobowego, doprowadzającego do rozstrzeni lewej komory, jednakże znajomość patomechanizmu tego procesu pozostaje ograniczona. Materiał genetyczny B19V jest wykrywany w komórkach śródbłonna naczyniowego, nie ma go natomiast w kardiomiocytach, co sugeruje wpływ wirusa na

indukcję niedokrwienia. Uważa się, że koinfekcja B19V z innym wirusem kardiotropowym może pogarszać przebieg zakażenia, prawdopodobnie poprzez reaktywację replikacji B19V. Dotychczas nie wyjaśniono, jakie zmiany zachodzą w budowie ultrastrukturalnej mięśnia sercowego w wyniku infekcji wirusowych i czy zmiany te różnią się w zależności od gatunku wirusa.

Pomimo trwających od wieków badań nad trójwymiarową architekturą serca, szczegóły organizacji kardiomiocytów w ścianie mięśnia sercowego nadal nie zostały w pełni poznane. Również przebieg zmian patologicznych zachodzących w miokardium na poziomie subkomórkowym nie został dotychczas dobrze wyjaśniony. Zgłębieniu tej wiedzy ma służyć wprowadzenie pojęcia jednostki mięśniowo-naczyniowej (CVU), które jest rozwinięciem myśli funkcjonalnego połączenia kardiomiocytów z komórkami śródbłonna naczyniowego. Jednostka ta określana jest jako podstawowy strukturalny i funkcjonalny element mięśnia sercowego, składający się z kardiomiocytów, fibroblastów oraz naczyń krwionośnych wraz z pericytem. Niniejsza praca powstała, aby określić zakres zmian ultrastrukturalnych w CVU w przebiegu wirusowej choroby serca wywołanej przez parwowirusa B19.

Podstawowym celem prowadzonych badań była analiza zmian ultrastrukturalnych poszczególnych elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej w przebiegu infekcji mięśnia sercowego parwowirusem B19.

Cele szczegółowe obejmowały:

- Opracowanie schematu zmian zachodzących w mięśniu sercowym w przebiegu infekcji parwowirusem B19.
- Określenie, czy istnieje korelacja zmian w morfologii jednostki mięśniowo-naczyniowej na poziomie ultrastrukturalnym w zależności od liczby kopii parwowirusa B19 w EMB, klinicznego stanu chorych, wyników badania echokardiograficznego oraz od wyników badań laboratoryjnych.

Badana populacja została podzielona na 2 grupy: chorzy, u których wykryto DNA B19V w materiale biopsyjnym oraz pacjenci, u których nie stwierdzono materiału genetycznego parwowirusa B19. Szczegółowej analizie poddano chorych z potwierdzoną

obecnością B19V. Ta grupa została porównana z grupą kontrolną, którą stanowili pacjenci z rozstrzenią lewej komory i zachowaną frakcją wyrzutową, u których nie stwierdzono obecności materiału genetycznego wirusów. W kolejnej fazie badania sprawdzono, czy istnieje bezpośrednia korelacja pomiędzy frakcją wyrzutową lewej komory a liczbą kopii B19V w badanym materiale oraz dokonano opisu zmian ultrastrukturalnych, które zostały zaobserwowane w mikroskopii elektronowej, w zależności od kopijności parwowirusa B19, wybranych kryteriów klinicznych, wyników badań obrazowych i laboratoryjnych. W następnym etapie analizy, aby ustalić przebieg zmian morfologicznych w CVU w przebiegu infekcji B19V, chorych z tej grupy podzielono na 4 podgrupy w zależności od frakcji wyrzutowej lewej komory oraz od liczby kopii wirusa w biopsji miokardium.

Wszyscy pacjenci mieli wykonywane badania nieinwazyjne, które wchodziły w zakres rutynowej diagnostyki niewydolności serca i zostali ocenieni wg klasyfikacji NYHA pod względem nasilenia objawów niewydolności układu krążenia. Wszyscy chorzy mieli także wykonaną angiografię tętnic wieńcowych. Diagnostyka pacjentów uwzględnionych w niniejszym badaniu obejmowała wykonanie biopsji mięśnia lewej komory. Materiał biopsyjny oceniany był wg kryteriów Dallas oraz wg immunohistochemicznych kryteriów WHO pod kątem obecności stanu zapalnego, a do identyfikacji materiału genetycznego wirusów w miokardium wykorzystano qPCR i RT-qPCR. Próbkę od każdego pacjenta oceniane były przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Analizę statystyczną zgromadzonych danych wykonano w środowisku programistycznym GNU R.

#### Wyniki:

- 1) W materiale biopsyjnym od pacjentów z kopijnością B19V na poziomie <500 w obrazie ultrastrukturalnym obserwowano m.in. destrukcję aparatu kurczliwego, morfologiczne cechy stresu oksydacyjnego i obrzęku siateczki śródplazmatycznej, liczne wgłobienia otoczki jądrowej. Najbardziej charakterystyczną cechą w tej grupie chorych była jednak znaczna degradacja grzebieni mitochondrialnych. Część mitochondriów układała się w konglomeraty, w obrębie których obserwowano morfologiczne cechy fuzji.

W przestrzeni zewnątrzkomórkowej obecne były bardzo liczne włókienka kolagenowe. Naczynia kapilarne charakteryzowały się bardzo wąskim światłem i hipertroficznym śródbłonkiem o cechach nekrozy. Formowały one struktury o charakterze pętli, których światło najczęściej było całkowicie zamknięte.

- 2) W grupie chorych z pośrednią kopijnością B19V obserwowano często przerwane miofibryle i cechy poszerzenia szorstkiej siateczki śródplazmatycznej. Mitochondria w kardiomiocytach były liczne, zdegenerowane, z częściowo uszkodzonymi grzebieniami. Niektóre z nich miały przerwana błonę zewnętrzną, a w ich pobliżu znajdowały się skupiska glikogenu otoczone pojedynczą błoną plazmatyczną. Obserwowano również mitochondria o morfologii ciał mielinopodobnych. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej licznie występowały naczynia o charakterze pętli, a także drobnowłókienny materiał i fibroblasty. Komórki śródbłonka wykazywały często cechy hipertrofii i zawierały elektronowo gęste ziarnistości lub duże wakuole.
- 3) U pacjentów z poziomem kopijności B19V >5000 obserwowano zanik aparatu kurczliwego na znacznym obszarze komórki, a cytoplazmę wypełniały liczne skupiska ziaren glikogenu. Mitochondria w pobliżu takich skupisk charakteryzowały się jasną elektronowo macierzą, przerwana błoną zewnętrzną i mocno uszkodzonymi grzebieniami. Niektóre mitochondria były całkowicie pozbawione zewnętrznej błony. Charakterystyczne zmiany obserwowano również w jądrach kardiomiocytów. Poszerzona była przestrzeń pomiędzy błonami jądrowymi, często zawierała ona amorficzny materiał, a w otoczkach jądrowych występowały liczne wgłobienia. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej obecne były liczne fibroblasty, włókienka kolagenowe i elastynowe oraz włókienka o morfologii amyloidu i desminy. Naczynia kapilarne charakteryzowały się wysokim, hipertroficznym śródbłonkiem i bardzo wąskim światłem.
- 4) Patologiczne zmiany ultrastruktury elementów jednostki mięśniowo naczyniowej były bardziej nasilone u chorych z większym stopniem

zaawansowania objawów niewydolności serca, a także u chorych z wyższym poziomem NT-proBNP i troponiny I. Końcoworozkurczowy wymiar lewej komory oraz jej frakcja wyrzutowa nie były bezpośrednio związane z patologiami w obrębie CVU.

- 5) Cechy podziału mitochondriów były znacznie bardziej nasilone w grupie chorych z prawidłową frakcją wyrzutową lewej komory i wysokim poziomem kopijności B19V w porównaniu z chorymi z niską frakcją i małą liczbą kopii B19V.
- 6) Wśród pacjentów z wysoką kopijnością parwowirusa większa część naczyń była zwężona przy niskiej LVEF w porównaniu do prawidłowej frakcji wyrzutowej.
- 7) Grupa z prawidłową frakcją wyrzutową lewej komory i wysokim poziomem kopijności B19V miała istotnie mniejszą szerokość lewego przedsionka od pozostałych grup. Ci sami chorzy mieli istotnie wyższe TAPSE od pacjentów z niską LVEF.
- 8) Pacjenci z niską LVEF i niską kopijnością B19V mieli bardziej nasiloną niedomykalność mitralną od pozostałych chorych. Zaburzenia kurczliwości mięśnia lewej komory także były bardziej nasilone w tej grupie w porównaniu do chorych z prawidłową LVEF.
- 9) Grupa G4 przedstawiała pierwszy etap wirusowej infekcji serca – intensywna replikacja wirusa z prawidłową LVEF. Następnie obserwowano rozstrzeń lewej komory i upośledzenie jej funkcji skurczowej (grupa G3), a w dalszym etapie infekcji wirus kończył proces aktywnej replikacji (G1). Grupa G2 obrazowała postulowaną w literaturze populację chorych, w której parwowirus B19 jest jedynie pozostałością po infekcji przebytej w przeszłości, ale nie wywołuje on zmian patologicznych w miokardium.
- 10) Wirusowe DNA/RNA wykryto w 52,6% badanych biopsatów mięśnia sercowego. W 67,6% wykrytym wirusem był B19V, a w 14,1% próbek wykryto kwasy nukleinowe dwóch wirusów. Tylko w jednym wypadku B19V nie był jednym z wirusów koinfekujących.

- 11) Nie stwierdzono korelacji pomiędzy frakcją wyrzutową lewej komory a liczbą kopii parwowirusa B19 wykrytą w materiale biopsyjnym pobranym od poszczególnych pacjentów.

#### Wnioski:

- 1) Na poziomie mikroskopii świetlnej nie stwierdzono istotnych różnic w badanych grupach, natomiast bardzo ważnym jej uzupełnieniem okazało się badanie przy użyciu mikroskopii elektronowej.
- 2) Obraz zmian ultrastrukturalnych poszczególnych elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej u pacjentów z wirusową chorobą serca spowodowaną przez parwowirusa B19 różnił się w porównaniu do chorych z rozstrzenią lewej komory, u których nie stwierdzono obecności wirusowego materiału genetycznego. Patologie obserwowane były w aparacie kurczliwym, mitochondriach i jądrach komórkowych kardiomiocytów. Zmiany ultrastrukturalne dotyczyły również przestrzeni zewnątrzkomórkowej i naczyń włosowatych.
- 3) Patologiczne zmiany w morfologii elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej były związane z liczbą kopii parwowirusa B19 w EMB, z nasileniem objawów niewydolności serca wg skali NYHA, a także z poziomem NT-proBNP i troponiny I w surowicy krwi obwodowej, jednakże niemożliwe było stworzenie systematyki obserwowanych zmian.
- 4) Grupa chorych z kopijnością B19V <500 reprezentowała „zejściowy” obraz infekcji parwowirusem B19, ze znacznym stopniem destrukcji mięśnia sercowego i niepomyślnym rokowaniem. Znaczny stopień uszkodzenia kardiomiocytów był wtórny do patologii w obrębie naczyń kapilarnych, będących przyczyną niedokrwienia.



## 2.1. Abstract

Viral heart infections may be the reason for many serious conditions. These may be acute myocarditis and dilated cardiomyopathy (DCM), the diseases that often lead to the heart failure. This is a very important clinical and economic problem. Heart failure affects up to 1.2 million Poles, being the most common cause of hospitalization in our country. Its treatment costs almost PLN 2 billion per year. The prognosis for patients with advanced heart failure is worse than in the most of cancers.

Viral heart diseases develop due to changes in the heart muscle cells, most often as a result of an autoimmune response induced by viruses through molecular mimicry. Endomyocardial biopsy (EMB) is the only diagnostic tool that supports the analysis of the tissue changes. EMB is the best diagnostic device for recognition of myocarditis and post-inflammatory cardiomyopathy. Probes obtained in this way should undergo histological, immunohistochemical and virological diagnostics. Ultrastructural diagnostics using transmission electron microscopy also seems to be very valuable, but not many cardiological centers can afford it for now. It is caused by the organizational and financial reasons.

Parvovirus B19 (B19V), human herpesvirus type 6, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, Coxsackie virus type B and other enteroviruses and adenoviruses are viruses, that present the greatest affinity to the myocardium. Parvovirus B19 is the most frequently detected in endomyocardial biopsy samples taken from DCM patients. B19V has been long associated with induction of the process leading to the left ventricular dilatation. However, the knowledge about the pathomechanism of this process remains limited. Genetic material of B19V is often detected in endothelial cells, but its not present in the cardiomyocytes. This suggests the induction of ischemia. It is believed that co-infection of B19V with another cardiotropic virus may worsen the infection, probably by reactivating B19V replication. So far, it has not been clarified what changes in the myocardial ultrastructure occur during the viral infections and whether these changes differ depending on the virus species.

Despite centuries of researches over the three-dimensional architecture of the heart, the details of the cardiomyocytes organization in the wall of the heart muscle are still not fully understood. The pathological changes taking place in the myocardium at the subcellular level also have not been well understood so far. The introduction of the concept of cardiovascular unit (CVU), which is an extension of the idea of functional connection between cardiomyocytes and endothelial cells, is intended to widen the knowledge about pathological processes taking place in the myocardium. Cardiovascular unit is defined as the basic structural and functional element of the heart muscle, consisting of cardiomyocytes, fibroblasts and vessels with pericyte. The aim of this study is determining the range of the ultrastructural changes in the CVU in the course of viral heart disease caused by parvovirus B19.

The main goal of this research was the electron-microscopic evaluation of the cardiovascular unit elements and the analysis of changes in their ultrastructure in the course of parvoviral heart infection.

The detailed objectives included:

- Development of a scheme of changes taking place in the myocardium in the course of parvovirus B19 infection.
- Determining whether there is a relationship between the ultrastructural morphology of the cardiovascular unit and the number of parvovirus B19 copies in EMB, clinical condition of patients, echocardiographic examination results and laboratory tests results.

Population of the study was divided into 2 groups: patients with DNA of parvovirus B19 in the biopsy samples and patients with no genetic material of B19V. Detail analysis of the patients with confirmed presence of B19V in EMB was made. This group of patients was compared to the control group - patients with dilation of the left ventricle with preserved left ventricular ejection fraction, and no evidence of viral genetic material. In the next phase of the study, it was checked whether there was a correlation between the left ventricular ejection fraction and the number of B19V copies in the examined material and also the ultrastructural changes observed in electron microscopy

were described. In the next stage of the analysis, in order to determine the progress of morphological changes in CVU in the course of the B19V infection, patients from the B19V group were divided into 4 subgroups depending on the left ventricular ejection fraction and the number of virus copies in the myocardial biopsy specimens.

All patients had non-invasive tests routinely performed in the diagnosis of the heart failure and were assessed according to the NYHA criteria for the severity of cardiovascular failure symptoms. All of patients also had coronary angiography performed. The diagnostics of the patients included in this study had to be extended for an endomyocardial biopsy from the wall of the left ventricle. The biopsy material was assessed according to the Dallas criteria and to the immunohistochemical criteria of the WHO for the presence of inflammation. qPCR and RT-qPCR were used to identify the genetic material of viruses in the myocardium. Samples from each patient were assessed using transmission electron microscopy. Statistical analysis of the collected data was performed in the GNU R programming environment.

#### Results:

- 1) Destruction of the contractile apparatus, morphological features of oxidative stress, edema of the endoplasmic reticulum and numerous intussusceptions of the nuclear envelope were observed in the biopsy material taken from patients with <500 B19V copies level. Significant degradation of the mitochondrial combs was the most characteristic feature in this group of patients. Some of the mitochondria formed conglomerates in which fusion features were observed. Numerous filaments were present in the extracellular space. The capillaries were characterized by very narrow lumen and hypertrophic endothelium with necrosis features. The vessels looked like loops, their lumen was usually completely closed.
- 2) Interrupted myofibrils and features of the dilatation of the rough endoplasmic reticulum were often observed in the group of patients with 500-5000 copies of B19V. Mitochondria in the cardiomyocytes were numerous and degenerated, with partially damaged combs. Some of them had ruptured outer membrane, clusters of glycogen surrounded by a single plasma membrane

were observed near them. The mitochondria with the morphology of myelin-like bodies have also been observed. In the extracellular space, there were numerous loop vessels, as well as fine-fiber material and fibroblasts. The endothelial cells were often hypertrophic and contained electron dense granules or large vacuoles.

- 3) In patients with the B19V copies level >5000, atrophy of the contractile apparatus was observed in large area of the cells, cytoplasm was filled with numerous clusters of the glycogen grains. The mitochondria located near these clusters were characterized by an electron-bright matrix, broken outer membrane and seriously damaged combs. Some of the mitochondria were completely devoid of their outer membrane. Characteristic changes were also observed in the nuclei of cardiomyocytes. Space between the nuclear membranes was widened, it often contained amorphous material, and there were numerous cavities in the nuclear envelopes. Numerous fibroblasts, collagen, elastin, amyloid and desmin fibers were present in the extracellular space. The capillaries characterized of a high, hypertrophic endothelium and a very narrow lumen.
- 4) Pathological changes in ultrastructure of the cardiovascular unit elements were more pronounced in patients with higher NYHA class, higher levels of NT-proBNP and troponin I. Left ventricular end-diastolic dimension and left ventricular ejection fraction were not directly related to the CVU pathologies.
- 5) Features of the mitochondrial divisions were much more pronounced in the group of patients with normal left ventricular ejection fraction and high level of B19V copies than in the patients with low ejection fraction and low B19V copy number.
- 6) In the patients with high level of parvovirus copies the subgroup of patients with low LVEF had more frequently constricted vessels than patients with normal ejection fraction.
- 7) The group of patients with normal left ventricular ejection fraction and a high level of B19V copies level had significantly smaller width of the left atrium

than the other groups. The same patients had significantly higher TAPSE than patients with low LVEF.

- 8) The patients with low LVEF and low B19V copies number had more severe mitral regurgitation than the other patients. Left ventricular contractility disorders were also more severe in this group compared to patients with normal LVEF.
- 9) G4 group represented the first stage of viral heart infection - intensive viral replication with normal LVEF. The dilation of the left ventricle and deterioration of its function were the next stage (group G3). Further stage of the infection was the end of viral replication (G1). The G2 group represented postulated in the literature population of patients, in which parvovirus B19 is only a bystander and does not cause any pathological changes in the myocardium.
- 10) Viral genetic material was detected in 52.6% of myocardial biopsies. In 67.6% of cases B19V was detected. Nucleic acids of two viruses were detected in 14.1% of the samples. Only in one case B19V was not one of the co-infecting viruses.
- 11) There was no correlation between the left ventricular ejection fraction and the number of parvovirus B19 DNA copies detected in the biopsy samples.

#### Conclusions:

1. The picture of ultrastructural changes of the elements of the cardiovascular unit in the patients with viral heart disease caused by parvovirus B19 was different than in the patients with left ventricular dilatation with no viral genetic material. Pathologies were observed in the contractile apparatus, mitochondria and in nuclei of the cardiomyocytes. Ultrastructural changes were observed also in the extracellular space and capillaries.
2. No significant differences between studied groups were found in light microscopy, but the examination using transmission electron microscopy seemed to be very important supplement.

3. Pathological changes in the morphology of the cardiovascular unit were correlated to the number of parvovirus B19 copies in EMB, with the severity of heart failure symptoms according to the NYHA criteria, as well as with NT-proBNP and troponin I levels in peripheral blood serum. However, it was impossible to create a systematics of the observed changes.
4. The group of patients with <500 copies of B19V represented the final stage of parvovirus B19 infection. Myocardium demonstrates significant degree of destruction and it is connected with poor prognosis. A significant degree of the cardiomyocytes damage was secondary to the pathologies taking place in the capillaries and causing ischemia.

### 3. Wstęp

#### 3.1. Wirusowe choroby mięśnia sercowego

Grupę, u której należy podejrzewać wirusową infekcję z zajęciem mięśnia sercowego, mogą stanowić pacjenci z objawami niewydolności układu krążenia lub z bólem w klatce piersiowej, zazwyczaj po przebytej infekcji górnych dróg oddechowych lub przewodu pokarmowego, zwłaszcza przebiegającej z gorączką i bólami stawowymi. U tych chorych obserwuje się zaburzenia kurczliwości i/lub rozstrzeń lewej komory serca, podwyższony poziom markerów martwicy mięśnia sercowego (troponina T, troponina I, CK-MB), zaburzenia rytmu serca o typie tachyarytmii komorowych i nadkomorowych, bloków przedsionkowo-komorowych, czy też inne nieprawidłowości w zapisie elektrokardiograficznym.

Wirusowe infekcje mięśnia sercowego są przyczyną wielu poważnych problemów klinicznych, nazywanych wirusowymi chorobami serca [Pawlak et al. 2016]. Patologiami, które mogą mieć podłoże wirusowe, są między innymi zapalenie mięśnia sercowego (MC) w różnych postaciach (piorunujące, ostre i przewlekłe) oraz kardiomiopatia rozstrzeniowa (DCM) [Blauwet et Cooper 2010]. Konieczne jest odróżnienie wirusów, które bezpośrednio (wirusy kardiotropowe i naczyniotropowe) lub pośrednio (wirusy limfotropowe) infekują serce. Drugą grupą są wirusy, które niekoniecznie infekują komórki mięśnia sercowego, ale pośrednio, poprzez mimikrę molekularną, wywołują burzę cytokinową lub komórkową odpowiedź immunologiczną i w ten sposób odpowiadają za uszkodzenie serca i jego ujemną inotropię [Tschöpe et al. 2021]. Wirusy o dużym powinowactwie do mięśnia sercowego to: parwowirus B19, ludzkie herpeswirusy typu 6 (przede wszystkim HHV-6B), wirus Epsteina-Barr, cytomegalowirus, wirus Coxsackie typu B oraz inne enterowirusy i adenowirusy. W materiale biopsyjnym miokardium wykrywa się także wirusy grypy A i B, różyczki, świnki oraz wirusy paragrypy, jednak przypisuje się im mniejsze znaczenie w wywoływaniu patologii mięśnia sercowego [Basso et al. 2013, Escher et al. 2015, Kühl et Schultheiss 2009, Pawlak et al. 2016]. Stosunkowo często, bo nawet w 25% przypadków wirusowego zapalenia mięśnia sercowego, obserwuje się koinfekcję dwoma

typami wirusa – najczęściej współwystępują B19V z HHV-6 oraz B19V z EV [Kühl et al. 2005]. U chorych ze współistnieniem parwowirusa B19 z ludzkim herpeswirusem typu 6 stwierdzono istotnie wyższą kopijność B19V niż u pacjentów z monoinfekcją B19V [Bock et al. 2014]. Nie wyjaśniono dotąd, jakie zmiany w budowie ultrastrukturalnej mięśnia sercowego zachodzą w wyniku infekcji wirusowych i czy zmiany te różnią się w zależności od gatunku wirusa.



### 3.2. Zapalenie mięśnia sercowego

MC bywa często nierozpoznaną przyczyną ostrej niewydolności serca, nagłej śmierci sercowej lub przewlekłej kardiomiopatii rozstrzeniowej [Sagar et al. 2012]. Jest to choroba, która dotyczy kardiomiocytów, tkanki śródmiąższowej oraz naczyń krwionośnych [Zhao et Fu 2018], a w jej rozwoju można wyróżnić trzy stadia – ostre, podostre i przewlekłe stadium miopatii [Kuffner et al. 2017]. Niekiedy zapalenie mięśnia sercowego może przebiegać także z zajęciem osierdzia. Jest to choroba, która charakteryzuje się dużą śmiertelnością, a cechy MC stwierdza się nawet w 44% badań autopsyjnych wykonywanych w przypadku nagłych zgonów sercowych u osób młodych [Basso et al. 2001]. MC opisywano także jako przyczynę 46% DCM w populacji dziecięcej [Towbin et al. 2006], a u 10% dorosłych pacjentów z klinicznym rozpoznaniem kardiomiopatii rozstrzeniowej na podstawie badań histopatologicznych stawia się diagnozę aktywnego zapalenia mięśnia sercowego [Leone et al. 2012]. Dlatego uważa się, że MC może odgrywać istotną rolę w patogenezie DCM [Kawai 1999] i nawet 30% potwierdzonych przypadków MC może ulegać konwersji do kardiomiopatii rozstrzeniowej [Kindermann et al. 2012, Richardson et al. 1996]. Za najczęstsze przyczyny zapalenia mięśnia sercowego przyjmuje się infekcje wirusowe (Schultheiss et al. 2011). Reakcja układu odpornościowego na obecność patogenu prowadzi do dysfunkcji, patologicznej przebudowy i niewydolności serca.

Od lat 50. do 90. XX wieku najczęściej identyfikowane w Ameryce Północnej i Europie Zachodniej były enterowirusy, szczególnie wirus Coxsackie [Andréoletti et al. 2009, Pauschinger et al. 1999]. W ciągu ostatnich 2 dekad łańcuchowa reakcja polimerazy i hybrydyzacja in situ pozwoliły na identyfikację w materiale biopsji serca szeregu wirusów kardiotropowych, w tym szczepów grypy A H1N1, adenowirusów, wirusa zapalenia wątroby typu C, cytomegalowirusa, echowirusa, parwowirusa B19, wirusa Epsteina-Barr i wirusa opryszczki [Baruteau et al. 2010, Bowles et al. 2003, Chimenti et al. 2004, Matsumori et al. 2000, Omura et al. 2005, Pauschinger et al. 1999]. U pacjentów z przewlekającymi się objawami i tzw. kardiomiopatią pozapalną przeważają parwowirus B19 i ludzki wirus opryszczki [Breinholt et al. 2010, Kühl et al. 2005]. Ponadto zapalenie mięśnia sercowego może być także wywoływane przez inne

czynniki infekcyjne, takie jak: bakterie, pierwotniaki, grzyby i pasożyty, a także przez czynniki toksyczne (głównie alkohol etylowy oraz leki), choroby autoimmunologiczne oraz metaboliczne. Podstawowym problemem związanym z MC jest brak praktycznej możliwości odróżnienia, na podstawie danych klinicznych, procesu zapalnego o podłożu wirusowym od niezwiązanego z zakażeniem. Przekłada się to na brak możliwości zastosowania leczenia celowanego. Sytuacja ta wynika z mimikry, czyli podobieństwa strukturalnego i/lub funkcjonalnego między antygenami wirusowymi i białkami mięśnia sercowego [Massilamany et al. 2014, Reddy et al. 2013, Zhao et Fu 2018].

Pod kątem rodzaju nacieku zapalnego, zapalenia mięśnia sercowego można podzielić na limfocytowe, eozynofilowe, polimorficzne, olbrzymiokomórkowe oraz sarkoidozę serca [Aretz et al. 1985, Caforio et al. 2013, Gore et Saphir 1947]. Większość obecnej wiedzy na temat zapalenia mięśnia sercowego wywodzi się z eksperymentów prowadzonych na szczepach gryzoni.

### 3.2.1. Diagnostyka i leczenie zapaleń mięśnia sercowego

Kliniczne podejrzenie zapalenia mięśnia sercowego może być wysunięte w przypadku chorych z bólem w klatce piersiowej, zwłaszcza o charakterze osierdziowym lub pseudo-niedokrwiennym. Także u pacjentów z objawami niewydolności układu krążenia, zwłaszcza młodych, nieleczonych dotychczas z tego powodu oraz u osób z niewyjaśnionymi arytmiami, omdleniami, u chorych z wstrząsem kardiogenym wywołanym przez nieznaną przyczynę i w przypadku nagłych zgonów sercowych można rozważać MC jako potencjalny czynnik sprawczy. Dodatkowymi kryteriami mogącymi nasuwać podejrzenie zapalenia mięśnia sercowego są gorączka, wywiad przebytej infekcji układu oddechowego lub przewodu pokarmowego, okres okołoporodowy, uprzednio rozpoznane lub podejrzewane zapalenie mięśnia sercowego, dodatni wywiad w kierunku chorób alergicznych i autoimmunologicznych, rodzinny wywiad MC lub DCM.

Każdy pacjent z podejrzeniem MC powinien mieć wykonane standardowe badania stosowane w diagnostyce kardiologicznej – elektrokardiogram i echokardiografię przeklatkową, a także badania laboratoryjne – poziom troponiny T lub I, NT-proBNP oraz CRP (białko C-reaktywne). Zapis elektrokardiograficzny (EKG) jest u pacjentów z zapaleniem mięśnia sercowego zazwyczaj nieprawidłowy, jednak stwierdzone zaburzenia nie wykazują dużej czułości ani swoistości dla MC [Ukena et al. 2011]. Echokardiografia służy do wykluczenia wad zastawkowych, a także daje konkretne informacje o szerokości jam serca, grubości ścian, funkcji skurczowej lewej i prawej komory oraz pozwala na wykrycie ewentualnej obecności płynu w worku osierdziowym. W MC często obserwujemy globalne lub regionalne zaburzenia kurczliwości mięśnia lewej komory bądź też dysfunkcję rozkurczową lewej komory z zachowaną LVEF [Felker et al. 2000, Yilmaz et al. 2009]. Poziom ultraczułych troponin jest prawie zawsze podwyższony w przebiegu MC, często spełniający kryterium laboratoryjne rozpoznania zawału mięśnia sercowego. Podobnie poziom NT-proBNP niemal we wszystkich przypadkach jest znacznie powyżej normy. Wykazano, że u ponad dwóch trzecich chorych diagnozowanych z powodu podejrzenia zawału mięśnia sercowego, u których nie stwierdzono istotnych przewężeń w nasierdziowych tętnicach wieńcowych, wykryto

obecność wirusowego materiału genetycznego w materiale biopsyjnym serca [Kühl et al. 2003], a w niemal 80% wykonanych badań scyntygraficznych u tego typu pacjentów stwierdzono cechy zapalenia mięśnia sercowego [Sarda et al. 2001]. Jeśli chodzi o markery stanu zapalnego, ich wartości także zazwyczaj są nieprawidłowe. Z MC próbuje się także łączyć tzw. „nowe” markery niewydolności serca, takie jak pentraksyna 3, galektyna 3 i różnicujący czynnik wzrostu 15 [Emdin et al. 2009].

Dodatkowe opcje w diagnostyce zapalenia mięśnia sercowego stanowią: obrazowanie za pomocą rezonansu magnetycznego, scyntygrafia, wykrywanie przeciwciał antywirusowych oraz sercowych autoprzeciwciał w surowicy krwi obwodowej, które są obecne nawet u 60% chorych z MC i kardiomiopatią pozapalną [Caforio et al. 2007, Tschöpe et al. 2021]. Autoprzeciwciała mogą być skierowane przeciwko łańcuchom ciężkim alfa i beta miozyny, receptorom beta-adrenergicznym, receptorom muskarynowym M2, i troponinie. Nie zaleca się rutynowego oznaczania przeciwciał w wypadku podejrzenia zapalenia mięśnia sercowego, z wyjątkiem podejrzenia zapalenia w przebiegu WZW typu C, choroby z Lyme oraz zakażenia riketsjami. W razie dostępności testów wykrywających autoprzeciwciała sercowe, należy je wykonywać w wypadku niestwierdzenia obecności materiału wirusowego w biopsjach miokardium. Ułatwia to podjęcie decyzji o wdrożeniu terapii immunosupresyjnej, przynoszącej niekiedy doskonałe rezultaty. Pomimo, że zalecenia dużych towarzystw kardiologicznych dotyczące oznaczania materiału genetycznego wirusów w materiale biopsyjnym mięśnia sercowego w chwili obecnej są niespójne, wielu badaczy uważa za wskazane nie tylko oznaczanie wirusów w EMB, ale także w próbkach krwi pobranej z komór serca oraz krwi obwodowej [Cooper et al. 2007, Pawlak et al. 2015], a obecność wirusa w surowicy krwi traktowana jest jako marker aktywnej infekcji [Pawlak et al. 2016]. Dobrym rozwiązaniem wydaje się być wykonywanie rezonansu magnetycznego (MRI) u klinicznie stabilnych chorych, przed wykonaniem biopsji mięśnia sercowego, gdyż wynik badania ułatwia dobór miejsca pobrania preparatów. Choć część klinicystów uważa, że diagnostyka przy użyciu MRI jest wystarczająca w większości przypadków podejrzenia MC, to inni z kolei podkreślają, że rezonans nie może w 100% zastąpić biopsji endomiokardialnej i nie powinien on opóźniać wykonania biopsji w przypadkach ciężkiego przebiegu klinicznego [Cooper et al. 2007]. Biopsja mięśnia sercowego jest

uznawana za złoty standard diagnostyczny w przypadku podejrzenia MC [Leone et al. 2012, Thiene et al. 2013, Tschöpe et al. 2021], jednak na dzień dzisiejszy wykorzystanie tej metody jest o wiele rzadsze niż zalecają to wytyczne. Metoda ta jako jedyna daje możliwość wyjaśnienia zmian zachodzących w mięśniu sercowym na poziomie komórkowym i subkomórkowym [Gil et al. 2016]. Pobranie materiału biopsyjnego przez doświadczonego operatora jest uznawane za procedurę bezpieczną, a odsetek wszystkich powikłań nie przekracza 2% [Cooper et al. 2007, Holzmann et al. 2008, Veinot 2002]. Komplikacje, które mogą zostać spowodowane wykonaniem EMB to krwiak w miejscu nakłucia naczynia, przetoka tętniczo-żylna, reakcja wazowagalna, infekcja, odma opłucnowa, tachyarytmia, zaburzenia przewodnictwa, uszkodzenie zastawek, zatorowość płucna lub obwodowa, perforacja ściany komory, krwawienie do osierdzia i tamponada worka osierdziowego. Pomimo wprowadzenia tej metody do praktyki klinicznej już w 1980 roku, budzi ona nadal sporo kontrowersji [Savvatis et al. 2015].

W celu usystematyzowania histopatologicznej diagnostyki stanu zapalnego toczącego się w miokardium, w roku 1986 zostały wprowadzone tzw. kryteria Dallas, zgodnie z którymi zapalenie mięśnia sercowego można stwierdzić, gdy w badaniu histopatologicznym obserwuje się naciek zapalny mięśnia sercowego połączony z martwicą i/lub zwyrodnieniem kardiomiocytów, bez przyczyny niedokrwiennej [Aretz et al. 1987]. Kryteria te okazały się jednak mało precyzyjne i niewystarczające. W 1996 roku Światowa Organizacja Zdrowia zaproponowała nowe kryteria (tzw. Marburskie), zgodnie z którymi stan zapalny w obrębie mięśnia sercowego można rozpoznać, jeśli na obszarze 1 mm<sup>2</sup> tkanki badanej pod dużym powiększeniem stwierdza się obecność minimum 14 leukocytów, z których co najmniej 7 jest limfocytami, a maksymalnie 4 z nich to monocyty. Od tej pory zapalenie mięśnia sercowego rozpoznaje się nie tylko na podstawie obrazu histologicznego badanej tkanki, ale także z wykorzystaniem konkretnych znaczników immunohistochemicznych [Caforio et al. 2015, Escher et al. 2015, Shauer et al. 2013]. W porównaniu do kryteriów Dallas metody immunohistochemiczne wykazują większą czułość oraz mają wyższą wartość prognostyczną [Frey et al. 2018, Katzmann et al. 2020].

Terapia zapaleń mięśnia sercowego zależy od etiologii schorzenia i zasadniczo strategię postępowania wyznaczane są przez wytyczne ESC [McDonagh et al. 2021]. U pacjentów skąpoobjawowych, z niewielkim stopniem uszkodzenia lewej komory, proces chorobowy zazwyczaj ustępuje samoistnie, bez zastosowania specyficznego leczenia [Caforio et al. 2007]. Zdecydowanie gorzej rokują pacjenci z zaznaczoną niewydolnością serca, zwłaszcza jeśli dotyczy ona zarówno lewej, jak i prawej komory. Uważa się, że chorzy z takim obrazem klinicznym są wysoce zagrożeni nagłym zgonem sercowym lub koniecznością wykonania przeszczepu serca. Istnieje kilka zaaprobowanych terapii celowanych zapaleń mięśnia sercowego [Schultheiss et al. 2011], a w celu dobrania odpowiedniej z nich konieczne jest wykonanie badań immunohistochemicznych i molekularnych materiału biopsyjnego mięśnia sercowego, a także oznaczenie przeciwciał w surowicy krwi obwodowej [Dennert et al. 2008, Rose 2009]. Sama terapia natomiast jest najskuteczniejsza, gdy zostanie rozpoczęta we wczesnym stadium choroby, co podkreśla wagę możliwie wczesnego wykonywania EMB [Gil et al. 2016].

Pacjenci w stanie ogólnym stabilnym, u których podejrzewa się zapalenie mięśnia sercowego, powinni być hospitalizowani celem jego potwierdzenia lub wykluczenia, a także przeprowadzenia pełnej diagnostyki różnicowej. Chorzy z rozpoznaniem zapaleniem mięśnia sercowego zobowiązani są do unikania wysiłku fizycznego przynajmniej przez pół roku od pierwszych objawów choroby w związku z możliwością wystąpienia groźnych zaburzeń rytmu serca, potencjalnie zagrażających życiu. Leczy się ich przy użyciu leków diuretycznych, inhibitorów konwertazy angiotensyny lub blokerów receptora dla angiotensyny oraz beta-blokerów. W wypadku braku optymalnego efektu po zastosowaniu powyższej terapii, można dołączyć lek z grupy antagonistów aldosteronu. Obecnie możliwa jest także modyfikacja terapii z zastosowaniem nowych leków stosowanych w terapii niewydolności serca, jak sakubitryl/walsartan i flozyny.

### 3.2.2. Parwovirus B19

Obecnie najczęściej podejrzewanym o indukcję MC wirusem jest parwovirus B19. Jest on małym, bezosłonkowym wirusem DNA, posiadającym jedną nić materiału genetycznego [Young et Brown 2004]. Średnicę wirusa określa się na 23-26 nm. Jest on pierwszym poznany patogenem z rodziny *Parvoviridae* i zarazem najczęściej wykrywanym wirusem w preparatach biopsyjnych mięśnia sercowego [Rigopoulos et al. 2019]. Ponadto B19V często występuje w tkankach odpowiedzialnych za hemopoezę, a także można go znaleźć w wątrobie, mózgu i skórze właściwej [Adamson-Small et al. 2014]. Parwovirus B19 odpowiada również za wywoływanie częstej choroby zakaźnej wieku dziecięcego, zwanej rumieniem zakaźnym lub chorobą piątą. Niejednokrotnie opisywano wysoką prewalencję B19V w sercach pacjentów z DCM, postulowano także powiązanie go z indukcją kardiomiopatii połogowej [Bültmann et al. 2005]. Dlatego też oczywiste były próby powiązania obecności B19V z indukcją samego procesu chorobowego, doprowadzającego do uszkodzenia mięśnia sercowego. Znajomość patomechanizmu jego przebiegu pozostaje ograniczona, wiadomo natomiast, że genomy B19V są wykrywane w komórkach śródbłonna naczyniowego, gdzie wirus może modulować przebieg procesu zapalnego i apoptozy, nie ma ich natomiast w kardiomiocytach [Duechting et al. 2008, Kuffner et al. 2017]. Może to sugerować istotną rolę komponenty niedokrwiennej w indukcji kardiomiopatii pozapalnej, a sam charakter wirusa określany jest niekiedy jako waskulotropowy, związany z mikroangiopatią [Bock et al. 2010]. Jedną z koncepcji wpływu B19V na indukcję DCM jest wzbudzenie na zasadzie mimikry reakcji autoimmunologicznej, prowadzącej do patologicznej przebudowy miokardium [Kawai 1999, Kuffner et al. 2017, Van Linthout et al. 2020]. Obecność DNA B19V można stwierdzić długo po przebyciu infekcji pierwotnej [Juhl et al. 2014, Molenaar-de Backer et al. 2016]. Uważa się, że koinfekcja B19V z innym wirusem kardiotropowym (np. EV, HAdV, czy HHV-6) jest zjawiskiem stosunkowo częstym i może pogarszać przebieg infekcji, prawdopodobnie przez reaktywację replikacji B19V i tym samym wzmacnianie specyficznej odpowiedzi immunologicznej [Bock et al. 2014, Rohayem et al. 2001]. Tego typu zjawisko może predysponować do rozwoju przewlekłej dysfunkcji lewokomorowej, a aby je

zidentyfikować, coraz częściej wykrywa się parwowirusowe mRNA powstające w procesie transkrypcji [Lai et al. 2015, Pietsch et al. 2020].



### 3.3. Kardiomiopatia rozstrzeniowa

Kardiomiopatia rozstrzeniowa jest heterogenną grupą chorób serca związanych z poszerzeniem jamy lewej komory oraz często z upośledzeniem funkcji skurczowej [Imanaka-Yoshida 2020]. DCM to najbardziej rozpowszechniona spośród wszystkich kardiomiopatii – zarówno pierwotnych, jak i wtórnych. Jest także najczęstszą przyczyną niewydolności u młodych osób kwalifikowanych do przeszczepu serca [Bogomolovas et al. 2016]. Bardzo często w jej przebiegu dochodzi do nagłego zgonu sercowego [Lakdawala et al. 2013, McNamara et al. 2011]. Śmiertelność 5-letnią w przebiegu tej choroby określa się na 20-50%. DCM charakteryzuje się poszerzeniem lewej i niekiedy także prawej komory serca oraz upośledzeniem funkcji skurczowej lub rozkurczowej lewej komory. Przyjmuje się, że około 30-50% przypadków kardiomiopatii rozstrzeniowej może mieć charakter dziedziczny. Wiadomo, że za wykształcenie fenotypu DCM mogą być odpowiedzialne setki mutacji w ponad 50 *loci*. Mutacje te najczęściej występują w genach kodujących titynę, laminę A lub C, łańcuch ciężki beta i alfa miozyny oraz troponinę T [Reichart et al. 2019]. DCM może być także spowodowana nadużywaniem alkoholu, stosowaniem narkotyków (kokaina i metamfetamina), narażeniem na inne toksyny, może rozwijać się w wyniku zaburzeń metabolicznych lub endokrynologicznych oraz w przebiegu zapalenia mięśnia sercowego, często o etiologii wirusowej. Raportowano, że 9-50% przypadków kardiomiopatii rozstrzeniowej towarzyszy obecność stanu zapalnego w miokardium [Bracamonte-Baran et al. 2017]. Wiadomo, że podstawą nieregularnej architektury mięśnia sercowego w DCM są zmiany w strukturze i składzie kardiomiocytów. Prowadzą one do przebudowy mięśnia sercowego, wskutek czego dochodzi do zwiększenia ciśnienia rozkurczowego, co pociąga za sobą poszerzenie lewej komory. W pierwszym okresie choroby aktywowane zostają mechanizmy kompensujące, które zgodnie z prawem Franka-Starlinga utrzymują rzut serca na odpowiednim poziomie. Postępujące uszkodzenie kardiomiocytów powoduje zmniejszenie LVEF, pogorszenie funkcji rozkurczowej i wystąpienie objawów klinicznych [Lakdawala et al. 2013, Weintraub et al. 2017]. To, czy uszkodzenie komórek jest odwracalne, czy też wystąpią trwałe zmiany w obrębie błony, skutkujące nieodwracalną degradacją i śmiercią komórki, zależy

od wielu czynników, a korelacja między zmianami morfologicznymi i zmianami molekularnymi w różnych fazach progresji uszkodzenia miokardium nie została jeszcze w pełni opisana. Upośledzenie frakcji wyrzutowej lewej komory prowadzi do zwiększonego wydzielania katecholamin, zmniejszenia aktywności nerwu błędnego oraz aktywacji układu renina-angiotensyna-aldosteron. Mechanizmy molekularne leżące u podstaw przebudowy miokardium tworzą złożoną sieć szlaków sygnałowych, które są na dzień dzisiejszy nie do końca zrozumiałe. W okresie przejściowym pomiędzy MC a DCM może być obserwowany echokardiograficznie obraz przypominający kardiomiopatię restrykcyjną lub nawet przerostową, a wynikać on może z obrzęku występującego na skutek obecności stanu zapalnego. Stan ten zazwyczaj w ciągu kilku tygodni ulega konwersji do typowej rozstrzeni lewej komory [McCarthy et al. 2000]. Uważa się, że nawet 70% DCM może być wynikiem przewlekłego procesu zapalnego w obrębie miokardium, spowodowanego zazwyczaj utrzymującą się infekcją wirusową [Caforio et al. 2017, Cooper 2009, Kühl et al. 2003]. Przejście od ostrej infekcji wirusowej przez aktywne zapalenie do DCM określa się jako model wielofazowy. Kardiomiopatia pozapalna powikłana dysfunkcją lewej komory, niewydolnością serca lub arytmia wiąże się ze złym rokowaniem [Tschöpe et al. 2021]. Badania nad zmianami ultrastrukturalnymi u pacjentów ze schyłkową kardiomiopatią rozstrzeniową wykazały wzrost nasilenia włóknienia w obrębie przestrzeni zewnątrzkomórkowej, zwyrodnienie komórek mięśnia sercowego, a także zmiany w ich cytoszkielecie, które mogą wynikać między innymi z uszkodzenia lamin jądrowych. Ponadto obserwuje się upośledzenie apoptotycznej śmierci komórki i pojawienie się charakterystycznych markerów NS, takich jak struktury mieloidalne [Gupta et al. 2010, Saito et al. 2020]. DCM wywołaną przez zakażenie wirusowe określa się jako kardiomiopatię rozstrzeniową pozapalną. Może ona być indukowana zarówno przez infekcję *de novo*, jak i poprzez reaktywację zakażenia latentnego. W Europie oraz Ameryce Północnej wirusy są uznawane za najczęstszą przyczynę kardiomiopatii pozapalnej [Kühl et al. 2012, Mahrholdt et al. 2006].

### 3.4. Niewydolność serca

Wytyczne Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego, dotyczące ostrej i przewlekłej niewydolności serca, definiują ją jako zespół objawów podmiotowych (duszność i upośledzona tolerancja wysiłku fizycznego), którym mogą towarzyszyć objawy przedmiotowe (osłuchowe cechy zastojów nad polami płucnymi, poszerzenie żył szyjnych, obrzęki obwodowe). Zespół tych objawów wynika ze zmniejszenia rzutu serca i/lub podwyższenia ciśnienia wewnątrzsercowego na skutek zaburzeń funkcji skurczowej i/lub rozkurczowej mięśnia sercowego, i/lub wad strukturalnych organu [McDonagh et al. 2021].

Szacuje się, że na niewydolność serca może cierpieć nawet 1,2 miliona Polaków [Kałużna-Oleksy et al. 2020]. Jest to najczęstsza przyczyna hospitalizacji w naszym kraju, której leczenie kosztuje rocznie niemal 2 miliardy złotych [Czech et al. 2013], wykazująca bardzo niepomyślne rokowanie. Wskaźniki 5-letniej śmiertelności w niewydolności serca są wyższe niż w chorobach nowotworowych (z wyjątkiem raka płuca). W badaniu Framingham średnie przeżycie od momentu wykrycia NS wyniosło 3,2 roku u kobiet i zaledwie 1,7 roku u pacjentów płci męskiej [Ho et al. 1993]. Wśród chorych w IV stopniu wg skali NYHA, około 50% umiera w przeciągu jednego roku od rozpoznania [Karasek et al. 2008]. Uważa się, że liczba chorych z NS w krajach rozwiniętych systematycznie rośnie [Barker et al. 2006]. Do najczęstszych przyczyn niewydolności serca należą: choroba wieńcowa, nadciśnienie tętnicze, toksyczne uszkodzenie mięśnia sercowego (głównie za sprawą stosowania substancji psychoaktywnych lub leków wykazujących kardiotoxycyzość), zapalenie mięśnia sercowego oraz reakcje autoimmunologiczne. Inne istotne czynniki, które mogą zaburzać funkcjonowanie serca jako pompy, to: wady zastawkowe, ubytki w przegrodzie międzykomorowej lub międzyprzedsionkowej, choroby osierdzia, przewodnienie oraz sytuacje, w których dochodzi do zwiększenia rzutu serca, takie jak: sepsa, tyreotoksykoza, ciężka niedokrwistość oraz obecność przetoki tętniczo-żylniej. NS może być również spowodowana tachy- lub bradyarytmiami. Wszystkie powyższe przyczyny NS pierwotnie prowadzą do zwiększenia skurczowego lub objętościowego obciążenia

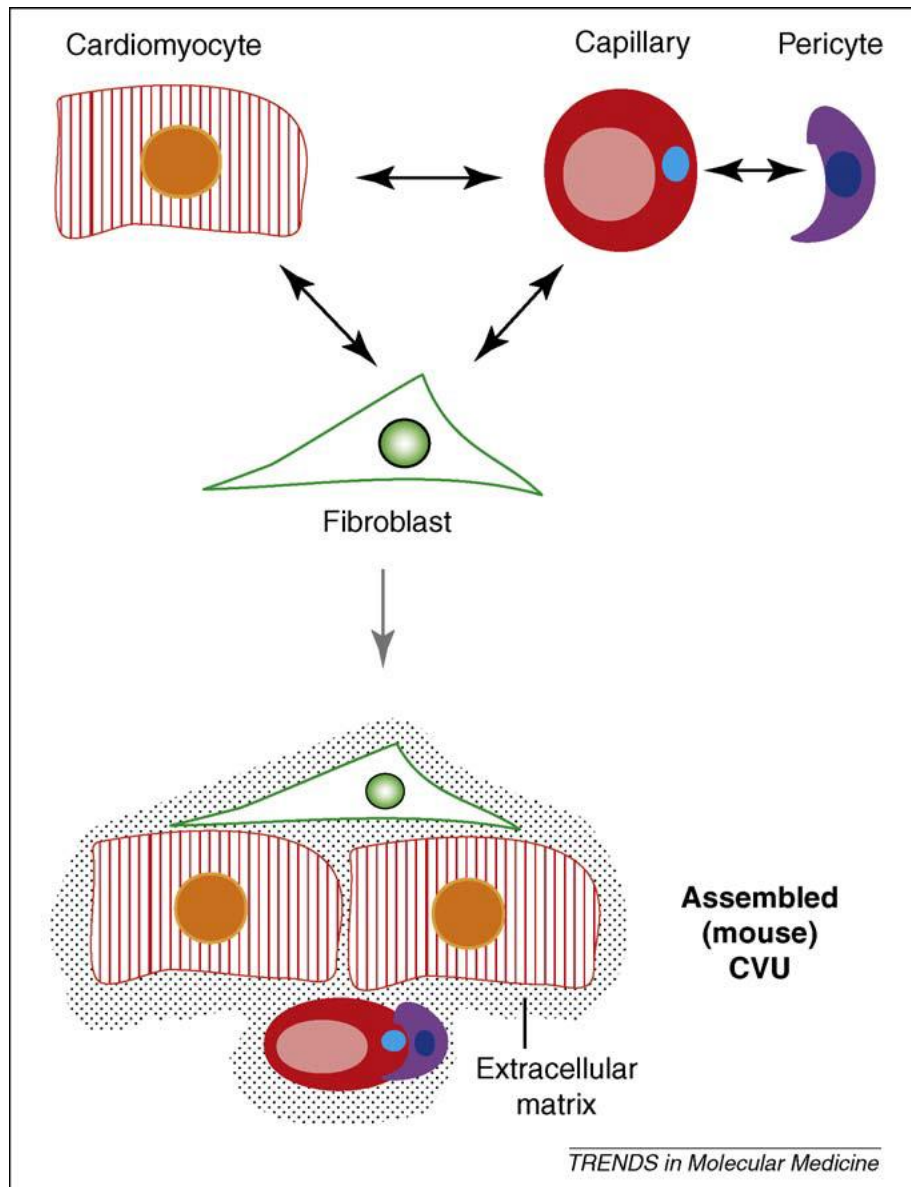
mięśnia sercowego, a dalsze etapy patologicznej przebudowy serca są podobne, niezależnie od przyczyny niewydolności [Beręsewicz et al. 2010].

Fracja wyrzutowa lewej komory to parametr opisujący sprawność serca jako pompy. Jest to stosunek objętości krwi wyrzucanej z lewej komory podczas skurczu do objętości końcoworozkurczowej lewej komory. Zgodnie z wytycznymi ESC i PTK, niewydolność serca dzieli się obecnie na postać z zachowaną frakcją wyrzutową lewej komory (LVEF  $\geq 50\%$ ), niewydolność serca z pośrednią frakcją wyrzutową lewej komory (LVEF 40-49%) oraz niewydolność serca z obniżoną frakcją wyrzutową lewej komory (LVEF  $< 40\%$ ) [McDonagh et al. 2021]. U około 50-60% pacjentów hospitalizowanych z powodu niewydolności serca stwierdzana jest upośledzona frakcja wyrzutowa  $< 40\%$  [Ambrosy et al. 2014].

### 3.5. Jednostka mięśniowo-naczyniowa

Pomimo trwających od wieków badań nad trójwymiarową architekturą serca, szczegóły organizacji kardiomiocytów w ścianie mięśnia sercowego nadal nie zostały w pełni poznane. Wiadomo, że miocyty w sercu są ułożone w sposób przypominający kształtem siatkę zawieszoną w macierzy z tkanki włóknistej [Anderson et al. 2009]. W związku z brakiem dostatecznej wiedzy na temat histogenezy mięśnia sercowego, w 2009 roku na Uniwersytecie w Padwie zaproponowano pojęcie tzw. jednostki mięśniowo-naczyniowej jako podstawowego elementu strukturalnego i funkcjonalnego mięśnia sercowego. W skład CVU wchodzi kardiomiocyty, fibroblasty oraz włosowate naczynia krwionośne wraz z pericytem (Rycina 1) [Ausoni et Sartore 2009]. Pojęcie CVU jest niejako rozwinięciem myśli funkcjonalnego połączenia kardiomiocytów z komórkami śródbłonka naczyniowego, kluczowego dla regeneracji miokardium, gdzie śródbłonek opisywany był jako element umożliwiający prawidłową organizację kardiomiocytów oraz hamujący ich apoptozę i nekrozę [Narmoneva et al. 2004]. Histologiczny rozwój serca związany jest z dwoma zdarzeniami: wzrostem wielkości kardiomiocytów oraz polaryzacją i organizacją prawidłowego unaczynienia. W zdarzeniach tych biorą udział zmiany ciśnienia i sił ścinających, zachodzące w układzie krążenia zarówno w trakcie życia płodowego, jak i po urodzeniu. Na modelu mysim wykazano, że białka połączeń międzykomórkowych zmieniają swoje rozmieszczenie z układu zorientowanego na pojedyncze kardiomiocyty - na tryb bipolarny. Dochodzi tu także do zmian w dystrybucji białek macierzy zewnątrzkomórkowej, umożliwiających jednokierunkowy skurcz komórek [Hirschy et al. 2006]. Jednocześnie kardiomiocyty łączą się ze sobą, tworząc pasma podnasilczowe i podwielczowe, które są połączone spiralnie, podczas gdy kardiomiocyty agregujące w środkowej części ściany komory są ułożone w sposób kołowy [Bartman et Hove 2005]. Kardiomiocyty wszystkich warstw otaczane są kolagenem śródmięśniowym, który stanowi rusztowanie dla naczyń krwionośnych i fibroblastów. Układ naczyń włosowatych i kardiomiocytów stopniowo osiąga regularną strukturę, która umożliwia prawidłowy rozkład sił biomechanicznych, co przyczynia się do ostatecznego kształtowania CVU. Kardiomiocyty i naczynia włosowate układają się równolegle, a u dorosłego człowieka stosunek liczby komórek mięśniowych do kapilar

jest bliski 1:1 [Brutsaert 2003], natomiast stosunek liczby fibroblastów do komórek mięśniowych jest zmienny [Banerjee et al. 2006].



Rycina 1. Schemat budowy jednostki mięśniowo-naczyniowej. Rycinę zaczerpnięto z publikacji „The cardiovascular unit as a dynamic player in disease and regeneration.” [Ausoni et Sartore 2009].

Celem wprowadzenia koncepcji CVU jest dążenie do pełnego poznania możliwości regeneracyjnych mięśnia sercowego i wykrycie możliwości wpływu na nie, w drodze do zwiększenia skuteczności terapii niewydolności serca. Okazuje się, że to komórki śródmięszowe i naczynia kapilarne kontrolują proliferację, wzrost i różnicowanie kardiomiocytów, nie tylko w fazie rozwoju osobniczego, ale także

w warunkach patologicznych [Ieda et al. 2009, Thum et al. 2008]. W reakcjach tych pośredniczą szlaki sygnałowe, wciąż słabo poznane, które mogą się stać w przyszłości głównym punktem uchwytu umożliwiającym wpływ na kardiogenezę w dorosłym, uszkodzonym sercu. Wykazywano także istotne znaczenie dla regeneracji miokardium tzw. krążących komórek angiogennych, pochodzących ze szpiku kostnego [Bearzi et al. 2009, Schmidt-Lucke et al. 2015]. Niewątpliwie wszystkie komórki mięśnia sercowego są ważne dla homeostazy tkanek i mogą wzajemnie wpływać na siebie w rozwoju, chorobie oraz w procesie regeneracji mięśnia sercowego, jednakże funkcja jednostki mięśniowo-naczyniowej nie została dotychczas w pełni scharakteryzowana. Wiedza co do zmian patologicznych zachodzących w jej obrębie w przebiegu różnych chorób jest mocno ograniczona i pochodzi w znacznej przewadze z modeli zwierzęcych. W procesie starzenia się tkanki mięśnia sercowego następuje zmniejszenie objętości kardiomiocytów oraz gromadzenie produktów stresu oksydacyjnego, co prowadzi do zwiększenia aktywności autofagii [Pazolli et al. 2008]. Starzejące się kardiomiocyty są często wielojądrowe i wykazują ekspresję inhibitorów cyklu komórkowego p53 i p16INK4a. Mają także krótsze telomery oraz bywają poliploidalne [Chimenti et al. 2003]. Śmierć uszkodzonych kardiomiocytów jest kompensowana przez przerost pozostałych. W literaturze opisywano także niewielką możliwość odbudowy komórek mięśnia sercowego w warunkach homeostazy [Bergmann et al. 2009]. Sieć naczyń krwionośnych nie ulega zazwyczaj istotnym zmianom, natomiast fibroblasty tracą z wiekiem swój potencjał migracyjny, proliferacyjny oraz upośledzona zostaje funkcja produkcji białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Z wyników badań histologicznych wiemy, że w przebiegu patologii toczących się w miokardium, takich jak różne postacie zapalenia mięśnia sercowego i kardiomiopatia rozstrzeniowa, możemy w obrębie CVU zaobserwować przerost kardiomiocytów, zaburzenia integralności linii Z, wzrost liczby fibroblastów, nasilone włóknienie przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz wzmożoną, często nieprawidłową angiogenezę [Dominguez et al. 2016, Yun et al. 2021]. Komórki mięśnia sercowego mogą być uszkodzane w wyniku reakcji autoimmunologicznej skierowanej przeciwko łańcuchom miozyny, wykazującym strukturalne podobieństwo do białek wirusa, przeciwko którym skierowana jest odpowiedź limfocytów T [Trachtenberg et al. 2017]. W przebiegu patologii spowodowanych przez parwowirusa

B19 często obserwowana była apoptoza komórek śródbłonna naczyniowego, która może być skutecznie hamowana wskutek leczenia interferonem beta [Schmidt-Lucke et al. 2010, Van Linthout et al. 2018]. B19V indukuje uszkodzenie komórek poprzez ich lizę podczas procesu replikacji lub przez ekspresję cytotoksycznych genów [Guan et al. 2008]. W wyniku innych infekcji wirusowych, w tym także w przebiegu COVID-19, opisywano nekrozę kardiomiocytów i obrzęk komórek śródbłonna naczyniowego [Fox et al. 2020].



## **4. Cele pracy**

### **4.1. Podstawowy cel pracy**

Celem pracy była analiza zmian ultrastrukturalnych poszczególnych elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej w przebiegu infekcji mięśnia sercowego parwowirusem B19.

### **4.2. Dodatkowe cele pracy**

- Opracowanie schematu zmian zachodzących w mięśniu sercowym w przebiegu infekcji parwowirusem B19.
- Określenie, czy istnieje korelacja zmian w morfologii jednostki mięśniowo-naczyniowej w zależności od: liczby kopii parwowirusa B19 w EMB, klinicznego stanu chorych, wyników badania echokardiograficznego oraz wyników badań laboratoryjnych.

## 5. Innowacyjność rozprawy doktorskiej

1. Badanie uwzględnia jednocześnie dane kliniczne, wyniki badań laboratoryjnych i obrazowych, testy z zakresu biologii molekularnej oraz wyniki badań ultrastrukturalnych mięśnia sercowego.
2. Analizie poddano bardzo dużą bazę materiału pochodzącego z biopsji mięśnia sercowego wykonanych u ludzi. Należy zauważyć, że dotychczas zdecydowana większość badań dotyczących wpływu wirusów na komórki i tkanki została wykonana na materiale pochodzącym od zwierząt oraz na hodowlach komórkowych.
3. Badanie identyfikuje najważniejsze zmiany w budowie ultrastrukturalnej mięśnia sercowego zachodzące w wyniku infekcji parwowirusem B19 oraz określa ich zależność od liczby kopii parwowirusa B19, frakcji wyrzutowej lewej komory, jej wymiaru końcoworozkurczowego oraz od wybranych parametrów klinicznych i laboratoryjnych.
4. Opracowano po raz pierwszy schemat zmian zachodzących w przebiegu infekcji parwowirusem B19 w mięśniu sercowym.

## 6. Metodyka

### 6.1. Dane medyczne i badana populacja

Badaną populację stanowią chorzy, którzy byli hospitalizowani w Klinice Kardiologii Inwazyjnej Centralnego Szpitala Klinicznego MSWiA w Warszawie w latach 2010-2017 w związku z przebytych epizodem infekcji grypopodobnej (zakażenie dróg oddechowych, gorączka, duszność) oraz co najmniej jedną z następujących cech, niezwiązanych z niedokrwieniem mięśnia sercowego: upośledzona globalna lub regionalna czynność skurczowa lewej komory, podwyższone stężenie markerów martwicy mięśnia sercowego w surowicy krwi lub nieutrwalony/utrwalony częstoskurcz komorowy lub migotanie komór o nieznanym przyczynie. Jednym z elementów postępowania diagnostycznego u tych chorych było pobranie biopsji mięśnia lewej komory serca celem poszerzenia diagnostyki przyczyn wystąpienia objawów niewydolności serca. Ponadto pobrano od nich krew bezpośrednio z jamy lewej komory serca, a także z naczynia obwodowego, celem oznaczenia obecności DNA/RNA wirusowego w badaniu RT-PCR. Często byli to pacjenci z wywiadem dolegliwości bólowych w klatce piersiowej. Dostęp do danych medycznych uzyskano dzięki uprzejmości dr hab. Agnieszki Pawlak, która jest inicjatorką i koordynatorką wspólnego projektu badań prowadzonych we współpracy Kliniki Kardiologii Inwazyjnej CSK MSWiA z Pracownią Badań Mikroskopowo-Elektronowych Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk oraz z Zakładem Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

W celu oceny stanu chorych, jak i zaawansowania niewydolności serca, były wykonywane badania, które wchodziły w zakres rutynowej diagnostyki pacjentów w Klinice Kardiologii Inwazyjnej CSK MSWiA. Początkowo wszyscy pacjenci hospitalizowani w Klinice z powodu NS zostali poddani diagnostyce nieinwazyjnej. W chwili przyjęcia do szpitala została od nich pobrana krew do badań laboratoryjnych, w tym do oznaczenia N-końcowego peptydu natriuretycznego typu B, który jest markerem niewydolności mięśnia sercowego. Pacjentów oceniano wg skali NYHA pod kątem nasilenia objawów niewydolności układu krążenia. Skala ta jest uznanym

narzędziem do oceny zaawansowania objawów niewydolności układu krążenia, ponadto jest dobrym wskaźnikiem oceny rokowania chorych z niewydolnością serca [Briongos-Figuero et al. 2020]. Wszyscy pacjenci mieli także wykonaną koronarografię w celu oceny ewentualnej obecności oraz istotności przewężeń w nasierdziowych tętnicach wieńcowych. Stan kliniczny oraz rozpoznania wstępne postawione pacjentom uwzględnionym w niniejszym badaniu wymagały poszerzenia diagnostyki o kolejną metodę inwazyjną, którą było pobranie biopsji endomiokardialnej mięśnia lewej komory. Na wszystkie procedury inwazyjne chorzy wyrazili pisemnie świadomą zgodę.

Badana populacja liczyła 135 pacjentów i wyodrębniono z niej grupę **B19V** (n=38) - pacjenci ze stwierdzoną obecnością B19V bioptacie miokardium, u których nie wykryto obecności wirusów w materiale innym niż EMB, czyli w surowicy krwi obwodowej lub surowicy krwi pobranej bezpośrednio z jamy lewej komory. Za grupę kontrolną **K** (n=5) przyjęto chorych z rozstrzenią lewej komory (LVEDd >58 mm u mężczyzn i >52 mm u kobiet [Płońska-Gościniak et al.]) z zachowaną frakcją wyrzutową, u których nie stwierdzono obecności materiału genetycznego wirusów w żadnym z badanych materiałów. Utworzenie grupy kontrolnej z osobników zdrowych jest niewykonalne z powodu braku możliwości przyżyciowego pobrania materiału biopsyjnego od takiej grupy ze względów etycznych.

Sprawdzono, czy istnieje bezpośrednia korelacja pomiędzy frakcją wyrzutową lewej komory a liczbą kopii parwowirusa B19 w badanym materiale oraz dokonano opisu zmian ultrastrukturalnych, które zostały zaobserwowane w mikroskopii elektronowej, w zależności od kopijności parwowirusa B19. Grupy wyróżniane w tym etapie badań to:

- <500 kopii parwowirusa B19,
- 500-5000 kopii parwowirusa B19,
- >5000 kopii parwowirusa B19.

W tej części badania analizowano także zmiany ultrastruktury jednostki mięśniowo-naczyniowej w zależności od nasilenia objawów niewydolności serca, wymiaru końcoworozkurczowego i frakcji wyrzutowej lewej komory, poziomu NT-proBNP i troponiny I.

W dalszym etapie projektu chorych z grupy B19V podzielono na 4 grupy badane na podstawie liczby kopii parwowirusa B19 wykrytych w bioptatach miokardium oraz w zależności od zachowanej bądź nieprawidłowej (upośledzonej lub pośredniej) frakcji wyrzutowej lewej komory [McDonagh et al. 2021]:

- **G1** (n=15) – liczba kopii B19V  $<5000^1$  i LVEF  $<50\%$
- **G2** (n=9) – liczba kopii B19V  $<5000^1$  i LVEF  $\geq 50\%$
- **G3** (n=5) – liczba kopii B19V  $\geq 5000^1$  i LVEF  $<50\%$
- **G4** (n=9) – liczba kopii B19V  $\geq 5000^1$  i LVEF  $\geq 50\%$

Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną CSK MSWiA w Warszawie.

---

<sup>1</sup> Poziom kopijności B19V w przeliczeniu na  $10^6$  kopii genu G6PD

## 6.2. Diagnostyka nieinwazyjna

- 1) Badania laboratoryjne z krwi obwodowej: morfologia krwi obwodowej, NT-proBNP, troponina I, CRP, prokalcytonina, poziom mocznika, kreatyniny, sodu, potasu, glukozy, cholesterolu całkowitego, LDL, HDL i trójglicerydów, bilirubina, aminotransferaza asparaginianowa (AST), aminotransferaza alaninowa (ALT), kinaza fosfokreatynowa (CPK), frakcja sercowa kinazy kreatynowej (CK-MB), hormon tyreotropowy (TSH), wolna tyroksyna (fT3) i trójiodotyronina (fT4). Badania laboratoryjne zostały wykonane zgodnie z procedurami Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej CSK MSWiA. W niniejszym opracowaniu uwzględniono wyniki badań uzyskane z próbek pobranych w trakcie przyjmowania chorych do Kliniki Kardiologii Inwazyjnej.
- 2) Echokardiografia przezklatkowa: u wszystkich pacjentów wykonano kompleksowe badanie z zastosowaniem ultrasonografu wyposażonego w przetwornik 3.5-MHz (iE33, Philips). Wszystkie pomiary wykonane zostały zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego przez zespół doświadczonych echokardiografistów. Do oceny frakcji wyrzutowej lewej komory wykorzystano metodę Simpsona. Bardzo istotnym pod kątem prowadzonych badań pomiarem w badaniu echokardiograficznym była końcoworozkurczowa szerokość jamy lewej komory. W projekcie brano pod uwagę wynik pierwszego badania echokardiograficznego po przyjęciu do szpitala.

### 6.3. Diagnostyka inwazyjna

- 1) Koronarografia – selektywna angiografia niasierdziowych tętnic wieńcowych wykonywana była z dostępu promieniowego lub udowego z podaniem kontrastu jodowego. W przypadku zmian o granicznej istotności, badanie uzupełniono o pomiar cząstkowej rezerwy przepływu wieńcowego lub ultrasonografię wewnątrzwieńcową. Badania wykonywane były przy użyciu angiografu Toshiba Infinix CF-i.
- 2) Biopsja mięśnia sercowego – zabieg wykonywano z dostępu udowego. Biopaty pobierano z wolnej ściany lewej komory (ze względu na udowodnioną przewagę biopsji lewokomorowej nad prawokomorową w aspekcie czułości wykrywania wirusowego materiału genetycznego [Kühl et Schultheiss 2012]), według zaleceń europejskiego i amerykańskiego towarzystwa kardiologicznego, u każdego pacjenta 7-8 próbek. Optymalnie pobiera się próbki o wymiarach 1-2 mm<sup>3</sup> [Parillo et al. 1984] z kilku miejsc, w celu osiągnięcia wyższego poziomu czułości wykrywania stanu zapalnego oraz materiału wirusowego [Mahrholdt et al. 2004, Stewart et al. 2011]. 3 lub 4 biopaty utrwała się w 10% roztworze formaliny do badań w mikroskopii świetlnej, 1 lub 2 próbki mrozi się w -80°C celem diagnostyki molekularnej metodą PCR i 1-2 należy utrwalić w 2,5% aldehydzie glutarowym lub roztworze Karnovsky'ego dla badań ultrastrukturalnych [Leone et al. 2012]. Materiał pobierano przy użyciu bioptomu 7F (Cordis, Johnson&Johnson). Procedurę przeprowadzono przy ciągłym monitorowaniu zapisu EKG, pod kontrolą skopii RTG. Każdy pacjent miał po zabiegu wykonane kontrolne badanie echokardiograficzne. Wszyscy pacjenci podpisali formularz świadomej zgody na zabieg, a badania przeprowadzono zgodnie z Deklaracją Helsińską.

#### 6.4. Diagnostyka materiału biopsyjnego

- 1) Histopatologia – materiał biopsyjny barwiono hematoksyliną i eozyną oraz trichromem Massona wg klasycznej metody. Próbki oceniano pod kątem zapalenia mięśnia sercowego za pomocą kryteriów Dallas. Analizowano także nasilenie włóknienia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Badania wykonano w Zakładzie Patomorfologii CSK MSWiA.
- 2) Immunohistochemia – pobrany materiał oceniano wg kryteriów WHO. Lokalizację i identyfikację nacieków komórek jądrzastych oznaczono za pomocą przeciwciał przeciwko antygenom leukocytarnym LCA, CD3, CD4, CD8 i CD68 firmy DAKO. Znakowanie wykonano systemem EnVision HRP (Dako), zgodnie z zaleceniami producenta. Diagnostykę immunohistochemiczną wykonano także w Zakładzie Patomorfologii CSK MSWiA.
- 3) qPCR i RT-qPCR – wirusowe kwasy nukleinowe izolowano z dwóch próbek biopsyjnych (20-50µg tkanki) mięśnia sercowego zamrożonych w ciekłym azocie oraz z surowicy krwi obwodowej, a także surowicy krwi pobranej z jamy lewej komory serca (5-10ml krwi pobranej na EDTA) w trakcie wykonywania EMB. Izolację DNA i RNA wykonano za pomocą zestawu NucleoSpin (Macherey-Nagel) dla DNA i zestawu NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) dla RNA oraz z surowicy krwi za pomocą zestawu High Pure Viral Nucleic Acids Kit (Roche Diagnostics). Wyizolowany RNA został przepisany na cDNA za pomocą losowych heksametrów oraz odwrotnej transkryptazy MMLV (Invitrogen). Uzyskane DNA oraz cDNA zostało użyte jako szablony do wykrycia następujących genomów wirusowych: CMV, EBV, HHV-6, HAdV, B19V oraz EV. Wszystkie procesy zostały przeprowadzone ze starterami specyficznymi dla ludzkiej dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej z późniejszym przeliczeniem na liczbę kopii genu G6PD podniesioną do potęgi szóstej. Procedury przeprowadzono zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producentów zestawów w Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.
- 4) Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) – materiał pobrany metodą biopsji utrwalano kolejno w 2% paraformaldehydzie, 2,5% aldehydzie glutarowym,



w buforze kakodylanowym oraz w 1% tetratlenku osmu z żelazicyjankiem potasu przez 2 godziny. Próbki następnie odwodniono w szeregu etanolu i zatopiono w żywicy. Ultracienkie skrawki barwiono octanem uranylu i cytrynianem ołowiu i oceniano w mikroskopie JEM 1011, Jeol. Pomiarów szerokości przestrzeni międzykomórkowych dokonywano przy użyciu oprogramowania iTEM (Olympus) w Pracowni Badań Mikroskopowo-Elektronowych IMDiK PAN (Tabela 1).

Tabela 1. Zastosowane metody diagnostyki materiału biopsyjnego

<b>Analiza bioptatów</b>	<b>Przedmiot analizy</b>
Barwienie HE	Ocena morfologiczna kardiomiocytów. Ocena obecności nacieku zapalnego.
Trichrom Massona	Obecność i nasilenie włóknienia.
Przeciwciała anty CD3	Identyfikacja limfocytów T.
Przeciwciała anty CD4	Identyfikacja limfocytów T pomocniczych.
Przeciwciała anty CD8	Identyfikacja limfocytów T cytotoksycznych.
Przeciwciała anty CD68	Identyfikacja makrofagów.
Przeciwciała anty LCA	Identyfikacja wszystkich leukocytów.
Przeciwciała anty CD31	Znakowanie śródbłonna naczyniowego.
RT-PCR	Wykrywanie obecności i ocena liczby genomów wirusowych.
Transmisyjna mikroskopia elektronowa	Ocena ultrastrukturalna CVU.

## 6.5. Metody statystyczne

Wyniki zebrane w toku prowadzenia badań przedstawiono w tabelach i na wykresach. Dla każdej cechy ilościowej obliczono podstawowe miary statystyczne, tj. średnią arytmetyczną ( $\bar{x}$ ), medianę (Me), wartość minimalną (min), maksymalną (max), odchylenie standardowe (sd) oraz współczynnik zmienności (V). Natomiast cechy jakościowe zaprezentowano w formie liczebności (N) i frakcji procentowych (%). Normalność rozkładu każdej cechy została oceniona z wykorzystaniem testu Shapiro-Wilka. Ze względu na to, że charakter większości analizowanych zmiennych odbiegał od normalnego, zdecydowano się na nieparametryczne testy istotności. Do oceny istotności różnic pomiędzy grupami zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa oraz test post-hoc Duncana. Przy porównaniach dwóch grup stosowano test U Manna Whitneya. Dla cech jakościowych zastosowano test niezależności  $\chi^2$  celem określenia zależności pomiędzy przynależnością do grupy a rozkładem frakcji poszczególnych zmiennych. Dla wartości procentowych zastosowano test dla dwóch frakcji. Statystycznie za istotne uznano zmiany na poziomie istotności  $\alpha=0,05$ . Analizę statystyczną wykonano w środowisku programistycznym GNU R.

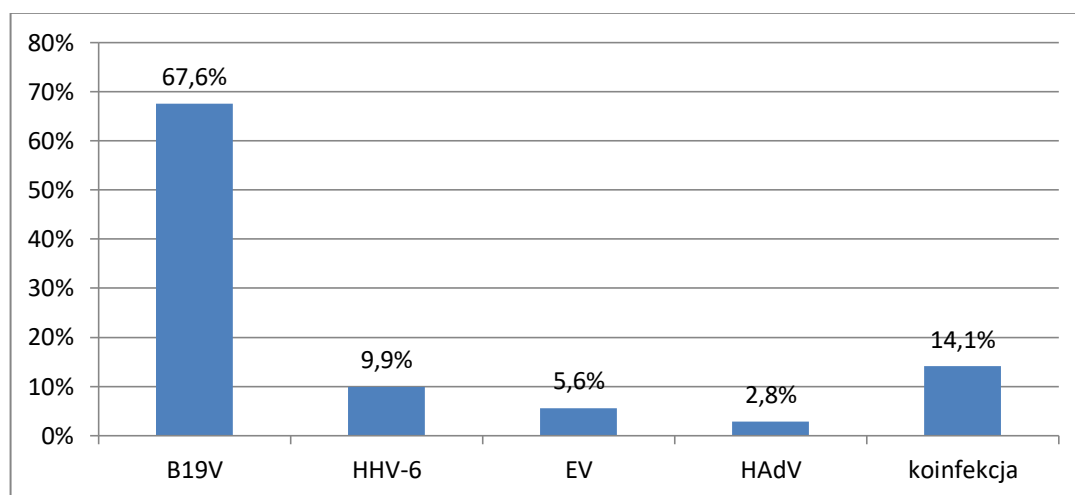
Analiza danych w zakresie grup G1, G2, G3 i G4 była prowadzona dwuetapowo. Najpierw za pomocą testu Kruskala-Wallisa sprawdzano, czy istnieje różnica pomiędzy którymkolwiek z tych grup, a następnie przy użyciu testu post hoc Duncana identyfikowano pary, w których różnice są istotne statystycznie.

## 7. Wyniki

### 7.1. Charakterystyka populacji

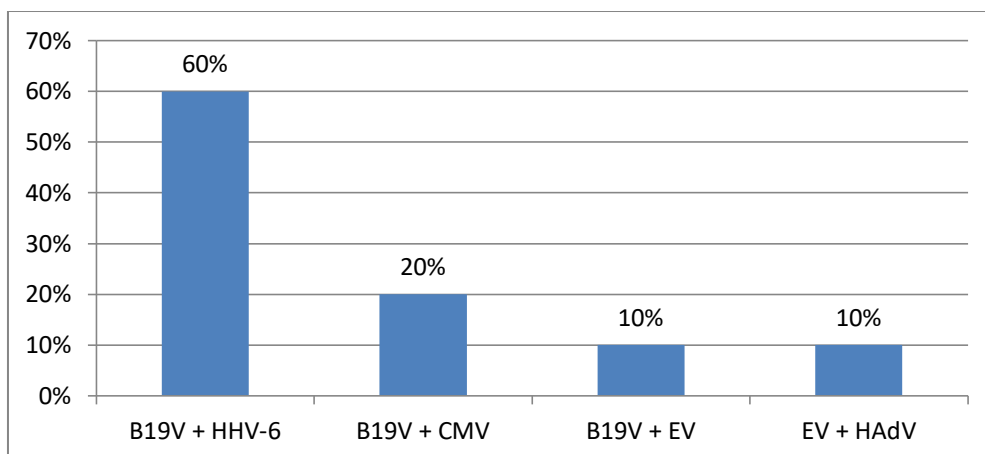
Pacjenci z wykrytym DNA/RNA dowolnego wirusa istotnie różnili się od chorych, u których nie wykryto materiału genetycznego wirusów w EMB pod względem wieku i wymiaru końcoworozkurczowego lewej komory. Pacjenci, u których wykryto materiał genetyczny wirusów, byli istotnie młodsi od grupy przeciwnej ( $p=0,0022$ ), a szerokość ich komory była istotnie mniejsza ( $p=0404$ ).

Materiał genetyczny wirusa został wykryty w 71 (52,6%) bioptatach mięśnia sercowego pobranych od ww. pacjentów. Wśród oznaczonych wirusów dominował B19V, który został wykryty w 48 próbkach (67,6% wyników pozytywnych), HHV-6 został wykryty w 7 bioptatach (9,9% próbek pozytywnych), EV w 4 (5,6%), a HAdV w 2 (2,8%) (Rycina 2).



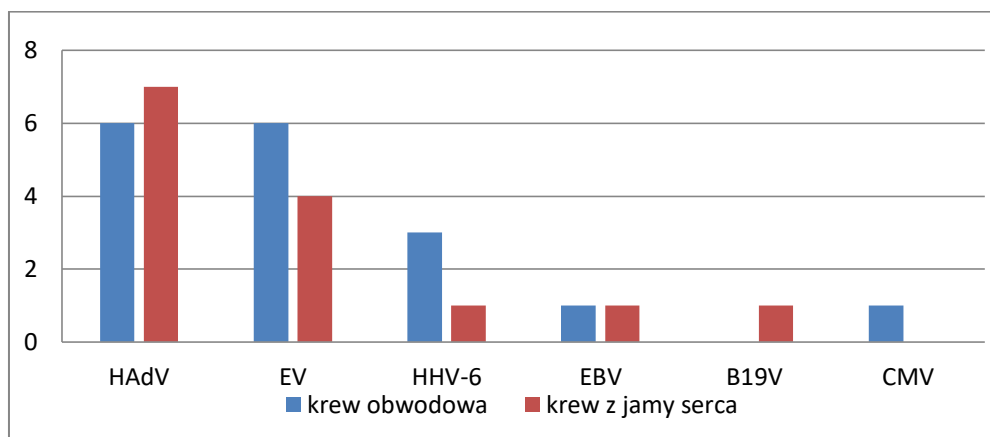
Rycina 2. Częstość występowania materiału genetycznego wirusów w EMB

W części badanego materiału stwierdzono współwystępowanie kwasów nukleinowych dwóch typów wirusa. Sytuację taką odnotowano w przypadku 10 bioptatów miokardium (14,1%) (Rycina 2). Najczęstszą koinfekcją była B19V+HHV-6 – 6 próbek (60% koinfekcji), obserwowano także 2 przypadki współwystępowania B19V i CMV (20%) oraz po jednym B19V+EV i EV+HAdV (po 10%) (Rycina 3).



Rycina 3. Częstość występowania poszczególnych koinfekcji

Oznaczano również wirusowe DNA/RNA w surowicy krwi obwodowej oraz pobranej z jamy lewej komory. Najczęściej wykrywanymi wirusami w tym materiale były HAdV – w 6 próbkach krwi obwodowej i 7 próbkach krwi pobranej z jamy lewej komory, EV – odpowiednio w 6 i 4 próbkach, HHV-6 w 3 i 1 próbce, wirus Epstein-Barr (EBV) – w 1 próbce surowicy krwi obwodowej oraz w 1 próbce krwi z lewej komory. CMV został wykryty w 1 próbce surowicy krwi obwodowej, a B19V w 1 próbce krwi z jamy serca (Rycina 4).



Rycina 4. Materiał genetyczny wirusów w surowicy krwi obwodowej oraz krwi z jamy lewej komory

## 7.2. B19V vs grupa kontrolna

Dalszej analizie poddano pacjentów, u których wykryto wyłącznie DNA B19V w materiale biopsyjnym i jednocześnie nie wykryto materiału genetycznego żadnego z wirusów w surowicy krwi obwodowej oraz krwi pobranej bezpośrednio z jamy serca (n=38).

### 7.2.1. Parametry antropometryczne

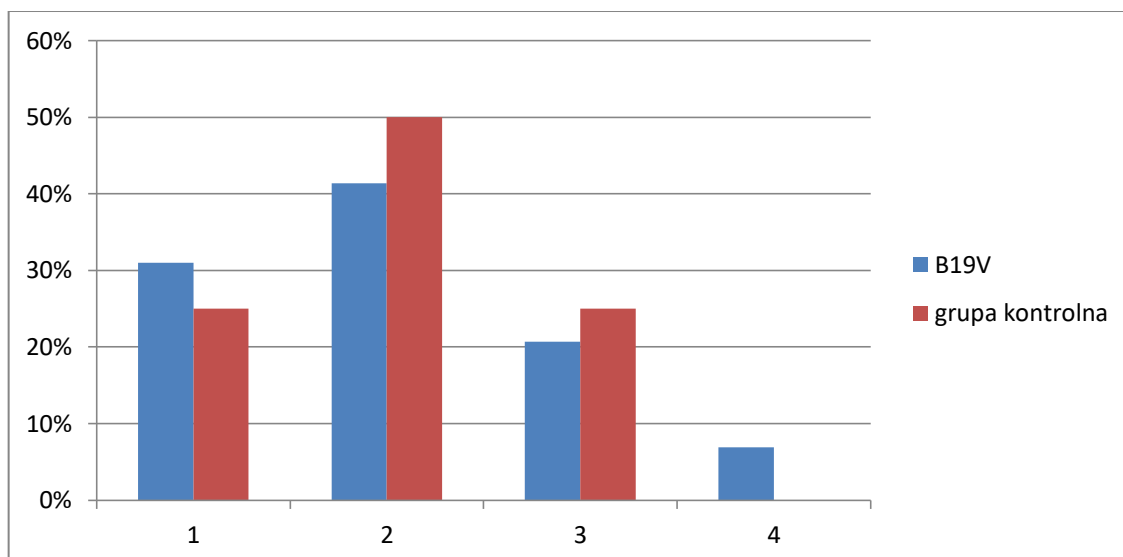
Na podstawie wykonanej analizy parametrów antropometrycznych nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy pacjentami z grupy badanej i z grupy kontrolnej pod względem wieku, wzrostu, masy ciała oraz BMI (Tabela 2).

Tabela 2. Wiek, wzrost, masa ciała, BMI

Zmienna	Grupa	N	x	Me	sd	V	min	max	p
wiek	B19V	38	42,0	43,0	12,3	29,2	19,0	65,0	<b>0,353</b>
	K	5	49,0	45,0	17,8	36,4	25,0	73,0	
wzrost	B19V	21	1,7	1,8	0,1	5,5	1,5	1,9	<b>0,381</b>
	K	3	1,8	1,8	0,1	5,5	1,6	1,8	
masa ciała	B19V	19	86,9	80,0	20,7	23,8	61,0	126,0	<b>0,886</b>
	K	3	85,0	86,0	4,6	5,4	80,0	89,0	
BMI	B19V	20	29,4	28,2	5,5	18,6	21,5	42,4	<b>0,681</b>
	K	3	27,9	27,2	3,7	13,3	24,7	32,0	

### 7.2.2. Objawy niewydolności układu krążenia

Pacjenci z grupy B19V i z grupy kontrolnej nie różnili się istotnie pod względem nasilenia objawów niewydolności serca ocenianych wg skali NYHA. W obydwu grupach dominowali chorzy z objawami w stopniu II w skali NYHA, odpowiednio 41,4% pacjentów w grupie B19V oraz 50% chorych w grupie kontrolnej (Rycina 5 oraz Tabela 3).



Rycina 5. Nasilenie objawów NS wg skali NYHA ( $p > 0,05$ )

Tabela 3. Objawy podmiotowe i przedmiotowe

	B19V		K		p
	N	%	N	%	
<b>nasilenie objawów wg skali NYHA</b>					
<b>1</b>	9	31,0	1	25	<b>0,982</b>
<b>2</b>	12	41,4	2	50	
<b>3</b>	6	20,7	1	25	
<b>4</b>	2	6,9	0	0	
<b>duszność</b>					
<b>nieobecne</b>	16	72,7	4	100	<b>0,585</b>
<b>obecne</b>	6	27,3	0	0	
<b>wzmoczona męczliwość</b>					
<b>nieobecne</b>	11	50,0	2	50	<b>0,999</b>
<b>obecne</b>	11	50,0	2	50	
<b>obrzęki podudzi</b>					
<b>nieobecne</b>	20	90,9	4	100	<b>0,999</b>
<b>obecne</b>	2	9,1	0	0	
<b>zastój w krążeniu płucnym</b>					
<b>nieobecne</b>	19	86,4	4	100	<b>0,999</b>
<b>obecne</b>	3	13,6	0	0	

### 7.2.3. Badania laboratoryjne

Na podstawie analizy wybranych badań laboratoryjnych nie stwierdzono żadnych istotnych różnic pomiędzy pacjentami z grupy B19V a grupą kontrolną (Tabela 4).

Tabela 4. Badania laboratoryjne krwi obwodowej

Zmienna	Grupa	N	x	Me	sd	V	min	max	p
CRP	B19V	35	3,2	2,4	3,5	108,8	0,4	15,0	0,945
	K	4	2,6	1,7	2,2	84,3	1,2	5,8	
PCT	B19V	31	0,2	0,2	0,1	22,9	0,1	0,4	0,979
	K	4	0,2	0,2	0,0	13,5	0,2	0,3	
RBC	B19V	37	4,8	5,0	0,7	15,5	2,8	6,6	0,145
	K	5	5,2	5,3	0,4	7,1	4,6	5,6	
HGB	B19V	37	14,2	14,8	2,6	18,2	5,4	18,9	0,103
	K	5	15,7	15,6	0,9	5,7	14,3	16,5	
HCT	B19V	37	42,6	44,9	7,6	17,9	16,4	59,5	0,068
	K	5	47,1	47,1	1,8	3,9	44,2	49,0	
MCV	B19V	37	90,6	89,7	6,0	6,6	79,2	112,9	0,641
	K	5	90,8	91,0	4,3	4,7	84,7	96,1	
MCH	B19V	37	30,2	29,9	2,1	6,8	27,1	37,0	0,683
	K	5	30,2	30,4	1,2	3,8	28,6	31,4	
MCHC	B19V	36	33,2	33,4	1,0	3,1	30,8	34,8	0,952
	K	5	33,3	33,4	1,1	3,2	32,1	34,8	
RDW	B19V	34	21,5	14,0	13,1	60,9	12,2	50,6	0,490
	K	4	30,1	29,0	19,6	65,2	12,0	50,4	
PLT	B19V	36	219,6	211,0	69,5	31,6	36,0	465,0	0,952
	K	5	222,4	206,0	51,4	23,1	166,0	286,0	
PDW	B19V	33	13,7	13,5	2,2	16,1	9,7	18,8	0,231
	K	4	15,1	15,0	1,9	12,8	13,1	17,5	
MPV	B19V	34	11,0	11,0	1,0	9,0	8,7	13,5	0,207
	K	4	11,7	12,0	1,1	9,2	10,3	12,7	
LEUKOCYTY	B19V	37	7,8	7,0	2,8	35,9	3,0	14,9	0,938
	K	5	7,5	6,6	2,1	28,2	5,9	11,0	
NEUTROFILE	B19V	36	60,4	59,8	13,2	21,8	30,1	92,9	0,359
	K	5	54,4	51,1	13,0	23,9	40,4	71,5	
LIMFOCYTY	B19V	35	26,5	23,9	10,5	39,5	0,8	53,6	0,130
	K	5	32,9	36,1	9,7	29,6	19,4	42,8	
MONOCYTY	B19V	36	8,9	9,5	3,2	36,0	1,2	18,0	0,720
	K	5	8,6	7,4	2,5	29,1	6,0	11,5	
EOZYNOFILE	B19V	36	2,8	1,7	3,5	122,6	0,0	19,0	0,537
	K	5	3,0	2,7	2,3	76,7	0,5	6,4	

<b>BAZOFIL</b>	B19V	35	0,6	0,5	0,3	53,8	0,1	1,2	<b>0,651</b>
	K	5	0,6	0,6	0,3	55,2	0,3	1,1	
<b>Na+</b>	B19V	34	140,3	140,0	2,8	2,0	134,0	148,0	<b>0,790</b>
	K	4	140,5	139,5	3,9	2,8	137,0	146,0	
<b>K+</b>	B19V	37	4,5	4,4	0,4	9,1	3,7	5,8	<b>0,166</b>
	K	4	4,7	4,7	0,1	1,6	4,6	4,7	
<b>kreatynina</b>	B19V	36	1,5	1,0	2,0	129,6	0,7	9,5	<b>0,064</b>
	K	5	0,8	0,8	0,2	22,1	0,5	0,9	
<b>eGFR</b>	B19V	32	70,0	75,5	23,1	33,0	6,0	97,0	<b>0,237</b>
	K	5	89,6	102,0	27,4	30,6	60,0	114,0	
<b>cholesterol całkowity</b>	B19V	28	187,5	186,0	44,4	23,7	105,0	284,0	<b>0,181</b>
	K	3	157,3	147,0	23,3	14,8	141,0	184,0	
<b>HDL</b>	B19V	26	47,7	47,0	15,4	32,3	25,0	90,0	<b>0,858</b>
	K	3	50,3	42,0	18,0	35,8	38,0	71,0	
<b>LDL</b>	B19V	24	121,6	128,0	38,2	31,4	54,0	198,0	<b>0,114</b>
	K	3	77,3	84,0	48,3	62,5	26,0	122,0	
<b>TG</b>	B19V	28	135,3	133,5	57,1	42,2	37,0	300,0	<b>0,227</b>
	K	2	88,0	88,0	42,4	48,2	58,0	118,0	
<b>bilirubina</b>	B19V	23	1,2	0,6	1,5	129,3	0,3	7,4	<b>0,748</b>
	K	3	0,9	0,9	0,4	41,9	0,5	1,2	
<b>AST</b>	B19V	29	32,0	19,0	48,8	152,2	11,0	280,0	<b>0,120</b>
	K	3	32,7	32,0	5,0	15,4	28,0	38,0	
<b>ALT</b>	B19V	29	34,7	25,0	44,3	127,9	10,0	252,0	<b>0,086</b>
	K	3	54,3	51,0	29,1	53,6	27,0	85,0	
<b>glukoza</b>	B19V	29	92,7	87,0	16,4	17,7	70,0	160,0	<b>0,651</b>
	K	3	92,7	96,0	8,5	9,2	83,0	99,0	
<b>CPK</b>	B19V	18	705,9	80,5	2423,0	343,3	29,0	10399,0	<b>0,175</b>
	K	3	269,3	286,0	166,6	61,9	95,0	427,0	
<b>CK-MB</b>	B19V	21	34,2	16,0	75,5	220,6	9,0	363,0	<b>0,661</b>
	K	3	22,0	25,0	8,9	40,4	12,0	29,0	
<b>troponina I</b>	B19V	31	578,0	16,0	2211,2	382,6	0,0	12115,0	<b>0,795</b>
	K	4	93,7	27,0	151,7	161,9	1,0	320,0	
<b>TSH</b>	B19V	31	1,7	1,4	1,2	69,2	0,5	5,8	<b>0,145</b>
	K	3	0,8	0,9	0,7	78,9	0,1	1,5	
<b>FT3</b>	B19V	9	3,2	3,4	1,2	36,0	1,3	4,4	<b>0,643</b>
	K	3	3,2	3,1	0,3	9,5	3,0	3,6	
<b>FT4</b>	B19V	10	1,3	1,3	0,3	21,0	0,9	1,6	<b>0,915</b>
	K	2	1,3	1,3	0,3	22,1	1,1	1,5	
<b>NT-proBNP</b>	B19V	34	4086,6	816,5	12493,3	305,7	20,0	70000,0	<b>0,087</b>
	K	4	236,3	194,0	252,1	106,7	20,0	537,0	



## 7.2.4. Badanie echokardiograficzne

Na podstawie analizy pomiarów echokardiograficznych stwierdzono istotne różnice pomiędzy grupą B19V a grupą kontrolną w zakresie wymiaru końcoworozkurczowego lewej komory. W grupie chorych z B19V średnia wartość pomiaru wynosiła 55,9 mm, a w grupie kontrolnej 66,6 mm. Pozostałe badane parametry echokardiograficzne nie różniły się istotnie od siebie (Tabela 5).

Tabela 5. Pomiary echokardiograficzne

Zmienna	Grupa	N	x	Me	sd	V	min	max	p
LVEDd	B19V	38	55,9	55,5	11,5	20,6	37,0	87,0	<b>0,023</b>
	K	5	66,6	64,0	8,4	12,6	59,0	76,0	
LVEF	B19V	38	43,3	45,0	15,3	35,4	15,0	65,0	<b>0,200</b>
	K	5	54,4	55,0	4,9	9,1	50,0	62,0	
IVS	B19V	29	11,0	10,0	3,2	28,6	8,0	23,0	<b>0,758</b>
	K	4	10,8	11,5	1,9	17,6	8,0	12,0	
PW	B19V	32	10,6	10,0	2,5	23,8	7,0	19,0	<b>0,608</b>
	K	4	11,8	11,0	3,9	32,9	8,0	17,0	
LA	B19V	33	43,0	44,0	7,8	18,2	26,0	57,0	<b>0,340</b>
	K	4	47,3	46,0	8,2	17,3	40,0	57,0	
RV	B19V	33	33,5	32,0	8,0	23,8	21,0	64,0	<b>0,309</b>
	K	5	36,2	36,0	6,9	19,0	28,0	46,0	
TAPSE	B19V	32	21,2	22,0	4,1	19,5	14,0	30,0	<b>0,153</b>
	K	5	23,8	25,0	2,2	9,1	21,0	26,0	
MR	B19V	30	1,0	1,0	0,7	74,3	0,0	3,0	<b>0,751</b>
	K	5	1,0	1,0	1,2	122,5	0,0	3,0	
E/A	B19V	27	1,3	1,2	0,6	45,0	0,4	2,8	<b>0,096</b>
	K	5	1,9	1,6	0,9	48,4	1,3	3,5	
E	B19V	22	67,2	70,0	22,8	33,9	0,5	104,0	<b>0,085</b>
	K	2	91,2	91,2	4,0	4,3	88,4	94,0	
A	B19V	18	64,5	70,0	16,7	25,9	30,0	93,8	<b>0,752</b>
	K	2	60,4	60,4	4,7	7,9	57,0	63,7	
E'	B19V	22	5,3	5,5	3,0	57,3	0,0	11,9	<b>1,000</b>
	K	1	4,5	4,5			4,5	4,5	
E/E'	B19V	24	13,0	11,8	4,8	37,3	6,5	26,5	<b>1,000</b>
	K	1	21,0	21,0			21,0	21,0	
AV V max	B19V	17	1,6	1,3	1,0	62,7	1,0	5,3	<b>0,638</b>
	K	2	1,3	1,3	0,1	5,7	1,2	1,3	
AR	B19V	20	0,3	0,0	0,5	156,7	0,0	1,0	<b>0,157</b>
	K	5	0,8	1,0	0,8	104,6	0,0	2,0	

<b>TR</b>	B19V	24	0,8	1,0	0,6	76,4	0,0	3,0	<b>0,2289</b>
	K	5	1,2	1,0	0,8	69,7	0,0	2,0	
<b>AcT</b>	B19V	27	114,9	113,0	24,5	21,3	67,0	176,0	<b>0,2025</b>
	K	5	101,0	102,0	25,6	25,4	63,0	135,0	
<b>PR</b>	B19V	18	0,7	1,0	0,6	89,1	0,0	2,0	<b>0,3978</b>
	K	5	0,4	0,0	0,5	136,9	0,0	1,0	

Występowanie zaburzeń kurczliwości mięśnia lewej komory oraz ich zakres nie wykazują istotnych różnic przy porównaniu pacjentów z grupy B19V z pacjentami grupy kontrolnej (Tabela 6).

Tabela 6. Zaburzenia kurczliwości i przerost ścian LV w TTE

	<b>B19V</b>		<b>K</b>		<b>p</b>
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	
<b>zaburzenia kurczliwości</b>					
<b>nieobecne</b>	20	52,6	1	20	<b>0,370</b>
<b>obecne</b>	18	47,4	4	80	
<b>uogólnione zaburzenia kurczliwości</b>					
<b>nieobecne</b>	25	65,8	3	60	<b>0,999</b>
<b>obecne</b>	13	34,2	2	40	
<b>zaburzenia kurczliwości w obrębie ściany przedniej</b>					
<b>nieobecne</b>	25	65,8	3	60	<b>0,999</b>
<b>obecne</b>	13	34,2	2	40	
<b>zaburzenia kurczliwości w obrębie ściany tylnej</b>					
<b>nieobecne</b>	34	89,5	3	60	<b>0,271</b>
<b>obecne</b>	4	10,5	2	40	
<b>zaburzenia kurczliwości w obrębie ściany dolnej</b>					
<b>nieobecne</b>	25	65,8	3	60	<b>0,999</b>
<b>obecne</b>	13	34,2	2	40	
<b>zaburzenia kurczliwości w obrębie ściany bocznej</b>					
<b>nieobecne</b>	30	78,9	2	40	<b>0,183</b>
<b>obecne</b>	8	21,1	3	60	
<b>zaburzenia kurczliwości w obrębie przegrody międzykomorowej</b>					
<b>nieobecne</b>	27	71,1	4	80	<b>0,999</b>
<b>obecne</b>	11	28,9	1	20	

<b>zaburzenia kurczliwości w obrębie koniuszka lewej komory</b>					
<b>nieobecne</b>	31	81,6	4	80	<b>0,099</b>
<b>obecne</b>	7	18,4	1	20	
<b>przerost ścian lewej komory</b>					
<b>nieobecne</b>	21	55,3	2	40	<b>0,868</b>
<b>obecne</b>	17	44,7	3	60	

### 7.2.5. Badanie histopatologiczne

W analizie obrazu histopatologicznego z uwzględnieniem znakowania immunohistochemicznego nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie występowania włóknienia, a także pod względem obecności antygenów LCA, CD4, CD8, CD3 i CD68 u chorych z parwowirusem B19 w porównaniu do grupy kontrolnej (Tabela 7).

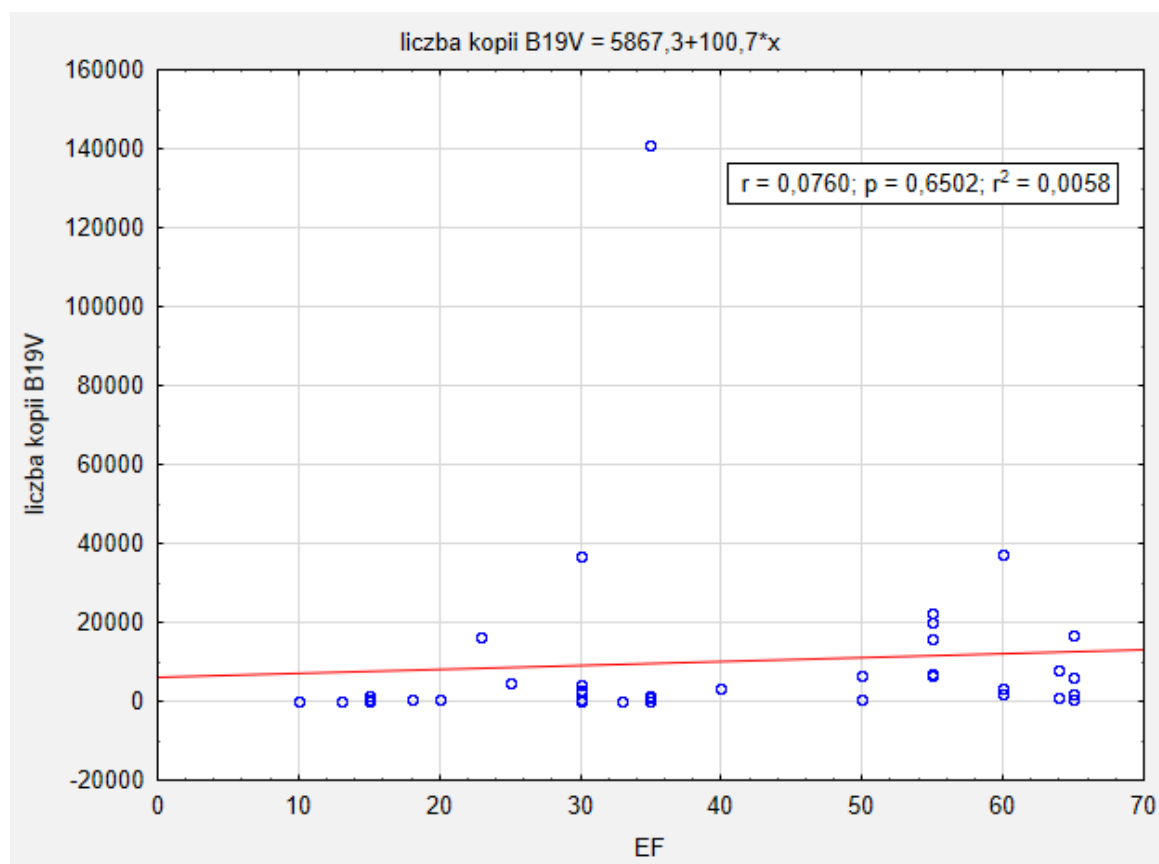
Tabela 7. Oznaczenia immunohistochemiczne

	B19V		K		p
	N	%	N	%	
<b>włóknienie</b>					
<b>nieobecne</b>	15	39,5	1	20	<b>0,723</b>
<b>obecne</b>	23	60,5	4	80	
<b>LCA</b>					
<b>nieobecne</b>	8	32	1	25	<b>0,999</b>
<b>obecne</b>	17	68	3	75	
<b>CD4</b>					
<b>nieobecne</b>	18	72	3	75	<b>0,999</b>
<b>obecne</b>	7	28	1	25	
<b>CD8</b>					
<b>nieobecne</b>	20	80	3	75	<b>0,999</b>
<b>obecne</b>	5	20	1	25	
<b>CD3</b>					
<b>nieobecne</b>	13	52	2	50	<b>0,195</b>
<b>obecne</b>	12	48	2	50	
<b>CD68</b>					
<b>nieobecne</b>	12	48	4	100	<b>0,161</b>
<b>obecne</b>	13	52	0	0	

Jeśli chodzi o ocenę obecności stanu zapalnego, to w badanym materiale jedynie u 7,4% chorych z grupy B19V stwierdzono obecność przewlekłego zapalenia. Próbki EMB od żadnego pacjenta z parwowirusem B19 nie wykazały obecności ostrej fazy zapalenia. W grupie kontrolnej nie odnotowano obecności ostrego bądź przewlekłego procesu zapalnego u żadnego chorego. Nie stwierdzono istotności statystycznej różnic pomiędzy tymi grupami ( $p=0,999$ ).

### 7.3. Korelacja LVEF i kopijności B19V

W kolejnej fazie badania sprawdzono, czy istnieje bezpośrednia korelacja pomiędzy frakcją wyrzutową lewej komory a liczbą kopii parwowirusa B19 wykrytą w materiale biopsyjnym pobranym od poszczególnych pacjentów. Wykonano wykres i regresję liniową. Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono brak zależności pomiędzy powyższymi parametrami ( $r=0,076$ ,  $p=0,65$ ) (Rycina 6).



Rycina 6. Analiza zależności między liczbą kopii B19V a LVEF ( $p=0,65$ )

## 7.4. Mikroskopia elektronowa

### 7.4.1. Obraz zmian ultrastrukturalnych w zależności od liczby kopii B19V

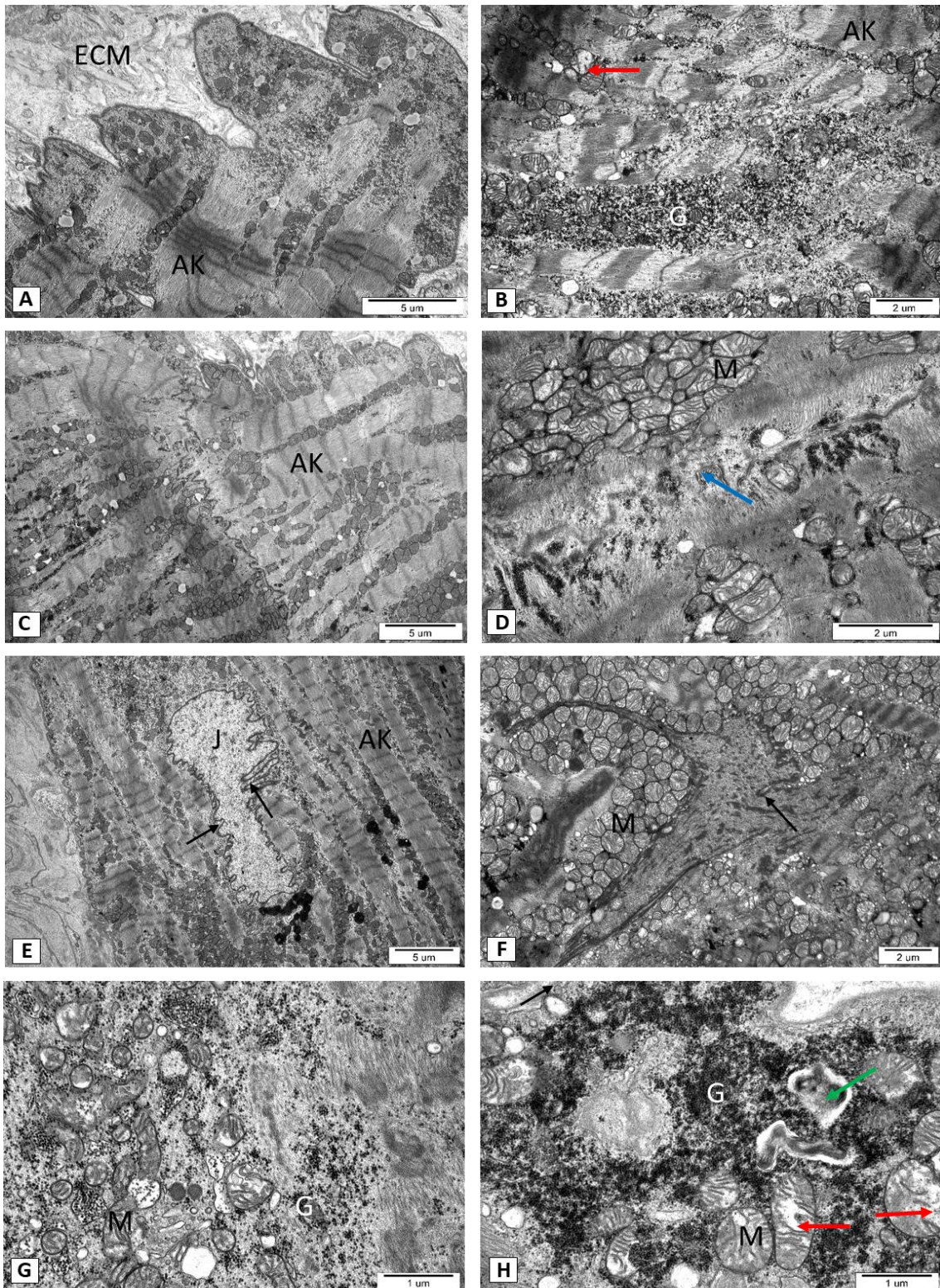
W związku ze stwierdzonym brakiem zależności pomiędzy LVEF a liczbą kopii B19V w biopsjach mięśnia sercowego, dokonano analizy zmian ultrastrukturalnych w obrębie elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej. Na podstawie zmian obserwowanych w obrazie ultrastrukturalnym podzielono chorych z B19V na trzy grupy. Wydzielono pacjentów z liczbą <500 kopii parwowirusa B19, 500-5000 kopii oraz >5000 kopii parwowirusa B19. Ponadto opisano zmiany ultrastrukturalne obecne w grupie kontrolnej oraz obraz ultrastrukturalny niezmiennego morfologicznie mięśnia sercowego.

#### Prawidłowy obraz morfologiczny serca

Komórki niezmiennego miokardium zawierają jedno lub dwa jądra. Większość organelli zgrupowana jest w centrum komórki, wokół jądra komórkowego, a aparat kurczliwy tworzą rozgałęzione miofibryle zbudowane z miofilamentów zgrupowanych w sarkomery (poprzeczne prążkowanie). Pomędzy miofibrilami bardzo licznie występują mitochondria. Obecna jest również siateczka sarkoplazmatyczna, aparat Golgiego i kanaliki T. Komórki połączone są ze sobą za pośrednictwem wstawek, tj. kompleksów połączeń międzykomórkowych o charakterze mechanicznym (strefy przylegania i desmosomy) i komunikacyjnym (neksusy umożliwiające przekazywanie bodźców). Każda komórka otoczona jest blaszką podstawną. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej występują białka macierzy z licznymi elementami włóknistymi. Obecne są tam również naczynia krwionośne. W sytuacjach patologicznych obraz morfologiczny mięśnia sercowego ulega istotnym zmianom.

### Grupa kontrolna – rozstrzeń lewej komory z prawidłową LVEF

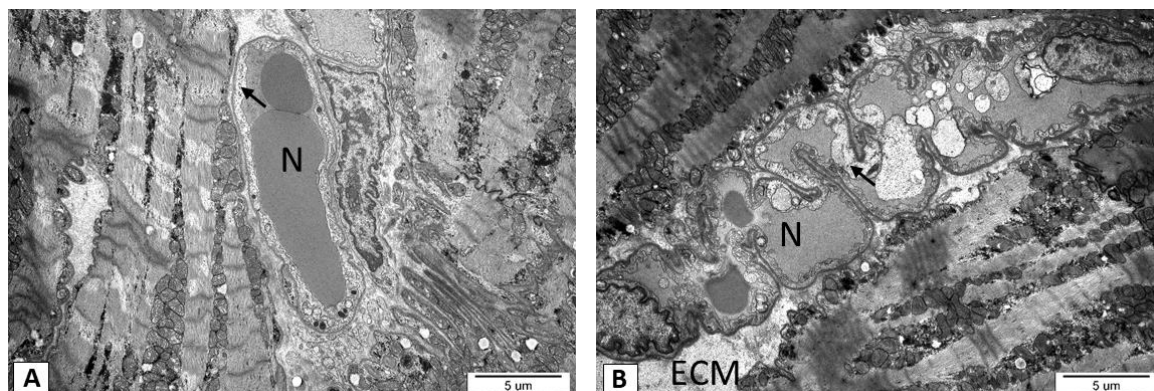
Ocena ultrastrukturalna elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej wykazała ogniskowy zanik miofibrili w komórkach mięśnia sercowego (Rycina 7 A,B,C). Niektóre kardiomiocyty charakteryzowały się niejednorodną gęstością elektronową. Jądra kardiomiocytów posiadały liczne wgłobienia w otoczce jądrowej i nieregularny kształt (Rycina 7 E,F), a niekiedy także ogniskowo przerwana otoczkę jądrową (Rycina 7 F). Zmiany ultrastrukturalne obserwowano również w mitochondriach, których część charakteryzowała się brakiem grzebieni mitochondrialnych (Rycina 7 B,H). W cytoplazmie wielu kardiomiocytów licznie występowały mitochondria o nieregularnym kształcie i nieprawidłowym układzie grzebieni (Rycina 7 G,H), a niektóre mitochondria wykazywały cechy autofagii (Rycina 7 H). W cytoplazmie kardiomiocytów licznie występowały autofagosomy, obecne były także obłonione podwójnie struktury wypełnione materiałem drobnoziarnistym i włókienkowym. Ponadto licznie występowały lizosomy. Wstawka cechowała się najczęściej regularnym przebiegiem, choć czasami była ogniskowo przerwana lub też zatarta (Rycina 7 D).



Rycina 7. Mięsień sercowy pacjentów z grupy kontrolnej. A-C. Aparat kurczliwy + nieprawidłowe mitochondria; D. Wstawka; E-F. Jądra komórkowe; G. Skupiska glikogenu; H. Mitofagia + glikogen. (ECM – macierz zewnątrzkomórkowa, AK – aparat kurczliwy, G – glikogen, M – mitochondria, czerwona strzałka – uszkodzone grzebienie mitochondrialne, J – jądro komórkowe, czarna strzałka – wgłobienie w otoczce jądrowej, niebieska strzałka – wstawka o nieregularnym przebiegu, zielona strzałka – mitofagia)



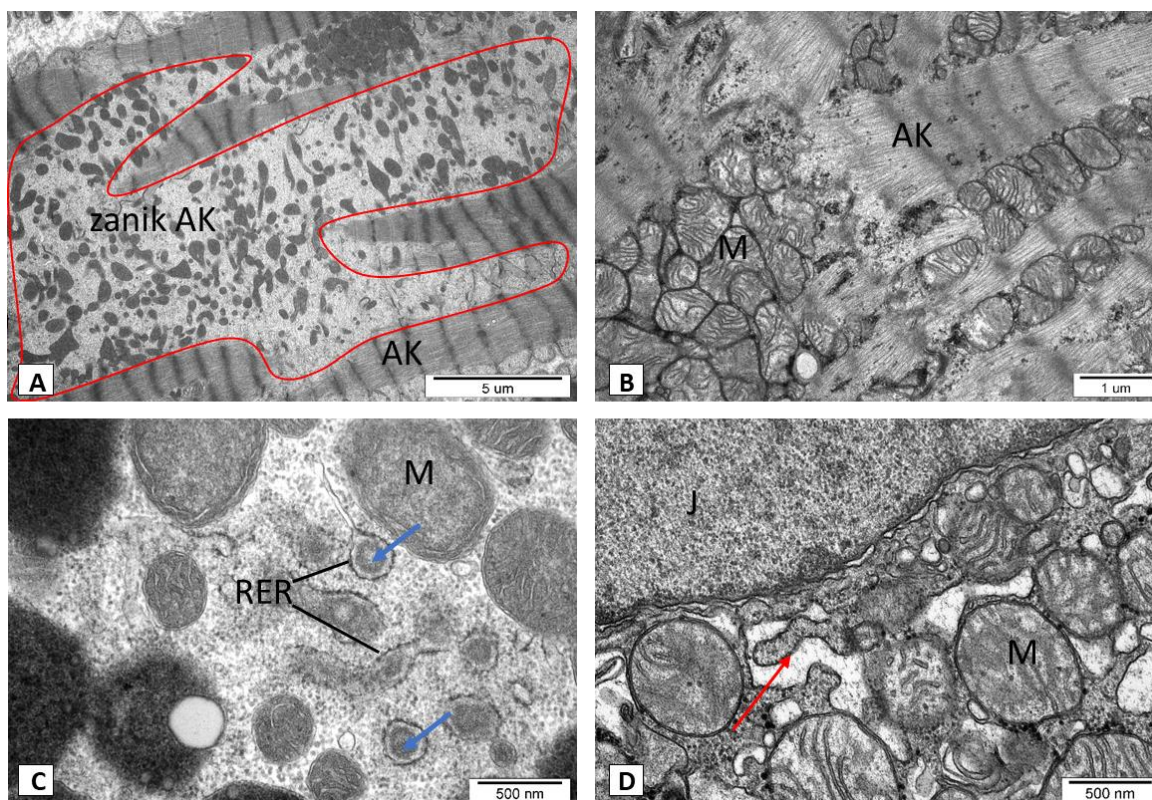
W przestrzeni zewnątrzkomórkowej występowały naczynia kapilarne, niekiedy wyścielone śródbłonkiem o cechach nekrotycznych (Rycina 8 A,B). Często przybierały one formę pętli (Rycina 8 B). Niekiedy w znacznie poszerzonych przestrzeniach międzykomórkowych oprócz włókienek kolagenowych występowała elastyna.



Rycina 8. Mięsień sercowy pacjentów z grupy kontrolnej. A-B. Przestrzeń zewnątrzkomórkowa + naczynia kapilarne. (ECM – macierz zewnątrzkomórkowa, N – naczynia kapilarne, czarna strzałka – nekrotyczny śródbłonek)

#### Grupa pacjentów ze stwierdzoną niską liczbą kopii parwowirusa B19 (poniżej 500)

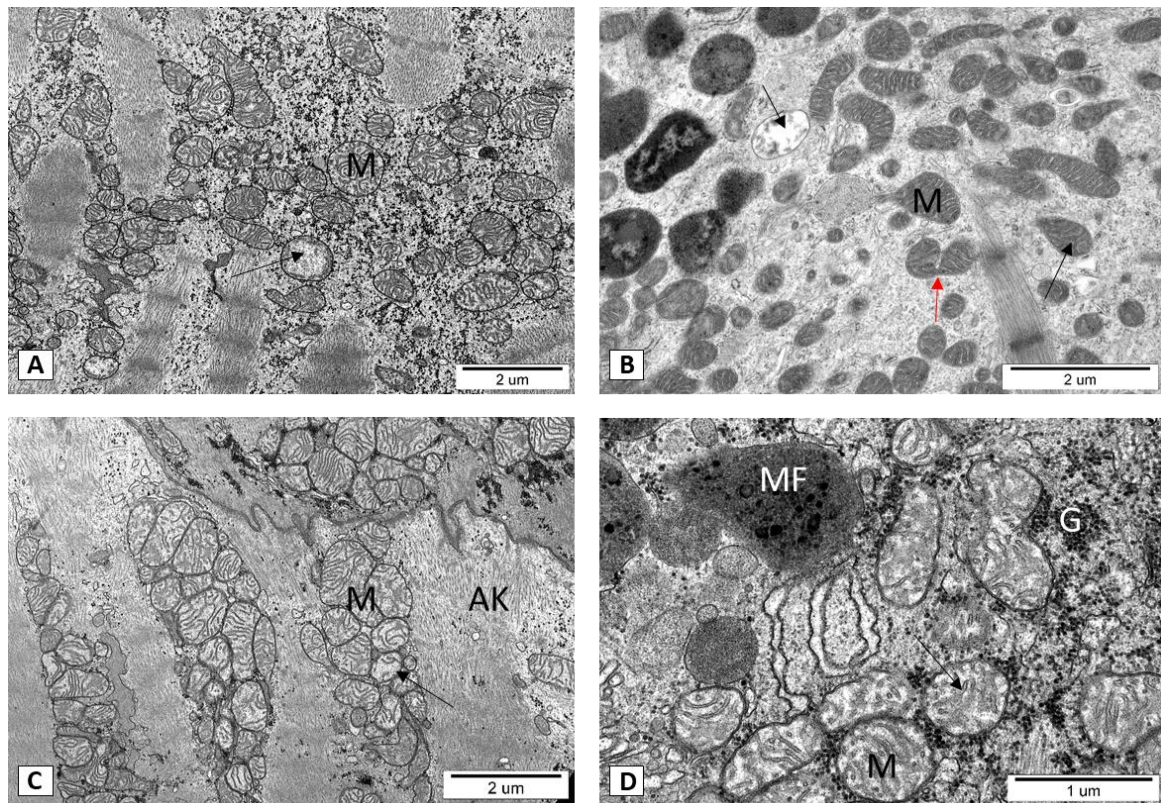
W kardiomiocytach pacjentów tej grupy obserwowano szereg zaburzeń ultrastruktury wszystkich elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej. Ocena morfologiczna wykazała obecność komórek mięśniowych o często przerwanym aparacie kurczliwym (Rycina 9 A), połączenie między komórkami mięśniowymi (wstawka) często było zatarte i poszerzone (Rycina 9 B). W cytoplazmie kardiomiocytów obecne były sferyczne struktury podobne do szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, zawierające gęsty elektronowo, amorficzny materiał (Rycina 9 C). Obserwowano również siateczkę śródplazmatyczną z morfologicznymi oznakami stresu oksydacyjnego. W sąsiedztwie często obecne były zmienione morfologicznie mitochondria, prawie całkowicie pozbawione grzebieni oraz liczne lizosomy (Rycina 9 D). W pobliżu jąder kardiomiocytów obserwowano siateczkę śródplazmatyczną z cechami obrzęku (Rycina 9 D).



Rycina 9. Mięsień sercowy pacjentów z grupy <500. A-B. Aparat kurczliwy; C-D. Siateczka śródplazmatyczna. (AK – aparat kurczliwy, czerwona otoczka – zanik aparatu kurczliwego, M – mitochondria, L – lizosomy, J – jądro komórkowe, RER – szorstka siateczka śródplazmatyczna, niebieska strzałka – amorficzny materiał wewnątrz RER, czerwona strzałka – obrzęk siateczki)

W materiale pobranym od tej grupy pacjentów obserwowano wiele zaburzeń ultrastruktury mitochondriów. Degradacja grzebieni mitochondrialnych jest najbardziej charakterystyczną i powtarzającą się cechą w materiale pobranym od wszystkich pacjentów z liczbą kopii wirusa mniejszą niż 500 (Rycina 10 A,B,C,D). Zaobserwowano jednak, że w tym samym kardiomiocycie mogą występować zarówno mitochondria wykazujące normalną gęstość elektronową macierzy i znaczny stopień degradacji grzebieni, a także mitochondria o zwiększonej gęstości elektronowej (Rycina 10 B,C). W takich przypadkach grzebienie nie są całkowicie zniszczone. Stwierdzono, że mitochondria o dużej gęstości elektronowej bardzo często wykazują cechy morfologiczne wskazujące na ich podział (Rycina 10 B). Innym zjawiskiem obserwowanym w tej grupie pacjentów było formowanie się konglomeratów mitochondrialnych o prawidłowej gęstości elektronowej i stosunkowo regularnym układzie grzebieni (Rycina 10 A). Niektóre mitochondria w konglomeracie wykazują

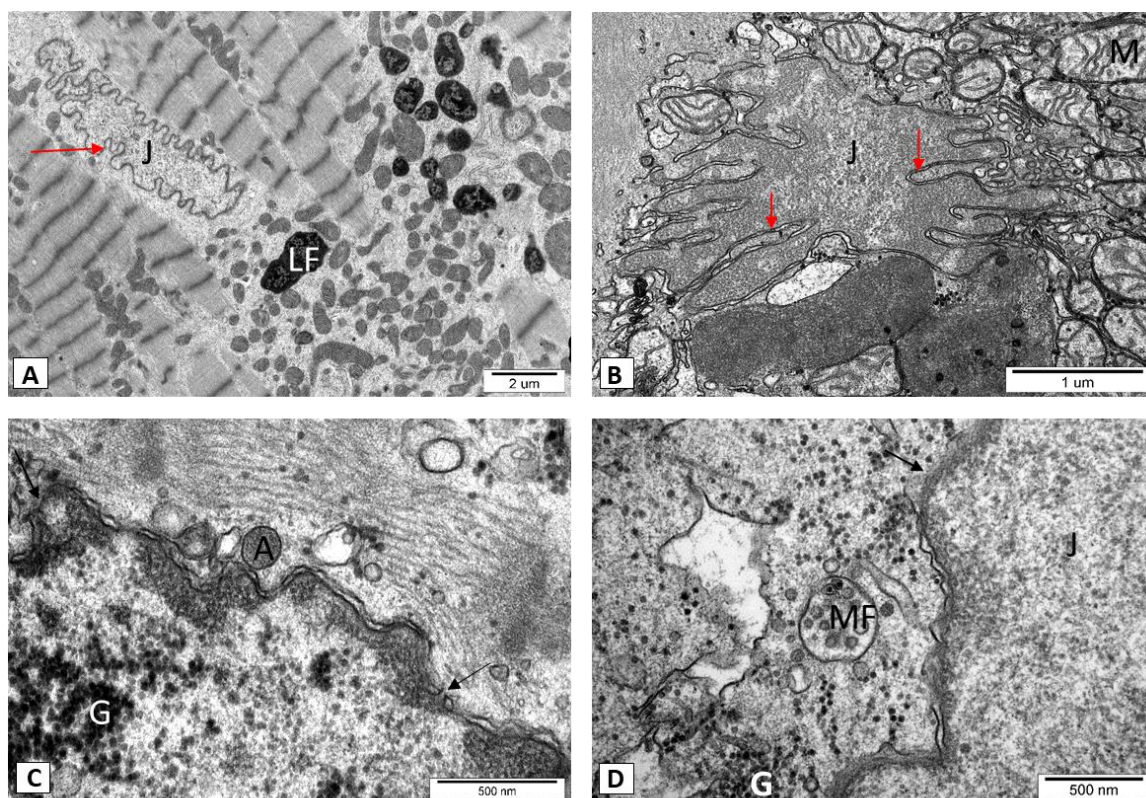
cechy morfologiczne wskazujące na fuzję tych organelli. Stwierdzano też mitochondria częściowo lub całkowicie pozbawione błony zewnętrznej. Ponadto zauważono mitochondria częściowo pozbawione grzebieni, stykające się ze strukturami o morfologii mitofagosomów, najczęściej z pobliskimi fagolizosomami (Rycina 10 D).



Rycina 10. Mięsień sercowy pacjentów z grupy <500. A-C. Aparat kurczliwy + mitochondria; D. Nieprawidłowe mitochondria + skupiska glikogenu. (M – mitochondria, AK – aparat kurczliwy, MF – mitofagosomy, G – glikogen, czerwona strzałka – podział mitochondriów, czarna strzałka – degradacja grzebieni mitochondrialnych)

W grupie pacjentów z najmniejszą liczbą kopii DNA parwowirusa B19 zaobserwowano także liczne zmiany ultrastrukturalne w jądrach komórkowych. Otoczka jądrowa posiadała liczne wgłobienia i znacznie rozszerzone pory jądrowe (Rycina 11 A,B). W niektórych kardiomiocytach obserwowano również jądra charakteryzujące się przerwana otoczką. Często na obszarze takich jąder obecne były organelle cytoplazmatyczne i ziarna glikogenu (Rycina 11 C). Z zewnętrzną błoną jądrową połączone były struktury o morfologii autofagosomów (Rycina 11 C). W sąsiedztwie jąder zaobserwowano licznie występujące lizosomy (Rycina 11 B), a także kuliste

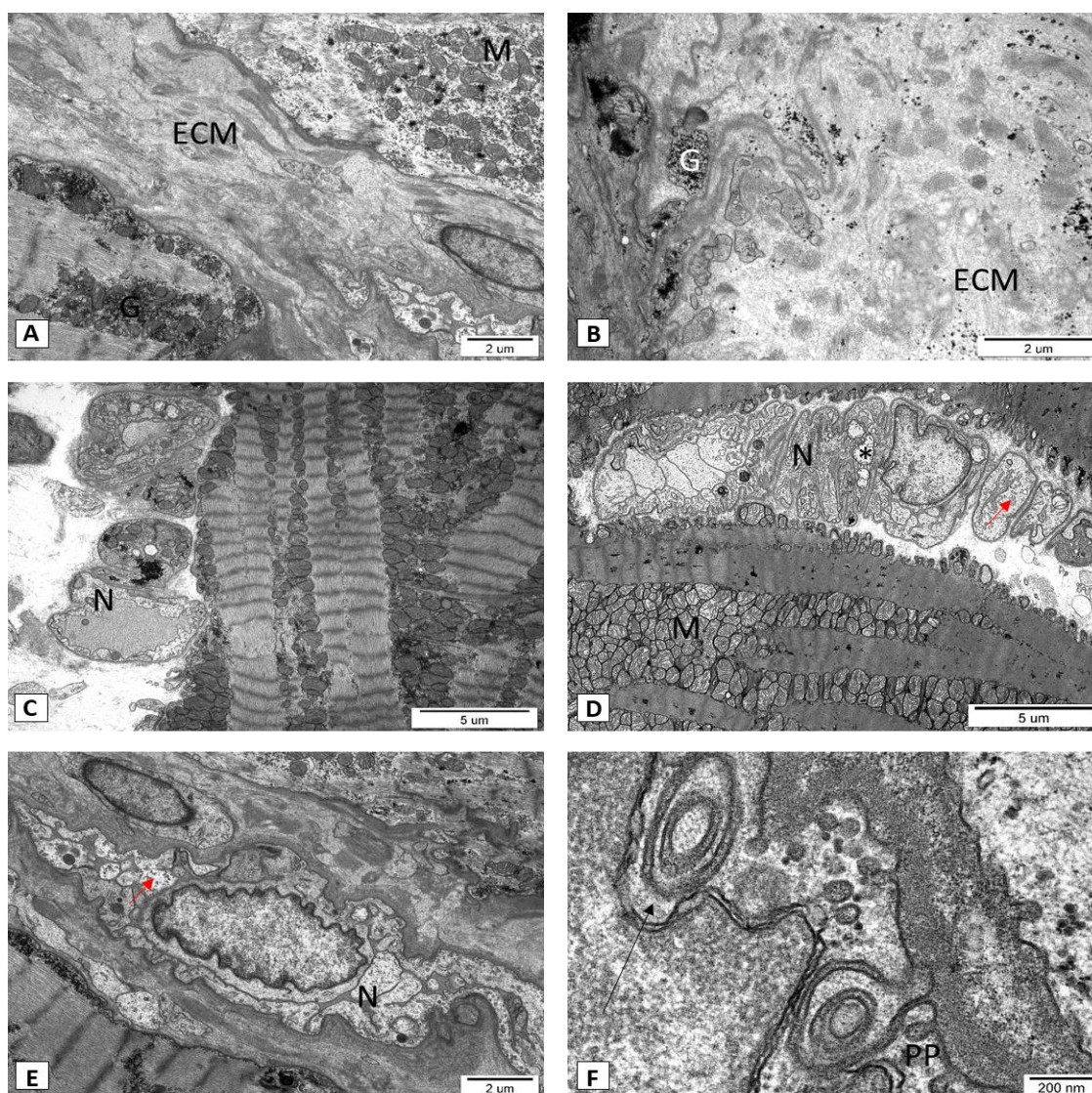
struktury wypełnione pęcherzykami o morfologii późnych mitofagosomów (Rycina 11 D).



Rycina 11. Mięsień sercowy pacjentów z grupy <500. A. Aparat kurczliwy + jądro komórki; B. Jądro komórki; C. Otoczka jądrowa + autofagosom; D. Otoczka jądrowa + mitofagosom. (J – jądra komórkowe, M – mitochondria, MF – mitofagosom, G – glikogen, A – autofagosom, czarna strzałka – przerwana otoczka jądrowa, czerwona strzałka – wgłębienia w otoczce jądrowej, LF – lipofuscyna)

Przestrzeń zewnątrzkomórkowa w materiale tej grupy pacjentów była zmiennej szerokości i obecne były w niej bardzo liczne włókienka o różnej morfologii (Rycina 12 A,B). Występowały tam naczynia kapilarne charakteryzujące się bardzo wąskim światłem (Rycina 12 D,E). Większość naczyń obecnych w badanym materiale odznaczała się hipertroficznym śródbłonkiem o cechach morfologicznych nekrozy (Rycina 12 C,D,E). Naczynia formowały struktury o charakterze pętli (Rycina 12 C,D), a ich światło najczęściej było całkowicie zamknięte (Rycina 12 D,E). Obecne były również liczne pęcherzyki pinocytarne, przy czym niektóre z nich wielokrotnie obłonione (Rycina 12 F). W niektórych komórkach blaszka błony podstawnej śródbłonka była na dużej przestrzeni całkowicie oddzielona, co może być efektem aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (Rycina 12 F). Obecne były również komórki śródbłonka leżące

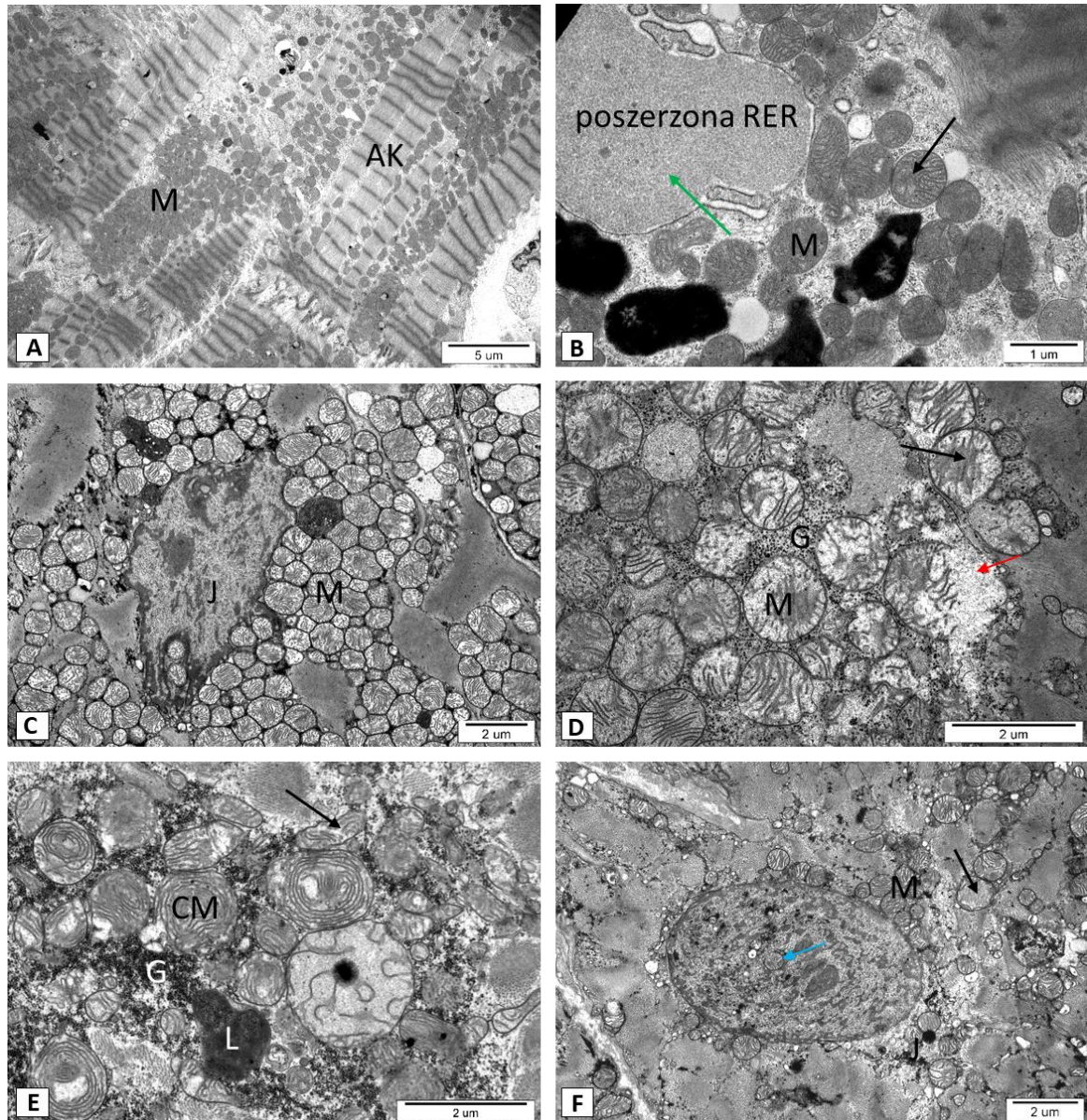
na błonie podstawnej o zatartej strukturze. W cytoplazmie takich komórek obserwowano podwójnie obłonione pęcherzyki, a także duże, obłonione, sferyczne struktury o morfologii charakterystycznej dla autofagosomów. Zwracała uwagę obecność ziaren glikogenu w cytoplazmie komórek śródbłonka, co jest niezwykle w odniesieniu do zaawansowanej nekrozy. Mitochondria komórek śródbłonka naczyń włosowatych charakteryzowały się zaawansowanym ubytkiem grzebieni oraz elektronowo jasną macierzą mitochondrialną. Podobnie jak błona cytoplazmatyczna, błona jądrowa wykazywała obecność licznych wgłobień (Rycina 12 E).



Rycina 12. Mięsień sercowy pacjentów z grupy  $< 500$ . A-B. Przestrzeń zewnątrzkomórkowa; C-E. Aparat kurczliwy + naczynia kapilarne; F. Błona podstawna + pęcherzyki pinocytarne. (ECM – macierz zewnątrzkomórkowa, M – mitochondria, N – naczynia kapilarne, PP – pęcherzyki pinocytarne, G – glikogen, czarna strzałka – wgłobienie błony podstawnej, czerwona strzałka – nekrotyczny śródbłonek, gwiazdka – uszkodzone mitochondrium w śródbłonku naczyń włosowatych)

### Grupa pacjentów ze stwierdzoną liczbą kopii DNA B19V 500-5000

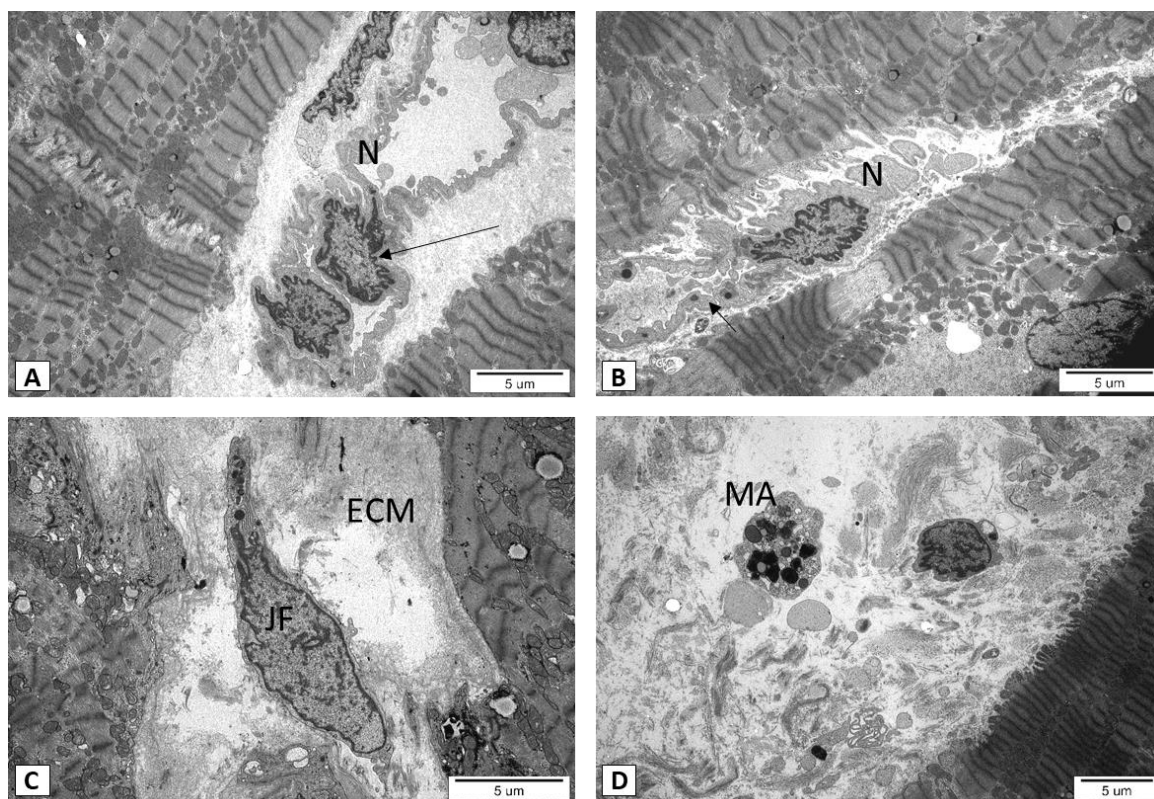
W tej grupie pacjentów miofibryle najczęściej były przerwane (Rycina 13 A). W cytoplazmie kardiomiocytów obserwowano szorstką siateczkę śródplazmatyczną, która wykazywała cechy poszerzenia w układzie błon i wypełniona była amorficznym materiałem (Rycina 13 B). Mitochondria w kardiomiocytach tej grupy pacjentów były liczne, o cechach degeneracji, z częściowo uszkodzonymi grzebieniami (Rycina 13 B,C,D,E). Niektóre z nich, z jasną elektronowo macierzą mitochondrialną, miały przerwaną błonę zewnętrzną (Rycina 13 D). Czasami w pobliżu takich mitochondriów znajdowały się skupiska glikogenu otoczone pojedynczą błoną plazmatyczną (Rycina 13 D,E). Obserwowano również mitochondria o morfologii ciał mielinopodobnych, w pobliżu których obecne były lizosomy (Rycina 13 E). Niektóre jądra kardiomiocytów charakteryzowały się przerwaną otoczką jądrową, a na terenie jądra obecne były organelle i ziarna glikogenu (Rycina 13 F).



Rycina 13. Mięsień sercowy pacjentów z grupy 500-5000. A. Aparat kurczliwy + mitochondria; B. Poszerzona siateczka śródplazmatyczna; C. Mitochondria + jądro komórkowe; D-E. Mitochondria + skupiska glikogenu; F. Uszkodzone jądro komórkowe + mitochondria. (AK – aparat kurczliwy, J – jądro komórkowe, M – mitochondria, G – glikogen, L – lizosom, RER – szorstka siateczka śródplazmatyczna, CM – mitochondria o morfologii ciał mielinopodobnych, czarna strzałka – uszkodzone grzebień mitochondrialne, czerwona strzałka – przerwana błona mitochondrialna, niebieska strzałka – mitochondrium w jądrze komórkowym, zielona strzałka – amorficzny materiał wewnątrz RER)

W przestrzeni zewnątrzkomórkowej licznie występowały naczynia kapilarne (Rycina 14 A,B), najczęściej o charakterze pętli, a także drobnowłókienkowy materiał i fibroblasty (Rycina 14 C). Komórki śródblonka wykazywały często cechy hipertrofii i zawierały elektronowo gęste ziarnistości lub duże wakuole (Rycina 14 B). Nie

obserwowano jednak cech nekrozy komórek śródłonkowych ani zamknięcia światła naczyń. Czasami w przestrzeni zewnątrzkomórkowej występowały makrofagi (Rycina 14 D).



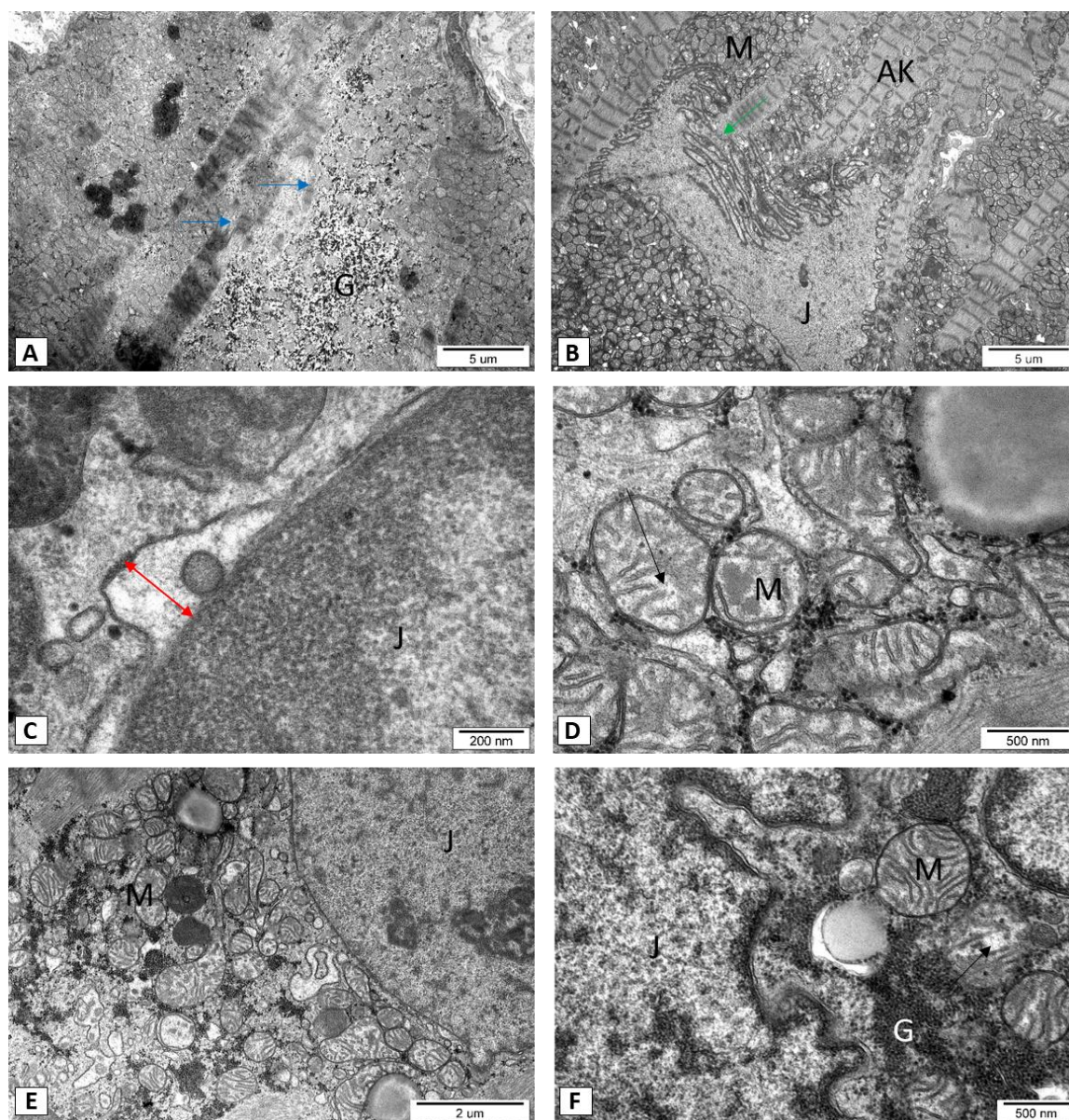
Rycina 14. Mięsień sercowy pacjentów z grupy 500-5000. A-D. Aparat kurczliwy + przestrzeń zewnątrzkomórkowa. (ECM – macierz zewnątrzkomórkowa, N – naczynie kapilarne, MA – makrofag, JF – jądro fibroblasta, czarna strzałka – hipertroficzny śródblonek)

#### Grupa pacjentów ze stwierdzoną liczbą kopii DNA B19V >5000

Ocena ultrastrukturalna CVU wykazała w tej grupie pacjentów zanik aparatu kurczliwego na znacznym obszarze komórki, a cytoplazmę w tym miejscu wypełniały licznie ziarna glikogenu (Rycina 15 A). W grupie pacjentów z największą liczbą kopii B19V (>5000 kopii DNA) cechą charakterystyczną była często obecność skupisk glikogenu w pobliżu mitochondriów (Rycina 15 F). Mitochondria takie charakteryzowały się jasną elektronowo macierzą, przerwaną błoną zewnętrzną i mocno uszkodzonymi grzebieniami (Rycina 15 A,D,E). Niektóre mitochondria były całkowicie pozbawione zewnętrznej błony (Rycina 15 E,F), w macierzy mitochondrialnej obecne były czasami struktury o kształcie pęcherzyków. W części mitochondriów obecna była także

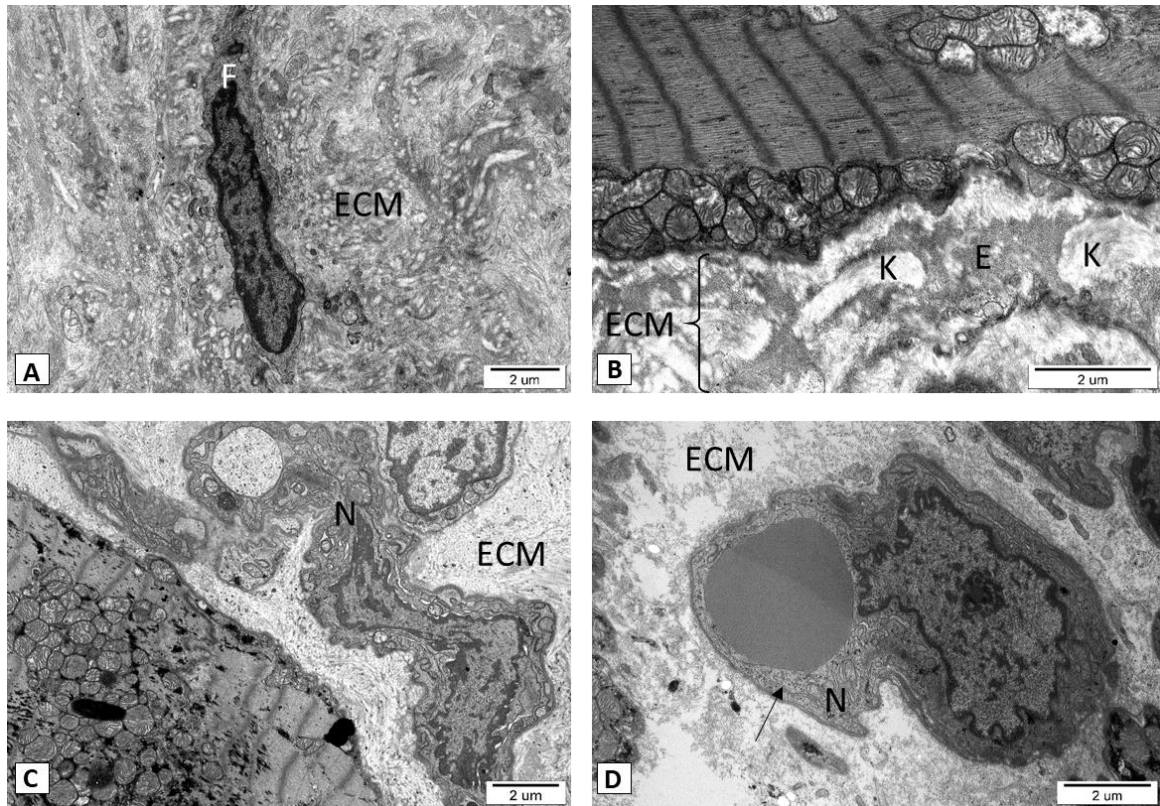


amorficzna substancja, podobna do występującej w przestrzeniach między błonami siateczki śródplazmatycznej. Charakterystyczne zmiany obserwowano również w jądrach kardiomiocytów. Poszerzona była przestrzeń pomiędzy błonami jądrowymi i również często zawierała ona amorficzny materiał (Rycina 15 C). W otoczkach jądrowych występowały liczne wgłobienia (Rycina 15 B). Niektóre jądra posiadały przerwaną otoczkę jądrową, a na ich terenie obecne były mitochondria i ziarna glikogenu.



Rycina 15. Mięsień sercowy pacjentów z grupy >5000. A. Aparat kurczliwy + skupiska glikogenu; B. Jądro komórkowe; C. Poszerzona przestrzeń pomiędzy błonami jądrowymi; D. Mitochondria; E. Jądro komórkowe + mitochondria; F. Mitochondria + skupiska glikogenu. (AK – aparat kurczliwy, J – jądra komórkowe, M – mitochondria, G – glikogen, niebieska strzałka – przerwany aparat kurczliwy, czarna strzałka – zanik grzebieni mitochondrialnych, zielona strzałka – wgłobienia w otoczce jądrowej, czerwone strzałki – błony otoczki jądrowej)

W przestrzeni zewnątrzkomórkowej obecne były liczne fibroblasty, włókienka kolagenowe i elastynowe (Rycina 16 A,B,C,D). Obserwowano również naczynia kapilarne charakteryzujące się wysokim, hipertroficznym śródbłonkiem (Rycina 16 D) i wąskim, prawie niewidocznym światłem (Rycina 16 C).



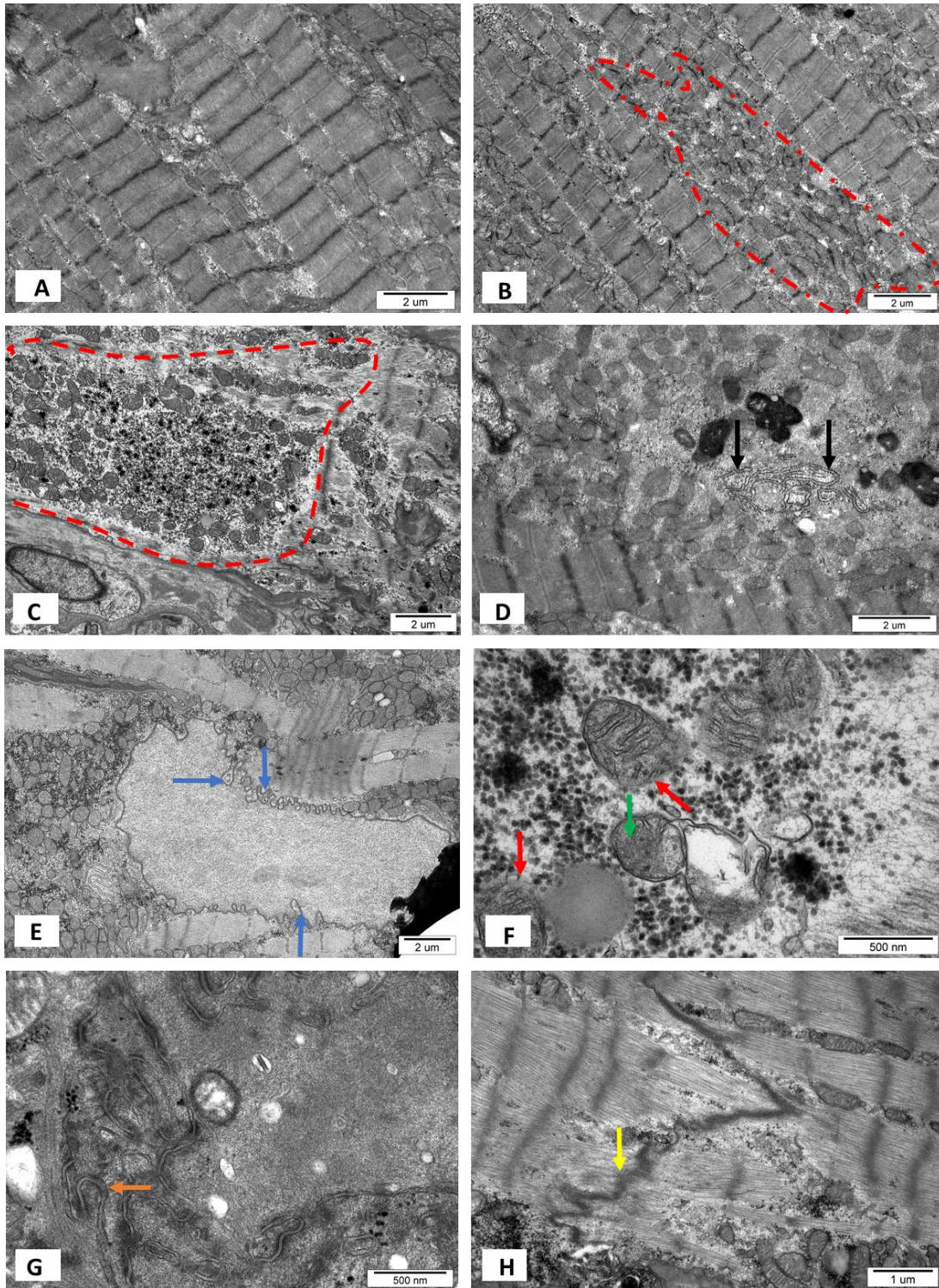
Rycina 16. Mięsień sercowy pacjentów z grupy >5000. A. Przestrzeń zewnątrzkomórkowa + fibroblast; B. Włókna w obrębie przestrzeni zewnątrzkomórkowej; C-D. Naczynia kapilarne. (ECM – macierz zewnątrzkomórkowa, M – mitochondria, N – naczynie kapilarne, F – fibroblast, K – włókna kolagenowe, E – włókna elastynowe, czarna strzałka – hipertroficzny śródbłonek)

#### **7.4.2. Obraz zmian ultrastrukturalnych w zależności od wybranych parametrów klinicznych, wyników badań obrazowych i laboratoryjnych**

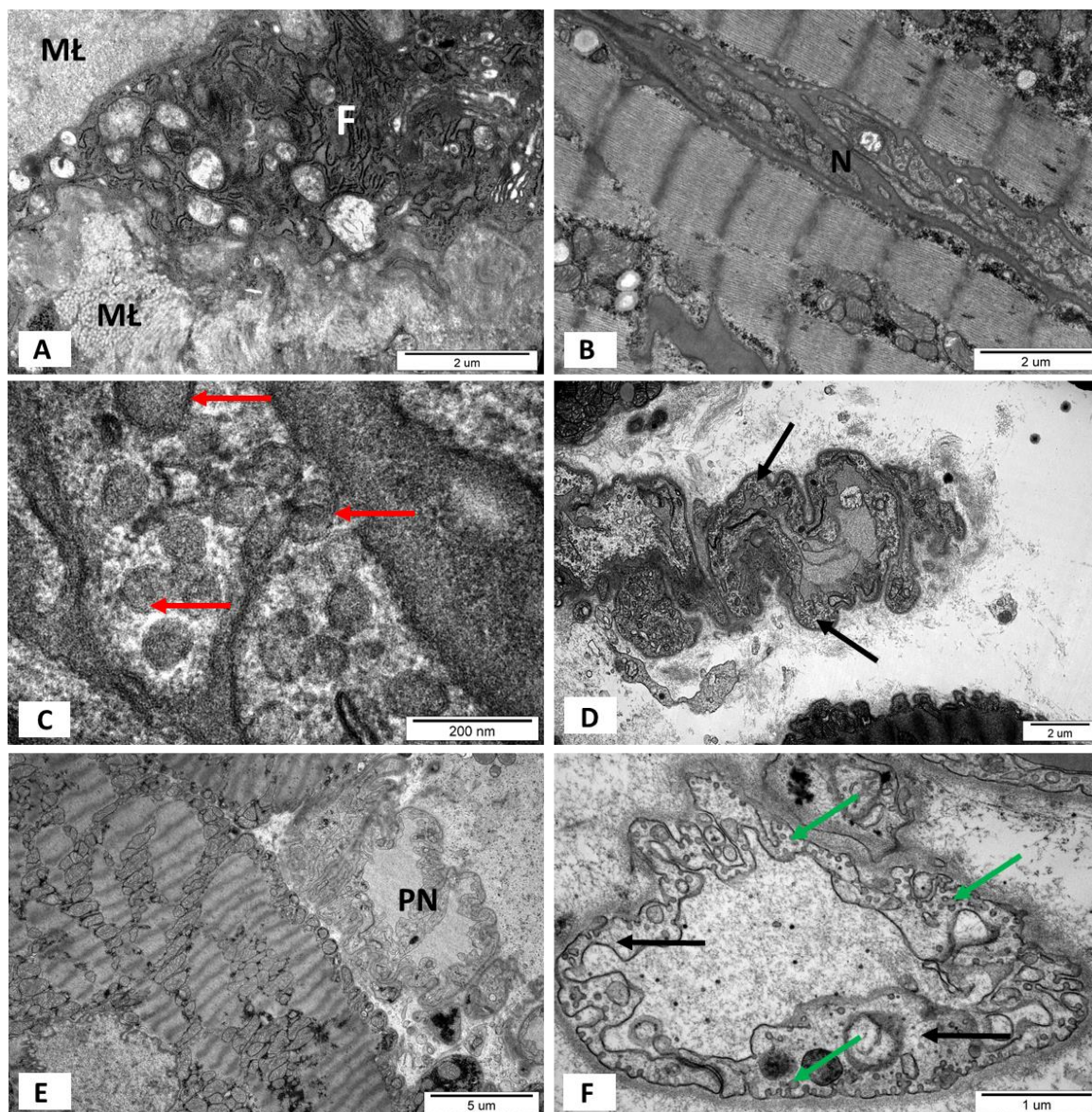
##### Nasilenie objawów niewydolności serca

Kardiomiocyty w materiale biopsyjnym pobranym od pacjentów z małym nasileniem niewydolności serca (NYHA I) posiadały najczęściej wyraźną, prawidłową budowę ultrastrukturalną (Rycina 17 A). W niektórych komórkach obserwowano niejednakową gęstość miofibryli (Rycina 17 B). W tych rejonach licznie występowały mitochondria, gęsto do siebie przylegające. W niektórych kardiomiocytach aparat kurczliwy wykazywał brak ciągłości (Rycina 17 C), a w ich cytoplazmie występowała wyraźnie zaznaczona siatka śródplazmatyczna szorstka (Rycina 17 D). Jądra komórkowe charakteryzowały się nieregularnym kształtem i wgłobieniami w otocze jądrowej (Rycina 17 E), która często była ogniskowo przzerwana. W pobliżu jąder kardiomiocytów licznie występowały mitochondria charakteryzujące się zatartą strukturą grzebieni i często przerwaną błoną zewnętrzną (Rycina 17 F). Połączenie między kardiomiocytami było poszerzone (Rycina 17 G), a jego struktura często była zatarta (Rycina 17 H).

W przestrzeni międzykomórkowej obecne były fibroblasty i bogaty materiał łącznotkankowy (Rycina 18 A), występowały tam także naczynia włosowate o bardzo wąskim świetle (Rycina 18 B). W śródbłonku takich naczyń obecne były liczne pęcherzyki otoczone podwójną błoną (Rycina 18 C), a niektóre komórki śródbłonka wykazywały cechy morfologiczne nekrozy (Rycina 18 D). Jądra komórek śródbłonka naczyń włosowatych miały nieregularny kształt. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej występowały również liczne naczynia włosowate, które tworzyły struktury o charakterze pętli naczyniowych (Rycina 18 E). Niektóre komórki śródbłonkowe wykazywały cechy nekrozy i posiadały w swoim wnętrzu liczne pęcherzyki pinocytarne (Rycina 18 F).



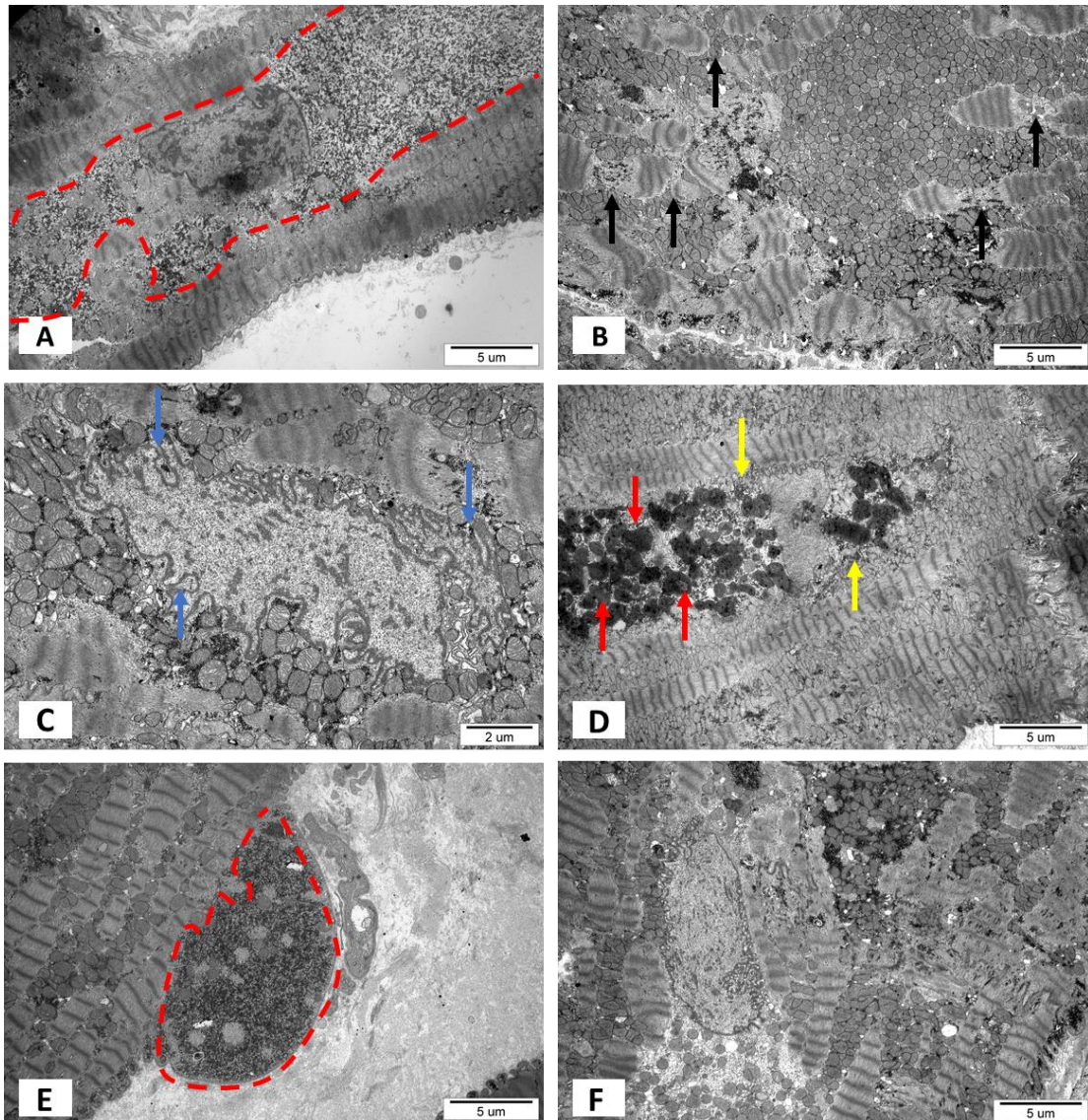
Rycina 17. Mięsień sercowy pacjentów z małym nasileniem objawów NS. A-D. Aparat kurczliwy; E. Jądro komórkowe; F. Uszkodzone mitochondria; G-H. Nieprawidłowe połączenia międzykomórkowe. (czerwona obwódka – skupiska mitochondriów w obrębie aparatu kurczliwego, M – mitochondria, czarna strzałka – szorstka siateczka śródplazmatyczna, niebieska strzałka – wgłobienia w otoczcze jądrowej, zielona strzałka – zatarte grzebienie mitochondrialne, czerwona strzałka – przerwana zewnętrzna błona mitochondrialna, pomarańczowa strzałka – poszerzone połączenie międzykomórkowe, żółta strzałka – zatarte połączenie międzykomórkowe)



Rycina 18. Mięsień sercowy pacjentów z małym nasileniem objawów NS. A. Fibroblasty; B. Aparat kurczliwy + naczynie; C. Liczne pęcherzyki; D. Nekroza śródbłonka; E. Pętle naczyniowe; F. Pinocytoza. (MŁ – materiał łącznotkankowy, F – fibroblasty, N – naczynia włosowate, PN – pętle naczyniowe, czerwona strzałka – podwójnie obłonione pęcherzyki, czarna strzałka – komórki wykazujące cechy nekrozy, zielona strzałka – liczne pęcherzyki pinocytarne)

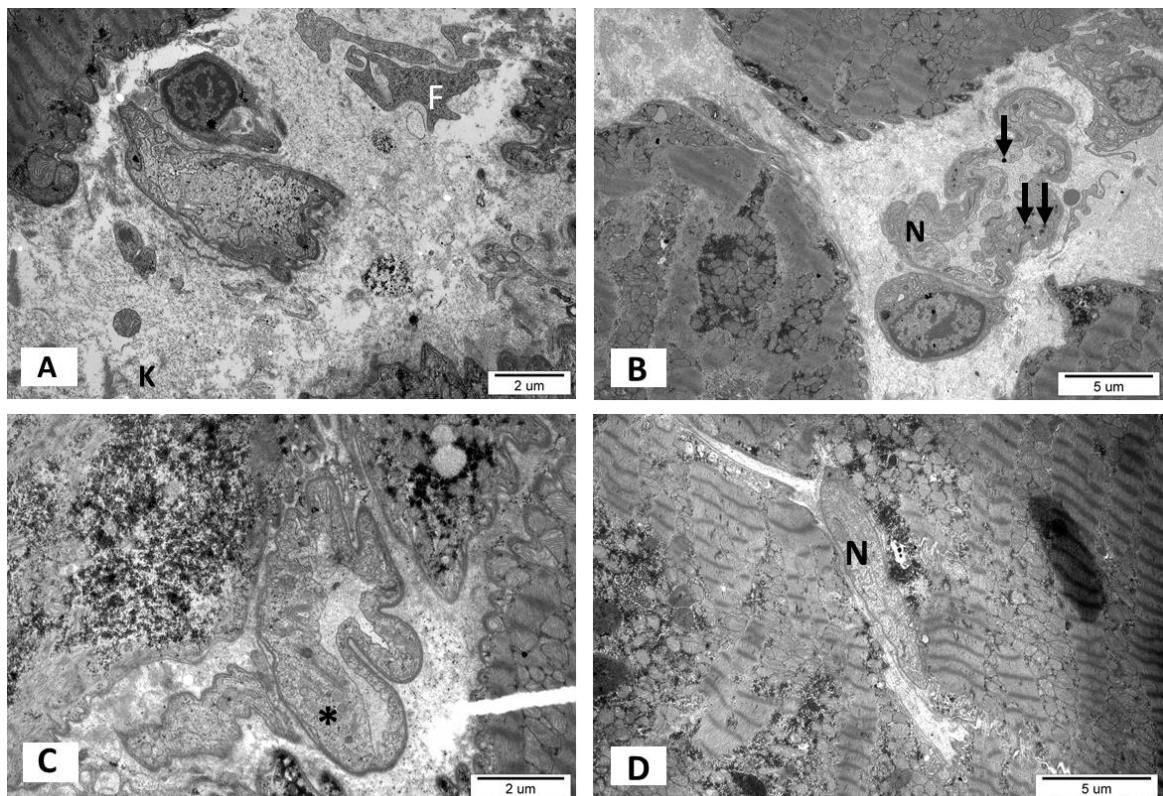
Analiza ultrastrukturalna materiału pobranego od pacjentów ze znacznym nasileniem objawów niewydolności krążenia (NYHA IV) wykazała zmiany patologiczne w obrębie wszystkich elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej. W znacznej części kardiomiocytów występował zanik aparatu kurczliwego (Rycina 19 A), częściej też obserwowano miofibryle charakteryzujące się brakiem ciągłości (Rycina 19 B). Jądra

kardiomiocytów najczęściej posiadały nieregularny kształt i liczne wgłobienia w otoczkach (Rycina 19 C), a w ich sąsiedztwie licznie występowały ziarna glikogenu, lizosomy i autofagosomy (Rycina 19 D). W obszarach podbłonowych również obserwowano liczne ziarna glikogenu (Rycina 19 E). Cech tych nie zauważono u pacjentów sklasyfikowanych jako NYHA I. Cytoplazma niektórych kardiomiocytów była jasna elektronowo. Cecha ta wskazuje na nekrozę, jednakże nie obserwowano przerwania ciągłości błony kardiomiocytów (Rycina 19 F).



Rycina 19. Mięsień sercowy pacjentów z dużym nasileniem objawów NS. A-B. Aparat kurczliwy; C. Jądro komórkowe; D. Lizosomy + autofagosomy + glikogen; E. Glikogen; F. Aparat kurczliwy + jądro komórkowe + mitochondria. (zielona strzałka – zanik aparatu kurczliwego, czarna strzałka – brak ciągłości miofibryli, niebieska strzałka – wgłobienia w otoczkach jądrowej, czerwona strzałka – lizosomy i autofagosomy, żółta strzałka – ziarna glikogenu, czerwona obwódka – skupiska glikogenu)

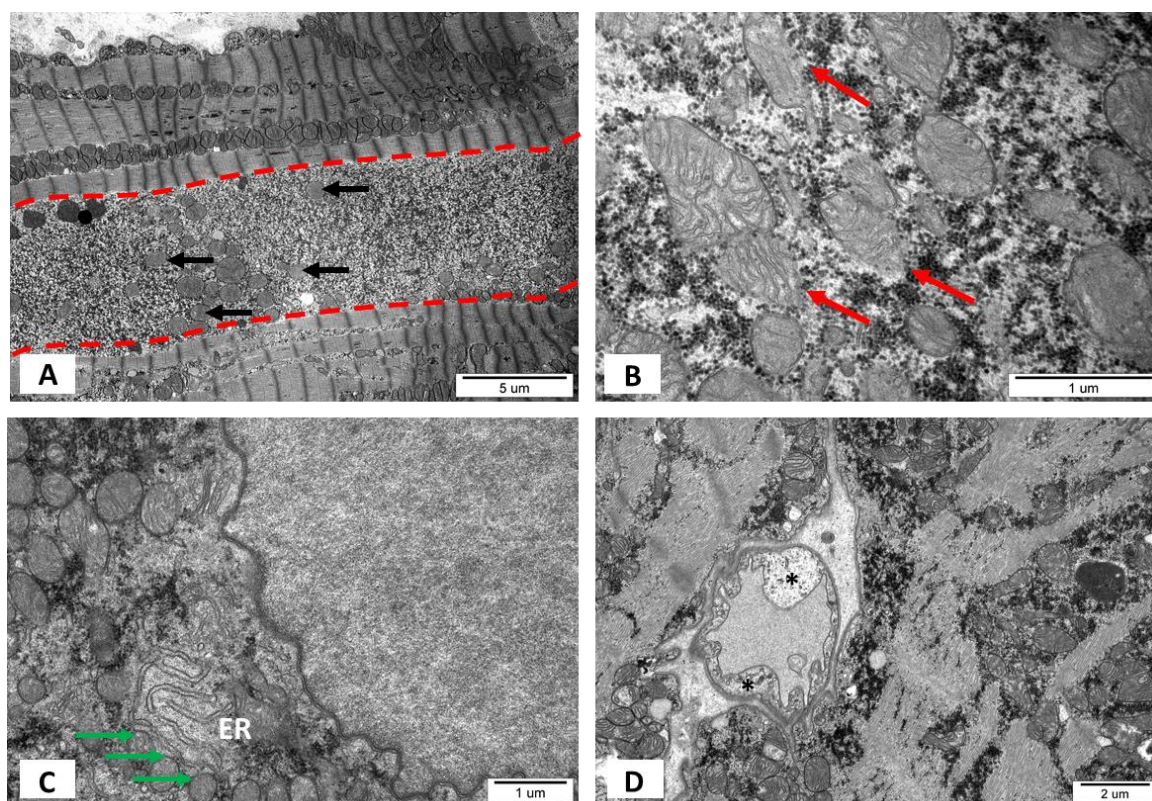
W przestrzeni międzykomórkowej obecne były liczne fibroblasty i włókienka kolagenowe (Rycina 20 A). Występujące w niej naczynia włosowate charakteryzowały się nieregularnym kształtem, formowały pętle, a w cytoplazmie komórek śródbłonkowych takich naczyń obecne były ziarnistości (Rycina 20 B). Niekiedy komórki śródbłonkowe naczyń włosowatych wykazywały cechy hipertrofii (Rycina 20 C). W materiale pochodzącym od pacjentów tej grupy obserwowano również naczynia włosowate charakteryzujące się silnie zwężonym światłem (Rycina 20 D). Nie obserwowano kapilar, których komórki śródbłonkowe posiadałyby cechy nekrozy.



Rycina 20. Mięsień sercowy pacjentów z dużym nasileniem objawów NS. A. Przestrzeń zewnątrzkomórkowa; B-D. Naczynia włosowate. (K – włókienka kolagenowe, F – fibroblasty, N – naczynia włosowate, czarna strzałka – ziarnistości, gwiazdka – śródbłonek o cechach hipertrofii)

### Końcoworozkurczowa szerokość lewej komory

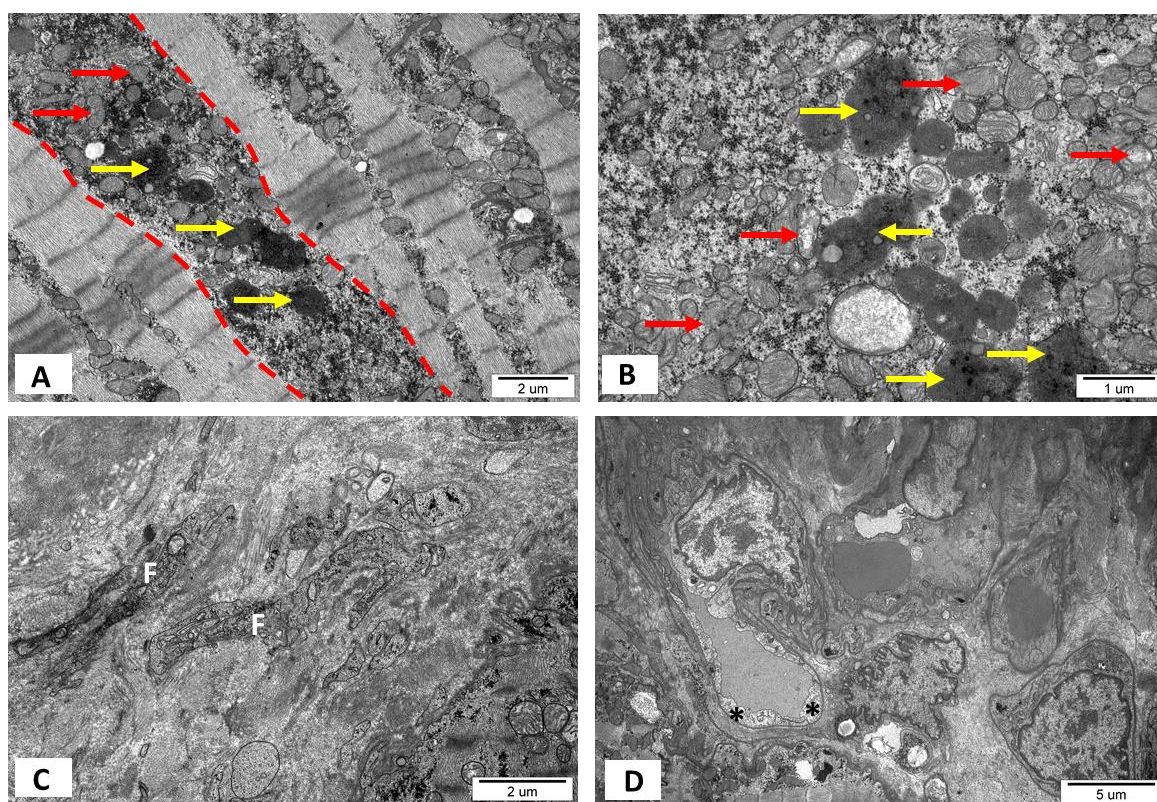
Ocena ultrastrukturalna materiału pobranego od pacjentów z prawidłową szerokością jamy lewej komory (LVEDd) wykazała brak aparatu kurczliwego na dużym obszarze niektórych kardiomiocytów (Rycina 21 A). Obserwowano w takich miejscach jedynie pojedyncze mitochondria, które charakteryzowały się zatartą strukturą grzebieni. W sarkoplazmie występowały również mitochondria charakteryzujące się całkowitym lub ogniskowym brakiem błony zewnętrznej (Rycina 21 B). W pobliżu jąder kardiomiocytów występowała siateczka śródplazmatyczna pozostająca w kontakcie z mitochondriami (Rycina 21 C). Mitochondria takie charakteryzowały się również całkowitym lub ogniskowo występującym brakiem błony zewnętrznej i zatartą strukturą grzebieni. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej obecne były naczynia włosowate. Niektóre komórki śródbłonkowe wykazywały cechy nekrozy (Rycina 21 D).



Rycina 21. Mięsień sercowy pacjentów z prawidłowym LVEDd. A. Ubytki w aparacie kurczliwym; B. Nieprawidłowe mitochondria; C. Jądro komórkowe + siateczka śródplazmatyczna; D. Nekrotyczny śródbłonek. (ER – siateczka śródplazmatyczna, czarna strzałka – zatarta struktura grzebieni mitochondrialnych, czerwona strzałka – ubytki zewnętrznej błony mitochondrialnej, zielona strzałka – miejsca kontaktu pomiędzy siateczką śródplazmatyczną i mitochondriami, gwiazdka – nekroza komórek śródbłonna)



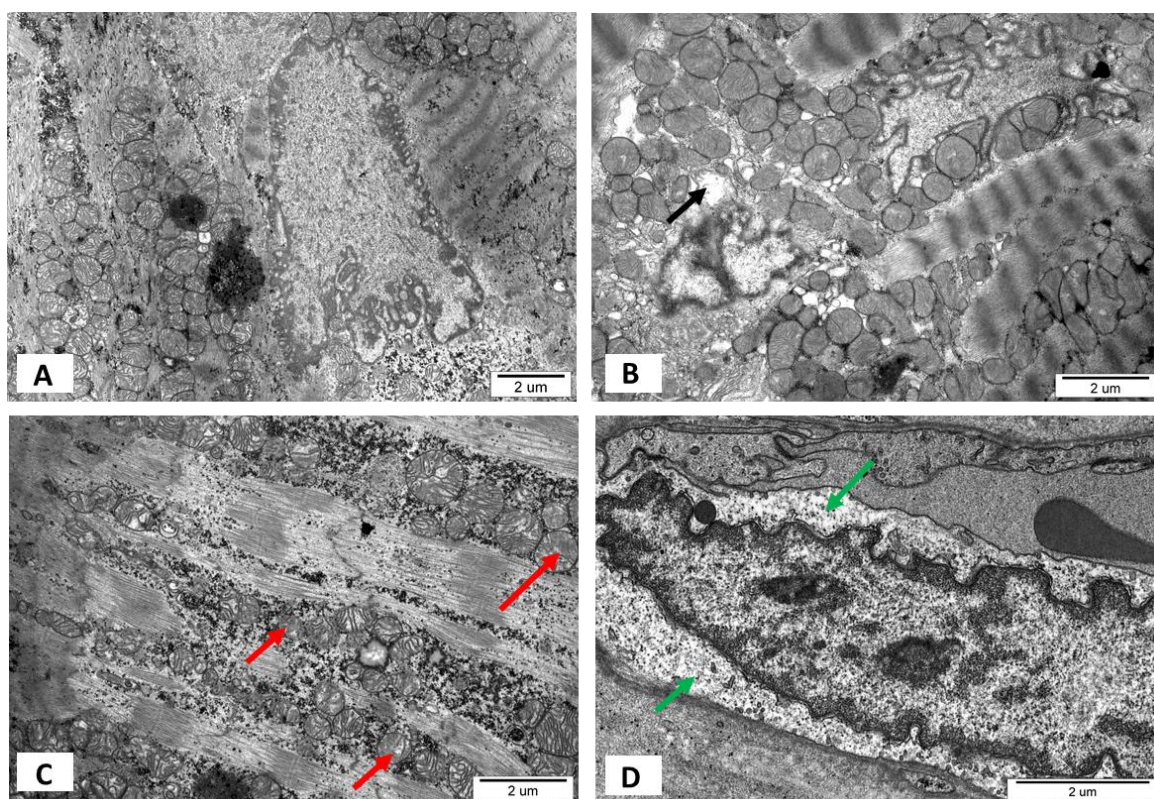
W materiale pochodzącym od grupy pacjentów z rozstrzenią lewej komory nie obserwowano istotnych różnic jeśli chodzi o stan aparatu kurczliwego w porównaniu do grupy z prawidłowym LVEDd. W miejscach ubytku miofibryli występowały mitochondria o różnym kształcie i wielkości, często charakteryzujące się ogniskowym przerwaniem błony zewnętrznej, a także zatartą strukturą grzebieni lub ich całkowitym brakiem. W sąsiedztwie takich mitochondriów występowały lizosomy lub figury autofagalne (Rycina 22 A,B). W przestrzeni zewnątrzkomórkowej licznie występowały fibroblasty i materiał łącznotkankowy (Rycina 22 C). Cechy tej nie obserwowano u pacjentów, u których nie stwierdzono rozstrzeni lewej komory. Niektóre komórki śródbłonna wykazywały cechy nekrozy (Rycina 22 D).



Rycina 22. Mięsień sercowy pacjentów z rozstrzenią lewej komory. A-B. Lizosomy, autofagosomy, uszkodzone mitochondria; C. Przestrzeń zewnątrzkomórkowa; D. Naczynie krwionośne. (czerwona strzałka – degradacja grzebieni mitochondrialnych, żółta strzałka – lizosomy/autofagosomy, F – fibroblasty, gwiazdka – nekroza komórek śródbłonna)

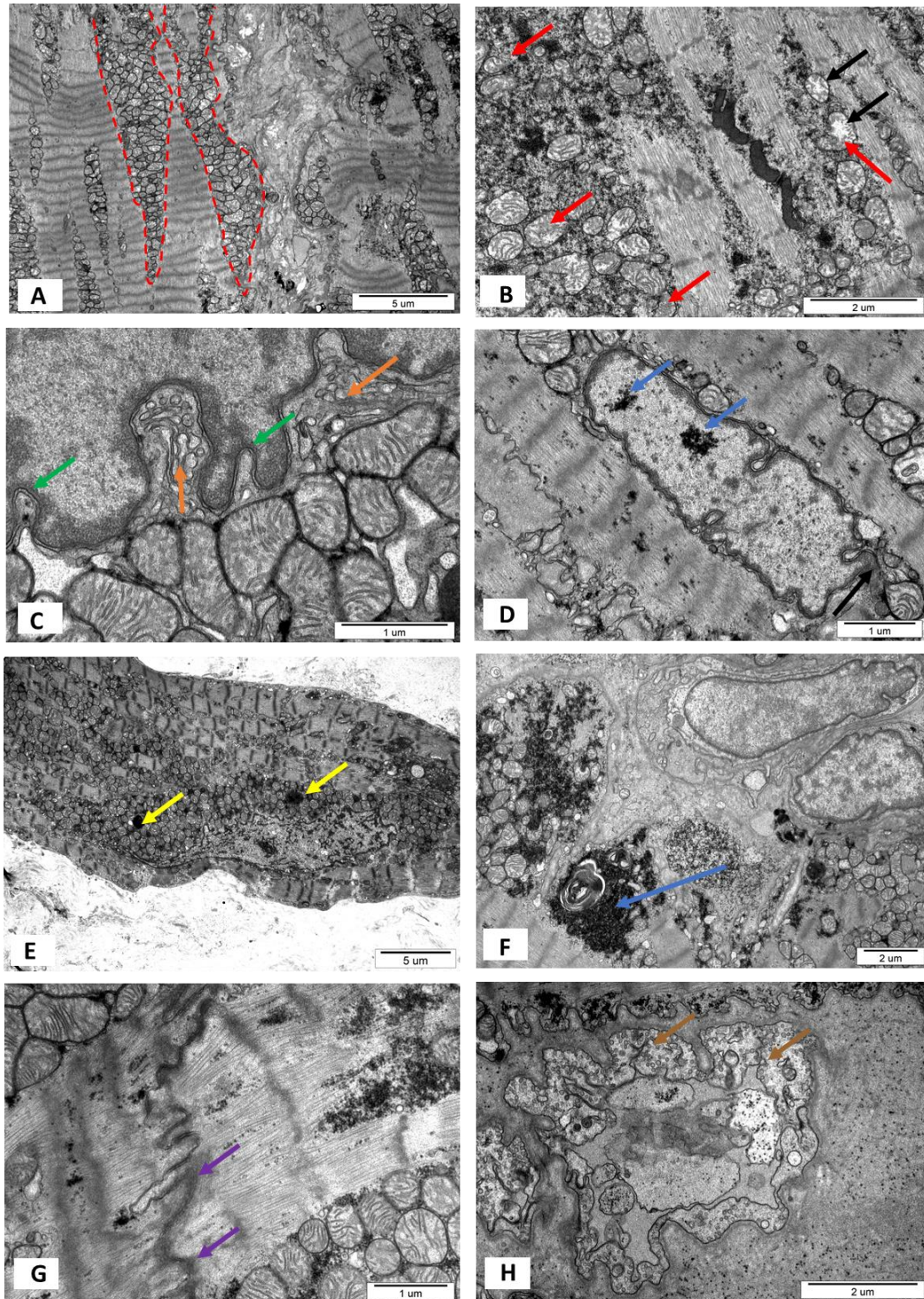
## Frakcja wyrzutowa lewej komory

Analiza morfologiczna materiału grupy chorych z zachowaną LVEF wykazała obecność licznych kardiomiocytów charakteryzujących się przerwaniem ciągłości miofibryli i zanikiem aparatu kurczliwego (Rycina 23 A). Miejsca takie najczęściej występowały w okolicach jąder kardiomiocytów i obserwowano w nich mitochondria wykazujące cechy obrzęku (Rycina 23 A,B). Niektóre z mitochondriów posiadały przerwaną błonę zewnętrzną i grzebień o zatartej strukturze (Rycina 23 C). W ich sąsiedztwie obecne były niekiedy figury autofagalne i licznie występujące ziarna glikogenu. W bogatej w materiał łącznotkankowy przestrzeni zewnątrzkomórkowej obecne były naczynia włosowate charakteryzujące się najczęściej nekrotycznym śródbłonkiem (Rycina 23 D). Cecha ta występowała równie często, jak w grupie pacjentów z niską LVEF.



Rycina 23. Mięsień sercowy pacjentów z prawidłową LVEF. A-B. Uszkodzone kardiomiocyty. C. Uszkodzone mitochondria. D. Naczynie krwionośne. (czarna strzałka – mitochondria wykazujące cechy obrzęku, czerwona strzałka – zatarta struktura grzebieni mitochondrialnych, zielona strzałka – nekroza śródbłonka)

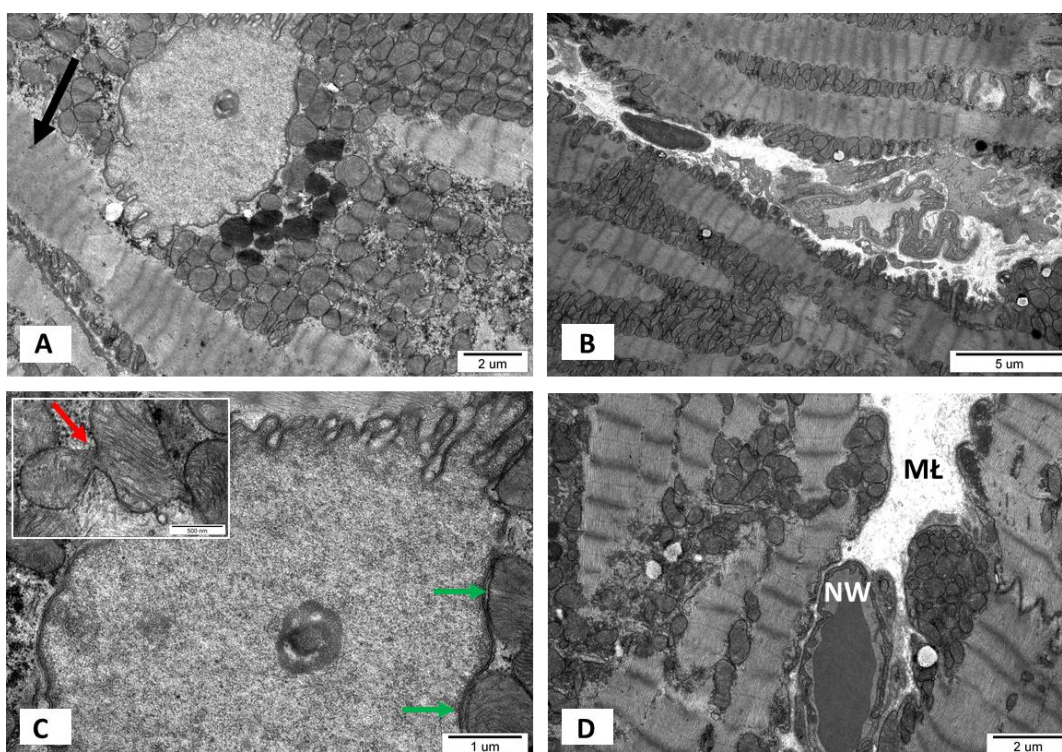
Ocena ultrastrukturalna materiału pochodzącego od grupy pacjentów z niską LVEF wykazała ogniskowe zmiany w aparacie kurczliwym (Rycina 24 A). Często obserwowano brak ciągłości miofibryli i przerwanie linii Z. Na takich obszarach obecne były liczne mitochondria, które najczęściej wykazywały cechy obrzęku, zatarcie struktury grzebieni lub ich ubytek oraz ogniskowe przerwanie błony zewnętrznej (Rycina 24 B). Nasilenie uszkodzenia aparatu kurczliwego było porównywalne z grupą pacjentów z prawidłową LVEF. W otoczkach jąder komórkowych występowały wgłobienia, a w ich sąsiedztwie obserwowano siateczkę śródplazmatyczną i ściśle do siebie przylegające mitochondria, charakteryzujące się zatartą strukturą grzebieni oraz niekiedy błony zewnętrznej (Rycina 24 C). Niektóre jądra kardiomiocytów wykazywały cechy przerwania ciągłości otoczki jądrowej, a na ich obszarze widoczne były ziarna glikogenu (Rycina 24 D). Rzadko w sąsiedztwie jądra komórkowego obserwowano lizosomy i autofagosomy (Rycina 24 E), natomiast pod błoną komórkową kardiomiocytu występowały skupiska glikogenu, pośród których czasami obecne były figury mielinopodobne (Rycina 24 F). Połączenie między kardiomiocytami często miało zatartą strukturę (Rycina 24 G). W przestrzeni zewnątrzkomórkowej obficie występował materiał łącznotkankowy i naczynia włosowate, których śródbłonek sporadycznie wykazywał cechy nekrozy (Rycina 24 H).



Rycina 24. Mięsień sercowy pacjentów z prawidłową LVEF. A-B. Aparat kurczliwy + mitochondria; C. Otoczka jądrowa + siateczka śródplazmatyczna; D. Glikogen wewnątrz jądra komórkowego; E. Lizosomy i autofagosomy; F. Figury mielinopodobne wśród ziaren glikogenu; G. Połączenie międzykomórkowe; H. Naczynie kapilarne. (czerwona obwódka – skupiska mitochondriów, czerwona strzałka – zatarcie struktury grzebieni mitochondrialnych, czarna strzałka – mitochondria wykazujące cechy obrzęku, zielona strzałka – wgłobienia w otoczcze jądrowej, pomarańczowa strzałka – siateczka śródplazmatyczna z cechami obrzęku, niebieska strzałka – ziarna glikogenu, żółta strzałka – autofagosomy, fioletowa strzałka – zatarte połączenie międzykomórkowe, brązowa strzałka – komórki śródbłonkowe o cechach nekrozy)

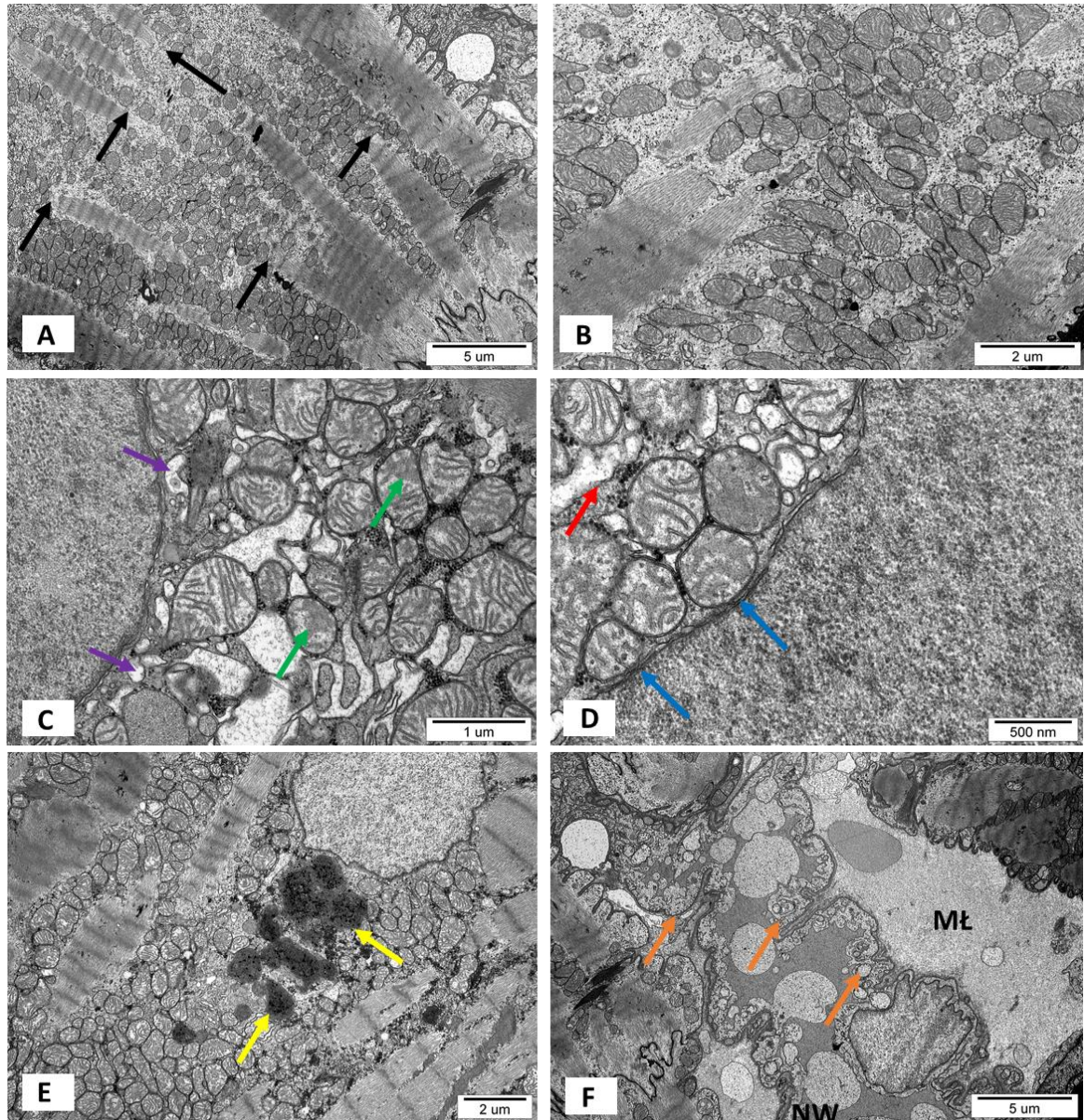
## NT-proBNP

Analiza ultrastrukturalna wykazała niewielkie zmiany ultrastrukturalne w materiale pobranym od pacjentów z niskim stężeniem NT-proBNP w surowicy krwi. Kardiomiocyty najczęściej charakteryzowały się prawidłową budową morfologiczną (Rycina 25 A). W pobliżu jądra niektórych kardiomiocytów miofibryle wykazywały brak ciągłości, a w okolicy licznie występowały mitochondria (Rycina 25 B). Cechą charakterystyczną mitochondriów była zatarta struktura grzebieni i ogniskowo przerwana błona zewnętrzna. Niektóre mitochondria ściśle przylegały do błony zewnętrznej jąder kardiomiocytów (Rycina 25 C). Typową cechą dla tej grupy chorych było występowanie połączeń błony zewnętrznej sąsiadujących ze sobą mitochondriów (Rycina 25 C - powiększenie). W okolicy jąder kardiomiocytów występowały czasami figury autofagalne. Przestrzeń zewnątrzkomórkową wypełniał materiał łącznotkankowy i naczynia włosowate, najczęściej o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej (Rycina 25 D).



Rycina 25. Mięsień sercowy pacjentów z niskim poziomem NT-proBNP. A-B. Aparat kurczliwy + liczne mitochondria; C. Jądro komórkowe, na powiększeniu widoczne jest połączenie błony mitochondriów; D. Przestrzeń zewnątrzkomórkowa + aparat kurczliwy. (MŁ – materiał łącznotkankowy, NW – naczynia włosowate, czarna strzałka – zatarta struktura aparatu kurczliwego, czerwona strzałka – połączenie błony zewnętrznej mitochondriów, zielona strzałka – zewnętrzna błona jądrowa)

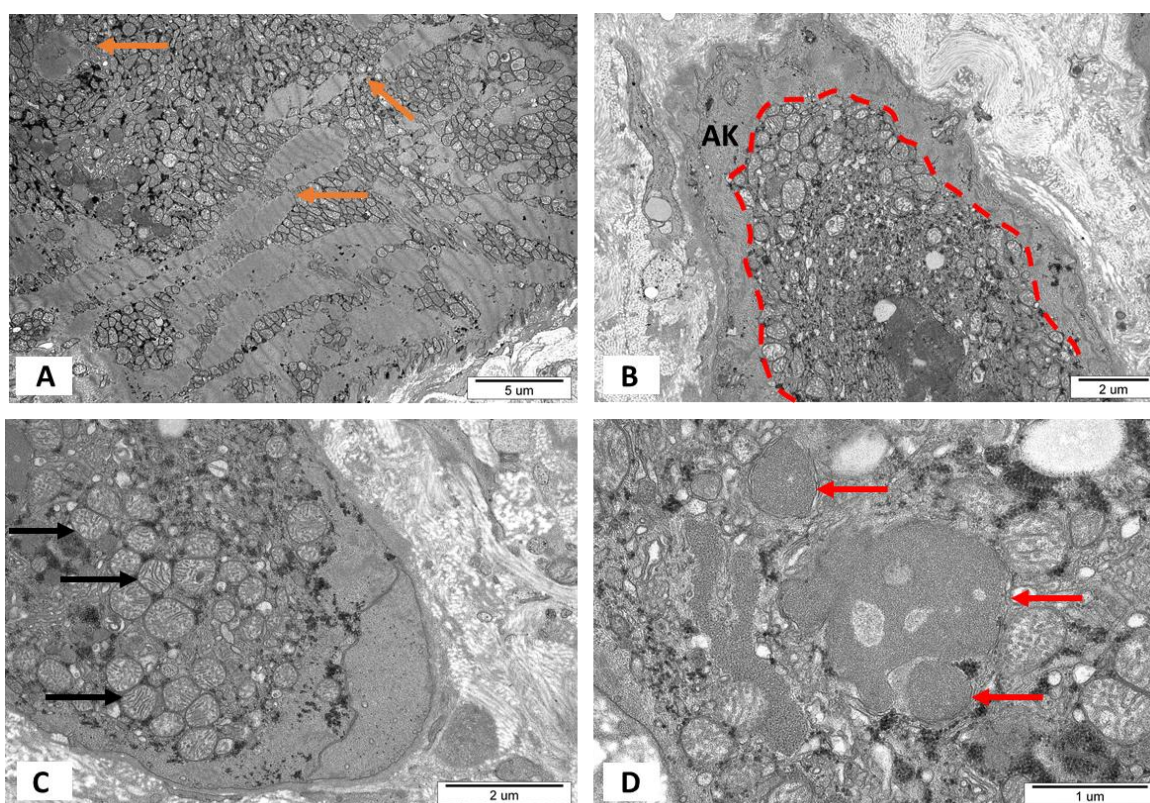
Analiza ultrastrukturalna wykazała zmiany we wszystkich elementach jednostki mięśniowo-naczyniowej w materiale pobranym od chorych z wysokim poziomem NT-proBNP. Kardiomiocyty najczęściej charakteryzowały się brakiem ciągłości miofibryli (Rycina 26 A). Cecha ta była zdecydowanie bardziej nasiloną niż w grupie z niskim NT-proBNP. W miejscach tych obecne były mitochondria o różnym kształcie, czasami ściśle ze sobą połączone (Rycina 26 B). W pobliżu jąder kardiomiocytów licznie występowały mitochondria, których grzebień charakteryzowały się zatartą strukturą (Rycina 26 C). Często tak zmienione mitochondria bezpośrednio przylegały do zewnętrznej błony otoczki jądrowej (Rycina 26 D). Obserwowano również leżącą w bezpośrednim kontakcie z nimi siateczkę śródplazmatyczną, która była obrzęknięta (Rycina 26 C), cechy tej nie obserwowano w grupie z niskim poziomem NT-proBNP. Niekiedy obecne były także figury autofagalne (Rycina 26 E). W przestrzeni zewnątrzkomórkowej występował materiał łącznotkankowy i naczynia włosowate najczęściej o charakterze pętli. Komórki śródbłonkowe wykazywały morfologiczne cechy nekrozy (Rycina 26 F), co nie było obserwowane w grupie z niskim NT-proBNP.



Rycina 26. Mięsień sercowy pacjentów z wysokim poziomem NT-proBNP. A-B. Kardiomiocyty + liczne mitochondria; C-D Uszkodzone mitochondria + jądro komórkowe; E. Figury autofagalne; F. Nekroza śródbłonna. (czarna strzałka – brak ciągłości miofibryli, zielona strzałka – zatarte grzebienie mitochondrialne, czerwona strzałka – siateczka śródplazmatyczna, niebieska strzałka – zewnętrzna błona otoczki jądrowej, żółta strzałka – figury autofagalne, pomarańczowa strzałka – komórki śródbłonna o cechach nekrozy, fioletowa strzałka – obrzęk siateczki śródplazmatycznej)

## Troponina I

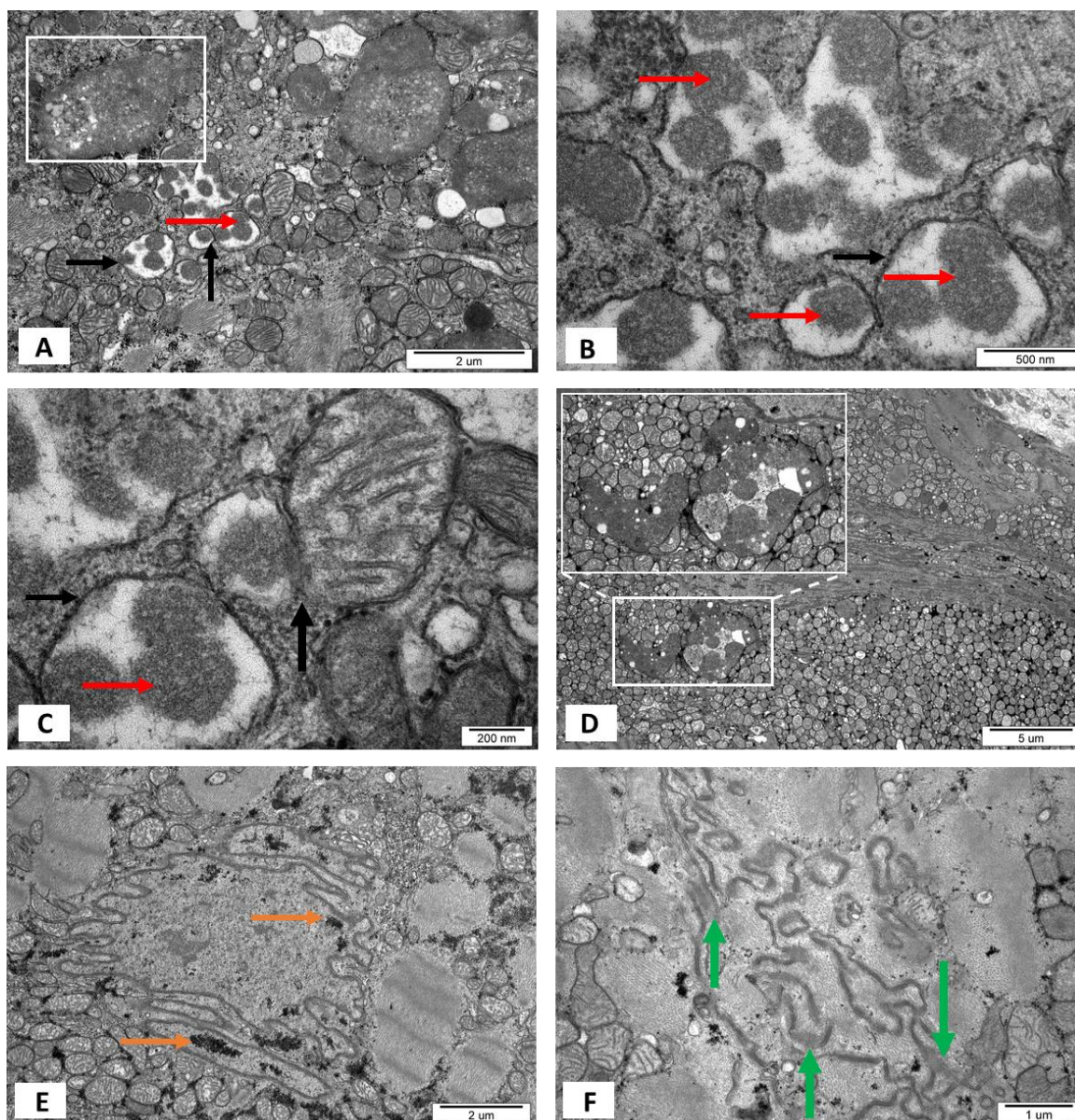
Analiza mikroskopowo-elektronowa materiału pobranego od chorych z niskim poziomem troponiny I wykazała zmiany morfologiczne w obrębie wszystkich elementów tkanek mięśnia sercowego. Kardiomiocyty najczęściej charakteryzowały się zmienioną morfologią. W wielu kardiomiocytach obserwowano brak ciągłości aparatu kurczliwego (Rycina 27 A), często występował on jedynie w okolicach podbłonowych, a w centralnej części kardiomiocyty obecne były jedynie organelle komórkowe i materiał drobnowłókienny (Rycina 27 B). W takich miejscach licznie występowały przylegające do siebie mitochondria, które wykazywały najczęściej cechy obrzęku (Rycina 27 C). Czasami błony zewnętrzne mitochondriów posiadały zatartą strukturę. W bezpośrednim sąsiedztwie tych mitochondriów występowały pęcherzyki otoczone podwójną błoną, wypełnione materiałem o ziarnistej strukturze (Rycina 27 D).



Rycina 27. Mięsień sercowy pacjentów z niskim poziomem troponiny T. A-C. Uszkodzone kardiomiocyty; D. Uszkodzone mitochondria. (AK – aparat kurczliwy, pomarańczowa strzałka – brak ciągłości aparatu kurczliwego, czarna strzałka – mitochondria z cechami obrzęku, czerwona strzałka – pęcherzyki wypełnione materiałem ziarnistym)

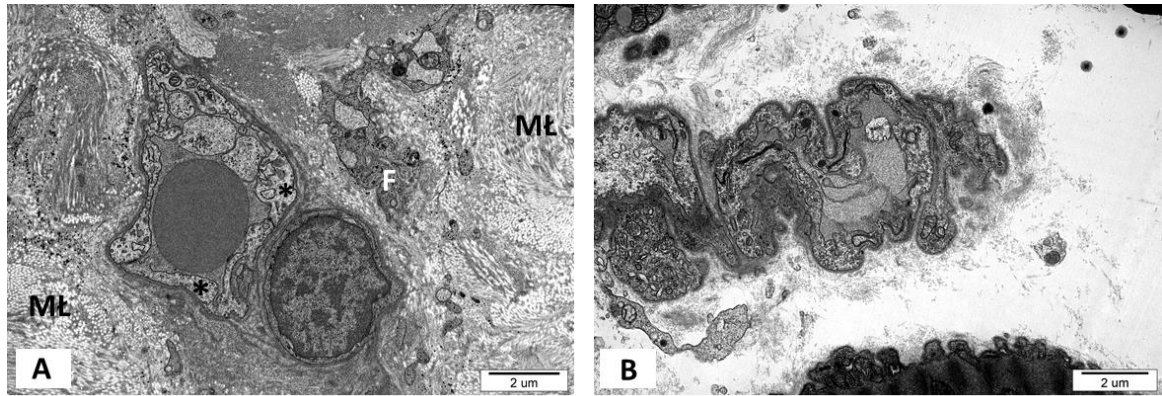


W cytoplazmie kardiomiocytów często występowała również zmieniona ultrastrukturalnie siateczka śródplazmatyczna szorstka, między której błonami występował bezpostaciowy materiał. Do tak zmienionej siateczki przylegały mitochondria o przerwanej błonie zewnętrznej (Rycina 28 A,B,C), a w sąsiedztwie często występowały równocześnie figury autofagalne (Rycina 28 A,D). Zmienioną morfologią charakteryzowały się także jądra kardiomiocytów. Posiadały one nieregularny kształt i wgłobienia w otoczce jądrowej, często ogniskowo przerwanej (Rycina 28 D,E). Na terenie jądra komórkowego obserwowano obecność organelli komórkowych i ziaren glikogenu (Rycina 28 E). Struktura połączeń pomiędzy kardiomiocytami bywała zatarta (Rycina 28 F).



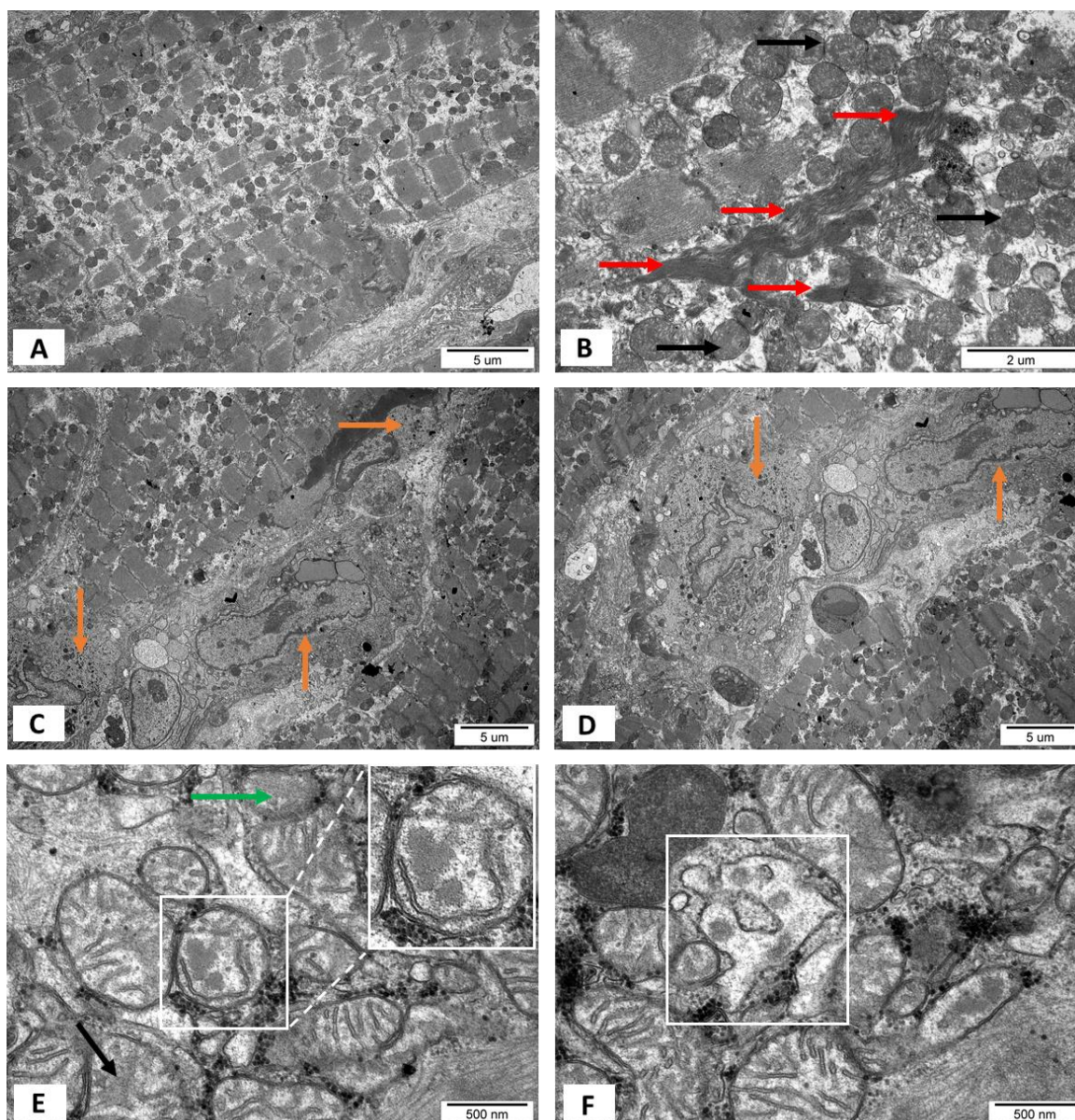
Rycina 28. Mięsień sercowy pacjentów z niskim poziomem troponiny T. A-C. Nieprawidłowa siateczka śródplazmatyczna + uszkodzone mitochondria; D. Figury autofagalne; E. Jądro komórkowe; F. Połączenie międzykomórkowe. (ramka na A i D – figury autofagalne, czarna strzałka – szorstka siateczka śródplazmatyczna, czerwona strzałka – amorficzny materiał, pomarańczowa strzałka – glikogen, zielona strzałka – zatarte połączenie międzykomórkowe)

W przestrzeni międzykomórkowej obficie występował materiał łącznotkankowy (Rycina 29 A), a także fibroblasty i naczynia włosowate niekiedy wyścielone śródbłonkiem wykazującym cechy nekrozy. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej występowały również również nieliczne naczynia włosowate, które tworzyły struktury o charakterze pętli naczyniowych (Rycina 29 B).



Rycina 29. Mięsień sercowy pacjentów z niskim poziomem troponiny T. A. Przestrzeń zewnątrzkomórkowa; B. Naczynie krwionośne. (F – fibroblasty, MŁ – materiał łącznotkankowy, gwiazdka – nekroza komórek śródbłónka)

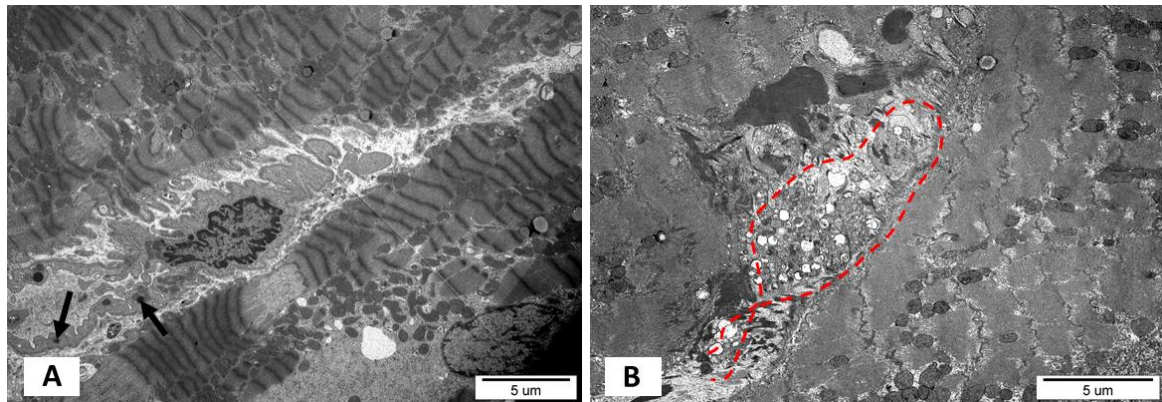
Ocena mikroskopowo-elektronowa materiału pobranego od pacjentów z wysokim poziomem troponiny I wykazała zmiany morfologiczne w wielu kardiomiocytach. W komórkach tych przerwane były miofibryle, a jasna elektronowo cytoplazma niemal w całości wypełniona była mitochondriami, leżącymi najczęściej luźno (Rycina 30 A). Cecha ta była zdecydowanie bardziej nasiloną niż u chorych z prawidłowym poziomem markerów martwicy miokardium. Mitochondria częściej niż u chorych z prawidłowym poziomem troponiny posiadały zatartą strukturę grzebieni oraz ubytki w błonie zewnętrznej, a w sąsiedztwie mitochondriów i przerwanych miofibryli występowały ciemne elektronowo włókienka o morfologii desminy (Rycina 30 B). W sąsiadującej przestrzeni zewnątrzkomórkowej obecne były komórki o morfologii limfocytów i monocytów (Rycina 30 C,D) oraz cysterny siateczki śródplazmatycznej. Ponadto w badanych tkankach obserwowano kardiomiocyty, w których cytoplazmie obecne były mitochondria charakteryzujące się przerwaniem błony zewnętrznej i zatarciem struktury grzebieni. Cecha ta była bardziej nasiloną niż w grupie z niską troponiną. W macierzy mitochondrialnej okazjonalnie widoczny był bezpostaciowy materiał (Rycina 30 E). Pomiędzy błonami siateczki sarkoplazmatycznej obecny był amorficzny materiał (Rycina 30 F), a w sąsiedztwie występowały figury autofagalne, jednak cecha ta była słabo nasiloną w porównaniu do chorych z niskim poziomem troponiny.



Rycina 30. Mięsień sercowy pacjentów z wysokim poziomem troponiny T. A. Nieprawidłowe kardiomiocyty; B. Aparat kurczliwy + uszkodzone mitochondria; C-D. Limfocyty i monocyty; E. Nieprawidłowe mitochondria; F. Poszerzona siateczka śródplazmatyczna. (czarna strzałka – zatarta struktura mitochondriów, czerwona strzałka – włókienka o morfologii desminy, pomarańczowa strzałka – limfocyty/monocyty, zielona strzałka – uszkodzone mitochondria)

Zmiany morfologiczne obserwowano również w jądrach kardiomiocytów, niektóre z nich posiadały przerwany otoczkę jądrową. Przestrzeń zewnątrzkomórkowa była bogata w materiał łącznotkankowy i naczynia włosowate charakteryzujące się nieregularnym kształtem. Często przybierały one formę pętli i zawierały ziarnistości

cytoplazmatyczne (Rycina 31 A). Interesującym znaleziskiem w tej grupie pacjentów, nieobserwowanym wcześniej, była obecność w przestrzeni zewnątrzkomórkowej fragmentów zmienionych morfologicznie kardiomiocytów (Rycina 31 B), co wskazuje na przerwanie niektórych błon sarkoplazmatycznych (obszar przestrzeni międzykomórkowej wypełniony uszkodzonymi organellami zaznaczono czerwoną przerywaną linią).



Rycina 31. Mięsień sercowy pacjentów z wysokim poziomem troponiny T. A. Naczynie krwionośne; B. Przestrzeń zewnątrzkomórkowa. (czarna strzałka – ziarnistości wewnątrz komórek śród błonka, czerwona obwódka – uszkodzone organella komórkowe)

### 7.4.3. Podsumowanie analizy mikroskopowo-elektronowej

W badanym materiale obserwowano szereg zmian ultrastrukturalnych w obrębie elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej, tj. dotyczących kardiomiocytów (m.in. uszkodzenie aparatu kurczliwego, obrzęk siateczki śródplazmatycznej, zatarcie struktury lub przerwanie ciągłości otoczki jądrowej, poszerzenie porów jądrowych, poszerzenie przestrzeni pomiędzy błonami jądrowymi, autofagia mitochondriów, uszkodzenia błon mitochondrialnych, uszkodzenie struktury grzebieni mitochondrialnych, nasilenie podziałów mitochondrialnych, poszerzenie połączeń międzykomórkowych) i naczyń krwionośnych (m.in. nekroza i hipertrofia komórek śródbłonka, formowanie pętli naczyniowych, zwężenie światła naczyń kapilarnych, nasilenie endocytozy w obrębie komórek śródbłonka). Zmiany ultrastrukturalne w obrębie elementów jednostki mięśniowo naczyniowej wykazywały odmienny stopień nasilenia w zależności od kopijności parwowirusa B19 w badanym materiale. Ponadto odchylenia od normy były bardziej zaznaczone u chorych z większym stopniem zaawansowania objawów niewydolności serca, co koreluje także z poziomem NT-proBNP. Podobnie elementy CVU wykazują większy stopień uszkodzenia w przypadku chorych z wysokim poziomem troponiny I. Z kolei końcoworozkurczowy wymiar lewej komory oraz jej frakcja wyrzutowa były parametrami, których zmienność okazała się niezwiązana bezpośrednio z patologiami w obrębie CVU. Jednakże wykonana analiza nie pozwalała na ustalenie systematyki zmian ultrastrukturalnych zachodzących w przebiegu infekcji B19V oraz wyróżnienie charakterystycznych cech dla poszczególnych etapów infekcji. Ma to związek z małą liczebnością grup wyróżnionych w niniejszym opracowaniu. Aby określić istotność zmian obserwowanych w mikroskopii elektronowej, lub też jej brak, należałoby wykonać badanie na większej grupie pacjentów, optymalnie wieloośrodkowe.

## 7.5. Ustalenie przebiegu infekcji parwowirusem B19

W kolejnym etapie analizy, aby ustalić możliwy przebieg zmian morfologii elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej w przebiegu infekcji B19V, chorych z tej grupy podzielono na 4 podgrupy w zależności od prawidłowej bądź upośledzonej frakcji wyrzutowej lewej komory oraz od liczby kopii wirusa stwierdzonych w bioptacie. Na tym etapie badań za wartość rozgraniczającą wysoką i niską kopijność parwowirusa B19 przyjęto 5000 kopii (Tabela 8).

Tabela 8. Grupy badane G1-G4

	B19V<5000 kopii <sup>2</sup>	B19V>5000 kopii <sup>2</sup>
LVEF <50%	<b>Grupa G1 (n=15)</b>	<b>Grupa G3 (n=5)</b>
LVEF ≥50%	<b>Grupa G2 (n=9)</b>	<b>Grupa G4 (n=9)</b>

### 7.5.1. Analiza zmian w obrębie elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej

Badany materiał poddano ocenie w mikroskopii elektronowej pod względem 17 cech patologicznej przebudowy mięśnia sercowego, które były obserwowane w analizowanym materiale. Nasilenie zmian oceniano w 4-stopniowej skali jako małe (1), średnie (2) i duże (3) w porównaniu do pozostałych badanych grup lub też brak obecności danej cechy (0).

---

<sup>2</sup> Poziom kopijności B19V w przeliczeniu na 10<sup>6</sup> kopii genu G6PD.

W badanym materiale stwierdzono istotne różnice pod względem nasilenia podziałów mitochondrialnych w grupach G1-G4. Zaobserwowano także istotne zróżnicowanie, jeśli chodzi o zwężenie lub zamknięcie światła naczyń kapilarnych oraz przerwanie otoczki jądrowej (Tabela 9).

Tabela 9. Ocena materiału biopsyjnego w TEM

Nasilenie	G1		G2		G3		G4		K		p
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Fragmentacja włókien mięśniowych											
0 - brak	8	61,54	5	62,5	0	0	3	33,3	1	20	<b>0,077</b>
1 - małe	1	7,69	1	12,5	4	80	4	44,4	3	60	
2 - średnie	2	15,38	2	25	1	20	2	22,2	1	20	
3 - duże	2	15,38	0	0	0	0	0	0	0	0	
Zwiększenie odległości między komórkami											
0 - brak	1	7,69	4	50	1	20	2	22,2	3	60	<b>0,126</b>
1 - małe	3	23,08	2	25	2	40	6	66,7	2	40	
2 - średnie	6	46,15	1	12,5	2	40	0	0	0	0	
3 - duże	3	23,08	1	12,5	0	0	1	11,1	0	0	
Poszerzenie retikulum endoplazmatycznego											
0 - brak	7	53,85	6	75	1	20	4	44,4	5	100	<b>0,357</b>
1 - małe	3	23,08	1	12,5	3	60	1	11,1	0	0	
2 - średnie	1	7,69	1	12,5	1	20	3	33,3	0	0	
3 - duże	2	15,38	0	0	0	0	1	11,1	0	0	
Włóknienie przestrzeni zewnątrzkomórkowej											
0 - brak	0	0	1	11,1	0	0	1	11,1	2	40	<b>0,881</b>
1 - małe	8	53,3	5	55,6	3	60	5	55,6	2	40	
2 - średnie	5	33,3	3	33,3	2	40	2	22,2	1	20	
3 - duże	2	13,3	0	0	0	0	1	11,1	0	0	
Patologiczne skupiska glikogenu w tkance mięśniowej											
0 - brak	5	38,5	1	12,5	2	40	3	33,3	0	0	<b>0,433</b>
1 - małe	6	46,2	2	25	1	20	3	33,3	4	80	
2 - średnie	2	15,4	5	62,5	2	40	2	22,2	1	20	
3 - duże	0	0	0	0	0	0	1	11,1	0	0	
Zatarta struktura mitochondriów											
0 - brak	1	7,69	1	12,5	1	20	0	0	0	0	<b>0,554</b>
1 - małe	4	30,77	3	37,5	2	40	2	22,2	3	60	
2 - średnie	5	38,46	4	50	2	40	3	33,3	2	40	
3 - duże	3	23,08	0	0	0	0	4	44,4	0	0	
Częściowy zanik grzebieni mitochondrialnych											
0 - brak	5	38,5	5	62,5	2	40	2	22,2	2	40	<b>0,732</b>



1 - małe	6	46,2	2	25	2	40	6	66,7	3	60	
2 - średnie	2	15,4	1	12,5	1	20	1	11,1	0	0	
3 - duże	5	38,5	5	62,5	2	40	2	22,2	2	40	
Autofagia mitochondriów											
0 - brak	4	30,8	2	25	0	0	0	0	0	0	<b>0,258</b>
1 - małe	3	23,1	3	37,5	2	40	4	44,4	3	60	
2 - średnie	6	46,2	3	37,5	2	40	5	55,6	1	20	
3 - duże	0	0	0	0	1	20	0	0	1	20	
Liczne podziały mitochondrialne											
0 - brak	4	30,8	3	37,5	3	60	0	0	1	20	<b>0,031</b>
1 - małe	7	53,8	1	12,5	0	0	2	22,2	0	0	
2 - średnie	2	15,4	4	50	2	40	5	55,6	2	40	
3 - duże	0	0	0	0	0	0	2	22,2	2	40	
Zwiększona gęstość macierzy mitochondrialnej											
0 - brak	7	53,85	4	50	2	40	6	66,7	1	20	<b>0,858</b>
1 - małe	3	23,08	1	12,5	1	20	2	22,2	2	40	
2 - średnie	2	15,38	3	37,5	2	40	1	11,1	2	40	
3 - duże	1	7,69	0	0	0	0	0	0	0	0	
Przerwana zewnętrzna błona mitochondrialna											
0 - brak	0	0	1	12,5	0	0	0	0	0	0	<b>0,876</b>
1 - małe	7	53,85	3	37,5	3	60	5	55,6	5	100	
2 - średnie	5	38,46	3	37,5	2	40	3	33,3	0	0	
3 - duże	1	7,69	1	12,5	0	0	1	11,1	0	0	
Hipertroficzny śródbłonek naczyniowy											
0 - brak	3	23,1	1	12,5	3	60	1	11,1	1	20	<b>0,238</b>
1 - małe	4	30,8	6	75	2	40	3	33,3	2	40	
2 - średnie	4	30,8	1	12,5	0	0	4	44,4	2	40	
3 - duże	2	15,4	0	0	0	0	1	11,1	0	0	
Zwężone lub zamknięte światło naczyń											
0 - brak	3	23,08	7	87,5	0	0	6	66,7	1	20	<b>0,049</b>
1 - małe	5	38,46	1	12,5	4	80	2	22,2	2	40	
2 - średnie	4	30,77	0	0	1	20	1	11,1	2	40	
3 - duże	1	7,69	0	0	0	0	0	0	0	0	
Formowanie pętli naczyniowych											
0 - brak	7	53,85	6	75	3	60	3	33,3	3	60	<b>0,660</b>
1 - małe	5	38,46	1	12,5	1	20	4	44,4	2	40	
2 - średnie	1	7,69	1	12,5	1	20	2	22,2	0	0	
3 - duże	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Nekroza śródbłonna											
0 - brak	5	38,46	5	62,5	4	80	5	55,6	2	40	<b>0,506</b>
1 - małe	7	53,85	2	25	1	20	2	22,2	0	0	
2 - średnie	1	7,69	1	12,5	0	0	2	22,2	3	60	
3 - duże	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Przerwana otoczka jądrowa											
0 - brak	3	23,1	5	62,5	4	80	1	11,1	1	20	<b>0,045</b>
1 - małe	7	53,8	2	25	1	20	3	33,3	3	60	
2 - średnie	3	23,1	1	12,5	0	0	5	55,6	1	20	
Poszerzona przestrzeń między blaszkami otoczki jądrowej											
0 - brak	5	38,46	7	87,5	5	100	4	44,4	2	40	<b>0,258</b>
1 - małe	3	23,08	1	12,5	0	0	3	33,3	3	60	
2 - średnie	4	30,77	0	0	0	0	2	22,2	0	0	
3 - duże	1	7,69	0	0	0	0	0	0	0	0	

Post hoc stwierdzono, że podziały mitochondrialne były znacznie bardziej nasilone w grupie G4 w porównaniu z grupą G1. Wyższy stopień zwężenia światła naczyń krwionośnych obserwowano w grupach G1 i G3 niż w grupie G2, większa część naczyń była także zwężona w grupie G3 w porównaniu z grupą G4, a otoczka jądrowa była istotnie częściej poprzerwana w grupie G4 w zestawieniu z grupą G3 (Tabele 10, 11 i 12).

Tabela 10. Liczne podziały mitochondrialne – różnice w zakresie grup G1-G4

<b>Liczne podziały mitochondrialne (p)</b>					
<i>G1 vs G2</i>	<i>G1 vs G3</i>	<i>G1 vs G4</i>	<i>G2 vs G3</i>	<i>G2 vs G4</i>	<i>G3 vs G4</i>
0,113	0,107	<b>0,0217</b>	0,598	0,144	0,0508

Tabela 11. Zwężenie światła naczyń – różnice w zakresie grup G1-G4

<b>Zwężenie światła naczyń kapilarnych (p)</b>					
<i>G1 vs G2</i>	<i>G1 vs G3</i>	<i>G1 vs G4</i>	<i>G2 vs G3</i>	<i>G2 vs G4</i>	<i>G3 vs G4</i>
<b>0,036</b>	0,402	0,212	<b>0,008</b>	0,508	<b>0,049</b>

Tabela 12. Przerwana otoczka jądrowa – różnice w zakresie grup G1-G4

<b>Przerwana otoczka jądrowa (p)</b>					
<i>G1 vs G2</i>	<i>G1 vs G3</i>	<i>G1 vs G4</i>	<i>G2 vs G3</i>	<i>G2 vs G4</i>	<i>G3 vs G4</i>
0,195	0,078	0,293	0,672	0,064	<b>0,027</b>

## 7.5.2. Badanie echokardiograficzne

Na podstawie analizy parametrów echokardiograficznych stwierdzono istotne różnice w obrębie grup G1-G4 w zakresie wymiaru końcoworozkurczowego lewej komory oraz frakcji wyrzutowej. Ponadto grupy G1-G4 różniły się istotnie między sobą wymiarem lewego przedsionka, wartością TAPSE oraz występowaniem i stopniem niedomykalności zastawki mitralnej (Tabela 13).

Tabela 13. Pomiary echokardiograficzne

Zmienna	Grupa	N	x	Me	sd	V	min	max	p
LVEDd	G1	15	61,667	63	11,980	19,427	38,0	79,0	<b>0,009</b>
	G2	9	49,889	51	6,373	12,774	37,0	58,0	
	G3	5	61,600	57	14,346	23,289	52,0	87,0	
	G4	9	49,111	51	6,679	13,600	40,0	58,0	
LVEF	G1	15	30,267	30	9,339	30,854	15,0	45,0	<b>0,000</b>
	G2	9	56,556	55	4,799	8,485	50,0	64,0	
	G3	5	31,600	30	8,820	27,913	23,0	45,0	
	G4	9	58,333	55	4,330	7,423	55,0	65,0	
IVS	G1	11	10,455	9	2,018	19,304	9,0	14,0	<b>0,229</b>
	G2	8	13,000	11,5	4,986	38,351	8,0	23,0	
	G3	4	10,250	10,5	1,708	16,662	8,0	12,0	
	G4	6	10,000	10	1,549	15,492	8,0	12,0	
PW	G1	13	10,308	10	1,843	17,882	8,0	15,0	<b>0,111</b>
	G2	9	12,222	11	3,456	28,277	9,0	19,0	
	G3	4	10,250	10	1,258	12,276	9,0	12,0	
	G4	6	9,167	8,5	1,941	21,172	7,0	12,0	
LA	G1	13	46,231	49	7,791	16,851	32,0	57,0	<b>0,008</b>
	G2	9	43,667	44	5,148	11,789	35,0	51,0	
	G3	4	45,500	45,5	6,245	13,725	38,0	53,0	
	G4	7	34,714	38	6,576	18,942	26,0	42,0	
RV	G1	13	33,923	34	4,212	12,417	25,0	39,0	<b>0,220</b>
	G2	9	35,333	32	12,329	34,893	25,0	64,0	
	G3	3	38,333	41	9,292	24,239	28,0	46,0	
	G4	8	28,750	29,5	4,652	16,182	21,0	35,0	
TAPSE	G1	12	18,917	18	4,274	22,593	14,0	30,0	<b>0,019</b>
	G2	9	22,444	23	3,844	17,128	14,0	28,0	
	G3	4	19,500	19	3,000	15,385	17,0	23,0	
	G4	7	24,286	23	2,059	8,477	22,0	27,0	
MR	G1	10	1,500	1	0,707	47,140	1,0	3,0	<b>0,028</b>
	G2	7	0,714	1	0,488	68,313	0,0	1,0	

	G3	5	0,800	1	0,447	55,902	0,0	1,0	
	G4	8	0,625	0,5	0,744	119,044	0,0	2,0	
<b>E/A</b>	G1	7	1,486	1,3	0,739	49,736	0,7	2,8	<b>0,211</b>
	G2	9	1,101	1,14	0,489	44,409	0,4	2,0	
	G3	3	0,950	1	0,180	18,977	0,8	1,1	
	G4	8	1,594	1,46	0,589	36,982	0,9	2,5	
<b>E</b>	G1	8	69,324	74,3	33,758	48,695	0,5	104,0	<b>0,667</b>
	G2	7	59,800	62	15,248	25,499	31,1	80,0	
	G3	4	66,550	63,5	14,755	22,171	53,3	85,9	
	G4	3	79,667	80	2,517	3,159	77,0	82,0	
<b>A</b>	G1	5	72,440	70	16,508	22,788	55,0	93,8	<b>0,627</b>
	G2	7	62,300	70	20,787	33,366	30,0	89,0	
	G3	3	64,200	70	10,570	16,464	52,0	70,6	
	G4	3	56,567	53,7	12,254	21,663	46,0	70,0	
<b>E'</b>	G1	7	4,935	5	2,825	57,248	0,0	9,5	<b>0,773</b>
	G2	6	5,040	5,53	1,594	31,632	1,9	6,4	
	G3	3	7,120	6	2,423	34,026	5,5	9,9	
	G4	6	5,136	4,935	4,708	91,658	0,0	11,9	
<b>E/E'</b>	G1	12	14,570	13,1	5,857	40,196	7,3	26,5	<b>0,416</b>
	G2	7	12,089	11,07	2,787	23,058	9,8	16,4	
	G3	3	10,037	9,76	1,514	15,085	8,7	11,7	
	G4	2	10,970	10,97	6,364	58,012	6,5	15,5	
<b>AV Vmax</b>	G1	6	1,200	1,15	0,210	17,480	1,0	1,5	<b>0,527</b>
	G2	3	1,433	1,3	0,321	22,427	1,2	1,8	
	G3	1	1,400	1,4			1,4	1,4	
	G4	7	2,043	1,5	1,485	72,708	1,2	5,3	
<b>AR</b>	G1	6	0,167	0	0,408	244,949	0,0	1,0	<b>0,535</b>
	G2	4	0,250	0	0,500	200,000	0,0	1,0	
	G3	3	0,667	1	0,577	86,603	0,0	1,0	
	G4	7	0,286	0	0,488	170,783	0,0	1,0	
<b>TR</b>	G1	7	1,000	1	1,000	100,000	0,0	3,0	<b>0,863</b>
	G2	6	0,833	1	0,408	48,990	0,0	1,0	
	G3	3	0,667	1	0,577	86,603	0,0	1,0	
	G4	8	0,750	1	0,463	61,721	0,0	1,0	
<b>AcT</b>	G1	12	105,917	107,5	20,554	19,405	70,0	141,0	<b>0,249</b>
	G2	6	113,333	114,5	26,688	23,549	67,0	148,0	
	G3	2	126,500	126,5	34,648	27,390	102,0	151,0	
	G4	7	128,286	123	24,683	19,240	106,0	176,0	
<b>PR</b>	G1	7	0,714	1	0,756	105,830	0,0	2,0	<b>0,663</b>
	G2	4	0,750	1	0,500	66,667	0,0	1,0	
	G3	2	1,000	1	0,000	0,000	1,0	1,0	
	G4	5	0,400	0	0,548	136,931	0,0	1,0	

Analiza post hoc wykazała istotne różnice pod względem wymiaru końcoworozkurczowego oraz frakcji wyrzutowej lewej komory pomiędzy grupami G1 i G2, G1 i G4, G2 i G3 oraz G3 i G4, pod względem szerokości lewego przedsionka pomiędzy grupą G4 a grupami G1, G2 i G3, pod względem TAPSE pomiędzy grupą G4 a grupami G1 i G3, natomiast jeśli chodzi o niedomykalność mitralną, pomiędzy grupą G1 a grupami G2, G3 i G4 (Tabele 14, 15, 16, 17 i 18).

Tabela 14. Analiza post hoc – test Duncana dla LVEDd

Grupa	Test Duncana; zmienna: LVEDd			
	{1}	{2}	{3}	{4}
G1 {1}		0,032195	0,989600	0,026847
G2 {2}	0,032195		0,025999	0,878044
G3 {3}	0,989600	0,025999		0,023490
G4 {4}	0,026847	0,878044	0,023490	

Tabela 15. Analiza post hoc – test Duncana dla LVEF

Grupa	Test Duncana; zmienna: LVEF			
	{1}	{2}	{3}	{4}
G1 {1}		0,000062	0,718244	0,000054
G2 {2}	0,000062		0,000120	0,630686
G3 {3}	0,718244	0,000120		0,000062
G4 {4}	0,000054	0,630686	0,000062	

Tabela 16. Analiza post hoc – test Duncana dla LA

Grupa	Test Duncana; zmienna: LA			
	{1}	{2}	{3}	{4}
G1 {1}		0,512096	0,842044	0,005975
G2 {2}	0,512096		0,617615	0,019986
G3 {3}	0,842044	0,617615		0,008001
G4 {4}	0,005975	0,019986	0,008001	

Tabela 17. Analiza post hoc – test Duncana dla TAPSE

Grupa	Test Duncana; zmienna: TAPSE			
	{1}	{2}	{3}	{4}
G1 {1}		0,101313	0,769917	0,017396
G2 {2}	0,101313		0,147125	0,359066
G3 {3}	0,769917	0,147125		0,028290
G4 {4}	0,017396	0,359066	0,028290	

Tabela 18. Analiza post hoc – test Duncana dla MR

Grupa	Test Duncana; zmienna: MR			
	{1}	{2}	{3}	{4}
G1 {1}		0,036852	0,049961	0,024655
G2 {2}	0,036852		0,803225	0,795208
G3 {3}	0,049961	0,803225		0,632806
G4 {4}	0,024655	0,795208	0,632806	

### 7.5.3. Zaburzenia kurczliwości i przerost mięśnia

Analizując zaburzenia kurczliwości mięśnia lewej komory stwierdzone w badaniu echokardiograficznym, należy zwrócić uwagę na istotne różnice w grupach G1-G4 pod względem występowania zaburzeń kurczliwości, ich obecności w postaci uogólnionej, a także regionalnego umiejscowienia w obrębie ściany przedniej, dolnej, w obrębie przegrody międzykomorowej oraz koniuszka lewej komory (Tabela 19).

Tabela 19. Zaburzenia kurczliwości i przerost ścian LV w TTE

	G1		G2		G3		G4		p
	N	%	N	%	N	%	N	%	
<b>zaburzenia kurczliwości</b>									
<b>nieobecne</b>	2	13,3	8	88,9	2	40	8	88,9	<b>0,000</b>
<b>obecne</b>	13	86,7	1	11,1	3	60	1	11,1	
<b>uogólnione zaburzenia kurczliwości</b>									
<b>nieobecne</b>	5	33,3	9	100	2	40	9	100	<b>0,001</b>
<b>obecne</b>	10	66,7	0	0	3	60	0	0	
<b>zaburzenia kurczliwości w obrębie ściany przedniej</b>									
<b>nieobecne</b>	6	40	8	88,9	2	40	9	100	<b>0,005</b>
<b>obecne</b>	9	60	1	11,1	3	60	0	0	
<b>zaburzenia kurczliwości w obrębie ściany tylnej</b>									
<b>nieobecne</b>	11	73,3	9	100	5	100	9	100	<b>0,077</b>
<b>obecne</b>	4	26,7	0	0	0	0	0	0	
<b>zaburzenia kurczliwości w obrębie ściany dolnej</b>									
<b>nieobecne</b>	7	46,7	8	88,9	2	40	8	88,9	<b>0,042</b>
<b>obecne</b>	8	53,3	1	11,1	3	60	1	11,1	
<b>zaburzenia kurczliwości w obrębie ściany bocznej</b>									
<b>nieobecne</b>	9	60	8	88,9	4	80	9	100	<b>0,103</b>
<b>obecne</b>	6	40	1	11,1	1	20	0	0	

zaburzenia kurczliwości w obrębie przegrody międzykomorowej									
nieobecne	7	46,7	9	100	2	40	9	100	<b>0,003</b>
obecne	8	53,3	0	0	3	60	0	0	
zaburzenia kurczliwości w obrębie koniuszka lewej komory									
nieobecne	10	66,7	9	100	3	60	9	100	<b>0,049</b>
obecne	5	33,3	0	0	2	40	0	0	
przerost ścian lewej komory									
nieobecne	6	40	7	77,8	3	60	5	55,6	<b>0,347</b>
obecne	9	60	2	22,2	2	40	4	44,4	

Na podstawie analizy post hoc możemy zauważyć, że zaburzenia kurczliwości były znacznie rzadziej obecne w grupach G2 i G4 (w obydwu u 11,1% chorych), niż w grupie G1 (86,7% pacjentów) (Tabela 20). W grupach G2 i G4 również nie występowały uogólnione zaburzenia kurczliwości oraz zlokalizowane w obrębie przegrody międzykomorowej, natomiast w grupie G1 odsetek pacjentów z obecnymi tego typu zaburzeniami stanowił odpowiednio 66,7% oraz 53,3% i były to różnice istotne statystycznie (Tabele 21 i 22). W obrębie ściany przedniej dysfunkcję stwierdzono u 60% pacjentów z grupy G1, natomiast nie obserwowano jej w grupie G4 ( $p=0,012$ ). Blisko progu istotności znalazły się wartości  $p$  dla porównania grup G1 vs G2 oraz G3 vs G4 (Tabela 23). Analizując zaburzenia dotyczące kurczliwości ściany dolnej oraz koniuszka lewej komory, nie wykazano istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami G1-G4 w konfrontacji 1:1 (Tabele 24 i 25).

Tabela 20. Zaburzenia kurczliwości – różnice w zakresie grup G1-G4

<b><i>zaburzenia kurczliwości (p)</i></b>					
<i>G1 vs G2</i>	<i>G1 vs G3</i>	<i>G1 vs G4</i>	<i>G2 vs G3</i>	<i>G2 vs G4</i>	<i>G3 vs G4</i>
<b>0,001</b>	0,519	<b>0,001</b>	0,186	0,999	0,186

Tabela 21. Uogólnione zaburzenia kurczliwości – różnice w zakresie grup G1-G4

<b><i>uogólnione zaburzenia kurczliwości (p)</i></b>					
<i>G1 vs G2</i>	<i>G1 vs G3</i>	<i>G1 vs G4</i>	<i>G2 vs G3</i>	<i>G2 vs G4</i>	<i>G3 vs G4</i>
<b>0,005</b>	0,999	<b>0,005</b>	0,052	----	0,052

Tabela 22. Zaburzenia kurczliwości przegrody międzykomorowej – różnice w zakresie grup G1-G4

<b><i>zaburzenia kurczliwości przegrody międzykomorowej (p)</i></b>					
<i>G1 vs G2</i>	<i>G1 vs G3</i>	<i>G1 vs G4</i>	<i>G2 vs G3</i>	<i>G2 vs G4</i>	<i>G3 vs G4</i>
0,025	0,999	0,025	0,052	---	0,052

Tabela 23. Zaburzenia kurczliwości ściany przedniej – różnice w zakresie grup G1-G4

<b><i>zaburzenia kurczliwości ściany przedniej (p)</i></b>					
<i>G1 vs G2</i>	<i>G1 vs G3</i>	<i>G1 vs G4</i>	<i>G2 vs G3</i>	<i>G2 vs G4</i>	<i>G3 vs G4</i>
0,054	0,999	0,012	0,186	0,999	0,052

Tabela 24. Zaburzenia kurczliwości ściany dolnej – różnice w zakresie grup G1-G4

<b><i>zaburzenia kurczliwości ściany dolnej (p)</i></b>					
<i>G1 vs G2</i>	<i>G1 vs G3</i>	<i>G1 vs G4</i>	<i>G2 vs G3</i>	<i>G2 vs G4</i>	<i>G3 vs G4</i>
0,102	0,999	0,102	0,186	0,999	0,186

Tabela 25. Zaburzenia kurczliwości koniuszka lewej komory – różnice w zakresie grup G1-G4

<b><i>zaburzenia kurczliwości koniuszka lewej komory (p)</i></b>					
<i>G1 vs G2</i>	<i>G1 vs G3</i>	<i>G1 vs G4</i>	<i>G2 vs G3</i>	<i>G2 vs G4</i>	<i>G3 vs G4</i>
0,153	0,999	0,153	0,21	---	0,210



## 8. Dyskusja

Przebudowa serca, którą obserwujemy w wirusowym zapaleniu mięśnia sercowego, występuje jako morfologiczne przejście od tkanki zdrowej do takiej, która jest podatna na destabilizację i progresję w kierunku niewydolności serca. Na poziomie komórkowym przebudowa powoduje stres dla całych kardiomiocytów poprzez zmianę metabolizmu energetycznego, struktury aparatu kurczliwego i cytoszkieletu. Przekształcenia te często w krótkim czasie prowadzą do rozwoju kardiomiopatii rozstrzeniowej. W 1985 roku Rużyło i współpracownicy opisywali cechy aktywnego procesu zapalnego aż w 61% serc poddanych biopsji z powodu stwierdzenia rozstrzeni jamy lewej komory [Rużyło et al.1985]. Należy jednak pamiętać, że był to okres przed wprowadzeniem kryteriów Dallas oraz Marburskich. W populacji przez nas badanej cechy aktywnego procesu zapalnego stwierdzono jedynie u 6,5% wszystkich pacjentów (7,4% pacjentów z grupy B19V).

Zmiany ultrastrukturalne towarzyszące wirusowej chorobie serca czy parwowirusowemu zapaleniu mięśnia sercowego nie były dotąd licznie opisywane. Pojedyncze publikacje oparte były na wynikach badań eksperymentalnych przeprowadzanych na zwierzętach lub hodowlach komórkowych. W niniejszej rozprawie przedstawiono wyniki badań klinicznych oraz ultrastrukturalnych i to one są podstawą analizy porównawczej z wynikami dostępnych badań. Dogłębna analiza mechanizmów kierujących przebiegiem infekcji wirusowej w mięśniu sercowym możliwa będzie dopiero po przeprowadzeniu badań molekularnych.

Pomimo ogromnego postępu w leczeniu niewydolności serca, poczynionego w okresie ostatnich kilkudziesięciu lat i związanego z nim znacznego spadku śmiertelności (wynikającego z większej dostępności do koronarografii i angioplastyk wieńcowych, udoskonalenia farmakoterapii NS, modyfikacji stylu życia chorych i lepszego leczenia chorób współistniejących) [Ziołkowski et al. 2009], niewydolność serca pozostaje jedną z głównych przyczyn zgonów w Polsce i na świecie, a w związku z systematycznym wydłużaniem się średniej długości życia w krajach rozwiniętych, częstość jej występowania stale rośnie [Towbin et al. 2010, Yancy et al. 2018]. Stąd

niezwykle istotne wydaje się ciągle dążenie do opracowania skuteczniejszych schematów farmakoterapii oraz postępowania nefarmakologicznego u chorych z NS. Grupą niewydolności, w której nadal mamy wąski zakres możliwości terapeutycznych, jest NS o etiologii pozapalne, w której to czynnik wirusowy jest podejrzewany o indukcję procesu chorobowego w miokardium. Problem ten wydaje się jeszcze bardziej istotny w obliczu pandemii COVID-19, czyli choroby wywołanej przez koronawirusa SARS-CoV-2. Badacze coraz częściej donoszą o powikłaniach kardiologicznych tej infekcji, takich jak np. zapalenie mięśnia sercowego [Everaert et al. 2020, Long et al. 2020, Samidurai et Das 2020, Zeng et al. 2020].

Pacjenci uwzględnieni w niniejszym projekcie to w większości mężczyźni. Przeważali oni zarówno w grupie, w której stwierdzono wirusowy materiał genetyczny w biopsji mięśnia sercowego, jak i w grupie, w której nie potwierdzono obecności wirusa w miokardium. Skład badanej grupy nieco odbiega od populacji większości badań prowadzonych nad niewydolnością serca, gdzie mężczyźni występują w przewadze, ale stanowią zazwyczaj do 63% chorych [Ambrosy et al. 2014]. Różnica ta może wynikać z zaobserwowanej przez mnie większej łatwości w podejmowaniu decyzji o poddawaniu się procedurom inwazyjnym, w tym biopsji endomiokardialnej, wśród pacjentów płci męskiej w porównaniu do kobiet. Sytuacja ta swoje odzwierciedlenie ma także w badaniach nad skłonnością do podejmowania ryzyka [Studenski 2004].

Chorzy, u których wykryto wirusa, byli istotnie młodsi od tych pacjentów z niewydolnością serca, u których nie wykryto wirusowego materiału genetycznego w miokardium, co sugeruje istotny wpływ obecności wirusów na rozwój NS. Należy też zwrócić uwagę na stosunkowo młody wiek obydwu grup w porównaniu do populacji pacjentów z przewlekłą niewydolnością serca. W populacji starszej przyczynę NS można zazwyczaj ustalić na podstawie wywiadu oraz badań rutynowo wykonywanych w trakcie diagnostyki kardiologicznej. Ze względu na stale trwającą, ograniczoną dostępność w Polsce do zespołów patologów mających doświadczenie w ocenie materiału pobranego na drodze EMB, procedura ta wykonywana jest głównie u pacjentów mniej zaawansowanych wiekowo, pomimo pewnego odsetka niewydolności serca niewiadomego pochodzenia u osób starszych.

Jeśli chodzi o nasilenie objawów niewydolności układu krążenia, to w badaniu dominowali pacjenci w II stopniu wg skali NYHA przed chorymi w klasie I. Trzecią co do liczności grupą byli pacjenci w klasie III, a grupą najmniej liczną byli chorzy, którym przyznano w klasyfikacji NYHA stopień IV. Nie występowały istotne statystycznie różnice nasilenia objawów pomiędzy pacjentami ze stwierdzonym wirusowym materiałem genetycznym w miokardium i bez. W dużych rejestrach dotyczących pacjentów z niewydolnością serca dane te prezentują się odmiennie. Dominują w nich pacjenci ze znacznym stopniem nasilenia objawów, głównie w klasie NYHA III i IV. Np. w rejestrze ADHERE chorzy sklasyfikowani jako stopień I wg NYHA stanowili 4% badanych, stopień II – 20%, III – 44% i IV – 32% [Fonarow et Corday 2004]. Różnica ta wynika najprawdopodobniej z tego, że realizowane przeze mnie badanie dotyczyło w dużej mierze pacjentów, u których świeżo zdiagnozowano niewydolność mięśnia sercowego i próbowano ustalić jej przyczynę. Chorzy ci, często dotychczas zdrowi, szukają pomocy systemu opieki zdrowotnej przy pierwszych objawach dekomensacji układu krążenia. Grupą, która w najmniejszej części miała już wcześniej postawione rozpoznanie niewydolności serca, jest grupa G4. Miało to miejsce jedynie u 22% chorych, natomiast w grupach G1 i G3 odpowiednio u 87 i 100% pacjentów. Statystyki te mogą świadczyć o tym, że grupa G4 jest zbiorowością reprezentującą pierwszy etap wirusowej choroby serca. Potwierdzeniem tej tezy może być również fakt, że ostry okres zapalenia mięśnia sercowego wiązany jest ze wzmożoną aktywnością procesu replikacji wirusa [Verdonschot et al. 2016], a grupa G4 to pacjenci z wysokim poziomem kopijności B19V. Z drugiej strony jednak istnieją badania, które wykazały wzrost kopijności B19V w próbkach krwi po wielu tygodniach od przebycia infekcji pierwotnej pomimo braku jakichkolwiek objawów chorobowych [Lindblom et al. 2005].

Różnice szerokości lewego przedsionka mierzonej w projekcji przymostkowej w osi długiej wykazały istotność statystyczną w obrębie grup G1-G4. Średni wymiar LA był znamienne mniejszy w grupie G4 w stosunku do grup G1, G2 i G3, co może świadczyć o znacznie krótszym okresie trwania niewydolności lewej komory w grupie G4, co opisywane było przez Triposkiadisa i współpracowników (2016). Istnieją także prace postulujące powiązanie wymiaru lewego przedsionka z ciężkością przebiegu niewydolności serca [Rossi et al. 2018]. Wartość TAPSE była z kolei istotnie wyższa

w grupie G4 w porównaniu do grup G1 oraz G3 i jest to kolejny argument za początkowym stadium niewydolności serca w grupie G4, gdyż wykazano związek nasilenia niewydolności skurczowej prawej komory ze stopniem niewydolności lewokomorowej [Bosch et al. 2017]. Średnie TAPSE nie różniło się natomiast w porównaniu grupy G2 z grupą G4. Częstość występowania oraz stopień nasilenia niedomykalności zastawki mitralnej były znamienne wyższe w grupie G1 niż w grupach G2, G3 oraz G4. Może to wskazywać, iż grupa G1 składa się z pacjentów z najbardziej zaawansowanym stopniem VHD i obarczona jest złym rokowaniem dalszego przebiegu choroby [Asgar et al. 2015, Shah et al. 2019]. Zaburzenia kurczliwości mięśniówki lewej komory były znacznie rzadziej obserwowane w grupach G2 i G4 w porównaniu do grupy G1 ( $p=0,001$  dla obydwu porównań). Podobna obserwacja dotyczy uogólnionych zaburzeń kurczliwości ( $p=0,005$ ) oraz zaburzeń w obrębie przegrody międzykomorowej ( $p=0,025$ ). W grupie G4 rzadziej niż w grupie G1 występowały zaburzenia w obrębie ściany przedniej lewej komory ( $p=0,012$ ). Jeśli chodzi o hipokinezę ściany dolnej i koniuszka LV, również obserwuje się jej mniejsze nasilenie w grupach G2 i G4 w stosunku do grupy G1. Jednak te porównania nie uzyskały progu istotności statystycznej.

Pacjenci, którzy mieli dodatni wynik testu PCR w kierunku genomu dowolnego wirusa w bioptacie mięśnia sercowego, stanowili 53% ogółu chorych spełniających kryteria włączenia do badania. Przypomnijmy, że była to populacja z objawami dekompensacji układu krążenia, której część miała wywiad bólu o charakterze dławicowym w przeszłości. U wszystkich pacjentów wykonano koronarografię, w której nie stwierdzono istotnych przewężeń w tętnicach wieńcowych. W przeszłości opisywano, że u 71% chorych z negatywnym wynikiem koronarografii wykrywano materiał genetyczny wirusów w bioptatach mięśnia sercowego pobranych do 24 godzin od czasu rozpoczęcia dolegliwości bólowych [Kühl et al. 2003]. W badanej przez mnie populacji czas wykonania koronarografii i biopsji mięśnia sercowego u niektórych chorych różnił się nawet o 5 lat. W tym czasie mogło dojść do całkowitego usunięcia wirusów z organizmu, nawet jeśli to one były przyczyną dolegliwości i stąd najprawdopodobniej wynika wspomniana rozbieżność.

Najczęściej wykrywanym w materiale biopsyjnym mięśnia sercowego wirusem był B19V (67,6%). HHV-6 był wykrywany w 9,9% przypadków, enterowirusy w 5,6%, adenowirusy w 2,8%, a w 14,1% przypadków stwierdzono współwystępowanie dwóch rodzajów wirusa w bioptacie. Dane te były zbieżne z dotychczas opisywaną w literaturze wykrywalnością wirusów w EMB [Kühl et al. 2005, Pollack et al. 2015]. Najczęstszą koinfekcją była B19V + HHV-6 (60% koinfekcji). Bock i współpracownicy wykazali w 2014 roku, że koinfekcja B19V z innymi wirusami kardiotropowymi, a zwłaszcza z HHV-6, może nasilać replikację B19V i pogarszać przebieg zapalenia mięśnia sercowego.

Wg danych literaturowych parwowirus B19 bywał też często wykrywany u pacjentów, u których nie zostały stwierdzone cechy zapalenia mięśnia sercowego ani kardiomiopatii rozstrzeniowej [Kuethe et al. 2009, Moimas et al. 2012, Nielsen et al. 2014, Schenk et al. 2009]. Fakt ten może świadczyć o długotrwałym utrzymywaniu się wirusa w sercach niektórych pacjentów po przebyciu infekcji pierwotnej, np. w dzieciństwie. Genom parwowirusa B19V koduje główne niestrukturalne białko NS1, małe 11-kDa białko niestrukturalne oraz białka kapsydowe VP1 i VP2 [Luo et Astell 1993]. Wydajna transkrypcja tych białek zależy od aktywności procesu replikacji genomu B19V [Guan et al. 2008]. Zakażenie B19V ogranicza się do komórek eksponujących antygen receptora grupy krwi P [Brown et al. 1993], który jest niezbędny do wiązania B19V, ale niewystarczający do jego internalizacji [Weigel-Kelley et al. 2001]. W tym celu wymagany jest koreceptor integryny  $\beta 1$  [Weigel-Kelley et al. 2003], a Ku80 jest zaangażowany w wiązanie się B19V z różnymi typami komórek [Munakata et al 2005]. Patologia infekcji parwowirusowej jest często bezpośrednio połączona z cytotoksycznym jej charakterem, natomiast wiele wskazuje na to, że niewydolność serca związana z infekcją parwowirusową nie jest zjawiskiem jednoczynnikowym. Być może oprócz obecności B19V do rozwoju choroby konieczne jest jeszcze wystąpienie innych czynników, jak np. koinfekcja odmiennym wirusem [Tschöpe et al. 2021], choroby toczące się w obrębie innych tkanek czy narządów, przewlekły stres lub też podobne stany skutkujące czasowym bądź trwałym obniżeniem odporności organizmu, które w efekcie prowadzą do rozwoju pełnoobjawowej wirusowej choroby serca.

Jak wykazały nieliczne badania prowadzone na populacji ludzkiej, B19V jest bezpośrednio zaangażowany jako czynnik etiologiczny w ostre zapalenie mięśnia sercowego zarówno w populacji pediatrycznej [Breinholt et al. 2010], jak i u dorosłych [Bültmann, et al. 2003, Kühl et al. 2003, Mahrholdt et al. 2006]. W przebieg ogólnoustrojowej fazy infekcji B19V zaangażowane są głównie komórki śródbłonka naczyniowego [Cooling et al. 1995], który może odpowiadać za szeroką dystrybucję wirusa. Badacze przypuszczają, że B19V prawdopodobnie działa poprzez wywoływanie dysfunkcji śródbłonka, co z kolei wyzwała reakcje zapalne w tkance mięśnia sercowego, prowadzące do rozwoju przewlekłych kardiomiopatii [Bock, et al. 2010]. W takiej sytuacji dysfunkcja śródbłonka może być wywołana przez mechanizmy zależne od wirusa i być konsekwencją replikacji lub ekspresji białek wirusowych, na przykład białka NS1 lub VP1.

W obrębie materiału biopsyjnego pacjentów z B19V zaobserwowano znamienne rozbieżności w zakresie liczności podziałów mitochondrialnych, występowania przewężeń bądź też zamknięcia światła naczyń kapilarnych oraz ubytków w otoczce jądra komórkowego. Analiza post-hoc wykazała, że podziały mitochondrialne były bardziej nasilone w grupie G4 niż w grupie G1, zatem to właśnie w pierwszej fazie infekcji parwowirusowej zapotrzebowanie energetyczne miokardium jest najwyższe. W związku z powyższym mitochondria, które nie są w stanie wyprodukować wystarczającej ilości adenozyntrifosforanu (ATP) dla komórek, podlegają intensywnym podziałom, aby podołać temu zadaniu. Światło naczyń krwionośnych było mocniej przepiężane w grupach G1 i G3 w stosunku do grupy G2. Istotniejsze zwężenia naczyń obserwowano także w grupie G3 w porównaniu z G4. Są to argumenty przemawiające za większą aktywnością procesu chorobowego w grupach chorych G1 i G3. A grupą, w której dochodzi do najszybszego postępu patologii wydaje się być G3. Przerwanie otoczki jądrowej częściej obserwowano w grupie G4 niż w grupie G3, gdyż to właśnie w fazie G4 dochodzi do najintensywniejszej replikacji materiału genetycznego wirusa w jądrze komórkowym. W materiale pobranym od pacjentów z parwowirusem B19 często obserwowano włóknienie przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Występowanie włóknienia przy braku obecności stanu zapalnego wg danych literaturowych związane jest ze złym rokowaniem [Assomull et al. 2006]. Można z tego wnioskować, że niewydolności serca

o podłożu wirusowym związane są z gorszą prognozą odnośnie przeżycia niż np. NS o etiologii niedokrwiennej czy nadciśnieniowej.

W grupie chorych z niską kopijnością B19V należy na podstawie obserwacji ultrastruktury mięśnia sercowego w mikroskopii elektronowej wyróżnić grupę <500 kopii B19V, która cechuje się znacznym uszkodzeniem struktur jednostki mięśniowo-naczyniowej. Wiele wskazuje, że jest to grupa pacjentów, u których doszło do znacznego pobudzenia układu immunologicznego. Na skutek reakcji autoimmunologicznej nastąpiła destrukcja tkanki mięśnia sercowego, a tempo eliminacji wirusów z organizmu przewyższa szybkość procesu replikacji. Znaczny stopień uszkodzenia dotyczył zwłaszcza mitochondriów komórek mięśniowych, jednakże obserwowano również mitochondria wykazujące cechy podziału oraz konglomeraty niemal prawidłowych mitochondriów. Obraz nasilonej patologii dotyczył także jąder komórkowych i naczyń krwionośnych, które najczęściej miały całkowicie zamknięte światło. Grupa tych chorych w większości cechuje się niską frakcją wyrzutową lewej komory i niepomyślnym rokowaniem.

Wyniki badań mikroskopowo-elektronowych przedstawione w rozprawie wyraźnie wskazują na udział wszystkich organelli kardiomiocytów, a także otaczającej je tkanki łącznej i naczyń włosowatych (a zatem całej jednostki mięśniowo-naczyniowej) w procesie przebudowy mięśnia po infekcji wirusowej. W przewlekłej chorobie związanej z infekcją B19V wykazano, że komórki śródbłonna są celami specyficznymi dla B19V, natomiast kardiomiocyty, pozbawione receptorów dla B19V, są wykluczone z infekcji [Pankuweit et Klingel 2013, Towbin et al. 2010]. Zatem zmiany zachodzące w komórkach mięśniowych są zmianami wtórnymi i wynikają z ich niedokrwienia. Blokada replikacji w komórkach śródbłonna hamuje propagację B19V i umożliwia długotrwałe przetrwanie nawet po ustąpieniu objawów zakażenia [Pozzuto et al. 2011]. Dotychczasowe badania wskazują, że uszkodzenie komórek śródbłonna różnych narządów podczas przewlekłego zakażenia parwowirusem B19V może bezpośrednio indukować apoptozę, nekrozę i śmierć komórek przez reorganizację cytoszkieletu komórek mięśnia sercowego [Bültmann et al. 2004, Duechting et al. 2008, Nüesch et Rommelaere 2007, Poole et al. 2004, Rayet et al. 1998]. Tymczasem obserwacje przeprowadzone na

potrzeby niniejszej pracy nie potwierdzają wyników badań prowadzonych na liniach komórkowych. Ocena ultrastrukturalna wykazała bowiem jedynie morfologiczne cechy nekrozy.

Patologiczne zmiany ultrastruktury CVU są bardziej nasilone u chorych z wyższym stopniem niewydolności serca według skali NYHA i wyższym poziomem NT-proBNP. Potwierdza to po raz kolejny przydatność tego biomarkera w diagnostyce i klasyfikowaniu stopnia niewydolności serca [Karabulut et al. 2005]. W literaturze można znaleźć także próby powiązania stężenia NT-proBNP m. in. z funkcją mitochondriów. Marker ten wykorzystywany jest m. in. do oceny wpływu konkretnych substancji na ich sprawność [Xu et al. 2020]. Podobnie elementy CVU wykazują większy stopień uszkodzenia w przypadku chorych z wysokim poziomem troponiny I, która jest z kolei markerem uszkodzenia kardiomiocytów. W toku przeprowadzonych badań stwierdzono natomiast, że końcoworozkurczowy wymiar lewej komory oraz jej frakcja wyrzutowa były parametrami, których zmienność okazała się niezwiązana bezpośrednio z patologiami w obrębie elementów CVU. Fakt, że zmiany ultrastrukturalne są bardziej nasilone u chorych z większym zaawansowaniem niewydolności serca, natomiast nie są skorelowane z frakcją wyrzutową lewej komory, świadczy o dużej roli komponenty rozkurczowej niewydolności serca w wirusowym uszkodzeniu miokardium. Duże rozpowszechnienie B19V opisywane było u chorych z izolowaną dysfunkcją rozkurczową lewej komory m. in. przez Tschöpe i wsp. w 2005 roku. Także w przypadku infekcji HIV często stwierdzana jest rozkurczowa dysfunkcja mięśnia sercowego [Butler et al. 2018].

Serce zawsze reaguje na zmiany w bodźcach środowiskowych za pomocą szeregu odpowiedzi, które obejmują zmiany objętości komory i częstości akcji serca. Kolejnym kluczowym składnikiem odpowiedzi serca na stres jest niekiedy znaczna zmiana, w górę lub w dół, w masie mięśniowej [Hill et Olson 2008]. Zmiany te mogą nastąpić w wyjątkowo krótkich okresach czasu. Wiele sygnałów środowiskowych ma charakter fizjologiczny, np. ćwiczenia fizyczne lub ciąża. W przypadkach tych pomimo zmiany masy mięśnia sercowego zachowana jest jego struktura i funkcja [Dorn et al. 2003]. Istnieją jednak czynniki patologiczne, wpływające na mięsień sercowy destrukcyjnie.



Należą do nich m.in. infekcje wirusowe, które wywołują zaburzenia metaboliczne, strukturalne i funkcjonalne. W obrazie ultrastrukturalnym kardiomiocytów uwagę zwraca rozpad aparatu kurczliwego, jednakże wyniki badań nie wykazały całkowitej destrukcji kardiomiocytów, a jedynie zanik znacznej części aparatu kurczliwego, zazwyczaj przy zachowaniu ciągłości błony komórkowej. Dojrzałe kardiomiocyty charakteryzują się złożoną strukturą, która pozwala na skuteczny i zsynchronizowany skurcz całej komórki. Utrzymanie tej struktury zapewnia cytoszkielet, który utrzymuje sarkomery, mechanicznie sprzęga miofibryle sąsiednich miocytów i przenosi mechaniczne sygnały stresowe.

Mitochondria są integralną częścią tej cytoarchitektury. Zajmują one aż około 30% całkowitej objętości kardiomiocytów, gdyż prawidłowe funkcjonowanie mięśnia sercowego ściśle zależy od szlaku generującego ATP [Huss et Huss 2005], a liczba mitochondriów w kardiomiocytach jest regulowana dynamicznie w odpowiedzi na zapotrzebowanie energetyczne [Lehman et al. 2000]. Mitochondria nie są izolowanymi organellami, lecz tworzą złożone dynamiczne sieci, które są pod ścisłą kontrolą dwóch odrębnych procesów. Pierwszy to fuzja mitochondrialna, w wyniku której powstają długie nitkowate mitochondria, a drugi to rozszczepienie, które generuje powstawanie małych, sferycznych mitochondriów. Intensywność tych procesów zależy od potrzeb metabolicznych komórki [Li et al. 2012, Miettinen et al. 2017]. Fuzja i rozszczepienie mitochondriów to procesy przeciwstawne, które kontrolują liczbę mitochondriów, ich morfologię oraz, do pewnego stopnia, jakość mitochondriów. Właściwa ich funkcja wiąże się z równowagą pomiędzy tymi procesami, a ich upośledzenie jest związane z szerokim zakresem chorób sercowo-naczyniowych [Goh et al. 2016, Twig et al. 2008]. Dodatkowo innym źródłem kontroli jakości mitochondriów jest selektywna degradacja dysfunkcyjnych organelli poprzez autofagię, która jest określana jako mitofagia [Lemasters 2014]. Utrzymanie morfologicznej integralności mitochondriów jest niezwykle ważne dla struktury serca i jego funkcjonowania. Obecnie rola mitochondriów w patofizjologii miażdżycy, urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego, nadciśnienia tętniczego, cukrzycy, przerostu serca i niewydolności stanowi ciągle aktualny przedmiot zainteresowania badaczy [Siasos et al. 2018]. Unikalnym odkryciem w mięśniu sercowym jest ciągła komunikacja pomiędzy sąsiednimi mitochondriami. Zauważono,

że istnieją między nimi tzw. „kissing junctions”, które umożliwiają wymianę białek i jonów [Huang et al. 2013]. Ponadto między sąsiednimi mitochondriami występują nanotunele, które kontrolują odpowiedź mitochondrialną, szczególnie dotyczącą zmian dynamiki przepływu jonów wapnia [Lavorato et al. 2017]. Dysfunkcja mitochondriów wpływa na komórki śródbłonna, ponieważ starzejące się struktury mają obniżoną ekspresję enzymów antyoksydacyjnych, takich jak SOD-2 i reduktaza tioredoksynowa.

Wirusy są częstą przyczyną występowania zaburzeń w funkcjonowaniu mitochondriów. Dobrym przykładem jest infekcja wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV). Białka tego wirusa dostają się do mitochondriów, powodując wzrost wychwytu  $Ca^{2+}$ , produkcję reaktywnych form tlenu i zwiększenie przepuszczalności błon mitochondrialnych. Podobną rolę w patogenezie HIV odgrywa białko wirusowe R, zintegrowane z mitochondrialną błoną zewnętrzną. Zmniejsza ono ekspresję mitofusiny 2, co prowadzi do fragmentacji mitochondriów i depolaryzacji błony mitochondrialnej, indukującej śmierć zakażonych limfocytów T. Sugeruje się, że zapalenie mięśnia sercowego związane z HIV, HCV lub grypą wynika z odpowiedzi układu odpornościowego na te patogeny. Opisywano predyspozycje genetyczne do rozwoju DCM w wyniku utrzymywania się HCV u pacjentów z HLA-DPB1\*0901 i HLA-DRB1\*1201 [Sanchez et Bergasa 2008]. Kolejnym przykładem jest wirus syncytialny układu oddechowego (RSV), który może powodować ciężkie infekcje, ponieważ wirusowe białko niestrukturalne NS1 zakłóca funkcjonowanie przeciwwirusowego mitochondrialnego białka sygnałowego, hamującego wytwarzanie interferonu. Odpowiedź immunologiczna jest zatem opóźniona na wczesnym etapie infekcji RSV, co daje więcej czasu na replikację wirusa. Bardzo ciekawą grupę stanowią wirusy kardiotropowe, np. herpeswirus HHV-6. Rodzina herpeswirusów znacząco zmienia funkcjonowanie mitochondriów w zainfekowanych komórkach T poprzez modyfikację ekspresji genów i przebiegu fosforylacji oksydacyjnej. W szczególności dochodzi do modulacji replikacji i transkrypcji mitochondrialnego DNA. Jednocześnie podczas infekcji dramatycznie zmniejsza się potencjał błony mitochondrialnej. Przypuszcza się, że błędy w funkcjonowaniu mitochondriów prowadzą do zaburzeń równowagi metabolicznej i sygnalizacyjnej, które wpływają na homeostazę komórkową. Najczęściej występującym u ludzi wirusem kardiotropowym jest parwowirus B19. W infekcjach

B19V znaczącą rolę odgrywa, jak w przypadku RSV, wirusowe niestrukturalne białko NS1. Po infekcji parwowirusem, równolegle z ekspresją białka NS1, widoczne było uszkodzenie struktury mitochondriów i przejściowa depolaryzacja ich błon. Wykazano również, że NS1 wchodziło w interakcje z różnymi białkami komórkowymi, w tym z regulatorami transkrypcji i elementami mechanizmu replikacji, wywołując efekty cytopatyczne. Poziom fosforylacji białka jest ściśle związany z regulacją różnych funkcji NS1 [Birdwell et West 2018].

W ostatnich latach liczne badania wykazały, że kluczową rolę w interakcji pomiędzy komórkami gospodarza i wirusami odgrywa autofagia [Cheng et al. 2017, Rautou et al. 2011]. Jest ona dynamicznym, wszechobecnym procesem katabolicznym, mającym na celu utrzymanie homeostazy komórkowej i wytwarzanie energii, w którym komórki usuwają agregaty białka i uszkodzone organelle w celu recyklingu. Autofagia odgrywa kluczową rolę w degradacji i usuwaniu licznych patogenów wirusowych [Deretic et Levine 2009, Sumpter et Levine 2010]. Jednak w zależności od środowiska wewnątrzkomórkowego wirusów i typów komórek gospodarza, funkcjonalne role autofagii w różnych infekcjach wirusowych różnią się [Deretic 2016]. W odpowiedzi na różne infekcje wirusowe, autofagia może regulować przebieg reakcji immunologicznych i adaptacyjnych poprzez regulację różnicowania komórek immunologicznie kompetentnych, ich przeżycie, fagocytozę, sposób prezentacji antygeny, proces degranulacji lub też produkcji cytokin, co odgrywa ważną rolę w tłumieniu lub promowaniu infekcji wirusowej [Deretic et Saitoh 2013, Ma et al. 2013, Puleston et Simon 2014]. Podczas autofagii, w celu sekwestracji części cytoplazmy, w cytozolu tworzą się półksiężycy zwane fagoforami. Brzegi fagoforów rozciągają się i ostatecznie łączą, tworząc zamknięte pęcherzyki z podwójną błoną, znane jako autofagosomy. Następnie łączą się one z endosomami, tworząc amfiosomy, oraz z lizosomami, tworząc autolizosomy. Zawartość autofagosomów zostaje ostatecznie zdegradowana przez enzymy lizosomalne [Levine et Kroemer 2008]. Wirusowe kwasy nukleinowe są rozpoznawane przez receptory rozpoznawania wzorców (PRR) [Akira et al. 2006]. Cytozolowy kwas nukleinowy jest wykrywany przez receptory podobne do RIG-I (RLR), natomiast w przedziałach endosomalnych wirusowy kwas nukleinowy jest rozpoznawany przez receptory Toll-podobne (TLR) [Medzhitov 2007]. Oba systemy

detekcji aktywują czynniki transkrypcyjne IRF3/IRF7 i NF- $\kappa$ B, powodując odpowiednio wytwarzanie IFN typu I i cytokin prozapalnych. Wśród wielu czynników przeciwdrobnoustrojowych gospodarza interferony typu I indukują silne mechanizmy obronne przed wirusami i są kluczowe w walce z patogenem. Organizm ludzki wykorzystuje ten wrodzony układ cytokin do tworzenia wielu warstw obrony immunologicznej [García-Sastre et Biron 2006], podczas gdy wirusy rozwinęły specjalne systemy unikania natychmiastowego działania przeciwwirusowego IFN [Orvedahl et Levine 2009]. Strategie te można ogólnie podzielić na trzy niewykluczające się wzajemnie podejścia: bezpośrednie hamowanie białek gospodarza indukujących autofagię, zakłócanie szlaku degradacji oraz zatrzymanie autofagii gospodarza w celu wsparcia replikacji wirusa. Niektóre wirusy tłumią ścieżkę autofagii, podczas gdy inne ją wzmacniają. Bez trudu można znaleźć wirusy, które wykorzystują autofagię w celu osiągnięcia maksymalnej replikacji. Są to np. wirusy Coxsackie, wirus pryszczycy i wirus polio [Suhy et al. 2000, Wong et al. 2008]. Badania na komórkach zakażonych ludzkim parwowirusem B19 wykazały, że ludzki parwowirus B19 może nasilać autofagię [Nakashima et al. 2006]. Podczas stresu, wywołanego np. niedożywieniem, autofagia może też być indukowana jako sposób na wytworzenie ograniczonej ilości składników odżywczych, niezbędnych do przeżycia komórki.

## 8.1. Ograniczenia pracy

Podstawowym ograniczeniem pracy wydaje się być odmienny czas trwania choroby u poszczególnych pacjentów w trakcie wykonywania diagnostyki inwazyjnej. Biopsja mięśnia sercowego wykonywana była w Klinice Kardiologii Inwazyjnej CSK MSWiA w Warszawie, a więc w ośrodku o najwyższym stopniu referencyjności, do którego trafiają pacjenci ze znacznej części kraju. Zatem czas od wystąpienia objawów do momentu pobrania EMB wahał się od kilku dni u pacjentów, którzy zostali skierowani do Kliniki bezpośrednio z poradni kardiologicznej, do nawet wielu miesięcy czy w skrajnych przypadkach lat, zanim chorzy, przechodząc przez kolejne stopnie referencyjności, dotarli do CSK MSWiA.

Kolejnym ograniczeniem jest mała liczebność analizowanych grup, pomimo że badanie zostało wykonane na jednej z największych na świecie baz biopłatów mięśnia sercowego. Liczebność ta mogła wpłynąć na uzyskane wyniki i brak istotności statystycznych niektórych parametrów, które wydają się być istotne z punktu widzenia obserwacji mikroskopowej. Niestety metoda biopsji endomiokardialnej nadal nie jest wykonywana tak często, jak zalecają wytyczne, a wynika to w głównej mierze z ograniczonej liczby ośrodków wykonujących to badanie. Rozwiązaniem tej kwestii mogłoby być połączenie sił przez kliniki wykonujące EMB i wykonanie badania wielośrodkowego.

Kwestią, która także mogła wpłynąć na uzyskane wyniki dotyczące w głównej mierze wywiadu zebranego od chorych, wyników badań laboratoryjnych i obrazowych, jest fakt, że rekrutacja pacjentów do badania trwała aż 7 lat (2010-2017).

## 9. Wnioski

- 1) Na poziomie mikroskopii świetlnej nie stwierdzono istotnych różnic w badanych grupach, natomiast bardzo ważnym jej uzupełnieniem okazało się badanie przy użyciu mikroskopii elektronowej.
- 2) Obraz zmian ultrastrukturalnych poszczególnych elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej u pacjentów z wirusową chorobą serca spowodowaną przez parwowirusa B19 różnił się w porównaniu do chorych z rozstrzenią lewej komory, u których nie stwierdzono obecności wirusowego materiału genetycznego. Patologie obserwowane były w aparacie kurczliwym, mitochondriach i jądrach komórkowych kardiomiocytów. Zmiany ultrastrukturalne dotyczyły również przestrzeni zewnątrzkomórkowej i naczyń włosowatych.
- 3) Patologiczne zmiany w morfologii elementów jednostki mięśniowo-naczyniowej były związane z liczbą kopii parwowirusa B19 w EMB, z nasileniem objawów niewydolności serca wg skali NYHA, a także z poziomem NT-proBNP i troponiny I w surowicy krwi obwodowej, jednakże niemożliwe było stworzenie systematyki obserwowanych zmian.
- 4) Grupa chorych z kopijnością B19V <500 reprezentowała „zejściowy” obraz infekcji parwowirusem B19, ze znacznym stopniem destrukcji mięśnia sercowego i niepomyślnym rokowaniem. Znaczny stopień uszkodzenia kardiomiocytów był wtórny do patologii w obrębie naczyń kapilarnych, będących przyczyną niedokrwienia.

## 10. Bibliografia

1. Adamson-Small LA, Ignatovich IV, Laemmerhirt MG, Hobbs JA. Persistent parvovirus B19 infection in nonerythroid tissues: possible role in the inflammatory and disease process. *Virus Res.* 2014; 190:8-16.
2. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006; 124(4):783-801.
3. Anderson RH, Smerup M, Sanchez-Quintana D, Loukas M, Lunkenheimer PP. The three-dimensional arrangement of the myocytes in the ventricular walls. *Clin Anat.* 2009; 22(1):64-76.
4. Andréoletti L, Lévêque N, Boulagnon C, Brasselet C, Fornes P. Viral causes of human myocarditis. *Arch Cardiovasc Dis* 2009;102:559–68.
5. Asgar AW, Mack MJ, Stone GW. Secondary mitral regurgitation in heart failure: pathophysiology, prognosis, and therapeutic considerations. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 65(12):1231-1248.
6. Assomull RG, Prasad SK, Lyne J, Smith G, Burman ED, Khan M, Sheppard MN, Poole-Wilson PA, Pennell DJ. Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48:1977–85.
7. Ambrosy AP, Fonarow GC, Butler J, Chioncel O, Greene SJ, Vaduganathan M, Nodari S, Lam CSP, Sato N, Shah AN, Gheorghiade M. The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from hospitalized heart failure registries. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 63(12):1123-1133.
8. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, et al. Myocarditis: a histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987; 1:3-14.
9. Ausoni S, Sartore S. The cardiovascular unit as a dynamic player in disease and regeneration. *Trends Mol Med.* 2009; 15(12):543-52.
10. Banerjee I, Yekkala K, Borg TK, Baudino TA. Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1080:76-84.
11. Barker WH, Mullooly JP, Getchell W. Changing incidence and survival for heart failure in a well-defined older population, 1970–1974 and 1990–1994. *Circulation.* 2006; 113(6):799-805.

12. Bartman T, Hove J. Mechanics and function in heart morphogenesis. *Dev Dyn*. 2005; 233(2):373-81.
13. Baruteau AE, Boimond N, Ramful D. Myocarditis associated with 2009 influenza A (H1N1) virus in children. *Cardiol Young*. 2010; 20:351–2.
14. Basso C, Calabrese F, Angelini A, Carturan E, Thiene G. Classification and histological, immunohistochemical, and molecular diagnosis of inflammatory myocardial disease. *Heart Fail Rev*. 2013; 18(6):673-81.
15. Basso C, Calabrese F, Corrado D, Thiene G. Postmortem diagnosis in sudden cardiac death victims: macroscopic, microscopic and molecular findings. *Cardiovasc Res*. 2001; 50(2):290-300.
16. Bearzi C, Leri A, Lo Monaco F, et al. Identification of a coronary vascular progenitor cell in the human heart. *Proc Natl Acad Sci*. 2009; 106:15885–90.
17. Beręsewicz A, Duda M, Klemenska E, Mackiewicz U, Mączewski M. Patofizjologia niewydolności serca. CMKP. 2010.
18. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisén J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009; 324(5923):98-102.
19. Birdwell CE, West P. Exploring a role for Human Herpesvirus 6B-mediated mitochondrial dysfunction in dysregulating antiviral innate immunity. *J Immunol*. 2018; 200(1):50.12.
20. Blauwet LA, Cooper LT. Myocarditis. *Prog. Cardiovasc. Dis*. 2010; 52(4):274-88.
21. Bock CT, Düchting A, Utta F, Brunner E, Sy BT, Klingel K, Lang F, Gawaz M, Felix SB, Kandolf R. Molecular Phenotypes of Human Parvovirus B19 in Patients With Myocarditis. *World J Cardiol*. 2014; 6(4):183-95.
22. Bock CT, Klingel K, Kandolf R. Human parvovirus B19-associated myocarditis. *N Engl J Med*. 2010; 362:1248-1249.
23. Bogomolovas J, Šimoliūnas E, Rinkūnaitė I, Smalinskaitė L, Podkopajev A, Bironaitė D, Weis CA, Marx A, Bukelskienė V, Gretz N, Grabauskienė V, Labeit D, Labeit S. A Novel Murine Model of Parvovirus Associated Dilated Cardiomyopathy Induced by Immunization with VP1-Unique Region of Parvovirus B19. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:1627184.



24. Bosch L, Lam CSP, Gong L, Chan SP, Sim D, Yeo D, Jaufeerally F, Leong KTG, Ong HY, Ng TP, Richards AM, Arslan F, Ling LH. Right ventricular dysfunction in left-sided heart failure with preserved versus reduced ejection fraction. *Eur J Heart Fail.* 2017; 19(12):1664-1671.
25. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, Pauschinger M, Schultheiss HP, McCarty R, Hare J, Bricker JT, Bowles KR, Towbin JA. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. Evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42:466–72.
26. Bracamonte-Baran W, Ciháková D. Cardiac autoimmunity: Myocarditis. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1003: 187–221.
27. Breinholt JP, Moulik M, Dreyer WJ, Denfiels SW, Kim JJ, Jefferies JL, Rossano JW, Gates CM, Clunie SK, Bowles KR, Kearney DL, Bowles NE, Towbin AJ. Viral epidemiologic shift in inflammatory heart disease: the increasing involvement of parvovirus B19 in the myocardium of pediatric cardiac transplant patients. *J Heart Lung Transplant.* 2010; 29:739-46.
28. Briongos-Figuero S, Estévez A, Pérez ML, Martínez-Ferrer JB, García E, Viñolas X, Arenal Á, Alzueta J, Muñoz-Aguilera R. Prognostic role of NYHA class in heart failure patients undergoing primary prevention ICD therapy. *ESC Heart Fail.* 2020; 7(1):279-283.
29. Brown KE, Anderson S, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science.* 1993; 262:114–7.
30. Brutsaert DL. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev.* 2003; 83(1):59-115.
31. Butler J, Kalogeropoulos AP, Anstrom KJ, Hsue PY, Kim RJ, Scherzer R, Shah SJ, Shah SH, Velazquez EJ, Hernandez AF, Desvigne-Nickens P, Braunwald E. Diastolic Dysfunction in Individuals With Human Immunodeficiency Virus Infection: Literature Review, Rationale and Design of the Characterizing Heart Function on Antiretroviral Therapy (CHART) Study. *J Card Fail.* 2018; 24(4):255-265.
32. Bültmann BD, Klingel K, Nabauer M, Wallwiener D, Kandolf R. High prevalence of viral genomes and inflammation in peripartum cardiomyopathy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005; 193:363-365.

33. Bültmann BD, Klingel K, Sotlar K, Bock CT, Baba HA, Sauter M, Kandolf R. Fatal parvovirus B19-associated myocarditis clinically mimicking ischemic heart disease: an endothelial cell-mediated disease. *Hum Pathol.* 2003; 34(1):92-5.
34. Bültmann BD, Sotlar K, Klingel K. Parvovirus B19. *N Engl J Med.* 2004; 350(19):2006-7.
35. Caforio AL, Calabrese F, Angelini A, et al. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *Eur Heart J* 2007; 28:1326-33.
36. Caforio AL, Malipiero G, Marcolongo R, Iliceto S. Myocarditis: A Clinical Overview. *Curr Cardiol Rep.* 2017; 19(7):63.
37. Caforio AL, Marcolongo R, Basso C, Iliceto S. Clinical presentation and diagnosis of myocarditis. *Heart.* 2015; 101(16):1332-44.
38. Caforio AL, Pankuweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, Fu M, Heliö T, Heymans S, Jahns R, Klingel K, Linhart A, Maisch B, McKenna W, Mogensen J, Pinto YM, Ristic A, Schultheiss HP, Seggewiss H, Tavazzi L, Thiene G, Yilmaz A, Charron P, Elliott PM. 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.
39. Cheng LS, Li J, Liu Y, Wang FP, Wang SQ, She WM, Wu SD, Qi XL, Zhou YP, Jiang W. HMGB1-induced autophagy: a new pathway to maintain Treg function during chronic hepatitis B virus infection. *Clin Sci (Lond).* 2017; 131(5):381-394.
40. Chimenti C, Kajstura J, Torella D, Urbanek K, Heliński H, Colussi C, Di Meglio F, Nadal-Ginard B, Frustaci A, Leri A, Maseri A, Anversa P. Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure. *Circ Res.* 2003; 93(7):604-13.
41. Chimenti C, Russo A, Pieroni M, Calabrese F, Verardo R, Thiene G, Russo MA, Maseri A, Frustaci A. Intramyocyte detection of Epstein-Barr virus genome by laser capture microdissection in patients with inflammatory cardiomyopathy. *Circulation.* 2004; 110:3534-9.

42. Cooling LL, Koerner TA, Naides SJ. Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of parvovirus B19. *J Infect Dis.* 1995; 172(5):1198-205.
43. Cooper LT Jr. Myocarditis. *N Engl J Med.* 2009; 360(15):1526-38.
44. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Köhl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R. The Role of Endomyocardial Biopsy in the Management of Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50(19):1914-31.
45. Czech M, Opolski G, Zdrojewski T, et al. The costs of heart failure in Poland from the public payer's perspective. Polish programme assessing diagnostic procedures, treatment and costs in patients with heart failure in randomly selected outpatient clinics and hospitals at different levels of care: POLKARD. *Kardiologia polska* 2013; 71(3):224-32.
46. Dennert R, Crijns HJ, Heymans S. Acute Viral Myocarditis. *Eur Heart J.* 2008; 29(17):2073-82.
47. Deretic V. Autophagy in leukocytes and other cells: Mechanisms, subsystem organization, selectivity, and links to innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2016; 100:969–978.
48. Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe.* 2009; 5(6):527-49.
49. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(10):722-37.
50. Dominguez F, Köhl U, Pieske B, Garcia-Pavia P, Tschöpe C. Update on Myocarditis and Inflammatory Cardiomyopathy: Reemergence of Endomyocardial Biopsy. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2016; 69(2):178-87.
51. Dorn GW, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res.* 2003; 92:1171–1175.
52. Duechting A, Tschöpe C, Kaiser H, Lamkemeyer T, Tanaka N, Aberle S, Lang F, Torresi J, Kandolf R, Bock CT. Human parvovirus B19 NS1 protein modulates

inflammatory signaling by activation of STAT3/PIAS3 in human endothelial cells. *J Virol* 2008; 82:7942-7952.

53. Emdin M, Vittorini S, Passino C, Clerico A. Old and New Biomarkers of Heart Failure. *Eur J Heart Fail*. 2009; 11(4):331-5.

54. Escher F, Tschöepe C, Lassner D, Schultheiss HP. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: from diagnosis to treatment. *Turk Kardiyol Dern Ars*. 2015; 43(8):739-48.

55. Everaert B, Muylle J, Twicker TB. Emerging cardiological issues during the COVID-19 pandemic. *Eur J Clin Invest*. 2020 May 16; e13270.

56. Felker GM, Boehmer JP, Hruban RH, Hutchins GM, Kasper EK, Baughman KL, Hare JM. Echocardiographic Findings in Fulminant and Acute Myocarditis. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36(1):227-32.

57. Fonarow GC, Corday E. Overview of acutely decompensated congestive heart failure (ADHF): a report from the ADHERE registry. *Heart Fail Rev*. 2004; 9:179–85.

58. Fox SE, Li G, Akmatbekov A, Harbert JL, Lameira FS, Brown JQ, Vander Heide RS. Unexpected Features of Cardiac Pathology in COVID-19 Infection. *Circulation*. 2020 Sep 15;142(11):1123-1125.

59. Frey N, Meder B, Katus HA. Left Ventricular Biopsy in the Diagnosis of Myocardial Diseases. *Circulation*. 2018; 137(10):993-995.

60. García-Sastre A, Biron CA. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente. *Science*. 2006; 312(5775):879-82.

61. Gil KE, Pawlak A, Gil RJ, Frontczak-Baniewicz M, Bil J. The role of invasive diagnostics and its impact on the treatment of dilated cardiomyopathy: A systematic review. *Adv Med Sci*. 2016; 61(2):331-343.

62. Goh KY, Qu J, Hong H, Liu T, Dell'Italia LJ, Wu Y, O'Rourke B, Zhou L. Impaired mitochondrial network excitability in failing guinea-pig cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2016; 109(1):79-89.

63. Gore I, Saphir O. Myocarditis Associated With Acute Nasopharyngitis and Acute Tonsillitis. *Am Heart J*. 1947; 34(6):831-51.

64. Guan W, Cheng F, Yoto Y, Kleiboeker S, Wong S, Zhi N, Pintel DJ, Qiu J. Block to the production of full-length B19 virus transcripts by internal polyadenylation is overcome by replication of the viral genome. *J Virol.* 2008; 82(20):9951-63.
65. Gupta A, Gupta S, Young D, Das B, McMahon J, Sen S. Impairment of ultrastructure and cytoskeleton during progression of cardiac hypertrophy to heart failure. *Lab Invest.* 2010; 90:520–530.
66. Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity. *N Engl J Med.* 2008; 358:1370–1380.
67. Hirschy A, Schatzmann F, Ehler E, Perriard JC. Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart. *Dev Biol.* 2006; 289(2):430-41.
68. Holzmann M, Nicko A, Kühl U, Noutsias M, Poller W, Hoffmann, Morguet A, Witzendichler B, Tschöpe C, Schultheiss HP, Paushinger M. Complication rate of right ventricular endomyocardial biopsy via the femoral approach – a retrospective and prospective study analyzing 3048 diagnostic procedures over an 11-year period. *Circulation.* 2008; 118:1722-1728.
69. Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: The Framingham Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1993; 22: 6A–13A.
70. Huang X, Sun L, Ji S, Zhao T, Zhang W, Xu J, Zhang J, Wang Y, Wang X, Franzini-Armstrong C, Zheng M, Cheng H. Kissing and nanotunneling mediate intermitochondrial communication in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(8):2846-51.
71. Huss J, Huss M. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest.* 2005; 115(3):547-55.
72. Ieda M, Tsuchihashi T, Ivey KN, Ross RS, Hong TT, Shaw RM, Srivastava D. Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Dev Cell.* 2009; 16(2):233-44.
73. Imanaka-Yoshida K. Inflammation in myocardial disease: From myocarditis to dilated cardiomyopathy. *Pathol Int.* 2020; 70(1):1-11.
74. Juhl D, Gorg S, Hennig H. Persistence of Parvovirus B19 (B19V) DNA and humoral immune response in B19V-infected blood donors. *Vox Sang.* 2014; 107(3):226-32.
75. Kałużna-Oleksy M, Bartolik K, Bukowski H, Czech M, Dudek M, Kucia-Kuźma S, Łyszczarz B, Migaj J, Nessler J, Pietruszka-Zasadny A, Uchmanowicz I, Wołczyński A. Niewydolność serca w Polsce. Realia, koszty, sugestie poprawy sytuacji. Raport 2020.

76. Karabulut A, Kaplan A, Aslan C, Iltumur K, Toprak G, Toprak N. The association between NT-proBNP levels, functional capacity and stage in patients with heart failure. *Acta Cardiol.* 2005; 60(6):631-8.
77. Karasek D, Kubica A, Sinkiewicz W, Błażejowski J, Bujak R. Epidemia niewydolności serca – problem zdrowotny i społeczny starzejących się społeczeństw Polski i Europy. *Folia Cardiologica Excerpta.* 2008; tom 3, nr 5, 242–248.
78. Katzmann JL, Schlattmann P, Rigopoulos AG, Noutsias E, Bigalke B, Pauschinger M, Tschöpe C, Sedding D, Schulze PC, Noutsias M. Meta-analysis on the immunohistological detection of inflammatory cardiomyopathy in endomyocardial biopsies. *Heart Fail Rev.* 2020; 25(2):277-294.
79. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 1999; 99:1091-100.
80. Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U, Cooper LT, Böhm M. Update on myocarditis. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 59(9):779-92.
81. Kueth F, Lindner J, Matschke K, Wenzel JJ, Norja P, Ploetze K, Schaal S, Kamvissi V, Bornstein SR, Schwanebeck U, Modrow S. Prevalence of parvovirus B19 and human bocavirus DNA in the heart of patients with no evidence of dilated cardiomyopathy or myocarditis. *Clin Infect Dis.* 2009; 49:1660–1666.
82. Kuffner M, Pawlak A, Przybylski M. Viral Infection of the Heart: Pathogenesis and Diagnosis. *Pol J Microbiol.* 2017; 65(4):391-398.
83. Kühl U, Lassner D, von Schlippenbach J, Poller W, Schultheiss HP. Interferon-Beta improves survival in enterovirus-associated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 60(14):1295-6.
84. Kühl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck CPL, Seeberg B, Krautwurm L, Poller W, Schultheiss HP, Kandolf R. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation.* 2003; 108:945-50.
85. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with ‘idiopathic’ left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005;111:887-893.

86. Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2003; 107(22):2793-8.
87. Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 112, 2005; 1965–1970.
88. Kühl U, Rohde M, Lassner D, Gross UM, Escher F, Schultheiss HP. miRNA as activity markers in Parvo B19 associated heart disease. *Herz*. 2012; 37(6):637-43.
89. Kühl U, Schultheiss HP. Myocarditis: early biopsy allows for tailored regenerative treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2012; 109(20):361-8.
- 90.
91. Kühl U, Schultheiss HP. Viral myocarditis: diagnosis, aetiology and management. *Drugs*. 2009; 69(10):1287-302.
92. Lai KB, Sanderson JE, Izzat MB, Yu CM. Micro-RNA and mRNA myocardial tissue expression in biopsy specimen from patients with heart failure. *Int J Cardiol*. 2015; 199:79-83.
93. Lakdawala NK, Winterfield JR, Funke BH. Dilated cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013; 6(1):228-37.
94. Lavorato M, Iyer VR, Dewight W, et al. Increased mitochondrial nanotunneling activity, induced by calcium imbalance, affects intermitochondrial matrix exchanges. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114:E849-58.
95. Lemasters JJ. Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). *Redox Biol*. 2014; 2:749-54.
96. Leone O, Veinot JP, Angelini A, Baandrup UT, Basso C, Berry G, Bruneval P, Burke M, Butany J, Calabrese F, d'Amati G, Edwards WD, Fallon JT, Fishbein MC, Gallagher PJ, Halushka MK, McManus B, Pucci A, Rodriguez ER, Saffitz JE, Sheppard MN, Steenbergen C, Stone JR, Tan C, Thiene G, van der Wal AC, Winters GL. 2011 consensus statement on endomyocardial biopsy from the Association for European Cardiovascular Pathology and the Society for Cardiovascular Pathology. *Cardiovasc Pathol*. 2012; 21(4):245-74.

97. Lehman J, Barger P M, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest.* 2000; 106(7):847-56.
98. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008; 132(1):27-42.
99. Li Q, Zhou LY, Gao GF, Jiao JQ, Li PF. Mitochondrial network in the heart. *Protein Cell.* 2012; 3(6):410-8.
100. Lindblom A, Isa A, Norbeck O, Wolf S, Johansson B, Broliden K, Tolfvenstam T. Slow Clearance of Human Parvovirus B19 Viremia following Acute Infection. *Clinical Infectious Diseases.* 2005; 41(8):1201–1203.
101. Long B, Brady WJ, Koyfman A, Gottlieb M. Cardiovascular complications in COVID-19. *Am J Emerg Med.* 2020; 38(7): 1504–1507.
102. Luo W, Astell CR. A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19. *Virology.* 1993; 195:448–55.
103. Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G. Autophagy and cellular immune responses. *Immunity.* 2013; 39:211–227.
104. Mahmaljy H, Yelamanchili VS, Singhal M. Dilated Cardiomyopathy. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. 2020 Aug 10.
105. Mahrholdt H, Goedecke C, Wagner A, Meinhardt G, Athanasiadis A, Vogelsberg H, Fritz P, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Cardiovascular magnetic resonance assessment of human myocarditis: a comparison to histology and molecular pathology. *Circulation.* 2004; 109:1250-1258.
106. Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi CC, Kispert E, Hager S, Meinhardt G. Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation.* 2006; 114(15):1581-90.
107. Massilamany C, Huber SA, Cunningham MW, Reddy J. Relevance of molecular mimicry in the mediation of infectious myocarditis. *J Cardiovasc Transl Res.* 2014; 7(2):165-71.
108. Matsumori A, Yutani C, Ikeda Y, Kawai S, Sasayama S. Hepatitis C virus from the hearts of patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Lab Invest.* 2000; 80:1137–42.



109. McCarthy RE 3rd, Boehmer JP, Hruban RH, Hutchins GM, Kasper EK, Hare JM, Baughman KL. Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *N Engl J Med.* 2000; 342(10):690-5.
110. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJV, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Francesco Piepoli M, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, Skibelund AK. ESC Scientific Document Group. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2021
111. McNamara DM, Starling RC, Cooper LT, Boehmer JP, Mather PJ, Janosko KM, Gorcsan J 3rd, Kip KE, Dec GW; IMAC Investigators. Clinical and demographic predictors of outcomes in recent onset dilated cardiomyopathy: results of the IMAC (Intervention in Myocarditis and Acute Cardiomyopathy)-2 study. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 58(11):1112-8.
112. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007; 449(7164):819-26.
113. Miettinen TP, Bjorklund M. Mitochondrial Function and Cell Size: An Allometric Relationship. *Trends Cell Biol.* 2017; 27:393-402.
114. Moimas S, Zacchigna S, Merlo M, Buiatti A, Anzini M, Dreas L, Salvi A, Di Lenarda A, Giacca M, Sinagra G. Idiopathic dilated cardiomyopathy and persistent viral infection: lack of association in a controlled study using a quantitative assay. *Heart Lung Circ.* 2012; 21:787–93.
115. Molenaar-de Backer MW, Russcher A, Kroes AC, Koppelman MH, Lanfermeijer M, Zaaijer HL. Detection of parvovirus B19 DNA in blood: Viruses or DNA remnants? *J Clin Virol.* 2016; 84:19-23.
116. Munakata Y, Saito-Ito T, Kumura-Ishii K, Huang J, Kodera T, Ishii T, Hirabayashi Y, Koyanagi Y, Sasaki T. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood.* 2005; 106:3449–56.

117. Nakashima A, Tanaka N, Tamai K, Kyuuma M, Ishikawa Y, Sato H, Yoshimori T, Saito S, Sugamura K. Survival of parvovirus B19-infected cells by cellular autophagy. *Virology*. 2006; 349(2):254-63.
118. Narmoneva DA, Vukmirovic R, Davis ME, Kamm RD, Lee RT. Endothelial cells promote cardiac myocyte survival and spatial reorganization: implications for cardiac regeneration. *Circulation*. 2004; 110(8):962-8.
119. Nielsen TS, Hansen J, Nielsen LP, Baandrup UT, Banner J. The presence of enterovirus, adenovirus, and parvovirus B19 in myocardial tissue samples from autopsies: an evaluation of their frequencies in deceased individuals with myocarditis and in non-inflamed control hearts. *Forensic Sci Med Pathol*. 2014; 10:344–350.
120. Nüesch JP, Rommelaere J. A viral adaptor protein modulating casein kinase II activity induces cytopathic effects in permissive cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(30):12482-7.
121. Omura T, Yoshiyama M, Hayashi T, Nishiguchi S, Kaito M, Horiike S, Fukuda K, Inamoto S, Kitaura Y, Nakamura Y, Teragaki M, Tokuhisa T, Iwao H, Takeuchi K, Yoshikawa J. Core protein of hepatitis C virus induces cardiomyopathy. *Circ Res*. 2005; 96:148–50.
122. Orvedahl A, Levine B. Autophagy in Mammalian antiviral immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009; 335:267-85.
123. Pankuweit S, Klingel K. Viral myocarditis: from experimental models to molecular diagnosis in patients. *Heart Fail Rev*. 2013; 18(6):683-702.
124. Parrillo JE, Aretz HT, Palacios I, et al. The results of transvenous endomyocardial biopsy can frequently be used to diagnose myocardial diseases in patients with idiopathic heart failure. Endomyocardial biopsies in 100 consecutive patients revealed a substantial incidence of myocarditis. *Circulation* 1984; 69:93-101.
125. Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, Pham V, Kühl U, Schimbeck PL, Schultheiss HP, Towbin JA. Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation*. 1999; 99:1348–54.
126. Pauschinger M, Phan MD, Doerner A, Kuehl U, Schwimbeck PL, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients

with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation*. 1999; 99:889–95.

127. Pawlak A, Gil KE, Gil RJ. Viral heart disease. *Kardiol Pol*. 2016; 74(4):307-13.

128. Pawlak A, Przybylski M, Durlik M, Gil KE, Nasierowska-Guttmejer AM, Byczkowska K, Ziemia A, Gil RJ. Viral Nucleic Acids in the Serum Are Dependent on Blood Sampling Site in Patients with Clinical Suspicion of Myocarditis. *Intervirol*. 2016; 59:143-151.

129. Pawlak A, Przybylski M, Nasierowska-Guttmejer AM, Gil KE, Durlik M, Gil RJ. Utility of qualitative and quantitative evaluation of viral nucleic acids in cardiac biopsy and blood samples in patients with suspected myocarditis/inflammatory cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2015; 36:1191.

130. Pazolli E, Stewart SA. Senescence: the good the bad and the dysfunctional. *Curr Opin Genet Dev*. 2008; 18(1):42-7.

131. Pietsch H, Escher F, Aleshcheva G, Lassner D, Bock CT, Schultheiss HP. Detection of parvovirus mRNAs as markers for viral activity in endomyocardial biopsy-based diagnosis of patients with unexplained heart failure. *Sci Rep*. 2020; 10(1):22354.

132. Płońska-Gościński E. et al. Standardy kardiologiczne 2017 okiem echokardiografisty. Warsaw, Medical Tribune Polska. 2017.

133. Pollack A, Kontorovich AR, Fuster V, Dec GW. Viral myocarditis – diagnosis, treatment options, and current controversies. *Nature Reviews Cardiology*. 2015; 12:670–680.

134. Poole BD, Karenyi YV, Naides SJ. Parvovirus B19-induced apoptosis of hepatocytes. *J Virol*. 2004; 78(14):7775-83.

135. Pozzuto T, von Kietzell K, Bock T, Schmidt-Lucke C, Poller W, Zobel T, Lassner D, Zeichhardt H, Weger S, Fechner H. Transactivation of human parvovirus B19 gene expression in endothelial cells by adenoviral helper functions. *Virology*. 2011; 411:50–64.

136. Puleston DJ, Simon AK. Autophagy in the immune system. *Immunology*. 2014; 141(1):1-8.

137. Rautou PE, Cazals-Hatem D, Feldmann G, Mansouri A, Grodet A, Barge S, Martinot-Peignoux M, Duces A, Bièche I, Lebrec D, Bedossa P, Paradis V, Marcellin P,

Valla D, Asselah T, Moreau R. Changes in autophagic response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Pathol.* 2011; 178(6):2708-15.

138. Rayet B, Lopez-Guerrero JA, Rommelaere J, Dinsart C. Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J Virol.* 1998; 72(11):8893-903.

139. Reddy J, Massilamany C, Buskiewicz I, Huber SA. Autoimmunity in viral myocarditis. *Curr Opin Rheumatol.* 2013; 25(4):502-8.

140. Reichart D, Magnussen C, Zeller T, Blankenberg S. Dilated cardiomyopathy: from epidemiologic to genetic phenotypes: A translational review of current literature. *J Intern Med.* 2019; 286(4):362-372.

141. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation.* 1996; 93(5):841-2.

142. Rigopoulos AG, Klutt B, Matiakis M, Apostolou A, Mavrogeni S, Noutsias M. Systematic Review of PCR Proof of Parvovirus B19 Genomes in Endomyocardial Biopsies of Patients Presenting With Myocarditis or Dilated Cardiomyopathy. *Viruses.* 2019; 11(6):566.

143. Rohayem J, Dinger J, Fischer R, Klingel K, Kandolf R, Rethwilm A. Fatal myocarditis associated with acute parvovirus B19 and human herpesvirus 6 coinfection. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(12):4585-7.

144. Rose NR. Myocarditis: Infection Versus Autoimmunity. *J Clin Immunol.* 2009; 29(6):730-7.

145. Rossi A, Dini FL, Agricola E, Faggiano P, Benfari G, Temporelli PL, Cucco C, Scelsi L, Vassanelli C, Ghio S. Left atrial dilatation in systolic heart failure: a marker of poor prognosis, not just a buffer between the left ventricle and pulmonary circulation. *Journal of Echocardiography.* 2018; 16:155–161.

146. Rużyłło W, Rosnowski A, Dąbrowski M. Profiles of biopsy-proven cases with myocarditis. *Heart Vessels Suppl.* 1985; 1:107-10.

147. Sagar S, Liu PP, Cooper LT Jr. Myocarditis. *Lancet.* 2012; 379(9817):738-47.

148. Saito T, Asai K, Tachi M, Sato S, Mozawa K, Adachi A, Sasaki Y, Amano Y, Mizuno K, Kumita SI, Shimizu W. Long-term prognostic value of ultrastructural features in dilated cardiomyopathy: comparison with cardiac magnetic resonance. *ESC Heart Fail.* 2020; 7(2):682-691.
149. Samidurai A, Das A. Cardiovascular Complications Associated with COVID-19 and Potential Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(18):6790.
150. Sanchez MJ, Bergasa NV. Hepatitis C associated cardiomyopathy: potential pathogenic mechanisms and clinical implications. *Med Sci Monit.* 2008; 14(5):RA55-63.
151. Sarda L, Colin P, Boccara F, et al. Myocarditis in patients with clinical presentation of myocardial infarction and normal coronary angiograms. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 37:786-92.
152. Savvatis K, Schultheiss HP, Tschöpe C. Endomyocardial biopsy and ultrastructural changes in dilated cardiomyopathy: taking a ‘deeper’ look into patients’ prognosis. *Eur Heart J.* 2015; 36(12):708-10.
153. Schenk T, Enders M, Pollak S, Hahn R, Huzly D. High prevalence of human parvovirus B19 DNA in myocardial autopsy samples from subjects without myocarditis or dilative cardiomyopathy. *J Clin Microbiol* 2009; 47:106–110.
154. Schmidt-Lucke C, Spillmann F, Bock T, Kühl U, Van Linthout S, Schultheiss HP, Tschöpe C. Interferon beta modulates endothelial damage in patients with cardiac persistence of human parvovirus b19 infection. *J Infect Dis.* 2010; 201(6):936-45.
155. Schmidt-Lucke C, Zobel T, Schrepfer S, Kuhl U, Wang D, Klingel K, Becher PM, Fechner H, Pozzuto T, Van Linthout S, Lassner D, Spillmann F, Escher F, Holinski S, Volk HD, Schultheiss HP, Tschöpe C. Impaired Endothelial Regeneration Through Human Parvovirus B19-Infected Circulating Angiogenic Cells in Patients With Cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 2015; 1;212(7):1070-81.
156. Schultheiss HP, Kühl U, Cooper LT. The management of myocarditis. *Eur Heart J.* 2011; 32(21):2616-25.
157. Shah T, Zhong M, Minutello RM. Functional Mitral Regurgitation in Heart Failure. *Cardiol Rev.* 2019; 27(6):327-336.

158. Shauer A, Gotsman I, Keren A, Zwas DR, Hellman Y, Durst R, Admon D. Acute viral myocarditis: current concepts in diagnosis and treatment. *Isr Med Assoc J.* 2013; 15(3):180-5.
159. Siasos G, Tsigkou V, Kosmopoulos M, Theodosiadis D, Simantiris S, Tagkou NM, Tsimpiktsioglou A, Stampouloglou PK, Oikonomou E, Mourouzis K, Philippou A, Vavuranakis M, Stefanadis C, Tousoulis D, Papavassiliou AG. Mitochondria and cardiovascular diseases-from pathophysiology to treatment. *Ann Transl Med.* 2018; 6(12):256.
160. Stewart GC, Lopez-Molina J, Gottumukkala RV, Rosner GF, Anello MS, Hecht JL, Winters GL, Padera RF, Baughman KL, Lipes MA. Myocardial parvovirus B19 persistence: lack of association with clinicopathologic phenotype in adults with heart failure. *Circ Heart Fail.* 2011; 4:71-78.
161. Studenski R. Płeć a podejmowanie ryzyka. *Przegląd Psychologiczny.* 2004; 2:147-156.
162. Suhy DA, Giddings TH Jr, Kirkegaard K. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J Virol.* 2000; 74(19):8953-65.
163. Sumpter R Jr, Levine B. Autophagy and innate immunity: triggering, targeting and tuning. *Semin Cell Dev Biol.* 2010; 21(7):699-711.
164. Thiene G, Bruneval P, Veinot J, Leone O. Diagnostic use of the endomyocardial biopsy: a consensus statement. *Virchows Arch.* 2013; 463(1):1-5.
165. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature.* 2008; 456(7224):980-4.
166. Towbin JA, Lowe AM, Colan SD, Sleeper LA, Orav EJ, Clunie S, Messere J, Cox GF, Lurie PR, Hsu D, Canter C, Wilkinson JD, Lipshultz SE. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. *JAMA.* 2006; 296(15):1867-76.
167. Towbin JA, Ware SM, Jefferies JL. Heart transplants in pediatric patients: viral infection as a loss predictor. *Future Cardiol.* 2010; 6(6):735-41.

168. Trachtenberg BH, Hare JM. Inflammatory cardiomyopathic syndromes. *Circ Res* 2017; 121:803-18.
169. Triposkiadis F, Pieske B, Butler J, Parissis J, Giamouzis G, Skoularigis J, Brutsaert D, Boudoulas H. Global left atrial failure in heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2016; 18(11):1307-1320.
170. Tschöpe C, Ammirati E, Bozkurt B, Caforio ALP, Cooper LT, Felix SB, Hare JM, Heidecker B, Heymans S, Hübner N, Kelle S, Klingel K, Maatz H, Parwani AS, Spillmann F, Starling RC, Tsutsui H, Seferovic P, Van Linthout S. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: current evidence and future directions. *Nat Rev Cardiol.* 2021; 18(3):169-193.
171. Tschöpe C, Bock CT, Kasner M, Noutsias M, Westermann D, Schwimmbeck PL, Pauschinger M, Poller WC, Kühl U, Kandolf R, Schultheiss HP. High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation.* 2005; 111(7):879-86.
172. Twig G, Hyde B, Shirihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1777(9):1092-7.
173. Ukena C, Mahfoud F, Kindermann I, Kandolf R, Kindermann M, Böhm M. Prognostic Electrocardiographic Parameters in Patients With Suspected Myocarditis. *Eur J Heart Fail.* 2011; 13(4):398-405.
174. Van Linthout S, Elsanhoury A, Klein O, Sosnowski M, Miteva K, Lassner D, Abou-El-Enein M, Pieske B, Kühl U, Tschöpe C. Telbivudine in Chronic Lymphocytic Myocarditis and Human Parvovirus B19 Transcriptional Activity. *ESC Heart Fail.* 2018; 5(5):818-829.
175. Van Linthout S, Klingel K, Tschöpe C. SARS-CoV2-related myocarditis-like syndroms: Shakespeare's question: What's in a name? *Eur. J. Heart Fail.* 2020; 22:922–925.
176. Veinot JP. Diagnostic endomyocardial biopsy pathology – general biopsy considerations, and its use for myocarditis and cardiomyopathy: a review. *Can J Cardiol.* 2002; 18(1):55-65.

177. Verdonschot J, Hazebroek M, Merken J, Debing Y, Dennert R, Brunner-La Rocca HP, Heymans S. Relevance of Cardiac Parvovirus B19 in Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy: Review of the Literature. *Eur J Heart Fail.* 2016; 18(12):1430-1441.
178. Weintraub RG, Semsarian C, Macdonald P. Dilated cardiomyopathy. *Lancet.* 2017; 390:400–14.
179. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood.* 2003; 102: 3927–33.
180. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. *J Virol.* 2001; 75:4110–6.
181. Wong J, Zhang J, Si X, Gao G, Mao I, McManus BM, Luo H. Autophagosome supports coxsackievirus B3 replication in host cells. *J Virol.* 2008; 82(18):9143-53.
182. Xu X, Chen C, Lu WJ, Su YL, Shi JY, Liu YC, Wang L, Xiao CX, Wu X, Lu Q. Pyrroloquinoline quinone can prevent chronic heart failure by regulating mitochondrial function. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2020; 10(3):453-469.
183. Yancy CW, Januzzi JL Jr., Allen LA, Butler J, Davis LL, Fonarow GC, Ibrahim NE, Jessup M, Lindenfeld J, Maddox TM, Masoudi FA, Motiwala SR, Patterson JH, Walsh MN, Wasserman A. 2017 ACC Expert Consensus Decision Pathway for Optimization of Heart Failure Treatment: Answers to 10 Pivotal Issues About Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: A Report of the American College of Cardiology Task Force on Expert Consensus Decision Pathways. *J Am Coll Cardiol.* 2018; 71(2):201-230.
184. Yilmaz A, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Imaging in Inflammatory Heart Disease: From the Past to Current Clinical Practice. *Hellenic J Cardiol.* Nov-Dec 2009; 50(6):449-60.
185. Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *N Engl J Med.* 2004; 350:586-597.
186. Yun HH, Jung SY, Park BW, Ko JS, Yoo K, Yeo J, Kim HL, Park HJ, Youn HJ, Lee JH. An Adult Mouse Model of Dilated Cardiomyopathy Caused by Inducible Cardiac-Specific Bis Deletion. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(3):1343.



187. Zeng JH, Liu YX, Yuan J, Wang FX, Wu WB, Li JX, Wang LF, Gao H, Wang Y, Dong CF, Li YJ, Xie XJ, Feng C, Liu L. First case of COVID-19 complicated with fulminant myocarditis: a case report and insights. *Infection*. 2020; 48(5):773-777.
188. Zhao L, Fu Z. Roles of Host Immunity in Viral Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy. *J Immunol Res*. 2018; 2018:5301548.
189. Ziolkowski M, Kubica A, Sinkiewicz W, Maciejewski J. Zmniejszanie umieralności na chorobę niedokrwienną serca w Polsce – sukces terapii czy prozdrowotnego stylu życia? *Folia Cardiologica Excerpta*. 2009; 4(5):265-272.