

На правах рукописи

Веревкин Александр Александрович

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И
ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
МИОКАРДА ПРИ ОТТОРЖЕНИИ СЕРДЕЧНОГО
ТРАНСПЛАНТАТА**

14.03.02 – патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России).

Научный руководитель - доктор биологических наук, профессор Славинский Александр Александрович.

Научный консультант - доктор медицинских наук, доцент Космачева Елена Дмитриевна.

Официальные оппоненты:

Кливер Евгений Эдуардович, доктор медицинских наук, заведующий патологоанатомическим отделением федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Тодоров Сергей Сергеевич, доктор медицинских наук, руководитель морфологического отдела клиники федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека», г. Москва.

Защита состоится «__» _____ 2021 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д.208.008.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной научной библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1; <https://www.volgmed.ru/ru/dsovet/thesis/957/>).

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Григорьева Наталья Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Трансплантация сердца (ТС) – наиболее эффективный метод лечения пациентов в терминальной стадии хронической сердечной недостаточности (Кактурский Л.В., 2005, 2007; D'Addio F. et al., 2015; Kaye D.M. et al., 2019). Все реципиенты на разных сроках после операции сталкиваются с проблемой отторжения трансплантата. Острое отторжение и болезнь коронарных артерий пересаженного сердца – факторы, серьезно ограничивающие выживаемость реципиентов (Sánchez-Lacuesta E. et al., 2017; Barten M.J. et al., 2019).

Для предотвращения развития иммунного повреждения пересаженного органа пациенты вынуждены пожизненно получать иммуносупрессивную терапию. Антилимфоцитарные препараты обладают рядом побочных эффектов, среди которых вторичные иммунодефициты, эндокринные нарушения и повреждение печени и почек. Кроме того, эти препараты отличает высокая стоимость (Wang W. et al., 2019). Таким образом, своевременная и точная диагностика реакции отторжения трансплантированного сердца необходима для оптимизации режима иммуносупрессии, что позволит предотвратить как экономические потери, так и нежелательные побочные эффекты у пациентов, что, в свою очередь, позволит увеличить качество и продолжительность их жизни (Voora S. et al., 2019).

Рядом исследователей высказывается необходимость пересмотра и расширения признаков антитело-опосредованного отторжения и введение критериев диагностики смешанного клеточно-гуморального отторжения (Szymańska S. et al., 2015). В качестве возможных иммуногистохимических маркеров смешанного отторжения целесообразно использовать компоненты комплемента, экспрессия которых однозначно отражает антитело-опосредованную реакцию. Возможными дополнительными показателями, отражающими повреждение сердечной мышцы, могут послужить рецепторы комплемента II типа (CR-2, CD21), а также тромбоцитарно-эндотелиальные молекулы клеточной адгезии I типа - PECAM-1, или CD31 (Sosinska-Zawierucha P. et al., 2019).

При визуальной оценке данных эндомикардиальной биопсии неизбежны ошибки, связанные с субъективностью методики. Кроме того, такая оценка не позволяет получить количественную характеристику клеточного инфильтрата (Di Donato G. et al., 2017). В связи с этим целесообразным представляется применение компьютерной морфометрии с разработкой алгоритмов автоматического и полуавтоматического морфометрического анализа изображений клеток и тканей, а также количественных критериев повреждения миокарда.

Таким образом, необходим поиск новых критериев смешанного клеточно-гуморального отторжения, а также уточнение количественных критериев антитело-опосредованного отторжения. Целесообразна разработка алгоритма компьютерной морфометрии, позволяющего дать количественную характеристику реакции отторжения в полуавтоматическом или автоматическом режиме.

Степень разработанности темы

Для диагностики отторжения трансплантированного сердца используют критерии, предложенные Международным обществом трансплантации сердца и легких. В рамках этих критериев процесс подразделяется на две формы: клеточное отторжение, имеющее четыре степени тяжести – 0R, 1R, 2R или 3R (Рекомендации Международного общества трансплантации сердца и лёгких, 2010) и антитело-опосредованное отторжение трансплантата, или AMR (Antibody-mediated rejection), связанное с наличием в очаге деструкции кардиомиоцитов C4d – компонента комплемента (Szymańska S. et al., 2015). Для оценки формы и степени тяжести отторжения применяют иммуногистохимическую диагностику эндомикардиальных биоптатов, в ходе которой осуществляют фенотипирование основных компонентов клеточного воспалительного инфильтрата (CD3-позитивных Т-лимфоцитов, CD20-позитивных В-лимфоцитов, CD68-позитивных макрофагов), а также обнаружение депозитов компонента комплемента C4d. Диагностика смешанного отторжения – явления, сочетающего в себе признаки и клеточной, и антитело-опосредованной реакции, – строится на оценке срезов только после рутинной окраски без применения стандартного протокола иммуногистохимического исследования (Nery A.A. et al., 2013).

Диагностика с применением методики компьютерной морфометрии основывается в основном на оценке плотности сосудистого русла трансплантата и не включает в себя количественную характеристику компонентов клеточного воспалительного инфильтрата или патоморфологических изменений. Существует подход к дифференциальной диагностике эффекта Quilty и реакции отторжения трансплантата, связанный с компьютерным анализом изображения.

Цель исследования – охарактеризовать патоморфологические и иммунофенотипические изменения в миокарде при различных формах отторжения пересаженного сердца с применением компьютерной морфометрии для количественного анализа эндомикардиальных биоптатов.

Задачи исследования:

1. Разработать и охарактеризовать наиболее ранние морфологические и иммуногистохимические признаки клеточного отторжения сердечного трансплантата.

2. Определить диагностическую значимость экспрессии эндотелиальных молекул адгезии CD31 при клеточном, антитело-опосредованном и смешанном клеточно-гуморальном отторжении пересаженного сердца, а также её связь с состоянием эндотелия сосудистого русла трансплантата.
3. Охарактеризовать состав и иммунофенотипические особенности клеточных коопераций в воспалительном инфильтрате миокарда пересаженного сердца при различных формах его отторжения.
4. Оценить связь между уровнем экспрессии рецептора комплемента CD21 и выраженностью фиброза в миокарде пересаженного сердца при различных формах отторжения.
5. Выявить активацию комплемента по изменению экспрессии его плазменных компонентов C3d и C4d и установить влияние этого процесса на повреждение миокарда при клеточном отторжении пересаженного сердца.
6. Разработать алгоритм компьютерного морфометрического имидж-анализа тканевых структур для объективной количественной оценки эндомиокардиальных биоптатов.

Научная новизна

1. Установлено, что наиболее ранним признаком начинающегося клеточного отторжения пересаженного сердца является снижение экспрессии эндотелиальных молекул клеточной адгезии CD31 в сочетании с появлением стеатоза кардиомиоцитов.
2. Получены новые количественные данные о клеточном составе воспалительного инфильтрата в миокарде, характеризующие форму и степень тяжести отторжения сердечного трансплантата.
3. Впервые установлено, что возрастание экспрессии рецептора комплемента CD21 сопровождается увеличением интенсивности фиброза в миокарде сердечного трансплантата, что может быть использовано в качестве предиктора развития хронической сердечной недостаточности у реципиентов сердца.
4. Впервые показано, что повышение экспрессии плазменных компонентов комплемента C3d и C4d, отражающее активацию системы комплемента, предшествует возрастанию интенсивности некроза в миокарде пересаженного сердца как при антитело-опосредованном, так и при клеточном отторжении.

Теоретическая и практическая значимость.

Полученные данные имеют теоретическое значение для уточнения патогенеза различных форм отторжения сердечного трансплантата. Эти результаты целесообразно использовать в образовательном процессе при подготовке врачей-патологоанатомов,

кардиохирургов и кардиологов. В клинической практике результаты исследования могут быть применены для повышения точности эндомиокардиальной биопсийной диагностики формы и степени тяжести отторжения сердечного трансплантата. Разработанный алгоритм компьютерного морфометрического анализа изображения тканевых структур позволяет получить объективную количественную характеристику компонентов воспалительного клеточного инфильтрата, а также распространенности патологических процессов в миокарде.

Диссертационное исследование выполнено в рамках комплексной научно-исследовательской работы кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России АААА-А18-118110890085-6 «Паренхиматозно-стромальные взаимодействия и межклеточные кооперации в реакциях воспаления и отторжения трансплантата» от 08.11.2018.

Методология и методы исследования:

1. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование: определение выраженности некроза, кровоизлияний, стеатоза и фиброза; определение клеток, экспрессирующих антигены CD3, CD20, CD21, CD31, CD68, а также оценка экспрессии в тканях C3d и C4d.
2. Компьютерная морфометрия с целью определения количественных показателей инфильтрата (количество отдельных клеточных элементов, площадь инфильтрата, площадь фиброза) с помощью специального программного обеспечения.
3. Статистические методы исследования: статистический анализ данных с помощью персонального компьютера и необходимого программного обеспечения (MedCalc Statistical Software version 19.1.2, Бельгия).

Положения, выносимые на защиту:

1. При отсутствии морфологических и иммуногистохимических признаков отторжения в трансплантате пересаженного сердца выявляется наиболее высокий уровень экспрессии эндотелиальных молекул клеточной адгезии CD31. Наиболее ранние признаки клеточного отторжения трансплантата – снижение экспрессии CD31 с появлением стеатоза кардиомиоцитов. Величина экспрессии молекул CD31 продолжает снижаться с нарастанием тяжести отторжения и сопровождается прогрессирующим развитием кровоизлияний в сердечной мышце.
2. Отторжение трансплантированного сердца сопровождается формированием в воспалительном инфильтрате миокарда клеточных коопераций, в которых участвуют Т-лимфоциты, В-лимфоциты, макрофаги и нейтрофильные гранулоциты. При всех формах отторжения преобладают Т-лимфоциты, однако по мере возрастания тяжести

отторжения их относительное содержание уменьшается, а доля В-лимфоцитов, макрофагов и нейтрофильных гранулоцитов увеличивается.

3. Выраженность фиброза в миокарде пересаженного сердца имеет высокую прямую зависимость ($R=0,81$) от величины экспрессии рецептора комплемента CD21, что может быть связано с увеличением продолжительности жизни В-лимфоцитов, вырабатывающих факторы роста фибробластов. Возрастание экспрессии CD21 по мере нарастания тяжести отторжения можно использовать в качестве предиктора развития хронической сердечной недостаточности у реципиентов сердца.

4. Повышение экспрессии плазменных компонентов комплемента C3d и C4d в миокарде пересаженного сердца отражает активацию системы комплемента и сопровождается возрастанием интенсивности некроза как при антитело-опосредованном, так и при клеточном отторжении.

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточной эмпирической базой (56 реципиентов сердца, 1340 гистологических препаратов), адекватным статистическим анализом полученных данных, а также наличием публикаций, подробно описывающих методику и результаты, полученные при выполнении исследования. Основные положения диссертации соответствуют пп. 1, 2, 3 и 4 паспорта специальности «Патологическая анатомия».

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 4 в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, а также одна – в журнале, индексируемом в базе Scopus. Материалы исследования представлены на конференциях «Современные проблемы клинической медицины» (Прага, Чехия, 2017), «Инновационные медицинские технологии» (Москва, 2018), UK-Russia Young Medics Conference (Москва, 2019). Получен патент на изобретение «Способ ранней диагностики отторжения трансплантата».

Реализация результатов исследования

Основные результаты работы внедрены в практику работы патологоанатомического отделения ГБУЗ «НИИ – ККБ №1 им. проф. С.В.Очаповского», патологоанатомического отделения ГБУЗ «Краевая клиническая больница №2» (все – г. Краснодар), а также морфологического отдела клиники Ростовского государственного медицинского университета. Научные положения диссертации используются в образовательном процессе на кафедрах патологической

анатомии и патологической физиологии Кубанского государственного медицинского университета.

Личный вклад автора

Автором проведён анализ отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Автор также самостоятельно осуществил микроскопию и фотографирование гистологических препаратов, разработал алгоритм морфометрического анализа и выполнил статистическую обработку полученных данных. Текст диссертации написан автором на 95%, научные публикации по теме исследования – на 70%.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы, а также приложения. Использовано 224 литературных источников, из них 35 – отечественных авторов. Диссертация изложена на 138 страницах, содержит 18 таблиц и 57 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Диссертационное исследование выполнено на архивном материале патологоанатомического отделения НИИ - ККБ №1. Для получения биологического материала от больных использовали эндомикардиальную биопсию (рисунок 1). Данную процедуру проводили кардиохирурги в соответствующих отделениях Центра грудной хирургии НИИ - ККБ №1. При этом проведение эндомикардиальной биопсии выполняли в рамках протокола ведения реципиентов после трансплантации сердца в сроки, установленные клиническими рекомендациями.



Рисунок 1. Дизайн исследования.

Полученные фрагменты миокарда фиксировали в 10% растворе формалина, после чего осуществляли проводку в парафин по стандартной методике. С помощью ротационного микротомы получили срезы толщиной 5 мкм, которые окрасили гематоксилином-эозином и пикрофуксином по ван Гизону. Для выявления липидных включений окрасили суданом III замороженные срезы. Иммуногистохимическое исследование выполнили с использованием первичных антител к маркерам CD3, CD20, CD21, CD31, CD68 и к компонентам комплемента C3d и C4d (Abcam, Великобритания). В качестве системы детекции использовали DAB-хромаген.

Для проведения морфометрического анализа применили программное обеспечение с открытым исходным кодом ImageJ (US National Institutes of Health, США) и фотографии препаратов с увеличением объектива x20 или x40. Во всех случаях проводили измерение общей площади биоптата. Для препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, осуществляли измерение суммарной площади очагов некроза, кровоизлияний, а также количество клеточных элементов в инфильтрате. Оценивали выраженность стеатоза кардиомиоцитов, под которым подразумевалось наличие неокрашенных вакуолей в цитоплазме клеток (Коржевский Д.Э., 2014). В случае препаратов, окрашенных по ван Гизону, оценивали суммарную площадь фиброза. После проведения иммуногистохимических реакций определяли площадь, занимаемую иммунореактивным продуктом в клеточном инфильтрате. Критерием интенсивности иммуногистохимической реакции или выраженности патологического процесса служил коэффициент площади окрашивания (КПО) – отношение суммарной площади цветного продукта окрашивания к общей площади биоптата, выраженное в процентах (Веревкин А.А. и соавт., 2017; Чуприненко Л.М. и соавт., 2020).

Разработаны три алгоритма компьютерной морфометрии: для определения относительной площади патологических изменений (некроз, кровоизлияния, фиброз, стеатоз), для определения количества клеток на единицу площади среза, а также для определения выраженности иммуногистохимических реакций.

1) Алгоритм компьютерного морфометрического анализа изображений клеточных и тканевых структур на срезах, окрашенных гематоксилином-эозином и другими гистологическими красителями, предназначенный для выявления относительной площади патологических изменений (некроз, фиброз, кровоизлияния, стеатоз). Площадь патологических изменений и общую площадь биоптата определяют с помощью инструмента «ручное выделение».

2) Алгоритм компьютерного морфометрического анализа изображений клеточных структур на срезах, окрашенных гематоксилином-эозином и другими

гистологическими красителями, и предназначенный для выявления количества клеток (на единицу площади среза биоптата). Подсчёт клеток выполняют с помощью инструмента «анализатор частиц», а определение площади – с помощью «ручного выделения».

3) Алгоритм компьютерного морфометрического анализа изображений клеточных и тканевых структур для оценки выраженности иммуногистохимических реакций. Обработку изображения «анализатором частиц» выполняют после бинаризации изображения по цвету.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью статистических инструментов программы MedCalc Statistical Software version 19.1.3. Характер распределения выборочных значений проверили с использованием W-критерия Шапиро-Уилка. Средние значения вариационных рядов в различных выборках, характеризующих один исследуемый признак, сравнивали попарно со значением группы 0R (отсутствие отторжения). Для определения достоверности различия вариационных рядов использовали T-критерий Крамера-Уэлча. Для оценки взаимосвязи между различными показателями у одних и тех же больных внутри отдельных групп использован линейный и нелинейный корреляционный анализ. Для оценки степени влияния связанных признаков друг на друга определяли коэффициент линейной регрессии и частный коэффициент эластичности для средних значений сопоставляемых выборок.

Результаты исследования

Формы и степени тяжести отторжения установлены согласно рекомендациям Международного общества трансплантации сердца и легких (ISHLT). Степень отторжения 0R определена в 92 биоптатах (клеточная инфильтрация отсутствует или представлена единичными элементами, признаков повреждения кардиомиоцитов нет). Лёгкое отторжение (1R) выявлено в 90 биоптатах (единичные локусы повреждения мышечных клеток с одним очагом лимфомакрофагальной инфильтрации). В 41 биоптатах отмечено отторжение 2R (множественные локусы эндомиокардиального повреждения в ассоциации с очагами лимфомакрофагальной инфильтрации). В 17 биоптатах обнаружены признаки отторжения 3R (диффузная инфильтрация лимфоцитами и макрофагами, присутствие нейтрофильных гранулоцитов, очаги кровоизлияний). В 17 образцах выявлено антитело-опосредованное отторжение (AMR): выраженный отек, васкулит и интравасальное скопление макрофагов.

Для оценки выраженности патоморфологических изменений (некроз, кровоизлияния, фиброз и стеатоз) использован морфометрический алгоритм №1,

определение количества клеточных элементов инфильтрата на единицу площади проводили с помощью морфометрического алгоритма №2. Для оценки выраженности иммуногистохимических реакций использовали алгоритм компьютерной морфометрии №3.

Выраженность кровоизлияний (КПО) в биоптатах с 1R в 2,3 раза превышает таковую при 0R ($p<0,05$). При 2R этот показатель в 5,2 раза выше, чем в 1R ($p<0,05$). В биоптатах с отторжением третьей степени площадь кровоизлияний в полтора раза превосходит значение 2R ($p<0,05$). Гуморальное отторжение характеризуется умеренно выраженным кровоизлиянием, площадь которого сопоставима с аналогичным показателем для 1R.

При отсутствии отторжения в препаратах некроз выявить не удалось. При умеренно выраженном отторжении площадь некротических изменений в 165 раз больше, а при тяжёлом клеточном отторжении – в 580 раз больше площади, занимаемыми этим же патологическим процессом при лёгком отторжении ($p<0,05$). Умеренно выражены некротические изменения при антитело-опосредованном отторжении: данный показатель в 2,5 раза меньше такового при тяжёлом ACR ($p<0,05$).

Выраженность фиброза имеет наименьшее значение в биоптатах с нулевой степенью отторжения и составляет 2,36%. Повышение этого показателя в 1,6 раза отмечается в биоптатах с 1R и в 3,7 – с 2R ($p<0,05$). Для биоптатов с 3R этот показатель составляет 4,5%. Значительно сильнее склеротические изменения выявляются в биоптатах с AMR – в них данный показатель выше показателя тяжёлого клеточного отторжения в 2,5 раза ($p<0,05$). Меньшее значение в случае тяжёлого клеточного процесса по сравнению с умеренным свидетельствует, по-видимому, о более остром течении воспалительной реакции в первом случае.

Стеатоз кардиомиоцитов появляется уже при нулевой степени тяжести отторжения, где его величина составляет 0,16%. Необходимо отметить, что он имеет наибольшую выраженность среди всех морфологических признаков повреждения миокарда в биоптатах с 1R. Так, некротические изменения для легкой степени отторжения не характерны, а кровоизлияния носят единичный характер и, по-видимому, связаны с процедурой эндомиокардиальной биопсии, как и в случае 0R. Фиброз в той или иной мере выражен во всех образцах, в том числе и при 0R, в отличие от стеатоза, который в ткани миокарда при отсутствии отторжения не выявлен. Наибольшее значение КПО стеатоза отмечено при третьей степени отторжения, для второй степени этот показатель меньше на 10% ($p<0,05$).

Промежуточное положение между значениями 3R и 2R занимает показатель КПО стеатоза в биоптатах с AMR.

Нейтрофильные гранулоциты присутствуют во всех биоптатах независимо от вида и степени тяжести отторжения. Однако в случае 0R их количество незначительно и они, вероятнее всего, представляются случайной находкой. При слабо выраженном отторжении их содержание повышается уже в 4,2 раза, а при умеренно выраженном – в 15 раз ($p < 0,05$). Наибольшее содержание нейтрофильных гранулоцитов – 11,5 клеток на 1 мм² – наблюдается при тяжёлом отторжении ($p < 0,05$). При AMR их содержание сопоставимо со степенью 1R. Макрофаги также обнаруживаются при любой форме ОТС. Их количество практически одинаково при 0R и 1R. Однако при умеренно выраженном отторжении эта величина повышается в полтора раза, а при тяжёлом и антитело-опосредованном – в 2,5 и 3, соответственно ($p < 0,05$). Лимфоциты в незначительных количествах обнаруживались в биоптатах при отсутствии отторжения, на 50% их содержание увеличено в случае 1R, в 3 раза эта величина возростала при умеренно выраженном отторжении, в пять – при тяжёлом ($p < 0,05$). В случае AMR содержание лимфоцитов было на 13% больше, чем при 3R ($p < 0,05$).

Мембранный белок CD3, служащий одним из основных компонентов Т-клеточного рецептора, характеризовался диффузным расположением на поверхности клеток. Положительный сигнал был зафиксирован при исследовании всех биоптатов. Экспрессия CD3 (КПО) составляла 1% при 0R, далее этот показатель возрастал в два раза при 1R ($p < 0,05$), в три – в случае 2R ($p < 0,05$), в 5,5 раз – при 3R ($p < 0,05$). При AMR эта величина занимает промежуточное положение между таковыми для 2R и 3R.

В-лимфоцитарный корецептор (CD20) характеризуется мембранной локализацией. Единичные CD20-позитивные клетки диффузно располагались практически во всех полях зрения большинства, исследованных биоптатов. Экспрессия CD20 была низкой во всех изученных биоптатах. С нарастанием степени тяжести отторжения эта величина всякий раз увеличивалась на 50% ($p < 0,05$), однако в случае AMR отмечалось двукратное повышение величины КПО положительно прореагировавшей области биоптата в сравнении с 3R ($p < 0,05$). Таким образом, наибольшую долю клеточных элементов В-лимфоциты образовывали при антитело-опосредованном отторжении.

Кластер дифференцировки CD68 представляет собой гликопротеид макросиалин, который формирует главный рецептор моноцитов и макрофагов. В

нашем исследовании положительный сигнал CD68 разной интенсивности был получен во всех биоптатах. Экспрессия макросиалина (КПО) при 0R составила 0,34%, при 1R она увеличивалась в 2,7 раза, при 2R – в 3,97 раза ($p < 0,05$). При тяжёлом отторжении этот показатель больше аналогичного при 0R в 9,6 раза ($p < 0,05$). КПО инфильтрата, образованного CD68+ клетками, при антитело-опосредованном отторжении был сопоставим с таковой при 2R. Таким образом, наибольшее содержание макрофагов характеризует тяжёлое клеточное отторжение. Иммуноморфологическая картина распределения Т-лимфоцитов и макрофагов в миокарде при отторжении трансплантата представлена на рисунке 2.

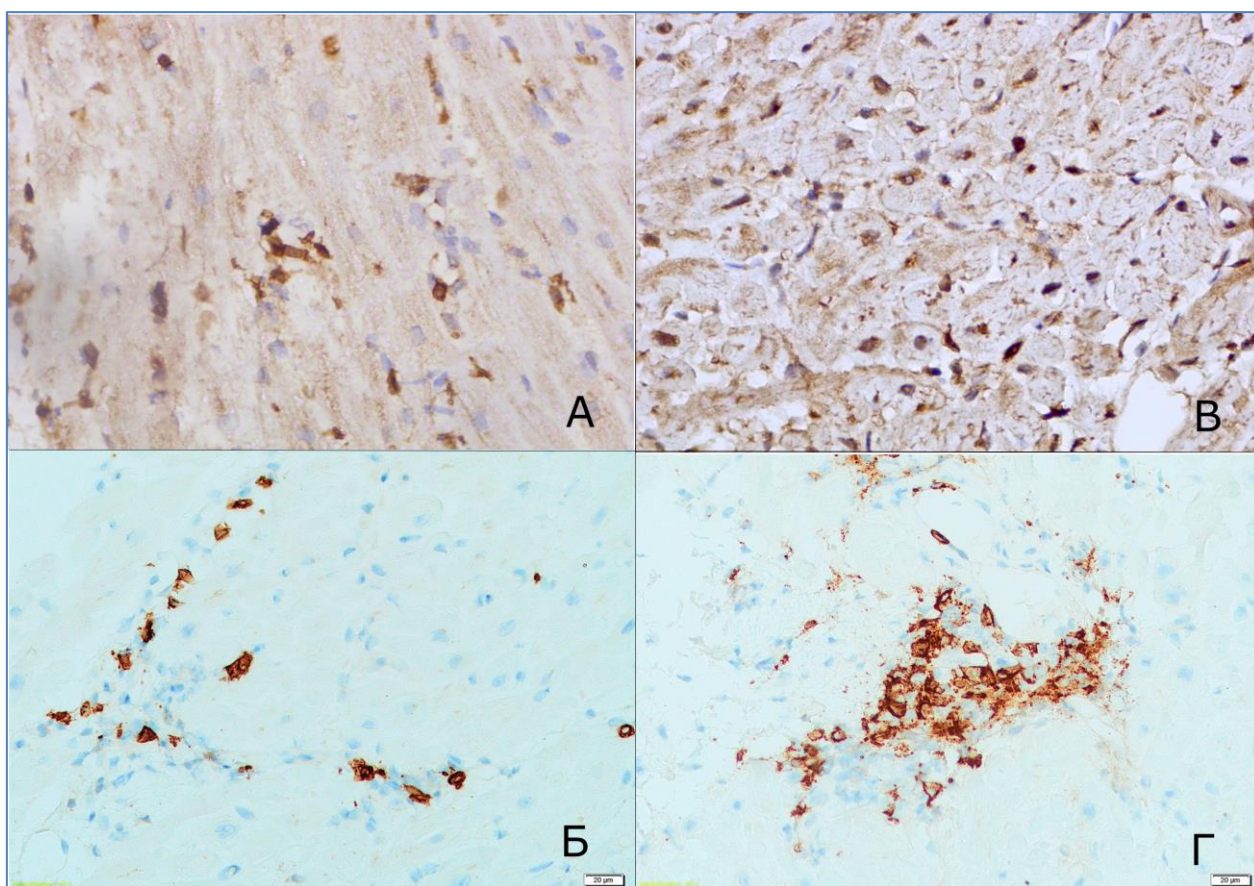


Рисунок 2. Низкая экспрессия маркеров Т-лимфоцитов CD3+ (А) и макрофагов CD68+ (Б) при легком отторжении; значительное скопление Т-лимфоцитов (В) и макрофагов (Г) при тяжёлом отторжении 3R. Иммуногистохимическая реакция, DAB-хромаген, ув. об. x40.

Компонент комплемента C3d представляет собой продукт активации белка C3, служащий для взаимодействия с рецепторами В-лимфоцитов и может формировать диффузные отложения в очаге воспаления. Он присутствовал в незначительных количествах во всех биоптатах. Охватываемая депозитами C3d площадь среза практически не изменялась в зависимости от степени тяжести отторжения вплоть до тяжёлого клеточного отторжения, где его КПО повышается в 2,9 раза в сравнении с

0R ($p<0,05$). Ещё большее значение КПО C3d принял в случае AMR, где он в 3,3 раза превышает аналогичный показатель при 0R ($p<0,05$).

Компонент комплемента C4d также характеризуется диффузной экспрессией в очагах воспаления. Внеклеточная локализация, преимущественно под базальной мембраной эндокарда или эндотелия сосудов, отмечалась во всех биоптатах. Коэффициент площади окрашивания этого компонента комплемента умеренно – на 10-20% – возрастал по мере увеличения тяжести клеточной воспалительной реакции и составлял 0,56% при 0R. Однако же в случае антитело-опосредованного отторжения данная величина была выше в 4 раза по сравнению с 3R ($p<0,05$). Депозиты C4d при этом носили диффузный характер и располагались не только периваскулярно, но и между кардиомиоцитами.

Рецептор комплемента 2 типа (CD21) представляет собой трансмембранный белок, поэтому в гистологических препаратах он располагался на поверхности клеток. Указанное вещество обнаружено во всех биоптатах. Экспрессия CD21 повышается с нарастанием степени тяжести отторжения. Его экспрессия составляла 0,31% в образцах с 0R, затем она повышалась при 1R в 3,5 раза, при отторжении 2R – в 6,5 раз, а при 3R – уже в 13,4 раза ($p<0,05$). Наибольший коэффициент площади окрашивания отмечен в биоптатах с антитело-опосредованным отторжением, где он в 22 раза превосходит эту величину в образцах с 0R ($p<0,05$).

Тромбоцитарно-эндотелиальные молекулы клеточной адгезии (PECAM-1, или CD31) характеризуются мембранной локализацией на поверхности эндотелиальных клеток, а также незначительным распространением в строме миокарда. Минимальное количество данного кластера дифференцировки выявлено и на поверхности иммунокомпетентных клеток – макрофагов и лимфоцитов. Неожиданные результаты получены при оценке экспрессии молекулы CD31. Этот показатель снижается с повышением выраженности иммунного воспалительного процесса в миокарде. Так, в биоптатах пациентов без отторжения занимаемая CD31-позитивными клетками площадь составляет 3,49%, при отторжении 1R этот показатель уменьшается в 1,3 раза, в биоптатах с 2R этот показатель меньше в 1,8 раза, а для образцов с 3R – в 2,6 раза ($p<0,05$). Наконец, при антитело-опосредованном отторжении эта величина достигает своего минимума в 0,84% площади биоптата ($p<0,05$). В таблице 1 представлены значения выраженности патологических изменений и КПО иммуногистохимических маркеров при различных формах и степенях тяжести отторжения.

Для оценки взаимосвязи между интенсивностью фиброза и экспрессией рецептора комплемента 2 типа (CD21) произведен корреляционно-регрессионный анализ и определение коэффициента корреляции ($R=0,81$), корреляционного отношения ($\eta=0,8$) и коэффициента эластичности интенсивности фиброза ($\Theta=0,34\%$). Высокое значение коэффициента корреляции говорит о сильной положительной связи кардиосклероза и экспрессии CD21, то есть повышение экспрессии CD21 вызывает усиление кардиосклероза (рисунок 3).

Таблица 1. Количественная характеристика различных форм / степеней тяжести отторжения трансплантированного сердца.

Признак / маркер	0R	1R	2R	3R	AMR
Признаки повреждения миокарда					
Кровоизлияния	0,83±0,11	1,91±0,2*	9,89±0,61*	13,34±1,03*	3,20±0,07*
Некроз	0	0,03±0,01*	4,95±0,56*	17,40±0,70*	7,32±0,24*
Стеатоз	0,16±0,05	5,88±0,30*	14,70±0,90*	16,50±2,23*	15,24±2,81*
Фиброз	2,36±0,24	3,80±0,37*	8,69±0,77*	4,50±0,17*	10,03±0,60*
Иммуногистохимические маркеры лейкоцитов					
CD3	0,99±0,02	2,03±0,06*	3,41±0,10*	5,45±1,00*	4,75±0,33*
CD20	0,19±0,01	0,52±0,02*	0,65±0,03*	0,84±0,21*	1,80±0,22*
CD68	0,34±0,01	0,92±0,03*	1,35±0,05*	3,26±0,69*	1,40±0,31*
Иммуногистохимические маркеры системы комплемента					
C3d	0,60±0,02	0,66±0,02*	0,72±0,03*	1,72±0,14*	1,98±0,11*
C4d	0,56±0,02	0,65±0,02*	0,70±0,04*	0,86±0,10*	3,72±0,16*
Дополнительные иммуногистохимические маркеры					
CD21	0,31±0,01	1,09±0,08*	2,01±0,10*	4,15±0,20*	6,80±0,51*
CD31	3,49±0,12	2,72±0,09*	1,95±0,05*	1,34±0,10*	0,84±0,18*

Примечание: * - $p<0,05$ в сравнении с группой 0R.

При этом корреляционное отношение CD21/фиброз составляет 0,8, в то время как отношение фиброз/CD21 равно 0,2, исходя из чего, можно предположить, что повышение уровня экспрессии CD21 приводит к нарастанию интенсивности кардиосклероза, а не наоборот. Коэффициент детерминации $\eta^2=64\%$ указывает на то, что развитие кардиосклероза в наблюдаемых условиях на 64% зависит от экспрессии рецептора комплемента CD21. Значение коэффициента эластичности 0,34% свидетельствует о несимметричном характере описываемой связи (при возрастании экспрессии рецептора комплемента на 1% интенсивность фиброза увеличивается на 0.34%).

Статистический анализ корреляционно-регрессионной взаимосвязи экспрессии плазменных компонентов комплемента C3d и C4d и распространенности некроза выявил для компонента C3d коэффициент корреляции $R=0,77$. Можно заключить, что между экспрессией C3d и выраженностью некротических изменений существует сильная прямая связь. При этом корреляционное отношение C3d/некроз составило $\eta=0,69$, а соотношение некроз/C3d $\eta=0,07$, таким образом, величина экспрессии отражает выраженность некротических изменений.

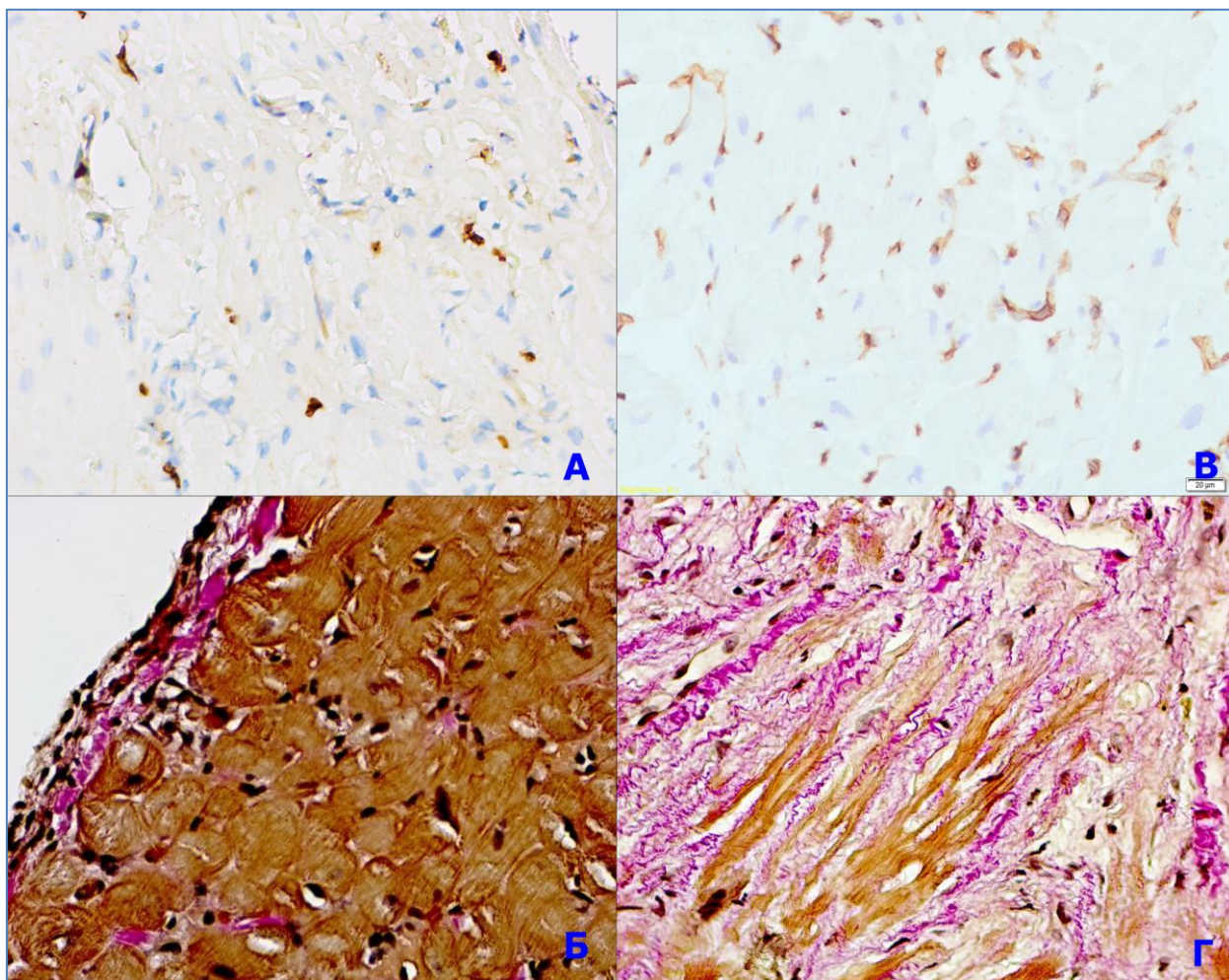


Рисунок 3. Незначительный фиброз миокарда (Б) при низкой экспрессии CD21 (А); диффузный кардиосклероз (Г) при высоком уровне экспрессии CD21 (В). А, В – иммуногистохимическая реакция, DAB-хромаген; Б, Г - пикрофуксин по Ван Гизону. Ув. об. х 40.

Коэффициент эластичности $\Theta=18,5\%$, следовательно, при повышении экспрессии C3d на 1% происходит увеличение выраженности некроза на 18,5%. Коэффициент корреляции для компонента C4d $R=0,79$ указывает на наличие между экспрессией C4d и выраженностью некроза сильной прямой связи. Корреляционное соотношение C4d/некроз составило $\eta=0,70$, а соотношение некроз/C4d $\eta=0,01$, то есть выраженность некроза зависит от экспрессии C4d. Коэффициент эластичности

$\Theta=20,1\%$, следовательно при повышении экспрессии C4d на 1% КПО некроза увеличивается на 20,1%. Коэффициент детерминации для C3d: $\eta^2=47\%$, а для C4d: $\eta^2=49\%$. Увеличение выраженности некротических изменений на 47% зависит от экспрессии C3d и на 49% - от экспрессии C4d. Таким образом, повышение экспрессии компонентов комплемента отражает выраженность некротических изменений в сердечной мышце.

Заключение

Проведенное исследование позволило представить количественную характеристику патологических процессов в ходе реакции отторжения сердечного трансплантата, что направлено на повышение точности биопсийной диагностики. Полученные в ходе исследования данные свидетельствуют о том, что наиболее ранним патогистологическим признаком отторжения трансплантированного сердца служит стеатоз наряду со снижением экспрессии маркера CD31 – тромбоцитарно-эндотелиальных молекул клеточной адгезии. Выраженность стеатоза косвенно отражает состояние сосудистого русла трансплантата, поскольку при повреждении стенок сосудов ухудшается перфузия сердечной мышцы и происходит нарушение энергетического обмена в кардиомиоцитах.

О дисфункции эндотелия кровеносных сосудов сердечной мышцы говорит снижение экспрессии маркера CD31 – тромбоцитарно-эндотелиальных молекул клеточной адгезии, отражающих нормальное межклеточное взаимодействие. Уменьшение содержания CD31 отмечается уже на ранних стадиях процесса отторжения, когда ещё отсутствуют морфологические признаки васкулита.

Другим отражением дисфункции стенки кровеносного сосуда служат кровоизлияния, интенсивность которых по мере нарастания тяжести отторжения усиливается наряду со снижением экспрессии CD31 (рисунок 4). Незначительная выраженность кровоизлияний при антитело-опосредованном отторжении может быть объяснена преобладанием склеротических изменений, в частности, периваскулярным фиброзом миокарда.

В процессе смешанного отторжения принимают участие не только макрофаги и лимфоциты, но и нейтрофильные гранулоциты, а также компоненты комплемента C3d и C4d. Величина экспрессии C3d и C4d компонентов находится в тесной связи с выраженностью некротических изменений в сердечной мышце.

Об этом свидетельствуют высокие показатели корреляции и корреляционного отношения. Для компонента комплемента C3d $R=0,7$, $\eta=0,69$. Для компонента комплемента C4d эти показатели составили $R=0,77$, $\eta=0,7$. При этом, исходя из высокого

коэффициента эластичности ($\Theta=20,1\%$ для C3d и $\Theta=18,5\%$ для C4d), можно утверждать, что даже незначительное повышение экспрессии C3d и C4d приводят к резкому увеличению интенсивности некроза, особенно в случае клеточного отторжения. Таким образом, экспрессию C3d и C4d можно использовать для прогнозирования развития некротических изменений в сердечной мышце, ведущих к сердечной недостаточности и потере трансплантата.

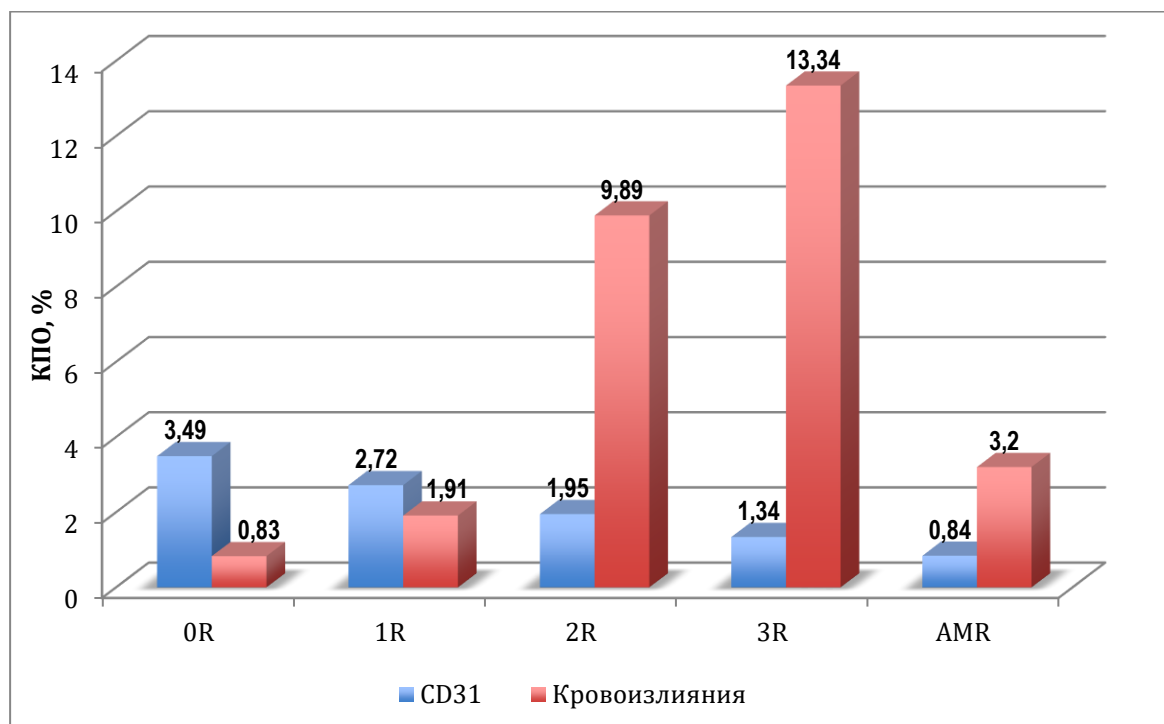


Рисунок 4. Взаимосвязь между экспрессией CD31 и выраженностью кровоизлияний при отторжении трансплантированного сердца (КПО, %).

Реакция отторжения трансплантированного сердца сопровождается формированием в миокарде трансплантата клеточных коопераций, основными участниками которых выступают макрофаги, а также Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Нейтрофильные гранулоциты включаются в эти кооперации лишь при тяжёлом клеточном или антитело-опосредованном отторжении, и их роль, по-видимому, связана с развитием демаркационного воспаления в ответ на вторичное повреждение сердечной мышцы. Независимо от формы и степени тяжести процесса преобладающей клеткой является Т-лимфоцит. Кооперации иммунокомпетентных клеток при тяжёлом клеточном отторжении трансплантата характеризуется преобладанием Т-лимфоцитов, а при антитело-опосредованном – равномерным содержанием Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. При этом относительное содержание Т-лимфоцитов при нарастании тяжести отторжения уменьшается, а доля В-лимфоцитов и макрофагов – увеличивается.

Повышение экспрессии рецептора комплемента 2 типа связано с нарастанием кардиосклероза (рисунок 5). Корреляционно-регрессионный анализ выявил сильную связь между данными показателями ($R=0,81$). Корреляционное соотношение CD21/фиброз составило 0,8, а коэффициент детерминации 64%. Таким образом, повышение экспрессии CD21 влияет на возрастание выраженности фиброза на 64%. Увеличение интенсивности кардиосклероза связано с угнетением апоптоза В-лимфоцитов, вырабатывающих факторы роста фибробластов. Полученные данные согласуются и с увеличением интенсивности фиброза в ответ на активацию системы комплемента, поскольку C3 и C4 компоненты комплемента являются лигандами для рецептора CD21. Это позволяет использовать экспрессию CD21 в качестве прогностического маркера позднего повреждения сердечной мышцы.

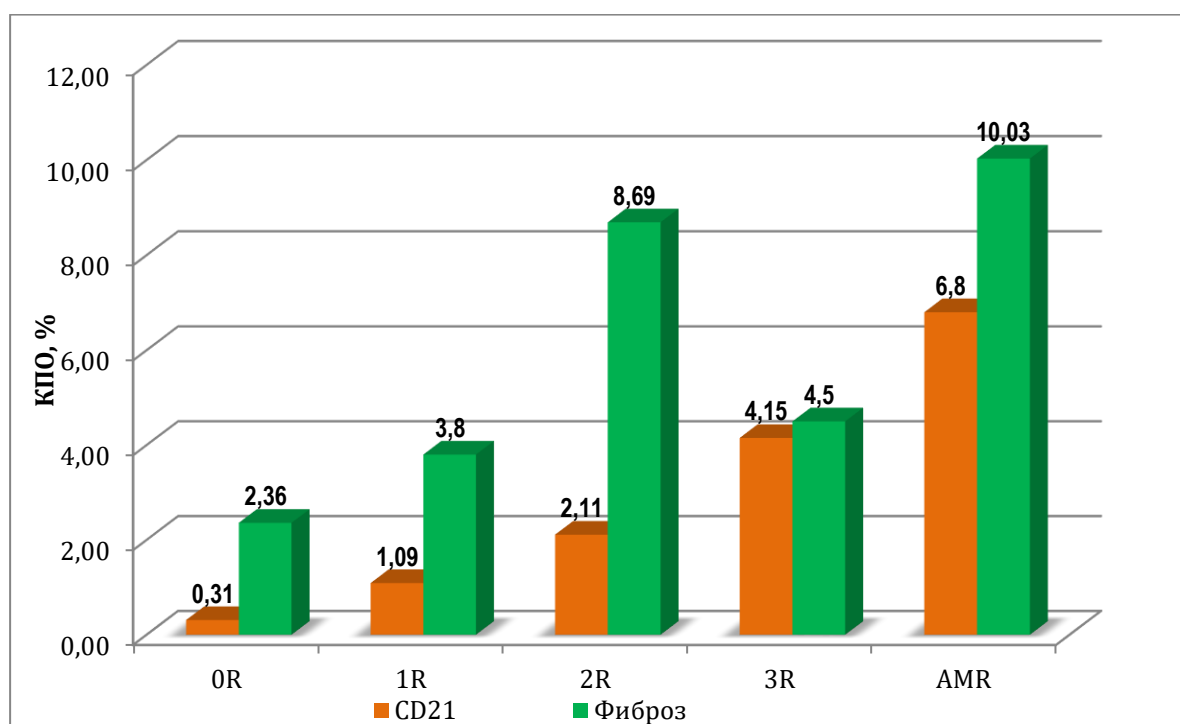


Рисунок 5. Взаимоотношение между экспрессией CD21 и площадью фиброза при отторжении трансплантированного сердца (КПО, %).

Таким образом, проведенное исследование позволило разработать объективные количественные критерии диагностики отторжения трансплантированного сердца, повышающие точность интерпретации результатов эндомикардиальной биопсии. Оптимизация диагностики отторжения пересаженного сердца позволит предотвратить развитие сердечной недостаточности, тем самым увеличить продолжительность и качество жизни реципиентов.

ВЫВОДЫ

1. Нулевая степень клеточного отторжения (0R) характеризуется высокими показателями экспрессии эндотелиальных молекул адгезии CD31 с отсутствием морфологических и иммуногистохимических признаков отторжения. Наиболее ранние признаки клеточного отторжения при его лёгкой степени 1R – снижение экспрессии CD31 в 2,1 раза ($p<0,05$) и появление стеатоза кардиомиоцитов, который нарастает в 36,7 раза по сравнению со степенью 0R ($p<0,05$).
2. Уровень экспрессии эндотелиальных молекул адгезии CD31 снижается при тяжёлом клеточном отторжении 3R в 2,6 раза ($p<0,05$), при гуморальном (AMR) – в 2,1 раза ($p<0,05$), при смешанном клеточно-гуморальном отторжении – в 1,9 раза ($p<0,05$) по сравнению с легкой степенью 1R. Это указывает на развивающуюся дисфункцию эндотелия в сосудистом русле трансплантата, сопровождающуюся кровоизлияниями, интенсивность которых увеличивается при тяжёлом клеточном отторжении по сравнению с легкой степенью в 7 раз ($p<0,05$), при гуморальном отторжении – в 1,8 раза ($p<0,05$), а при смешанном отторжении – в 3,2 раза ($p<0,05$).
3. Отторжение трансплантированного сердца сопровождается формированием в воспалительном инфильтрате миокарда клеточных коопераций, в которых участвуют Т-лимфоциты (Тл), В-лимфоциты (Вл), макрофаги (Мф) и нейтрофильные гранулоциты. Соотношение Тл / Вл / Мф составляет при отсутствии клеточного отторжения 0R [5,2 : 1 : 1,8]; при тяжёлом клеточном отторжении 3R [6,5 : 1 : 3,9]; при антитело-опосредованном отторжении [3,4 : 1,3 : 1]. Все формы отторжения характеризуются преобладанием в клеточных кооперациях Т-лимфоцитов. Содержание нейтрофильных гранулоцитов в инфильтрате повышается в 17,4 раза при нарастании тяжести клеточного отторжения от нулевой до третьей степени ($p<0,05$).
4. В миокарде пересаженного сердца возрастание экспрессии рецептора комплемента CD21 сопровождается увеличением интенсивности фиброза. При тяжёлом отторжении 3R экспрессия CD21 увеличивается в 13,4 раза по сравнению с лёгкой степенью 1R ($p<0,05$), при этом выраженность фиброза повышается в 1,9 раза ($p<0,05$, коэффициент корреляции $R=0,81$, коэффициент детерминации $\eta^2=64\%$), что может быть связано с увеличением продолжительности жизни В-лимфоцитов, вырабатывающих факторы роста фибробластов. Возрастание экспрессии CD21 можно использовать в качестве предиктора развития хронической сердечной недостаточности у реципиентов сердца.
5. Плазменные компоненты комплемента C3d и C4d участвуют в патогенезе как антитело-опосредованного, так и клеточного отторжения пересаженного сердца. В сердечной мышце увеличение экспрессии C3d в 5,7 раза ($p<0,05$) и C4d – в 1,5 раза

($p < 0,05$) при тяжёлой степени отторжения 3R по сравнению со степенью 1R сопровождается возрастанием интенсивности некроза в 580 раз ($p < 0,05$, для C3d коэффициент корреляции $R = 0,77$, коэффициент детерминации $\eta^2 = 47\%$, для C4d коэффициент корреляции $R = 0,79$, коэффициент детерминации $\eta^2 = 49\%$). Повышение экспрессии C3d и C4d отражает активацию системы комплемента.

6. Объективные количественные критерии для диагностики формы и степени тяжести отторжения трансплантированного сердца при оценке эндомикардиальной биопсии установлены на основе разработанных алгоритмов компьютерного морфометрического анализа тканевых структур с бинаризацией изображения по цвету исследуемых объектов и вычислением коэффициента площади окрашивания.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для получения количественной характеристики элементов воспалительного клеточного инфильтрата, а также выраженности патоморфологических изменений необходимо использовать компьютерный морфометрический анализ, основанный на проведении бинаризации по цвету и последующем автоматическом подсчёте коэффициента площади окрашивания (КПО), который представляет собой отношение площади, занимаемой иммунореактивным продуктом, к общей площади биоптата, выраженный в процентах. Одновременное повышение КПО CD3 и CD20 выше 1% и C3d и C4d выше 0,5% следует расценивать как смешанное клеточно-гуморальное отторжение. Если КПО CD3 и CD68 больше 1%, а C3d и C4d меньше 0,5%, следует говорить о клеточном отторжении. Если КПО CD20 больше 1%, а суммарный КПО CD3 и CD68 меньше 1%, при этом КПО C3d и C4d меньше 0,5%, речь идет об антитело-опосредованном отторжении. При КПО CD20 выше 2% необходимо производить оценку экспрессии рецептора комплемента CD21 с целью прогнозирования кардиосклероза. В случае, если экспрессия CD31 составляет меньше 2% площади биоптата, необходимо дополнительно оценивать экспрессию маркеров эндотелия CD34 для исключения развития болезни коронарных артерий пересаженного сердца.

ПЕРСПЕКТИВА ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

На основании полученных в ходе исследования результатов планируется дальнейшая характеристика маркеров смешанного и антитело-опосредованного отторжения, а также признаков эндотелиальной дисфункции сосудов трансплантата. Также предполагается разработка и оптимизация протоколов морфометрического анализа изображений клеток и тканей, в том числе с применением машинного обучения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ACR – острое клеточное отторжение (Acute Cellular Rejection)
- AMR – антитело-опосредованное отторжение (Antibody-mediated Rejection)
- ISHLT – Международное общество трансплантации сердца и легких (International Society of Heart and Lung Transplantation)
- PECAM – тромбоцитарно-эндотелиальная молекула клеточной адгезии (Platelet-endothelial Cell Adhesion Molecule)
- ОТС – отторжение трансплантированного сердца
- ХСН – хроническая сердечная недостаточность
- ЭМБ – эндомиокардиальная биопсия

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Веревкин, А.А.** Определение экспрессии компонентов комплемента C3d и C4d в диагностике отторжения сердечного трансплантата / **А.А. Веревкин, А.А. Славинский, Е.Д. Космачева, Л.М. Чуприненко, Т.В. Ставенчук** // Международный журнал экспериментального образования. – 2017. – № 6. – С. 48-49.
2. **Веревкин, А.А.** Иммуногистохимические маркеры лимфоцитов в диагностике отторжения трансплантированного сердца / **А.А. Веревкин, А.А. Славинский, Е.Д. Космачева, Т.В. Ставенчук** // Международный журнал экспериментального образования. – 2017. – № 6. – С. 49-50.
3. ***Веревкин, А.А.** Патоморфологические признаки повреждения миокарда при отторжении трансплантированного сердца / **А.А. Веревкин, А.А. Славинский, Е.Д. Космачева, Т.В. Ставенчук** // Кубанский научный медицинский вестник. – 2017. – № 24. – Т. 6. – С. 17-21.
4. Ставенчук, Т.В. Проблема отторжения сердечного трансплантата и пути оптимизации оценки результатов эндомиокардиальной биопсии / Т.В. Ставенчук, Е.Д. Космачева, И.А. Шелестова, А.А. Славинский, Е.А. Терман, **А.А. Веревкин, Л.А. Медведева, К.О. Барбухатти, З.Г. Татаринцева, В.А. Порханов** // Клиническая практика. – 2017. – № 3. – С. 28-33.
5. ***Веревкин, А.А.** Экспрессия молекул клеточной адгезии и рецепторов комплемента в диагностике отторжения трансплантированного сердца / **А.А. Веревкин, А.А. Славинский, Е.Д. Космачева, Т.В. Ставенчук** // Кубанский научный медицинский вестник. – 2018. – Т. 25. – № 2. – С. 58-62.
6. Stavenchuk, T.V. Ways of Optimizing the Estimation of Results of Endomyocardial Biopsy in the Rejection of the Heart Transplant / T.V. Stavenchuk, E.D. Kosmachova, I.A. Shelestova,

A.A. Slavinsky, E.A. Terman, **A.A. Verevkin**, K.O. Barbuhatty, V.A. Porhanov. // The Journal of Heart and Lung Transplantation. – 2018. – Vol. 37, Issue 4, S325.

7. ***Веревкин, А.А. Морфофункциональная характеристика отторжения трансплантированного сердца / А.А. Веревкин, А.А. Славинский, Е.Д. Космачева // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2018. – № 2(26). – С. 55-61.**

8. **Verevkin, A.A.** Cell adhesion molecules and complement receptors in diagnostics of the transplanted heart rejection / **A.A. Verevkin**, A.A. Slavinsky, E.D. Kosmacheva, E.A. Gubareva // Book of abstracts of the UK-Russia Young Medics conference. – 2019. – P. 38-39.

9. ***Славинский, А.А. Иммуногистохимический профиль мононуклеарного инфильтрата в миокарде пересаженного сердца. Компьютерная морфометрия / А.А. Славинский, А.А. Веревкин, А.С. Сотниченко, Е.Д. Космачева, Т.В. Ставенчук // Кубанский научный медицинский вестник. – 2020. –Т. 27. – № 2. – С. 92-101.**

10. Патент № 2728683 РФ, «Способ ранней диагностики отторжения трансплантата» / Веревкин А.А., Космачева Е.Д., Славинский А.А., Ставенчук Т.В. – № 2019139534; заявл. 03.12.2019; опубл. 30.07.2020, бюл. № 22. – с.: ил.

*- работы, опубликованные в журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых ВАК РФ для опубликования материалов кандидатских диссертаций, а также публикации, приравненные к ним.