

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования Кубанский государственный медицинский
университет Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Веревкин Александр Александрович

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

14.03.02 – патологическая анатомия

Научный руководитель –
доктор биологических наук,
профессор Славинский
Александр Александрович

Научный консультант –
доктор медицинских наук,
доцент Космачева Елена
Дмитриевна

Краснодар – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. Современные представления о патологических процессах в миокарде при отторжении трансплантата (обзор литературы) ...	13
1.1 Патоморфологическая характеристика отторжения трансплантированного сердца	13
1.1.1. Классификация реакций отторжения	14
1.1.2. Патогистологические признаки острого клеточного отторжения ...	16
1.1.3. Патоморфология антитело-опосредованного отторжения	18
1.1.4. Смешанное клеточно-гуморальное отторжение	21
1.1.5. Гистологические находки, не связанные с реакцией отторжения ...	23
1.2. Возможности и ограничения эндомиокардиальной биопсии	25
1.3. Применение компьютерной морфометрии в диагностике отторжения трансплантированного сердца	29
ГЛАВА 2. Материал и методы исследования	34
2.1. Характеристика материала	35
2.2. Гистологические методы	36
2.3. Иммуногистохимические методы	37
2.4. Разработка алгоритмов компьютерной морфометрии	39
2.5. Статистический анализ	45
ГЛАВА 3. Патоморфологические изменения в сердечной мышце при отторжении трансплантированного сердца	47
3.1. Статистическая проверка вариационных рядов	48
3.2. Патогистологические признаки повреждения миокарда	52
3.3. Компоненты клеточного воспалительного инфильтрата	64
3.4. Компоненты комплемента	75
3.5. Дополнительные иммуногистохимические маркеры	78

3.6. Выявление корреляционно-регрессионных взаимоотношений	86
ГЛАВА 4. Обсуждение результатов исследования	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
ВЫВОДЫ	104
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	106
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	108

ВВЕДЕНИЕ

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 жизни реципиентов (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, 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 транспантированного 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.

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, 257 гистологических препаратов), адекватным статическим 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».

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.

На основании диссертации запланирована дальнейшая характеристика маркеров смешанного и антитело-опосредованного отторжения, а также признаков эндотелиальной дисфункции сосудов трансплантата. Также планируется дальнейшая разработка и оптимизация протоколов морфометрического анализа изображений клеток и тканей.

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.

Личный вклад автора

При выполнении исследования автором был проведен углубленный 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. Использовано 224 литературных источников, из них 35 – отечественных авторов. Полный объем диссертации составляет 137 страниц, включая в себя 58 рисунков и 18 таблиц.

ГЛАВА 1

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ В МИОКАРДЕ ПРИ ОТТОРЖЕНИИ ТРАНСПЛАНТАТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Операция по пересадке сердца широко распространена по всему миру. Ишемическая болезнь сердца, а также дилатационная кардиомиопатия служат одними из самых распространенных причин трансплантации (Кактурский Л.В., 2011).

1.1 Патоморфологическая характеристика отторжения трансплантированного сердца

В настоящее время пересадка донорского сердца является единственным наиболее эффективным способом лечения пациентов в терминальной стадии хронической сердечной недостаточности. Первая в мире успешная пересадка сердца была произведена в декабре 1967 года южноафриканским хирургом Кристианом Бернардом. И уже через год в мире было выполнено около 100 подобных операций (Barnard C. N., 1993). Ежегодно осуществляется свыше 5500 ТС, причем это количество постоянно увеличивается.

Регулярное наблюдение и адекватная иммуносупрессивная терапия у реципиентов сердца позволяют добиться для них большой продолжительности и хорошего качества жизни (Kobashigawa J.A. et al., 2011; Charles S. et al., 2015; McCartney S.L. et al., 2017). Основной причиной потери донорского органа на ранних и поздних сроках после пересадки остаётся клеточное и гуморальное отторжение трансплантата, а также связанное с ними воспалительное поражение коронарных сосудов (васкулопатия). Для выявления указанных патологических состояний применяют биопсию миокарда

(эндомиокардиальную биопсию, или ЭМБ) и рентгенографию венечных сосудов с контрастированием (Cipullo R. et al., 2011; Khaloo P. et al., 2019). В последние годы фокус исследований направлен на поиск неинвазивной процедуры диагностики отторжения трансплантированного сердца (ОТС). Тем не менее, для верификации этого состояния применяется именно ЭМБ (Bhonsale C., 2017; Aghdassi A. et al., 2019).

1.1.1. Классификация реакций отторжения

В зависимости от особенностей клинического течения различают острейшее, или сверхострое, острое и хроническое отторжение трансплантированного сердца. Первый вариант имеет место в том случае, если человеку в течение жизни проводились гемотрансфузии или пересадки других органов, например, почек (Chan C. et al., 2014; Pereira N.L. et al., 2019).

Симптоматика сверхострого отторжения складывается из явлений быстро нарастающей сердечной недостаточности при электрокардиографической картине острого ишемического повреждения миокарда, а также появления биохимических маркеров цитолиза кардиомиоцитов (Miller G. et al., 2017; Woolley A.E. et al., 2019). Патоморфологическая картина данной реакции характеризуется некротическим васкулитом с депозитами антител (прежде всего, IgG) на эндотелии сосудов мелкого и среднего калибра, а также значительным отеком стромы сердца и дискомплексацией пучков кардиомиоцитов (Hammond E., 1998; Corpage M., 2010). Стоит отметить, что в настоящее время сверхострое отторжение развивается крайне редко при грубых нарушениях пациентами иммуносупрессивной терапии (Colvin M.M. et al., 2015; Crowe M. et al., 2016).

Острое отторжение трансплантата, по данным литературы, в виде как минимум единичных кризов встречается у 60% реципиентов сердца. Данная реакция служит проявлением физиологической функции иммунной системы и реализуется как клеточными, так и гуморальными механизмами (Van Halen J., 2013; Doherty K.R. et al., 2015; Watanabe K. et al., 2019).

Наконец, хроническое отторжение трансплантированного сердца представляет собой болезнь коронарных сосудов трансплантата. Развивается оно у подавляющего большинства пациентов и приводит к постепенно нарастающей коронарной недостаточности. Основным морфологическим субстратом данной патологии служит прогрессирующий продуктивный коронарит, приводящий к ишемическому повреждению сердца и развитию мелкоочагового кардиосклероза (Hammond E.H. et al., 2009; Drakos J.R., 2011). Имеется ряд исследований, показывающих роль протеина плазмы А, ассоциированного с беременностью (Шевченко А. П. и соавт., 2014). Данное вещество, являющееся по сути цинкосодержащей металлопротеиназой, через активацию инсулиноподобного фактора роста приводит к развитию в сосудах донорского органа атеросклероза, что дополнительно усугубляет ишемию сердечной мышцы (Kotter S.W., 2011; Aydin S. et al., 2019).

Наибольшее значение в клинической практике имеет острое ОТС. Именно оно служит основной причиной потери донорского органа, снижения качества жизни пациента и нарастания хронической сердечной недостаточности в первые годы после операции (Ситникова М. Ю., 2012; Lee D. R. et al., 2018). Главной целью большинства схем иммуносупрессивной терапии выступает подавление именно острого ОТС. В связи с этим своевременная и точная патоморфологическая диагностика острой реакции

отторжения играет в коррекции иммуносупрессии ключевую роль (Островский А. П. и соавт., 2014).

1.1.2. Патогистологические признаки острого клеточного отторжения

В 1967 году у одного из оперированных К. Н. Барнардом реципиентов сердца был обнаружен процесс, который при дальнейшем изучении получил название клеточного отторжения трансплантата (КОТС) – форма иммунной реакции на пересадку.

Патогистологическая картина миокарда при данной форме отторжения трансплантата характеризуется двумя основными признаками: воспалительной клеточной инфильтрацией и повреждением кардиомиоцитов (Kfoury A.G. et al., 2010). В состав инфильтрата входят Т-лимфоциты, макрофаги, в некоторых случаях - единичные эозинофилы. Присутствие в образце нейтрофильных гранулоцитов говорит, как правило, об инфекционном осложнении или о деструктивном васкулите, связанном с антитело-опосредованным отторжением. А при клеточном отторжении их можно обнаружить лишь в случае крайне тяжёлой степени процесса (Anglicheau D. et al., 2019; Mehra M.R. et al., 2019). Обнаружение в очаге скопления плазмочитов также говорит не о клеточном отторжении, а об эффекте Quilty или реактивной гиперплазии лимфоидной ткани (Szymanska S. et al., 2016).

Вторым важным диагностическим признаком служит повреждение кардиомиоцитов, которое может быть как обратимым, так и необратимым. Некроз небольших групп кардиомиоцитов обычно сопровождает тяжелое клеточное отторжение; нелетальное повреждение кардиомиоцитов при более легких степенях тяжести часто проявляется лизисом отдельных кардиомиоцитов без развития

некроза сократительного пучка – contraction band necrosis (Kelley L. et al., 2003). Особенности клеточной смерти включают просветление саркоплазмы и ядер с расширением последних и появлением в них заметных ядрышек.

В результате повреждения кардиомиоцит приобретает «зубчатые края» из-за того, что он окружен лимфоцитами, которые образуют инвагинации внутрь мышечной клетки. Для того, чтобы получить наиболее успешные результаты в верификации подобных изменений, необходимо провести исследование серийных срезов.

Повреждение миокарда вследствие интраоперационной ишемии или тяжелой болезни коронарных артерий пересаженного сердца также может сопровождаться появлением миоцитолиза, о чём необходимо помнить при дифференциальной диагностике с клеточной реакцией отторжения (ISHLT Guidelines, 2010).

Исходя из присутствия и выраженности этих изменений, выделяют следующие формы клеточного отторжения.

Степень 0R (признаки острого клеточного отторжения отсутствуют). Отмечается отсутствие обратимого повреждения или лизиса кардиомиоцитов; воспалительной инфильтрации в срезе не наблюдается.

Степень 1R (слабое клеточное отторжение). Данный вид отторжения включает в себя два подтипа. Первый – в строме и периваскулярном пространстве появляются отдельные лимфоциты и макрофаги, крайне редко – эозинофилы. Они не оказывают деформирующего действия на контуры кардиомиоцитов, не вызывают их повреждение и в целом не нарушают структуру миокарда. Второй подтип характеризуется наличием единственного очага лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации, приводящая в результате к повреждению кардиомиоцитов.

Степень 2R (умеренно выраженное клеточное отторжение). При данной форме отторжения в сердечной мышце отмечается присутствие нескольких очагов воспаления с лимфоцитами и макрофагами, с каждым из которых связан очаг повреждения кардиомиоцитов. Возможно наличие в биоптате гранулоцитов. Описанные изменения не приобретают диффузный характер и разделены участками неповрежденной сердечной мышцы (Brunner-LaRocca H. P. et al., 2016).

Степень 3R (тяжелое клеточное отторжение). На фоне разлитого диффузного воспаления с участием макрофагов, лимфоцитов, нейтрофильных и немногочисленных эозинофильных гранулоцитов имеются сливающиеся участки повреждения сердечной мышцы – миоцитолиз, дискомплексация мышечных клеток, выраженный отёк интерстиция. Характерны также диапедезные геморрагии и деструктивный капиллярит (Subherwal S., 2014).

1.1.3. Патоморфология антитело-опосредованного отторжения

В современных условиях у реципиентов сердца применяются высокоэффективные антилимфоцитарные препараты, вследствие чего частота клеточного отторжения значительно снизилась. В связи с этим исследователи делали упор на изучении такого явления, как гуморальное или антитело-опосредованное отторжение (АОТС). Начиная с 2005 года, эта форма отторжения больше не рассматривается в качестве подвида клеточного (Baldwin W.M. 3rd et al., 2007). В зависимости от времени возникновения антитело-опосредованная реакция может быть ранней (развивается в первые несколько суток после операции, клинически проявляется как сверхострое отторжение) и поздней (месяцы или годы после трансплантации, Berry G.J. et al., 2011). По данным литературы, у 50% пациентов, имеющих дисфункцию трансплантата через пять лет

после операции, патогистологической находкой служит именно антитело-опосредованное отторжение.

Характерными патогистологическими и иммуноморфологическими признаками АОТС можно назвать отёк стромы сердца, повреждение эндотелия кровеносных сосудов и их тромбоз, обнаружение макрофагов в просвете капилляров, а также наличие антител (в первую очередь, IgG), фиксированных на поверхности эндотелиоцитов. Кроме того, при иммуногистохимическом исследовании выявляют депозиты компонентов комплемента в периваскулярном пространстве (Loupy A. et al., 2017). Помимо характерных патогистологических изменений, при иммунологическом исследовании плазмы крови можно обнаружить ряд донор-специфических антител (Шумаков В.И. и соавт., 2003). При этом стоит учитывать, что отсутствие искомым иммуноглобулинов в плазме не свидетельствует против АОТС, поскольку иммунные комплексы с участием этих антител быстро фиксируются в тканях (ISHLT Guidelines on AMR, 2013).

Существующая классификация антитело-опосредованного отторжения учитывает наличие патоморфологических и иммунопатологических признаков этого процесса и включает четыре формы:

рAMR 0: В миокарде нет патоморфологических признаков антитело-опосредованного отторжения; при иммуноферментном анализе крови донор-специфические антитела не выявляются.

рAMR 1 (H+): В биоптатах миокарда присутствуют патогистологические и иммуноморфологические явления АОТС, в то время как результаты иммуноферментного анализа плазмы крови отрицательны (Морозов Б.Н. и соавт., 2012).

pAMR 1 (I+): По данным иммуноферментного анализа плазмы определяется высокий титр донор-специфических антител к антигенам сердечной мышцы, а также продукты активации компонентов комплемента, фибриноген, фибрин и продукты деградации фибрина. Скорость расщепления активированных компонентов комплемента при этом, наоборот, снижается, о чём свидетельствует снижение экспрессии молекул DAF (Hirohashi T., 2011).

pAMR 2: В срезах сердечной мышцы определяются признаки антитело-опосредованного отторжения; по данным иммуноферментного анализа в плазме присутствуют донор-специфические антитела.

pAMR 3: Тяжелое антитело-опосредованное отторжение. Для него характерны кровоизлияния в строме сердца, некротизирующий васкулит, моноклеарная инфильтрация ткани миокарда и кариопикноз кардиомиоцитов с выраженным их отеком. Клиническим проявлением тяжелого AMR выступает быстро нарастающая сердечная недостаточность, которая имеет плохой прогноз и высокий риск потери трансплантата (Kfoury A.G. et al., 2009).

Ещё один вариант патогенеза антитело-опосредованного отторжения связан с так называемыми нетрадиционными антителами, или антителами не к HLA. В данном случае речь идет об антителах к различным аутоантигенам, прежде всего, виментину и цепям молекулы главного комплекса гистосовместимости I типа (Мебония Н.З. и соавт., 2009). Продукция указанных белков индуцируется, по-видимому, перенесенной вирусной инфекцией (пикорнавирусы или вирусы Коксаки). Основной же гистологической особенностью нетрадиционного антитело-опосредованного отторжения служит апоптоз эндотелиальных клеток, а не лизис, обусловленный действием комплемента (Morrell C.N. et al., 2010).

1.1.4. Смешанное клеточно-гуморальное отторжение

В биоптатах со смешанным отторжением можно обнаружить сочетание гистологических и иммуноморфологических признаков слабого клеточного отторжения (1R) и антитело-опосредованной реакции (Wu G.W. et al., 2009). Более выраженное КОТС (2R и 3R, соответственно) в сочетании с морфологическими и иммунофенотипическими проявлениями антитело-опосредованного отторжения встречается значительно реже (Kfoury A.G. et al., 2009). Оптимальный подход к диагностике смешанного отторжения до сих пор не выработан. Это объясняется тем, что большинство исследователей, занимающихся изучением АОТС, исключают из рассмотрения пациентов с «классическим» клеточным отторжением (Berry G. J. et al., 2013). В свою очередь гуморальное отторжение может не обладать характерными признаками, отличающее его от тяжелого клеточного отторжения. (Reed E.F. et al., 2006). В связи с этим Международное общество трансплантации сердца и легких рекомендует включить в диагностику смешанного типа оценку в биоптате наличие клеточного и антитело-опосредованного отторжения. Необходимо отметить, что при оценке КОТС следует ограничиться только рутинным окрашиванием срезов (ISHLT Guidelines on AMR, 2013; Mulholland G.B et al., 2015).

Ряд исследователей предлагает расширить перечень диагностических маркеров отторжения пересаженного сердца. В основном это касается антитело-опосредованного и смешанного вариантов течения реакции. В качестве кандидатов на эту роль обычно рассматривают такие вещества, как фактор некроза опухоли, а также молекулы спектрина, альфа-цепи интегрина (CD11b, CD11v), низкоаффинный Fc-рецептор для IgG (CD16) и синдекан 1 (CD138).

Наибольшее значение среди указанных веществ придаётся кластерам CD16 и CD138 (Ingles A., 2018; Petersen T., 2018; Harald F.R. et al., 2019; Jansson J.F. et al., 2019).

Низкоаффинный рецептор Fc-фрагмента иммуноглобулина G (CD16) экспрессируется на поверхности нейтрофилов и натуральных киллеров. Его основная роль состоит в активации антитело-зависимой клеточной цитотоксичности. Как нейтрофильные гранулоциты, так и NK-клетки принимают участие в развитии отторжения трансплантированного сердца, при этом стандартные протоколы иммуногистохимического исследования не включают ни одного маркера, отражающего присутствие в сердечной мышце этих клеток (Berman M., 2015; Ishikawa K., 2015).

Синдекан 1 (CD138) представляет собой комплекс из белка и гепарансульфата и располагается преимущественно на поверхности плазматических клеток. Данное вещество обеспечивает взаимодействие плазмócита с различными компонентами внеклеточного матрикса, например, кислыми гликозаминогликанами или коллагеном. Указанная функция реализуется в тканях в ходе воспалительной реакции, участником которой служит плазматическая клетка. Поскольку именно плазмóцит играет ключевую роль в патогенезе антитело-опосредованного отторжения, экспрессия CD138 представляется более точным маркером AMR, нежели кальциевый канал CD20, присутствующий на всех В-лимфоцитах независимо от функций и степени зрелости (Harald F.R., 2019; Paris D.L., 2019).

Помимо описанных маркеров, характеризующих непосредственно участников воспалительного процесса, предлагается определять экспрессию некоторых веществ, отражающих состояние самой сердечной мышцы. Наиболее перспективным в этой области

представляется семейство молекул клеточной адгезии. Так, ряд исследователей предлагает оценивать уровень экспрессии кадгеринов – особых белков, обеспечивающих межклеточные контакты, в частности, между кардиомиоцитами и между эндотелиальными клетками. Снижение экспрессии данных веществ может свидетельствовать, например, о разобщении мышечных клеток сердца, что может стать причиной нарушений ритма. Кроме того, уменьшение экспрессии кадгеринов эндотелиальными клетками служит косвенным признаком эндотелиальной дисфункции (Boyle S., 2015; Pagani G.L. et al., 2017; Miller L., 2018).

1.1.5. Гистологические находки, не связанные с реакцией отторжения

Раннее (интраоперационное) ишемическое повреждение связано с изоляцией сердца и отключением его от кровотока. В это время сначала выполняют забор донорского органа, а затем имплантируют его реципиенту (Alexander S., 2019). Экстракорпоральная оксигенация, управляемая гипотензия и инотропная поддержка отягощают проявление ранней ишемии (Rutz T. et al., 2011). При раннем ишемическом повреждении возникает заметный некроз сократительного пучка и гидropическое повреждение кардиомиоцитов. Аналогичные изменения затрагивают и внутреннюю оболочку сердца (John R., 2010).

Регенерирующее повреждение характеризуется слабо выраженной воспалительной инфильтрацией с участием нейтрофильных гранулоцитов, макрофагов, незначительного количества лимфоцитов и эозинофильных гранулоцитов. Наибольшие трудности представляет дифференциальная диагностика именно заживающего ишемического повреждения и острого клеточного

отторжения. Обычно такая морфологическая картина отмечается в образцах ткани сердца в первые полтора-два месяца после операции (Sing T.P. et al., 2011; Солейко Е.В, Кактурский Л.В., 2013). Различить острое КОТС и раннее ишемическое повреждение можно, сопоставив выраженность некротических изменений и воспалительной клеточной инфильтрации. При отторжении трансплантата выраженная воспалительная реакция будет приводить к тому, что густой воспалительный инфильтрат будет связан с выраженным повреждением сердечной мышцы. В очагах ишемического повреждения значительное скопление макрофагов и лимфоцитов говорит о заживлении дефекта, а некротические изменения будут выражены слабо (Tuzcu E.M. et al., 2005).

Позднее ишемическое повреждение (вследствие болезни коронарных артерий). Магистральные ветви венечных артерий не подвергаются гистологической оценке в ходе эндомиокардиальной биопсии, поэтому сделать заключение о болезни коронарных артерий пересаженного сердца при плановом патологоанатомическом исследовании материала от реципиентов невозможно (Yang X. et al., 2015). Однако наличие в исследуемых фрагментах миокарда мелких очагов инфаркта или парциальные гидропические изменения мышечных клеток могут косвенно свидетельствовать о позднем ишемическом повреждении и таким образом установить генез дисфункции трансплантата. Понимание морфологических особенностей позднего ишемического повреждения нужна для того, чтобы отграничивать его от потенциально устранимых явлений – КОТС или реактивной гиперплазии лимфоидной ткани (McCrohon J.A. et al., 2013; Дземешкевич С. Л. и соавт., 2014).

Эффект Quilty. У 20% реципиентов сердца в разные сроки в образцах миокарда можно обнаружить очаги плотной инфильтрации,

расположенные под эндокардом, - эффект Quilty. Своё название он получил по фамилии пациента, у которого впервые был обнаружен (Joshi A., 2005). Вплоть до пересмотра классификации реакции отторжения в 2005 году эффект Quilty делился на два подтипа: Quilty A – скопление клеток не выходило за пределы эндокарда, и Quilty B – присутствовал переход лимфомакрофагального инфильтрата на подлежащую мышечную ткань и её повреждение, имитирующее лёгкое клеточное отторжение трансплантата (Szymanska S. et al., 2016). Однако подобное деление не влияло на тактику ведения реципиентов или режим дозирования иммуносупрессивной терапии, поэтому в новом пересмотре критериев диагностики ISHLT от него отказались (Hiemann N.E., 2011). Само по себе наличие узловых субэндокардиальных инфильтратов не требует модификации антилимфоцитарной терапии. Если эффект Quilty не сопровождается повреждением миокарда, а очаг не выходит за пределы эндокарда, его морфологическую картину можно легко отличить от клеточного отторжения трансплантата (Szymanska S. et al., 2016).

1.2. Возможности и ограничения эндомиокардиальной биопсии

Для получения фрагментов миокарда, подлежащих гистологическому исследованию, используется эндомиокардиальная биопсия (ЭМБ). Данная манипуляция была впервые выполнена в 1958 году американскими врачами Мильтоном Вайнбергом, Эгбертом Феллом и Джошуа Лайнфилдом (Weinberg M. et al., 1958).

Чаще всего забор фрагментов миокарда межжелудочковой перегородки осуществляется из полости правого желудочка. Для этого применяется доступ через яремную, подключичную или бедренную вену (Dominguez F. et al., 2016). Доступ через правую внутреннюю яремную вену, или катетеризация сердца по

Селдингеру, осуществляется с применением прямого короткого проводникового катетера. Ввиду высокого риска воздушной эмболии данная методика не имеет широкого распространения (Versteeg H.W. et al., 2019). Как правило, методика выбора – биопсия с доступом через правую бедренную вену, которая осуществляется с помощью биоптома 7-8F. Значительно реже возникает необходимость в получении фрагментов миокарда из полости левого желудочка. В этом случае доступ выполняется через левую бедренную артерию (Ishibashi-Ueda H. et al., 2017). При любом из описанных выше способов манипуляция выполняется или под флуороскопическим, или, реже, под эхокардиографическим контролем.

Показания к проведению ЭМБ специалистами из Американской ассоциации сердца и Европейского общества кардиологов в 2007 году были разделены на 14 сценариев, которые включают в себя впервые возникшую сердечную недостаточность (СН) неустановленной этиологии продолжительностью менее двух недель с расстройством гемодинамики, впервые возникшую СН неустановленной этиологии продолжительностью от двух недель до трех месяцев, сопровождающуюся либо дилатацией левого желудочка, либо нарушениями ритма (фибрилляции желудочков, атриовентрикулярные блокады) при отсутствии ответа на стандартную терапию (Зайратьянц О.В. и соавт., 2014; Кактурский Л.В., Бахтин А.А., 2015; Cardona A. et al., 2019) и впервые возникшую СН неустановленной этиологии продолжительностью более трех месяцев, сопровождающуюся как дилатацией левого желудочка, так и нарушениями ритма (фибрилляции желудочков, атриовентрикулярные блокады) при отсутствии ответа на стандартную терапию (Choudhury T. et al., 2019).

Кроме того, в эти сценарии включены СН любой продолжительности, связанная с дилатационной кардиомиопатией при подозрении на аллергическую природу заболевания (эозинофилия в общем анализе крови), необъяснимая СН, вероятно, связанная с антрациклиновой кардиомиопатией, подозрения в том, что причиной СН служит рестриктивная кардиомиопатия, подозрения на опухоль сердца (кроме типичной миксомы, выявляемой при эхокардиографии), а также любая необъяснимая кардиомиопатия, возникающая у детей (Mannion M. et al., 2011)

С 9 по 13 клинический сценарий имеют уровень доказательности IIb, они включают в себя СН без дилатации и/или аритмий, или с расширением левого желудочка и расстройствами ритма и проводимости, но также с хорошим ответом на медикаментозную терапию (Urbanowicz T. et al., 2013). Наконец, при необъяснимой фибрилляции предсердий проведение ЭМБ не показано (Shah Z. et al., 2019).

Будучи инвазивной и весьма травматичной процедурой, ЭМБ сопряжена с риском серьезных осложнений. Самыми распространенными из них выступают воздушная и тромбоэмболия сосудов, повреждение створок трикуспидального или, реже, митрального клапана, аритмии вплоть до фибрилляции желудочков и перфорация стенки правого желудочка или межжелудочковой перегородки (Magnetta D.A. et al., 2018). Кроме того, существует опасность развития флебитов и инфекционного эндокардита (Васичкина Е.С., 2013).

Одна из проблем эндомиокардиальной биопсийной диагностики состоит в трудоемкости исследований гистологических препаратов. Для отторжения трансплантированного сердца перспективным представляется определение площади, занимаемой тем или иным клеточным инфильтратом или приходящейся на какое-либо патологическое изменение

(некроз, кровоизлияние и пр.). Очевидно, что визуальное выполнение всех этих вычислений затруднительно (Abramoff M.D., 2012).

Для интерпретации эндомиокардиальной биопсии используется методика иммуногистохимического исследования. Широкое распространение получила непрямая иммуногистохимия, основанная на использовании первичных и вторичных антител. При этом первичные антитела связываются с искомой структурой – клеточным или экстрацеллюлярным антигеном, – а вторичные антитела, несущие окрашенную метку, реагируют с первичными. Основным преимуществом непрямого иммуногистохимического исследования следует считать его значительно более низкую стоимость по сравнению с прямой иммуногистохимией. Главный же недостаток – более низкая специфичность, поскольку вторичные антитела обладают способностью неспецифически связываться с некоторыми белками тканей (White J.A., 1999).

В качестве окрашенных меток обычно используют диаминобензидин или различные флуорофоры, такие как FITC или производные родамина. Большее распространение получило иммуногистохимическое исследование с использованием световой микроскопии и диаминобензидина в качестве хромагена. Связано это, прежде всего, с большим сроком жизни гистологических препаратов (отсутствием у них «выцветания»). Флюоресцентные метки широко используются для выявления депозитов иммунного материала, такого как компоненты комплемента или иммуноглобулины (Kobashigawa G.W., 2011). Основным недостатком флуоресцентной микроскопии – меньший срок жизни гистологических препаратов, а также необходимость в специальном оборудовании для проведения исследования.

1.3. Применение компьютерной морфометрии в диагностике отторжения трансплантированного сердца

Попытки объективизировать интерпретацию результатов гистологического исследования предпринимались ещё до появления первых графических редакторов. Широко известен способ морфометрического анализа с использованием сетки Автандилова. Первоначально стекло с нанесенными метками укладывалось поверх гистологического препарата при микроскопии, после чего производился подсчет объектов интереса (например, элементов воспалительного инфильтрата), располагающихся в узлах сетки (Автандилов Г.Г., 1977). Основным недостатком данной методики следует признать значительную трудоемкость и дополнительную нагрузку на исследователя-морфолога, подчас несопоставимую с выигрышем в точности диагностики.

С появлением компьютерных программ, позволяющих осуществлять редактирование цифрового изображения, широкое распространение получила компьютерная морфометрия. Наиболее широко применяется так называемая ручная морфометрия, при которой осуществляется фотографирование изображения клеток или тканей с помощью цифрового фотоаппарата или фотонасадки, а затем обработка изображения графическим редактором (Габбасов Г.Р. и соавт., 2009). Одной из распространенных программ, применяемых при компьютерной морфометрии, служит Adobe Photoshop. С его помощью на изображение наносится решетка с заданным шагом узлов. Подсчет объектов интереса проводится способом, аналогичным описанному Г.Г. Автандиловым (Жданов В.С. и соавт., 2017). Такая морфометрическая диагностика рядом исследователей применяется в диагностике биопсий трансплантатов печени или почки, поскольку позволяет оценить состояние сосудистого русла, которое лежит в основе классификации

реакций отторжения этих органов (White J.H., 2010, Семаков Д.Т. и соавт., 2011). Недостаток данного метода – значительное время, требуемое на обработку одного гистологического препарата. Это, в свою очередь, не позволяет широко использовать метод ручной компьютерной морфометрии в клинической практике.

Следующим шагом в развитии компьютерной морфометрии стало появление специализированных программных комплексов, направленных на всесторонний анализ изображения. Широко известны такие программы, как «Морфолог» и «Cito», позволяющие выполнять сегментацию изображения по цвету или яркости, а также автоматическое контурирование объектов на изображении с характеристикой ограничиваемых областей (Степанов В.Н., 2005). После описанных выше преобразований программа проводит вычисление количества, площади и других параметров элементов, удовлетворяющих условиям поиска (Быхалов В.Л., 2017). На заключительном этапе возможно построение математической модели, описывающей геометрию и/или цветовые характеристики патологически изменных и нормальных объектов (Стуклов Н.Г., 2014).

Основными недостатками этих программных продуктов можно считать исключительно высокие требования к качеству изображения, проприетарный характер ПО и высокую стоимость, а также узкую специализацию в базовой комплектации (так, поставляются программы для морфометрического анализа сперматозоидов, программы для типирования раковых клеток желудка и кишечника и т.п.), что требует приобретения нескольких комплектов программ для патологоанатомического отделения.

Существуют подходы к компьютерной морфометрии, основанные на применении искусственных нейронных сетей. Так, генеративно-состязательные нейронные сети (GAN) способны с высокой точностью (около 98%) идентифицировать злокачественные новообразования на

цифровых фотографиях после прохождения «обучения» на больших стеках снимков с верифицированными опухолями (Ramachandran N. et al., 2018).

При применении значительной по размеру обучающей выборки изображений удастся добиться невосприимчивости к артефактам и дефектам окрашивания. Однако, имеющиеся на сегодняшний день нейросетевые алгоритмы плохо идентифицируют различные атипичные варианты течения патологических процессов, а также такие явления, как терапевтический патоморфоз (Blanche T., 2010; Costarelli D., 2015). Кроме того, «обучение» искусственных нейронных сетей желательно проводить на снимках, сделанных именно на оборудовании в отделении, где предполагается её дальнейшее использование. Ещё одним относительным недостатком данного метода морфометрической диагностики можно считать значительную нагрузку на ЭВМ и высокие требования к аппаратному обеспечению (Theochari M., 2018).

При использовании персональных компьютеров низкой производительности преимущества нейронных сетей в виде одновременной обработки нескольких гистологических препаратов будут нивелированы ограничениями в вычислительной мощности (Sarigül M., 2019). Ещё одно перспективное направление в развитии морфометрической диагностики состоит в использовании программного обеспечения с публичной лицензией и открытым программным кодом. Основное преимущество этой группы программ – свободное распространение. Кроме того, имеется возможность пользовательской настройки под нужды конкретного учреждения путем создания подключаемых модулей (Bharati S., 2013; Idica A., 2018).

Наиболее широко в этом направлении используются такие распространяемые по GNU GPL программы, как CellProfiler и ImageJ. Преимущество первой состоит в том, что она позволяет формировать алгоритмы автоматической обработки большого количества изображений

(так называемые пайплайны), которые могут включать в себя неограниченное количество шагов обработки. Однако применение такой программы целесообразно при большом объеме изображений, обрабатываемых одновременно с применением общего протокола.

Вторая программа удобна тем, что имеет большое количество подключаемых модулей при чрезвычайно низком использовании системных ресурсов ЭВМ в базовом режиме (Liang Z., 2019). Имеющаяся библиотека плагинов и макросов на сегодняшний день включает в себя более трехсот надстроек, предназначенных для решения тех или иных исследовательских задач (Timothy M., 2019). При необходимости надстройка может быть создана самостоятельно либо с использованием ресурсов самой программы, либо на языке Java (Abramoff M. D., 2012).

Возможности указанных программ позволяют оценить морфологию клетки (увеличение ядра, изменение плотности цитоплазмы или ядерно-цитоплазматического соотношения), а также охарактеризовать распределение клеток того или иного типа в срезе ткани (на этом может быть построена, например, дифференциальная диагностика эффекта Quilty и клеточного отторжения трансплантата). Ряд исследователей использует алгоритмы компьютерной морфометрии для оценки состояния сосудистого русла в сердечной мышце, что имеет значение в прогнозировании развития сердечной недостаточности (Грудянов А.И. и соавт., 2014). Вычисление площади ткани, дающей положительную иммуногистохимическую реакцию, дает возможность ввести коэффициенты отношения, повышающие точность диагноза (Aissiou M. et al., 2013; Yang J. et al., 2019).

К настоящему времени проведено большое количество исследований по эндомиокардиальной биопсийной диагностике

отторжения сердечного трансплантата, но некоторые вопросы все еще остаются актуальными в проведении качественного изучения. Одним из нерешенных вопросов является поиск дополнительных иммуногистохимических маркеров для диагностики антитело-опосредованного отторжения трансплантированного сердца. В ряде исследований поднимается вопрос о возможном расширении панели иммуногистохимических маркеров для диагностики антитело-опосредованного отторжения трансплантированного сердца. Определенную проблему также представляют случаи клеточно-гуморального отторжения. Наконец, определенного внимания заслуживает дифференциальная диагностика реакций отторжения и иных процессов в миокарде, такие как: рубцы после биопсии, болезнь коронарных артерий пересаженного сердца, эффект Quilty и посттрансплантационные лимфопролиферативные заболевания.

Хотя тенденция последних лет заключается в поиске неинвазивных методов диагностики ОТС, «золотым стандартом» по-прежнему остается проведение эндомиокардиальной биопсии. Исходя из этого, перспективным представляется повышение качества именно биопсийной диагностики. Одним из возможных способов служит применение компьютерной морфометрии. Низкий процент ошибок, простота освоения и широкий спектр решаемых задач позволяют существенно упростить процесс патоморфологической диагностики, а также повысить точность диагнозов, поставленных по данным ЭМБ.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на архивном материале от 56 реципиентов сердечного трансплантата, подвергнутых трансплантации в 2013-2017 годах. Исследование проведено по следующей схеме (рисунок 1).

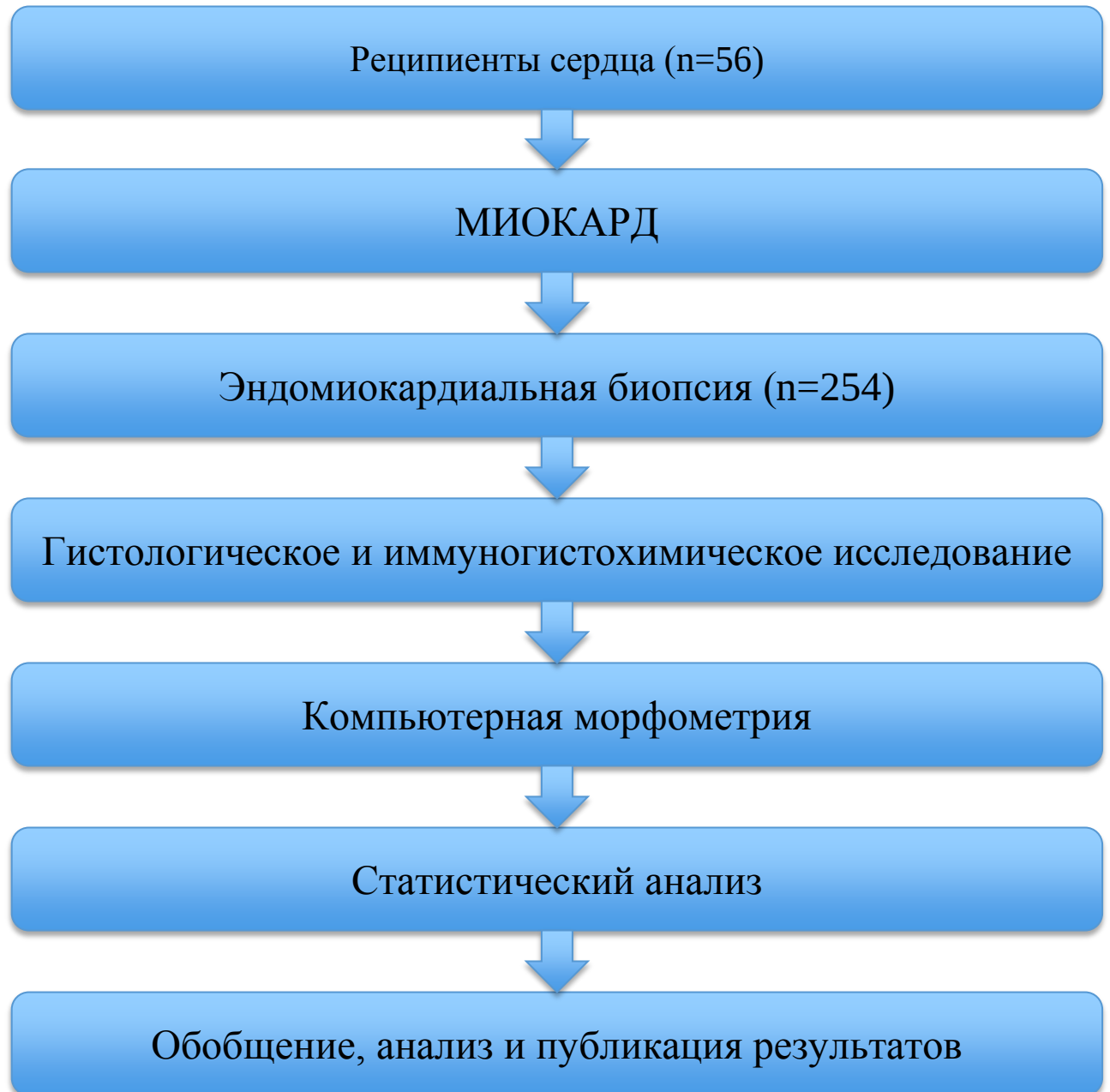


Рисунок 1. Дизайн исследования.

2.1. Характеристика материала

Материал для исследования реакций отторжения трансплантата (эндомиокардиальные биопсии) получен от 56 реципиентов сердца (39 мужчин и 17 женщин, возраст от 29 до 61 года). В группе реципиентов сердца наиболее распространенным сопутствующим заболеванием была гипертоническая болезнь (46% пациентов, из них у 80% – риск IV; данные приведены до проведения трансплантации), на втором месте находился сахарный диабет (35% пациентов). Поводом к трансплантации в 60% случаев послужила ИБС, в 29% – дилатационная кардиомиопатия, 11% приходились на остальную кардиальную патологию.

Единственным критерием включения пациентов в данную группу была трансплантация сердца в анамнезе. Критерии исключения пациентов: хронические гнойно-воспалительные заболевания, системные заболевания соединительной ткани, злокачественные новообразования, выраженные проявления ИБС (инфаркт миокарда, стенокардия напряжения II-IV ФК, ХСН ФК II и выше по NYHA). Все указанные лица проходили лечение в профильных отделениях ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница №1 им. проф. С.В. Очаповского» г. Краснодара.

Данное исследование выполнено на архивном материале патологоанатомического отделения НИИ - ККБ №1. Для получения биологического материала от больных использовали эндомиокардиальную биопсию. Данную процедуру проводили кардиохирурги в соответствующих отделениях Центра грудной хирургии НИИ - ККБ №1. При этом проведение эндомиокардиальной биопсии выполняли в рамках протокола ведения реципиентов после трансплантации сердца в сроки,

установленные клиническими рекомендациями (таблица 1). Доступ в полость правого желудочка осуществляли через правую плечевую вену с помощью стэнфордского биоптома (J&J, США) с катетером 7F длиной 85 см. Далее браншами устройства захватывали до 5 (в среднем 2-3) кусочков миокарда межжелудочковой перегородки.

Таблица 1. Периодичность проведения биопсий у лиц, перенесших трансплантацию сердца

№ исследования	Периодичность
Биопсии №№ 1-5	Еженедельно
Биопсии №№ 6-8	Раз в две недели
Биопсии №9 и №10	Каждые три недели
Биопсии №№ 11-13	Раз в четыре недели
Последующие в течение года	Раз в шесть недель
Биопсии на сроках более года	Раз в год или по показаниям

2.2. Гистологические методы

Полученные фрагменты миокарда выдерживали в течение суток в 10% растворе нейтрального забуференного формалина, после чего осуществляли проводку в парафин по стандартной методике с применением гистопроцессора STP120-2 (Thermo Scientific, США). Получение парафиновых блоков выполняли с помощью модульной установки EG1150H (Leica, Германия). В дальнейшем для изготовления срезов использовался ротационный микротом Rotary 3003 (PFM medical, Германия).

Срезы толщиной 5 мкм помещали на предметное стекло, после чего подвергали депарафинизации и регидратации по общепринятой методике с применением ксилола и батареи спиртов нисходящей концентрации.

Далее по одному срезу каждого биоптата окрашивали гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по ван Гизону, после чего заключали под покровное стекло с помощью синтетической монтирующей среды. Микроскопия и фотографирование полученных гистологических препаратов осуществлялась с помощью микроскопа Nikon E200 (Япония).

Для выявления липидов в кардиомиоцитах использовано окрашивание суданом III гистологических срезов, полученных на замораживающем микротоме Leica FTX-1171C. Докрашивание ядер выполняли с помощью гематоксилина Харриса по стандартной методике.

2.3. Иммуногистохимические методы

1. Срезы толщиной 4 мкм помещали на предметные стекла с адгезивным покрытием (полилизин).
2. Проводили их депарафинизацию и регидратацию по стандартной методике.
3. Осуществляли подавление активности эндогенной пероксидазы с помощью 3% раствора пероксида водорода.
4. Проводили температурную демаскировку антигена в цитратном буфере (pH 6.0) на водяной бане в течение 40 минут.
5. Блокировали неспецифическое связывание с помощью раствора Background reducing buffer (Abcam, Великобритания) в течение получаса.
6. Инкубировали срезы с первичными антителами (таблица 2) при комнатной температуре в течение часа.
7. Трижды промывали фосфатно-солевым буфером в течение трех минут.

8. Инкубировали с вторичными антиполивалентными биотинилированными кроличьими антителами (Abcam, Великобритания) в течение 10 минут.

Таблица 2. Первичные антитела с указанием разведения.

Антитело	Разведение	Каталожный номер, изготовитель
anti-CD3 clone 12	1:100	ab11089, Abcam, Великобритания
anti-CD20 clone L26	1:20	ab9475, Abcam, Великобритания
anti-CD68 clone KP1	1:100	ab955, Abcam, Великобритания
anti-CD21 clone EP3093	1:400	ab75985, Abcam, Великобритания
anti-CD31 clone P2B1	1:100	ab24590, Abcam, Великобритания
anti-C3d clone E28-P	1:200	ab136916, Abcam, Великобритания
anti-C4d clone LP69	1:25	ab167093, Abcam, Великобритания

9. Четырежды промывали фосфатно-солевым буфером в течение пяти минут.

10. Инкубировали в течение 10 минут со стрептавидин-пероксидазой при комнатной температуре.

11. Четырежды промывали фосфатно-солевым буфером в течение трех-пяти минут.

12. Обработывали раствором диаминобензидаина (ДАВ-хромогеном) в течение пяти минут.

13. Четырежды промывали фосфатно-солевым буфером в течение трех-пяти минут.

14. Срезы, в которых предполагалось визуально оценивать качество иммуногистохимической реакции, докрашивали гематоксилином Майера в течение одной минуты. Срезы, предназначенные для последующей компьютерной морфометрии, не докрашивали.

15. Дегидратировали срезы по стандартной методике, после чего заключали в синтетическую монтирующую среду.

Последующую микроскопию и фотографирование полученных препаратов осуществляли с помощью микроскопов Nikon E200 и Olympus IX51 (Япония).

2.4. Разработка алгоритмов компьютерной морфометрии

Для проведения морфометрического анализа использовали программное обеспечение с открытым исходным кодом ImageJ (US National Institutes of Health, США) и фотографии препаратов с увеличением объектива x20 или x40 (рисунок 2). 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 красителем 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).

В том случае, если окраска препарата не позволяла разложить его на несколько сегментов с узким спектральным диапазоном (при окрашивании гематоксилином-эозином вследствие близости

спектров синего и фиолетового цветов), определение площади искомых объектов осуществляли вручную. Для этого использовали инструмент “freehand selection”, с помощью которого с большой точностью выделяли область интереса. Затем программа вычисляла суммарную площадь выделенной области.

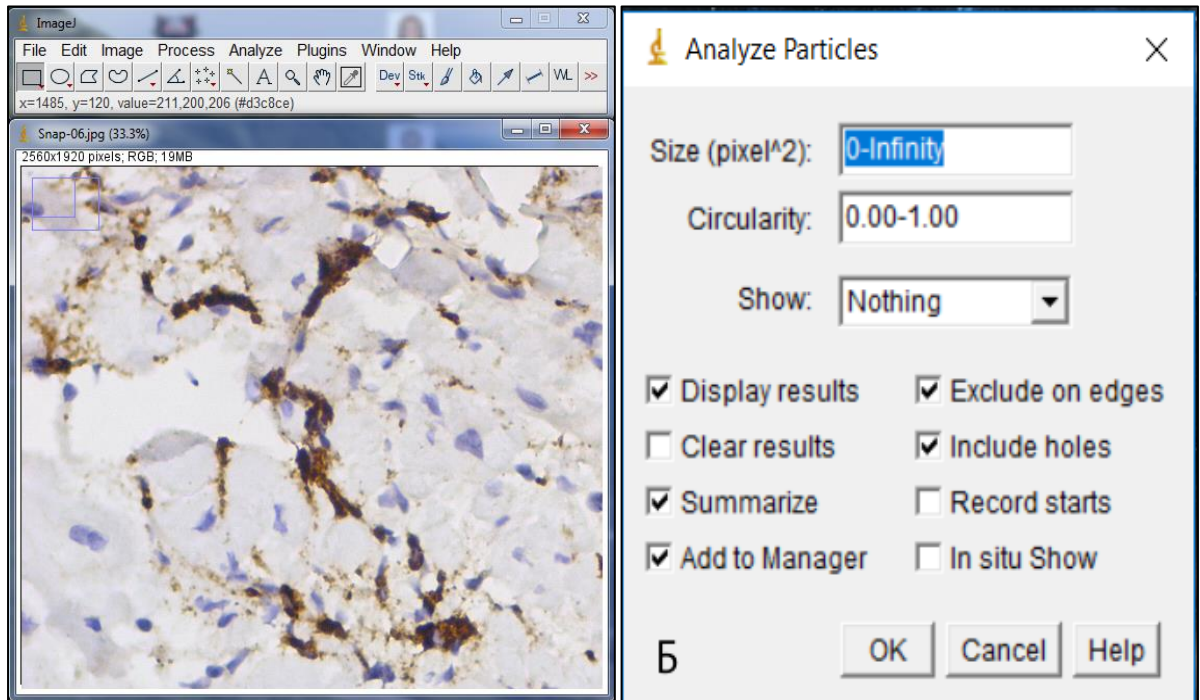


Рисунок 2. А – общий вид программы ImageJ. Б – надстройка для анализа частиц.

После подавления красного цветового канала и выставления порога чувствительности канала G осуществляли последовательный подсчет сферических объектов диаметром 8-12 мкм и 15-20 мкм (лимфоциты и макрофаги, соответственно). Затем производили расчет плотности расположения найденных объектов, что позволяло дифференцировать очаговые и диффузные изменения в миокарде. Далее аналогичный расчет проводили для объектов диаметром 5-6 мкм (ядро кардиомиоцита; при этом мы исходили из предположения, что некроз мышечных клеток и, соответственно, распад ядер в биоптате отсутствует). Затем все найденные на первом этапе объекты помечали зеленым цветом, а

на втором – красным, после чего выполняли суммацию двух изображений. Путем суммации изображений устанавливали взаиморасположение объектов в биоптате, а также характер их распределения.

В случае препаратов, окрашенных гематоксилином-эозином, на начальном этапе применяли выравнивание уровня освещенности изображения, чтобы избежать затемнения углов изображения. Затем осуществляли бинаризацию изображения для перевода в черно-белый формат. Наконец, выполняли поиск на изображении элементов, удовлетворяющих определенным критериям (сферическая форма и заданные размеры). Исключение из поиска объектов эллиптической формы позволило избежать подсчета ядер кардиомиоцитов, а варьирование размеров – выполнить дифференциальный подсчет лимфоцитов и макрофагов. Специфическая форма ядер зрелых нейтрофильных гранулоцитов не позволила применить к ним указанные выше маски поиска и потребовала осуществить определение их количества вручную. Для срезов после иммуногистохимических реакций, исследование включало несколько этапов. На первом этапе цветное изображение раскладывали на три канала (красный, зеленый и голубой). Затем голубой канал подавляли, после чего выполнялась бинаризация: изображение переводили в восьмибитный серошкальный (Greyscale) формат. На следующем этапе устанавливали пороговую величину интенсивности цвета, при которой DAB-положительные метки область сохранялась бы, а все остальные объекты изображения – окрашенные гематоксилином ядра, неравномерно освещенные края снимка – переставали отображаться (рисунок 3). После бинаризации программа определяла суммарную площадь окрашенной области (рисунок 4).



Рисунок 3. Компьютерная обработка изображений с помощью приложения ImageJ. А – исходное изображение. Б – результат бинаризации изображения после изменения порога чувствительности. Черный цвет соответствует DAB-хромагену.

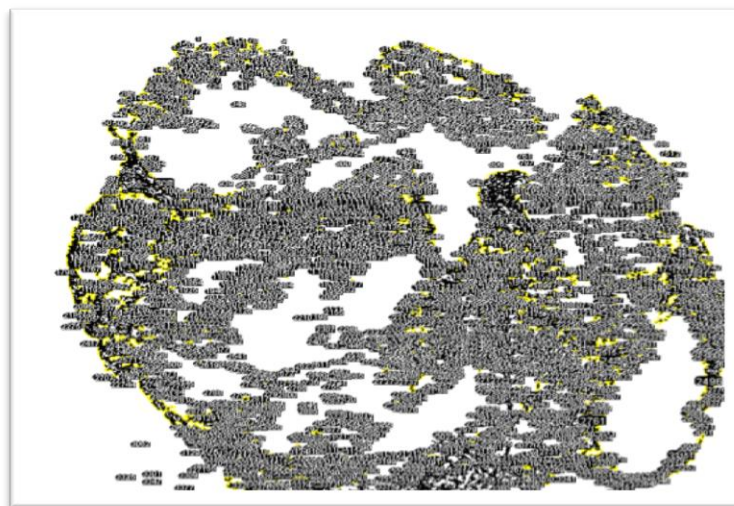


Рисунок 4. Измерение площади области, давшей положительную реакцию.

Нами 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):

1. Получение цифрового изображения тканевых структур.
2. Определение площади среза с помощью инструмента «Ручное выделение».
3. Определение суммарной площади искомых патологических изменений также с помощью инструмента «Ручное выделение».
4. Вычисление коэффициента площади окрашивания (КПО) по формуле: $\text{КПО} = \frac{m}{s} * 100\%$, где m – суммарная площадь патологических изменений (в мм^2), s – общая площадь среза (в мм^2).

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):

1. Получение цифрового изображения тканевых структур.
2. Определение общей площади среза с помощью инструмента «Ручное выделение».
3. Тонкая настройка инструмента «Particles analyzer» – задание размеров, характера взаиморасположения и эксцентриситета искомых объектов (макрофаги, лимфоциты, нейтрофилы).
4. Определение с помощью инструмента «Particles analyzer» общего числа искомых клеточных элементов в биоптате.

5. Вычисление относительного количества клеток RN по формуле: $RN = \frac{n}{s}$, где n – общее число найденных клеток (в шт), s – общая площадь среза (в мм²).

3. Алгоритм компьютерного морфометрического анализа изображений клеточных и тканевых структур для оценки выраженности иммуногистохимических реакций:

1. Получение цифрового изображения тканевых структур.
2. Определение общей площади среза с помощью инструмента «Ручное выделение».
3. Цветовая сегментация координатного пространства RGB, разложение изображения на три канала – красный, зеленый, голубой.
4. Подавление голубого и красного каналов, необходимое для исключения из анализа окрашивания ядерными красителями.
5. Бинаризация изображения по цвету продукта реакции (Для DAB хромагена используется зеленый цвет).
6. Установление порога чувствительности («Thresholding» в группе инструментов «Настройка изображения»).
7. Определение с помощью инструмента «Particles analyzer» суммарной площади иммунореактивного продукта, расположенного внеклеточно или в ассоциации с определенными клетками.
8. Вычисление коэффициента площади окрашивания (КПО) по формуле: $КПО = \frac{m}{s} * 100\%$, где m – суммарная площадь цветного продукта реакции (в мм²), s – общая площадь среза (в мм²).

2.5 Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли на персональном компьютере с применением

статистических инструментов программы MedCalc Statistical Software version 19.1.3. Значения всех выборок подвергли проверке на характер распределения с помощью W-критерия Шапиро-Уилка. Выбор данного критерия обусловлен малым размером отдельных выборок, а также значительной простотой его интерпретации и высокой «мощностью» (Реброва О.Ю., 2002).

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 Т-критерий Крамера-Уэлча. Выбор данного критерия обусловлен его применимостью при любых размерах выборок, а также нечувствительностью к различию внутригрупповых дисперсий (Реброва О.Ю., 2002). Нулевая гипотеза отвергалась при значении порога доверительной вероятности $p < 0,05$.

Для оценки взаимосвязи между различными показателями у одних и тех же больных внутри отдельных групп использован линейный и нелинейный корреляционный анализ. Во всех случаях вычисление коэффициента линейной корреляции выполняли после логарифмического преобразования числовых значений в выборках. Нелинейный корреляционный анализ включал в себя определение эмпирического корреляционного отношения η попеременно для связанных параметров по формуле $\eta = \sqrt{\frac{\delta^2}{\sigma^2}}$, где δ^2 – межгрупповая дисперсия, а σ^2 – общая дисперсия. Затем вычисляли коэффициент детерминации, равный квадрату корреляционного отношения. Данный показатель отражает степень влияния одного фактора на другой в связанных выборках.

Для оценки степени влияния связанных признаков друг на друга определяли коэффициент линейной регрессии и частный коэффициент эластичности для средних значений сопоставляемых выборок $\varepsilon = b * \frac{\bar{x}}{y}$, где b – коэффициент линейной регрессии, x и y – значения соответствующих связанных признаков.

ГЛАВА 3

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ ПРИ ОТТОРЖЕНИИ ТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО СЕРДЦА

Эндомиокардиальные биоптаты в количестве 254, полученные от 56 реципиентов сердца, подвергли гистологическому исследованию для установления характера и степени тяжести отторжения с использованием критериев Международного общества трансплантации сердца и легких ISHLT (рисунок 3а). Диагноз «отторжение трансплантированного сердца» далее представлен в виде кода по МКБ-10: Т86.2 (Зайратьянц О.В. и соавт., 2008).

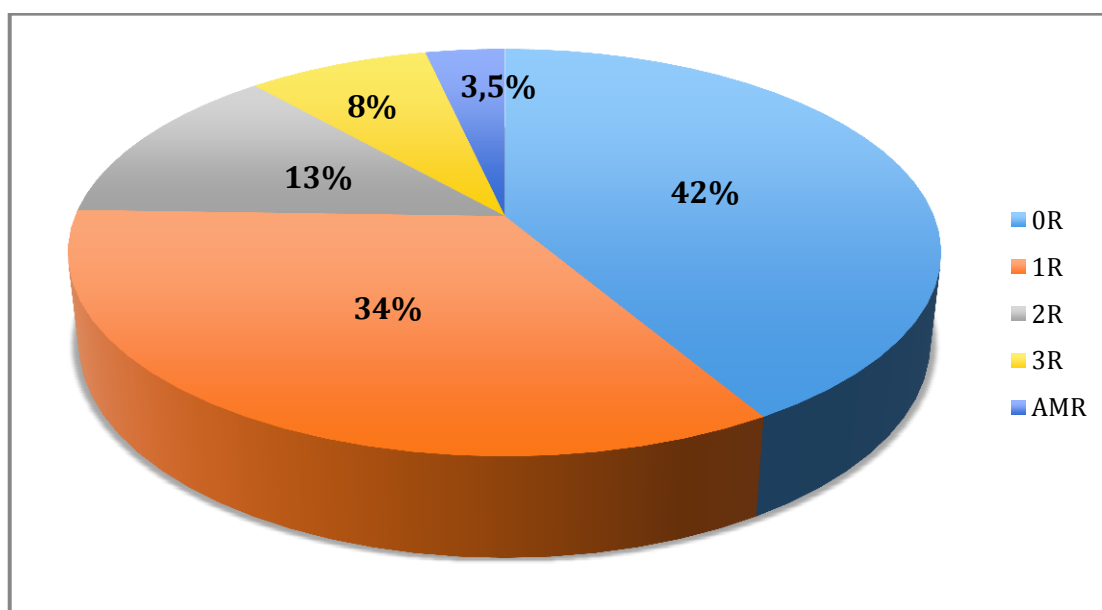


Рисунок 3а. Структура реакций отторжения трансплантированного сердца.

Степень отторжения 0R определена в 92 биоптатах (клеточная инфильтрация отсутствует или представлена единичными, как правило, случайными элементами, признаков повреждения кардиомиоцитов нет). Легкое отторжение (1R) выявлено в 90 биоптатах (единичные локусы повреждения мышечных клеток,

связанные с одним очагом лимфомакрофагальной инфильтрации). В 41 биоптатах отмечена картина отторжения 2R (множественные локусы эндомиокардиального повреждения в ассоциации с очагами лимфомакрофагальной инфильтрации). В 17 биоптатах обнаружены признаки отторжения 3R степени (диффузная инфильтрация лимфоцитами и макрофагами, присутствие нейтрофильных гранулоцитов, очаги кровоизлияний). Наконец, также в 17 образцах выявлена картина антитело-опосредованного отторжения (AMR), которая характеризуется выраженным отеком, васкулитом и интравасальным скоплением макрофагов.

Для оценки выраженности патоморфологических изменений (некроз, кровоизлияния, фиброз и стеатоз) использован морфометрический алгоритм №1 (глава 2), определение количества клеточных элементов инфильтрата на единицу площади проводили с помощью морфометрического алгоритма №2. Для оценки выраженности иммуногистохимических реакций использовали алгоритм компьютерной морфометрии №3.

3.1. Статистическая проверка вариационных рядов

Числовые значения, распределенные по группам, были подвергнуты статистической проверке характера распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Проверка показала, что все вариационные ряды имели нормальное распределение (таблица 3). Поэтому результаты исследования представлены в виде среднего арифметического значения и ошибки среднего ($\bar{X} \pm m$). Для проверки достоверности различия выборочных средних значений использовано попарное сравнение каждого среднего значения каждого признака с соответствующим признаком в группе 0R с помощью Т-критерия Крамера-Уэлча.

Таблица 3. Результаты проверки вариационных рядов на характер распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка.

Пат. процесс		Кровоизлияния				
Форма / степень тяжести отторжения		0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Критерий Шапиро-Уилка	W	0,991	0,983	0,985	0,966	0,948
	P	0,832	0,291	0,848	0,744	0,422
Заключение		Принять нормальность				
Пат. процесс		Некроз				
Форма / степень тяжести отторжения		0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Критерий Шапиро-Уилка	W	-	0,986	0,974	0,955	0,959
	P	-	0,482	0,476	0,540	0,618
Заклучение		Принять нормальность				
Пат. процесс		Фиброз				
Форма / степень тяжести отторжения		0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Критерий Шапиро-Уилка	W	0,995	0,986	0,994	0,967	0,989
	P	0,972	0,535	0,998	0,763	0,998
Заклучение		Принять нормальность				
Пат. процесс		Стеатоз				
Форма / степень тяжести отторжения		0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Критерий Шапиро-Уилка	W	0,979	0,992	0,965	0,959	0,947
	P	0,149	0,931	0,232	0,606	0,404
Заклучение		Принять нормальность				

Таблица 3. (продолжение).

Клетки		Нейтрофильные гранулоциты				
Форма / степень тяжести отторжения		0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Критерий Шапиро-Уилка	W	0,989	0,983	0,993	0,961	0,946
	P	0,627	0,291	0,994	0,648	0,392
Заключение		Принять нормальность				
Клетки		Макрофаги				
Форма / степень тяжести отторжения		0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Критерий Шапиро-Уилка	W	0,977	0,985	0,980	0,966	0,972
	P	0,115	0,480	0,689	0,737	0,858
Заключение		Принять нормальность				
Клетки		Лимфоциты				
Форма / степень тяжести отторжения		0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Критерий Шапиро-Уилка	W	0,980	0,986	0,963	0,962	0,983
	P	0,190	0,535	0,204	0,663	0,979
Заключение		Принять нормальность				
Маркер		CD3				
Форма / степень тяжести отторжения		0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Критерий Шапиро-Уилка	W	0,988	0,981	0,976	0,956	0,970
	P	0,548	0,317	0,524	0,549	0,826
Заключение		Принять нормальность				

Таблица 3. (продолжение).

Маркер		CD20				
Форма / степень тяжести отторжения		0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Критерий Шапиро-Уилка	W	0,980	0,989	0,970	0,978	0,941
	P	0,190	0,769	0,344	0,940	0,329
Заключение		Принять нормальность				
Маркер		CD68				
Форма / степень тяжести отторжения		0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Критерий Шапиро-Уилка	W	0,989	0,991	0,969	0,966	0,933
	P	0,679	0,867	0,320	0,736	0,244
Заключение		Принять нормальность				
Маркер		C3d				
Форма / степень тяжести отторжения		0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Критерий Шапиро-Уилка	W	0,995	0,990	0,972	0,969	0,957
	P	0,989	0,733	0,385	0,809	0,580
Заключение		Принять нормальность				
Маркер		C4d				
Форма / степень тяжести отторжения		0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Критерий Шапиро-Уилка	W	0,981	0,974	0,976	0,960	0,984
	P	0,207	0,115	0,532	0,626	0,985
Заключение		Принять нормальность				

Таблица 3. (продолжение)

Маркер		CD21				
Форма / степень тяжести отторжения		0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Критерий Шапиро-Уилка	W	0,992	0,984	0,974	0,954	0,927
	P	0,875	0,421	0,463	0,514	0,191
Заключение		Принять нормальность				
Маркер		CD31				
Форма / степень тяжести отторжения		0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Критерий Шапиро-Уилка	W	0,985	0,983	0,980	0,932	0,954
	P	0,394	0,378	0,665	0,239	0,514
Заключение		Принять нормальность				

3.2. Патогистологические признаки повреждения миокарда

Кровоизлияния. Кровоизлияния из мелких сосудов отмечены в основном на «тяжелых» стадиях отторжения (рисунок 3.2.1). В то же время, незначительно выражены они и при 0R и 1R (рисунок 3.2.2). В данном случае они, по-видимому, обусловлены механическим повреждением ткани в ходе проведения биопсии.

Выраженность кровоизлияний (КПО) в биоптатах (таблица 4) с 1R в 2,3 раза превышает таковую при 0R ($p < 0,05$). В свою очередь, данный показатель в случае 2R 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 ($p < 0,05$).

Таблица 4. КПО кровоизлияний при отторжении трансплантированного сердца

Патологический процесс	КПО ($\bar{X} \pm m$), %				
	0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Кровоизлияния	0,83±0,11	1,91±0,2	9,89±0,61	13,34±1,03	3,20±0,07

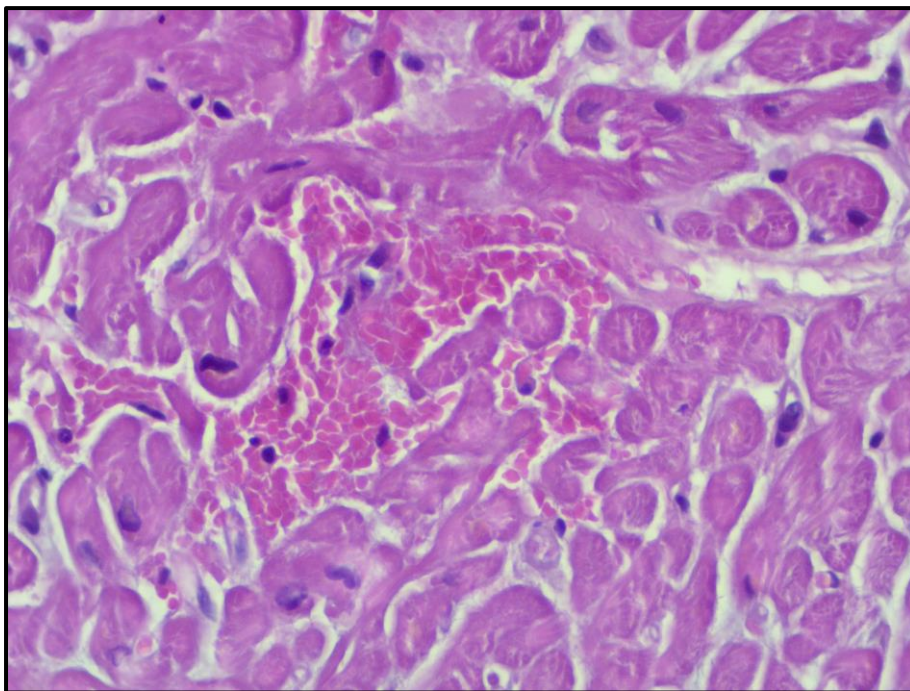


Рисунок 3.2.1. Пациент Ф., 51 год. Т86.2. Диффузное кровоизлияние в миокарде при AMR. Гематоксилин-эозин, увеличение об. х40

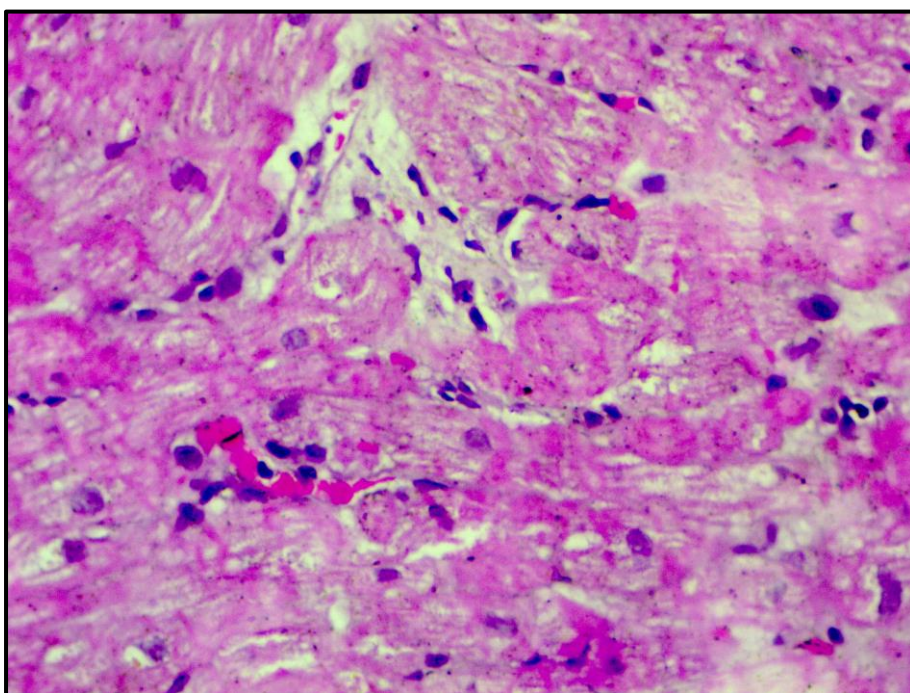


Рисунок 3.2.2. Пациентка С., 48 лет. Т86.2. Единичное очаговое кровоизлияние при клеточном отторжении 1R. Гематоксилин-эозин, увеличение об. х40

Гуморальное отторжение характеризуется умеренно выраженным кровоизлиянием, площадь которого сопоставима с аналогичным показателем для 1R. Таким образом, наибольшее значение площадь кровоизлияний приобретает при умеренном и тяжелом клеточном отторжении (рисунки 3.2.3, 3.2.4).

Некротические изменения. Очаги некроза, различные по площади, располагались диффузно практически во всех полях зрения (рисунок 3.2.5). В случае антитело-опосредованного отторжения участки дистрофии и некроза кардиомиоцитов совпадали с периваскулярным отеком миокарда (рисунок 3.2.6).

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 ($p < 0,05$) (таблица 5; рисунки 3.2.7, 3.2.8.). Умеренно выражены некротические изменения при антитело-опосредованном отторжении: данный показатель в 2,5 раза меньше такового при тяжелом ACR ($p < 0,05$). Начиная с 1R, во всех биоптатах наблюдался фокальный некроз, сопровождающий тяжелое повреждение кардиомиоцитов.

Таблица 5. Некротические изменения в миокарде при отторжении трансплантата

Патологический процесс	КПО ($\bar{X} \pm m$), %				
	0R (n=92)	1R (n=90)	2R (n=41)	3R (n=17)	AMR (n=17)
Некроз	0	0,03±0,01	4,95±0,56	17,40±0,70	7,32±0,24

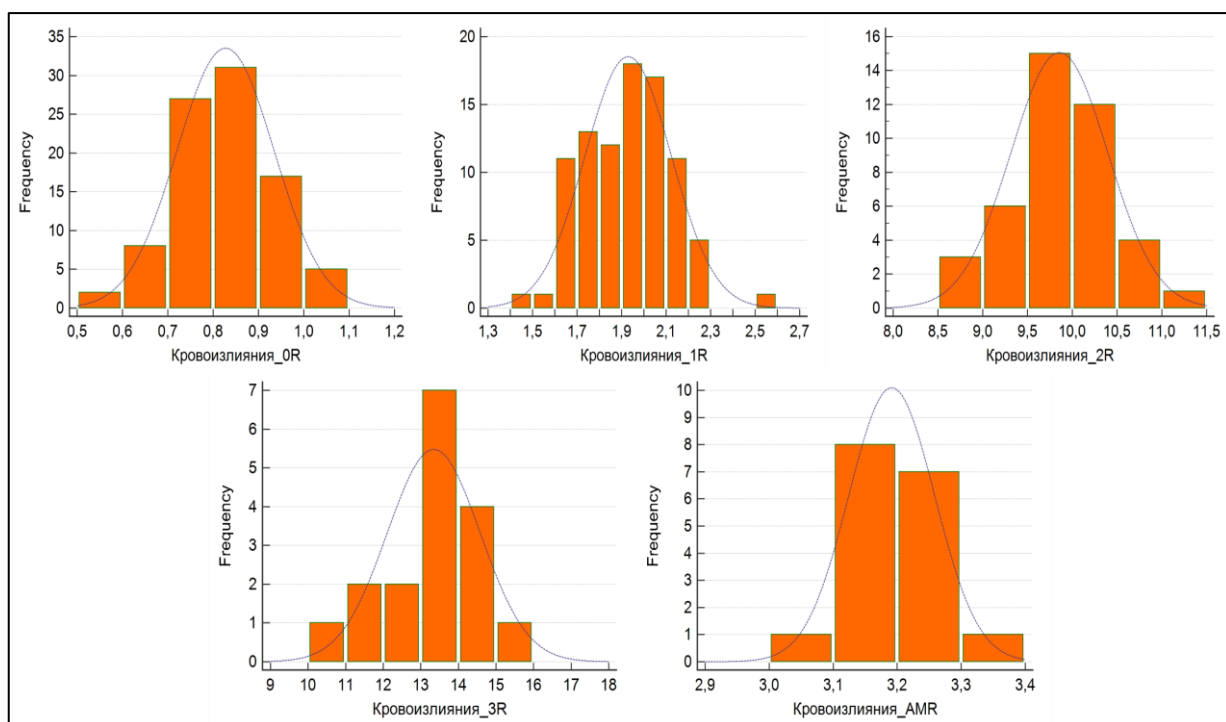


Рисунок 3.2.3. Характер распределения значений КПО кровоизлияний при отторжении трансплантированного сердца. Линия – кривая Гаусса.

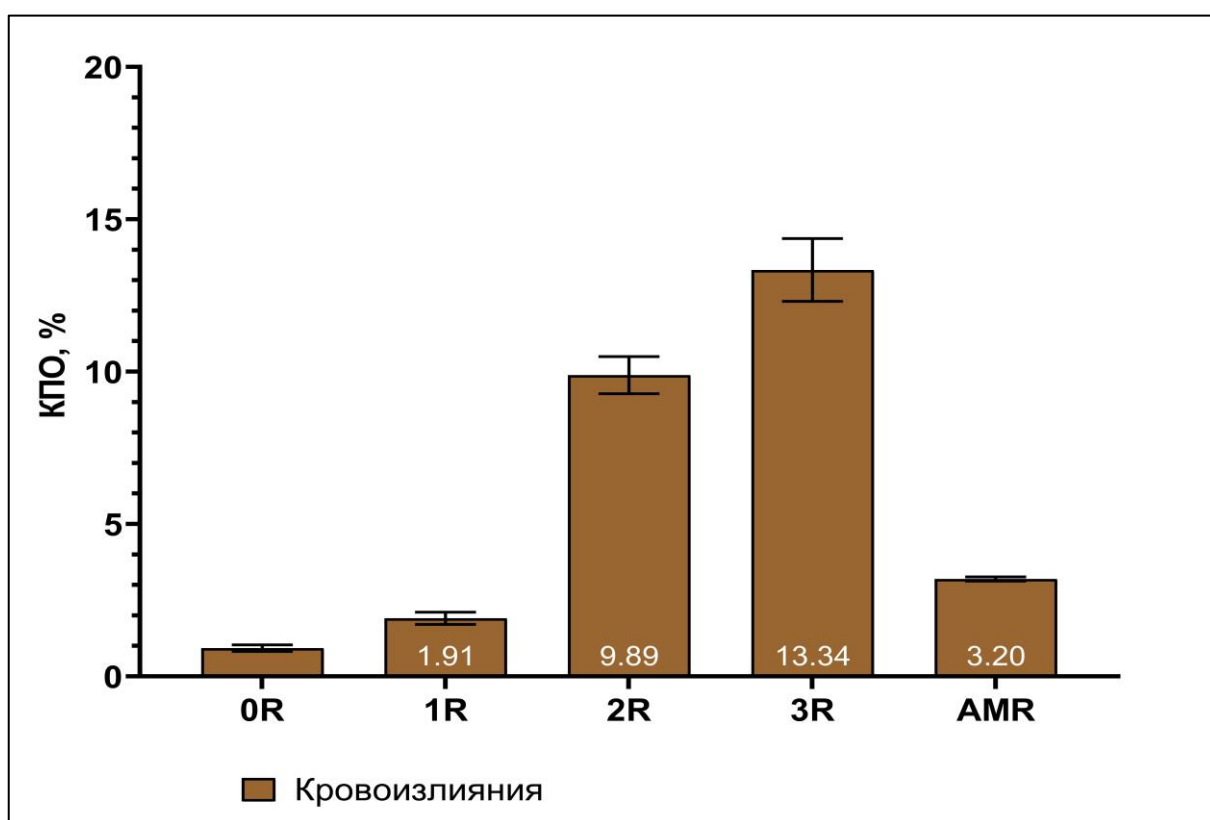


Рисунок 3.2.4. Выраженность кровоизлияний при различных формах отторжения трансплантированного сердца (КПО, %).

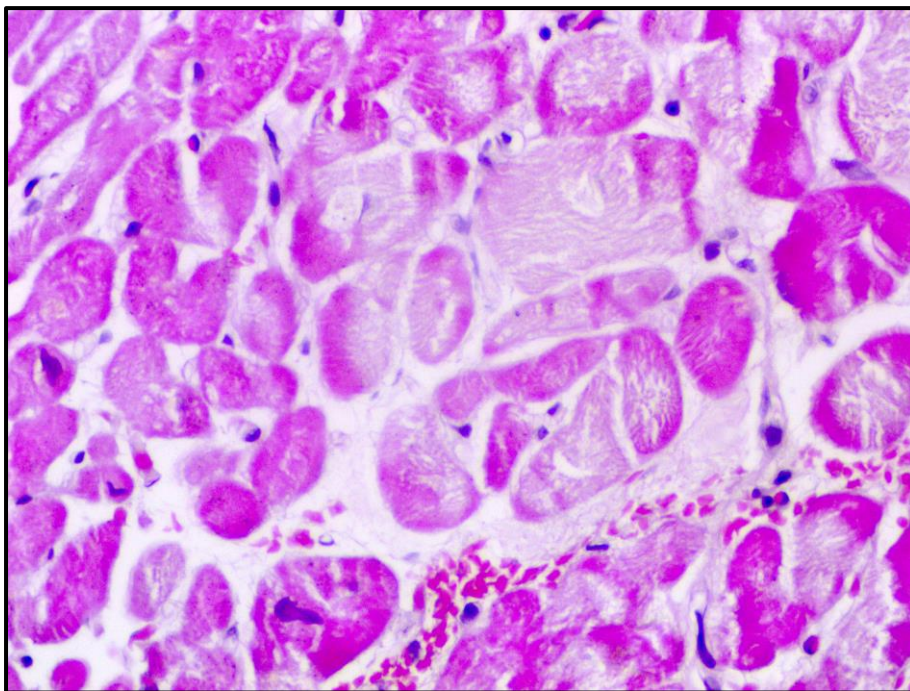


Рисунок 3.2.5. Пациентка С., 38 лет. Т86.2. Обширные поля некроза в миокарде при отторжении ЗР. Гематоксилин-эозин. Увеличение: об. х40.

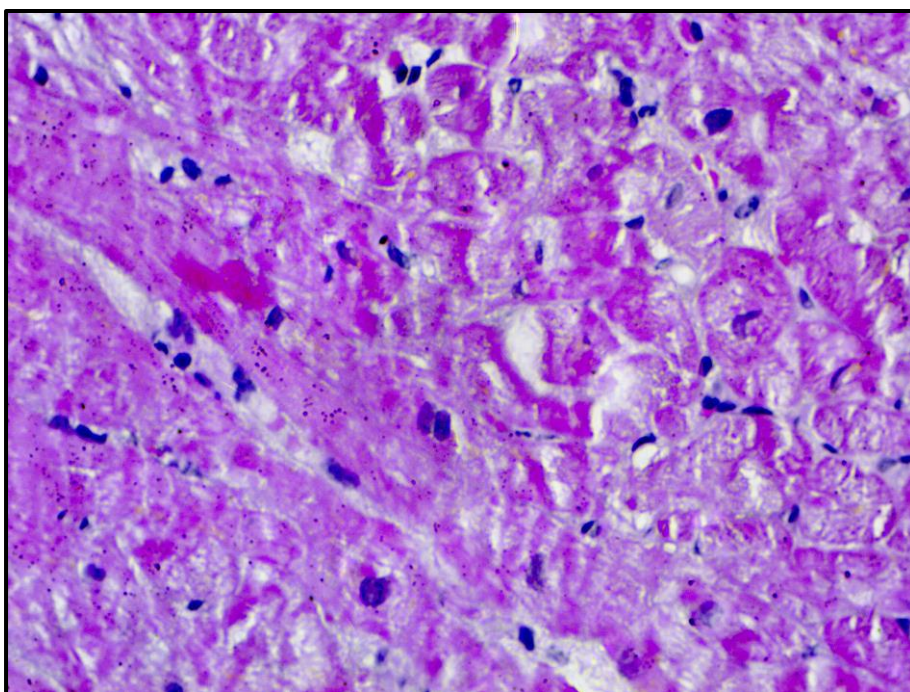


Рисунок 3.2.6. Пациент Т., 59 лет. Т86.2. Некроз небольших групп кардиомиоцитов при AMR. Гематоксилин-эозин. Увеличение: об. х40.

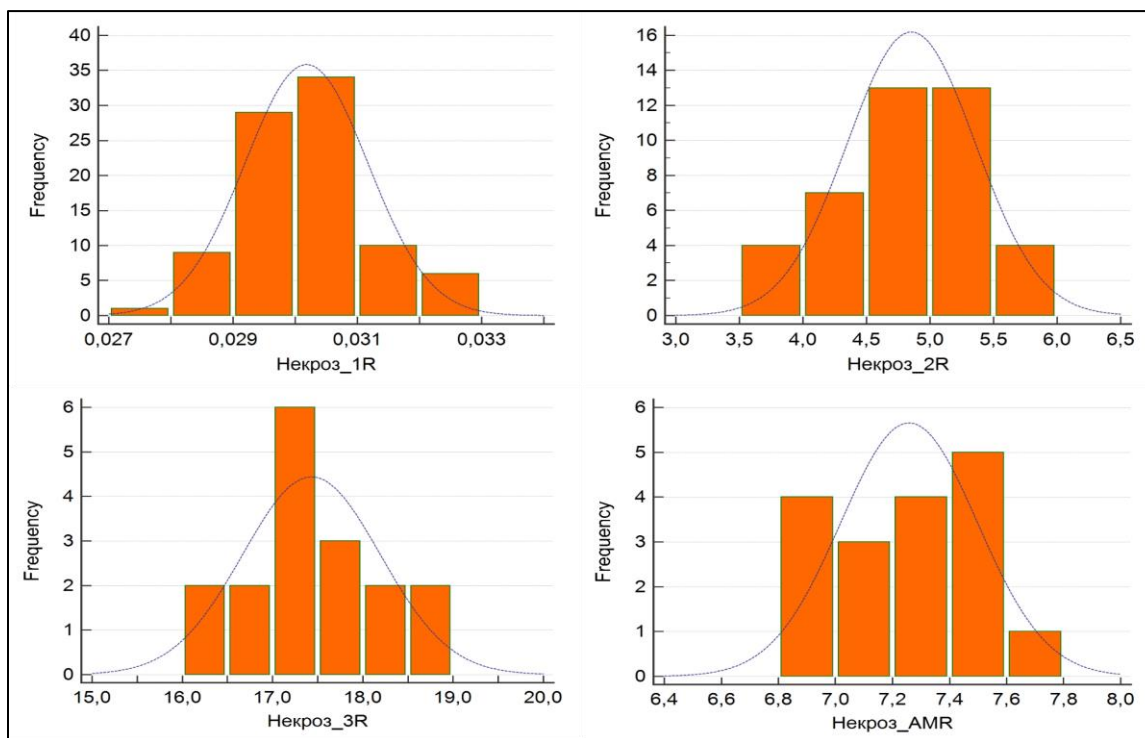


Рисунок 3.2.7. Характер распределения значений КПО некроза при отторжении трансплантированного сердца. Линия – кривая Гаусса.

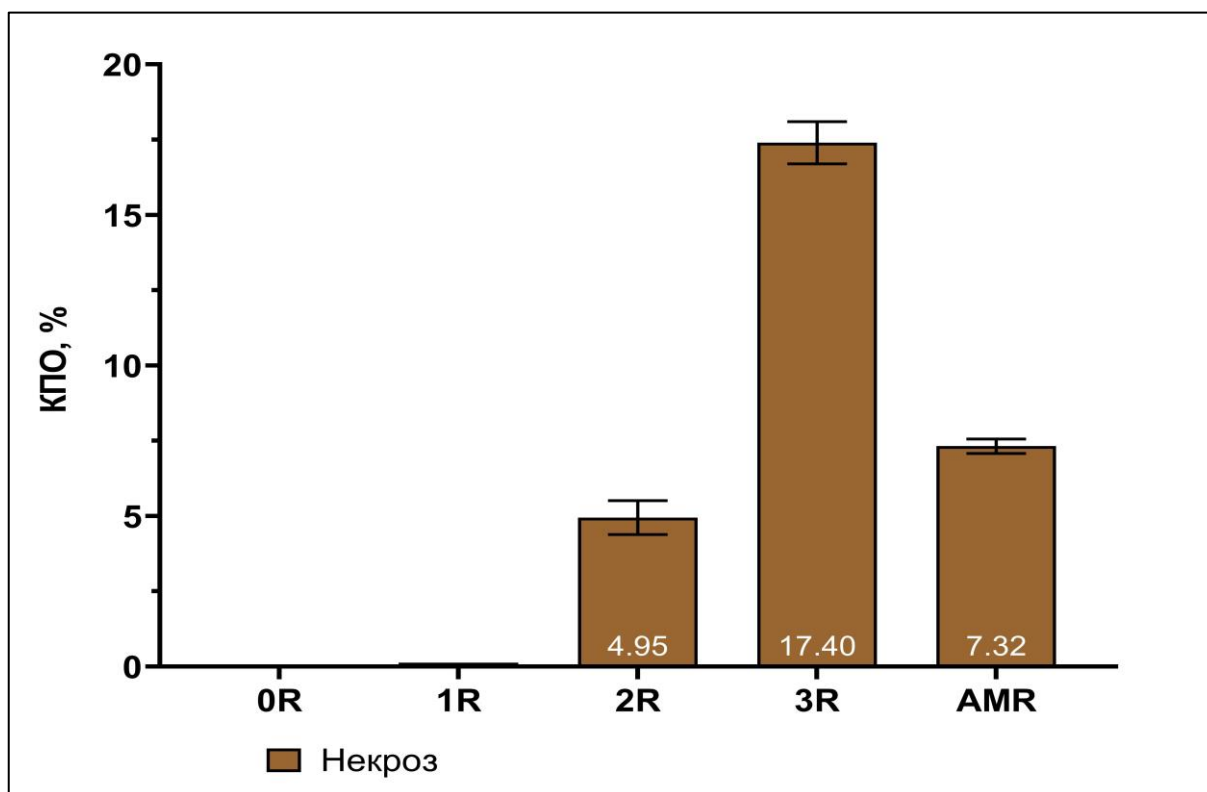


Рисунок 3.2.8. Площадь некроза при различных формах отторжения трансплантированного сердца (% площади биоптата).

Склеротические изменения. Различной выраженности склероз отмечался практически во всех биоптатах. В некоторых случаях очаги фиброза располагались строго периваскулярно, в других имели диффузный характер. В биоптатах с антитело-опосредованным отторжением наблюдалось образование своего рода соединительнотканной сети, охватывающей практически все кардиомиоциты.

Для морфометрической оценки выраженности фиброза все биоптаты также были окрашены пикрофуксином по ван Гизону (рисунки 3.2.9, 3.2.10). Полученные данные свидетельствуют о том, что выраженность фиброза нарастает незначительно при увеличении тяжести отторжения. Наибольшую площадь склеротические изменения имеют в случае антитело-опосредованного отторжения.

При отсутствии клеточного отторжения площадь фиброза была минимальной и составляла 2,36% площади биоптата. В случае первой степени тяжести этот показатель увеличивается в 1,6 раза, а в случае умеренно выраженного отторжения – в 3,7 раза в сравнение с нулевой степенью ($p < 0,05$). Для биоптатов с 3R этот показатель составляет 4,5%. При антитело-опосредованном отторжении площадь фиброза выше показателя тяжелого клеточного отторжения в 2,5 раза ($p < 0,05$). Наибольшее значение КПО фиброза принимает при умеренном клеточном и при антитело-опосредованном отторжении (таблица 6; рисунки 3.2.11, 3.2.12). Меньшее значение в случае тяжелого клеточного процесса по сравнению с умеренным свидетельствует, по-видимому, о более остром течении воспалительной реакции в первом случае.

Таблица 6. Выраженность фиброза в зависимости от формы отторжения

Патологический процесс	КПО ($\bar{X} \pm m$), %				
	0R	1R	2R	3R	AMR
Фиброз	2,36±0,24	3,80±0,37	8,69±0,77	4,50±0,17	10,03±0,60

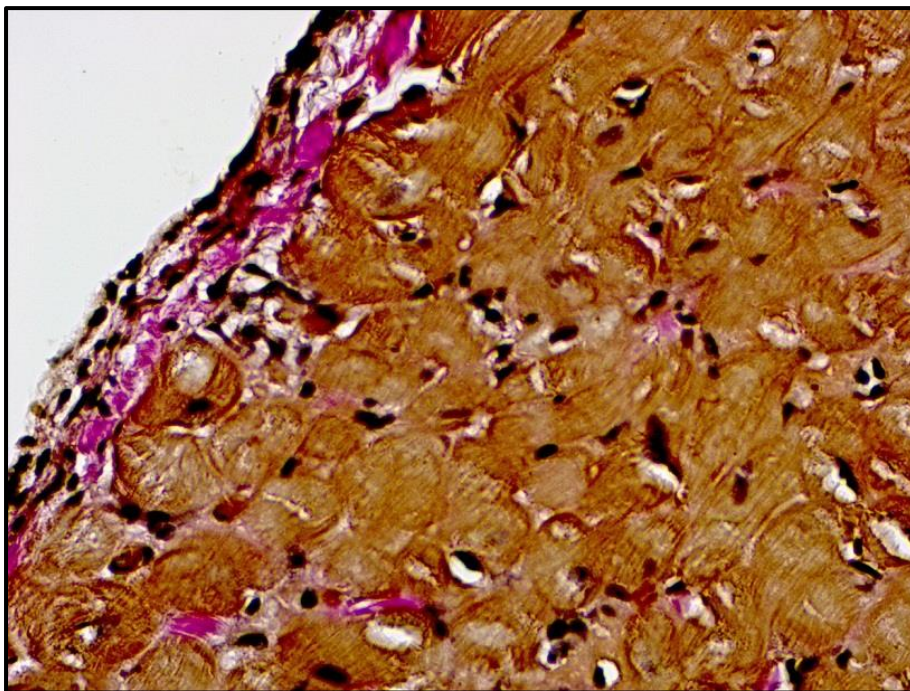


Рисунок 3.2.9. Пациентка У., 42 года. Т86.2. Незначительный субэндокардиальный фиброз миокарда при отторжении 1R. Пикрофуксин по ван Гизону. Увеличение: об. x40

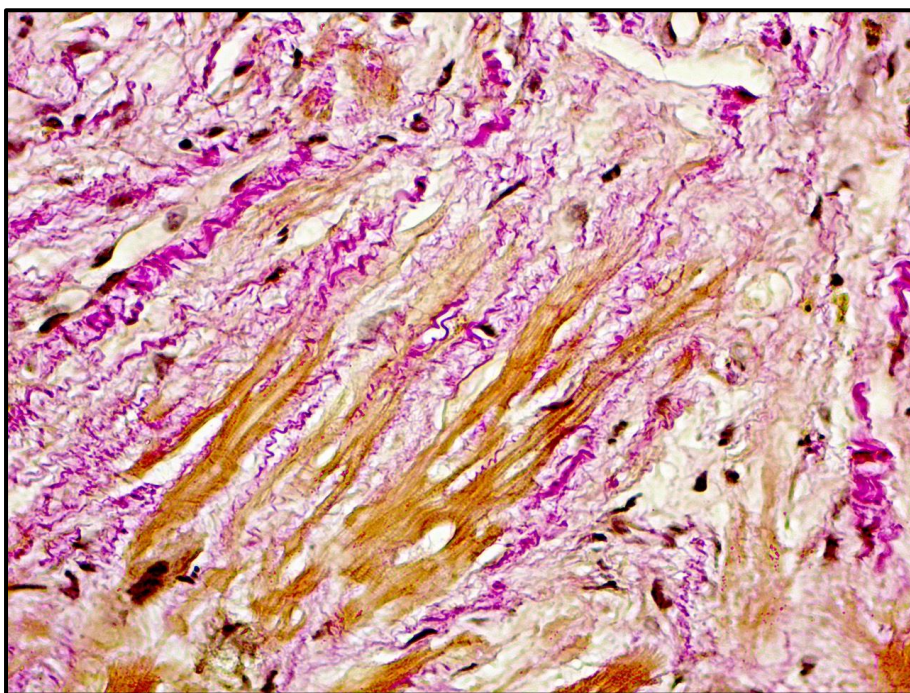


Рисунок 3.2.10 Пациентка Ж., 37 лет. Т86.2. Диффузный кардиосклероз в сердечной мышце при AMR. Пикрофуксин по ван Гизону. Увеличение: об. x40.

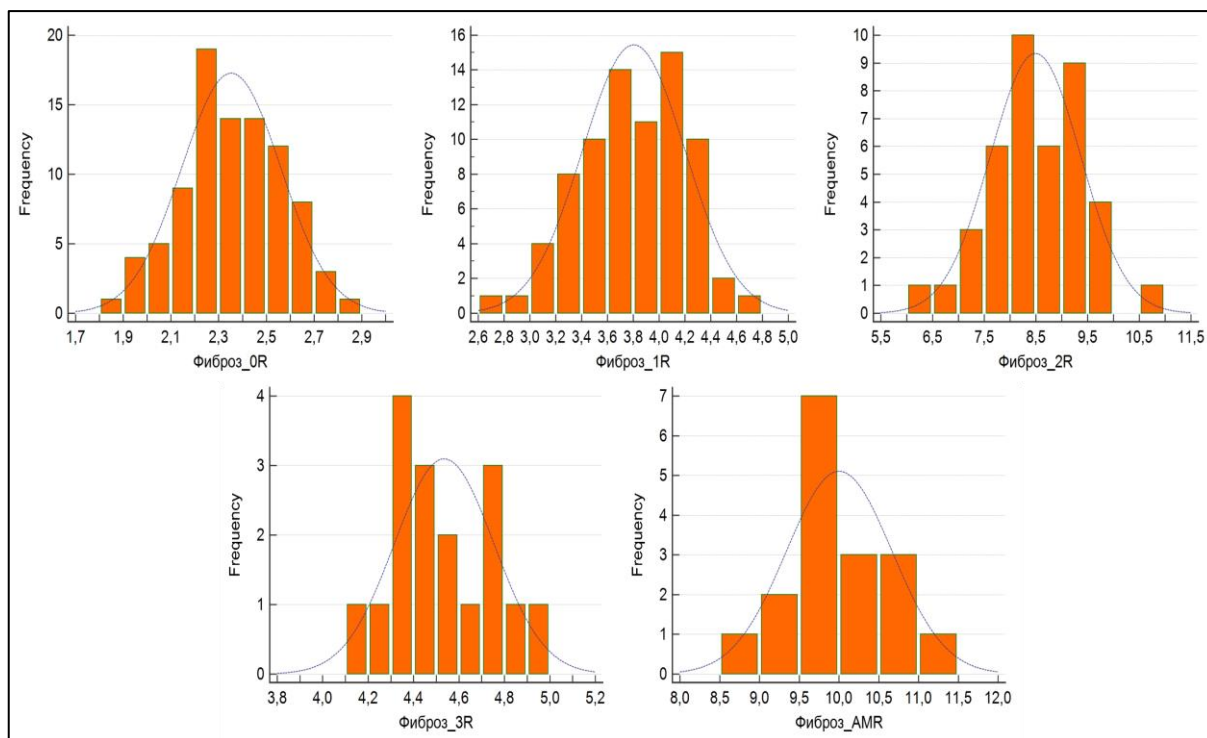


Рисунок 3.2.11. Характер распределения значений КПО фиброза при отторжении трансплантированного сердца. Линия – кривая Гаусса.

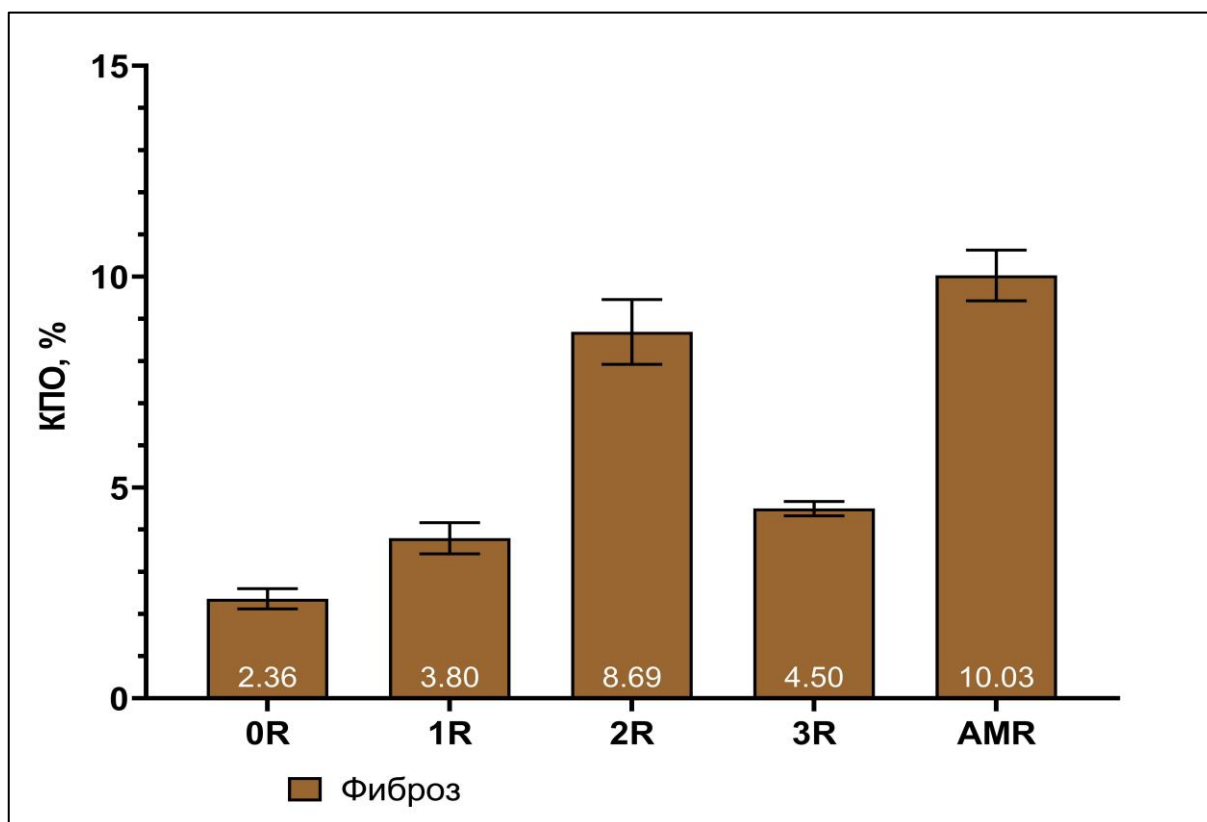


Рисунок 3.2.12. КПО фиброза в зависимости от формы отторжения трансплантированного сердца.

Стеатоз. Появление вакуолей в кардиомиоцитах было отмечено при любой форме отторжения. Для подтверждения липидной природы вакуолей выполнено окрашивание замороженных срезов суданом III (рисунок 3.2.13, 3.2.14). Очаги стеатоза были немногочисленны и в основном локализовались под эндокардом. В ряде биоптатов отмечено периваскулярное развитие жировой ткани, а также совпадение зон стеатоза и фиброза. Стеатоз появляется уже при нулевой степени тяжести отторжения, где его величина составляет 0,16% (таблица 7; рисунки 3.1.15, 3.1.16).

Таблица 7. Стеатоз при отторжении трансплантированного сердца

Патологический процесс	КПО ($\bar{X} \pm m$), %				
	0R	1R	2R	3R	AMR
Стеатоз	0,16±0,05	5,88±0,30	14,70±0,90	16,50±2,23	15,24±2,81

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 выявлена.

Наибольшее значение КПО стеатоза выявлено 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. Очаги стеатоза практически во всех случаях располагались периваскулярно.

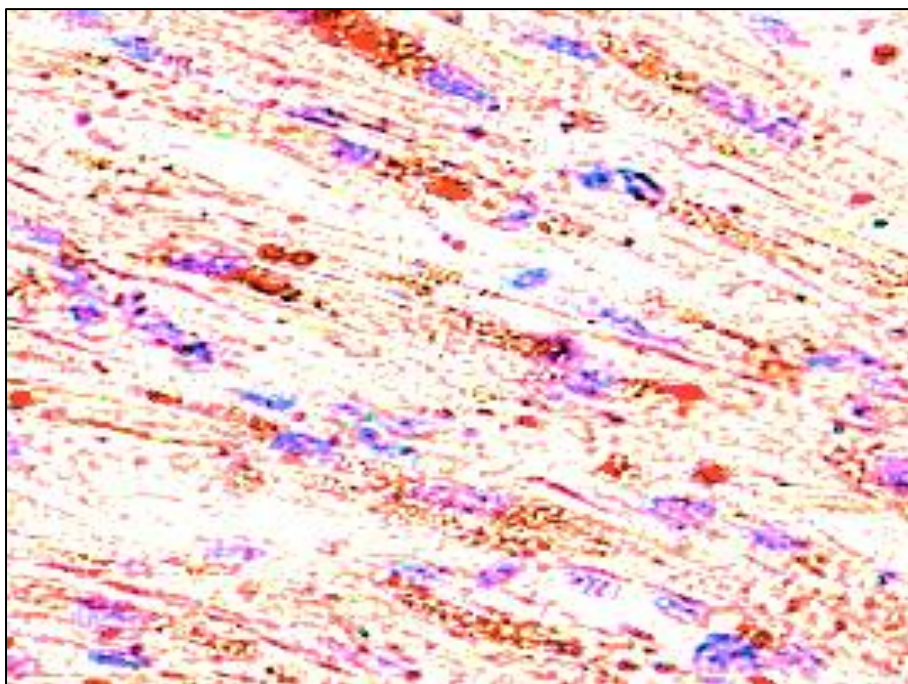


Рисунок 3.2.13. Пациент Е., 50 лет. Т86.2. Умеренно выраженный стеатоз в сердечной мышце при клеточном отторжении 1R. Судан III. Увеличение: об. х40.

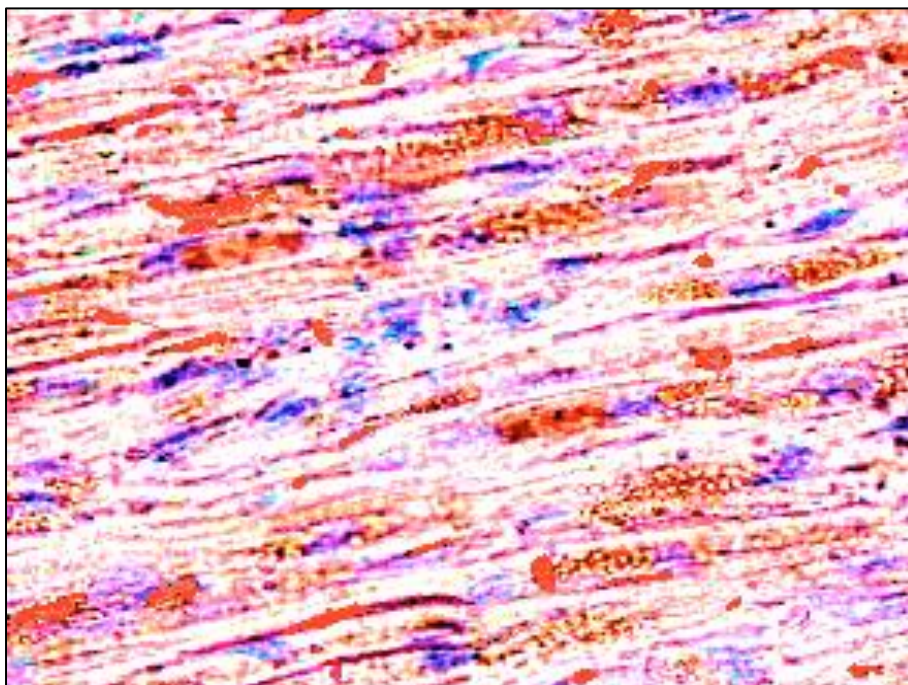


Рисунок 3.2.14. Пациентка У., 51 год, Т86.2. Значительный стеатоз ткани сердечного трансплантата при клеточном отторжении 3R. Судан III. Увеличение: об. х40.

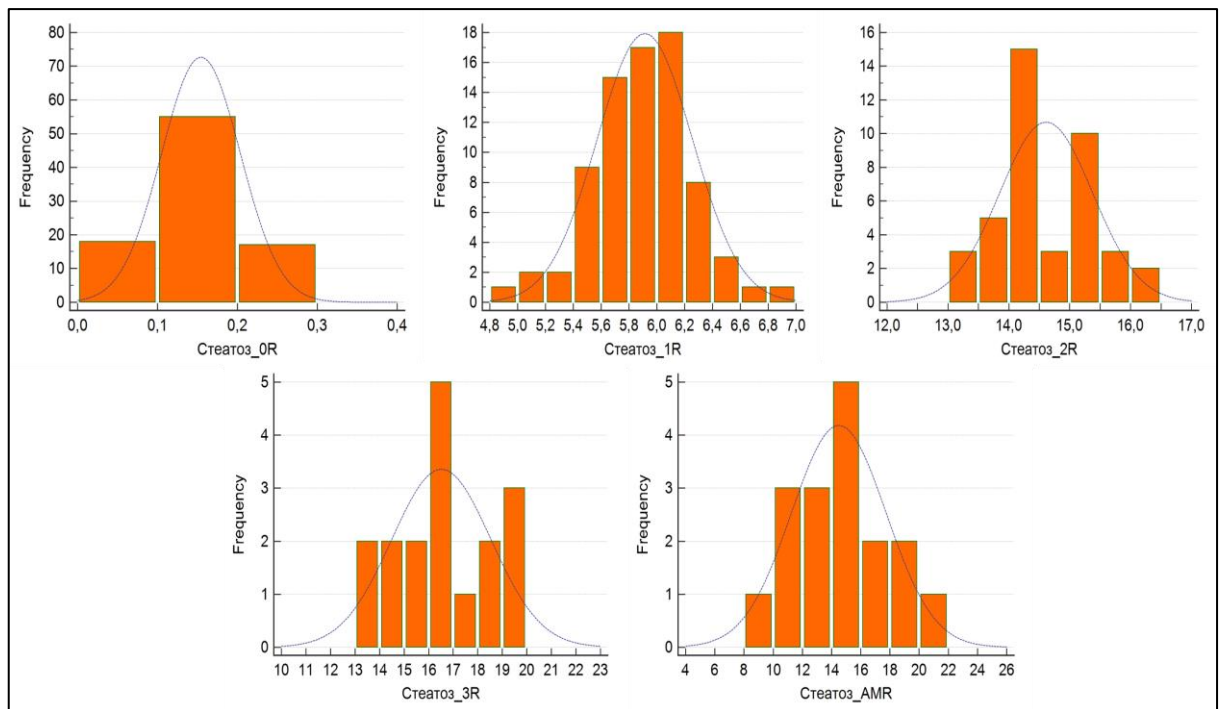


Рисунок 3.2.15. Характер распределения значений КПО стеатоза при отторжении трансплантированного сердца. Линия – кривая Гаусса.

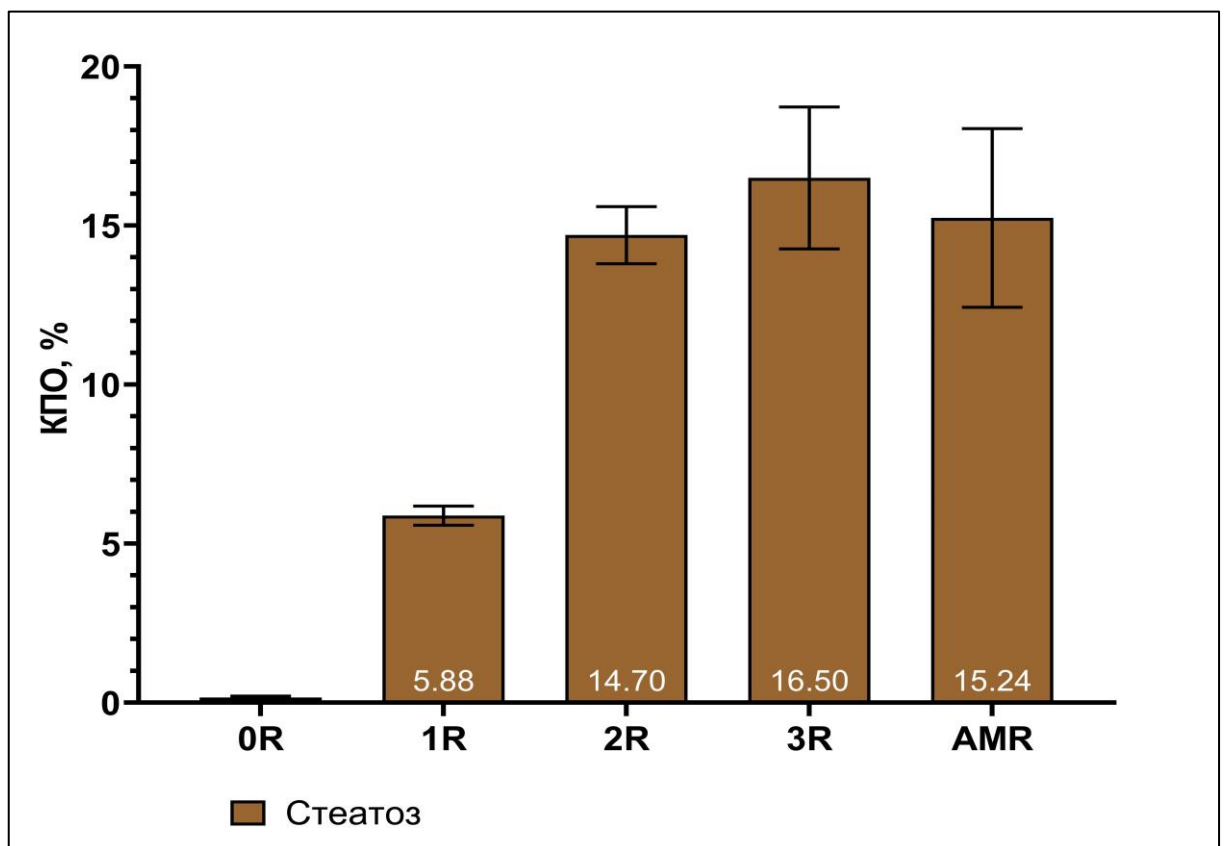


Рисунок 3.2.16. КПО стеатоза в зависимости от формы и тяжести отторжения трансплантата.

3.3. Компоненты клеточного воспалительного инфильтрата

С помощью компьютерной морфометрии оценивали клеточный состав воспалительного инфильтрата в миокарде. Клеточными элементами, присутствующими в очагах воспаления, служили макрофаги, лимфоциты и нейтрофильные гранулоциты. Единичные эозинофилы неспецифичны по отношению к тяжести воспалительного процесса.

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 мм^2 – наблюдается при тяжелом отторжении ($p < 0,05$). Что касается AMR, то здесь их содержание сопоставимо со степенью 1R (таблица 8; рисунки 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4).

Таблица 8. Клеточные элементы инфильтрата при ОТС

Степень тяжести отторжения	Клеток на 1 мм^2 площади ($\bar{X} \pm m$)		
	Нейтрофилы	Макрофаги	Лимфоциты
0R (n=92)	0,66±0,03	8,20±0,90	2,43±0,09
1R (n=77)	2,91±0,10	8,94±1,00	3,57±0,08
2R (n=30)	9,40±0,51	12,07±1,02	7,64±0,13
3R (n=8)	11,54±1,02	25,00±2,14	13,85±2,97
AMR (n=19)	2,22±0,08	20,18±1,23	16,00±1,01

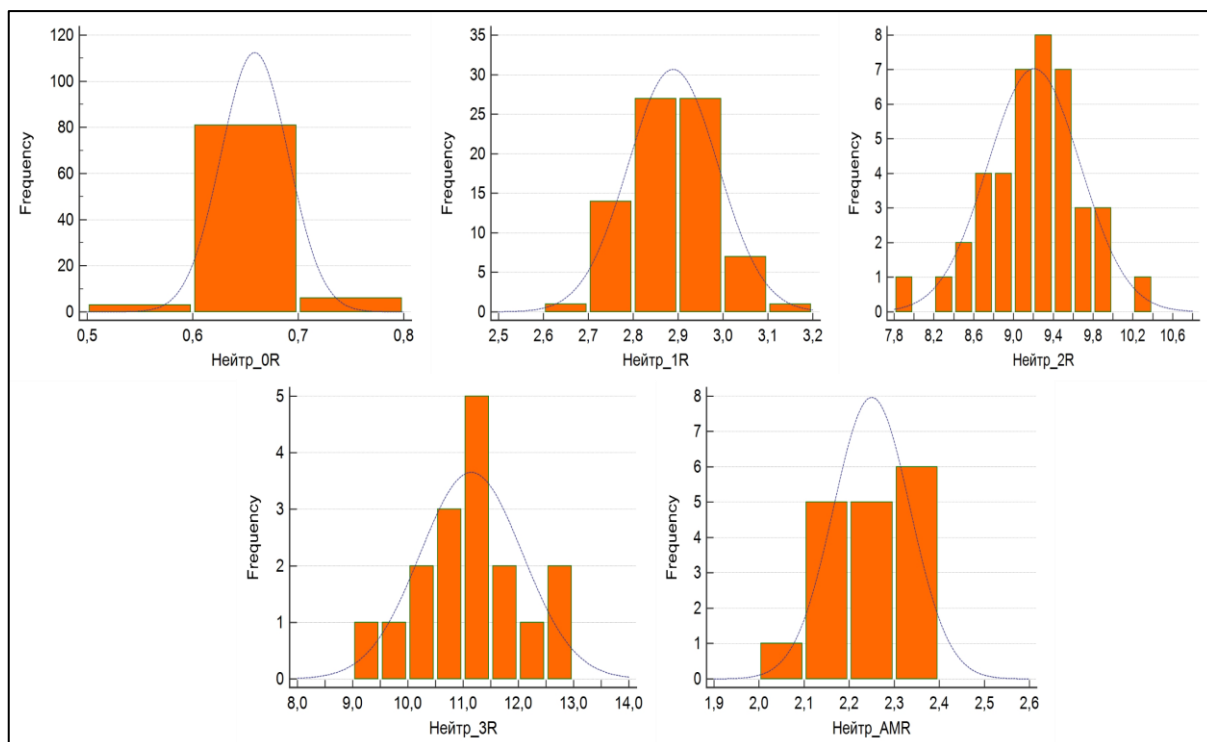


Рисунок 3.3.1. Характер распределения значений количества нейтрофильных гранулоцитов при отторжении трансплантированного сердца. Линия – кривая Гаусса.

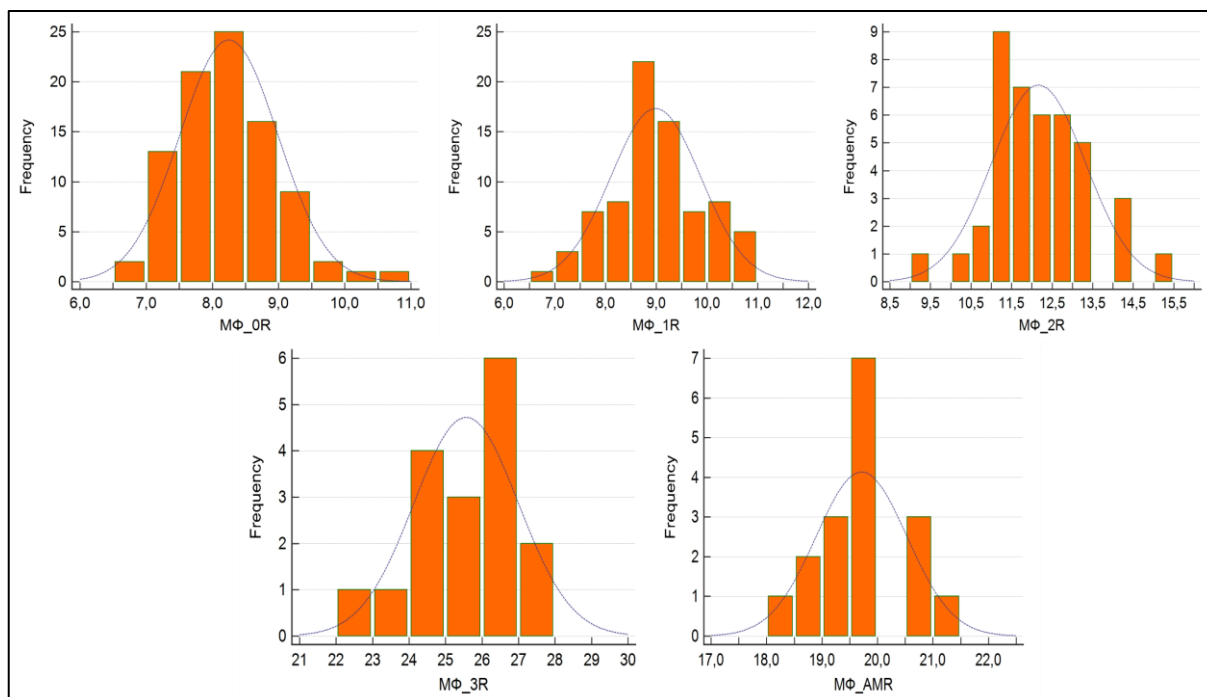


Рисунок 3.3.2. Характер распределения значений количества макрофагов при отторжении трансплантированного сердца. Линия – кривая Гаусса.

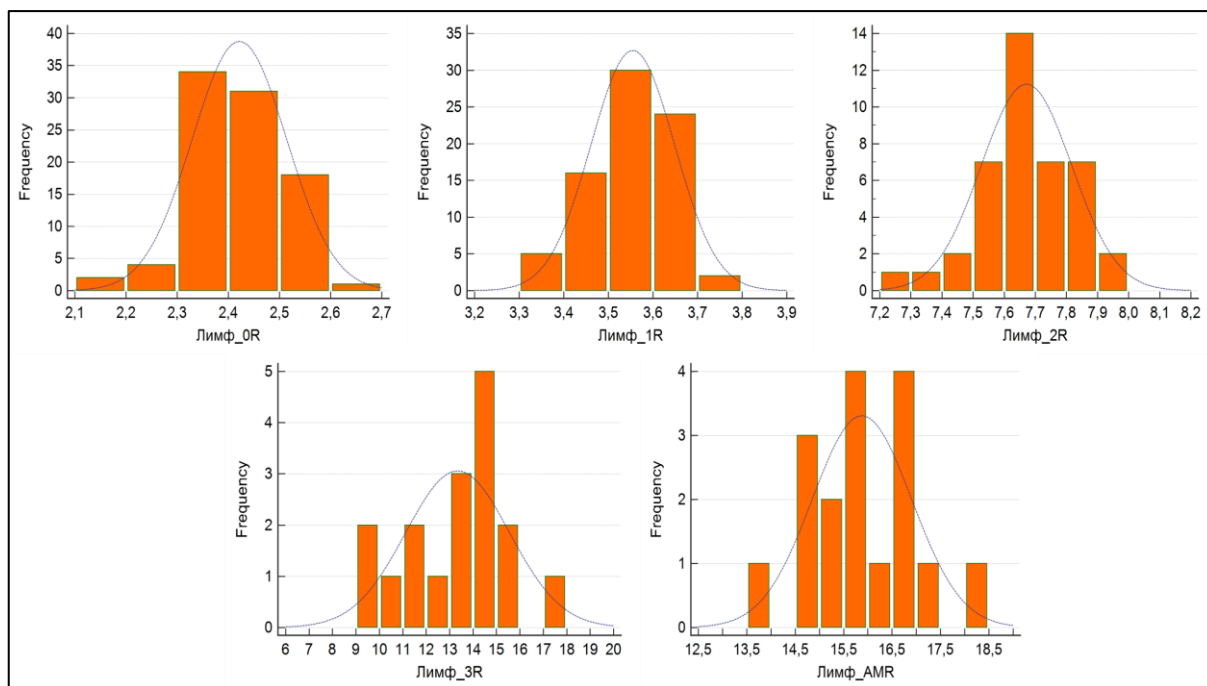


Рисунок 3.3.3. Характер распределения значений количества лимфоцитов при отторжении трансплантированного сердца. Линия – кривая Гаусса.

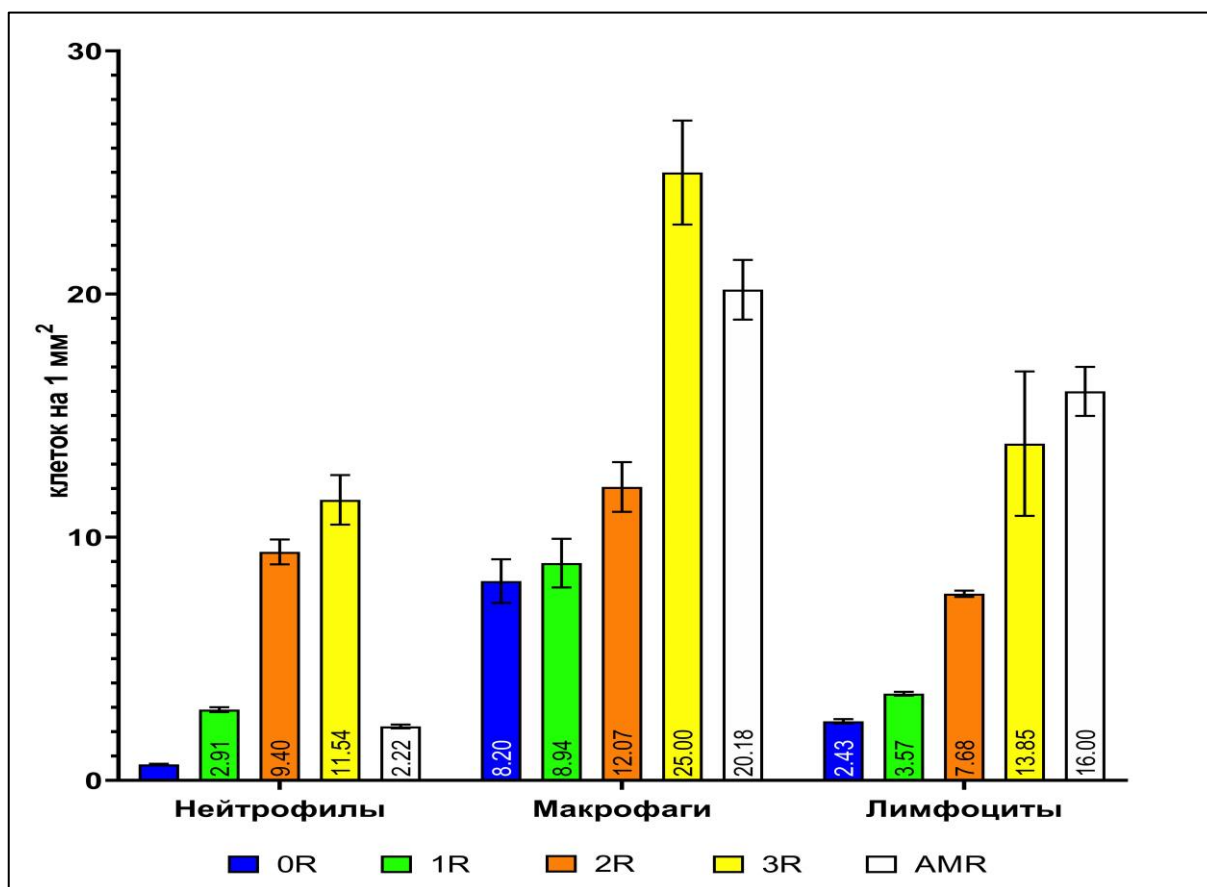


Рисунок 3.3.4. Клеточные элементы инфильтрата в миокарде при отторжении трансплантированного сердца

Макрофаги – постоянный элемент воспалительного инфильтрата – также обнаруживаются при любой форме ОТС. Их количество практически одинаково в случае 0R и 1R. Однако при умеренно выраженном отторжении эта величина повышается в полтора раза, а при тяжелом и анитело-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 тяжелом ($p<0,05$). В случае AMR содержание лимфоцитов было на 13% больше, чем при 3R ($p<0,05$).

Проведено иммуногистохимическое исследование для выявления последовательно лейкоцитарных антигенов (CD3 – Т-лимфоциты, CD68 – макрофаги, CD20 – В-лимфоциты), компонентов комплемента C3d и C4d, а также рецепторов комплемента второго типа (CR-2, CD21) и тромбоцитарно-эндотелиальных молекул клеточной адгезии (PECAM-1, CD31).

Т-лимфоциты (CD3). Мембранный белок CD3, служащий одним из основных компонентов Т-клеточного рецептора, характеризовался диффузным расположением на поверхности клеток (рисунки 3.3.5, 3.3.6). 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 – когда речь идет о тяжелом клеточном отторжении ($p<0,05$). При AMR эта величина занимает промежуточное положение между таковыми для 2R и 3R (таблица 9; рисунки 3.3.7, 3.3.8.).

Таблица 9. Экспрессия CD3 в зависимости от формы отторжения сердца

Маркер	КПО ($\bar{X} \pm m$), %				
	0R	1R	2R	3R	AMR
CD3	0,99±0,02	2,03±0,06	3,41±0,10	5,45±1,00	4,75±0,33

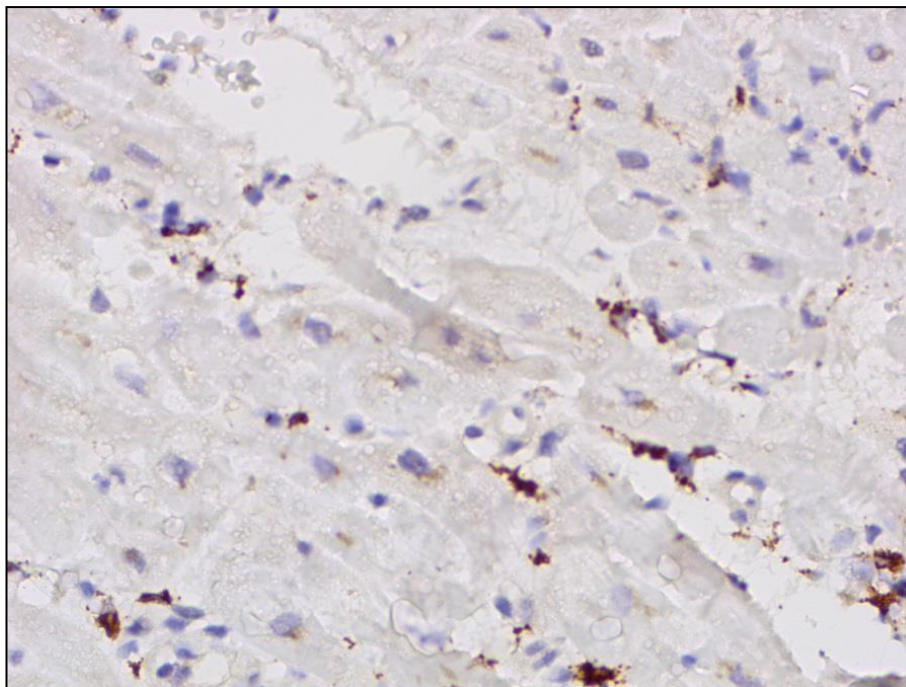


Рисунок 3.3.5. Пациент Т., 52 года. Т86.2. Небольшой инфильтрат из CD3-позитивных Т-лимфоцитов в миокарде пересаженного сердца при отторжении 1R. Пероксидазная иммуногистохимическая реакция. Увеличение: об. x40.

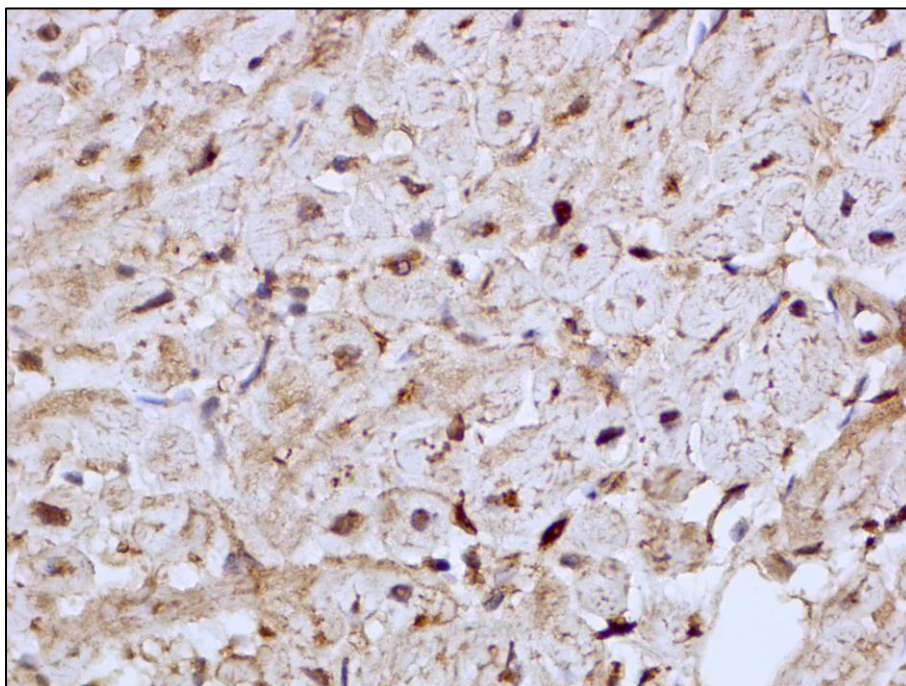


Рисунок 3.3.6. Пациентка У., 58 лет. Т86.2. Диффузное расположение CD3-позитивных клеток в сердечной мышце при отторжении 3R. Стрептавидин-пероксидазная иммуногистохимическая реакция. Увеличение: об. x40.

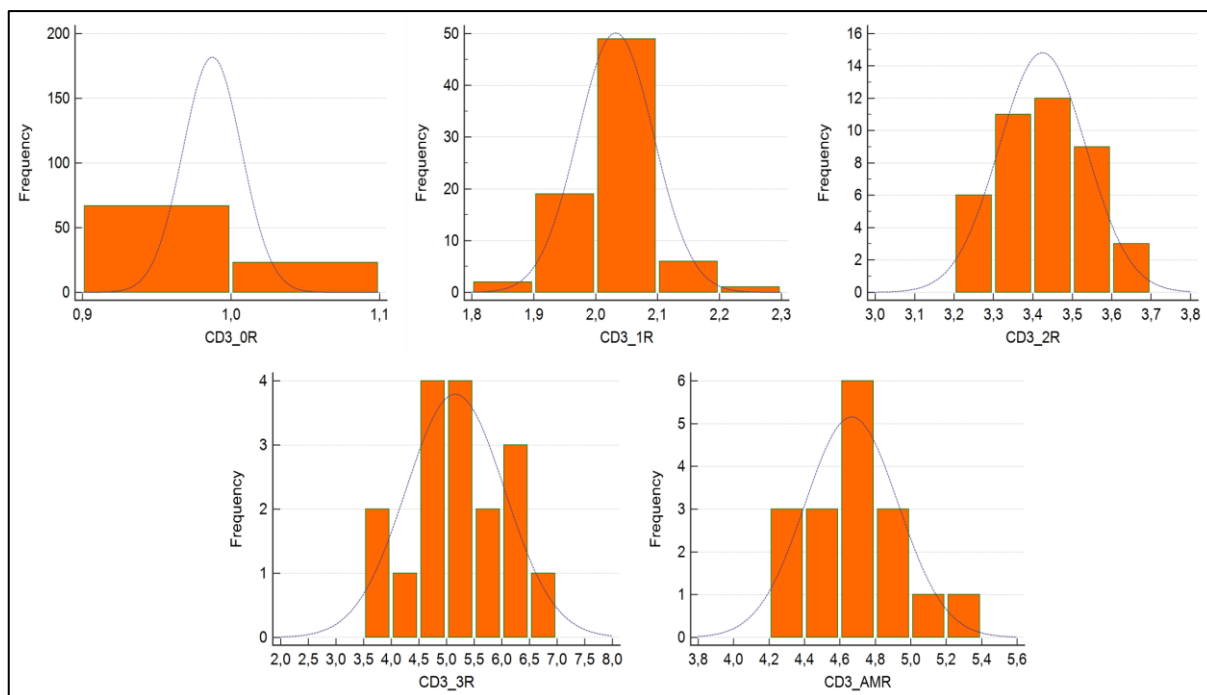


Рисунок 3.3.7. Характер распределения значений КПО маркера CD3 (Т-лимфоциты) при отторжении трансплантированного сердца. Линия – кривая Гаусса.

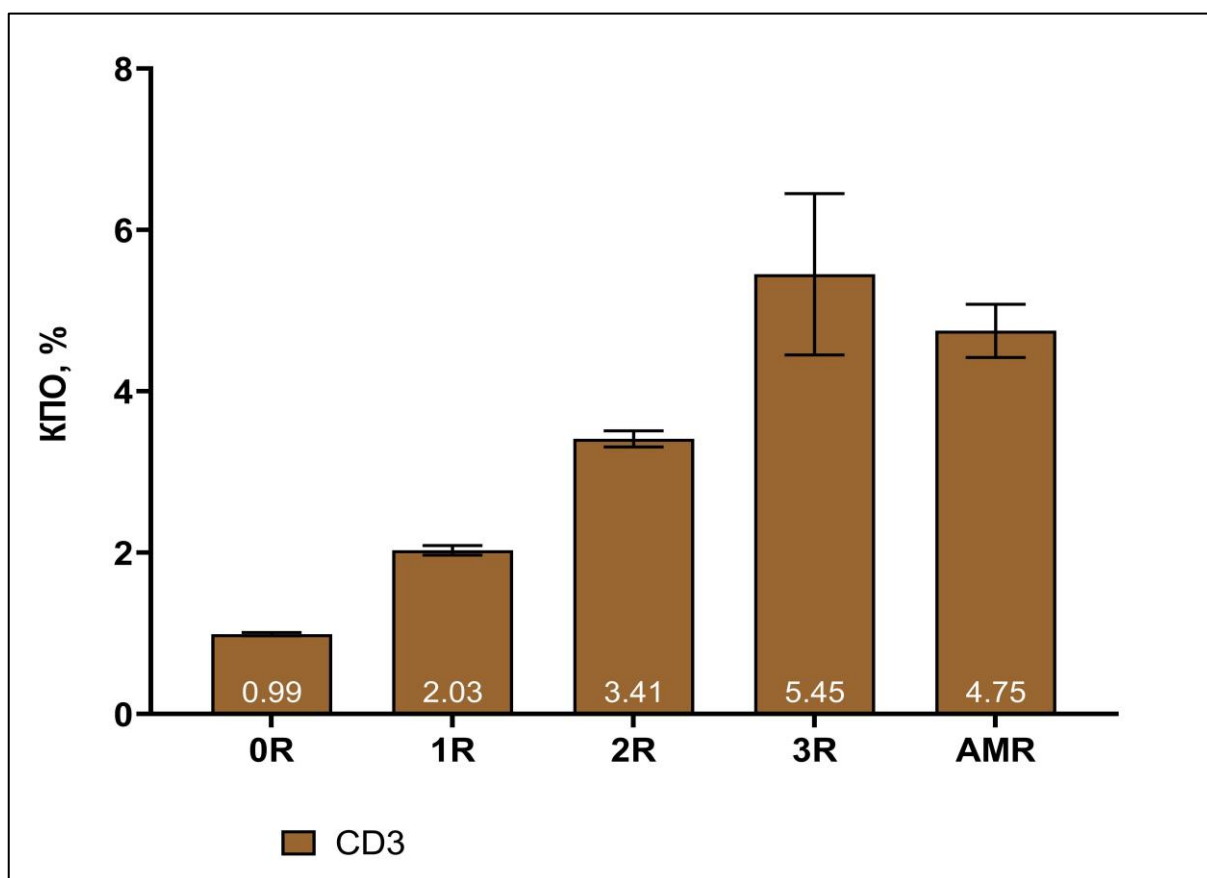


Рисунок 3.3.8. Т-лимфоциты (CD3+) при различных формах/степенях тяжести отторжения трансплантированного сердца (% площади биоптата).

В-лимфоциты (CD20). В-лимфоцитарный корецептор характеризуется мембранной локализацией. Единичные CD20-позитивные клетки диффузно располагались практически во всех полях зрения большинства, исследованных биоптатов (рисунок 3.3.9, 3.3.10). Ряд гистологических препаратов характеризовался субэндокардиальными скоплениями В-лимфоцитов. Экспрессия поверхностного маркера В-лимфоцитов 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 (таблица 10; рисунки 3.3.11, 3.3.12).

Таблица 10. Экспрессия CD20 при отторжении трансплантированного сердца

Маркер	КПО ($\bar{X} \pm m$), %				
	0R	1R	2R	3R	AMR
CD20	0,19±0,01	0,52±0,02	0,65±0,03	0,84±0,21	1,80±0,22

Моноциты/макрофаги (CD68). 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 (рисунки 3.3.13, 3.3.14).

Экспрессия макросиалина (КПО) при 0R составила 0,34% (таблица 11), при 1R она увеличивалась в 2,7 раза, при 2R – в 3,97 раза ($p<0,05$). При тяжелом 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 (рисунки 3.3.15, 3.3.16) Таким образом, наибольшее содержание макрофагов характеризует тяжелое клеточное отторжение.

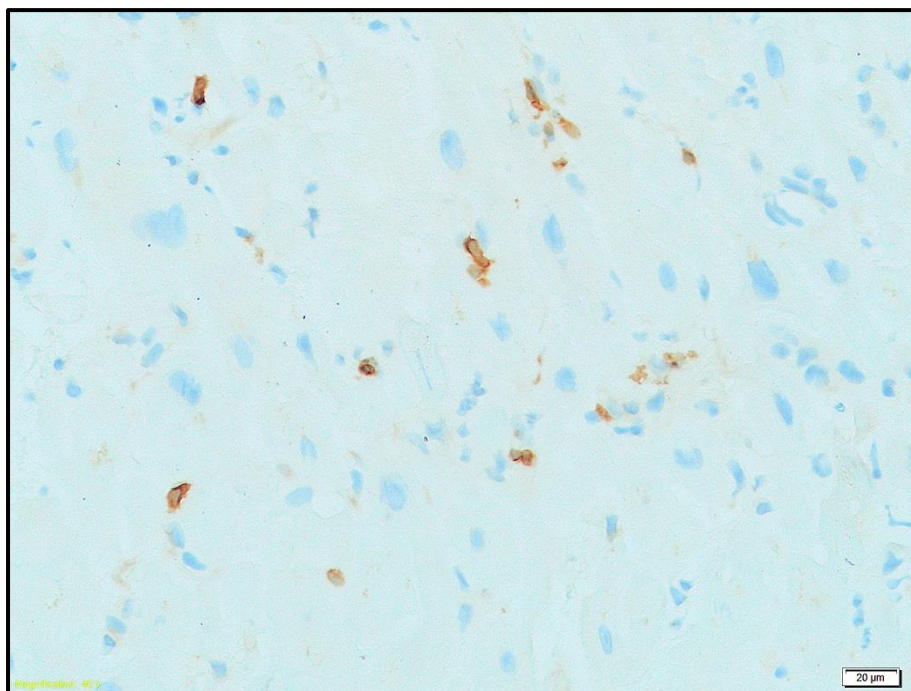


Рисунок 3.3.9 Пациент Д., 40 лет. Т86.2. Немногочисленные В-лимфоциты (CD20+) в миокарде при отторжении трансплантированного сердца 2R. Пероксидазная иммуногистохимическая реакция. Увеличение: об. x40.

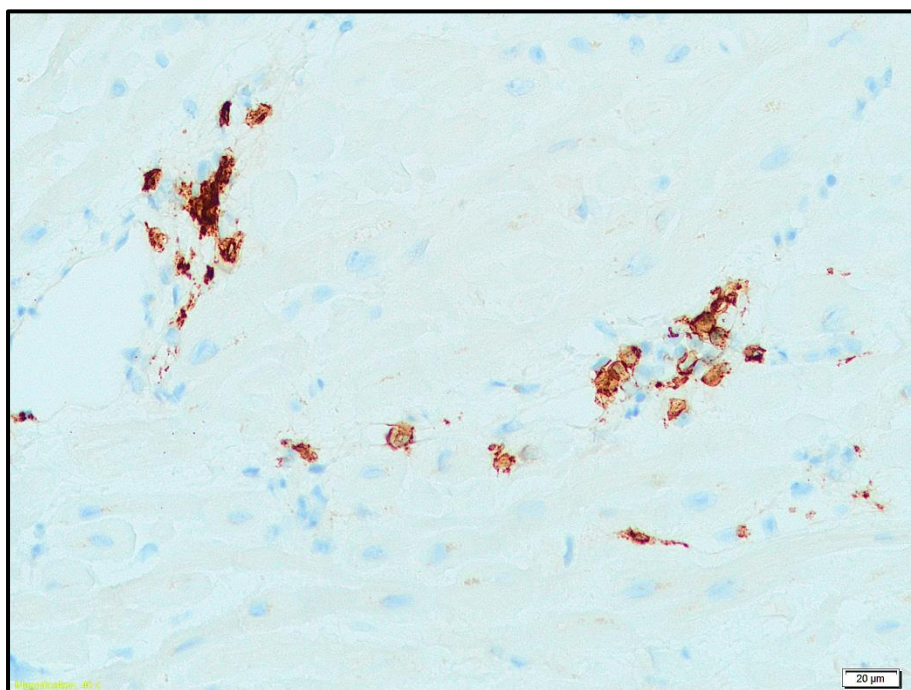


Рисунок 3.3.10 Пациентка М., 39 лет. Т86.2. Очаговые скопления В-лимфоцитов (CD20+) в миокарде при отторжении AMR. Стрептавидин-пероксидазная иммуногистохимическая реакция. Увеличение: об. x40.

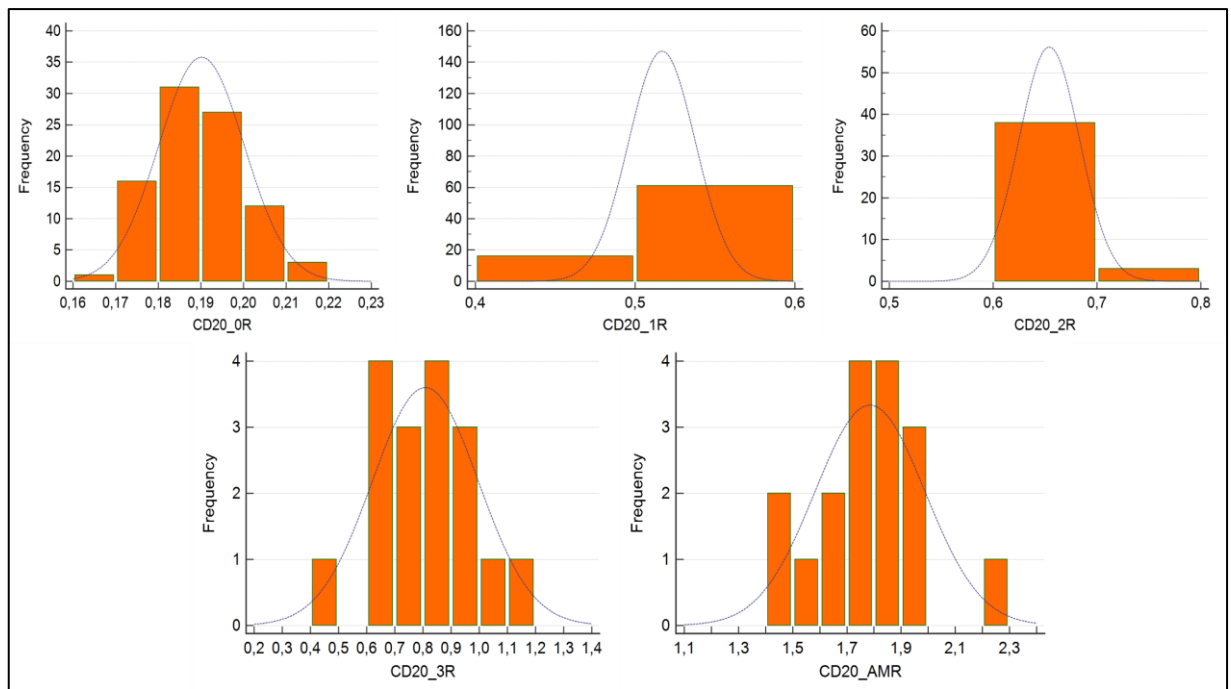


Рисунок 3.3.11. Характер распределения значений КПО CD20 (В-лимфоциты) при отторжении трансплантированного сердца. Линия – кривая Гаусса.

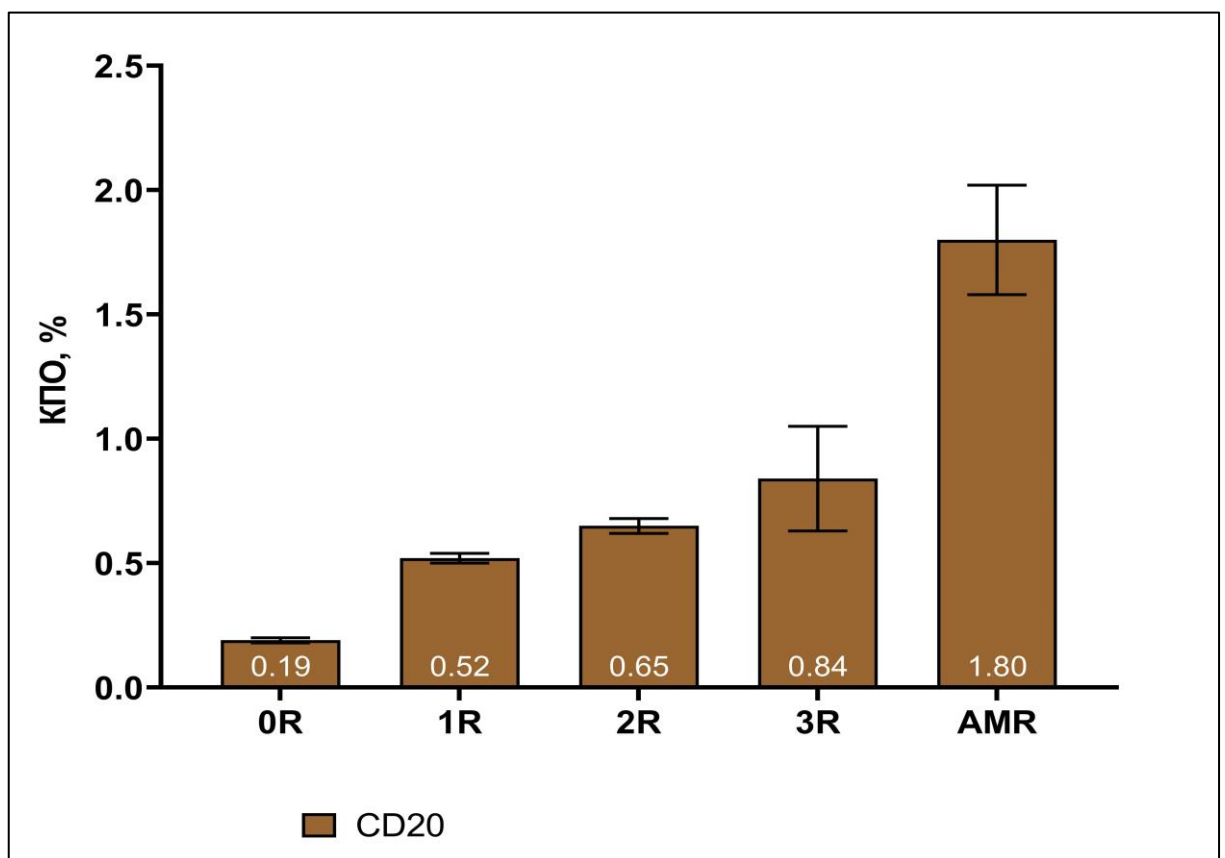


Рисунок 3.3.12. КПО В-лимфоцитов в инфильтрате при отторжении трансплантированного сердца.

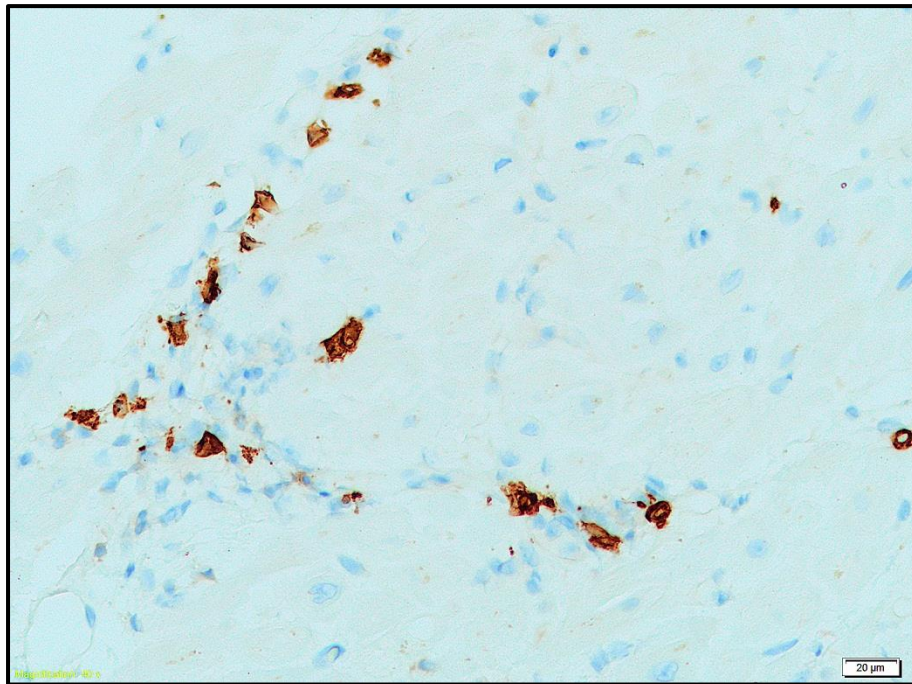


Рисунок 3.3.13. Пациент Т., 44 года. Т86.2. Единичные макрофаги (CD68+) в миокарде при клеточном отторжении 1R. Стрептавидин-пероксидазная иммуногистохимическая реакция. Увеличение: об. х40.

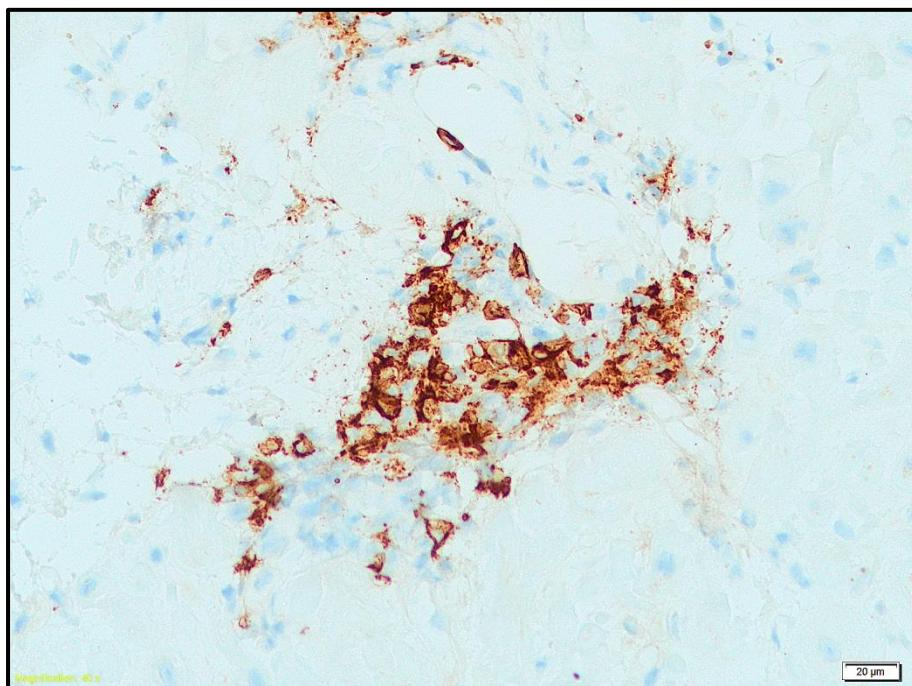


Рисунок 3.3.14. Пациентка Д., 42 года, Т86.2. Крупное скопление макрофагов (CD68+) в ткани сердца при отторжении трансплантата 3R. Стрептавидин-пероксидазная иммуногистохимическая реакция. Увеличение: об. х40.

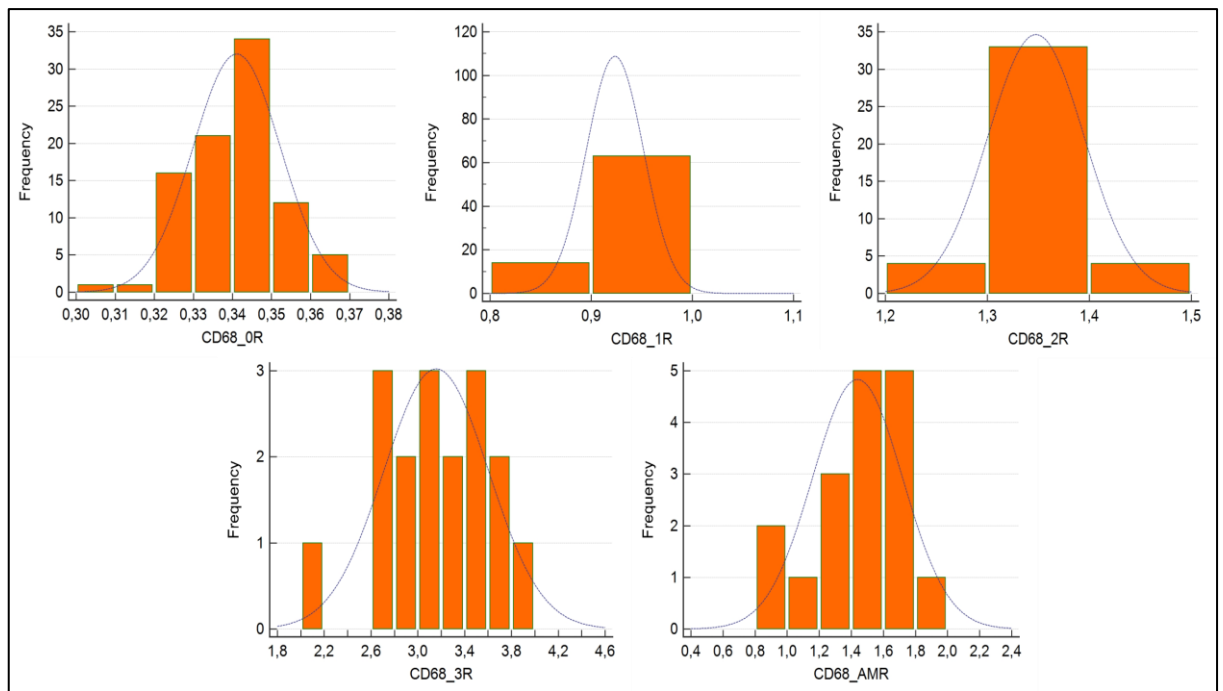


Рисунок 3.3.15. Характер распределения значений КПО CD68 (макрофаги) при отторжении трансплантированного сердца. Линия – кривая Гаусса.

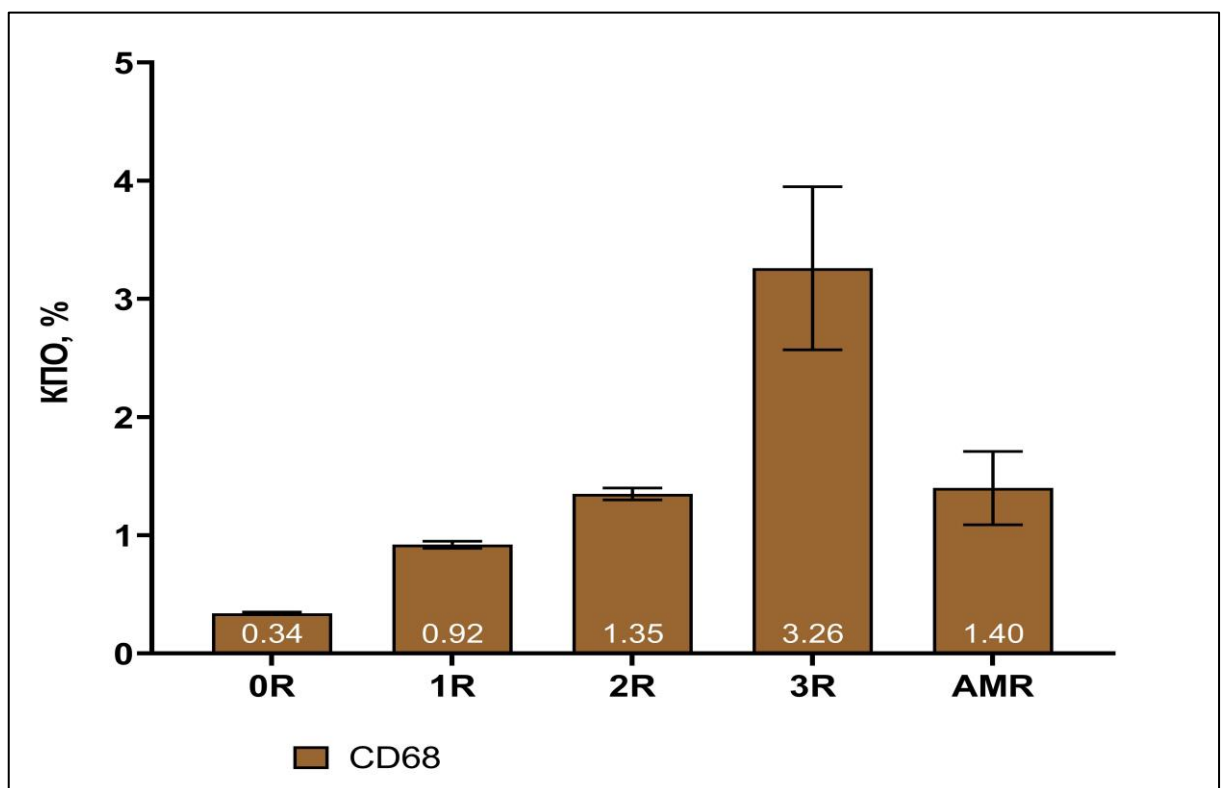


Рисунок 3.3.16. Экспрессия моноцитов/макрофагов (CD68+) при различных формах отторжения трансплантированного сердца.

Таблица 11. Экспрессия CD68 при отторжении трансплантированного сердца

Маркер	КПО ($\bar{X} \pm m$), %				
	0R	1R	2R	3R	AMR
CD68	0,34±0,01	0,92±0,03	1,35±0,05	3,26±0,69	1,40±0,31

3.4. Компоненты комплемента

С помощью иммуногистохимической реакции была определена экспрессия компонентов комплемента C3d и C4d. Указанные маркеры в основном используются для верификации антитело-опосредованного отторжения, однако нами было решено оценить их участие и в процессе ACR.

Компонент комплемента C3d. Продукт активации белка C3, служащий для взаимодействия с рецепторами В-лимфоцитов, обладает способностью формировать диффузные отложения в очаге воспаления (рисунок 3.4.1). Нередко в нашем исследовании депозиты C3d отмечались вдоль базальной мембраны кровеносных сосудов и реже эндокарда (рисунок 3.4.2).

Компонент комплемента C3d присутствовал в незначительных количествах во всех биоптатах. Охватываемая им площадь среза практически не изменялась в зависимости от степени тяжести отторжения вплоть до тяжелого клеточного отторжения (таблица 12, рисунки 3.4.3, 3.4.4), где его КПО повышается в 2,9 раза в сравнении с 0R ($p < 0,05$).

Таблица 12. Экспрессия C3d при отторжении трансплантированного сердца

Маркер	КПО ($\bar{X} \pm m$), %				
	0R	1R	2R	3R	AMR
C3d	0,60±0,02	0,66±0,02	0,72±0,03	1,72±0,14	1,98±0,11

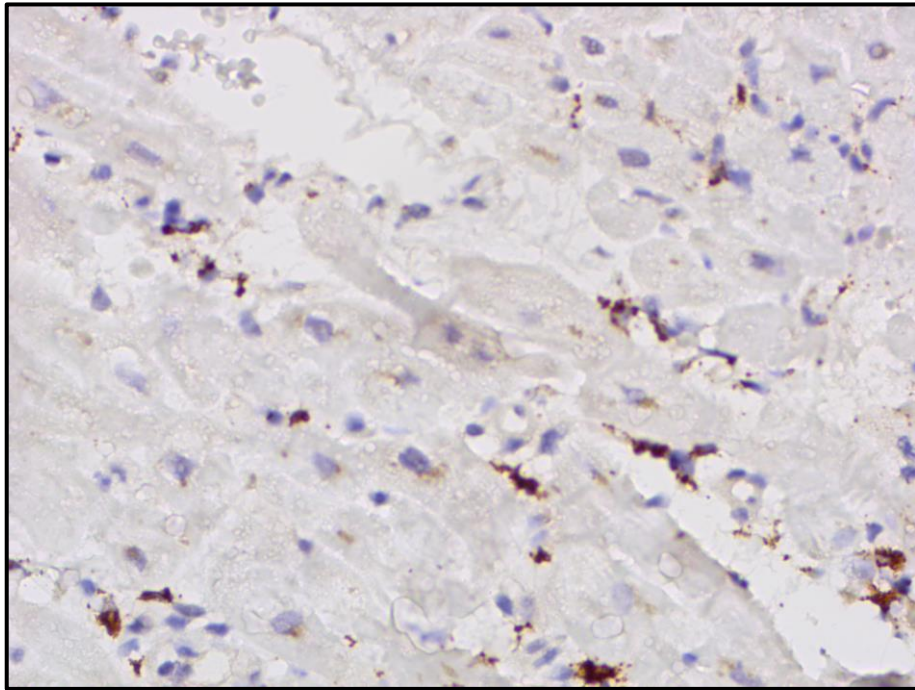


Рисунок 3.4.1. Пациент Ц., 56 лет, Т86.2. Небольшие депозиты компонента комплемента C3d в строме миокарда при отторжении 1R. Стрептавидин-пероксидазная иммуногистохимическая реакция. Увеличение: об. х40.

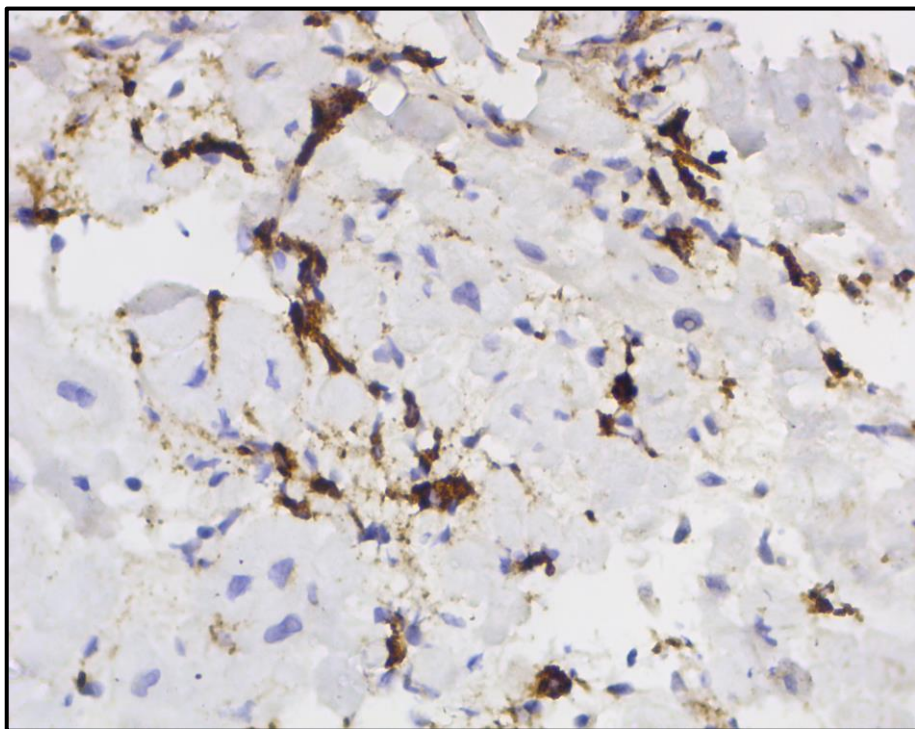


Рисунок 3.4.2. Пациент М., 55 лет, Т86.2. Значительные депозиты компонента комплемента C3d при тяжелом клеточном отторжении, локализующиеся в интерстиции. Стрептавидин-пероксидазная иммуногистохимическая реакция. Увеличение: об. х40.

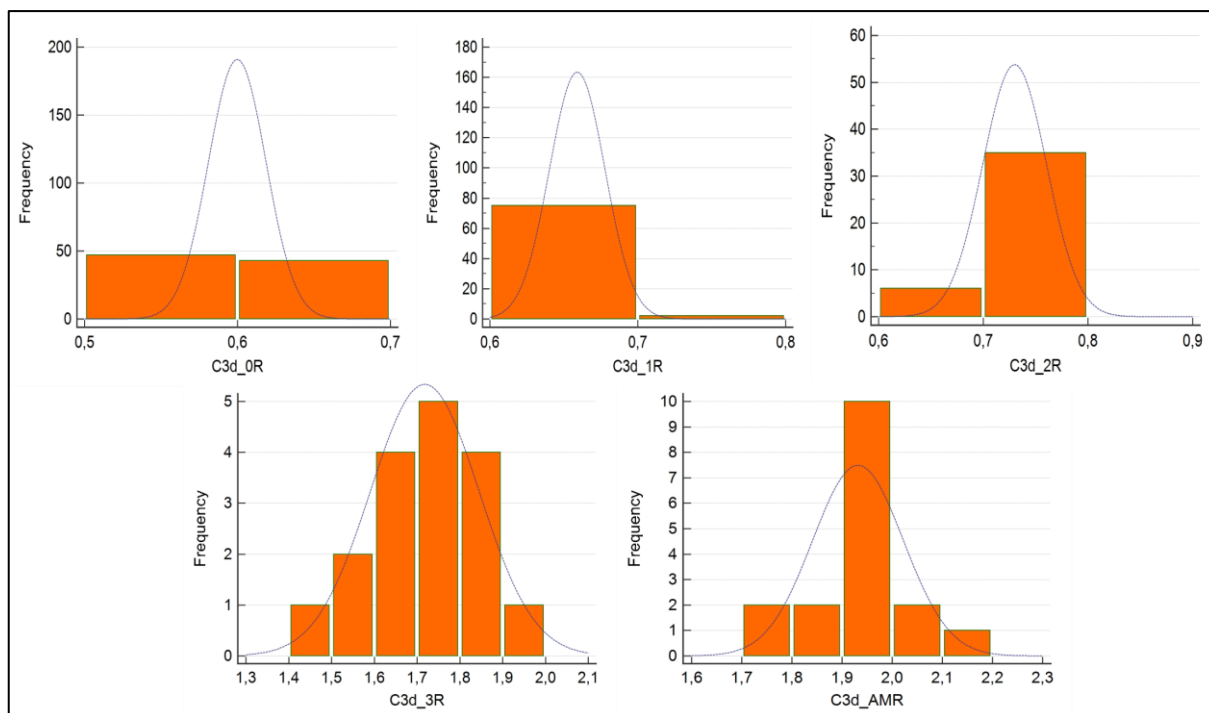


Рисунок 3.4.3. Характер распределения значений КПО C3d при отторжении трансплантированного сердца. Линия – кривая Гаусса.

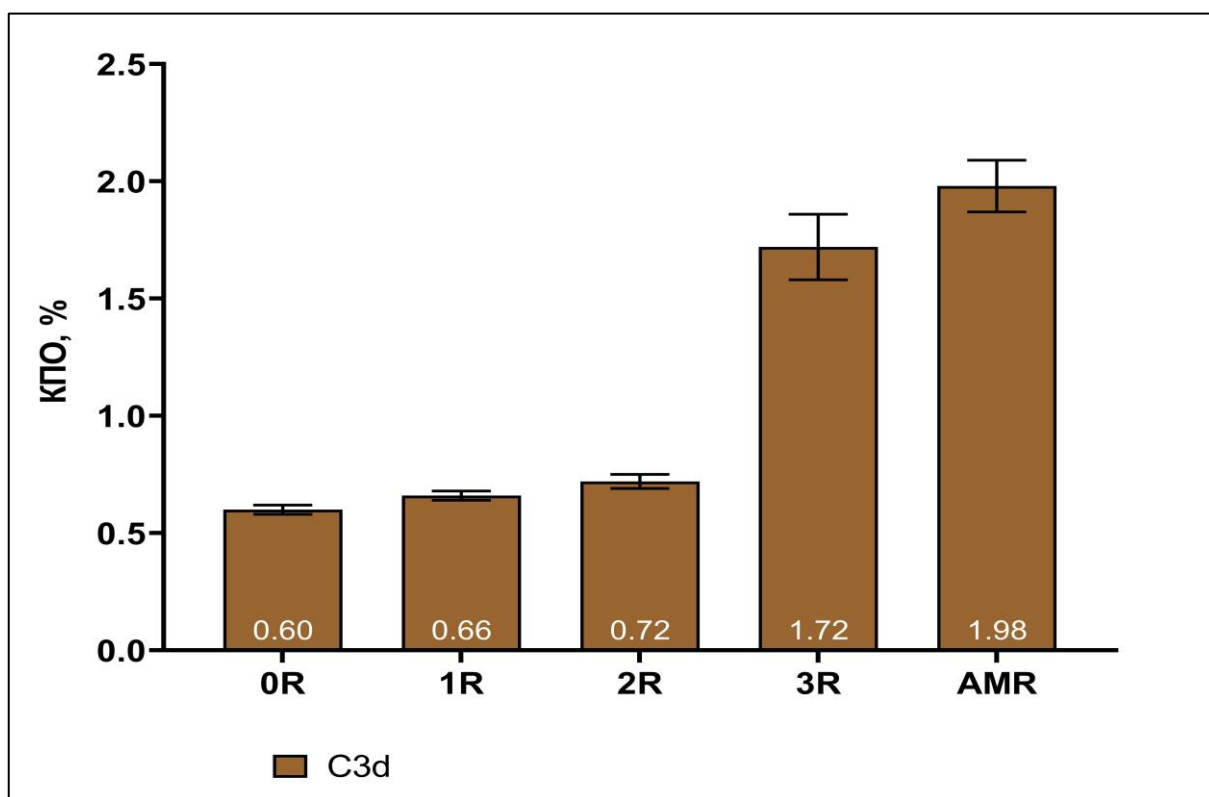


Рисунок 3.4.4. КПО C3d при различных формах отторжения трансплантированного сердца.

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

Компонент комплемента C4d. Данный маркер также характеризуется диффузной экспрессией в очагах воспаления. Внеклеточная локализация, преимущественно под базальной мембраной эндокарда или эндотелия сосудов, отмечалась во всех биоптатах (рисунки 3.4.5, 3.4.6).

Коэффициент площади окрашивания этого компонента комплемента умеренно – на 10-20% – возрастал по мере увеличения тяжести клеточной воспалительной реакции и составлял 0,56% при 0R (таблица 13, рисунки 3.4.7, 3.4.8). 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.

Таблица 13. Экспрессия C4d при отторжении трансплантированного сердца

Маркер	КПО ($\bar{X} \pm m$), %				
	0R	1R	2R	3R	AMR
C4d	0,56±0,02	0,65±0,02	0,70±0,04	0,86±0,10	3,72±0,16

3.5. Дополнительные иммуногистохимические маркеры

Определили экспрессию рецепторов комплемента 2 типа (CD21) и тромбоцитарно-эндотелиальных молекул клеточной адгезии (CD31). В той или иной мере положительная реакция отмечена во всех биоптатах.

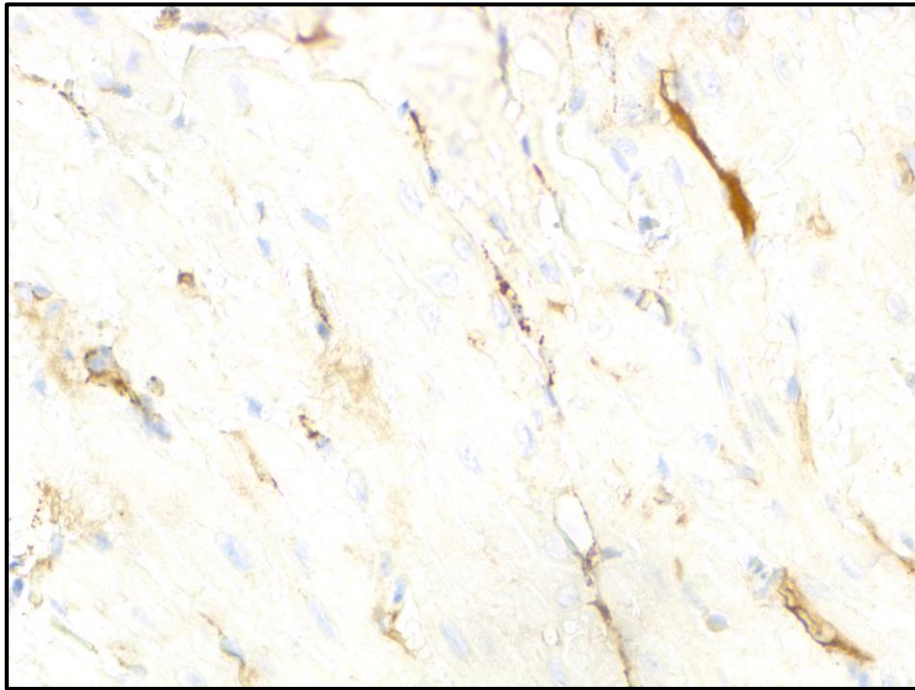


Рисунок 3.4.5. Пациентка Ч., 60 лет, T86.2. Мелкие депозиты компонента комплемента C4d между кардиомиоцитами трансплантата при 1R. Стрептавидин-пероксидазная иммуногистохимическая реакция. Увеличение: об. x40.

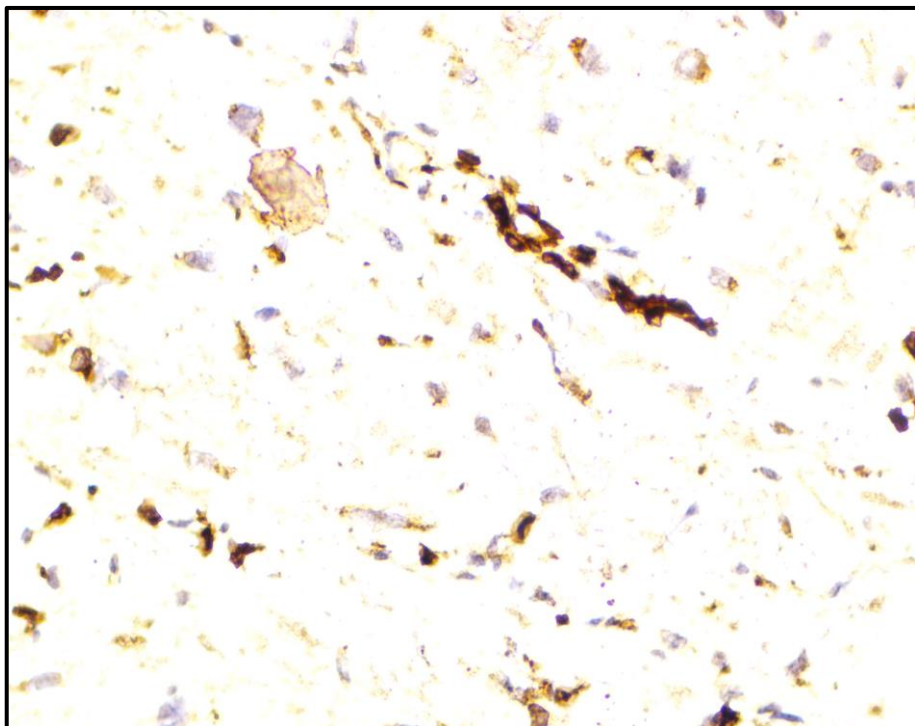


Рисунок 3.4.6. Пациентка Д., 47 лет., T86.2. Значительные депозиты компонента комплемента C4d в строме сердечной мышцы и на поверхности лимфоцитов при отторжении AMR. Стрептавидин-пероксидазная иммуногистохимическая реакция. Увеличение: об. x40.

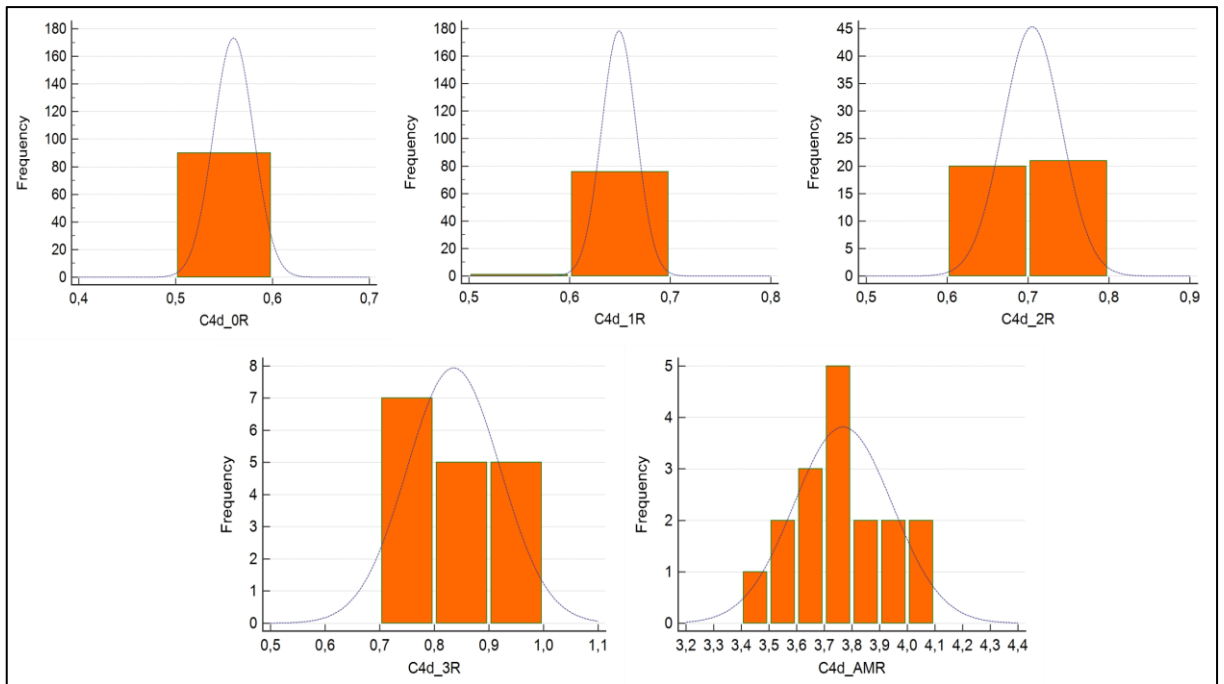


Рисунок 3.4.7. Характер распределения значений КПО С4d-компонента комплемента при отторжении трансплантированного сердца. Линия – кривая Гаусса.

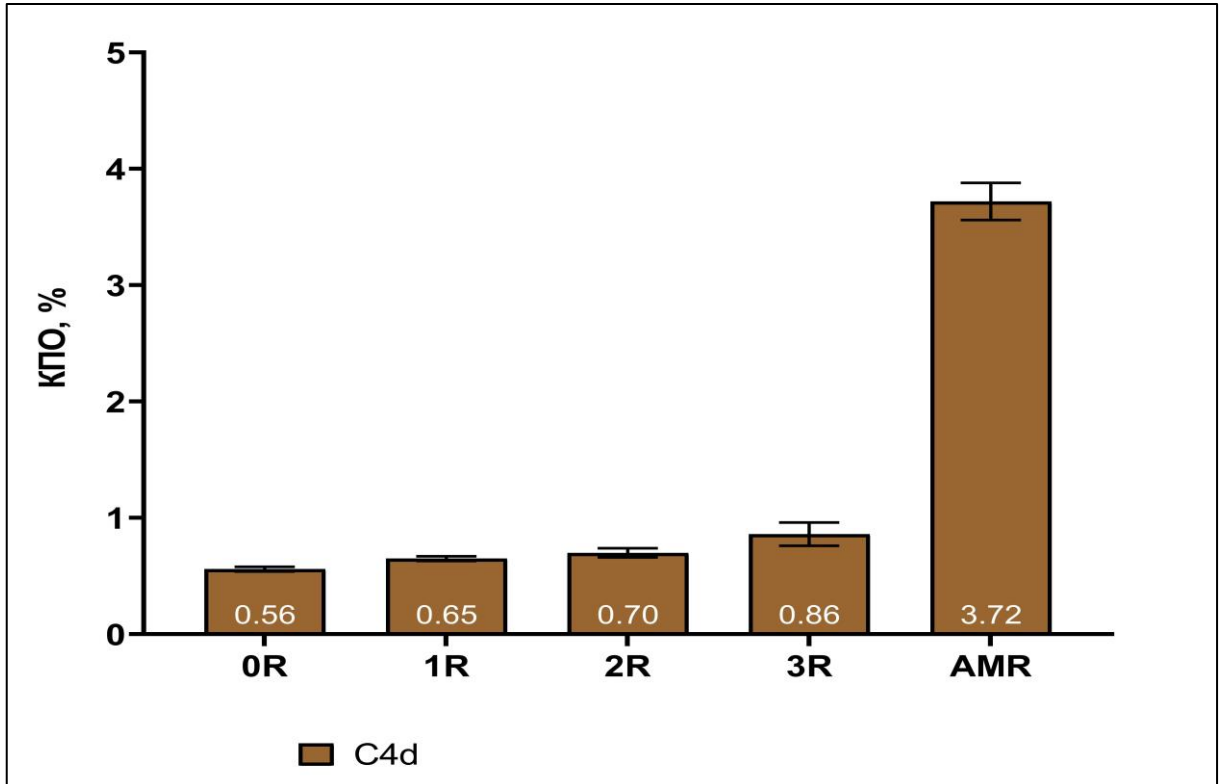


Рисунок 3.4.8. КПО С4d при различных формах отторжения трансплантированного сердца.

Рецептор комплемента 2 типа (CD21). Данный кластер дифференцировки представляет собой трансмембранный белок, поэтому в гистологических препаратах отмечена на поверхности клеток (рисунки 3.5.1, 3.5.2). Указанное вещество обнаружено во всех биоптатах.

Экспрессия CD21 повышается с нарастанием степени тяжести отторжения (таблица 14; рисунки 3.4.3, 3.4.4). Так, составляя всего 0,31% в образцах с 0R, она повышается для пациентов с 1R в 3,5 раза, при отторжении 2R – в 6,5 раз, а при 3R – уже в 13,4 раза ($p < 0,05$).

Таблица 14. Экспрессия CD21 при отторжении трансплантированного сердца

Маркер	КПО ($\bar{X} \pm m$), %				
	0R	1R	2R	3R	AMR
CD21	0.31±0.01	1.09±0.08	2.01±0.10	4.15±0.20	6,80±0,51

Наибольший коэффициент площади окрашивания отмечен в биоптатах с антитело-опосредованным отторжением, где он в 22 раза превосходит эту величину в биоптатах с 0R ($p < 0,05$).

Тромбоцитарно-эндотелиальные молекулы клеточной адгезии (PECAM-1, или CD31). Данный маркер характеризуется мембранной локализацией на поверхности эндотелиальных клеток, а также незначительным распространением в строме миокарда (рисунок 3.5.5, 3.5.6). Минимальное количество данного кластера дифференцировки выявлено и на поверхности иммунокомпетентных клеток – макрофагов и лимфоцитов. Так же как и рецептор комплемента II типа, молекулы клеточной адгезии характеризуются мембранным распределением.

Неожиданные результаты получены при оценке экспрессии молекулы CD31. Этот показатель снижается с повышением выраженности иммунного воспалительного процесса в миокарде (таблица 15; рисунки 3.5.7, 3.5.8).

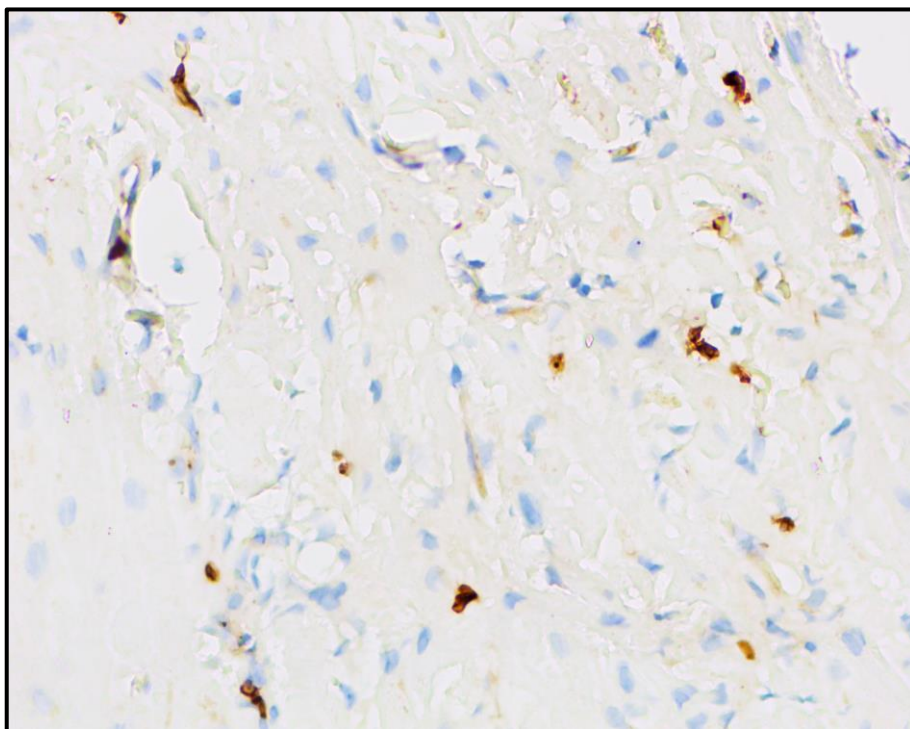


Рисунок 3.5.1. Пациент Ф., 49 лет., T86.2. Единичные CD21-позитивные В-лимфоциты в ткани сердца при отторжении 1R. Иммуногистохимическая реакция. Увеличение: об. x40.

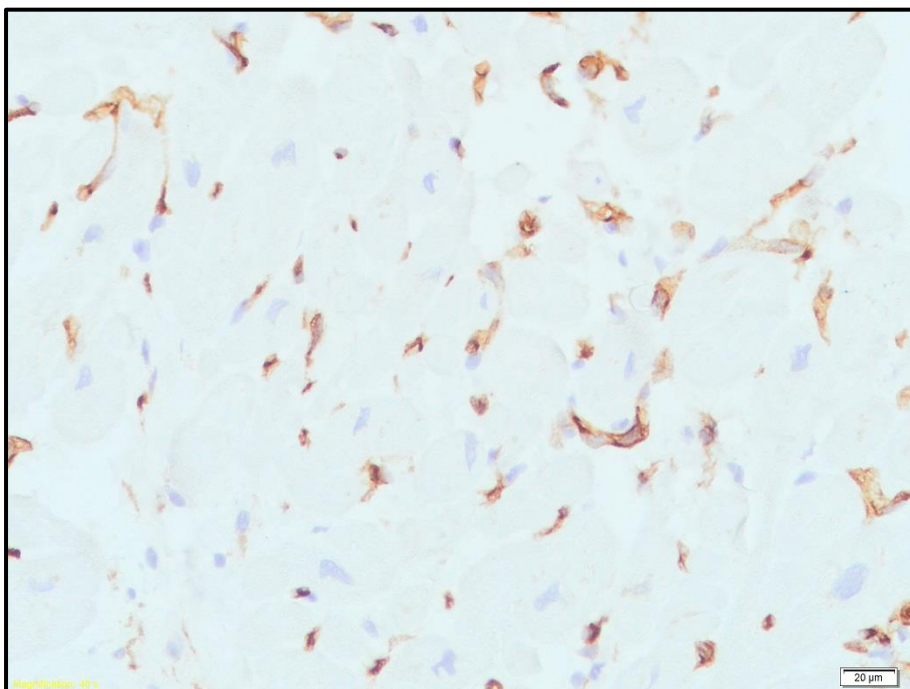


Рисунок 3.5.2. Пациентка К., 38 лет, T86.2. Многочисленные CD21-позитивные В-лимфоциты в сердечной мышце при отторжении 3R. Иммуногистохимическая реакция. Увеличение: об. x40.

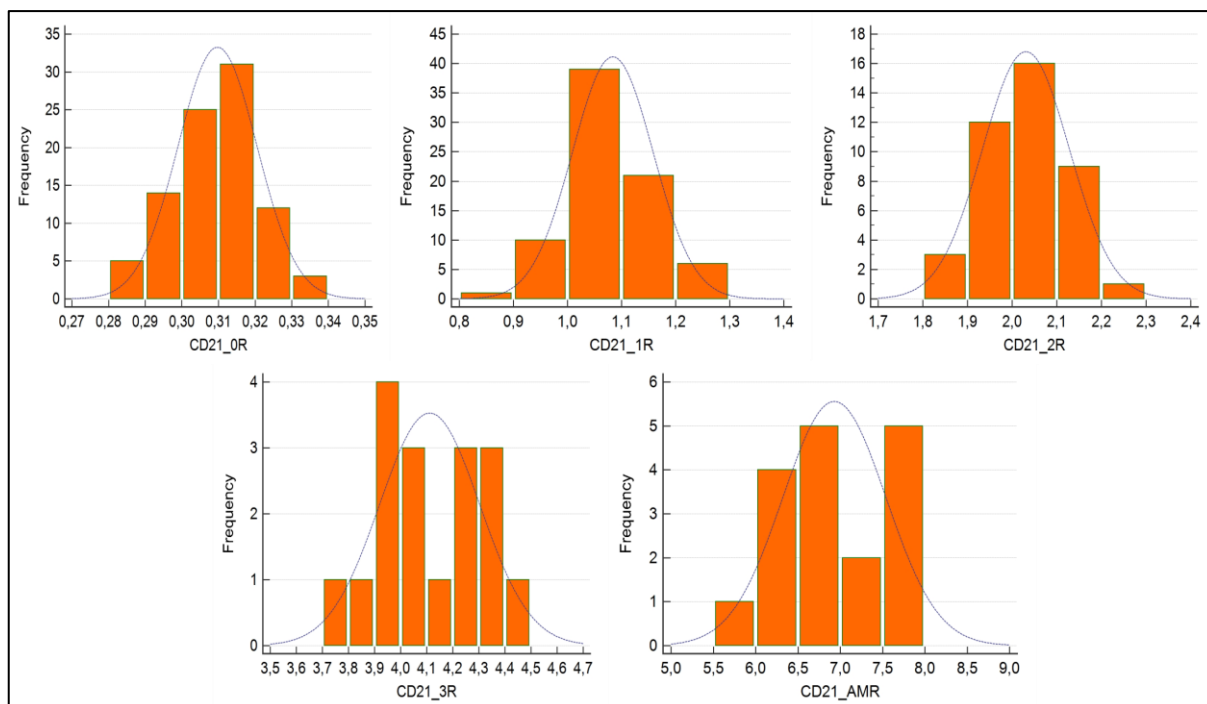


Рисунок 3.5.3. Характер распределения значений, отражающих КПО рецептора CD21 при отторжении трансплантированного сердца. Линия – кривая Гаусса.

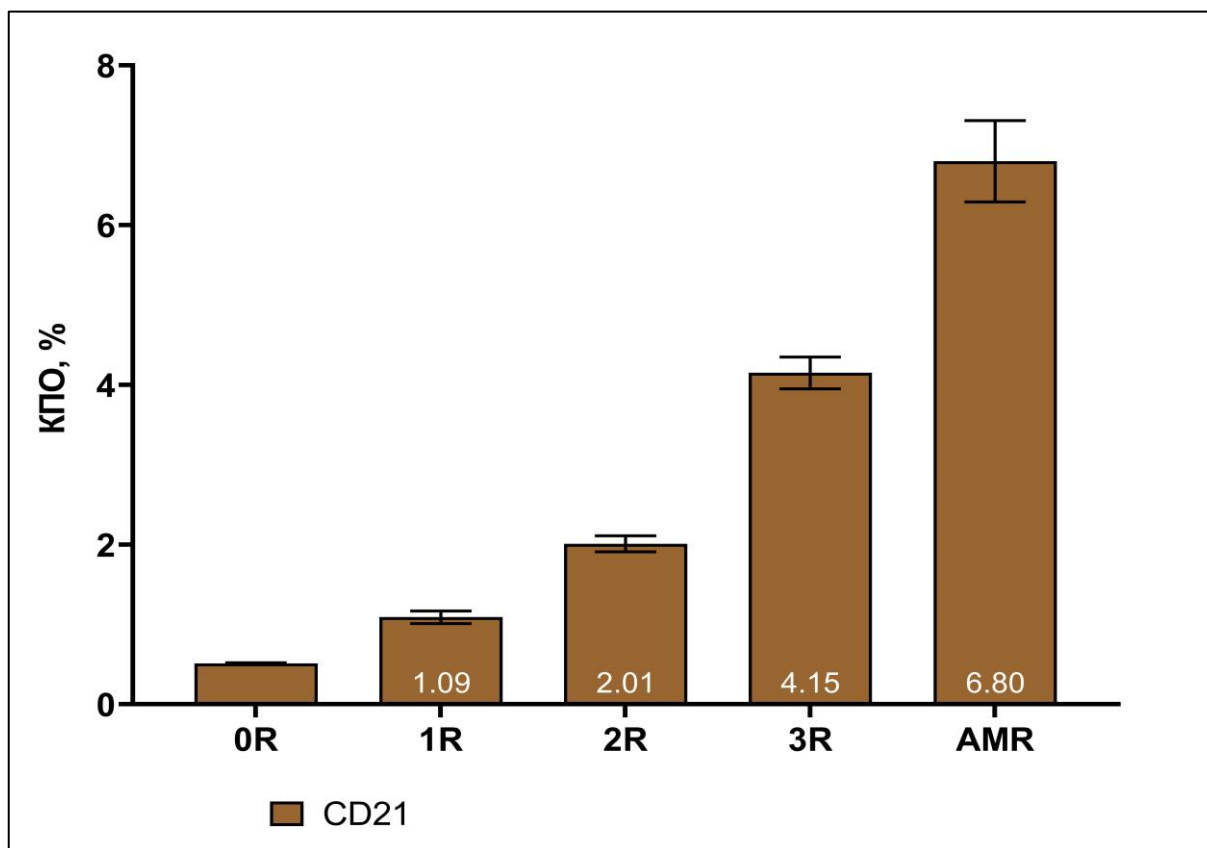


Рисунок 3.5.4. КПО CD21 при различных формах отторжения трансплантированного сердца.

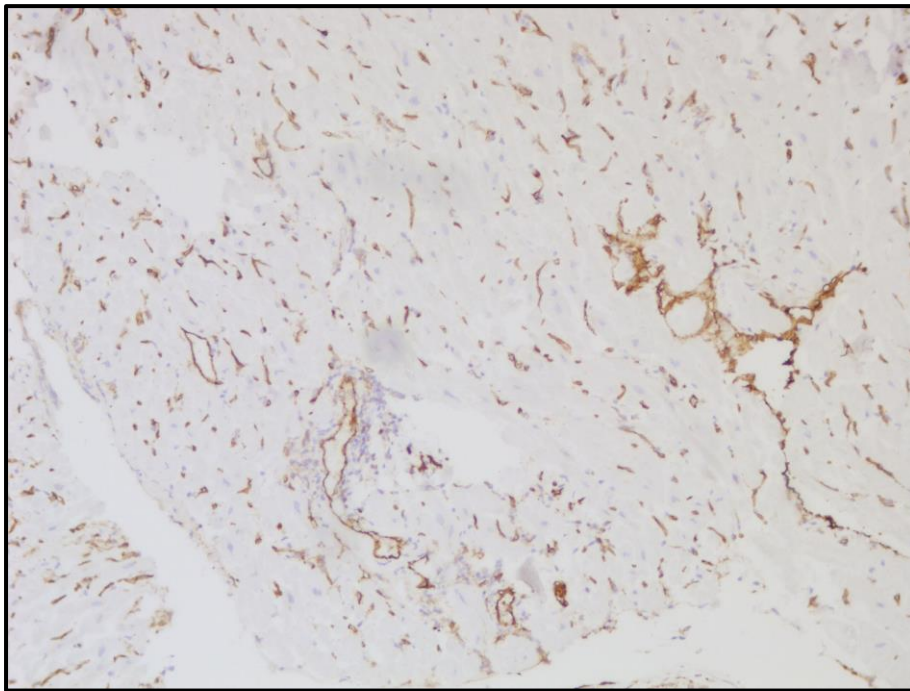


Рисунок 3.5.5. Пациентка Д., 43 года, Т86.2. Экспрессия молекул CD31 при отсутствии отторжения (OR). PECAM определяются в эндотелиальных клетках и в единичных клетках стромы. Иммуногистохимическая реакция. Увеличение: об. x20.

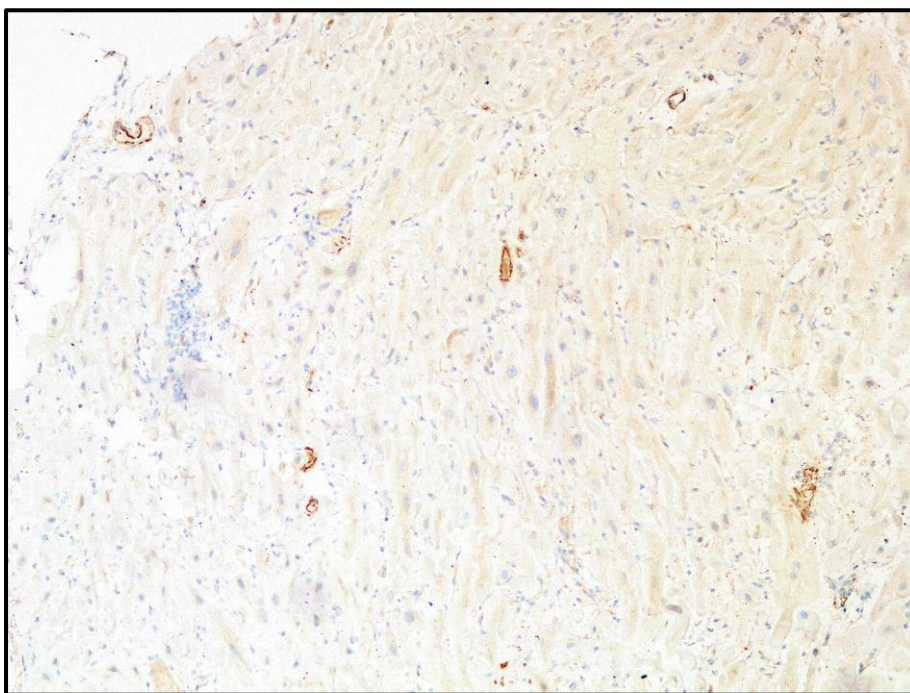


Рисунок 3.5.6. Пациент Ж., 37 лет, Т86.2. Экспрессия молекул CD31 при антитело-опосредованном отторжении (AMR). PECAM присутствует лишь в отдельных эндотелиальных клетках капилляров миокарда. Иммуногистохимическая реакция. Увеличение: об. x20.

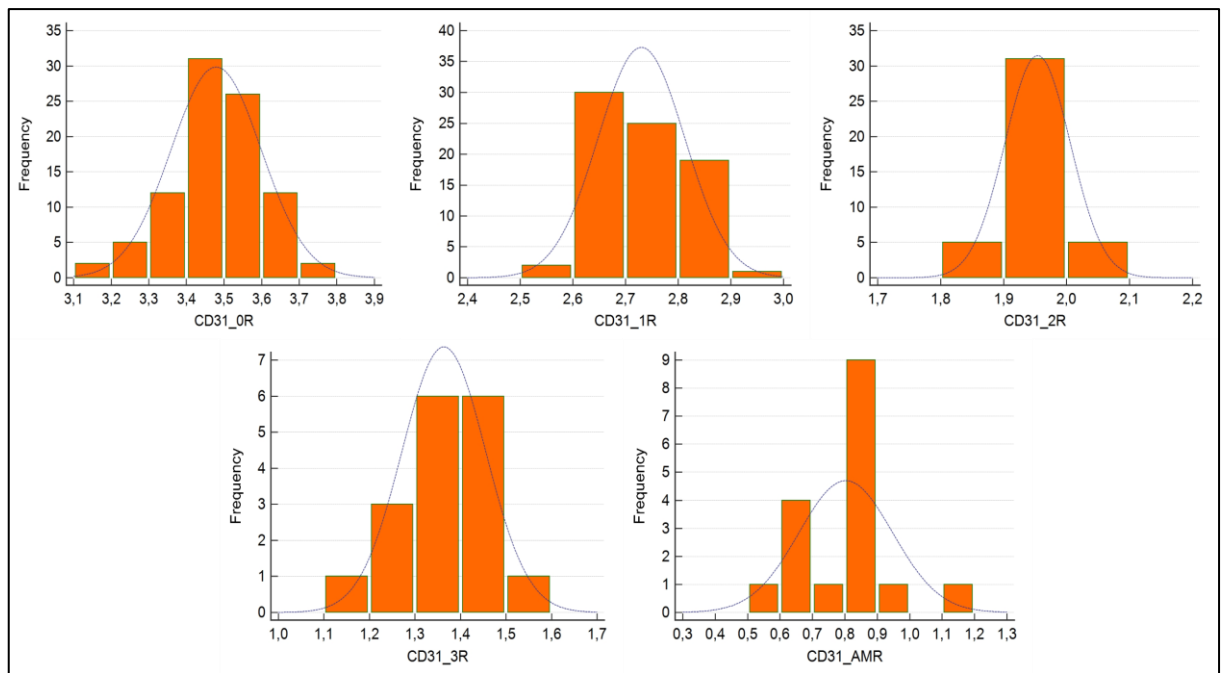


Рисунок 3.5.7. Характер распределения значений, отражающих КПО CD31 при отторжении трансплантированного сердца. Линия – кривая Гаусса.

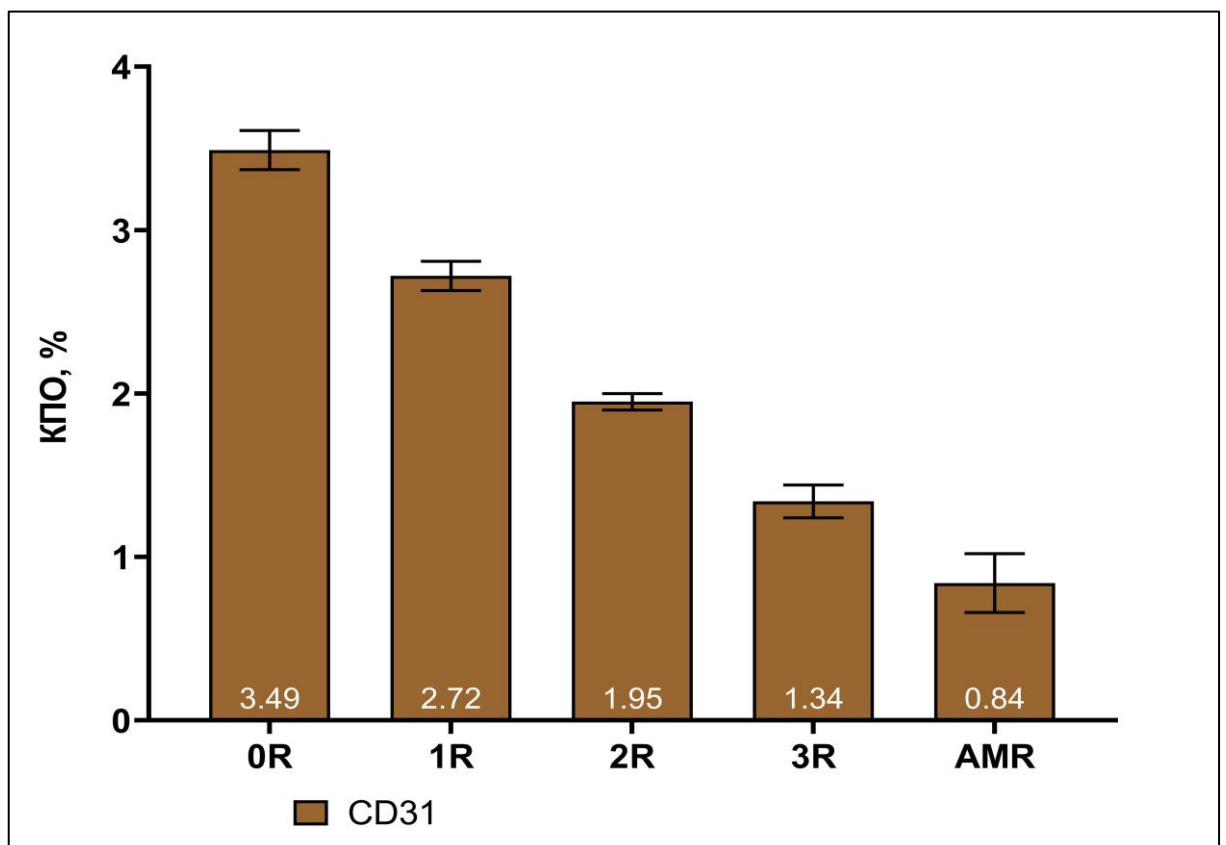


Рисунок 3.5.8. КПО CD31 при различных формах отторжения трансплантированного сердца.

Таблица 15. Экспрессия CD31 при отторжении трансплантированного сердца

Маркер	КПО ($\bar{X} \pm m$), %				
	0R	1R	2R	3R	AMR
CD31	3.49±0.12	2.72±0.09	1.95±0.05	1.34±0.10	0,84±0,18

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 ($p < 0,05$).

3.6. Выявление корреляционно-регрессионных взаимоотношений

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 ($\Xi=0,34\%$). Высокое значение коэффициента корреляции говорит о сильной положительной связи кардиосклероза и экспрессии CD21. 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. Коэффициент эластичности $\Xi=18,5\%$, 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 $\Xi=20,1\%$, 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.

Резюме

Отторжение трансплантированного сердца сопровождается целым рядом патогистологических изменений в миокарде, таких как кровоизлияния, некроз, фиброз, стеатоз и воспалительная клеточная инфильтрация. Проведенное исследование выявило взаимосвязь между данными изменениями и формой/степенью тяжести отторжения. Кровоизлияния отмечены в биоптатах миокарда с любой формой и степенью тяжести процесса, при этом их интенсивность значительно нарастает с увеличением интенсивности реакции и достигает максимума в случае тяжелого клеточного отторжения. Некротические изменения выявлены в биоптатах, начиная с 1R. Интенсивность процесса также нарастает от легкого к тяжелому отторжению. В случае отторжения 3R некроз имеет диффузный характер, а при антитело-опосредованном располагается периваскулярно.

Склеротические изменения наиболее значительны в случае гуморального и умеренного клеточного процесса. При отторжении 3R интенсивность фиброза вдвое ниже таковой при 2R.

Стеатоз появляется уже при легком отторжении 1R, в то время как другие патогистологические изменения ещё отсутствуют или носят неспецифический характер. Таким образом, он служит наиболее ранним морфологическим признаком отторжения. Затем его интенсивность увеличивается при усилении повреждения миокарда.

Лимфоциты присутствуют во всех биоптатах, где выявлено отторжение; их максимальное количество приходится на AMR. В ряде случаев отмечено сочетание CD3-позитивных и CD20-позитивных клеток в одних и тех же участках миокарда, что свидетельствует о смешанном клеточно-гуморальном отторжении.

Максимальное количество макрофагов характеризует тяжелое клеточное отторжение. Незначительно ниже их содержание при антитело-опосредованном отторжении. Наибольшее содержание нейтрофильных гранулоцитов отмечено в биоптатах с 3R, при этом присутствуют они при всех формах и степенях тяжести процесса.

Посредством иммуногистохимических реакций выявлено повышение экспрессии компонентов комплемента C3d и C4d не только в случае антитело-опосредованной реакции, но и по мере нарастания тяжести клеточного отторжения трансплантата. Молекулы C3d в наибольшей концентрации содержатся при тяжелом клеточном и при антитело-опосредованном отторжении. Компонент комплемента C4d имеет примерно одинаковую экспрессию в случаях клеточного процесса, однако при AMR его содержание увеличивается в три раза. Выявлена сильная прямая связь между экспрессией компонентов комплемента и некротическими изменениями в сердечной мышце. Расположение депозитов компонентов комплемента также соответствует очагам, в которых одновременно представлены как CD3, так и CD20 лимфоциты.

Экспрессия В-лимфоцитарного корецепторного комплекса (CD21) при повышении тяжести воспалительной реакции увеличивается линейно – на 50% с каждой последующей степенью выраженности процесса – и достигает максимума при гуморальном отторжении. Установлено, что от уровня экспрессии маркера CD21 на 64%. Количество молекул клеточной адгезии (CD31) уменьшается на более высоких степенях отторжения и при AMR становится минимальным. Одновременно с этим увеличивается выраженность кровоизлияний, а также происходит развитие стеатоза кардиомиоцитов.

Таким образом, в проведенном исследовании установлена взаимосвязь между выраженностью признаков повреждения миокарда,

таких как некроз, кровоизлияния, склероз и стеатоз, с формой и тяжестью отторжения. Установлено, что стеатоз кардиомиоцитов наряду со снижением экспрессии эндотелиальных молекул клеточной адгезии CD31 выступает одним из наиболее ранних патоморфологических проявлений отторжения. Компоненты комплемента C3d и C4d принимают участие не только в антитело-опосредованном, но и в клеточном отторжении трансплантата, при этом величина их экспрессии также увеличивается с нарастанием тяжести АСР. Тромбоцитарно-эндотелиальные молекулы клеточной адгезии принимают участие в ходе как клеточного, так и гуморального отторжения, при этом величина их экспрессии с повышением тяжести процесса уменьшается. Изменение количества рецепторов комплемента II типа имеет противоположную закономерность – экспрессия повышается от 1R к 3R.

ГЛАВА 4

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенное исследование позволило получить количественную характеристику патологических процессов, сопровождающих реакцию отторжения трансплантированного сердца. Имеющиеся диагностические стандарты, в частности, стандарты Международного общества трансплантации сердца и легких, опираются лишь на качественные критерии. Детальная количественная характеристика патологических изменений в миокарде позволит повысить точность биопсийной диагностики ОТС. На рисунке 5.1 даны количественные показатели, отражающие патоморфологические изменения в миокарде при отторжении трансплантированного сердца.

Геморрагии говорят в пользу деструктивного васкулита или быстро нарастающего повышения сосудистой проницаемости при остром воспалении. Мелкие очаги кровоизлияний при отсутствии реакции отторжения (менее 1% площади) связаны, по-видимому, с повреждением миокарда в ходе проведения эндомиокардиальной биопсии. Интенсивность кровоизлияний закономерно увеличивается при повышении тяжести воспалительной реакции. Меньшая выраженность кровоизлияний при тяжелом отторжении объясняется, по-видимому, уплотнением сосудистой стенки за счет развития васкулита.

Некроз усиливается при выраженном течении воспалительного процесса в миокарде. Аналогичные результаты получены Frangogiannis N.G. и соавторами (2017). Стеатоз служит выражением хронической гипоксии, которая приводит к нарушению метаболизма нейтральных жиров (Bonacina E. et al., 2009). Результаты нашего исследования позволяют сделать заключение о том, что стеатоз кардиомиоцитов можно рассматривать как наиболее раннее проявление реакции отторжения.

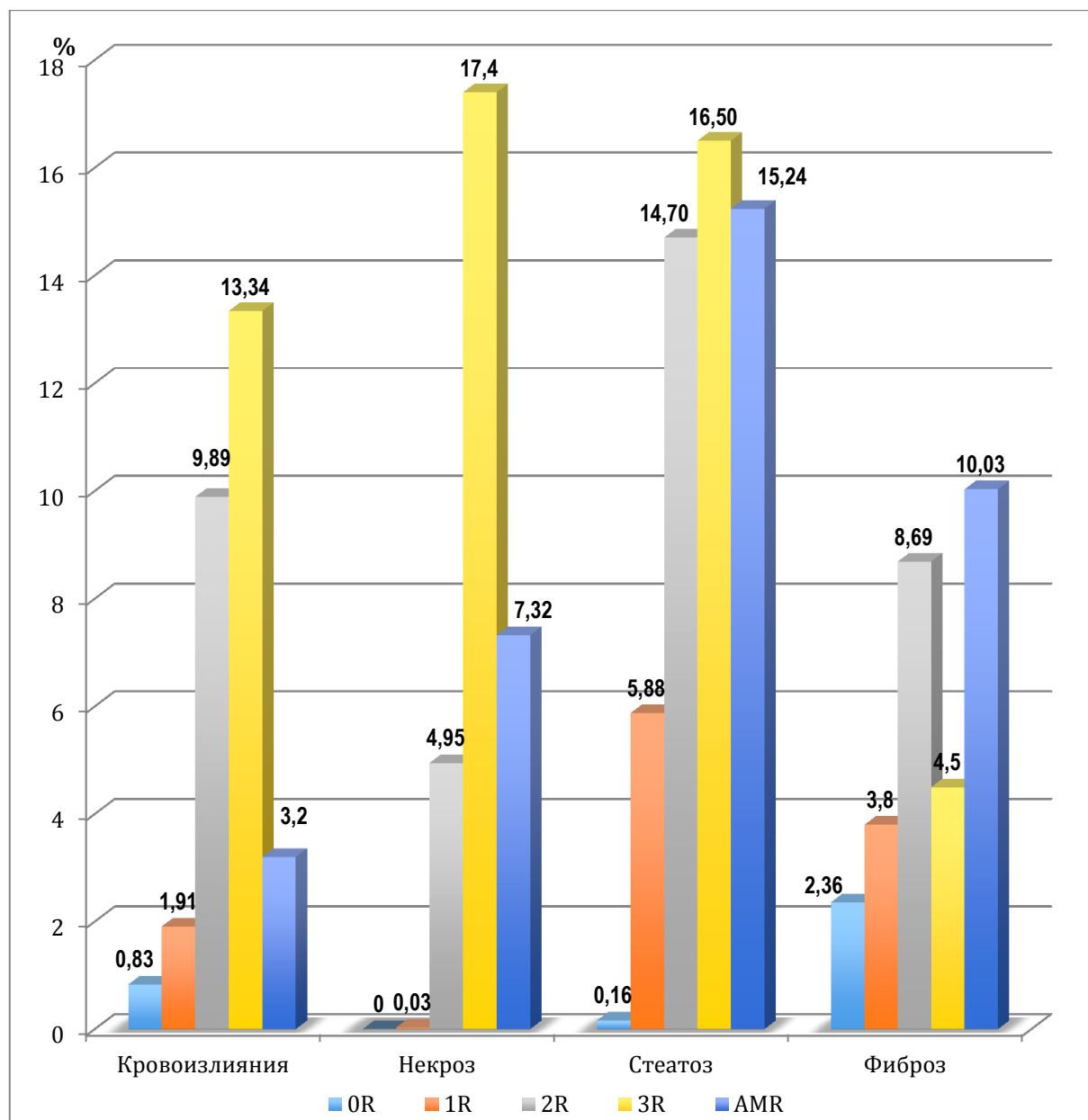


Рисунок 5.1. Патогистологические признаки повреждения миокарда при отторжении трансплантированного сердца (% площади биоптата).

Он в значительной степени проявляется уже при отторжении 1R, затем его интенсивность нарастает. При этом стеатоз не связан с повреждением ткани сердца в ходе эндомиокардиальной биопсии, поскольку для его развития требуется значительное время. Учитывая то, что при 0R стеатоз миокарда не наблюдается, можно предположить, что их появление связано с нарушением окисления жирных кислот (Кактурский Л.В., 2009), которое служит следствием повреждения микроциркуляторного русла в ходе отторжения.

Выраженный стеатоз при AMR также можно объяснить следствием повреждения коронарных артерий, приводящего ко вторичной ишемии миокарда. Исходя из того, насколько выражены остальные признаки повреждения сердечной мышцы – прежде всего, склероз, - можно сделать вывод о длительности реакции отторжения. Кроме того, фиброз, отражающий репаративную регенерацию, будет тем интенсивнее, чем значительнее было предшествующее поражение миокарда (Schiechl G. et al., 2016).

Ввиду необратимости фиброза, процент его площади нарастает с каждым последующим кризом отторжения. Таким образом, интенсивность фиброза будет зависеть от количества времени после трансплантации. Кроме того, в литературе имеются данные о том, что источником соединительной ткани в случае отторжения служат клетки экстракардиального происхождения, привлекаемые в очаг воспаления макрофагами (Pichler M. et al., 2012).

Проведенное иммуногистохимическое типирование клеточных элементов воспалительного инфильтрата показало, что Т-лимфоциты играют важную роль в процессе клеточного отторжения трансплантата. Это объясняется их участием в реакции гиперчувствительности IV типа (Boer K. et al., 2015). Полученные в ходе исследования данные

свидетельствуют об активном участии Т-лимфоцитов и в антитело-опосредованном отторжении.

В-лимфоциты играют большую роль в AMR. В то же время, цитолитические антитела, продуцируемые плазматическими клетками, участвуют и в реакциях клеточного отторжения, чем и обусловлено усиление экспрессии лимфоцитарных маркеров при повышении тяжести клеточного отторжения.

В ходе исследования установлено, что компоненты комплемента C3d и C4d принимают участие в развитии как клеточного, так и гуморального отторжения. Фрагмент C3d представляет собой продукт активации компонента комплемента C3. Связываясь с рецептором комплемента второго типа (CD21) на поверхности В-лимфоцитов, он образует так называемый лимфоцитарный корецепторный комплекс, усиливающий ответ на антигенную стимуляцию (Timofeeva O, 2019). Увеличение экспрессии C3d свидетельствует об интенсификации выработки иммуноглобулинов плазматическими клетками, что приводит к усилению воспалительной реакции. Белковый фрагмент C4d образуется из компонента комплемента C4 при активации комплемента по классическому пути. Молекула обладает высокой устойчивостью и способностью образовывать прочные ковалентные связи с различными белками ткани (Aguilar P.R. et al., 2018).

Экспрессия C4d свидетельствует об активации комплемента и развитию реакции гиперчувствительности II типа. Соответственно, её увеличение говорит о более выраженной воспалительной реакции и значительном повреждении миокарда. Взаимосвязь между экспрессией двух компонентов комплемента представлена на рисунке 5.2.

Рецептор комплемента второго типа (CD21) располагается на поверхности В- и (в меньшей степени) Т-лимфоцитов и участвует в связывании компонентов комплемента C3b, C3d и C3dg.

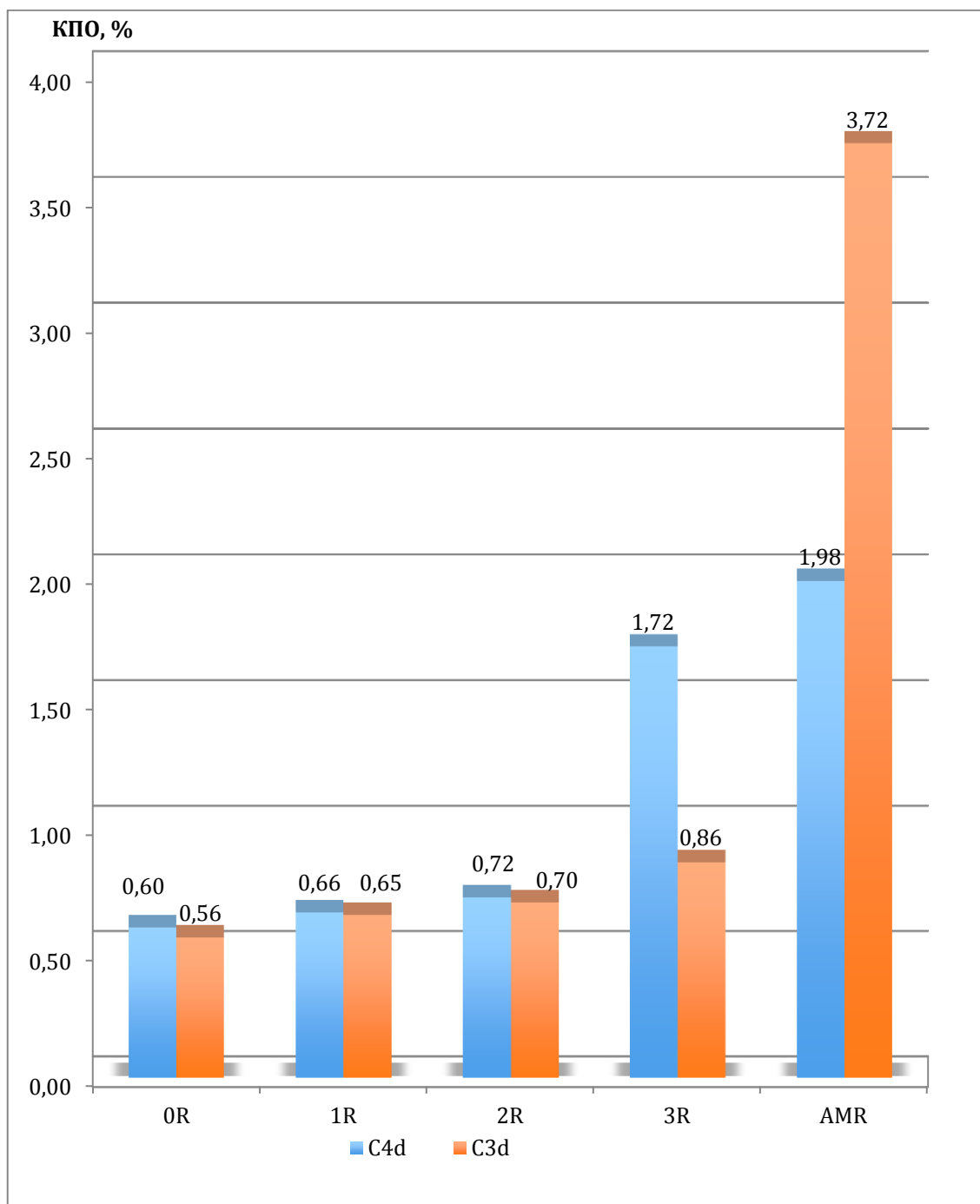


Рисунок 5.2. Экспрессия компонентов комплемента при отторжении трансплантированного сердца (% площади биоптата).

В ассоциации с молекулами CD19 и CD27 он образует так называемый В-лимфоцитарный корецепторный комплекс (Lechner A. et al., 2019). Повышение его экспрессии напрямую связано с увеличением тяжести воспалительной реакции, что и наблюдалось в нашем исследовании.

Поскольку в случае отторжения сердца наибольшую роль В-лимфоциты играют в развитии AMR, именно при данной форме отторжения наблюдались максимальные значения экспрессии корецепторного комплекса. По имеющимся в литературе данным, увеличение содержания CD21-позитивных клеток напрямую связано с дальнейшим развитием выраженного фиброза в сердце (Doi H. et al., 2015). Кроме того, наличие его на поверхности клеток тормозит процесс апоптоза В-лимфоцитов, что дополнительно усугубляет воспалительную реакцию.

В результате проведенного сравнения экспрессии CD21 с выраженностью фиброза установлено, что повышение количества рецепторов комплемента с нарастанием тяжести отторжения сопровождается разрастанием в миокарде соединительной ткани, что подтверждает данные литературы (Doi H. et al., 2015; Сухачева Т.В. и соавт., 2018) об участии корецепторного комплекса в процессе ремоделирования миокарда (рисунок 5.3.). Относительно меньшую выраженность фиброза при отторжении 3R можно объяснить тем, что в случае тяжелой реакции на передний план выступает острое повреждение миокарда, которое в некоторой мере скрывает склеротические изменения.

Тромбоцитарно-эндотелиальная молекула клеточной адгезии первого типа (Platelet/endothelial cell adhesion molecule – 1, PECAM-1, или CD31) служит одной из главных молекул межклеточных контактов эндотелиальных клеток.

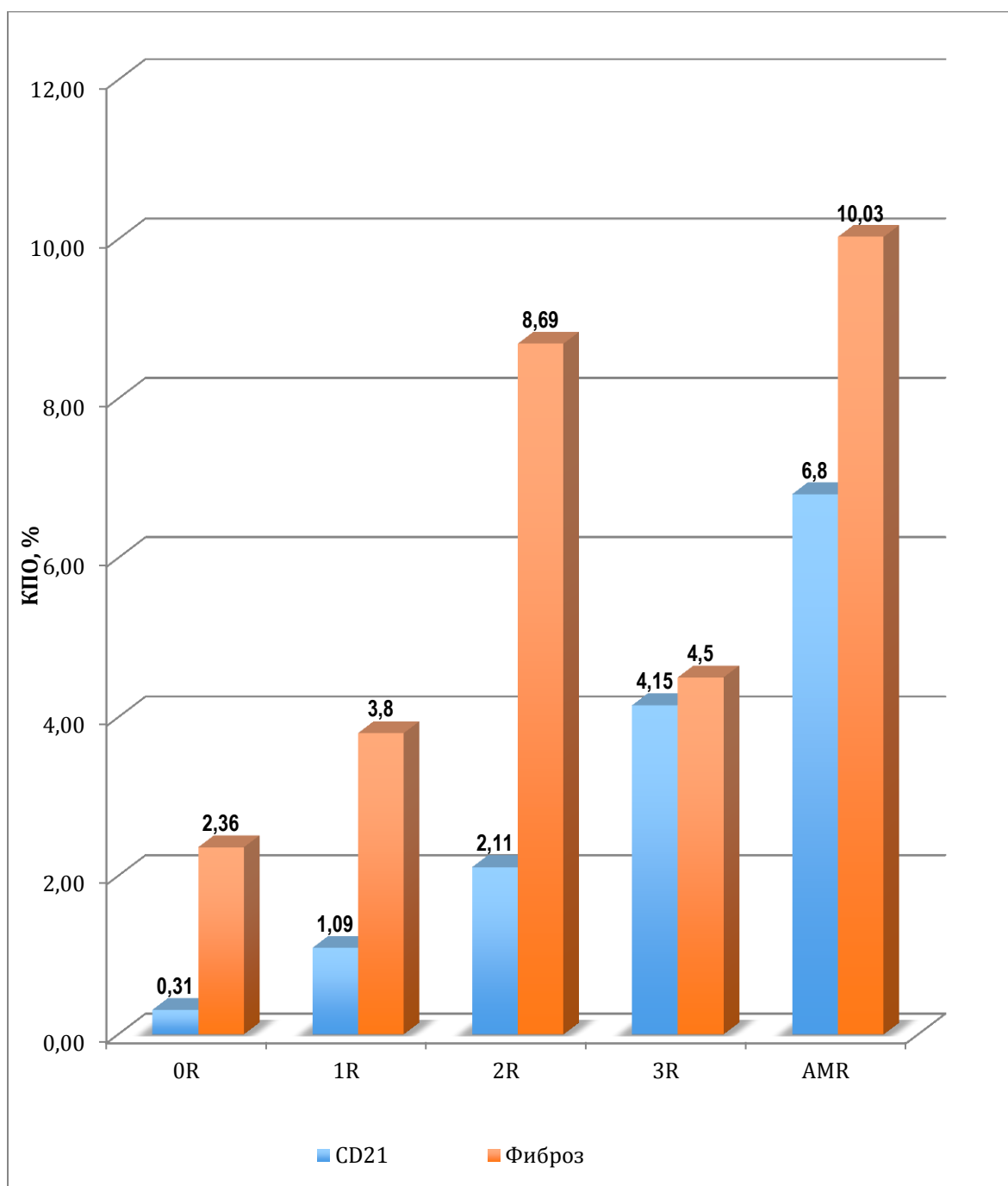


Рисунок 5.3. Взаимоотношение между экспрессией CD21 и площадью фиброза при отторжении трансплантированного сердца (% площади биоптата).

РЕСАМ обеспечивает межклеточное взаимодействие эндотелиоцитов с моноцитами и нейтрофильными гранулоцитами, предшествующее их миграции в очаг воспаления. В меньших количествах CD31 экспрессируется на поверхности тромбоцитов и Т-лимфоцитов, а также дендритных клеток. Иммунофенотипирование срезов миокарда выявило депозиты CD31 в зоне расположения капилляров, что соотносится с данными литературы (Lertkiatmongkol P. et al., 2016). Уменьшение экспрессии CD31 с нарастанием выраженности отторжения, по-видимому, означает повреждение эндотелия в ходе воспалительной реакции, которое, тем не менее, носит нелетальный характер и не сопровождается деструктивным васкулитом.

При наиболее значительном повреждении кровеносных сосудов трансплантата, которое характерно для антитело-опосредованного отторжения, экспрессия тромбоцитарно-эндотелиальных молекул клеточной адгезии принимала наименьшие значения. Эндотелиальная дисфункция, маркером которой и служит падение экспрессии CD31, имеет прямым следствием ишемию сердечной мышцы трансплантата (Valentini X. et al., 2011). В нашем случае это означает развитие болезни коронарных сосудов пересаженного сердца (БКАПС), представляющей серьезную угрозу функционированию пересаженного органа.

О повреждении сосудистой стенки также могут свидетельствовать кровоизлияния (Arnaoutakis G.J et al., 2011). Для того, чтобы оценить состояние стенки капилляров, проведено сравнение экспрессии CD31 и выраженности геморрагии (рисунок 5.4.). Видно, что острое повреждение сосудистой стенки, характеризующееся кровоизлиянием, связано с уменьшением экспрессии молекул CD31. В случае AMR имеет место хроническое повреждение сосуда, что морфологически выражается в периваскулярном фиброзе, а не геморрагиях.

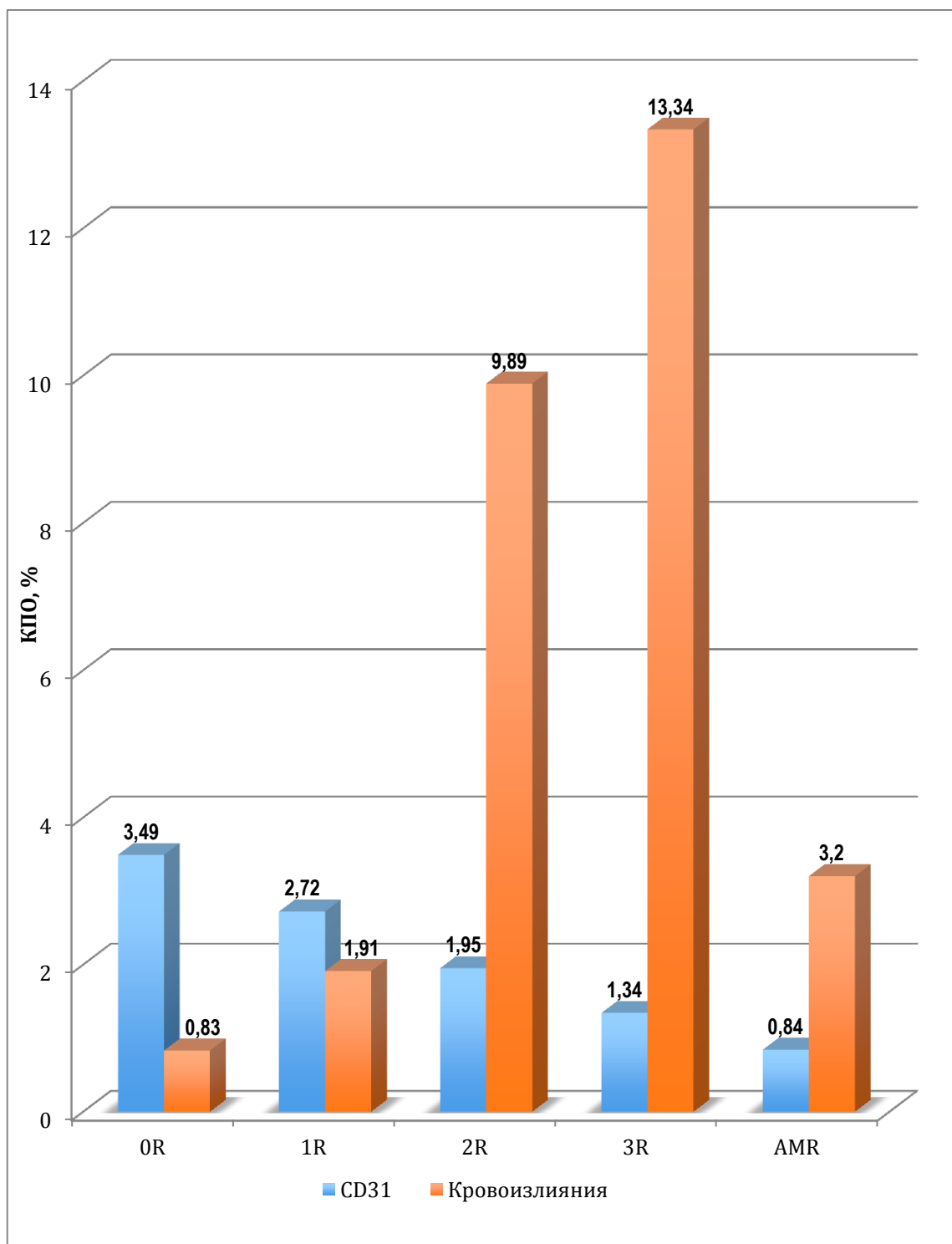


Рисунок 5.4. Взаимосвязь между экспрессией PECAM и выраженностью кровоизлияний при отторжении трансплантированного сердца (% площади биоптата).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью исследования была характеристика патоморфологических изменений в миокарде при различных формах отторжения пересаженного сердца с применением компьютерной морфометрии для количественного анализа эндомиокардиальных биоптатов.

Для достижения поставленной цели было разработано три алгоритма компьютерного морфометрического анализа. Данные алгоритмы основаны на определении общей площади среза и вычислении количества клеток или коэффициента площади окрашивания, представляющего собой отношение площади цветного продукта окрашивания к общей площади среза. В качестве вспомогательных инструментов при вычислении указанных показателей применялась цветовая сегментация изображения, подавление цветовых каналов фона, бинаризация изображения по цвету продукта окрашивания, а также выставление порогового значения чувствительности анализатора. С помощью указанных алгоритмов получены объективные количественные критерии для диагностики формы и степени тяжести отторжения трансплантированного сердца при оценке эндомиокардиальной биопсии.

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. 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 ($\Delta=20,1\%$ для C3d и $\Delta=18,5\%$ 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.

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 тяжелом 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 тяжелом 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. 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 С3 и С4 компоненты комплемента являются лигандами для рецептора CD21. Это позволяет использовать экспрессию CD21 в качестве прогностических маркеров позднего повреждения сердечной мышцы.

Таким образом, проведенное исследование позволило разработать объективные количественные критерии диагностики отторжения трансплантированного сердца, повышающие точность интерпретации результатов эндомиокардиальной 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 тяжелом 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 тяжелом 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 тяжелом 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 тяжелой 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 эндомиокардиальной 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

1. 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 подсчете коэффициента площади окрашивания (КПО), который представляет собой отношение площади, занимаемой иммунореактивным продуктом, к общей площади биоптата, выраженный в процентах.
2. 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.
3. При КПО CD20 выше 2% необходимо производить оценку экспрессии рецептора комплемента CD21 с целью прогнозирования кардиосклероза.
4. 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.

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
(Platelete-endothelial Cell Adhesion Molecule)

ОТС – отторжение трансплантированного сердца

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЭМБ – эндомиокардиальная биопсия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барбухатти, К.О. Первый опыт трансплантации сердца в Краснодарском крае // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 14. – №. 3. – С. 42-47.
2. Белецкая, Л.В. С4d-компонент комплемента как один из маркеров отторжения гуморального типа / Л.В. Белецкая, Ф.С. Баранова, А.Г. Куприянова [и др.] // Вестник трансплант. и искусств. органов. – 2003. – № 4. – С. 72–77.
3. Белецкая, Л.В. Ревмоподобное течение отторжения гуморального (сосудистого) типа при аллотрансплантации сердца / Л.В. Белецкая, А.Г. Куприянова, А.Я. Кормер [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 142. – №. 9. – С. 337–340.
4. Быхалов, Л.С. Причины смерти и патоморфологическая характеристика органов при туберкулезе, ассоциированном с ВИЧ-инфекцией / Быхалов Л.С., Седова Н.Н., Деларю В.В., Богомолова Н.В., Голуб Б.В., Губанова Е.И., Гуров Д.Ю., Даниленко В.И., Замараев В.С., Кашина Н.П., Маланин Д.А., Матвеев О.В., Маслова Е.А., Самусев Р.П., Хлопонин П.А. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. - 2013. - № 3 (47). - С. 64-68.
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. 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. – Т. 24. – № 6. – С. 27-31.
7. Готье, С.В. Перспективы улучшения отдаленных результатов трансплантации сердца / С.В. Готье, А.О. Шевченко, А.Я. Кормер, А.П. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – No. 3. – С. 23-30.
8. Дземешкевич, С.Л. Болезнь коронарных артерий пересаженного сердца и системный атеросклероз – сходства и различия / С.Л. Дземешкевич, Ю.В. Фролова, В.В. Раскин // Атеросклероз и дислипидемии. – 2014. – No. 3 (16). – С. 16-20.
9. Зайратьянц, О.В. Инфаркт миокарда и острый коронарный синдром: дефиниции, классификация и критерии диагностики / О.В. Зайратьянц, О.Д. Мишнев, Л.В. Кактурский // Архив патологии. – 2014. – Т. 76. – №6. – С. 3-11.
10. Зайратьянц, О.В. Формулировка и кодирование по МКБ-10 патолого-анатомического диагноза при болезнях системы кровообращения / О.В. Зайратьянц, Л.В. Кактурский, О.В. Макарова // Архив патологии. – 2008. – Т. 70. – №1. – С.17-23.
11. Ильинский, И.М. Связь эффекта Quilty с острым отторжением трансплантированного сердца / И. М. Ильинский, Л. С. Алексеева, В. А. Зайденов, Н. П. Можайко, А. О. Шевченко [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. – Т. 17. – №3. – С. 17-23.
12. Кактурский, Л.В. Внезапная сердечная смерть: современное состояние проблемы // Архив патологии. – 2005. – Т. 67. – №3. – С. 8-11.

13. Кактурский, Л.В. Клиническая морфология алкогольной кардиомиопатии // Архив патологии. – 2009. – Т. 71. – №5. – С. 21-22.
14. Кактурский, Л.В. Клиническая морфология острого коронарного синдрома // Архив патологии. – 2007. – Т. 69. – №4. – С. 16-19.
15. Кактурский, Л.В. Механизмы фибрилляции желудочков при внезапной коронарной смерти / Л.В. Кактурский, А.А. Бахтин // Современные подходы в клинко-морфологической диагностике и лечении заболеваний человека. Всероссийская конференция с международным участием, шестые научные чтения, посвященные памяти член-корр. РАМН, з.д.н. РФ, профессора Олега Константиновича Хмельницкого. – 2015. – С. 103-106.
16. Кактурский, Л.В. Первичные (идиопатические) кардиомиопатии // Архив патологии. – 2011. – Т. 73. – №3. – С. 18-20.
17. Козиолова, Н.А. Оценка сосудистого ремоделирования у больных ишемической болезнью сердца в зависимости от выраженности хронической сердечной недостаточности / Н.А. Козиолова, М.В. Суровцева, А.И. Чернявина, М.А. Ельцова // Сердечная недостаточность. – 2010. – Т.11. – № 2. – С. 83-88
18. Космачева, Е.Д. Осложнения в послеоперационном периоде у пациентов, перенесших ортотопическую трансплантацию сердца // Клиническая медицина. – 2014. – Т. 92. – № 4. – С. 30-34.
19. Куприянова, А.Г. Анализ соотношения признаков отторжения гуморального и клеточного типов при длительном функционировании аллотрансплантата сердца / А.Г. Куприянова, Л.В. Белецкая, Ф.С. Баранова [и др.] // Вестник трансплант. и искусств. органов. - 2002. - №1. - С. 28– 35.

20. Куприянова, А.Г. Иммуноморфологические признаки отторжения гуморального типа в разные периоды после аллотрансплантации: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2005.
21. Лашковская, Т.А. Случай трансплантации сердца ребенку 10 лет с дилатационной кардиомиопатией / Т.А. Лашковская, А.И. Кизелевич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2018. Т. 16. № 6. С. 740-742.
22. Мебония, Н.З. Применение плазмафереза в лечении болезни коронарных артерий пересаженного сердца и оценка его эффективности / Н.З. Мебония, Б.Н. Морозов, Е.Н. Остроумов [и др.] // Вестник трансплант. и искусств. органов. 2009. No 2. С. 25–28.
23. Морозов, Б.Н. Влияние программного плазмафереза на региональную функцию миокарда левого желудочка пересаженного сердца / Морозов Б.Н., Остроумов Е.Н., Могирева И.А. [и др.] // Вестник трансплантол. и искусств. органов. 2002. No 3. С. 39–40.
24. Островский, А.П. Инфекционные осложнения у пациентов, перенесших ортотопическую трансплантацию сердца / Островский А. П., Курлянская А. К. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 13. – №. 4. – С. 24-31.
25. Ситникова, М. Ю. Хроническая сердечная недостаточность: эпидемиология и перспективы планирования / М.Ю. Ситникова, Е.А. Лясникова, М.А. Трукшина // Сердечная недостаточность. – 2012. – Т. 13. – No. 6. – С. 372-376.
26. Солейко, Е.В. Осложненное течение хронической постинфарктной аневризмы сердца (клинико-морфологические параллели) / Е.В. Солейко, Л.В. Кактурский // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2013. – №3. – С. 7-12.

27. Сухачева, Т.В. Роль интерстициального фиброза в ремоделировании миокарда у пациентов с ГКМП / Т.В. Сухачева, Р.А. Серов, Л.А. Бокерия // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Сердечно-сосудистые заболевания. – 2018. – Т. 19. – № S6. – С. 238.
28. Фролова, Э.Б. Современное представление о хронической сердечной недостаточности / Э.Б. Фролова, М.Ф. Яушев // Вестник современной клинической медицины. – 2013. – Т. 6. – No. 2. – С. 87-93.
29. Чумарная, Т.В. Функциональная геометрия левого желудочка у пациентов после ортотопической трансплантации сердца в раннем послеоперационном периоде / Т.В. Чумарная, Ю.С. Алуева, В.В. Кочмашева, Н.Ф. Климушева, А.И. Иофин, А.Н. Быков // Трансплантология. – 2016. – №2. – С. 9-15.
30. Чуприненко, Л.М. Экспрессия сосудистого эндотелиального фактора роста типа А в эндометрии при маточной форме бесплодия / Л.М. Чуприненко, А.А. Славинский, Е.С. Севостьянова, А.А. Веревкин, В.Л. Друшевская, В.С. Котов // Кубанский научный медицинский вестник. – 2020. – №27(1). – С. 85-95.
31. Шевченко, А.П. Ассоциированный с беременностью протеин плазмы А (РАРР-А) при васкулопатии трансплантированного сердца / А.П. Шевченко, А.Я. Кормер, А.Л. МIRONKов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 13. – No. 2. – С. 46-51.
32. Шемакин, А.Ю. Особенности клинических проявлений острой реакции отторжения пересаженного сердца // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 12. – No. 1. – С. 7-16.

33. Шумаков, В.И. Достижения и перспективы развития трансплантологии и искусственных органов в России // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2005. – №3. – С. 6-9.
34. Шумаков, В.И. (ред.). // Трансплантология. – М.: Медицина – Тула: Репроникс Лтд, 1995. 391 с.
35. Шумаков, В.И. (ред.) Отторжение гуморального типа при аллотрансплантации сердца. В.И. Шумаков, М.Ш. Хубутя, Л.В. Белецкая. Тверь: Триада, 2003. 183 с.
36. Chopra, P. Pathology of cardiac transplantation the initial experience // Nat. Med. J. India. - 1997. - V. 10. - N 6. - P. 264-269.
37. Abramoff, M.D. Image processing with ImageJ / M.D. Abramoff, P.J. Magalhães, S.J. Ram // Biophotonics international. – 2004. – Vol. 11. – No. 7. – P. 36-42.
38. Aghdassi, A. Endomyocardial_Biopsy: Examining Indications and Trends in Use - More Native Heart Biopsies to Come? / A. Aghdassi, A. Gupta // Cardiology. 2019. – 142(2). – P. 102-104.
39. Agozzino, L. Pathology of heart transplantation (Morphological study of 1246 endomyocardial biopsies from 167 transplanted hearts). Causes of early, intermediate, and late deaths / Agozzino L., Thomopoulos K., Esposito S. [et al.] // Pathologica. - 1999. - V. 91. - N2.-P. 89-100.
40. Aharinejad, S. Serum matrix metalloprotease-1 and vascular endothelial growth factor – a predict cardiac allograft rejection / S. Aharinejad, K. Krenn, A. Zuckermann, R. Schäfer, M. Gmeiner, A. Thomas // Am J Transplant. – 2009. – Vol. 9. – No. 1. – P. 149-59.
41. Antynio, N. Uric acid: a prognostic marker not only before but also after heart transplantation / Antynio, N., Prieto D., Antunes M.J. // Eur. J. Cardiothorac. Surg. - 2010. — V. 38.-N2.-P. 187-191.

42. Arnaoutakis, G.J. Effect of sensitization in US heart transplant recipients bridged with a ventricular assist device: update in a modern cohort / G.J. Arnaoutakis, T.J. George, A. Kilic [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2011. – Vol. – No. 5. – P. 1236-1245.
43. Baldwin, W.M. 3rd Beyond C4d: other complement-related diagnostic approaches to antibody-mediated rejection / W.M. Baldwin 3rd, E.K. Kasper, A.A. Zachary, B.A. Wasowska, E.R. Rodriguez // Am. J. Transplant. – 2004. – Vol. 4. – No. 3. – P. 311–318.
44. Barnard, C.N. Comments on the first human-to-human heart transplant. 1993 // Cardiovasc J S Afr. – 2001. – Vol. 12. – No. 4. – P. 192-194.
45. Baroldi, G. Frequency and extent of contraction band necrosis in orthotopically transplanted human hearts. A morphometric study / G. Baroldi, M.D. Silver, R. De Maria, M. Parolini, E. Turillazzi, V. Fineschi // Int J Cardiol. – 2003. – Vol. 88. – №№ 2-3. – P. 267-278.
46. Barone, J.H. Absence of endocardial lymphoid infiltrates (Quilty lesions) in non heart transplant recipients treated with cyclosporin / Barone, J.H., Fishbein M.C., Czer L.S. [et al.] // J. Heart Lung Transplant. - 1997. - V. 16. - N 6. - P. 600-603.
47. Behr, T.M. Detection of humoral rejection in human cardiac allografts by assessing the capillary deposition of complement fragment C4d in endomyocardial biopsies / T.M. Behr, H.E. Feucht, K. Richter [et al.] // J Heart Lung Transplant. – 1999. – Vol. 18. – No. 9. – P. 904-912.
48. Beletskaya, L.V. Heart allograft lymphatic system changes and Quilty lesion / Beletskaya L.V., Kupriyanova A.G., Baranova F.S. [et al.] // J. Heart Lung Transplant. - 2005. -V. 24. - N 11. - P. 1999-2000.

49. Beletskaya, L.V. C4d-complement component as one of the humoral rejection / L.V. Beletskaya, A.G. Kupriyanova, F.S. Baranova // Russian J. of Immunology. – 2010. – No 4. – P. 40–42.
50. Beletskaya, L.V. Immunohistochemical investigation of the heart allograft myocardium (1991–1998) / L.V. Beletskaya, F.S. Baranova, Z.A. Khalimova [et al.] // Russian J. of Immunology. – 2000. – No 5. – P. 33–38.
51. Berry, G.J. The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody – mediated rejection in heart transplantation / G.J. Berry, M.M. Burke, C. Anderson [et al.] // J Heart Transplant. – 2013. – Vol. 32. – No. 12. – P. 1147–1161.
52. Berry, G.J. The ISHLT working formulation for pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation: evolution and current status (2005–2011) / G.J. Berry, A. Angelini, M.M. Burke [et al.] // J Heart Lung Transplant. – 2011. – Vol. 30. – P. 601–611.
53. Billingham, M.E. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation / Billingham M.E., Cary N.R., Hammond M.E., Kemnitz J., Marboe C., McCallister H.A., Snovar D.C., Winters G.L., Zerbe A. // J. Heart Transplant. - 1990. - V. 9. -N 6. - P. 587-593.
54. Billingham, M.E. Endomyocardial biopsy detection of acute rejection in cardiac allograft recipients // Heart Vessels Suppl. 1985; 1, 86–90.
55. Blanche, C. Heart transplantation with donor fifty years of age and older / C. Blanche, A. Kamlot, D. Blanche [et al.] // Cardiothorac Transplant. – 2002. – Vol.123. – P. 810-815.

56. Book, W.M. Fulminant mixed humoral and cellular rejection in cardiac transplant recipient: a review of the histologic findings and literature / W.M. Book, L. Kelley, M.B. Gravanis // J. Heart. Lung. Transplant. – 2003. – Vol. 22. – No 5. – P. 604–607.
57. Botas, J. Influence of preexistent donor coronary artery disease on the progression of transplant vasculopathy. An intravascular ultrasound study / J. Botas, F.J. Pinto, A. Chenzbraun [et al.] // Circulation. – 1995. – Vol. 92. – P. 1126-1132.
58. Brunner-LaRocca, H.P. Natural course of moderate cardiac allograft rejections (International Society of Heart and Lung Transplantation Grade 2) early and late after transplantation / H.P. Brunner-LaRocca, G. Sutsch, J. Schneider // Circulation. – 1996. – Vol. 94. – P. 1334–1338.
59. Cano, L.C. Quilty effect areas are frequently associated with endocardial C4d deposition / Cano L.C., Arteta A.A., Fernôndez R [et al.] // J. Heart Lung Transplant. - 2008. -V.-27,-N7.-P. 775-779.
60. Chantranuwat, C. Sudden, unexpected death in cardiac transplant recipients: an autopsy study / Chantranuwat C., Blakey J.D., Kobashigawa J.A. [et al.] // J. Heart Lung Transplant. - 2004. - V. - 23. - N 6. - P. - 683-689.
61. Chantranuwat, C. Immunoperoxidase staining for C4d on paraffin-embedded tissue in cardiac allograft endomyocardial biopsies: comparison to frozen tissue immunofluorescence / Chantranuwat C., Qiao J.H., Kobashigawa J., Hong L. [et al.] // App. Immunohistochem. Mol. Morphol. - 2004. - V. - 12. - N 2. - P. 166-171.
62. Chen, C.W. Low ejection fraction in donor hearts is not directly associated with increased recipient mortality / C.W. Chen, M.H. Sprys, A.N. Gaffey [et al.] // J Heart Lung Transplant. – 2017. – Vol. 36. – P. 611-615.

63. Chu, K.E. The relationship of nodular endocardial infiltrates (Quilty lesions) to survival, patient age, anti-HLA antibodies, and coronary artery disease following heart transplantation / Chu K.E., Ho E.K., de la Torre L. [et al.] // Cardiovasc. Pathol. - 2005. - V. - 14. N 4,- P. 219-224.
64. Cipullo, R. Vasculitis and Eosinophils in Endomyocardial Biopsies as Rejection Predictors in Heart Transplantation / R. Cipullo, M.A. Finger, J.M.R. Neto, C.M. Contreras, N. Van Geen Poltronieri, M. de Moura Barros Zamorano [et al.] // Arq Bras Cardiol. – 2011. – Vol. 97. – No. 2. – P. 163–170.
65. Clelland, C. A comparison of the cytology of endomyocardial biopsy washings from heart transplants with biopsy histologic study and peripheral blood lymphocyte counts / Clelland C., Fielding S., Storie I. [et al.] // J. Heart Lung Transplant. - 1997. - V. - 16. - N 5. - P. 477-483.
66. Colvin, R.B. Antibody-mediated organ-allograft rejection / R.B. Colvin, R.N. Smith // Nat. Rev. Immunol. – 2015. – Vol. 5. – Is. 10. – P. 807–817.
67. Coppage, M. Lack 42. of significant de novo HLA allosensitization in ventricular assist device recipients transfused with leukoreduced, ABO identical blood products / M. Coppage, M. Baker, L. Fialkow [et al.] // Hum. Immunol. – 2009. – Vol. 70. – No. 6. – P. 413–416.
68. Costa, E.S. Assessment of cardiac allograft vasculopathy in cardiac transplantation: experience of a Brazilian center / Costa E.S., Wang R., Susin M.F. // Arq. Bras. Cardiol. - 2012. - V. 99. - N 4. - P. 886-891.
69. Costanzo, M.R. International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines. The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients / Costanzo M.R., Dipchand A., Starling R. [et al.] // J. Heart Lung Transplant. - 2010. - V. 29. -N 8. -P. 914-56.

70. Costanzo-Nordin, M.R. Endocardial infiltrates in the transplanted heart: clinical significance emerging from the analysis of 5026 endomyocardial biopsy specimens / Costanzo-Nordin M.R., Winters G.L., Fisher S.G., O'Sullivan J, Heroux AL [et al.] // J. Heart Lung Transplant. - 1993. - V. 12. -N 5. - P. 741-747.
71. Coutance, G. Late antibody-mediated rejection after heart transplantation: Mortality, graft function, and fulminant cardiac allograft vasculopathy / Coutance G., Ouldamar S., Rouvier P. [et al.] // J. Heart Lung Transplant. - 2015. - V. - 34. - N 8. - P. 1050-1057.
72. Cunningham, K.S. An approach to endomyocardial biopsy interpretation / Cunningham K.S., Veinot J.P., Butany J. // J. Clin. Pathol. - 2006. - V. - 59. - N 2. - P. 121-129.
73. Da Costa, E.S.M. Assessment of Cardiac Allograft Vasculopathy in Cardiac Transplantation: Experience of a Brazilian Center / Da Costa E.S.M., Wang R., Susin M.F. // Arq. Bras. Cardiol. - 2012. - V. 99. - N 4. - P. 886-891.
74. Davis, M.K. State of the art: cardiac transplantation / M.K. Davis, S.A. Hunt // Trends in cardiovascular medicine. – 2014. – Vol. 24. – P. 341-349.
75. Dhital, K.K. Adult Heart Transplantation With Distant Procurement and Ex-Vivo Preservation of Donor Hearts After Circulatory Death: A Case Series // The Lancet. – 2015. – Vol. 385. – P. 2585–2591.
76. Di Carlo, E. Quilty effect has the features of lymphoid neogenesis and shares CXCL13-CXCR5 pathway with recurrent acute cardiac rejections / Di Carlo E., D'Antuono T., Contento S. [et al.] // Am. J. Transplant. - 2007. - V. 7. - N 1. - P. 201-210.
77. Dong C. Bax and apoptosis in acute and chronic rejection of rat cardiac allografts / Dong C., Granville D.J., Tuffnel C.E. [et al.] // Lab. Invest. - 1999. - V. 79. - N 12. -P. 1643-1653.

78. Dong C., Winters G.L., Wilson J.E. et al. Enhanced lymphocyte longevity and absence of proliferation and lymphocyte apoptosis in Quilty effects of human heart allografts//Am. J. Pathol. - 1997.-V. 151.-N 1.-P. 121-130.
79. Drachenberg, C.B. Guidelines for the diagnosis of antibody-mediated rejection in pancreas allografts-updated Banff grading schema / C.B. Drachenberg, J.R. Torrealba, B.J. Nankivell [et al.] // Am J Transplant. – 2011. – Vol. 11. – P. 1792- 802.
80. Drakos, S.G. Prior human leukocyte antigen-allosensitization and left ventricular assist device type affect degree of post-implantation human leukocyte antigen-allosensitization / S.G. Drakos, A.G. Kfoury, J.R. Kotter [et al.] // J. Heart Lung Transplant. – 2009. – Vol. 28. – No. 8. – P. 838–842.
81. Duquesnoy, R.J. Evidence for heat shock protein immunity in a rat cardiac allograft model of chronic rejection // Transplantation. -1999.-V. 15.-N67.-P. 156-164.
82. Dzemeshevich, S. Plasmapheresis in the treatment of posttransplant cardiomyopathy / S. Dzemeshevich, A. Ragimov, Y. Mikhaylov [et al.] // Artif. organs. – 1998. – No 22. – P. 197–202.
83. El-Awar, N. HLA antibody identification with single antigen beads compared to conventional methods / N. El-Awar, J. Lee, P.I. Terasaki // Hum. Immunol. – 2005. – Vol. 66. – No. 9. – P. 989–997.
84. Eschenhagen T., Mummery C., Knollmann B.C. Modelling sarcomeric cardiomyopathies in the dish: from human heart samples to iPSC cardiomyocytes // Cardiovasc. Res. 2015; 105(4): 424–38. doi: 10.1093/cvr/cvv017
85. Fedrigo, M. Inflammatory cell burden and phenotype in endomyocardial biopsies with antibody-mediated rejection (AMR): a multicenter pilot study

from the AECVP / Fedrigo, M., Leone O., Burke M.M. [et al.] // Am. J. Transplant. - 2015. - V. 15. -N 2.-P. 526-534.

86. Feldman, D. 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Guidelines for mechanical circulatory support: executive summary / D. Feldman, S.V. Pamboukian, J.J. Teuteberg, E. Birks, K. Lietz, S.A. Moore [et al.] // The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation. – 2013. – Vol. 32. – P. 157-187.

87. Fishbein, M.C. Grade 2 cellular heart rejection: does it exist? // J. Heart Lung Transplant. - 1994. - V. 13. -N 6. -P. 1051-1057.

88. Forbes, R.D. Endocardial infiltrates in human heart transplants: a serial biopsy analysis comparing four immunosuppression protocols / Forbes R.D., Rowan R.A., Billingham M.E. // Hum. Pathol. - 1990. - V. 21. - N 8. - P. 850-855.

89. Frank, R. Correlations of lymphocyte subset infiltrates with donor-specific antibodies and acute antibody-mediated rejection in endomyocardial biopsies / Frank R., Dean S.A., Molina M.R., Kamoun M., Lai P. // Cardiovasc. Pathol. - 2015. - V. 24.- P.3.-P. 168-172.

90. Frank, R. Circulating donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies and complement C4d deposition are associated with the development of cardiac allograft vasculopathy / Frank R., Molina M.R., Goldberg L.R., Wald J.W., Kamoun M., Lai P. // Am. J. Clin. Pathol. - 2014. - V. 14. -N 6. - P. 809-815.

91. Freimark, D. Pathogenesis of Quilty lesion in cardiac allografts: relationship to reduced endocardial cyclosporine A // J. Heart Lung Transplant. - 1995.-V. 14.-N6.-P. 1197-1203.

92. Fyfe, B. Heart transplantation-associated perioperative ischemic myocardial injury: morphological features and clinical significance / B. Fyfe, E. Loh, G.L. Winters [et al.] // *Circulation*. – 1996. – Vol. 93. – P. 1133-1140.
93. Gajjar, N.A. FK506 vs. cyclosporin. Pathologic findings in 1067 endomyocardial biopsies // *Cardiovasc. Pathol.* - 2003. - V. 12. -N 2. - P.73-76.
94. Gallo, P. Working formulation nomenclature of heart transplant pathology: A retrospective evaluation of 1037 endomyocardial biopsies // *Cardiovasc. Pathol.* - 1992. - V. 1. - N 2. - P. 87-92.
95. Ghadimi, H. Histopathological findings in cardiac transplant recipients: an assessment after 10 years' experience in Iran // *Transplant. Proc.* -2005. - V. 37. - N 10. - P.4535-4536.
96. Giaid, A. Endothelin-1 immunoreactivity and mRNA in the transplanted human heart // *Transplantation*. - 1995. - V. 59. - N 9. -P. 1308-1313.
97. Gopal, S., Narasimhan U., Day J.D. et al. The Quilty lesion enigma: focal apoptosis/necrosis and lymphocyte subsets in human cardiac allografts // *Pathol. Int.* - 1998.-V. 48.-N3.-P. 191-198.
98. Grimm, J.G. MELD-XI score predicts early mortality in patients after heart transplantation / J.G. Grimm, A.S. Shah, J.T. Magrader [et al.] // *Ann Thorac Surg*. – 2015. – Vol. 100. – P. 1737-1743.
99. Hammond, E.H. Immunofluorescence of endomyocardial biopsy specimens: method and interpretation / E.H. Hammond, J.K. Hansen, L.S. Spenser [et al.] // *J. Heart Lung Transplant*. – 1993. – No. 12. – P. 115–124.
100. Hammond, E.H. Utility of Histologic Parameters in Screening for Antibody-Mediated Rejection of Cardiac Allograft: A Study of 3170 Biopsies / E.H. Hammond, J. Stehlik, G. Snow // *J. Heart Lung Transplant*. – 2005. – No. 24. – P. 2015–2021.

101. Hammond, E.H. Vascular (humoral) rejection in heart transplantation: pathologic observations and clinical implications / E.H. Hammond, R. Yowell, S. Nunoda [et al.] // J. Heart Lung Transplant. – 1998. – Vol. 9. – No. 4. – P. 447–449.
102. Herskowitz, A. Arteriolar vasculitis on endomyocardial biopsy: a histologic predictor of poor outcome in cyclosporine-treated heart transplant recipients / A. Herskowitz, L.M. Soule, K. Ueda [et al.] // J. Heart Transplant. – 1987. – Vol. 6. – No. 3. – P. 127–136.
103. Hiemann, N.E. Quilty effect, acute cellular rejection, and transplant vasculopathy: still controversial // J. Heart Lung Transplant. - 2009. -V. 28.- N 11.-P. 1240.
104. Hiemann, N.E. Heart transplantation at the Deutsches Herzzentrum Berlin // Clin. Transpl. - 2010. - P. 207-218.
105. Hiemann, N.E. Quilty indicates increased risk for microvasculopathy and poor survival after heart transplantation // J. Heart Lung Transplant. - 2008. - V. 27. - N 3. - P. 289-296.
106. Hiemann, N.E. Quilty in biopsy is associated with poor prognosis after heart transplantation / N.E. Hiemann, C. Knosalla, E. Wellnhofer, H.B. Lehmkuhl, R. Hetzer, R. Meyer // Transpl Immunol. – 2008. – Vol. – №№ 3–4. – P. 209–214.
107. Hirohashi, T. A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody / T. Hirohashi, C.M. Chase, P. Della Pelle [et al.] // Am. J. Transplant. – 2011. – Vol. 12. – No. 2. – P. 313–321.
108. Hollander, Z. Predicting acute cardiac rejection from donor heart and pre-transplant recipient blood gene expression / Z. Hollander, V. Chen, K.

Sidhu, D. Lin, R.T. Ng, R. Balshaw // J Heart Lung Transplant. – 2013. – Vol. 32. – No. 2. – P. 259-65.

109. Hooper, D.K. Panel-reactive antibodies late after allograft implantation in children / D.K. Hooper, J.A. Hawkins, T.C. Fuller, T. Profaizer, R.E. Shaddy // Ann. Thorac. Surg. – 2005. – Vol. 79. – No. 2. – P. 641–644.

110. Idica, A. Elimination of post-transplant donor-specific HLA antibodies with bortezomib / A. Idica, H. Kaneku, M.J. Everly [et al.] // Clin. Transpl. 2008. – Vol. 1. – P. 229–239.

111. Imamura, T. Late rejection occurred in recipients who experienced acute cellular rejection within the first year after heart transplantation // Int. Heart J. - 2015. - V. 56. -N 2. - P. 174-179.

112. Isaza, N. Cardiogenic shock as the first manifestation of large vessel vasculitis in a young patient: case report / N. Isaza, A.M. Posada, M.E. Diaz, D. Isaza-Restrepo // Eur Heart J Case Rep. – 2018. – Vol. 2. – No. 3. – P. 091.

113. Jansen, M.A. Immunological and Fibrotic Mechanisms in Cardiac Allograft Vasculopathy // Transplantation. - 2015. - Aug 17. [Epub ahead of print]

114. John, R. Impact of current management practices on early and late death in more than 500 consecutive cardiac transplant recipients / R. John, H. Rajasinghe, J.M. Chen [et al.] // Ann. Surg. – 2000. – Vol. 232(3). – P. 302–311.

115. Jollow, K.C. Apoptosis of mononuclear cell infiltrates in cardiac allograft biopsy specimens questions studies of biopsy-cultured cells // Transplantation. 1997. - V. 27. N.10. - P. 1482-9.

116. Jonigk, D. Aberrant reparative tissue remodeling: histopathology and molecular pathology // *Pathologe*. - 2014. - V. 35. - N 2. - P. 254-263.
117. Jonigk, D. Recipient-derived neoangiogenesis of arterioles and lymphatics in quilty lesions of cardiac allografts // *Transplantation*. -2007. -V. 84.-N 10.-P.1335-1342.
118. Joshi, A. The Quilty Effect: current knowledge and clinical implications // *Transplant. Proc.* - 1998. - V. 30. - N 3. - P. 907-908.
119. Joshi, A. "Quilty" revisited: a 10-year perspective // *Hum. Pathol.* - 1995. - V. 26. -N 5. - P. 547-557.
120. Joshi, A. Quilty revisited: a 10-year perspective / A. Joshi, M.A. Masek, B.W. Brown // *Hum Pathol.* – 1995. – Vol. 26. – P. 547–557.
121. Kemnitz, J. Some aspects of changed histopathologic appearance of acute rejection in cardiac allografts after prophylactic application of OKT3 // *J. Heart Lung Transplant.* - 1991. - V. 10. - N 3,-P. 366-372.
122. Kfoury, A.G. Cardiovascular mortality among heart transplant recipients with asymptomatic antibody-mediated or stable mixed cellular and antibody-mediated rejection / A.G. Kfoury, M.E. Hammond, G.L. Snow [et al.] // *J. Heart Lung Transplant.* – 2009. – Vol. 28(8). – P. 781–784.
123. Kfoury, A.G. Controversies in defining cardiac antibody-mediated rejection: need for updated criteria / A.G. Kfoury, M.E. Hammond // *J. Heart Lung Transplant.* – 2010. – Vol. 29(4). – P. 389–394.
124. Kfoury, A.G. Impact of repetitive episodes of antibody-mediated or cellular rejection on cardiovascular mortality in cardiac transplant recipients: defining rejection patterns / A.G. Kfoury, J. Stehlik, D.G. Renlund [et al.] // *J. Heart Lung Transplant.* –2005. – 25(11). – P. 1277–1282.

125. Khaloo, P. Association of extracellular heat shock protein 70 and insulin resistance in type 2 diabetes; independent of obesity and C-reactive protein / P. Khaloo, H. Alemi, S. Rabizadeh, M.A. Mansournia, H. Mirmiranpour, S.S. Salehi, A. Esteghamati, M. Nakhjavani // Cell Stress Chaperones. –2019. – 24(1). – P. 69-75.
126. Knecht, K.R. Gene expression profiling in pediatric heart transplant rejection / K.R. Knecht, S.L. MacLeod, C.A. Hobbs, M. Li, W.R. Morrow // Int J Cardiol. – 2013. – Vol. 168(5). – P. 5052-5053.
127. Kobashigawa, J.A. Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation / J. Kobashigawa, M.G. Crespo-Leiro, S.M. Ensminger [et al.] // J. Heart Lung Transplant. – 2011. – Vol. 30(3). – P. 252–269.
128. Kobashigawa, J.A. The long-term outcome of treated sensitized patients who undergo heart transplantation / J.A. Kobashigawa, J.K. Patel, M.M. Kittleson [et al.] // Clin. Transplant. – 2011. – Vol. 25(1). – E61–E67.
129. Kottke-Marchant, K. Endomyocardial lymphocytic infiltrates in cardiac transplant recipients. Incidence and characterization // Arch. Pathol. Lab. Med. - 1989. - V. 113. - N 6. - P. 690-698.
130. Kumarasinghe, G. Post-transplant lymphoproliferative disease in heart and lung transplantation: Defining risk and prognostic factors / G. Kumarasinghe, O. Lavee, A. Parker, I. Nivison-Smith, S. Milliken, A. Dodds // J Heart Lung Transplant. – 2015. – Vol. 34(11). – P. 1406-1414.
131. Labarrere, C.A. Coronary artery disease in cardiac allografts: association with arteriolar endothelial HLA-DR and ICAM-1 antigens / C.A. Labarrere, D. Pitts, D.R. Nelson, W.P. Faulk // Transplant. Proc. – 1995. – Vol. 27(3). – P. 1939–1940.

132. Labarrere, C.A. Endothelial activation and development of coronary artery disease in transplanted human hearts / C.A. Labarrere, D.R. Nelson, W.P. Faulk // JAMA. – 1997. – Vol. 278(14). – P. 1169–1175.
133. Laguens, R.P. Identification of programmed cell death (apoptosis) in situ by means of specific labeling of nuclear DNA fragments in heart biopsy samples during acute rejection episodes // J. Heart Lung Transplant. - - 1996.-V. 15.-N9.- P. 911-918.
134. Land, W.G. Emerging role of innate immunity in organ transplantation: part I: evolution of innate immunity and oxidative allograft injury // Transplantation reviews. – 2012. – Vol. 26. – P. 60-72.
135. Lee, D. R. C3d-binding Donor-specific HLA Antibody Is Associated With a High Risk of Antibody-mediated Rejection and Graft Loss in Stable Kidney Transplant Recipients: A Single-center Cohort Study / D.R. Lee, B.C. Kim, J.P. Kim, I.G. Kim, M.Y. Jeon // Transplant Proc. 2018. – Vol. 50(10). – P. 3452-3459.
136. Li, L. Clinical implication of microvasculopathy in patients post heart transplantation // Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi. - 2011. - V. 39. - N 2. - P. 156-159.
137. Li, L. The clinicopathological endomyocardial biopsy analysis in cardiac transplant recipients due to end-stage heart failure // Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi. - 2006. - V. 34. - N 9. - P. 819-821.
138. Lima, B. Marginal cardiac allografts do not have increased primary graft dysfunction in alternate list transplantation / B. Lima, K. Rajagopal , R.P. Petersen et al. // Circulation. – 2006. – Vol.114 (1). – P. 27-32.
139. Lin-Wang, H.T. Intragraft vasculitis and gene expression analysis: Association with acute rejection and prediction of mortality in long-term heart transplantation / Lin-Wang H.T. Cipullo R., Dias Franca J.I.,

Finger M.A., Rossi Netto J.M., Correira E.B., Dinkhuysen J.J., Hirata M.H. // Clin Transplant. – 2018. – Vol. 32(10). – e13373.

140. Loebe, M. Medium-term results of heart transplantation using older donor organs / M. Loebe, E.V. Potapov, M. Hummel [et al.] // J Heart Lung Transplant. – 2000. – Vol. 19. – P. 957-963.

141. Lorgetil, M. Evaluation of ticlopidine, a novel inhibitor of platelet aggregation, in heart transplant recipients / M. Lorgetil, P. Boissonnat, G. Dureau [et al.] // Transplantation. – 1993. – Vol. 55. – P.1195–1196.

142. Loupy, A. Very late heart transplant rejection is associated with microvascular injury, complement deposition and progression to cardiac allograft vasculopathy / A. Loupy, A. Cazes, R. Guillemain // Am J Transplant. – 2011. – Vol. 11. – P. 1478-1487.

143. Luthringer, D.J. Nature and significance of epicardial lymphoid infiltrates in cardiac allografts // J. Heart Lung Transplant. -1995.-V. 14.-N3.-P. 537-543.

144. Maisch, B. Cardiomyopathies: classification, diagnosis, and treatment / Noutsias M, Ruppert V, Richter A, Pankuweit S. // Heart Fail Clin. 2012; 8(1):53-78.

145. Malafa, M. Successful treatment of acute humoral rejection in heart transplant patient / M. Malafa, M.C. Mancini, J.L. Myles [et al.] // J. Heart Lung Transplant. – 1992. – No. 11. – P. 486–491.

146. Mannion, M. Successful treatment of pediatric IgG4 related systemic disease with mycophenolate mofetil: case report and a review of the pediatric autoimmune pancreatitis literature. / M. Mannion, R.Q. Cron // Pediatr Rheumatol Online J. – 2011. – Vol. 9(1). – P. 1.

147. Marboe, C.C. Nodular endocardial infiltrates (Quilty lesions) cause significant variability in diagnosis of ISHLT Grade 2 and 3A rejection in cardiac allograft recipients // J. Heart Lung Transplant. - 2005. - V. 24. -P. 219-226.

148. Markus, J. Long-term outcome following heart transplantation: current perspective // J. Thorac Dis. - 2015. -V. 7. -N 3. - P. 549-551.
149. Masaki, Y. Cutoff values of serum IgG4 and histopathological IgG4+ plasma cells for diagnosis of patients with IgG4- related disease. / Y. Masaki, N. Kurose, M. Yamamoto [et al.] // Int J Rheumatol. – 2012. – Vol. 2012.
150. Massad, M.G. Factors influencing HLA sensitization in implantable LVAD recipients / M.G. Massad, D.J. Cook, S.K. Schmitt [et al.] // Ann. Thorac. Surg. – 1997. – Vol. 64(4). – P. 1120–1125.
151. Matsui, S. Immunoglobulin G4-related lung disease: clinicoradiological and pathological features. / S. Matsui, A. Hebisawa, F. Sakai [et al.] // Respirology. – 2013. – Vol. 18(3). – P. 480-487. doi: 10.1111/resp.12016.
152. McCarthy, S. L. Long term outcomes and management of the heart transplant recipients / S. L. McCarthy, C. Patel, J. Del Rio [et al.] // Best Pract Research Clin Anesthesiol. – 2017. – Vol.31 (2). – P. 237-248.
153. Mehra, M.R. Advances in Heart and Lung Transplantation 2004: Report from the 24th International Society for Heart and Lung Transplantation Annual Meeting, San Francisco, April 21–24, 2004 / M.R. Mehra, J.A. Kobashigawa // J. Heart Lung Transplant. – 2004. – Vol. 23. – No. 8. – P. 925–930.
154. Mengel, M. The molecular phenotype of heart transplant biopsies: relationship to histopathological and clinical variables // Am J. Transplant. - 2010. - V. 10. - N 9. - P. 2105-15.
155. Michaels, P.J. Differential expression of RANTES chemokine, TGF-beta, and leukocyte phenotype in acute cellular rejection and quilty B lesions // J. Heart Lung Transplant. - 2001. - V. 20. - N 4. -P.407-416.

156. Michaels, P.J. Humoral rejection in cardiac transplantation: risk factors, hemodynamic consequences and relationship to transplant coronary artery disease / P.J. Michaels, M.L. Espejo, J. Kobashigawa [et al.] // J. Heart Lung Transplant. 2003. – 22(1). – P. 58–69.
157. Mohacsi, P.J. Endocardial mononuclear cell infiltrates (Quilty effect) in heterotopic cardiac allografts in rapamycin-treated rats // Transplant Proc. - 1994. - V. 26. - N 6. - P. 3255-3259.
158. Morrell, C.N. In vivo platelet-endothelial cell interactions in response to major histocompatibility complex alloantibody / C.N. Morrell, K. Murata, A.M. Swaim [et al.] // Circ. Res. – 2008. – Vol. 102(7). – P. 777–785.
159. Mozaffari, K. Diagnostic Pitfalls and Challenges in Interpretation of Heart Transplantation Rejection in Endomyocardial Biopsies With Focus on our Experience // Res Cardiovasc Med. - 2014. - V. 3. - N 1.
160. Mulholland, G.B. Immunoglobulin G4-related diseases in the head and neck: a systematic review. / G.B. Mulholland, C.C. Jeffery, P. Satija, D.W. Côté // J Otolaryngol Head Neck Surg. – 2015. – Vol. 44. – P. 24.
161. Nakhleh, R.E. Lack of evidence for involvement of Epstein-Barr virus in the development of the "Quilty" lesion of transplanted hearts: an in situ hybridization study // J. Heart Lung Transplant. -1991.-V. 10.-N4.-P. 504-507.
162. Olsen, S.L. Vascular rejection in heart transplantation: clinical correlation, treatment options and future consideration / S.L. Olsen, L.E. Wagoner, E.H. Hammond [et al.] // J. Heart Lung Transplant. – 1993. – No 12. –P. 135–142.
163. Pardo-Mindan, F.J. Pathology of heart transplant through endomyocardial biopsy // Semin Diagn Pathol. -1992. -V. 9.-N3.-P. 238-248.

164. Patel, J.K. Improving survival during heart transplantation: diagnosis of antibody-mediated rejection and techniques for the prevention of graft injury / J.K. Patel, J.A. Kobashigawa // *Future Cardiol.* – 2012. – Vol. 8. – P. 623-35.
165. Pijet, M. Fractal analysis of heart graft acute rejection microscopic images / M. Pijet, J. Nozynski, D. Konecka-Mrowka [et al.] // *Transplant Proc.* – 2014. – Vol. 46(8). – P. 2864-6.
166. Platt, J.L. C4d and the fate of organ allografts // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2002. – Vol. 13. – P. 2019–2022.
167. Plaza, D.M. Cytokine gene polymorphisms in heart transplantation: association of low IL-10 production genotype with Quilty effect // *J. Heart Lung Transplant.* -2003. -V. 22,-N8.-P. 851-856.
168. Potapov, E.V. Medium-term results of heart transplantation using donors over 63 years of age / E.V. Potapov, M. Loebe, M. Hubler [et al.] // *Transplantation.* – 1999. – Vol.8. – P. 1834 – 1838.
169. Potena, L. Does the antibody mediated rejection grading scale have prognostic prediction? Yes, but the picture is still blurry / L. Potena, V. Moriconi, M. Sabatino, V. Agostini, O. Leone // *Curr Opin Organ Transplant.* – 2019. – Vol. 1. – P. 201-210.
170. Previato, M. Heart transplantation survival and sex-related differences / M. Previato, P.L. Kerhof [et al.] // *Adv Exp Med Biol.* – 2018. – Vol. 1065. – P. 379-388.
171. Qiao, J.H. Expression of cell adhesion molecules in human cardiac allograft rejection // *J. Heart Lung Transplant.* - 1992. - V. 11. -N 5. -P. 920-925.
172. Reed, E.F. Acute antibody-mediated rejection of cardiac transplants / E.F. Reed, A.J. Demetris, E. Hammond [et al.] // *J. Heart Lung Transplant.* 2006. – Vol. 25(2). – P. 153–159.

173. Roing, E. Heart transplantation using allografts from older donors: multicenter study results / E. Roing, L. Almenar, M. Crespo-Leiro [et al.] // J Heart Lung Transplant. – 2015. – Vol.34. – P. 790-796.
174. Ruan, X.M. Cytokine expression and endothelial cell and lymphocyte activation in human cardiac allograft rejection: an immunohistochemical study of endomyocardial biopsy samples // J. Heart Lung Transplant. - 1992.-V. 11.-N6.-P. 1110-1115.
175. Salomon, R.N. Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis. Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells / R.N. Salomon, C.C. Hughes, F.J. Schoen, D.D. Payne, J.S. Pober, P. Libby // Am. J. Pathol. – 1991. – Vol. 138(4). – P. 791–798.
176. Sanchez-Vegazo, I. Pathology of the heart transplant // Rev. Esp. Cardiol. - 1995. - V. 48. - N 7. - P. 65-70.
177. Sattar, H.A. The presence of a CD21+ follicular dendritic cell network distinguishes invasive Quilty lesions from cardiac acute cellular rejection // Am. J. Surg. Pathol. - 2006. -V. 30. -N 8. -P.1008-1013.
178. Shumakov, V.I. Evidence for antibody and immunocomplex deposition in heart transplantation: a report of three cases / V.I. Shumakov, L.V. Beletskaya, F. Baranova [et al.] // J. Heart Lung Transplant. – 1992. No. 11. – P. 1209–1212.
179. Sibley, R.K. Pathology and immunopathology of solid organ graft rejection // Transplantation proceed. – 1981. – Vol. 21. – P. 14–17.
180. Sing, T.P. Improved survival in heart transplant recipients in the United States: racial differences in era effect / T. P. Sing, C. Almond, M. M. Givertz et al. // Circulation Heart Failure. – 2011. – Vol. 4. – P. 153-160.

181. Slauson, S. Quilty effect in heterotopic cardiac allografts in malononitrilamide-treated rats // J. Heart Lung Transplant. -1999.-V. 18.-N 12.-P. 1251-1253.
182. Smith, J.D. C4d fixing, luminex binding antibodies – a new tool for prediction of graft failure after heart transplantation / J.D. Smith, I.M. Hamour, N.R. Banner, M.L. Rose // Am. J. Transplant. – 2007. – Vol. 7(12). – P. 2809–2815.
183. Smith, R.N. C4d deposition in cardiac allografts correlates with alloantibody / R.N. Smith, N. Brousaides, L. Grazette [et al.] // J. Heart Lung Transplant. – 2005. – Vol. 24. – No 9. – P. 1202–1210.
184. Sorrentino, C. Endomyocardial infiltration by B and NK cells foreshadows the recurrence of cardiac allograft rejection // J. Pathol. - 2006. - V. 209. -N 3. - P. 400-410.
185. Starling, R.C. CTOT-05 consortium. Multicenter Analysis of Immune Biomarkers and Heart Transplant Outcomes: Results of the Clinical Trials in Organ Transplantation-05 Study // Am. J. Transplant. - 2015. Aug 10
186. Stehlik, J. Honoring 50 Years of Clinical Heart Transplantation in Circulation: InDepth State-of-the-Art Review/ J. Stehlik, J. Kobashigawa, S.A. Hunt [et al.] // Circulation. – 2018. – Vol.137 (1) . – P. 71-87.
187. Stewart, S. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection // J. Heart Lung Transplant. - 2005. - V. 24. - N 11. - P. 1710-1720.
188. Stovin P.G., al-Tikriti S.A. The correlation of various features of rejection in myocardial biopsies after human heart transplantation // Pathol. Res Pract. - 1989. -V. 185.-N6.-P. 836-842.
189. Subherwal, S. Incidence of acute cellular rejection and non-cellular rejection in cardiac transplantation / S. Subherwal, J.A. Kobashigawa, G.

Cogert, J. Patel, M. Espejo, B. Oeser // Transplant. Proc. – 2004. – Vol. 36(10). – P. 3171–3172.

190. Chen, C. W. Low ejection fraction in donor hearts is not directly associated with increased recipient mortality / C. W. Chen, M. H. Sprys, A. N. Gaffey et al. // J Heart Lung Transplant. –2017. –Vol.36. –P. 611-615.

191. Luo, B, NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model / Li B, Wang W, Liu X, Xia Y, Zhang C, et al. PLoS One. 2014 Aug 19; 9(8): e104771.

192. Szymanska, S. Reclassification of C4d-Positive Endomyocardial Biopsy (EMB) According to New International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) 2013 Categories for Reporting Pathologic Antibody-Mediated Rejection (pAMR): Preliminary Data from a Polish Single-Center Study // Ann. Transplant. - 2015. - V. 20. - P. 351356.

193. Szymanska, S. Prevalence of the Quilty effect in endomyocardial biopsy of patients after heart transplantation - from cellular rejection to antibody-mediated rejection? / S. Szymanska, W. Grajkowska, M. Sobieszczanska-Malek, T. Zielinski, M. Pyzlak, M. Pronicki // Pol J Pathol. – 2016. – Vol. 67(3). – P. 216-220.

194. Taimeh, Z. Vascular endothelial growth factor in heart failure / Taimeh Z., Loughran J., Birks E.J., Bolli R. // Nat Rev Cardiol. – 2013. – Vol. 10(9). – P. 519–530.

195. Takemoto, S. A national conference to assess antibody mediated rejection in solid organ transplantation / S. Takemoto, A. Zeevi, S. Feng [et al.] // Am. J. Transplant. – 2004. – Vol. 4. – P. 1–9.

196. Tavora, F. Endothelitis in cardiac allograft biopsy specimens: possible relationship to antibody-mediated rejection / F. Tavora, R.

Munivenkatappa, J. Papadimitriou // J Heart Lung Transplant. – 2011. – Vol. 30. – P. 435-44.

197. Taylor, D.O. Allograft coronary artery disease: clinical correlations with circulation anti-HLA antibodies and the immunopathologic pattern of vascular rejection / D.O. Taylor, R.L. Yowell, A.G. Kfoury // J. Heart Lung Transplant. – 2000. – Vol. 19. – No 6. – P. 518–521.

198. Tazelaar, H.D. Spectrum and diagnosis of myocardial rejection // Cardiol. Clin. - 1990. - V. 8. -N 1. - P. 119-139.

199. Theochari, C.A. Heart transplantation versus left ventricular assist devices as destination therapy or bridge to transplantation for 1-year mortality: a systematic review and metaanalysis / C.A. Theochari, G. Michalopolos, E. K. Oikonomou [et al.] // Ann Cardiothorac Surg. – 2018. – Vol. 7 (1). – P. 3-11.

200. Tonsho, M. Heart transplantation: challenges facing the field / M. Tonsho, S. Michel, Z. Ahmed, A. Alessandrini, J.C. Madsen // Cold Spring Harb Perspect Med. – 2014. – Vol. 4(5). – P. a015636.

201. Trivedi, J.R. Heart transplant survival based on recipient and donor risk scoring: a UNOS database analysis / J.R. Trivedi, A. Cheng, M. Ising [et al.] // ASAIO J 2016. – Vol. 62. –P. 297-301.

202. Truell, J.S. Case report of a Quilty lesion within a coronary artery / Truell J.S., Fishbein M.C. // Cardiovasc. Pathol. - 2006. - V. 15. - N 3. - P. 161-164.

203. Tsamandas A.C. Adult Heart Transplantation Under Tacrolimus (FK506) Immunosuppression: Histopathologic Observations and Comparison to a Cyclosporine-based Regimen with Lympholytic (ATG) Induction / Tsamandas A.C., Pham Si M., Seaberg E.C. [et al.] // J. Heart Lung Transplant. - 1997. - V. 16. - N 7. - P. 723-734.

204. Tuzcu, E.M. Intravascular ultrasound evidence of angiographically silent progression in coronary atherosclerosis predicts long-term morbidity and mortality after cardiac transplantation / E.M. Tuzcu, S. R. Kapadia, R. Sachar [et al.] // J Am Coll Cardiol. – 2005. – Vol. 45. – P. 1538-1542.
205. Urbanowicz, T. Comparison of conventional tacrolimus versus prolong release formula as initial therapy in heart transplantation / T. Urbanowicz, H. Baszyńska-Wachowiak, M. Ligowski, E. Straburzyńska-Migaj, M. Misterski, M. Jemielity // Ann Transplant. – 2014. – Vol. 19. – P. 295-99.
206. Valantine, H. Cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation: risk factors and management // J. Heart Lung Transplant. – 2004. – Vol. 23. – №5 – P. 187–193.
207. Van den Hoogen P. Cardiac allograft vasculopathy: a donor or recipient induced pathology? / Van den Hoogen P., Huibers M.M., Sluijter J.P. [et al.] // J. Cardiovasc. Transl. Res. - 2015.-V. 8.-N2.-P. 106-116.
208. Villemaire, M. Systematic Screening Using Luminex for De Novo C3d Fixing of Class II Donor-Specific Antibodies Is Correlated With Luminex Mean Fluorescence Intensity in Renal Transplant Patients / M. Villemaire, T. Jouve, A. Bourdin, B. Janbon, N. Pinel, R. Tetaz, N. Terrier, L. Rostaing, D. Masson, P. Malvezzi // Exp Clin Transplant. – 2018.
209. von der Thüsen, J.H. The histomorphological spectrum of restrictive chronic lung allograft dysfunction and implications for prognosis / J.H. von der Thüsen, E. Vandermeulen, R. Vos, B. Weynand, E.K. Verbeken, S.E. Verleden // Mod Pathol. – 2018. – Vol. 31. – P. 780-90.
210. Wahler, T. Marginal donor grafts in heart transplantation: lessons learned from 25 years of experience / T. Wahler, T. Wittwer [et al.] // Transplant International. – 2008. – Vol. 21. – P. 113-124.

211. White, J.A. Routine surveillance myocardial biopsies are unnecessary beyond one year after heart transplantation / White J.A., Guiraudon C., Pflugfelder P.W. [et al.] // J. Heart Lung Transplant. - 1995. - V. 14. - N 6. - P. 1052-1056.
212. Winters, G.L. The challenge of endomyocardial biopsy interpretation in assessing cardiac allograft rejection // Curr. Opin. Cardiol. - 1997. - V. 12. - N 2. -P. 146-152.
213. Winters G.L., Costanzo-Nordin M.R. Pathological findings in 2300 consecutive endomyocardial biopsies // Mod. Pathol. - 1991. - V. 4. - N 4. - P. 441-448.
214. Winters, G.L. Consistencies and controversies in the application of the International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation for heart transplant biopsy specimens. Rapamycin Cardiac Rejection Treatment Trial Pathologists / Winters G.L., McManus B.M. // J. Heart Lung Transplant. - 1996. — V. 15. -N 7.-P. 728-735.
215. Winters, G.L. Graft arteriosclerosis-induced myocardial pathology in heart transplant recipients: predictive value of endomyocardial biopsy / G.L. Winters, F.J. Schoen // J Heart Lung Transplant. – 1997. – Vol. 16. – P. 985–991.
216. Wu, G.W. Asymptomatic antibody-mediated rejection after heart transplantation predicts poor outcomes / G.W. Wu, J.A. Kobashigawa, M.C. Fishbein [et al.] // J. Heart Lung Transplant. – 2009. – Vol. 28(5). – P. 417–422.
217. Young, J.B. Perspectives on cardiac allograft vasculopathy // Curr Atheroscler Rep. – 2000. – Vol. 2. – P. 259–271.
218. Yusuf, S. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients / S. Yusuf, P.

Sleight, J. Pogue et al. // The New England journal of medicine. – 2000. – Vol. 342. – №3. – P. 145-153.

219. Zakliczynski, M. Quilty effect correlates with biopsy-proven acute cellular rejection but does not predict transplanted heart coronary artery vasculopathy / Zakliczynski, M., Nozynski J., Konecka-Mrowka D. [et al.] // J. Heart Lung Transplant. - 2009. - V. 28. -N 3. -P.255-259.

220. Zaroff, G. J. Maximizing use of organs recovered from the cadaver donor: cardiac recommendations / G. J. Zaroff, B. R. Rosengard, W. F. Armstronge et al. // J Heart Lung Transplant. – 2002. – Vol.21. – P. 1153-1160.

221. Zhang, Q. The importance of non-HLA antibodies in transplantation / Q. Zhang, E.F. Reed // Nat Rev Nephrol. – 2016. – Vol. 12. – P. 484-95.

222. Zhou, X. Expression of allograft inflammatory fac-tor-1 (AIF-1) in acute cellular rejection of cardiac allografts / Zhou, X., He Z., Henegar J. [et al.] // Cardiovasc. Pathol. -2011.-V. 20.-N5.-P. 177-184.

223. Zhuang, Q. Graft-infiltrating host dendritic cells play a key role in organ transplant rejection / Q. Zhuang, Q. Liu, S.J. Divito, Q. Zeng, K.M. Yatim, A.D. Hughes, D.M. Rojas-Canales // Nat Commun. 2016. – Vol. – 24. – No. 7. – P.12623.

224. Zou, H. HMGB1 is involved in chronic rejection of cardiac allograft via promoting inflammatory-like mDCs / H. Zou, Y. Yang, M. Gao, B. Zhang, B. Ming, Y. Sun [et al.] // American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. – 2014. – Vol. 14. – P. 1765-1777.