

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Petr Kuchynka

Nové diagnostické a terapeutické aspekty zánětlivé kardiomyopatie

New diagnostic and therapeutic aspects of inflammatory cardiomyopathy

Disertační práce

Školitel: as. MUDr. Stanislav Šimek, CSc.

Konzultant : doc. MUDr. Tomáš Paleček, Ph.D.

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 25.5.2011

MUDr. Petr Kuchynka

Poděkování

Mé poděkování patří mému školiteli, odbornému asistentu Stanislavu Šimkovi, CSc., za odborné vedení během mého postgraduálního studia a tvorby disertační práce.

Mé zvláštní a veliké díky patří docentu Tomáši Palečkovi, Ph.D., který je mým učitelem ve vědecko-výzkumné činnosti a který mi byl svými radami a připomínkami zásadně nápomocen při vypracování disertační práce. Docent Paleček je nejen uznávaným odborníkem v oblasti ultrazvukové kardiiovaskulární diagnostiky, ale rovněž i předním odborníkem na problematiku kardiomyopatií.

Mé veliké poděkování patří i profesoru Aleši Linhartovi, DrSc., přednostovi II. interní kliniky kardiologie a angiologie 1. LF UK a VFN, bez jehož podpory a pomoci by program péče o nemocné s kardiomyopatiemi nemohl na naší klinice probíhat.

Dále bych chtěl poděkovat MUDr. Štěpánu Havránkovi, Ph.D. za odborné rady a pomoc s provedením statistické analýzy.

Velký díky rovněž patří přítelkyni Kateřině Eisenkolbové za vytváření klidného zázemí, bez něhož by vědecká práce nemohla vzniknout.

Obsah

1	Úvod	7
1.1	Definice a zařazení zánětlivé kardiomyopatie	7
1.2	Etiologie zánětlivé kardiomyopatie.....	8
1.3	Patogeneze zánětlivé kardiomyopatie	10
1.4	Tradiční diagnostika a léčba zánětlivé kardiomyopatie	15
1.5	Moderní metody hodnocení endomyokardiální biopsie.....	18
1.6	Endomyokardiální biopsií řízená léčba zánětlivé kardiomyopatie	23
2	Cíle a hypotézy	28
3	Metodika	31
3.1	Soubor nemocných	31
3.2	Elektrokardiografie.....	32
3.3	Echokardiografie	32
3.4	Laboratorní vyšetření krve	39
3.5	Endomyokardiální biopsie.....	39
3.6	Léčba	41

3.7	Sledování nemocných	42
3.8	Statistické hodnocení.....	42
4	Výsledky	43
4.1	Klinické, echokardiografické a EKG charakteristiky souboru.....	43
4.2	Laboratorní vyšetření	46
4.3	Výsledky endomyokardiální biopsie.....	47
4.4	Sérologické vyšetření	55
4.5	Cílená léčba řízená nálezem v endomyokardiální biopsii.....	57
4.5.1	Nemocní s bioptickým průkazem <i>Borrelia burgdorferi</i> léčení ceftriaxonem.....	57
4.5.2	Nemocný léčení imunosupresí	60
4.5.3	Nemocní léčení antivirotiky	62
4.5.4	Nemocní léčení standardní terapií srdečního selhání.....	64
5	Diskuze	69
5.1	Obecná charakteristika souboru a nálezy v endomyokardiální biopsii	69
5.2	Sérologické vyšetření	75
5.3	Cílená léčba	77
5.3.1	Skupina nemocných s průkazem <i>Borrelia burgdorferi</i>	77

5.3.2	Skupina nemocných léčená kombinovanou imunosupresí.....	79
5.3.3	Skupina nemocných léčená antivirotiky	81
6	Závěry.....	83
7	Použitá literatura.....	85
8	Seznam zkratek	96
9	Seznam tabulek a grafů	98
10	Seznam obrázků	99
11	Seznam publikací autora	100
12	Příložené publikace	105

1.Úvod

1.1 Definice a zařazení zánětlivé kardiomyopatie

Pojem zánětlivá kardiomyopatie (ZKMP) byl poprvé uveden ve WHO/ISFC klasifikaci kardiomyopatií v roce 1995, kdy byla ZKMP definována jako myokarditida spojená se srdeční dysfunkcí (1). V současné klasifikaci kardiomyopatií Evropské kardiologické společnosti z roku 2008 je ZKMP řazena mezi nefamiliární formy dilatační kardiomyopatie (2). Dilatační kardiomyopatie je charakterizována dilatací a systolickou dysfunkcí levé komory (LK) srdeční, které nelze vysvětlit abnormalitou zatížení LK v důsledku arteriální hypertenze, chlopenní a vrozené srdeční vady, nebo stupněm onemocnění koronárních tepen.

1.2 Etiologie zánětlivé kardiomyopatie

Myokarditidu vedoucí ke vzniku ZKMP představuje akutní či chronický zánětlivý proces myokardu, který může mít celou řadu infekčních (Tabulka číslo 1) či neinfekčních příčin. Podstatně častěji se na rozvoji myokarditidy podílejí infekční agens. Za nejčastější příčinu myokardiálního zánětu je všeobecně považována virová infekce (3). Do souvislosti s rozvojem myokarditidy bývá dááno poměrně široké spektrum virových agens, přičemž zastoupení a četnost těchto patogenů se podle jednotlivých prací velice liší. V minulosti byly publikovány studie poukazující na význam enterovirů (4), v novějších pracech z počátku tohoto tisíciletí jsou naopak jako častá příčina myokarditidy uváděny adenoviry, parvovirus B19, herpetické viry, virus hepatitidy C, či virus HIV (5). V Jižní Americe naopak dominuje protozoální infekce myokardu vyvolaná *Trypanosoma Cruzi*, tzv. Chagasova choroba (6).

Ze široké skupiny neinfekčních příčin myokarditidy je nutné uvést především systémová onemocnění pojiva (systémový lupus erytematodes, sklerodermie, revmatoidní arthritida, dermatomyozitida/polymyozitida), vaskulitidy, případy lékové toxicity (chemoterapeutika), reakce lékové hypersenzitivity (např. v souvislosti s podáváním sulfonamidů, penicilinových či cefalosporinových antibiotik, digoxinu, diuretik, tricyklických antidepresiv či dobutaminu) (7).

Tabulka číslo 1 Infekční agens asociovaná s myokarditis (8)

<p>Viry:</p> <p>Parvovirus B 19, Adenovirus, Coxsackie virus, Echovirus, Herpes simplex virus 1 a 2, virus Epsteinova a Barrové, Cytomegalovirus, lidský herpesvirus virus 6, virus hepatitidy B a C, HIV, virus chřivky, respiračně syncytiální virus, Arbovirus, Arenavirus, virus encefalomyelitidy, virus poliomyelitidy, virus rubeoly, virus parotitidy, virus varioly, varicella-zoster virus</p>
<p>Bakterie:</p> <p>Borrelia, Leptospira, Treponema, Brucella, Clostridium, Corynebacterium, Francisella, Streptococcus, Staphylococcus, Neisseria, Legionella, Mycobacterium, Mycoplasma, Tropheryma, Rickettsie</p>
<p>Fungi:</p> <p>Candida, Cryptococcus, Coccidioides, Aspergillus, Blastomyces, Histoplasma</p>
<p>Protozoa:</p> <p>Trypanosoma, Toxoplasma, Entamoeba, Leishmania</p>
<p>Helminti:</p> <p>Cysticercus, Echinococcus, Schistosoma, Toxocara, Trichinella</p>

1.3 Patogeneze zánětlivé kardiomyopatie

Patogeneze ZKMP je odvozována především z výsledků studií prováděných na zvířecích, hlavně myších, modelech virové myokarditidy. Všeobecně je přijímán třístupňový model vývoje ZKMP, kdy na akutní zánět navazuje fáze chronického poškození myokardu, které je charakterizováno remodelací srdce a vývojem systolické dysfunkce levé komory (9).

1) Akutní fáze virové myokarditidy

Tato fáze trvá 0 až 3 dny a je zahájena internalizací viru. Přesný mechanismus internalizace byl popsán u enterovirů a adenovirů. Coxsackie viry, resp. většina dalších enterovirů a adenoviry se dostávají do nitra kardiomyocytů vazbou na společný receptor nazývaný CAR (z angličtiny coxsackie-adenoviral receptor) (10). CAR receptor je jedním z imunoglobulinových receptorů a řadí se mezi adhezivní molekuly. Vazba na tento receptor je sice klíčová k rozvoji virové infekce, k internalizaci viru je však nutná i vazba na ko-receptory. Ko-receptorem pro enteroviry je CD 55 (z angličtiny DAF- decay accelerating factor) a pro adenoviry pak integriny α_{vB3} a α_{vB5} . (11). V této fázi se na poškození kardiomyocytů podílí také přímé cytotoxické působení jednotlivých virů. Dochází k indukci transkripce mRNA pro interleukin (IL)-1 β , tumour necrosis factor (TNF)- α a interferon (IFN)- γ (12). Titry virů v myokardu dosahují svého maxima kolem 3. dne infekce.

2) Subakutní fáze

Toto období trvá od 4. do 14. dne od počátku virové infekce. Poté, co došlo k invazi viru do myokardu, je srdeční sval infiltrován NK (z angličtiny natural killer) buňkami. NK buňky aktivované IL-2 mají klíčovou roli v zábraně další virové invaze a inhibici virové replikace.

Alterace NK buněk vedla v myších modelech nejen k prolongaci virové infekce, ale i k vzestupu virových titrů a rozvoji těžkých forem myokarditidy .

V subakutní fázi je také zvýšena produkce IL-1 β , TNF- α a IFN- γ . Tyto cytokiny potencují aktivitu inducibilní NO syntázy v myokardu. Produkovaný NO hraje pozitivní úlohu v rámci obranných protiinfekčních mechanismů a při usmrcení virů. Na druhou stranu tyto cytokiny mohou zhoršovat průběh myokarditidy svým negativně inotropním účinkem (13).

V subakutní fázi je většinou zaznamenáván pokles virových koncentrací v myokardu a vzestup titrů neutralizačních protilátek. Vyšší titry neutralizačních protilátek bývají spojeny s lepší prognózou jedinců postižených myokarditidou (13). V této etapě se také zásadním způsobem na protivirové obraně podílí i buněčná imunita. Na rozdíl od bakteriálních infekcí, kde zásadní složku celulární imunity představují granulocyty, se zde uplatňují téměř výhradně lymfocyty a monocyty, resp. makrofágy. Nicméně u fulminantních virových myokarditid mohou být důležitou složkou protivirové obrany rovněž neutrofilní granulocyty (14). V buňkách napadených virem dochází k fragmentaci virových proteinů a ty jsou pak jako peptidy exprimovány na buněčných membránách spolu s MHC I. třídou (z angličtiny major histocompatibility complex). Na infikovaných kardiomyocytech jsou dále prezentovány adhezivní molekuly ICAM I (z angličtiny intercellular adhesion molecule), B7-1 (CD 80), B7-2 (CD 86) a CD (cluster of differentiation) 40. Tyto adhezivní molekuly se podílejí spolu s TCR (z angličtiny T cell-receptor), které interagují s MHC I. třídou, na rozpoznání buněk určených k usmrcení.

3). Chronická fáze

Tato fáze začíná 15. dnem a končí 90. dnem po invazi viru do myokardu, může ale pokračovat i déle. Jedná se o velice důležité období, během kterého může docházet k remodelaci srdce

a rozvoji chronického zánětlivého postižení myokardu, tj. ZKMP. K vývoji ZKMP dochází však pravděpodobně jen v necelé polovině případů akutní myokarditidy (15).

Pokračující postižení myokardu může být způsobeno perzistencí kardiotropních virů, autoimunitním zánětem či jejich kombinací. Perzistující virová infekce může vést k postižení myokardu přímou cytotoxicitou, indukci apoptózy (jak bylo prokázáno například u adenovirů či CMV a EBV) nebo se může podílet na rozvoji autoimunitních reakcí (10).

Pro autoimunitní reakce probíhající v myokardu v návaznosti na virovou, resp. i neviróvou infekci svědčí řada faktorů. U 25-73% nemocných se ZKMP lze v krvi prokázat přítomnost antimyokardiálních protilátek (16). Protilátky byly nejčastěji zjišťovány proti β_1 adrenergním receptorům, M2 typu muskarinových receptorů, α a β řetězcům myosinu a jednotlivým složkám mitochondrií (17). Názory na příčinu vzniku autoreaktivních protilátek se různí. Často bývají uváděny tzv. molekulární mimikry, kdy se určité epitopy jednotlivých antigenů obsažených v kardiomyocytech a ve virových partikulích natolik podobají, že mohou vést ke zkřížené reakci tvorby protilátek. Tato teorie je podepřena existencí shodných epitopů α -myosinu a VP1 proteinu Coxsackie B virů či proteinu pp71 (transkripční faktor) CMV viru a těžkého řetězce myosinu (18). Další možná příčina je spatřována v mobilizaci endogenního myosinu či jiné substance z intracelulárního prostředí a v důsledku toho navození zánětlivého autoimunitního procesu (19).

Pro chronickou fázi je typický úbytek kardiomyocytů. Jelikož kardiomyocyty jsou terminálně diferencované buňky neschopné dalšího dělení a regenerace myokardu cirkulujícími zárodečnými buňkami je minimální, vede ztráta kontraktálních elementů k negativní remodelaci komorového myokardu. Při tomto procesu dochází k makroskopickým i mikroskopickým změnách srdeční svaloviny.

Díky převážně sériové replikaci sarkomér se LK dilatuje a získává sférický tvar. Postupně se rozšiřuje prstenec mitrální chlopně, což společně s oddálením papilárních svalů v důsledku

remodelace LK vede ke vzniku sekundární mitrální regurgitace. Tato funkční nedomykavost vede k objemovému přetížení LK a dále snižuje efektivní minutový výdej.

Kromě těchto makroskopických změn dochází k širokému spektru změn na celulární a subcelulární úrovni. V důsledku zvýšení mechanického napětí v myokardu je aktivována řada humorálních působků a transkripčních faktorů. Mezi humorální působky vedoucí k hypertrofii kardiomyocytů a působící přes signální cestu zprostředkovanou Gq proteinem patří angiotenzin II, endotelin-I, vasopresin či noradrenalin (20). Mimo toto humorální působení dochází k aktivaci receptorových tyrosinkináz vedoucích k fosforylaci mitogeny aktivované proteinkinázy (MAPK), stresem aktivované kinázy, proteinu p38 a dalších kináz, které se po aktivaci translokují do jádra a ovlivňují transkripci příslušných genů.

Přetížení komorového myokardu vede ke změnám ve složení kontraktálních proteinů kardiomyocytů. Zvyšuje se podíl fetálních kontraktálních proteinů charakterizovaný především záměnou V1 izofomy myosinu s vysokou ATPázovou aktivitou za V3 izoformu s nízkou aktivitou ATPázy. Dochází také ke změnám lehkých forem myosinu a izotopů troponinu. Kontrakce a relaxace myokardu začíná podstatně více záviset na přesunech kalciových iontů mezi extracelulárním prostorem a cytolem než na jejich směně mezi cytoplazmou a sarkoplasmatickým retikulem. Zvyšuje se počet a aktivita L-kanálů v sarkolemě, klesá aktivita sarkoplasmatické Ca^{2+} ATPázy (SERCA) a fosfolambanu a snižuje se množství ryanodin senzitivního Ca^{2+} v sarkoplasmatickém retikulu (21).

Mění se rovněž metabolismus srdečního svalu. Sniženy jsou zásoby energie ve formě ATP a fosfokreatinu a místo převažujícího využití volných mastných kyselin se hlavním zdrojem energie stává glykolýza (22,23).

Mimo výše popsaných změn kardiomyocytů dochází rovněž k změnám v extracelulární matrix (ECM). V ECM se v důsledku porušené rovnováhy mezi aktivitou metaloproteináz a jejich

inhibitorů zvyšuje množství kolagenu. Zvýšené množství kolagenu vede k snížení poddajnosti komorového myokardu, a tak dále negativně ovlivňuje adaptaci srdečního svalu na zatížení.

1.4 Tradiční diagnostika a léčba zánětlivé kardiomyopatie

K definitivnímu průkazu zánětu srdečního svalu je u jedinců s klinickým podezřením na ZKMP tradičně prováděna endomyokardiální biopsie (EMB).

Prvým všeobecně užívaným klasifikačním schématem hodnocení přítomnosti zánětu v myokardu, založeným na histopatologickém vyšetření vzorků srdeční tkáně, byla tzv. Dallaská kritéria publikovaná Aretzem et al. v roce 1986 (24). Podle těchto kritérií byla přítomna jistá diagnóza myokarditidy v případě, že v srdečním svaly byla nalezena leukocytární infiltrace doprovázená nekrózou či destrukcí kardiomyocytů neischemické povahy. Jestliže byla detekována méně intenzivní zánětlivá infiltrace s absencí známek poškození kardiomyocytů, byl nález považován za hraniční (tzv. borderline myocarditis). Absence zánětlivého infiltrátu a myocytární nekrózy pak indikovala negativní nález pro přítomnost myokarditis.

Na základě takto stanoveného histopatologického průkazu myokarditidy byli nemocní často léčeni imunosupresivou v podobě monoterapie kortikoidy, případně jejich kombinací s jiným imunosupresivem, např. azathioprinem nebo cyklosporinem. Strategie této léčby byla založena na výsledcích malých nerandomizovaných studií, ve kterých byly popisovány příznivé účinky imunosupresivní terapie na regresi zánětlivého postižení myokardu a na zlepšení systolické funkce LK (25,26,27).

Entuziasmus spojený s prováděním EMB a možností následné „cílené“ imunosupresivní léčby srdečního zánětu byl výrazně oslaben v 90. letech 20. století, kdy byla publikována řada větších prací, demonstrujících žádný či minimální přínos této léčby u myokarditidy diagnostikované na základě Dallaských histopatologických kritérií. Nejzásadnější výsledky v tomto ohledu přinesla multicentrická studie Myocarditis Treatment Trial, která byla uskutečněna ve Spojených státech, Kanadě a Japonsku a publikována v roce 1995 (28). V rámci této rozsáhlé studie bylo provedeno

histopatologické vyšetření 4 vzorků EMB získaných z pravé komory srdeční u 2333 pacientů, kteří dle ošetřujících lékařů vykazovali klinický obraz myokarditidy. Jistá diagnóza myokarditidy však byla podle Dallaských kritérií prokázána pouze u 214 jedinců (cca 10% celkové populace studie). Z 214 jedinců byla dále velká část jedinců vyřazena z důvodu nesplnění dalších vstupních kritérií či odmítnutí ve studii pokračovat. Studie tedy finálně probíhala u celkového počtu 111 nemocných. Jednalo se o jedince, u kterých byla vyloučena ischemická choroba srdeční, s ejekční frakcí (EF) LK pod 45% hodnocenou radionuklidovou ventrikulografií a anamnézou srdečního selhání kratší než 2 roky. Všech 111 pacientů dostávalo tehdy užívanou léčbu srdečního selhání, 64 jedinců bylo randomizováno ke kombinované léčbě imunosupresivy skládající se buď z prednisonu a azathioprinu, či prednisonu a cyklosporinu. Kombinovaná imunosuprese byla podávána po dobu 24 týdnů. Při porovnání obou skupin za 28 a 52 týdnů sledování nedošlo k signifikantnímu rozdílu ve zlepšení EF LK, end-diastolického rozměru LK a tlaku v zaklínění. Nedošlo ani k významnému rozdílu v mortalitě, kdy mortalita v celém souboru činila za 1 rok 20% a za 4,3 roky 56%.

Závěry této důležité studie je ovšem nutno interpretovat v celém jejím kontextu. Již skutečnost, že pouze 214 jedinců z původních více než 2000 pacientů s klinickým obrazem myokarditidy splňovalo Dallaská kritéria, poukazuje na nízkou výpovědní hodnotu takto prováděné histopatologické diagnostiky myokarditis, resp. zánětlivého postižení srdečního svalu obecně. Na nízkou výpovědní hodnotu takto hodnocené EMB a na značnou interindividuální variabilitu při hodnocení EMB dle Dallaských kritérií poukázal i Shanes se svými spolupracovníky (29).

Dalším, velice podstatným nedostatkem studie Myocarditis Treatment Trial, který byl dobově podmíněný, byla nemožnost diagnostiky přítomnosti perzistence infekčního, především virového agens v myokardu. V souvislosti s tím lze spekulovat o negativním efektu podávané

imunosupresivní léčby u jedinců s histopatologickým obrazem myokarditidy, která byla stanovena bez možnosti prokázat případnou perzistující virovou infekci srdečního svalu.

Publikace této velké studie a řady dalších prací, poukazujících na omezené možnosti klasického histopatologického hodnocení EMB, vedla na období téměř 10 let k výraznému oslabení pozice EMB v diagnostice ZKMP. Na řadě pracovišť po celém světě včetně České republiky nebyla proto EMB prováděna vůbec, i vzhledem k její minimální výpovědní hodnotě stran možnosti cílené léčby myokardiálního zánětu.

1.5 Moderní metody hodnocení endomyokardiální biopsie

V souvislosti s nárůstem znalostí o patogenezi ZKMP a především s rozvojem nových patologických a mikrobiologických diagnostických metod, které výrazně zvyšují výtěžnost hodnocení vzorků EMB, dochází v posledních letech ke změně názoru na provádění EMB v diagnostice ZKMP. Analýza vzorků EMB je kromě standardního histopatologického vyšetření rozšiřována o vyšetření imunohistochemické, citlivější k průkazu známek zánětu myokardu, a mikrobiologické, zaměřené na průkaz perzistující infekce v myokardu (30).

Je známo, že detekce myokarditidy založená pouze na histopatologickém průkazu leukocytární infiltrace myokardu má nízkou výpovědní hodnotu. Příčinou nízké senzitivity je především tzv. chyba vzorkování (z angličtiny *sampling error*), kdy při fokálním postižení srdeční svaloviny leukocyty nemusí být při omezeném odběru vzorků myokardu EMB zánět prokázán. Další významné omezení představuje složité rozpoznávání typu infiltrujících buněk.

Tyto zásadní limitace histopatologického hodnocení EMB vedly k rozvoji imunohistochemických metod založených na přímé detekci infiltrujících T lymfocytů a na analýze exprese cytoadhezivních molekul na endoteliích a buňkách intersticia. Jednou ze zásadních prací, které prokázaly výrazně větší výtěžnost bioptické diagnostiky ZKMP při použití moderních imunohistochemických metod, představuje studie Kühla et al. (31). Tito autoři provedli EMB u 170 pacientů s dilatační kardiomyopatií, anamnézou srdečního selhání delší než 6 měsíců a absencí klinicky jasně prodělané virové infekce a dále u 85 kontrolních jedinců. Jen 5% pacientů s dilatační kardiomyopatií vykazovalo nález hraniční myokarditidy dle Dallaských kritérií, jasná myokarditida nebyla přítomna ani u jednoho nemocného. Histopatologicky detekovatelná zánětlivá infiltrace myokardu nebyla přítomna u žádného jedince z kontrolní

skupiny. Při imunohistochemickém vyšetření zaměřeném na hodnocení přítomnosti CD2 a CD3 znaků T lymfocytů v srdečním svalu bylo zjištěno, že u kontrolní skupiny byl nalezen méně než 1 lymfocyt na HPF (z angličtiny high power field- zorné pole) při zvětšení 400x a méně než 4 lymfocyty na mm^2 . Ve skupině nemocných s dilatační kardiomyopatií byla myokarditida imunohistochemicky přítomna u 48% jedinců, přičemž tato diagnóza byla stanovena při detekci více než 2 T lymfocytů / HPF resp. více než 7 T lymfocytů / mm^2 . V této a v dalších následujících studiích bylo zjištěno, že u pacientů se ZKMP vykazujících zvýšenou expresi CD znaků T lymfocytů jsou rovněž významně exprimovány antigeny MHC 1. třídy a MHC 2. třídy a některé adhezivní molekuly (např. VCAM-1, ICAM-1) a že tyto molekuly nebývají přítomny v myokardu jen fokálně, nýbrž difúzně, a tak dále zvyšují senzitivitu vyšetření vzorků myokardu získaných EMB (32,33).

Imunohistochemické vyšetření ZKMP tedy v současnosti využívá detekce širokého spektra cytoadhezivních molekul (např. ICAM 1 a VCAM 1), antigenů lidských leukocytů třídy I a II (HLA - anglicky human leucocyte antigen), a průkazu CD znaků infiltrujících zánětlivých buněk (lymfocytů, makrofágů aj.). Tímto způsobem je výrazně zvýšena senzitivita hodnocení přítomnosti zánětlivého infiltrátu v myokardu.

Moderní mikrobiologické vyšetření je postaveno na průkazu přítomnosti kardiotropních virů či nevirových patogenů v myokardu. Tato mikrobiální agens jsou v srdečním svalu nejčastěji prokazována metodou polymerázové řetězové reakce (PCR).

Otázkou prevalence přítomnosti virových agens v myokardu a jejím vztahem k patogenezi ZKMP se zabývala celá řada studií. Bowles et al. provedli EMB u 773 jedinců s dilatační kardiomyopatií, resp. myokarditidou (34). Diagnóza myokarditidy byla v této studii založena buď na histopatologickém průkazu tzv. jasné, či hraniční myokarditidy při hodnocení podle Dallaských kritérií, anebo na základě klinického podezření na myokarditis u nemocných

s obrazem dilatační kardiomyopatie a nově vzniklým srdečním selháním navazujícím na prodělanou virovou infekci. U 624 nemocných byla takto zjištěna dilatační kardiomyopatie a u 149 jedinců akutní myokarditis. Jednalo se o nemocné širokého věkového spektra, zahrnujícího od novorozenců přes dospívající děti až po dospělé. Dospělí jedinci tvořili pouze 20% celé zkoumané populace. Vzorky EMB byly vyšetřeny metodou PCR na přítomnost frekventně se vyskytujících kardiotropních virů: herpetických virů, enterovirů, adenovirů, parvoviru B19, respiračně syncytiálního viru a viru influenzy A. Pozitivní nález virového genomu v myokardu byl přítomen u 38% pacientů s myokarditidou a u 20% pacientů s dilatační kardiomyopatií. Nejčastěji se vyskytujícím patogenem byly v této práci adenoviry a enteroviry.

V jiné studii byla Kühlem et al. při vyšetření 245 dospělých jedinců s dilatační kardiomyopatií popsána ještě podstatně vyšší prevalence virových genomů v myokardu (35). Virové agens bylo nalezeno u 67,4% nemocných. Většinu pozitivních nálezů představoval parvovirus B19, častá byla i přítomnost lidského herpetického viru 6 a také současný nález dvou virových genomů u jednoho nemocného.

Perzistence virového agens v myokardu jedinců s dilatační kardiomyopatií je dle řady prací spojena s horší prognózou nemocných (36,37). Existují ovšem i studie, které toto popírají a přítomnosti virového genomu v srdečním svaly nepřipisují funkční ani prognostický význam (27,38). Interpretace pozitivních nálezů infekčních agens v myokardu, jmenovitě virových, tedy není jednoznačná. Samotná přítomnost virových agens v myokardu zřejmě nemusí vždy znamenat kauzální souvislost s morfologicko-funkčním obrazem dilatace a systolické dysfunkce LK. Například herpetické viry přetrvávají v organismu po celý život a dosud neexistuje spolehlivý laboratorní ukazatel jejich aktivity. V případě infekce HHV-6 (lidský herpetický virus 6) se může jednat o genom integrovaný v hostitelské buňce (39). Genom řady virů byl navíc

prokázán i u jiných typů kardiomyopatií, u nichž infekční, resp. zánětlivý původ není předpokládán, např. u hypertrofické kardiomyopatie(40,41).

Další metodou, která se využívá v detekci virových mikroorganismů, představuje elektronová mikroskopie. Jedná se o metodu, která se používá k vyšetření různých typů tkání a tekutin, vyšetření srdeční tkáně se v literárních pramenech obvykle nepopisuje a nejsou známy práce systematicky hodnotící přínos elektronové mikroskopie v diagnostice zánětlivé kardiomyopatie. Vyšetření virových agens se zakládá především na hodnocení tvarů, velikosti a dalších morfologických atributů virových částic, na základě kterých lze tyto mikroorganismy řadit do jednotlivých čeledí.

Tato diagnostická metoda má ve srovnání s PCR určitá specifika. Mezi hlavní výhody tohoto vyšetření patří především to, že se neomezuje cíleně jen na detekci předem stanoveného, a tudíž omezeného, množství mikroorganismů a navíc není limitována určitým antigenním vybavením mikroorganismů, a tak může danou virovou resp. nevirovou částici detekovat i v případě, že u mikroorganismu dojde v průběhu vývoje ke změně antigenní výbavy. Na druhé straně mezi hlavní limitace tohoto vyšetření patří to, že mikrobiální agens bývá ve vyšetřovaném vzorku diagnostikováno pouze, pokud se ve vzorku vyskytuje v dostatečné koncentraci (většinou více než 10^5 /ml) a dále, že tato metodika závisí výrazně na zkušenostech vyšetřujícího (42).

Znalostí o prevalenci nevirových kardiotropních mikrobiálních agens v myokardu jedinců s klinickým obrazem myokarditis či ZKMP je podstatně méně. Nejvíce zkoumanou nevirovou kardiomyopatií v Latinské Americe je Chagasova choroba. Tato choroba postihuje okolo 8 milionů obyvatel Jižní Ameriky a je způsobena Trypanosomou cruzi (43).

V našich klimatických podmínkách bylo dosud publikováno jen minimální množství biopicky zaměřených prací zkoumajících přítomnost nevirových mikrobiálních agens v myokardu jedinců s dilatační kardiomyopatií. V jedné z recentních prací zabývajících se výskytem borreliové infekce

v myokardu by se genom této spirochety měl vyskytovat u méně než 1% nemocných s DKMP (44). V práci Suedkampa et al. provedené u 68 pacientů s DKMP podstupující srdeční transplantaci pro terminální fázi srdečního selhání nebyla *Borrelie burgdorferi* v EMB dokonce zjištěna u žádného z nich (45).

1.6 Endomyokardiální biopsií řízená léčba ZKMP

Komplexní diagnostika ZKMP založená na imunohistochemickém, histopatologickém a mikrobiologickém vyšetření EMB je nutná nejen pro stanovení správné diagnózy, ale i pro možnost zahájení cílené léčby. Je známo, že u nemocných se ZKMP a EF LK pod 35% dochází při konvenční léčbě srdečního selhání k normalizaci systolické funkce LK jen ve 25% případů. U 50% jedinců dysfunkce LK přetrvává a v 25% tito nemocní umírají či podstupují transplantaci srdce (46).

Výsledky specifické léčby ZKMP vedené podle výsledků komplexně zpracovaných vzorků EMB byly poprvé prezentovány Wojniczem et al. v roce 2001 (47). Tito polští autoři studovali 202 jedinců s obrazem dilatační kardiomyopatie a anamnézou kardiální insuficience delší než 6 měsíců, z nichž 84 vykazovalo při imunohistochemickém vyšetření vzorků EMB zvýšenou expresi HLA antigenů svědčících pro přítomnost zánětu srdečního svalu. Těchto 84 nemocných bylo randomizováno k léčbě placebem nebo kombinované imunosupresivní terapii prednisonem s azathioprinem. V průběhu 2 letého sledování nebyl sice mezi oběma skupinami zjištěn rozdíl v celkové mortalitě, u nemocných léčených imunosupresí však došlo k významnému zlepšení EF LK, zmenšení rozměrů LK a zlepšení funkční třídy NYHA.

V práci italských autorů Frustacchio et al. byl retrospektivně analyzován efekt kombinované imunosupresivní léčby u 41 nemocných s dilatační kardiomyopatií a srdečním selháním progredujícím i přes optimální konvenční farmakoterapii (48). U téměř všech jedinců, u kterých v průběhu léčby došlo k signifikantnímu zlepšení EF LK, byla před zahájením terapie imunosupresivy přítomna pozitivita protilátek proti srdečnímu svalu v séru a jen v malém procentu (15%) byl u nich pomocí PCR detekován genom kardiotropních virů v myokardu.

Oproti tomu nemocní, kteří z imunosupresivní terapie neprofitovali, nevykazovali před zahájením léčby pozitivitu protilátek proti myokardu v žádném případě a u 85% z nich byla PCR detekována perzistující infekce některým z kardiotropních virů.

Na základě těchto poznatků pak stejní autoři iniciovali prospektivní randomizovanou studii imunosupresivní léčby biopticky verifikované ZKMP (49). Populaci studie tvořilo 85 nemocných s dilatační kardiomyopatií, EF LK < 45% a anamnézou srdečního selhání delší než 6 měsíců, u kterých byl při histologickém a imunohistochemickém vyšetření EMB potvrzen zánět myokardu definovaný přítomností více než 14 leukocytů/mm² resp. více než 2 CD3 pozitivních lymfocytů / zorné pole a zároveň nebyla metodou PCR zjištěna přítomnost většiny kardiotropních virů (specificky genomu herpetických virů, parvoviru B19, adenovirů, virů influenzy A a B a virů hepatitidy B a C). Nemocní byli randomizováni v poměru 1:1 k 6 měsíců trvající imunosupresivní léčbě založené na kombinovaném užívání prednisonu a azathioprinu nebo byli nadále léčeni konvenční terapií srdečního selhání. Po 6 měsících došlo ve skupině léčené imunosupresivy k signifikantnímu zlepšení EF LK, zmenšení rozměrů a objemů LK a zlepšení symptomatologie srdečního selhání hodnoceného NYHA klasifikací. V kontrolní skupině nedošlo k zlepšení systolické funkce LK či zmenšení rozměrů a objemů LK, zhoršila se také symptomatologie nemocných. Při provedení kontrolní EMB za 6 měsíců od zahájení studie došlo ve skupině léčené kombinovanou imunosupresí k regresi zánětlivého postižení myokardu, kdežto u nemocných s konvenční léčbou srdečního selhání známky chronické myokarditidy přetrvávaly. U žádného z nemocných nemusela být kombinovaná imunosuprese vysazena pro lékovou toxicitu a pouze u 6 nemocných v této skupině došlo k nárůstu tělesné hmotnosti vyžadující navýšení diuretické terapie, či ke zvýšení hladin glykémie vedoucí k nasazení perorálních antidiabetik resp. zahájení insulinoterapie.

Jinou možností imunomodulační léčby je podávání imunoglobulinů IgG, které vede k ovlivnění imunitních reakcí souvisejících s aktivací komplementu. Přesný mechanismus účinku podávaných imunoglobulinů není znám. Předpokládá se především ovlivnění blokády Fc receptorů a modulace produkce cytokinů (50). Výsledky studií hodnotících efekt tohoto typu imunomodulační léčby jsou zatím nejednoznačné. Gullestad et al. zjistili u pacientů se systolickou dysfunkcí levé komory ischemické etiologie a u nemocných s neischemickou dilatační kardiomyopatií pozitivní vliv léčby imunoglobuliny na zlepšení ejekční frakce levé komory a na zmírnění symptomatologie srdečních selhání (51). Naopak McNamara et al. v podobně designované studii efekt léčby imunoglobuliny na zlepšení EF LK neprokázali (52). Zásadní rozdíl v efektu podané imunomodulační léčby na vývoj systolické funkce LK byl nejspíše způsoben rozdílnou délkou trvání srdečního selhání před zahájením léčby intravenózní léčby imunoglobuliny. Efekt této terapie byl totiž pozorován u nemocných s délkou srdečního selhání nad 6 měsíců, což bylo následně potvrzeno i při provedení metaanalýzy studií zkoumajících vliv imunosupresivní léčby v závislosti na délce anamnézy srdečního selhání (53).

Jiná situace nastává v případě, že ve vzorcích EMB je prokázána perzistující přítomnost kardiotropního infekčního agens. V případě průkazu virového genomu v myokardu se na prvním místě nabízí cílená léčba antivirotiky. Je zajímavé, že doposud bylo na toto téma publikováno jen minimum prací, a to výhradně v podobě kazuistických sdělení (54, 55,56). Svou úlohu zde jistě sehrává skutečnost, že terapie specifickým antivirotikem je v současnosti možná jen proti velice omezenému spektru virových patogenů. Pokud je biopticky zjištěna přítomnost nevirového infekčního agens, např. bakteriálního či spirochety, logickou by se jevila léčba antibiotická. I zde je literární evidence minimální (57,58). Význam podávání antibiotické léčby u nemocných s DKMP a pozitivní sérologií borreliózy prokázali rakouští autoři. Ze 46 jedinců s DKMP prokázali pozitivitu protilátek u 11 z nich a ty poté léčili intravenózně ceftriaxonem po dobu 14

dní. Při této léčbě zjistili po 6 měsících normalizaci systolické funkce LK u 6 z nich a zlepšení EF LK u dalších 3 jedinců. V souhrnu tedy došlo k normalizaci či zlepšení EF LK u 82% nemocných cíleně léčených antibiotiky, což bylo v kontrastu se skupinou nemocných DKMP bez pozitivní sérologie lymeské borreliózy léčených pouze konvenční terapií srdečního selhání, kde takovéto zlepšení bylo pozorováno jen u 26% jedinců (59).

Jinou možností léčby ZKMP charakterizované perzistující virovou infekcí je snaha o potenciaci imunomodulačních mechanismů, které vedou k eliminaci viru z myokardu. Kühl et al. podávali interferon β po dobu 24 týdnů u 22 pacientů s dilatační kardiomyopatií, u kterých byl v EMB pomocí PCR prokázán adenovirový či enterovirový genom (60). Jednalo se o jedince s anamnézou srdečního selhání delší než 1 rok, u kterých i přes adekvátní léčbu srdečního selhání nedošlo k zlepšení systolické funkce LK. Při léčbě interferonem β bylo zaznamenáno významné zmenšení end-diastolického rozměru LK, zvýšila se EF LK a došlo i ke zlepšení v NYHA klasifikaci. Velice zajímavou skutečností je, že při kontrolní EMB nebyl prokázán virový genom ani u jednoho nemocného. Léčba interferonem β vedla sice poměrně často k navození flu-like syndromu v prvních týdnech jeho podávání, ale tyto nežádoucí účinky odezněly buď spontánně, nebo při terapii nesteroidními antirevmatiky a jiné vážnější nežádoucí účinky zaznamenány nebyly.

Výsledky výše uvedených studií tedy souhrnně naznačují efektivitu imunosupresivní terapie bioticky verifikované ZKMP bez současného průkazu perzistující virové či jiné infekce v myokardu. Naopak v případě přetrvávající virové infekce se jako slibná jeví imunomodulační léčba interferonem β . Alternativou by mohla být terapie antivirotiky. Pro tu, stejně jako pro cílenou léčbu nevirových infekčních agens antibiotiky, však doposud neexistují údaje ze studií provedených na větších souborech nemocných.

I nedávno publikovaná společná doporučení Evropské a Americké kardiologické společnosti považují provedení EMB u jedinců s nově vzniklým srdečním selháním, trvajícím méně než 3 měsíce a nereagujícího na konvenční léčbu v průběhu 1 až 2 týdnů, za jasně indikované (úroveň doporučení IB), při anamnéze nad 3 měsíce pak za spíše doporučované (úroveň doporučení IIa C) (61).

2. Cíle a hypotézy

Cíl číslo 1:

Zjistit u nemocných s dilatační kardiomyopatií nejasné etiologie a anamnézou srdečního selhání kratší než 1 rok prevalenci ZKMP, a to na základě komplexního vyšetření EMB s hodnocením:

- přítomnosti imunohistochemických známek zánětu myokardu;
- přítomnosti genomu řady kardiotropních virů (herpetických virů, enterovirů, adenovirů a parvoviru B 19) a genomu *Borrelia burgdorferi*;
- elektronmikroskopické přítomnosti mikrobiálních agens, a to především virových mikroorganismů.

Hypotéza číslo 1:

Jedinci se ZKMP představují významnou podskupinu nemocných s morfologicko-funkčním obrazem dilatační kardiomyopatie. Přítomnost virového agens v myokardu je častá, virová agens se navíc nemusí vyskytovat v myokardu izolovaně, kdy lze nezdědká prokázat pozitivitu dvou i více virových patogenů u jednoho jedince. Česká republika je vysoce endemickou oblastí lymeské borreliózy a *Borrelia burgdorferi* se tak může významnou měrou podílet na etiologii ZKMP. Elektronová mikroskopie může být přínosná v diagnostice ZKMP, protože se na rozdíl od PCR neomezuje na detekci jen předem určených mikrobiálních agens.

Cíl číslo 2:

Zhodnotit význam sérologického vyšetření protilátek proti kardiotropním virům a *Borrelia burgdorferi* v diagnostice biopticky zjištěné ZKMP.

Hypotéza číslo 2:

Pozitivní nález protilátek v třídách IgM a IgG je užitečný pro diagnostiku a hodnocení aktivity virového, resp. nevirového infekčního onemocnění. Sérologické vyšetření protilátek proti kardiotropním virům a *Borrelia burgdorferi* může být tedy přínosné při hodnocení významu perzistence virových a dalších infekčních agens detekovaných v EMB.

Cíl číslo 3:

Zhodnotit, zdali cílená léčba vede ke zlepšení strukturálních změn a systolické funkce LK a zlepšení symptomatologie srdečního selhání u nemocných s biopticky verifikovanou ZKMP.

Hypotéza číslo 3:

Borrelia burgdorferi je považována za primární patogen. V případě průkazu této spirochety v EMB povede cílená léčba antibiotiky k významnému zlepšení morfologických a funkčních parametrů LK a ke zmírnění symptomatologie srdečního selhání.

Perzistence virů v myokardu může souviset s rozvojem ZKMP a cílená léčba antivirotiky by tedy mohla vést k příznivému ovlivnění parametrů LK a ke zmírnění obtíží nemocných hodnocených NYHA klasifikací.

Kombinovaná imunosupresivní léčba u nemocných s průkazem zánětlivého postižení myokardu a absencí průkazu mikrobiálního agens v EMB a symptomatologií srdečního selhání delší než 6 měsíců může podle dosud provedených studií vést ke zlepšení morfologických i funkčních parametrů LK a ke zmírnění symptomatiky nemocných. Domníváme se, že podání kombinované imunosupresivní léčby skupině nemocných s průkazem zánětlivého postižení myokardu a absencí průkazu mikrobiálního agens, kteří budou mít dobu symptomů srdečního selhání kratší než 6 měsíců, by mohla být tato léčba rovněž účinná, neboť časná imunosupresivní terapie by u těchto jedinců mohla efektivněji zabránit progresi negativní srdeční remodelace a vzniku irreverzibilních změn myokardu především ve smyslu intersticiální fibrózy.

3. Metodika

3.1 Soubor nemocných

Soubor nemocných tvoří 56 jedinců (26 žen) průměrného věku 52 ± 10 let, kteří byli na II. interní klinice kardiologie a angiologie 1. LF UK a Všeobecné fakultní nemocnice hospitalizováni od 1.1.2007 do 31.12.2009 pro nově vzniklé srdeční selhání nejasné etiologie. Jednalo se o nemocné se symptomy srdečního selhání minimálně II. třídy dle NYHA klasifikace, trvajících maximálně 12 měsíců, systolickou dysfunkcí LK definovanou $EF < 40\%$, která přetrvávala i po nejméně týdenní standardní léčbě srdečního selhání. Za standardní léčbu byla považována terapie ACE inhibitory, resp. při jejich intoleranci sartany, dále betablokátory a při $EF < 35\%$ a symptomatice NYHA III. či IV. třídy spironolaktonem. Jedincům s projevy městnavé srdeční slabosti byla podávána kličková diuretika. U všech nemocných byly vyloučeny zjevné patologie, které by mohly vysvětlit systolickou dysfunkci LK. Jednalo se o více než 50% stenózu na jedné z hlavních větví věnčitých tepen dle koronarografického vyšetření, významnou chlopenní vadu (mimo funkční mitrální regurgitace), dekompenzovanou arteriální hypertenzi ($TK \geq 180/110$ mmHg), supraventrikulární tachyarytmii (především fibrilaci síní s rychlou odpovědí komor), neléčenou thyreopatii, anamnézu etylismu, kardiotoxické onkologické léčby a familiární formu dilatační kardiomyopatie.

3.2 Elektrokardiografie

U všech jedinců bylo při přijetí provedeno standardní 12 svodové EKG. Hodnocenými parametry byly charakter srdečního rytmu, absence či průkaz kompletní blokády levého raménka Tawarova, denivelace ST úseků o více než 1 mm a přítomnost inverzí vln T.

3.3 Echokardiografie

Echokardiografická vyšetření byla prováděna v den provedení EMB a dále za 1, 3, 6, 12 měsíců. Tloušťka mezikomového septa (IVS), zadní stěny LK (zsLK), end-diastolický (LKd) a end-systolický rozměr (LKs) LK byly měřeny podle doporučení Americké echokardiografické společnosti způsobem M v parasternální projekci na dlouhou osu LK (62) (Obrázek číslo 1). Za normální byly považovány hodnoty $LKd \leq 60\text{mm}$ a $LKs \leq 38\text{ mm}$ (63). Index sfericity LK byl hodnocen v apikální čtyřdutinové projekci jako poměr longitudinálního a transversálního rozměru LK v end-diastole (64) (Obrázek číslo 2). End-diastolický (EDV) a end-systolický (ESV) objem LK byly stanoveny Simpsonovou metodou mnoha disků v apikální čtyřdutinové projekci a pomocí nich byla následně spočtena EF LK (65) (Obrázek číslo 3). Za normální byly považovány hodnoty $EDV \leq 155\text{ ml}$, $ESV \leq 58\text{ ml}$ a $EF \geq 55\%$ (63). Typ diastolické funkce, resp. dysfunkce LK byl stanoven na základě kombinovaného hodnocení parametrů transmitrálního toku (Obrázek číslo 4), toku v plicní žíle a pulzní tkáňové dopplerovské echokardiografie: normální typ plnění, lehká diastolická dysfunkce charakteru izolované poruchy relaxace LK, středně těžká diastolická dysfunkce (tzv. pseudonormalizace plnění) a těžký, restriktivní typ diastolické dysfunkce (66).

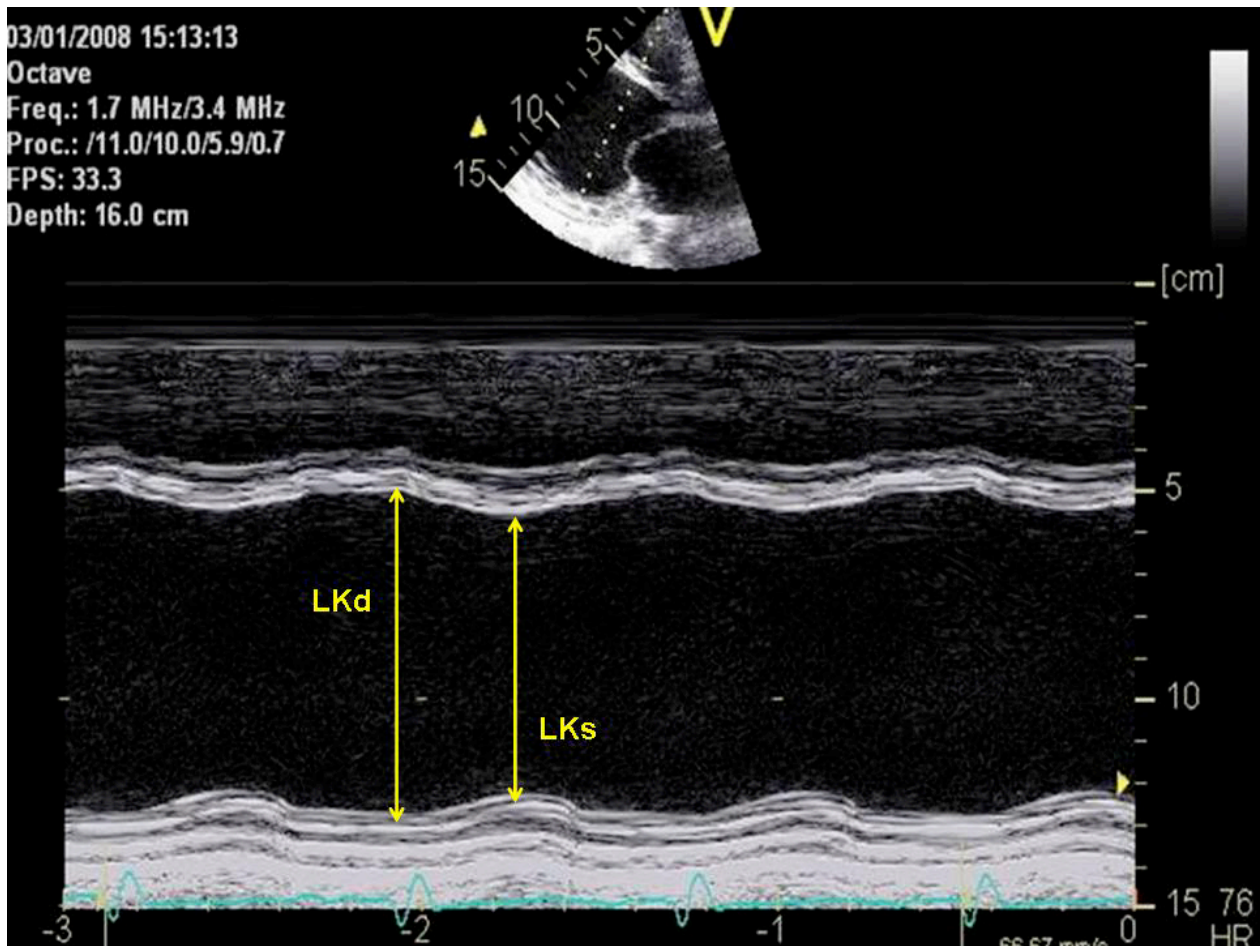
Rozměr levé síně (LS) byl měřen podle doporučení Americké echokardiografické společnosti způsobem M v parasternální projekci na dlouhou osu LK (62). K hodnocení objemu levé síně (LSV) bylo využito biplanární Simpsonovy metody mnoha disků v apikální čtyřdutinové a dvoudutinové projekci (67). Dilatace LS byla definována hodnotami $LS > 40\text{mm}$, resp. $LSV > 28\text{ml/m}^2$ (63).

Významnost funkční mitrální regurgitace byla posuzována semikvantitativně pomocí čtyřstupňové škály (stupně 1+ až 4+) na základě komplexního hodnocení řady dopplerovských parametrů (68). Za hemodynamicky významnou byla považována regurgitace nejméně stupně 3+ (Obrázek číslo 5).

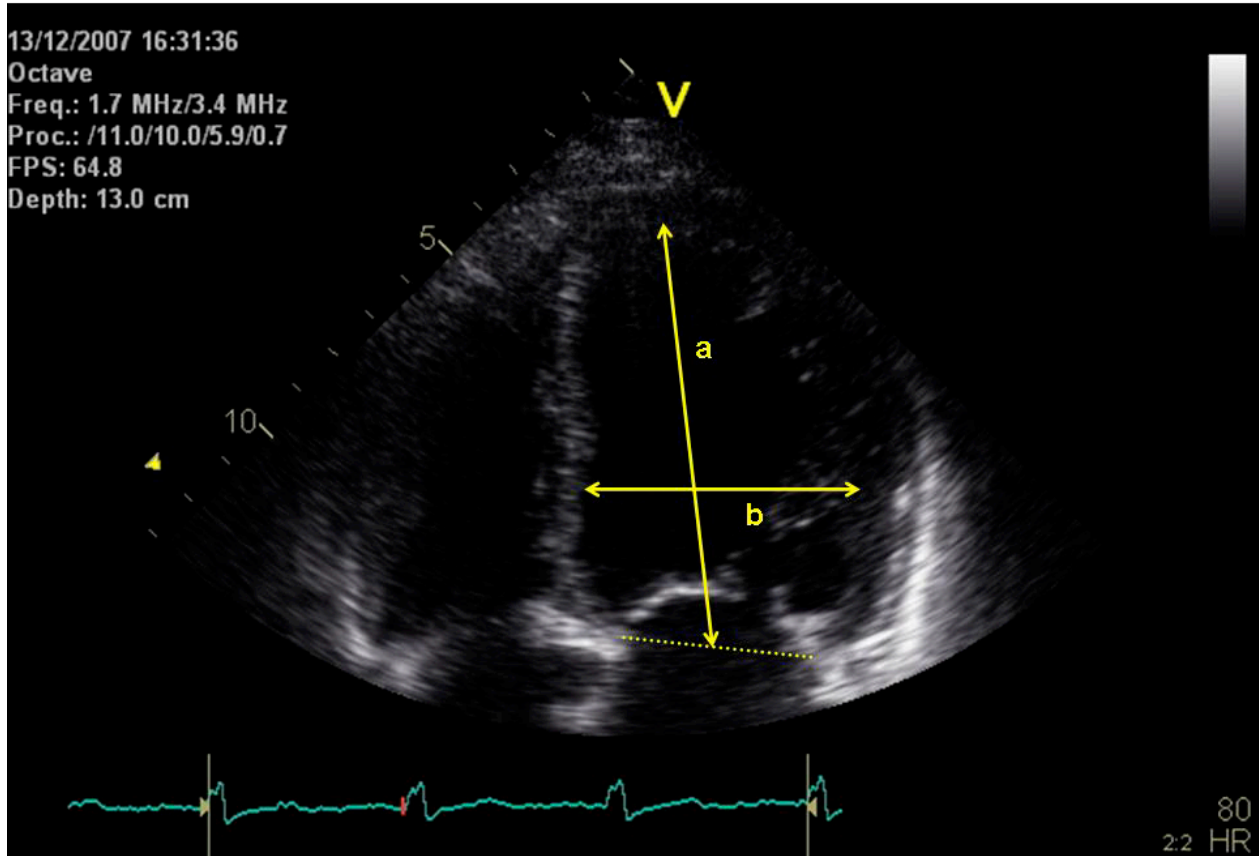
End-diastolický rozměr pravé komory (PK) a maximální rozměr pravé síně (PS) byly měřeny v apikální čtyřdutinové projekci (69). Za normální byly považovány hodnoty $PK \leq 42\text{mm}$ a $PS \leq 44\text{mm}$ (70). Systolická funkce pravé komory byla posuzována podle amplitudy pohybu volného okraje trikuspidálního anulu (TAPSE) měřené způsobem M v apikální čtyřdutinové projekci (71). Za normální systolickou funkci PK byly považovány hodnoty $TAPSE \geq 17\text{mm}$ (70).

Systolický tlak v plicnici (PASP) byl odhadován na základě hodnocení vrcholového gradientu trysky trikuspidální regurgitace s připočtením odhadovaného tlaku v pravé síni (72). K odhadu tlaku v pravé síni bylo využíváno hodnocení respirační variability rozměru dolní duté žíly, prováděné v subkostální projekci (73). Přítomnost plicní hypertenze byla definována hodnotou $PASP \geq 40\text{mmHg}$ (70).

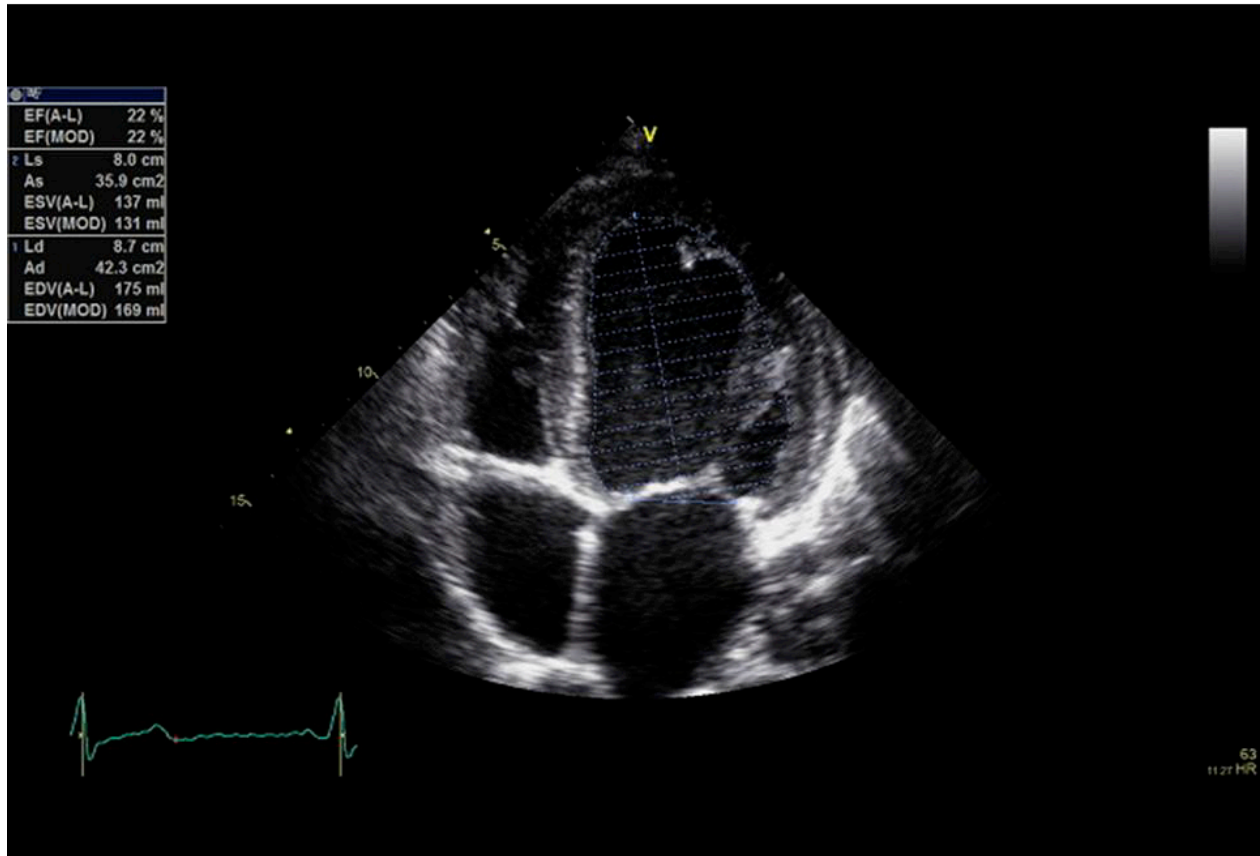
Obrázek číslo 1 Záznam M-mode z parasternální projekce na dlouhou osu (LKd – end-diastolický rozměr levé komory, LKs – end-systolický rozměr levé komory)



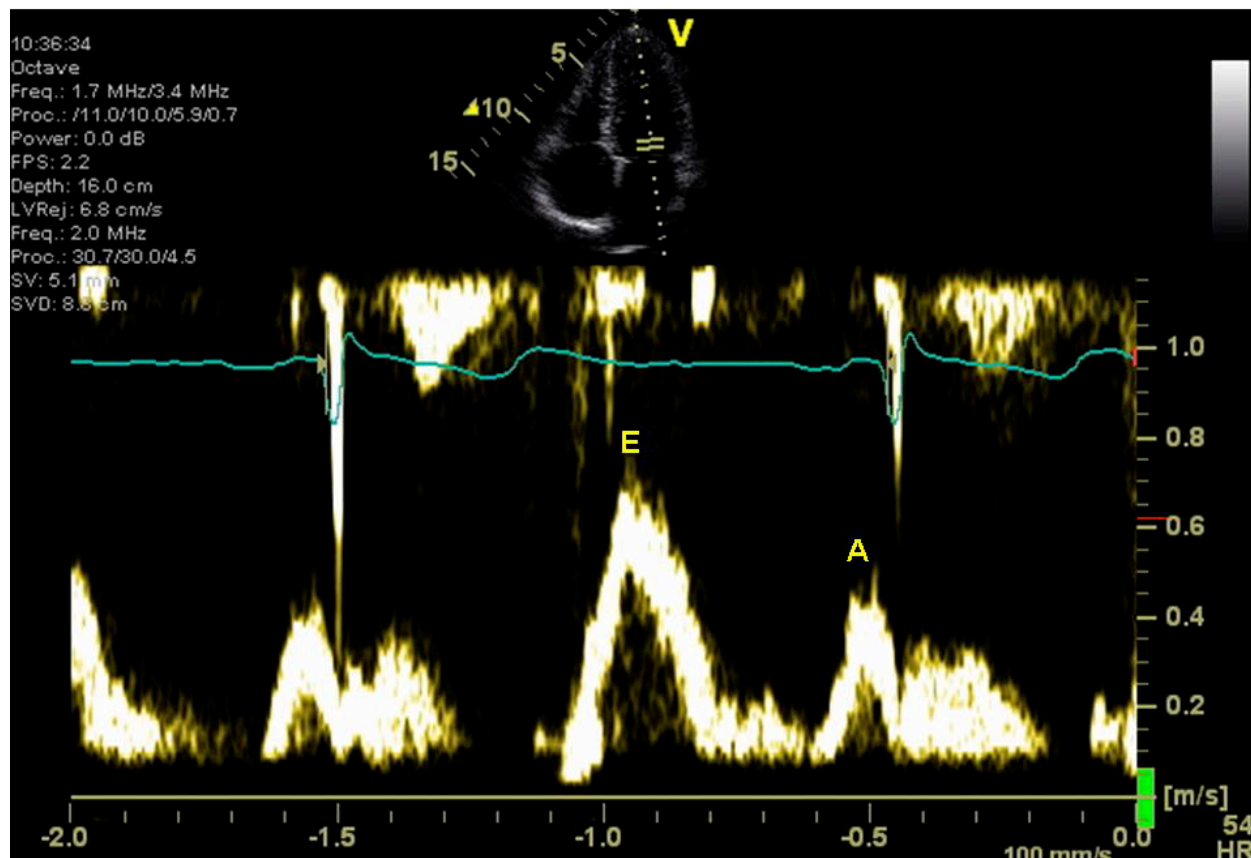
Obrázek číslo 2 Ukázka stanovení indexu sfericity v apikální čtyřdutinové projekci (index sfericity dán poměrem rozměrů levé komory v dlouhé a krátké ose; index sfericity = a/b)



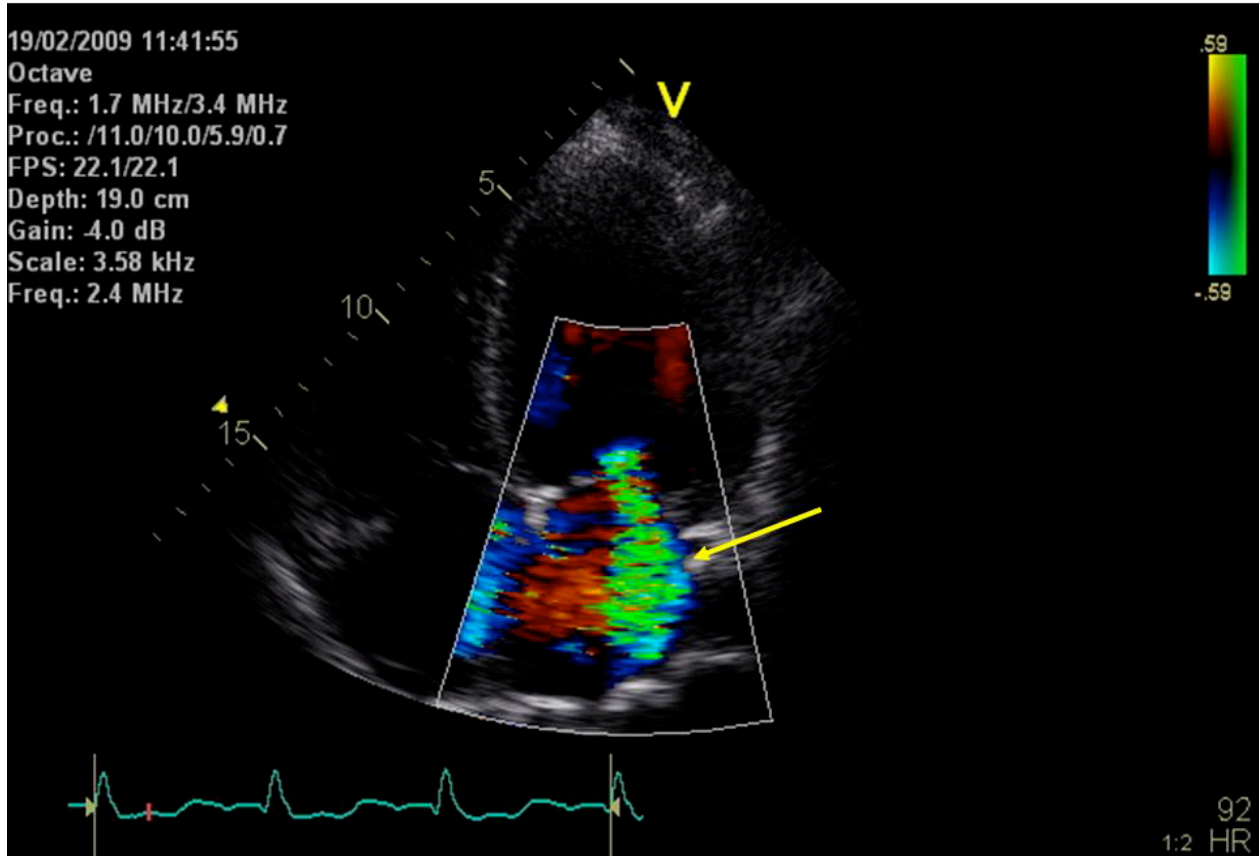
Obrázek číslo 3 Ukázka měření ejekční frakce levé komory v apikální čtyřdutinové projekci



Obrázek číslo 4 Pulzně dopplerovský záznam transmitrálního průtoku získaný z apikální čtyřdutinové projekce (E – vlna časného transmitrálního průtoku, A – vlna pozdního transmitrálního průtoku)



Obrázek číslo 5 Ukázka významné mitrální regurgitace zachycené barevným dopplerovským mapováním v apikální čtyřdutinové projekci



3.4 Laboratorní vyšetření krve

Při přijetí k hospitalizaci byly u všech nemocných laboratorně stanovovány základní parametry indikující systémovou zánětlivou odpověď (hladina leukocytů v krevním obraze, C-reaktivní protein metodou turbidimetrie), hladina B-natriuretického peptidu (BNP) (chemiluminiscenční metoda), hodnota troponinu I (chemiluminiscenční metoda) a sérologické vyšetření protilátek v třídách IgM a IgG proti borreliím (ELISA, konfirmace pozitivních nálezů metodou Western blot) a vyšetření protilátek proti HIV 1,2 (microparticle enzyme immunoassay) a proti virům hepatitid B a C (microparticle enzyme immunoassay). U prvních 36 jedinců bylo též provedeno sérologické vyšetření protilátek v třídách IgM a IgG proti adenovirům (ADV) (komplement fixační reakce), parvoviru B19 (ELISA), enterovirům (echoviry a coxackie viry; komplement fixační reakce) a proti následujícím herpetickým virům: lidský herpes virus 6 (HHV 6) metodou imunofluorescence, herpes simplex virus 1 (HSV 1), virus Epsteina a Barrové (EBV) a cytomegaloviru (CMV) metodou ELISA.

3.5 Endomyokardiální biopsie

Všichni nemocní zařazení do sledování podepsali informovaný souhlas s provedením EMB. Endomyokardiální biopsie byla prováděna z pravé komory cestou vena jugularis interna či z levé komory cestou arteria femoralis pomocí standardně vyráběného bioptomu (Cordis©). Rozhodnutí o provedení EMB z levé či pravé komory záviselo na zvyklosti katetrizujícího lékaře. Cílovou oblastí pro odběr vzorků srdeční svaloviny byla vždy oblast interventrikulárního septa. U každého jedince bylo EMB získáno 8-9 vzorků srdeční tkáně o průměrné velikosti 1-2 mm³. Dva vzorky byly ukládány do roztoku 10% formolu a následně vyšetřeny histologicky

a imunohistochemicky na Ústavu patologie 1. LF UK a Všeobecné fakultní nemocnice. Histologické hodnocení bylo prováděno na základě Dallaských kritérií, kdy za pozitivní nález přítomnosti zánětu myokardu byl považován průkaz zánětlivé infiltrace myokardu s přítomností degenerativních změn či nekrotizace kardiomyocytů (24). Imunohistochemické vyšetření bylo založeno na průkazu CD znaků lymfocytů a makrofágů (74). Vyšetřovány byly znaky CD3 (typický pro průkaz T lymfocytů) a CD 68 (typický pro průkaz makrofágů). Nález byl hodnocen jako pozitivní pro přítomnost myokardiálního zánětu v případě průkazu minimálně 5 makrofágů či 7 lymfocytů na mm² (31). Jeden vzorek EMB byl odeslán do Státního zdravotního ústavu na elektronmikroskopické vyšetření cílené na přítomnost virů a u 5 nemocných ještě 1 vzorek EMB cílený na přítomnost Borrelií. Vzorky EMB byly transportovány ve fyziologickém roztoku a v laboratoři byla jeho elektronmikroskopická analýza založena především na tzv. negativním barvení, při kterém se ke zlepšení vizualizace mikrobiálních agens používají soli těžkých kovů jako uranyl acetát či amonium molybdát (75). Dalších pět vzorků EMB bylo vyšetřeno metodou PCR pro průkaz přítomnosti genomu DNA virů a Borrelií nebo reverzní PCR pro průkaz přítomnosti RNA virů. Tyto vzorky biotického materiálu byly transportovány do příslušných laboratoří Státního zdravotního ústavu také ve fyziologickém roztoku. Vyšetření PCR bylo cílené na průkaz genomu herpetických virů (herpes simplex virus 1 a 2, lidský herpes virus 6, virus Epstein-Barr, cytomegalovirus), enterovirů (echoviry a coxsackie typu A a B), adenovirů, parvoviru B19 a *Borrelia burgdorferi*. Pro většinu vyšetřovaných mikrobiálních agens byla dostupná pouze kvalitativní diagnostika (anglicky nested PCR). Kvantitativní PCR vyšetření metodikou tzv. real time PCR bylo dostupné jen u parvovirů a herpetických virů a to jen u limitovaného počtu nemocných, proto jeho výsledky nejsou uvedeny.

3.6 Léčba

Všichni nemocní dostávali optimalizovanou léčbu chronického srdečního selhání podle současných doporučení České kardiologické společnosti (76), ke které byla dle nálezu v EMB v indikovaných případech přidávána léčba cílená.

Nemocní s průkazem genomu *Borrelia burgdorferi* v EMB byli intravenózně léčeni cefalosporinem III. generace, ceftriaxonem, v dávce 2 gramy 1x denně dobu 3 týdnů.

Jedinci, kteří vykazovali v EMB imunohistochemické známky myokarditis a neměli PCR zjištěný genom *Borrelie* či vyšetřovaných kardiotropních virů a negativní byl i nález elektronové mikroskopie, byli perorálně léčeni kombinovanou imunosupresivní terapií složenou z prednisonu a azathioprinu podle schématu užitého Wojniczem et al. (47). Kortikoterapie trvala celkem 90 dní a spočívala v iniciální dávce prednisonu 1 mg/kg podávané po dobu 12 dní a poté postupně snižované o 5 mg každých 5 dnů až na koncovou dávku 0,2 mg/kg. Azathioprin byl podáván 100 dní v dávce 1 mg/kg a tato dávka nebyla během léčby měněna.

Jedinci s bioptickým průkazem virového genomu v EMB byli na základě konzultace s infekcionista cíleně léčeni antivirotiky. Léčba byla u všech nemocných intravenózně (u 1 z nemocných intravenózně jen iniciálně s následnou terapií perorální) a trvala 2 týdny. U jednoho nemocného s pozitivitou genomu HSV 1 a negativním imunohistochemickým vyšetřením byl podáván acyclovir prvních 5 dní intravenózně 500 mg po 8 hodinách a poté 9 dní perorálně 400 mg po 4 hodinách s vynecháním 1 dávky v průběhu noci. Dvěma nemocným s pozitivitou genomu HHV 6 a průkazem zánětlivého poškození myokardu podáván gancyclovir v dávce 5 mg/kg po 12 hodinách. Jeden nemocný s pozitivitou genomů CMV i EBV a negativní imunohistochemií byl také léčen gancyclovirem ve stejné dávce. Všichni nemocní byli zároveň léčeni optimalizovanou léčbou chronického srdečního selhání dle stávajících doporučení.

3.7 Sledování nemocných

Vyšetřovaní jedinci byli po propuštění z diagnostické hospitalizace nadále pravidelně sledováni formou ambulantních kontrol. Ambulantní vyšetření byla prováděna za 1, 3, 6 a 12 měsíců od provedení EMB. V průběhu kontrol byla odebrána anamnéza cílená na symptomy srdečního selhávání, provedeno fyzikální vyšetření, EKG a echokardiografické vyšetření.

3.8 Statistické hodnocení

K statistickému hodnocení bylo použito programu STATISTICA, verze 8 (Statsoft ©). Hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm směrodatná odchylka pro kontinuální proměnné či jako absolutní hodnota a procentuální podíl pro dichotomické proměnné. Párový i nepárový dvouvýběrový Studentův t-test a Mann-Whitneyův U test byly využity ke zhodnocení rozdílů nezávislých proměnných. Závislé proměnné byly hodnoceny pomocí Wilcoxonova testu. Za statisticky významné byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

4. Výsledky

4.1 Klinické, echokardiografické a EKG charakteristiky souboru

Klinické charakteristiky vyšetřovaného souboru jsou uvedeny v Tabulce číslo 2. Většina jedinců byla při přijetí výrazně symptomatická, ve funkční třídě NYHA III a IV (73%). Průměrná délka trvání symptomů srdečního selhání nečinila více než 1,5 měsíce (maximální trvání symptomů bylo 10 měsíců, minimální 14 dnů).

Tabulka číslo 2 Klinická charakteristika souboru

Počet jedinců	56
Věk (roky)	52±10
Muži/ženy	36/20
Výška (cm)	174±10
Váha (kg)	87±19
sTK (mmHg)	117±15
dTK (mmHg)	71±13
TF (min ⁻¹)	81±14
NYHA třída II/III/IV	15/15/26
Trvání symptomů srdečního selhání (měsíce)	1,4±0,9

Parametry zjištěné při vstupním echokardiografickém vyšetření jsou souhrnně uvedeny v Tabulce číslo 3. Objemy a rozměry LK byly v průměru zřetelně zvýšeny, systolická funkce LK byla těžce

snížená. Těžká diastolická dysfunkce (restriktivní typ plnění) byla zjištěna u 20 jedinců (36%), středně významná dysfunkce (tzv. pseudonormalizace plnění) u 11 nemocných (20%). Lehkou diastolickou dysfunkci LK (porucha relaxace) jsme našli u 10 jedinců (18%). U 15 nemocných nebylo možné diastolickou funkci LK vzhledem k nepřítomnosti sinusového rytmu či existenci významné mitrální regurgitace validně posoudit. Dilatace LS byla přítomná u všech nemocných. Významná sekundární mitrální regurgitace (stupně 3+ a 4+) se vyskytovala u 10 jedinců (18% souboru). Plicní hypertenze byla zjištěna u 41% souboru.

Při elektrokardiografickém vyšetření byla při přijetí u 5 jedinců přítomna fibrilace síní s klidnou odpovědí komor (< 100/min), u ostatních vyšetřovaných byl přítomen sinusový rytmus. Blokáda levého raménka Tawarova se vyskytovala u 11 jedinců (20%). Repolarizační změny, tj. deprese úseků ST a inverze vln T, byly zjištěny u 26 nemocných (46%).

Tabulka číslo 3 Echokardiografické parametry souboru

IVS (mm)	10±1
LKd (mm)	68±7
LKs (mm)	59±8
zsLK (mm)	9±1
EDV (ml)	207±70
ESV (ml)	151±55
EF (%)	26±6
Index sfericity LK	1,5±0,2
LS (mm)	51±7
LSV (ml)	105±34
PS (mm)	42±7
PK (mm)	37±6
TAPSE (mm)	17±4
PASP (mmHg)	42±11
Mitrální reg. 1+/2+/3+/4+	23/23/8/2

4.2 Laboratorní vyšetření

Vyšší hladina CRP (> 7 mg/l) byla přítomna u 15 jedinců (27%) a leukocytóza ($> 10 \cdot 10^9/l$) u 11 nemocných (20%).

Normální hladina BNP ≤ 100 ng/l nebyla při přijetí zjištěna u žádného z nemocných. U 25% jedinců se hodnota BNP pohybovala v intervalu 100-400 ng/l a u 75% bylo BNP výrazně zvýšeno nad 400 ng/l.

Troponin I byl zvýšen nad horní hranici normy ($> 0,03 \mu\text{g/l}$) u 77% vyšetřovaných.

4.3 Výsledky endomyokardiální biopsie

Výsledky vyšetření bioptických vzorků metodou PCR shrnuje Tabulka číslo 4. PCR metodou jsme prokázali genom mikrobiálního agens celkem u 32 jedinců (57%). Genom *Borrelia burgdorferi* byl zjištěn u 14 jedinců (25%). Z virových agens byly nejčastěji detekovány parvoviry a to v 39%, dále HHV6 v 18%, enteroviry v 14%, HSV 1 v 5%, CMV v 4%, EBV v 2 %. U 3 nemocných (5%) byly v EMB nalezeny současně genomy 2 mikrobiálních agens a u 4 (7%) genomy 3 mikrobiálních agens. Genomy HSV 2 a adenovirů nebyly zjištěny u žádného z nemocných.

Tabulka číslo 4 Prevalence genomu virů a *Borrelia burgdorferi* v EMB

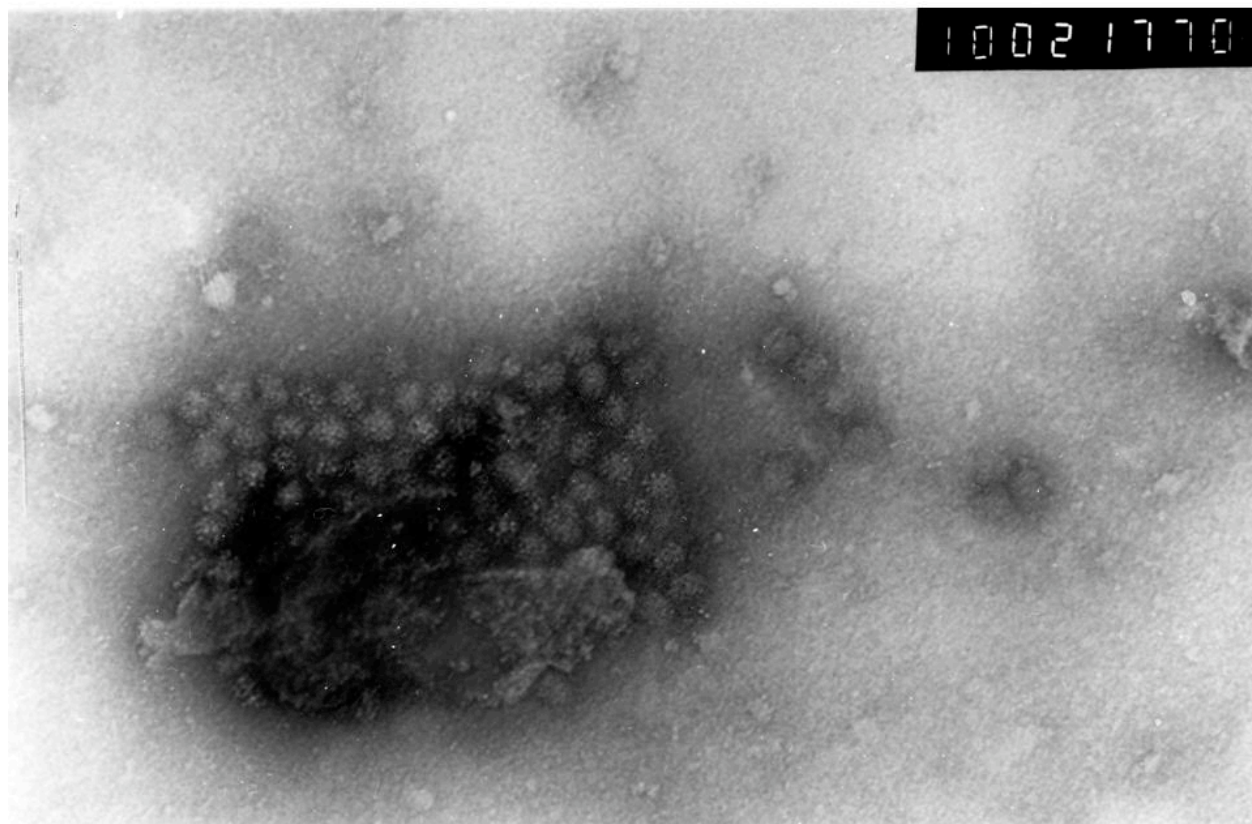
HSV 1	5%
HSV 2	0%
EBV	2%
CMV	4%
HHV 6	18%
Enteroviry	14%
Adenoviry	0%
Parvovirus B19	39%
<i>Borrelia burgdorferi</i>	25%

Elektronová mikroskopie prokázala přítomnost částic mikrobiálních agens u 41 jedinců (73%) (Tabulka číslo 5). V 68 % se jednalo o izolovaný výskyt mikrobů a u 32 % jedinců byla zjištěna 2 respektive 3 mikrobiální agens současně. U necelé poloviny souboru (48%) se jednalo o záchyt částic morfologie virové čeledi herpesviridae, v 23% byly zjištěny částice morfologie virové čeledi parvoviridae (Obrázek číslo 6) , u 13% picornaviridae a u 2% paramyxoviridae. Z nevirových agens jsme detekovali u 4% souboru částice mykoplasm a u 2% *Borrelie burgdorferi* (Obrázek číslo 7). Výskyt *Borrelie burgdorferi* byl takto zjištěn u jednoho nemocného s negativitou PCR vyšetření cíleného na průkaz této spirochety.

Tabulka číslo 5 Prevalence virových čeledí a nevirových agens v EMB zjištěných elektronovou mikroskopií

Herpesviridae	48%
Parvoviridae	23%
Picornaviridae	13%
Paramyxoviridae	2%
Mycoplasma	4%
Borrelia	2%

Obrázek číslo 6 Elektronmikroskopický obraz záchytu virů čeledi parvoviridae v endomyokardiální biopsii



Obrázek číslo 7 Ukázka záchytu *Borrelie burgdorferi* elektronovou mikroskopií v endomyokardiální biopsii

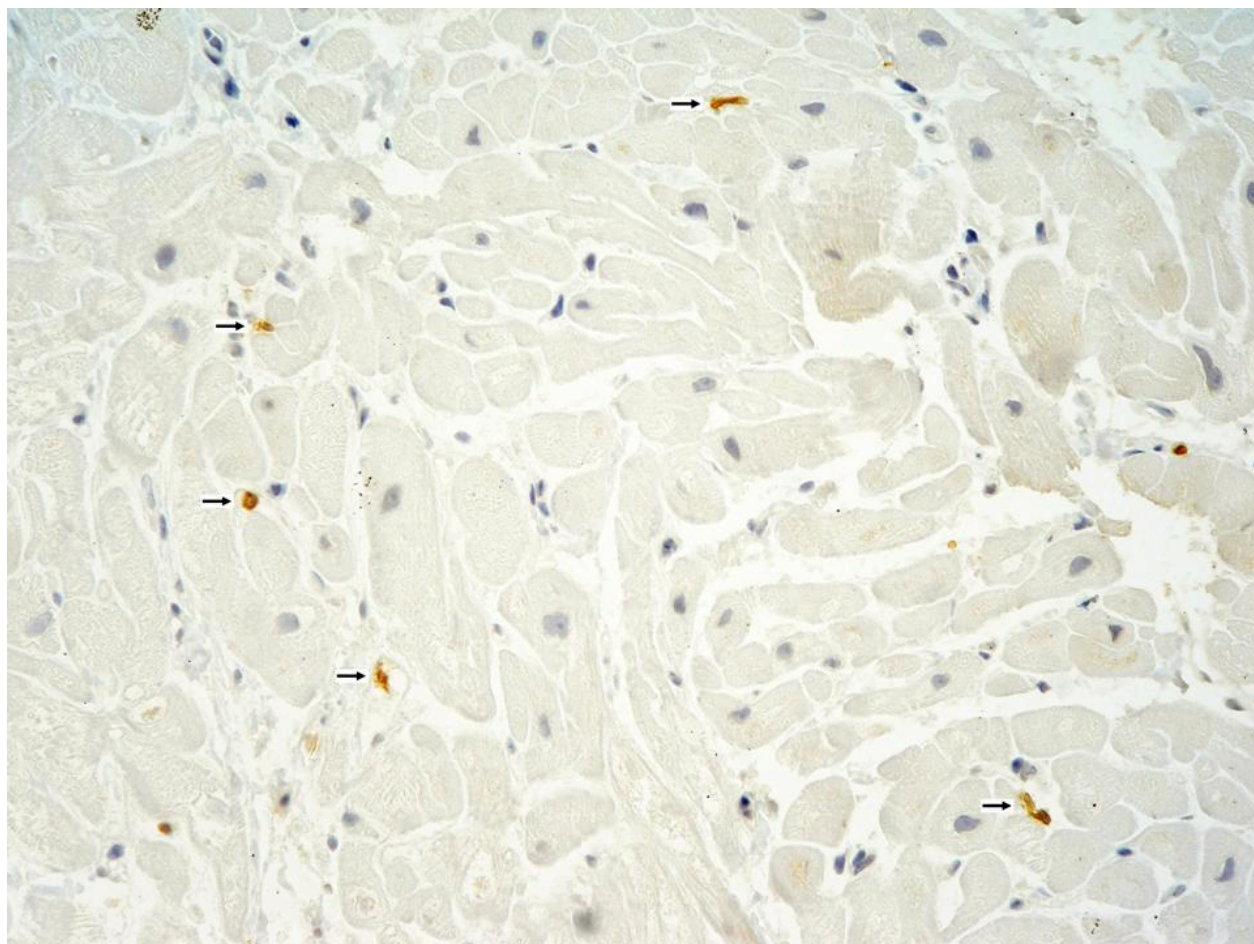


Histopatologické hodnocení EMB na základě Dallaských kritérií neprokázalo známky myokarditidy u žádného z jedinců.

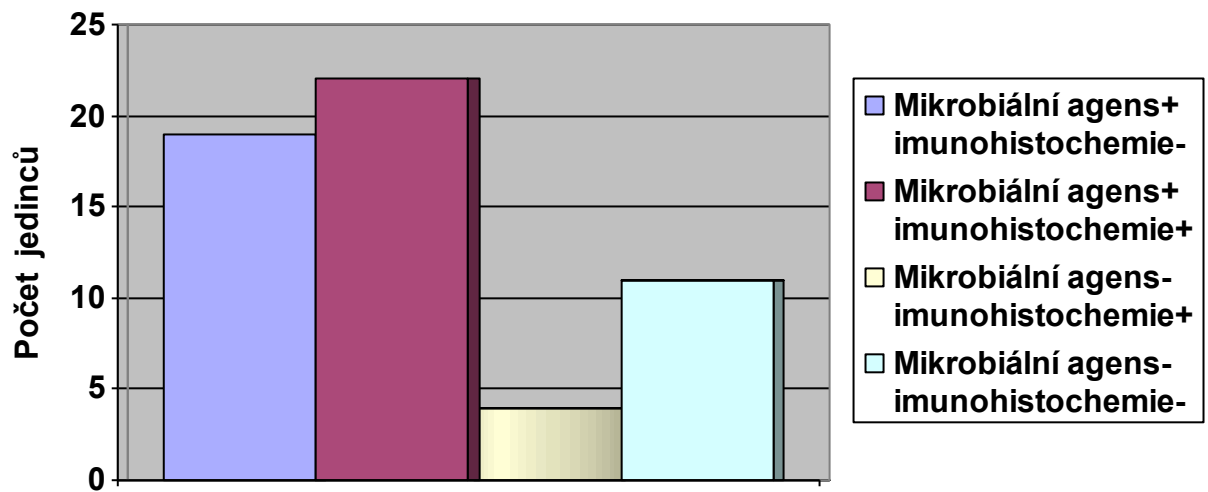
Imunohistochemické vyšetření prokázalo zánětlivé postižení myokardu u 26 jedinců (46%) (Obrázek číslo 8). Pozitivitu imunohistochemického vyšetření doprovázenou současným průkazem genomu mikrobiálního agens či nálezem mikrobiální částice elektronovou mikroskopií v myokardu jsme zjistili u 22 jedinců (39% nemocných). U 4 jedinců (7%) byly patrné imunohistochemické známky zánětu myokardu bez průkazu genomu či částic mikrobiálního agens. U 19 jedinců (34%) byl v myokardu přítomen genom nebo částice mikrobiálních agens, imunohistochemické vyšetření však bylo negativní. U 11 jedinců (20%) jsme neprokázali ani imunohistochemické známky zánětlivé infiltrace myokardu ani mikrobiální agens (Graf číslo 1).

Jednotlivé skupiny nemocných s průkazem genomu *Borrelia burgdorferi*, virového genomu, izolovaného průkazu zánětlivé infiltrace a skupina bez průkazu genomu mikrobiálního agens či známek zánětu myokardu se navzájem statisticky významně nelišily ve většině morfologicko-funkčních parametrů LK ani v tíži symptomatologie srdečního selhání.

Obrázek číslo 8 Imunohistochemický průkaz CD 3 pozitivních lymfocytů v endomyokardiální biopsii



Graf číslo 1 Vztah mezi přítomností mikrobiálního agens v EMB a imunohistochemickým vyšetřením



4.4 Sérologické vyšetření

Sérologickým vyšetřením krve jsme nezjistili pozitivitu IgM protilátek proti žádnému z vyšetřovaných virových či bakteriálních agens. Pozitivita protilátek v třídě IgG proti HSV 1 byla zjištěna u 100% vyšetřených, proti viru EBV u 96%, proti CMV u 68%, proti HHV 6 u 56%, proti echovirům v 67%, proti coxsackie virům v 19%, proti parvoviru B19 v 76% a proti ADV u 19% vyšetřených. U 13% byla přítomna pozitivita IgG protilátek proti Bb. Sérologická vyšetření HIV a hepatitid B a C byla zcela negativní.

Hodnoty senzitivity, specificity, pozitivní prediktivní hodnoty a negativní prediktivní hodnoty stanovení IgG protilátek ve vztahu k průkazu genomu mikrobiálního agens v endomyokardiální biopsii jsou uvedeny v Tabulce číslo 6. Tuto analýzu nebylo možno provést u HSV1, CMV, EBV, enterovirů a adenovirů. Mezi příčiny nemožnosti statistického zpracování patřily následující faktory: nízká prevalence těchto virových agens v EMB (v případě adenoviru nebylo dokonce toto virové agens v EMB ani jednou zachyceno), nedostatečný počet provedených sérologických vyšetření, resp. jejich chybění v případech průkazu mikrobiálního agens v EMB.

Význam sérologického vyšetření protilátek proti virům HIV a hepatitid nemohl být hodnocen, jelikož tyto viry nebyly PCR hodnoceny, resp. nebyly ani detekovány pomocí elektronové mikroskopie.

Tabulka číslo 6 Význam stanovení IgG protilátek pro nález mikrobiálního agens v EMB

	Senzitivita	Specifická	PV+	PV-
Borrelia burgdorferi	36%	95%	71%	82%
Parvovirus B 19	71%	16%	24%	60%
HHV 6	50%	39%	18%	75%

4.5 Cílená léčba řízená nálezem v endomyokardiální biopsii

4.5.1 Nemocní s biotickým průkazem *Borrelia burgdorferi* léčení ceftriaxonem

U 14 nemocných (25% souboru) jsme prokázali genom či částice *Borrelie burgdorferi* v EMB.

U 2 jedinců byla elektronovou mikroskopií navíc zjištěna současně i přítomnost částic mykoplazmat.

Vývoj echokardiografických parametrů při cílené léčbě ceftriaxonem ukazuje Tabulka číslo 7.

Po léčbě antibiotikem došlo během 12 měsíčního sledování k statisticky významnému zmenšení rozměrů a objemů LK. Došlo též k výraznému zlepšení globální systolické funkce LK hodnocené EF LK. Vstupně byla středně významná a těžká diastolická dysfunkce (pseudonormalizované resp. restriktivní plnění) LK přítomná u 8 nemocných a po 12 měsících jen u 2 nemocných; ke zlepšení plnění o minimálně 1 stupeň klasifikace diastolické dysfunkce došlo u 8 nemocných (57% jedinců). Významně se zmenšila mitrální regurgitace. Zaznamenáno bylo i signifikantní zlepšení systolické funkce PK a významný pokles systolického tlaku v plicnici.

Příznivé změny v remodelaci LK byly zjištěny již během prvních 3 měsíců sledování a byly následovány pozitivní remodelací pravostranných srdečních oddílů.

K normalizaci rozměrů LK a její globální systolické funkce došlo konkrétně u 2 nemocných, u zbylých 12 jedinců (včetně 2 jedinců s průkazem nejen *Borrelie burgdorferi*, ale i mykoplazmat) sice nebyla zjištěna úplná normalizace systolické funkce LK, ale u všech z nich došlo ke zlepšení EF doprovázeného zmenšením end-diastolických i end-systolických rozměrů LK.

Výrazně byla také zlepšena symptomatologie srdečního selhání hodnocená NYHA klasifikací ($3,2 \pm 0,9$ vstupně a $1,5 \pm 0,7$ po 12 měsících; $p < 0,05$). Zlepšení v symptomatologii srdečního selhání o minimálně 1 třídu klasifikace NYHA bylo pozorováno u všech nemocných.

Tabulka číslo 7 Vývoj echokardiografických parametrů jedinců s EMB pozitivitou *Borrelia burgdorferi* léčených ceftriaxonem (n=14)

	Vstupně	1. měsíc	3. měsíc	6. měsíc	12. měsíc
IVS (mm)	10±1	10±1	10±1	10±2	10±2
LKd (mm)	66±5	64±5	64±4*	58±7†	59±5*
LKs (mm)	58±7	53±8	50±8*	45±8*	45±6*
zsLK (mm)	10±1	9±2	10±2	9±1	10±1
EDV (ml)	189±37	174±50	165±42*	150±39*	150±47*
ESV (ml)	140±34	117±40	102±33†	84±30†	85±36†
EF (%)	26±6	33±9†	39±12†	45±9†	47±10†
LS (mm)	50±6	49±4	48±5	44±5*	45±4*
LSV (ml)	90±45	104±26	87±34	64±4	70±18
PS (mm)	41±7	40±10	41±8	36±5*	39±3
PK (mm)	36±6	35±6	36±6	32±4*	34±4
TAPSE (mm)	17±3	19±3	20±5*	21±3†	21±3†
PASP (mmHg)	42±10	34±5*	37±8	29±5†	34±4*
Mitrální reg. 1-4+	1,9±0,9	1,5±0,9	1,5±0,8	1,2±0,3*	0,9±0,6†

* p<0,05; † p<0,01 vstupní vyšetření versus jednotlivá následující měření v průběhu 12

měsíčního sledování

4.5.2 Nemocní léčení imunosupresí

Jednalo se o skupinu 4 jedinců, kteří v EMB vykazovali imunohistochemické známky myokardiálního zánětu a neměli pomocí PCR zjištěný genom Borrelie či vyšetřovaných kardiotropních virů a negativní byl i nález v elektronové mikroskopii.

Vývoj echokardiografických parametrů při léčbě kombinovanou imunosupresí shrnuje Tabulka číslo 8. Vzhledem k malé velikosti této skupiny nebylo možno srovnat vývoj těchto parametrů pomocí statistických metod; je však patrné, že v průběhu sledování byly zaznamenány pozitivní změny ve smyslu zmenšení objemů LK a zmenšení velikosti pravé komory a srdečních síní, zlepšení systolické funkce LK i pravé komory, zmenšení tíže funkční mitrální regurgitace i hodnoty systolického tlaku v plicnici. Dále byly zjištěny změny plnění LK, kdy vstupně byla středně významná a těžká diastolická dysfunkce LK přítomná u 3 nemocných a po 12 měsících jen u 1 nemocného; ke zlepšení plnění o minimálně 1 stupeň klasifikace diastolické dysfunkce došlo u 2 nemocných.

U všech nemocných léčených kombinovanou imunosupresí došlo k zmírnění symptomatologie srdečního selhání (vstupně NYHA třída $4,0 \pm 0$, po 12 měsících $1,7 \pm 0,9$).

Tabulka číslo 8 Vývoj echokardiografických parametrů jedinců léčených imunosupresí (n=4)

	Vstupně	1. měsíc	3. měsíc	6. měsíc	12. měsíc
IVS (mm)	9±1	9±1	9±1	10±1	10±1
LKd (mm)	71±3	70±4	73±2	73±1	74±2
LKs (mm)	61±3	61±3	61±2	60±1	63±2
zsLK (mm)	9±1	8±1	9±1	10±1	8±1
EDV (ml)	195±28	199±23	212±19	202±26	170±22
ESV (ml)	155±23	157±11	150±24	142±28	121±29
EF (%)	20±4	21±3	30±6	30±5	30±8
LS (mm)	52±3	59±4	50±4	46±2	46±3
LSV (ml)	116±13	110±10	100±8	73±4	79±4
PS (mm)	45±2	50±7	42±2	37±6	32±4
PK (mm)	41±3	40±3	37±2	36±4	29±1
TAPSE (mm)	15±3	18±2	18±5	18±6	20±8
PASP (mmHg)	53±7	59±6	46±7	37±8	49±6
Mitrální reg. 1-4+	2,9±0,7	2,0±0,3	2,2±0,8	2,3±0,3	2,2±0,3

4.5.3 Nemocní léčení antivirotiky

Čtyři nemocné jsme na základě výsledku EMB cíleně léčili antivirotiky.

Vývoj echokardiografických parametrů v průběhu sledování shrnuje Tabulka číslo 9.

Vzhledem k malé velikosti této skupiny nebylo ani zde možno srovnat vývoj těchto parametrů pomocí statistických metod. K normalizaci end-diastolických a end-systolických rozměrů a normalizaci systolické funkce LK došlo jen u 1 nemocného. Jednalo se o jedince s průkazem genomu HSV 1 léčeného acyclovirem. U dalších 2 nemocných, léčených gancyclovirem pro přítomnost HHV 6, došlo k mírnému zlepšení EF LK. U 1 nemocného, kterému byl vzhledem k průkazu CMV a EBV podáván rovněž gancyclovir, se EF LK nezměnila.

Vstupně byla středně významná a těžká diastolická dysfunkce LK přítomná u 4 nemocných a po 12 měsících jen u 1 nemocného; ke zlepšení plnění o minimálně 1 stupeň klasifikace diastolické dysfunkce došlo u 3 nemocných.

U všech jedinců došlo k zlepšení symptomatologie srdečního selhání (NYHA třída vstupně $3,0 \pm 0,8$ a po 12 měsících $1,5 \pm 0,5$).

Tabulka číslo 9 Vývoj echokardiografických parametrů jedinců léčených antivirotiky (n=4)

	Vstupně	1. měsíc	3. měsíc	6. měsíc	12. měsíc
IVS (mm)	9±1	9±2	8±1	11±1	10±1
LKd (mm)	75±7	74±8	74±12	72±6	66±16
LKs (mm)	67±7	65±11	62±19	59±9	30±21
zsLK (mm)	10±1	7±1	8±1	9±1	10±1
EDV (ml)	266±100	273±122	248±145	305±178	291±219
ESV (ml)	203±89	199±102	181±129	226±166	206±198
EF (%)	25±4	30±9	35±13	33±12	44±20
LS (mm)	53±7	51±6	47±10	46±6	51±5
LSV (ml)	102±20	105±13	50±14	81±23	87±15
PS (mm)	38±3	41±2	39±5	36±4	39±5
PK (mm)	36±3	38±1	31±4	33±2	33±1
TAPSE (mm)	19±2	23±1	21±1	22±5	21±5
PASP (mmHg)	35±4	36±4	35±4	33±5	30±3
Mitrální reg. 1-4+	1,7±0,1	1,5±0,6	1,7±0,6	1,3±0,5	1,2±0,2

4.5.4 Nemocní léčení standardní terapií srdečního selhání

Tato skupina zahrnovala celkem 34 jedinců, kteří nebyli léčení žádnou cílenou terapií (antibiotika, antivirotika nebo imunosuprese) a byla jim podávána jen optimalizovaná léčba chronického srdečního selhání dle stávajících doporučení.

Vývoj echokardiografických parametrů této skupiny v průběhu sledování zachycuje Tabulka číslo 10. Během 12 měsíců došlo ke statisticky významnému zmenšení rozměrů a objemů LK. Zaznamenáno bylo výrazné zlepšení globální systolické funkce LK. Vstupně byla středně významná a těžká diastolická dysfunkce LK přítomná u 15 nemocných a po 12 měsících jen u 3 nemocných; ke zlepšení plnění o minimálně 1 stupeň klasifikace diastolické dysfunkce došlo u 14 nemocných (41 % jedinců).

Významně se zmenšila mitrální regurgitace. Zjištěno bylo dále signifikantní zlepšení systolické funkce PK. Příznivé změny v pozitivní remodelaci LK se začaly objevovat již v 1. měsíci a přetrvávaly po celou dobu sledování.

U nemocných byla také výrazně zlepšena symptomatologie srdečního selhání hodnocená NYHA klasifikací (vstupně NYHA třída $3,2 \pm 0,8$ a po 12 měsících $1,7 \pm 0,9$; $p < 0,05$).

Tabulka číslo 10 Vývoj echokardiografických parametrů jedinců bez specifické léčby (n=34)

	Vstupně	1. měsíc	3. měsíc	6. měsíc	12. měsíc
IVS (mm)	10±1	10±1	11±1	10±1	10±1
LKd (mm)	68±8	67±9	65±9†	64±9†	62±10†
LKs (mm)	59±8	57±9*	55±9*	51±9†	47±12†
zsLK (mm)	9±1	9±1	10±2	10±1	9±1
EDV (ml)	209±77	190±68	183±80†	164±68†	161±66†
ESV (ml)	149±56	124±56†	118±67†	93±52†	90±57†
EF (%)	27±6	36±8†	39±11†	42±12†	47±14†
LS (mm)	51±7	47±6	47±6	51±7	48±9
LSV (ml)	111±31	96±30	81±32*	84±28	106±27
PS (mm)	43±8	38±4	40±6	40±5	39±6
PK (mm)	38±6	33±4*	35±5*	36±6	35±3
TAPSE (mm)	18±4	21±5	20±6	20±4	23±4*
PASP (mmHg)	41±10	36±4	36±5	37±13	34±11
Mitrální reg. 1-4+	2,0±0,8	1,5±0,9	1,3±0,6*	1,5±0,7†	1,3±0,8†

* p<0,05; † p<0,01 vstupní vyšetření versus jednotlivá následující měření v průběhu 12

měsíčního sledování

Vzhledem k tomu, že se jedná o skupinu heterogenní, zahrnující jedince s různými výsledky EMB, byla tato skupina stran podrobnější statistické analýzy vývoje strukturálních a funkčních parametrů LK a PK a symptomatiky nemocných dále rozdělena do 3 podskupin (Tabulka číslo 11):

1) Podskupina označená jako V+/I+ sestávala z 5 nemocných s imunohistochemickým nálezem zánětlivého postižení myokardu a s průkazem virového agens, proti kterému buď nebyla dostupná cílená léčba antivirotiky, anebo cílená léčba dostupná byla a nemocní tuto terapii odmítli.

Tato podskupina nebyla vzhledem k velikosti souboru statisticky hodnocena. Je však patrné, že kromě zmenšení objemů a end-systolického rozměru LK následovaných změnou EF LK nebyly zaznamenány klinicky významné pozitivní změny v parametrech srdečních oddílů.

Vstupně byla středně významná a těžká diastolická dysfunkce LK přítomná u 2 nemocných a po 12 měsících u žádného z nemocných; ke zlepšení plnění o minimálně 1 stupeň klasifikace diastolické dysfunkce došlo u 2 nemocných (40% jedinců).

U těchto nemocných došlo ke zlepšení symptomatologie srdečního selhání hodnocené NYHA klasifikací (NYHA třída vstupně $3,6 \pm 0,5$, po 12 měsících $1,8 \pm 0,4$).

2) Podskupina označená V+/I- zahrnovala 18 jedinců s negativním výsledkem imunohistochemického vyšetření, ale pozitivním PCR či elektronmikroskopickým nálezem virového agens, kteří nebyli cíleně léčeni antivirotiky, a to opět z důvodu nedostupnosti cílené léčby či jejího odmítnutí.

V této skupině došlo během 12 měsíců sledování k statisticky významnému zmenšení rozměrů a objemů LK a zlepšení systolické funkce LK.

Vstupně byla středně významná a těžká diastolická LK přítomná u 9 nemocných a po 12 měsících jen u 5 nemocných; ke zlepšení plnění o minimálně 1 stupeň klasifikace diastolické dysfunkce došlo u 4 nemocných (22% jedinců).

Dále bylo pozorováno významné zmírnění mitrální regurgitace. Došlo rovněž k signifikantnímu zmenšení PS.

Zaznamenáno bylo rovněž zmírnění symptomatologie srdečního selhání (NYHA třída vstupně $3,1 \pm 0,9$ a po 12 měsících $1,6 \pm 0,5$; $p < 0,05$).

3) Podskupinu označenou V-/I- tvořilo 11 nemocných s negativním výsledkem imunohistochemického vyšetření a absencí průkazu mikrobiálního agens v myokardu, jednalo se tedy o jedince s tzv. idiopatickou dilatační kardiomyopatií.

V této skupině došlo během 12 měsíců sledování k zmenšení objemů a end-systolického rozměru LK a zlepšení její systolické funkce.

Vstupně byla středně významná a těžká diastolická dysfunkce LK přítomná u 4 nemocných a po 12 měsících jen u 3 nemocných; ke zlepšení plnění o minimálně 1 stupeň klasifikace diastolické dysfunkce došlo u 3 nemocných (27% jedinců).

Zaznamenáno bylo statisticky významné zmenšení rozměrů PK, zlepšení její systolické funkce a pokles systolické tenze v plicnici. Významně se též zmenšila mitrální regurgitace.

V průběhu sledování došlo rovněž ke zmírnění symptomatologie srdečního selhání (vstupně NYHA třída $3,1 \pm 0,8$ a po 12 měsících $1,9 \pm 1,1$; $p < 0,05$)

Tabulka číslo 11 Vývoj echokardiografických parametrů jednotlivých podskupin jedinců bez cílené antimikrobiální či imunosupresivní léčby

	V+/I+ 0m	V+/I- 0m	V-/I- 0m	V+/I+ 12m	V+/I- 12m	V-/I- 12m
Počet jedinců	5	18	11	5	18	11
IVS (mm)	10±1	10±1	9±1	10±0	10±2	10±1
LKd (mm)	69±12	65±5	71±8	71±6	52±2*	64±11
LKs (mm)	62±9	56±6	64±7	57±9	34±5†	50±12†
zsLK (mm)	9±1	9±1	9±1	10±0	9±1	9±1
EDV (ml)	241±117	182±67	233±65	222±57	107±13†	162±76*
ESV (ml)	174±85	130±51	168±43	143±67	46±18†	95±59†
EF (%)	27±3	29±7	24±6	38±12	58±14†	44±14*
LS (mm)	51±8	51±6	52±8	54±2	46±14	47±6
LSV (ml)	104±17	110±39	152±0	118±21	69±14†	127±5†
PS (mm)	41±5	44±9	45±6	40±6	39±6*	42±6
PK (mm)	39±3	38±8	40±6	36±1	34±8	33±3†
TAPSE (mm)	20±4	19±4	16±4	21±3	22±2	22±3†
PASP (mmHg)	41±9	41±10	43±10	52±3	40±13	29±3†
Mitrální reg. 1-4+	1,6±0,6	2,0±0,7	2,4±0,8	1,5±0,4	1,4±1,3*	1,0±0,2†

* p<0,05; † p<0,01 vstupní vyšetření versus jednotlivá následující měření v průběhu 12 měsíčního sledování

5. Diskuze

5.1 Obecná charakteristika souboru a nálezy v endomyokardiální biopsii

Námi zkoumaný soubor zahrnoval nemocné s morfologicko-funkčním obrazem dilatační kardiomyopatie nejasné etiologie a anamnézou srdečního selhání kratší než 1 rok. Ve většině případů se jednalo o nemocné s těžkou systolickou dysfunkcí zřetelně dilatované LK a výrazně vyjádřenou symptomatologií srdečního selhání. Pro pokročilou formu kardiální insuficience svědčila i signifikantní elevace BNP zjištěná vstupně u tří čtvrtin nemocných. Jen přibližně 25% nemocných vykazovalo zvýšené hladiny CRP, resp. počtu leukocytů v krevním obraze, jakožto tradičních markerů probíhající zánětlivé reakce v organismu. Na základě komplexní analýzy endomyokardiální biopsie vycházející z imunohistochemického vyšetření a z mikrobiologických metod zahrnujících PCR a elektronovou mikroskopii jsme prokázali přítomnost virového či bakteriálního agens u 73% jedinců zkoumaného souboru. Elektronovou mikroskopií jsme zjistili mikrobiální agens u 73% jedinců (u 32% se jednalo o současný záchyt 2, respektive 3 patogenů u 1 jedince) a metodou PCR u 57% nemocných (u 3 jedinců byl zjištěn současný výskyt genomů 2 mikrobiálních agens a u 4 nemocných genomu 3 mikrobiálních patogenů). Pozitivita průkazu mikrobiálního agens byla u 39% nemocných doprovázena zánětlivým postižením myokardu. U 7% jedinců jsme imunohistochemické známky zánětu myokardu zjistili izolovaně, t.j. u těchto nemocných jsme nebyli schopni metodou PCR ani elektronovou mikroskopií přítomnost mikrobiálního agens zjistit. Pouze u 20% nemocných celého zkoumaného souboru byla endomyokardiální biopsie zcela negativní stran průkazu mikrobů i negativity imunohistochemického vyšetření. V souhrnu lze tedy říci, že výsledky naší studie nasvědčují

skutečnosti, že ZKMP by mohla mít zásadní podíl na etiologii nově vzniklého srdečního selhání na podkladě dilatační kardiomyopatie. Naše výsledky lze porovnat především s poznatky z následujících prací zahraničních autorů zabývajících se problematikou ZKMP. Kühn et al. ve své studii zahrnující 245 nemocných s dilatační kardiomyopatií nejasné etiologie prokázali metodou PCR přítomnost virového genomu u nadpoloviční většiny vyšetřovaných, konkrétně u 67 % souboru (35). Nejčastěji šlo o parvoviry a herpetické viry. U kolika z vyšetřovaných jedinců byly přítomny imunohistochemické známky zánětlivého poškození myokardu není v práci popsáno, je však uvedeno, že známky zánětu se mezi skupinou s průkazem virového agens a skupinou s absencí viru v myokardu od sebe nelišily. V práci amerických autorů, která zahrnovala jedince širokého věkového spektra včetně novorozenců, byl virový genom nalezen v EMB méně často, a to u 38 % nemocných s diagnózou myokarditidy a u 20 % jedinců s diagnózou dilatační kardiomyopatie (34). V této práci převažovaly, na rozdíl od práce německých autorů, enteroviry a adenoviry. Důležitá je též skutečnost, že imunohistochemické metody nebyly v této studii k analýze zánětlivého poškození myokardu využity.

Zimmermann et al. vyšetřili endomyokardiální biopsií 82 nemocných s dilatační kardiomyopatií. EMB byla vyšetřena imunohistochemicky a metodou PCR cílenou na přítomnost enterovirů a adenovirů. U 40% jedinců byly zjištěny izolované známky zánětlivého poškození myokardu, u 12% byl prokázán virový genom a u 48% jedinců byla EMB stran průkazu zánětu či virového agens negativní (77).

V naší práci byly nejčastěji zachyceny herpetické viry a parvoviry. Enteroviry (respektive obecně metodou elektronové mikroskopie nalezené picornaviry) a ostatní virové čeledi jako paramyxoviry se nacházely v EMB méně často a adenoviry nebyly zjištěny u žádného z našich nemocných. Z bakterií jsme relativně často, u čtvrtiny nemocných, prokázali přítomnost *Borrelia burgdorferi*, ostatní neviróvá agens se vyskytovala jen velice zřídka a jednalo se o izolovaný

záchyt mykoplazmat u 4% nemocných. Příčinou vyššího záchytu mikrobiálních agens v naší studii, resp. nálezu i nevirových agens jako jsou mykoplasmata, je skutečnost, že analýza EMB nebyla založena pouze na PCR, ale opírala se rovněž o elektronovou mikroskopii. Elektronová mikroskopie, tak podle našich poznatků skýtá významný přínos v diagnostice ZKMP. Bohužel se však jedná o diagnostickou metodu vyžadující kromě patřičného přístrojového vybavení především hodnotitele se značně vysokou mírou zkušenosti s touto metodou, což v dnešní době brání širšímu využití elektronové mikroskopie.

Význam izolovaného průkazu virového agens v EMB není v současnosti stále zcela vyjasněn. Přítomnost virového genomu v myokardu byla totiž zjištěna nejen u jiných forem kardiomyopatií, ale i v myokardu jedinců netrpících zjevnou myokardiální dysfunkcí.

Iglezias et al. detekovali virový genom u 50% jedinců s endomyokardiální fibrózou (78). Bowles et al. provedli EMB u 12 nemocných s arytmogenní kardiomyopatií pravé komory a zjistili u 7 jedinců genom enterovirů a u 2 jedinců genom adenovirů (79). Genom kardiotropních virů byl dokonce detekován v explantovaných srdcích dárců pro srdeční transplantaci (80). V této práci bylo metodou PCR vyšetřeno 499 vzorků srdeční tkáně získaných od dárců a recipientů pro srdeční transplantaci. Vyšetřován byl genom enterovirů, adenovirů, cytomegalovirů, parvoviru B19 a virů influenzy. U 47% čekatelů srdeční transplantace a v 60% explantovaných srdcích dárců byl zjištěn genom výše uvedených kardiotropních virů.

Hodnocení významu nálezů virového genomu k rozvoji DKMP se zdá být nejsvízelnější v případě parvoviru B19, jak je patrné z práce Lotze et al. , kteří vyšetřili vzorky srdeční tkáně 24 jedinců s dilatační kardiomyopatií a 10 kontrolních jedinců podstupujících kardiokirurgickou revaskularizaci myokardu a zjistili, že četnost nálezů genomu parvoviru B 19 se mezi oběma vyšetřenými skupinami nelišila (81).

Jak bylo tedy již uvedeno výše, je pravděpodobné, že genom či partikule virového agens se může nacházet v myokardu určitého procenta populace zcela inaparentně a nemusí v těchto případech být příčinou ZKMP projevující se dysfunkcí a dilatací LK.

V této souvislosti se proto v současné době dostává do popředí zájmu nejen pouhý kvalitativní průkaz virového agens v myokardu, nýbrž i kvantifikace tzv. virové nálože v EMB. Bock et al. zkoumali přítomnost parvoviru B19 detekovaného PCR v EMB nemocných s myokarditidou a dilatační kardiomyopatií a dále vyšetřovali přítomnost genomu tohoto viru v autopsiích srdce jedinců bez zánětlivého postižení myokardu, kteří tvořili kontrolní skupinu. Autoři v této práci našli genom parvoviru B19 u 65% nemocných s myokarditidou, u 35% nemocných s dilatační kardiomyopatií a u 8% jedinců kontrolní skupiny. Mezi jednotlivými skupinami byl mimo četnosti výskytu parvoviru B19 především zásadní rozdíl ve virové náloži uváděné v genomických ekvivalentech na mikrogram izolované nukleové kyseliny (ge/ugDNA). U nemocných s akutní myokarditidou byla průměrná virová nálož 316 000 ge/ugDNA, u nemocných s chronickým zánětem srdečního svalu (tedy u nemocných s dilatační kardiomyopatií a průkazem zánětlivé infiltrace myokardu) 709 ge/ugDNA, u nemocných s idiopatickou dilatační kardiomyopatií (nemocní s negativním výsledkem imunohistochemického vyšetření EMB) 392 ge/ugDNA a u kontrolní skupiny 84 ge/ugDNA. Autoři na základě svých poznatků navrhuji v případě pozitivního nálezu parvoviru B19 v EMB považovat počet 500 a více kopií ge/ugDNA za hodnoty klinicky významné stran souvislosti průkazu virového genomu v myokardu a rozvoje ZKMP (82).

V naší práci jsme měli u naprosté většiny provedených EMB k dispozici pouze kvalitativní PCR techniku. Kvantitativní PCR analýza zaměřená na stanovení nálože parvovirem B19 byla zavedena až ke konci našeho výzkumu. Z důvodu zcela minimálního počtu EMB hodnocených

kvantitativní PCR metodikou není proto počet virových náloží u nemocných našeho souboru s průkazem parvoviru B 19 uváděn.

Výsledky naší práce rovněž potvrzují nulový přínos klasického histologického hodnocení vzorků EMB na základě tzv. Dallaských kritérií. Ani u jednoho z nemocných, u kterého byly prokázány imunohistochemického známky myokardiálního zánětu, nebyla přítomna pozitivita histologického vyšetření. Toto zjištění je zcela v souladu s pracemi jiných autorů, např. se studií Wojnicze et al., kteří našli imunohistochemické známky zánětu myokardu u 84 z 202 nemocných s nově diagnostikovanou dilatační kardiomyopatií, zatímco Dallaská kritéria myokarditis byla pozitivní jen u 27% z nich (47). Lze tedy jednoznačně říci, že současné hodnocení vzorků EMB stran přítomnosti myokardiálního zánětu musí být založeno na imunohistochemickém, nikoli jen histologickém, vyšetření.

Na rozdíl od virů byly bakterie do současné doby stanovovány v EMB jen zřídka. V geografických oblastech podobných České republice se jednalo především o hodnocení přítomnosti infekce *Borrelia burgdorferi*. Ve studii německých autorů byl borreliový genom v myokardu zjištěn u méně než 1 % vyšetřených jedinců s dilatační kardiomyopatií (44). Recentní práce českých autorů Bartůňka et al. však naznačila možnost výrazně většího zastoupení borreliové infekce v etiologii dilatační kardiomyopatie (83). Bartůňek et al. provedli u 33 jedinců s DKMP endomyokardiální biopsii a vzorky srdeční tkáně vyšetřili na přítomnost *Borrelie burgdorferi* PCR a elektronovou mikroskopií. V 17 případech byl nález pozitivní, tedy byl buď prokázán genom Bb, nebo v elektronové mikroskopii byla zjištěna částice odpovídající Bb.

Přítomnost *Borrelie burgdorferi* v EMB byla v našem souboru zjištěna u jedné čtvrtiny všech nemocných. Daleko vyšší prevalenci tohoto infekčního patogenu v naší práci i v práci Bartůňka a spol. v porovnání s četností jeho výskytu uváděným německými autory dáváme do souvislosti

s významně vyšším výskytem endemických oblastí pro infekci *Borrelia burgdorferi* v regionu České republiky.

Naše dosavadní výsledky jasně podporují hypotézu, že infekce *Borrelia burgdorferi* může být příčinou, a v podmínkách České republiky poměrně častou, vzniku ZKMP, resp. dilatační kardiomyopatie. Je zajímavé, že u žádného z nemocných, u kterých jsme prokázali přítomnost *Borrelia burgdorferi* ve vzorcích EMB, nebyla na EKG zachycena převodní porucha ve smyslu zpomaleného atrioventrikulárního vedení, jakožto literárně často uváděné manifestace postižení srdce lymeskou boreliózou (84)

5.2 Sérologické vyšetření

Sérologické vyšetření IgM a IgG protilátek proti virovým a neviróvým agens je běžně užívanou metodou ke stanovení aktivity infekčního onemocnění. V našem souboru jsme pozitivitu IgM protilátek nezjistili proti žádnému z detekovaných virových agens, ani proti *Borrelia burgdorferi*. Sérologická vyšetření HIV a virů hepatitid B a C byla zcela negativní, tj. nesvědčila v případě virů hepatitid ani pro možnost chronicky probíhajícího, resp. již proběhlého onemocnění. Protilátky třídy IgG proti dalším zkoumaným mikrobiálním agens byly ve vysokém procentu nalezeny proti herpetickým virům, enterovirům a parvoviru B19 (56-100% případů). Vysoký výskyt séropozitivity IgG v případě herpetických virů (u HSV1 dokonce u všech zkoumaných jedinců), ale i dalších virů jako jsou enteroviry nebo parvoviry, je jasně podmíněn výraznou promořeností obecné populace těmito viry v dospělosti. Stanovování IgG protilátek proti kardiotropním virům tak nemá zásadní výpovědní hodnotu pro diagnostiku ZKMP, jak ukazují i nízké prediktivní hodnoty sérologických vyšetření proti parvoviru B19 a lidskému herpes viru 6. Význam sérologického vyšetření HIV a virů hepatitid B a C nebylo možné posoudit, jelikož sérologické vyšetření těchto virů bylo kompletně negativní, PCR vyšetření EMB na tyto virové agens nebyla cílena a elektronová mikroskopie tyto viry v EMB nezjistila. Pozitivita IgG protilátek proti *Borrelia burgdorferi* byla zjištěna u 7 jedinců (13% nemocných) a u 5 z nich byla *Borrelia burgdorferi* též prokázána v EMB. Sérologické vyšetření protilátek IgG proti tomuto patogenu tak vykazovalo hraničně uspokojivou pozitivní i negativní prediktivní hodnotu (71%, resp. 82%). V souhrnu je zřejmé, že stanovení IgM protilátek je pro stanovení diagnózy ZKMP zcela nepřínosné. Stanovení IgG protilátek pro diagnostiku ZKMP má určitý význam pouze v případě

Borrelie burgdorferi. Zásadním vyšetřením pro přesnou etiologickou diagnostiku ZKMP je tedy EMB, kterou nelze sérologickým vyšetřením nahradit.

Za určitou limitaci hodnocení významu stanovování IgG protilátek proti kardiotropním virům může být považován omezený počet provedených sérologických vyšetření. Hlavními faktory, proč nebyla sérologická vyšetření prováděna u všech jedinců našeho souboru, byly množící se literární poznatky o omezeném významu sérologického vyšetření v diagnostice ZKMP, které byly průběžně potvrzovány naší praxí, a zároveň poměrně výrazná ekonomická nákladnost těchto vyšetření (85,35).

V souladu s našimi závěry jsou i výsledky zcela recentně publikované práce Mahfouda et al. (86). Tato studie se zabývala významem sérologického vyšetření u nemocných s klinickým podezřením na akutní myokarditis a anamnézou proběhlého virového onemocnění v předchozích 6 měsících. Ve své práci hodnotili přítomnost protilátek proti herpetickým virům, enterovirům, adenovirům a parvovirům. U 30 jedinců byl proveden i náběr kontrolní sérologie s odstupem 1 až 4 týdnů od vstupního vyšetření. Zatímco virový genom v EMB prokázali pomocí PCR v 58% případech, sérologie svědčila pro akutní virovou infekci jen u 16% jedinců. Sérologický nález akutní infekce koreloval jen ve 4% případů s nálezem virového agens v EMB. Na základě svých poznatků autoři uzavírají, že sérologické vyšetření, a to i v případě náběrů tzv. párových sér, by v dnešní době nemělo být považováno za jedno ze základních vyšetření při podezření na zánětlivé postižení myokardu.

5.3 Cílená léčba

5.3.1 Skupina nemocných s průkazem *Borrelia burgdorferi*

Cílená léčba borreliové infekce antibiotiky je všeobecně uznávanou léčebnou strategií (87,88). V našem souboru jsme nemocné léčili intravenózně podávaným cefalosporinem po dobu 3 týdnů. Tato léčba vedla ke statisticky příznivým změnám ve smyslu reverzní remodelace LK doprovázené zlepšením její systolické i diastolické funkce a zmenšení funkční mitrální regurgitace. Tyto změny byly doprovázeny poklesem systolického tlaku v plicnici a zlepšením systolické funkce pravé komory. Současně došlo i k významnému zmírnění symptomatologie srdečního selhání. Tyto výsledky jsou v souladu s prací Gassera et al., kteří 9 nemocných s dilatační kardiomyopatií a pozitivní sérologií lymeské borreliózy léčili intravenózním ceftriaxonem a u všech kromě 1 jedince zaznamenali výrazné zlepšení či normalizaci systolické funkce LK během 6 měsíčního sledování (89).

Příznivý efekt léčby ve smyslu zlepšení funkce LK byl v našem souboru zaznamenán u všech léčených, k její kompletní normalizaci však došlo jen u dvou z nich. Za pravděpodobnou příčinu rozdílného vlivu cílené léčby u jednotlivých nemocných považujeme rozdílné trvání borreliové infekce. Přesnou délku trvání borreliózy, resp. doby, která uplynula od průniku spirochety do myokardu do stanovení diagnózy EMB, nebylo u nemocných možno zjistit. Nikdo z jedinců s pozitivním bioptickým průkazem *Borrelia burgdorferi* neměl anamnézu žádného ze stádií lymeské borreliózy a u nikoho z nich nebyla také zjištěna přítomnost pozitivivity IgM protilátek. Je tedy pravděpodobné, že u nemocných s minimální odezvou na antibiotickou léčbu již nebyla přítomna aktivně probíhající infekce, ale jednalo se pouze o nález genomu bakterie přítomného v myokardu od dříve prodělané infekce staršího data. Při hodnocení aktivity borreliové infekce

nám nebyla příliš nápomocna ani imunohistochemická vyšetření, která byla pozitivní u 6 nemocných z 14 (z toho jen u 1 z nemocných s normalizací systolické funkce levé komory). Na základě této zásadní limitace jsme do palety vyšetření vzorků EMB zařadili také elektronmikroskopické vyšetření cílené na posouzení přítomnosti partikulí *Borrelia burgdorferi*. Dosud prováděná elektronmikroskopická vyšetření byla cílená specificky na průkaz virových částic, a proto se prováděla při jiném nastavení elektronového mikroskopu. Vyšetření elektronovou mikroskopií nám totiž může poměrně přesně říci, jaká část spirochety je v EMB přítomná, a tak ve většině případů pomoci stanovit přibližnou aktivitu infekčního procesu. K potvrzení této naší hypotézy musíme vyčkat většího souboru dat.

5.3.2 Skupina nemocných léčených kombinovanou imunosupresí

Tuto skupinu tvořili 4 jedinci s průkazem imunohistochemických známek zánětlivého poškození myokardu, u kterých jsme ani metodou PCR, ani elektronovou mikroskopií neprokázali mikrobiální agens v EMB. Náš soubor se tedy od dosud publikovaných prací lišil zásadně tím, že se k diagnostice přítomnosti mikrobiálních agens využívala i elektronová mikroskopie a nejednalo se tedy o vyloučení jen omezeného množství patogenů, na které byla cílena PCR.

Vzhledem k malé velikosti této skupiny nebylo možno srovnat vývoj echokardiografických a klinických parametrů pomocí statistických metod; zjištěny však byly příznivé známky srdeční remodelace představované především zmenšením objemů LK a zlepšením systolické funkce LK.

Kromě těchto příznivých známek je potřebné zmínit, že léčba kombinovanou imunosupresí byla nemocnými dobře tolerována a nebyly zaznamenány nežádoucí účinky, které by nás nutily k předčasnému ukončení této léčby.

Naše výsledky u minimálního počtu nemocných naznačující možný příznivý vliv kombinované imunosupresivní léčby u nemocných s anamnézou srdečního selhání kratší než 6 měsíců a jsou v souladu s prací Zimmermanna et al., ve které autoři nemocné s dilatační kardiomyopatií s imunohistochemickými známkami zánětu a absencí virového genomu v EMB léčili kortikoterapií a zaznamenali příznivý vliv této léčby na zlepšení systolické funkce LK (77). Jelikož se jedná o dosud jedinou práci dokumentující význam imunosupresivní léčby kortikoidy u nemocných s anamnézou srdečního selhání kratší než 6 měsíců, bude nutno do budoucna vyčkat výsledků dalších randomizovaných studií.

Význam kombinované imunosupresivní léčby u nemocných s dilatační kardiomyopatií, průkazem imunohistochemických známek zánětu a absencí mikrobiálního agens v EMB, u kterých je

minimální anamnéza srdečního selhání delší než 6 měsíců, se v současnosti opírá o větší množství provedených studií (47, 48, 49), které byly detailněji rozebrány v úvodu této práce.

5.3.3 Skupina nemocných léčených antivirotiky

Tuto skupinu nemocných tvořili 4 jedinci s průkazem genomu herpetických virů v EMB, kteří byli léčeni acyclovirem resp. gancyclovirem.

S ohledem na minimální velikost souboru ani v tomto případě nebylo možné provést statistickou analýzu vývoje morfologicko-funkčních parametrů srdečních oddílů a symptomatiky nemocných. Je však možné říci, že u 1 z nemocných došlo ke kompletní normalizaci EF LK a u 2 dalších jedinců se systolická funkce LK při porovnání se vstupní hodnotou zlepšila. U všech 4 jedinců dále došlo k zmírnění symptomatologie srdečního selhání.

Naše poznatky s léčbou antivirotiky lze srovnat pouze s kazuistickými sděleními, jelikož do současnosti nebyla publikována žádná práce, která by hodnotila léčbu antivirotiky u nemocných s dilatační kardiomyopatií na větším počtu nemocných. Navíc i kazuistická sdělení zabývající se léčbou antivirotiky jsou velice raritní a jen výjimečně se jedná o nemocné s průkazem genomu viru v EMB, především herpetického (54, 56).

K ověření významu podávání antivirotik nemocným s dilatační kardiomyopatií a průkazem viru v EMB tak bude nutno též vyčkat provedení příslušných studií.

Jinou možností, než je cílená léčba antivirotiky, je imunomodulační léčba interferonem β . Efekt této léčby byl prokázán ve studii německých autorů, kteří 22 nemocným s dilatační kardiomyopatií a průkazem genomu adenoviru či enteroviru podávali interferon β a při 6 měsíčním sledování pozorovali u těchto nemocných zmenšení enddiastolických a endsystolických rozměrů LK, zlepšení ejekční frakce LK a při kontrolní EMB nebyl v myokardu léčených jedinců prokázán genom příslušných virů (60). Příznivý efekt léčby interferonem β na zlepšení systolické funkce LK byl zjištěn i ve studii Zimmermanna u 10 nemocných s průkazem genomu enteroviru v EMB (77). Použití léčby interferonem u našich

nemocných s průkazem virových agens v EMB nebylo bohužel možné pro vysokou finanční náročnost této terapie.

6. Závěry

Hypotéza čísla 1

Hypotéza byla potvrzena.

Zánětlivá kardiomyopatie tvoří významnou podskupinu nově diagnostikované dilatační kardiomyopatie nejasné etiologie. Přítomnost virového agens v endomyokardiální biopsii je častá a virová agens se nevyskytují v myokardu pouze izolovaně. *Borrelia burgdorferi* je zjišťována relativně často v endomyokardiální biopsii. Elektronová mikroskopie je užitečnou metodou v diagnostice ZKMP.

Hypotéza číslo 2

Hypotéza nebyla potvrzena.

Sérologické vyšetření není přínosné pro diagnostiku ZKMP charakterizované perzistencí virového agens v myokardu.

Sérologické vyšetření může být sice využito v diagnostice ZKMP asociované s borreliovou infekcí, i zde však má zásadní úlohu provedení EMB

Hypotéza číslo 3

Hypotéza byla zčásti potvrzena.

Antibiotická léčba, přidaná ke zvyklé léčbě srdečního selhání, vede u nemocných s průkazem *Borrelie burgdorferi* v myokardu ke zlepšení strukturálních a funkčních parametrů LK a ke zmírnění symptomatologie srdečního selhání. Vzhledem k tomu, že k podobně příznivým změnám vedla i samostatně podávaná zvyklá léčba srdečního selhávání u nemocných s idiopatickou dilatační kardiomyopatií, nelze nyní význam antibiotické terapie zcela validně posoudit. K ověření skutečného významu antibiotické léčby nemocných s dilatační kardiomyopatií s průkazem *Borrelie burgdorferi* v myokardu by bylo nutné provést randomizovanou dvojitě zaslepenou studii. Je ovšem otazné, nakolik by v současnosti, kdy je léčba infekce *Borrelia burgdorferi* antibiotiky všeobecně přijímána, bylo provedení této studie z etického pohledu obhajitelné.

7. Použitá literatura

1. Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. 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: 841-2.
2. Elliot P, Anderson B, Arbustini, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2008;29: 270-6.
3. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, et al. Diagnosis and treatment of patients with virus induced inflammatory cardiomyopathy. *Eur Heart J Supplements* 2002;4: 173-8.
4. Grumbach IM, Heim A, Pring-Akerblom P, Vonhof S, Hein WJ, Müller G, Figulla HR. Adenoviruses and enteroviruses as pathogens in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Acta Cardiol* 1999;54: 83-8.
5. Pankuweit S, Ruppert V, Eckhardt H, Strache D, Maisch B. Pathophysiology and aetiological diagnosis of inflammatory myocardial diseases with a special focus on parvovirus B19. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2005;52: 344-7.
6. Quiros FR, Moralko CA, Casas JP, et al. Charity: Chagas cardiomyopathy bisoprolol intervention study: a randomized double blind force titration controlled study with Bisoprolol in patients with chronic heart failure secondary to Chagas cardiomyopathy. *Trials* 2006;7: 21.
7. Mason JW. Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link. *Cardiovasc Res* 2003;60: 5-10.
8. Dennert R, Crijns HJ, Heymans S. Acute viral myocarditis. *Eur Heart J* 2008; 29: 2073–2082.

- 9.Hjalmarson A, Fu M, Mobini R. Who are the enemies? Inflammation and autoimmune mechanisms. *Eur Heart J Supplements* 2002; 4: G27-G32.
- 10.Noutsias M, Pauschinger M, Poller WC, Schultheiss HP, Kühl U. Current insights into the pathogenesis, diagnosis and therapy of inflammatory cardiomyopathy. *Heart Fail Monit.* 2003;3: 127-35.
- 11.Poller W, Fechner H, Noutsias M, Tschoepe C, Pauschinger M, Schultheiss HP. The molecular basis of cardiotropic viral infections. *Eur Heart J Supplements* 2002; 4 : I18–I30.
- 12.Matsumori A. Cytokines in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J Supplements* 2002; 4 : I42–I45.
- 13.Hare JM, Colucci WS. Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function. *Prog Cardiovasc Dis* 1995;38: 155-66.
- 14.Gupta S, Markham DW, Drazner MH, Mammen PP; Medscape. Fulminant myocarditis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008 ;5: 693-706.
- 15.Kearney MT, Cotton JM, Richardson PJ, Shah AM. Viral myocarditis and dilated cardiomyopathy: mechanisms, manifestations, and management. *Postgrad Med J* 2001 ;77: 4-10.
- 16.Pankuweit S, Portig I, Lottspeich F, et al. Autoantibodies in sera of patients with myocarditis: characterization of the corresponding proteins by isoelectric focusing and N-terminal sequence analysis. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29: 77– 84.
- 17.Caforio AL, Mahon NJ, Tona F, McKenna WJ. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance.*Eur J Heart Fail* 2002 ;4: 411-7.
- 18.Lawson CM. Evidence for mimicry by viral antigens in animal models of autoimmune disease including myocarditis. *Cell Mol Life Sci* 2000;57: 552–560.

19. Rose NR, Mackay IR. Molecular mimicry: a critical look at exemplary instance in human diseases *Cell Mol Life Sci* 2000;57: 542–551.
20. Hegarová M. Chronické srdeční selhání. In: Vojáček J, Kettner J. *Klinická kardiologie*. Hradec Králové: Nucleus 2009: 357-377.
21. Mishra S, Gusta RC, Tiwari N et al. Molecular mechanism of reduced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake in human failing left ventricular myocardium. *J Heart Lung Transplant*. 2002; 12: 366-373.
22. Bottomley PA. Noninvasive study of high-energy phosphate metabolism in human heart by depth-resolved ³¹P NMR spectroscopy. *Science* 1985;229: 769-772.
23. Kato T, Niizuma S, Inuzuka Y, Kawashima T, Okuda J, Tamaki Y, Iwanaga Y, Narazaki M, Matsuda T, Soga T, Kita T, Kimura T, Shioi T. Analysis of metabolic remodeling in compensated left ventricular hypertrophy and heart failure. *Circ Heart Fail* 2010;3: 420-30.
24. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, et al. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987;1: 3-14.
25. Salvi A, Di Lenarda A, Dreas L, et al. Immunosuppressive treatment in myocarditis. *Int J Cardiol* 1989;22: 329-38.
26. Mortensen SA, Baandrup U, Buch J, et al: Immunosuppressive therapy of biopsy-proven myocarditis: Experiences with corticosteroids and cyclosporine. *Int J Immunotherapy* 1985; 1:35-45
27. Dec GW, Palacios IF, Fallon JT, et al: Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies-Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome. *N Engl J Med* 1985; 312: 885-890
28. Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A, et al. A clinical trial immunosuppressive therapy for myocarditis. *N Engl J Med* 1995;333: 269-75.

29. Shanes JG, Ghali J, Billingham ME, et al. Interobserver variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results. *Circulation* 1987 ;75:401-5.
30. Baghman KL. Diagnosis of myocarditis: Death of Dallas Criteria. *Circulation* 2006;113: 593-5.
31. Kühl U, Noutsias M, Seeberg B, et al. Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart* 1996;75: 295-30.
32. Kühl U, Toussaint H, Ulrich G, et al. Evaluation of immunohistological data for the diagnosis of myocarditis. In: Schultheiss HP, ed. *New concepts of viral heart disease*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1988: 325–36.
33. Kühl U, Noutsias M, Seeberg B, et al. Immunohistological evaluation of myocardial biopsies from patients with dilated cardiomyopathy. *J Heart Fail* 1994;9: 231–45.
34. Bowles NE, Kearney DL, Pauschinger M, et al. 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.
35. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005;111: 887-93.
36. Noutsias M, Pauschinger M, Poller WC. Current insights into the pathogenesis, diagnosis and therapy of inflammatory cardiomyopathy. *Heart Fail Monit* 2003;3: 127-35.
37. Satoh M, Akatsu T, Ishikawa Y, et al. Association between toll-like receptor 8 expression and adverse clinical outcomes in patients with enterovirus-associated dilated cardiomyopathy. *Am Heart J*. 2007 ;154: 581-8

38. Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bültmann B, Müller T, Lindinger A, Böhm M. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 2008;118: 639-48.
39. Arbuckle JH, Medveczky MM, Luka J, Hadley SH, Luegmayr A, Ablashi D, Lund TC, Tolar J, De Meirleir K, Montoya JG, Komaroff AL, Ambros PF, Medveczky PG. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107: 5563-8.
40. Matsumori A, Matoba Y, Nishio R, Shioi T, Ono K, Sasayama S. Detection of hepatitis C virus RNA from the heart of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222: 678–682.
41. Frustaci A, Verardo R, Caldarulo M, Acconcia MC, Russo MA, Chimenti C. Myocarditis in hypertrophic cardiomyopathy patients presenting acute clinical deterioration. *Eur Heart J* 2007;28: 733-40.
42. Schramlová J, Arientová S, Hulínská D. The role of electron microscopy in the rapid diagnosis of viral infections. *Folia Microbiol* 2010;55: 88-101.
43. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010;375: 1388-402.
44. Pankuweit S, Hufnagel G, Eckhardt H, et al. Cardiotropic DNA viruses and bacteria in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy with or without inflammation. *Med Klin Munich* 1998;93: 223-8.
45. Suedkamp M, Lissel C, Eiffert H, Flesch M, Boehm M, Mehlhorn U, Thomssen R, de Vivie ER. Cardiac myocytes of hearts from patients with end-stage dilated cardiomyopathy do not contain *Borrelia burgdorferi* DNA. *Am Heart J* 1999;138: 269-272.
46. Magnani JW, Dec GW. Myocarditis, current trends in diagnosis and treatment. *Circulation* 2006;113: 876-90.

47. Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, et al. Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. *Circulation* 2001;104: 39-45.
48. Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, et al. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* 2003;107: 857– 63.
49. Frustaci A, Russo MA, Chimenti C. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study. *Eur Heart J* 2009;30: 1995-2002.
50. Wolf HM, Eibl MM. Immunomodulatory effect of immunoglobulins. *Clin Exp Rheumatol*. 1996;14 Suppl 15: S17-25.
51. Gullestad L, Aass H, Fjeld JG, Wikeby L, Andreassen AK, Ihlen H, Simonsen S, Kjekshus J, Nitter-Hauge S, Ueland T, Lien E, Frøland SS, Aukrust P. Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2001;103: 220-5.
52. McNamara DM, Holubkov R, Starling RC, Dec GW, Loh E, Torre-Amione G, Gass A, Janosko K, Tokarczyk T, Kessler P, Mann DL, Feldman AM. Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2001;103: 2254-9.
53. Stanton C, Mookadam F, Cha S, McNamara D, Aukrust P, Wojnicz R, Bailey KR, Cooper LT. Greater symptom duration predicts response to immunomodulatory therapy in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2008;128: 38-41.
54. Stack WA, Mulcahy HE, Fenelon L, Hegarty JE. Cytomegalovirus myocarditis following liver transplantation. *Postgrad Med J* 1994; 70: 658–60.

55. Lenzo JC, Shellam GR, Lawson CM. Ganciclovir and Cidofovir Treatment of cytomegalovirus-Induced Myocarditis in Mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1444–9.
56. Weinkauff J, Walia R, Berry GJ, Vagelos R, Faul JL. Lymphocytic Myocarditis After Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 1163–5.
57. de Koning J, Hoogkamp-Korstanje JA, van der Linde MR, Crijns HJ. Demonstration of spirochetes in cardiac biopsies of patients with Lyme disease. *J Infect Dis* 1989;160: 150-3.
58. van der Linde MR, Crijns HJ, de Koning J, Hoogkamp-Korstanje JA, de Graaf JJ, Piers DA, van der Galiën A, Lie KI. Range of atrioventricular conduction disturbances in Lyme borreliosis: a report of four cases and review of other published reports. *Br Heart J* 1990;63: 162-8.
59. Gasser R, Fruhwald F, Schumacher M, Seinost G, Reisinger E, Eber B, Keplinger A, Horvath R, Sedaj B, Klein W, Pierer K. Reversal of *Borrelia burgdorferi* associated dilated cardiomyopathy by antibiotic treatment? *Cardiovasc Drugs Ther.* 1996;10: 351-60.
60. Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, et al. 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: 2793–8.
61. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, et al. 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. *Circulation* 2007;116: 2216-33.
62. Sahn DJ, De Maria A, Kisslo J, et al: Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978;58: 1072-83.
63. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ;

Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005;18: 1440-1463.

64. Tumkosit M, Martin CG, Bayram E, Morgan TM, Lane KS, Rerkpattanapipat P, Hamilton CA, Link KM, Hundley WG. Left ventricular spherical remodeling and apical myocardial relaxation: cardiovascular MR imaging measurement of myocardial segments. *Radiology* 2007;244: 411-8.

65. Weyman AE, Doty WD. Left ventricle. In: Weyman AE, ed. *Cross sectional echocardiography*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1982: 267.

66. Appleton CP, Jensen JL, Hatle LK, et al: Doppler evaluation of left and right ventricular diastolic function: a technical guide for obtaining optimal flow velocity recordings. *J Am Soc Echocardiogr* 1997;10: 271-92.

67. Messika-Zeitoun D, Bellamy M, Avierinos JF, Breen J, Eusemann C, Rossi A, Behrenbeck T, Scott C, Tajik JA, Enriquez-Sarano M. Left atrial remodeling in mitral regurgitation: methodologic approach, physiological determinants, and outcome implications: a prospective quantitative Doppler-echocardiographic and electron beam-computed tomographic study. *Eur Heart J* 2007;28: 1773-81.

68. Zoghbi WA, Enriquez-Sarano M, Foster E, et al. Recommendations for evaluation of the severity of native valvular regurgitation with two-dimensional and Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2003;16: 777-802.

69. Bommer W, Weinert L, Neumann A, et al: Determination of right atrial and right ventricular size by two-dimensional echocardiography. *Circulation* 1979;60: 91-100.
70. Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, Hua L, Handschumacher MD, Chandrasekaran K, Solomon SD, Louie EK, Schiller NB. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2010;23: 685-713.
71. Samad BA, Alam M, Jensen-Urstad K. Prognostic impact of right ventricular involvement as assessed by tricuspid annular motion in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2002;90: 778-81.
72. Yock PG, Popp RL. Noninvasive estimation of right ventricular systolic pressure by Doppler ultrasound in patients with tricuspid regurgitation. *Circulation* 1984;70: 657-62.
73. Kircher BJ, Himelman RB, Schiller NB. Noninvasive estimation of right atrial pressure from the inspiratory collapse of the inferior vena cava. *Am J Cardiol* 1990;66: 493-6.
74. Milei J, Bortman G, Fernández-Alonso G, Grancelli H, Beigelman R. Immunohistochemical staining of lymphocytes for the reliable diagnosis of myocarditis in endomyocardial biopsies. *Cardiology* 1990;77: 77-85.
75. Curry A, Appleton H, Dowsett B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future. *Micron* 2006;37: 91-106.
76. Špinar J, Hradec J, Meluzín J, et al. Doporučení pro diagnostiku a léčbu chronického srdečního selhání ČKS 2006. *Cor Vasa* 2007; 49: K5-K34.
77. Zimmermann O, Kochs M, Zwaka TP, Kaya Z, Lepper PM, Bienek-Ziolkowski M, Hoher M, Hombach V, Torzewski J. Myocardial biopsy based classification and treatment in patients with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2005 ;104: 92-100.

78. Iglezias SD, Benvenuti LA, Calabrese F, et al. Endomyocardial fibrosis: pathological and molecular findings of surgically resected ventricular endomyocardium. *Virchows Arch* 2008;453: 233–41.
79. Bowles NE, Ni J, Marcus F, Towbin JA. The detection of cardiotropic viruses in the myocardium of patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2002;39: 892–5.
80. Donoso Mantke O, Meyer R, Prösch S, et al. High prevalence of cardiotropic viruses in myocardial tissue from explanted hearts of heart transplant recipients and heart donors: a 3-year retrospective study from a German patients' pool. *J Heart Lung Transplant* 2005;24: 1632–8.
81. Lotze U, Egerer R, Glück B, Zell R, Sigusch H, Erhardt C, Heim A, Kandolf R, Bock T, Wutzler P, Figulla HR. Low level myocardial parvovirus B19 persistence is a frequent finding in patients with heart disease but unrelated to ongoing myocardial injury. *J Med Virol* 2010 ;82: 1449-57.
82. Bock CT, Klingel K, Kandolf R. Human parvovirus B19-associated myocarditis. *N Engl J Med* 2010;362: 1248-1249.
83. Bartůněk P, Goričan K, Veiser T, Táborský M, Hulínská D. Significance of *Borrelia* infection in development of dilated cardiomyopathy (a pilot study). *Prague Med Rep* 2007;108: 339–347.
84. Lelovas P, Dontas I, Bassiakou E, Xanthos T. Cardiac implications of Lyme disease, diagnosis and therapeutic approach. *Int J Cardiol* 2008;129: 15-21.
85. Keeling PJ, Jeffery S, Caforio AL, Taylor R, Bottazzo GF, Davies MJ, McKenna WJ. Similar prevalence of enteroviral genome within the myocardium from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and controls by the polymerase chain reaction. *Br Heart J* 1992;68: 554 –559.

86. Mahfoud F, Gärtner B, Kindermann M, Ukena C, Gadowski K, Klingel K, Kandolf R, Böhm M, Kindermann I. Virus serology in patients with suspected myocarditis: utility or futility? *Eur Heart J* doi:10.1093/eurheartj/ehq493.
87. Bergler-Klein J, Ullrich R, Glogar D, Stanek G. Lyme borreliosis and cardiomyopathy. *Wien Med Wochenschr.* 1995;145: 196-198
88. Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klempner MS, Krause PJ, Bakken JS, Strle F, Stanek G, Bockenstedt L, Fish D, Dumler JS, Nadelman RB. The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006 ;43: 1089-134.
89. Gasser R, Dusleag J, Reisinger E, Stauber R, Feigl B, Pongratz S, Klein W, Furian C, Pierer K. Reversal by ceftriaxone of dilated cardiomyopathy *Borrelia burgdorferi* infection. *Lancet* 1992;339: 1174-5.

8. Seznam zkratek

A - vlna pozdního transmitrálního průtoku

ADV – adenovirus

Bb – Borrelia burgdorferi

BNP – B-natriuretický peptid

CAR – coxsackie-adenoviral receptor

CD – cluster of differentiation

CMV - cytomegalovirus

CRP – C-reaktivní protein

DKMP – dilatační kardiomyopatie

dTK- diastolický krevní tlak

E – vlna časného transmitrálního průtoku

EBV – virus Epsteina a Barrové

ECM – extracelulární matrix

EDV – end-diastolický objem levé komory

EF – ejekční frakce levé komory

EMB – endomyokardiální biopsie

ESV – end-systolický objem levé komory

HLA- antigeny lidských leukocytů

HHV 6 – lidský herpes virus 6

HPF – high power field

HSV – herpes simplex virus

ICAM – intercellular adhesion molecule

IFN - interferon

IVS – mezikomorové septum

LK – levá komora

LKd – end-diastolický rozměr levé komory

LKs – end-systolický rozměr levé komory

LS- levá síň

LSV- objem levé síně

MHC – major histocompatibility complex

NYHA- klasifikace New York Heart Association

NK – natural killer

PASP- systolický tlak v plicnici

PCR- polymerázová řetězová reakce

PK – pravá komora

PS - pravá síň

PV+ - pozitivní prediktivní hodnota testu

PV- - negativní prediktivní hodnota testu

sTK – systolický krevní tlak

TAPSE – amplituda pohybu volného okraje trikuspidálního anulu

TCR – T cell receptor

TF – tepová frekvence

TNF – tumour necrosis factor

ZKMP – zánětlivá kardiomyopatie

zsLK – zadní stěna levé komory

9. Seznam tabulek a grafů

Tabulka číslo 1 Infekční agens asociovaná s myokarditis.....	9
Tabulka číslo 2 Klinická charakteristika souboru.....	43
Tabulka číslo 3 Echokardiografické parametry souboru.....	45
Tabulka číslo 4 Prevalence genomu virů a <i>Borrelia burgdorferi</i> v EMB.....	48
Tabulka číslo 5 Prevalence virových čeledí a nevirových agens v EMB zjištěných elektronovou mikroskopií.....	49
Tabulka číslo 6 Význam stanovení IgG protilátek pro nález mikrobiálního agens v EMB.....	56
Tabulka číslo 7 Vývoj echokardiografických parametrů jedinců s EMB pozitivitou <i>Borrelia burgdorferi</i> léčených ceftriaxonem.....	59
Tabulka číslo 8 Vývoj echokardiografických parametrů jedinců léčených imunosupresí.....	61
Tabulka číslo 9 Vývoj echokardiografických parametrů jedinců léčených antivirotiky.....	63
Tabulka číslo 10 Vývoj echokardiografických parametrů jedinců bez specifické léčby.....	65
Tabulka číslo 11 Vývoj echokardiografických parametrů jednotlivých podskupin jedinců bez cílené antimikrobiální či imunosupresivní léčby.....	68
Graf číslo 1 Vztah mezi přítomností mikrobiálního agens v EMB a imunohistochemickým vyšetřením.....	54

10. Seznam obrázků

Obrázek číslo 1 Záznam M-mode z parasternální projekce na dlouhou osu.....	34
Obrázek číslo 2 Ukázka stanovení indexu sfericity v apikální čtyřdutinové projekci.....	35
Obrázek číslo 3 Ukázka měření ejekční frakce levé komory v apikální čtyřdutinové projekci....	36
Obrázek číslo 4 Pulzně dopplerovský záznam transmitrálního průtoku získaný z apikální čtyřdutinové projekce.....	37
Obrázek číslo 5 Ukázka významné mitrální regurgitace zachycené barevným dopplerovským mapováním v apikální čtyřdutinové projekci.....	38
Obrázek číslo 6 Elektronmikroskopický obraz záchytu virů čeledi parvoviridae v endomyokardiální biopsii.....	50
Obrázek číslo 7 Ukázka záchytu Borrelie burgdorferi elektronovou mikroskopií v endomyokardiální biopsii.....	51
Obrázek číslo 8 Imunohistochemický průkaz CD 3 pozitivních lymfocytů v endomyokardiální biopsii.....	53

11. Seznam publikací autora

A) Publikace s IF *in extenso*, které jsou ve vztahu k tématu dizertační práce

1) **Kuchynka P**, Paleček T, Hrbáková H, Vítková I, Šimek S, Nemeček E, Aster V, Louch WE, Aschermann M, Linhart A. Herpes simplex virus-induced cardiomyopathy successfully treated with acyclovir. *Wien Klin Wochenschr* 2010;122: 592-595.

(IF 2009 0,955)

2) Paleček T, **Kuchynka P (sdílené první autorství)**, Hulínská D, Schramlová J, Hrbáková H, Vítková I, Šimek S, Horák J, Louch WE, Linhart A. Presence of *Borrelia burgdorferi* in endomyocardial biopsies in patients with new-onset unexplained dilated cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol* 2010;199(2): 139-143.

(IF 2009 3,767)

3) Bělohávek J, **Kuchynka P**, Machala L, Dytrych V, Vítková I, Schramlová J, Šmíd O, Gandalovičová J, Linhart A: Successfully resuscitated sudden cardiac death in a young homosexual male with HIV myocarditis. *Curr HIV Res* 2009;7(4): 434-436.

(IF 2009 1,978)

B) Publikace bez IF *in extenso*, které jsou ve vztahu k tématu dizertační práce

1) **Kuchynka P**, Paleček T, Šimek S, Horák J, Vítková I, Schramlová J, Hulínská D, Aster V, Aschermann M, Linhart A. Komplexní bioptická diagnostika zánětlivé kardiomyopatie jako příčiny nově vzniklého srdečního selhání nejasné etiologie: první zkušenosti. *Cor Vasa* 2009;51(9): 572–577.

2) **Kuchynka P**, Paleček T, Šimek S, Vítková I, Schramlová J, Hulínská D, Aster V, Dostálová G, Sudheera M, Aschermann M, Linhart A. Zánětlivá kardiomyopatie: aktuální pohled na diagnostiku a léčbu. *Cor Vasa* 2009;51(1): 32–37.

3) **Kuchynka P**, Paleček T, Šimek S, Hulínská D, Magage S, Dostálová G, Havránek Š, Linhart A. Zánětlivá kardiomyopatie na podkladě borreliové infekce, bez systémové sérologické odezvy. *Cor Vasa* 2007;49: 426-430.

4) Paleček T, **Kuchynka P**, Šimek S, Horák J, Vítková I, Hulínská D, Schramlová J, Aschermann M, Linhart A. Zánětlivá kardiomyopatie: současný pohled na diagnostiku a léčbu, vlastní zkušenosti. *LL* 2009; 14: 29-32.

C) Publikace s IF *in extenso*, bez vztahu k tématu dizertační práce

1) **Kuchynka P**, Paleček T, Vilikus Z, Havranek S, Taborska K, Louch WE, Linhart A. Cardiac structural and functional changes in competitive amateur cyclists. *Echocardiography* 2010;27(1): 11-16.

(IF 2009 1,444)

2) Paleček T, Bultas J, Hajek M, Karetova D, **Kuchynka P**, Kautzner J, Elleder M, Linhart A: Association between cardiac energy metabolism and gain of left ventricular mass in Fabry disease. *Int J Cardiol* 2010;144: 337-339.

(IF 2009 3,469)

3) Palecek T, Dostalova G, **Kuchynka P**, Karetova D, Bultas J, Elleder M, Linhart A.

Right Ventricular Involvement in Fabry disease. J Am Soc Echocardiogr 2008;21: 1265-1268.

(IF 2008 2,256)

4) Widimsky P, Motovská Z, Simek S, Kala P, Pudil R, Holm F, Petr R, Bílková D, Skalická

H, **Kuchynka P**, Poloczek M, Miklík R, Maly M, Aschermann M; PRAGUE-8 Trial

Investigators. Clopidogrel pre-treatment in stable angina: for all patients >6 h before elective coronary angiography or only for angiographically selected patients a few minutes before PCI? A randomized multicentre trial Prague-8. Eur Heart J 2008;29: 1495-1503.

(IF 2008 8,917)

5) Danzig V, Míková B, **Kuchynka P**, Benáková H, Zima T, Kittnar O, Skrha J, Linhart A,

Kalousová M. Levels of Circulating Biomarkers at Rest and after Exercise in Coronary Artery Disease Patients. Physiol Res 2010;59(3): 385-392.

(IF 2009 1,43)

6) Palecek T, **Kuchynka P**, Linhart A. Treatment of Takotsubo Cardiomyopathy.

Curr Pharm Des 2010;16: 2905-2909.

(IF 2009 4,414)

D) Publikace bez IF *in extenso*, bez vztahu k tématu dizertační práce

1) **Kuchynka P**, Paleček T, Šimek S, Lubanda JC, Elleder M, Špička I, Jansa P, Linhart A. Izolovaná forma srdeční amyloidózy v podobě počínající infiltrativní kardiomyopatie bez restriktivní fyziologie. Vnitř Lék 2008; 54: 1010-1013.

2) **Kuchynka P**, Šimek S, Procházka P, Golář L, Danzig V, Dostál O, Mrázek V, Horák J, Aschermann M, Linhart A. Traumatická disekce koronární tepny jako příčina infarktu myokardu. Interv Akut Kardiol 2006;5:93-94.

3) Šimek S, Šimková R, Dostál O, Skalická H, **Kuchynka P**, Danzig V, Golář L, Linhart A. Poruchy glukózového metabolismu a význam orálního glukózového tolerančního testu u nemocných s akutními koronárními syndromy. Interv Akut Kardiol 2006;5: 174-180.

4) Šimek S, Horák J, Danzig V, **Kuchynka P**, Golář L, Bělohlávek J, Mrázek V, Aschermann M, Linhart A. Akutní koronární syndromy a nová doporučení pro strategii léčby nemocných. Medicína po promoci 2006;1: 66-73.

5) Šimek S, Danzig V, Šimková R, Horák J, **Kuchynka P**, Linhart A. Léčba trombotického uzávěru degenerovaného žilního aortokoronárního bypassu. Kazuistiky v diabetologii 2006 ;2: 10-12.

6) Šimek S, Horák J, Kovárník T, Danzig V, **Kuchynka P**, Golář L, Mrázek V, Aschermann M. Akutní koronární syndromy. Medicína po promoci 2005;3: 63-71.

7) Dostál O, Bělohávek J Kovárník T **Kuchynka P**, Linhart A: Infarkt myokardu u starších pacientů. Kardiologická revue, 2007, 9,: 82-87.

8) Pravečková A, Paleček T, **Kuchynka P**, Lindner J, Linhart A. Primární trikuspidální regurgitace vzniklá v důsledku tupého traumatu hrudníku při autohavárii. Cor Vasa 2009;51: 813–816.

9) Linhart A, **Kuchynka P**. Prevence náhlých kardiovaskulárních úmrtí u sportovců. Kap Kardiol 2010; 2: 17-23.

12. Příložené publikace

1) Palecek T, Kuchynka P, Hulinska D, Schramlova J, Hrbackova H, Vitkova I, Simek S, Horak J, Louch WE, Linhart A. Presence of *Borrelia burgdorferi* in endomyocardial biopsies in patients with new-onset unexplained dilated cardiomyopathy.

Med Microbiol Immunol 2010;199(2): 139-143.

2) Kuchynka P, Palecek T, Hrbackova H, Vitkova I, Simek S, Nemecek E, Aster V, Louch WE, Aschermann M, Linhart A. Herpes simplex virus-induced cardiomyopathy successfully treated with acyclovir. Wien Klin Wochenschr 2010;122: 592-595.

3) Kuchynka P, Paleček T, Šimek S, Horák J, Vítková I, Schramlová J, Hulínská D, Aster V, Aschermann M, Linhart A. Komplexní bioptická diagnostika zánětlivé kardiomyopatie jako příčiny nově vzniklého srdečního selhání nejasné etiologie: první zkušenosti. Cor Vasa 2009;51(9): 572–577.

4) Kuchynka P, Paleček T, Šimek S, Vítková I, Schramlová J, Hulínská D, Aster V, Dostálová G, Sudheera M, Aschermann M, Linhart A. Zánětlivá kardiomyopatie: aktuální pohled na diagnostiku a léčbu. Cor Vasa 2009;51(1): 32–37.