

А. А. ВЕРЕВКИН <sup>1</sup>, А. А. СЛАВИНСКИЙ <sup>1</sup>, Е. Д. КОСМАЧЕВА <sup>1,2</sup>, Т. В. СТАВЕНЧУК <sup>2</sup>

## ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ПОВРЕЖДЕНИЯ МИОКАРДА ПРИ ОТТОРЖЕНИИ ТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО СЕРДЦА

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Седина, д. 4, Краснодар, Россия, 350063.

<sup>2</sup> ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края, ул. 1 Мая, д. 167, Краснодар, Россия, 350086.

### АННОТАЦИЯ

**Цель.** Охарактеризовать гистологические признаки повреждения миокарда при отторжении трансплантированного сердца с применением компьютерной морфометрии для повышения качества биопсийной диагностики.

**Материалы и методы.** Для исследования использовали эндомикардиальные биоптаты 31 пациента, перенесшего трансплантацию сердца. Гистологические срезы были окрашены по стандартной методике гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по ван Гизону. Методом компьютерной морфометрии в биоптате оценивали площадь фиброза, некроза, липоматоза и кровоизлияний.

**Результаты.** Все биоптаты разделены по степеням отторжения следующим образом: степень 0R – 16 образцов, 1R – 14 образцов, 2R – 10 образцов, 3R – 4 образца. Выраженность некроза значительно увеличивалась при повышении степени тяжести отторжения, составляя 0% при 0R, 0,03% при 1R, 4,95% при 2R и 17,4% при 3R. Наиболее массивные кровоизлияния выявлены в образцах, отнесенных к 2R – 9,89% от площади биоптата. Липоматоз отмечался на всех степенях отторжения, достигая максимума в 16,5% площади у пациентов с 3R. Площадь фиброза возрастала с повышением степени тяжести отторжения: на нулевой степени ему соответствовало 0,16% биоптата, на первой – 3,8%, на второй – уже 8,69%.

**Заключение.** Описанные морфологические изменения позволяют более детально оценить степень тяжести, а также характер течения реакции отторжения, что позволит улучшить качество диагностики с помощью эндомикардиальной биопсии.

**Ключевые слова:** эндомикардиальная биопсия, отторжение трансплантированного сердца, компьютерная морфометрия

**Для цитирования:** Веревкин А.А., Славинский А.А., Космачева Е.Д., Ставенчук Т.В. Патоморфологические признаки повреждения миокарда при отторжении трансплантированного сердца. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2017; 24(6): 17-21. DOI: 10.25207 / 1608-6228-2017-24-6-17-21

**For citation:** Verevkin A.A., Slavinskiy A.A., Kosmacheva E.D., Stavenchuk T.V. Morphological indicators of myocardial damages in rejection of transplanted heart. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik*. 2017; 24(6): 17-21. (In Russ., English abstract). DOI: 10.25207 / 1608-6228-2017-24-6-17-21

А. А. ВЕРЕВКИН <sup>1</sup>, А. А. СЛАВИНСКИЙ <sup>1</sup>, Е. Д. КОСМАЧЕВА <sup>1,2</sup>, Т. В. СТАВЕНЧУК <sup>2</sup>

### MORPHOLOGICAL INDICATORS OF MYOCARDIAL DAMAGES IN REJECTION OF TRANSPLANTED HEART

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Sedina str., 4, Krasnodar, Russia, 350063.

<sup>2</sup> Scientific Research Institution – S.V. Ochapovsky Regional Clinical Hospital № 1, 1 Maya str., 167, Krasnodar, Russia, 350086.

### ABSTRACT

**Aim.** Characterization of histological indicators of myocardial damage in rejection of transplanted heart using computer morphometry to improve the quality of biopsy diagnostics.

**Materials and methods.** Endomyocardial biopsies of 31 patients after cardiac transplantation were used. Histological sections were stained using the standard procedure with hematoxylin and eosin, and also with picro-fuchsin by van Gieson. The area of the biopsy sample, fibrosis, necrosis, lipomatosis and hemorrhages, as well as the number of cells in the

infiltrate, was assessed using computer morphometry.

**Results.** All biopsies are divided according to the degrees of rejection as follows: degree 0R – 16 samples, 1R – 14 samples, 2R – 10 samples, 3R – 4 samples. The severity of necrosis significantly increased along the increase in rejection severity, reaching 0% at 0R, 0.03% at 1R, 4.95% at 2R and 17.4% at 3R. The most massive hemorrhages were detected in samples attributed to 2R – 9.89% of the biopsy area. Lipomatosis was noted at all levels of rejection, reaching a maximum of 16.5% of the area in patients with 3R. The area of fibrosis increased with an increase in the severity of rejection: at zero degree it was 0.16% of the biopsy, at the first – 3.8%, at the second – 8.69%.

**Conclusion.** The studied morphological indicators make possible a more detailed assessment of the degree, as well as the course of the rejection reaction, which will improve the quality of diagnosis with endomyocardial biopsy.

**Keywords:** endomyocardial biopsy, rejection of transplanted heart, computer morphometry

## Введение

Заболевания сердечно-сосудистой системы выступают основной причиной инвалидизации и смерти в развитых странах [1]. Закономерный исход большой доли таких заболеваний – хроническая сердечная недостаточность. Единственным эффективным способом лечения пациентов с терминальными стадиями сердечной недостаточности в настоящее время служит трансплантация сердца (ТС) [2]. Ежегодно в мире выполняется свыше 5500 подобных операций, причем это количество год от года увеличивается [2, 3]. В Краснодарском крае операции по трансплантации сердца выполняются регулярно начиная с 2010 года.

Качество жизни пациента, перенесшего трансплантацию сердца, во многом зависит от развития различных форм отторжения трансплантированного сердца (ОТС). Своевременная диагностика реакций отторжения позволяет произвести коррекцию иммуносупрессивной терапии, предотвратить кризы отторжения и болезнь коронарных сосудов пересаженного сердца и, таким образом, увеличить продолжительность и качество жизни реципиентов [4].

В настоящее время «золотым стандартом» диагностики ОТС служит проведение эндомикардиальной биопсии (ЭМБ) с трансвенозным доступом в полость правого желудочка и взятием фрагментов ткани из межжелудочковой перегородки [5]. Полученный таким образом материал подлежит последующему гистологическому исследованию. Стратификация реакции отторжения осуществляется согласно рекомендациям Международного сообщества трансплантации сердца и легких (ISHLT, 2010) [6]. Выделяют четыре степени тяжести клеточного отторжения: 1) нулевая степень (0R): отсутствие лимфоцитарной инфильтрации и очагов повреждения кардиомиоцитов, 2) первая степень (1R): интерстициальный и периваскулярный инфильтрат с одним локусом миоцитарного поражения, 3) вторая степень (2R): несколько локусов инфильтрации и повреждения кардиомиоцитов, 4) третья степень (3R): диффузная инфильтрация миокарда лимфоцитами, макрофагами и эозинофилами, выраженный миоцитоллиз. Кроме того, различают антитело-опосредованное отторжение (Antibody-mediated rejection, AMR), для которого характерно наличие В-лимфоцитов, а так-

же компонентов комплемента C3d и C4d по данным иммуногистохимического исследования.

Критерии диагностики строятся в основном на клеточной инфильтрации миокарда, в то время как таким признакам повреждения, как некроз, кровоизлияния, липоматоз и фиброз, при определении стадии отторжения уделяется недостаточно внимания. Тем не менее, указанные патологические процессы могут быть информативны при оценке выраженности воспалительной реакции, а также для дифференцирования клинических типов отторжения. Ещё одним направлением, позволяющим повысить качество эндомикардиальной биопсийной диагностики, может стать применение специального программного обеспечения для цифровой морфометрии фотографий миокарда. Таким образом, целью нашего исследования стал анализ гистологических признаков повреждения миокарда при отторжении трансплантированного сердца с применением компьютерной морфометрии для повышения качества биопсийной диагностики.

## Материалы и методы

Для исследования использовали 44 эндомикардиальных биоптата от 31 пациента (22 мужчины, 9 женщин; средний возраст 46 лет), которые перенесли ТС в Центре грудной хирургии НИИ ККБ №1 им. проф. С.В. Очаповского. 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 EG1150N (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.



**Рис. 1.** Компьютерная обработка изображений с помощью приложения ImageJ. А – исходное изображение. Б – после подавления зеленого цветового канала. В – результат бинаризации изображения после изменения порога чувствительности. Черный цвет соответствует фиброзу.

**Fig. 1.** Image processing using ImageJ software. A – the original image. B – result of Green channel shutdown. C – result of binarization after sensitivity threshold adjusting. Black color stands for fibrosis.

Микроскопию и фотографирование полученных гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Nikon E200 (Япония). Для проведения морфометрического анализа использовали программное обеспечение с открытым исходным кодом ImageJ (US National Institutes of Health, США) и фотографии препаратов с увеличением объектива  $\times 20$  и  $\times 40$  и окуляра  $\times 10$ . Во всех случаях проводили измерение площади биоптата. Для препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, осуществляли измерение площади фиброза, некроза, кровоизлияний и липоматоза. На препаратах, окрашенных по ван Гизону, оценивали площадь фиброза.

В том случае, если окраска препарата не позволяла разложить его на несколько сегментов с узким спектральным диапазоном, определение площади искомых объектов осуществляли вручную. Для этого использовался инструмент “freehand selection”, с помощью которого с большой точностью выделяли область интереса. Затем программа вычисляла суммарную площадь заключенной в выделение области. Для срезов, окрашенных

пикрофуксином, исследование включало несколько этапов. На первом этапе цветное изображение раскладывали на три канала (красный, зеленый и голубой). Затем голубой канал подавляли, после чего изображение переводили в восьмибитный серошкальный формат. На следующем этапе устанавливали пороговую величину интенсивности цвета, при которой прореагировавшая с фуксином область сохранялась бы, а все остальные объекты изображения переставали отображаться. Наконец, программа определяла суммарную площадь окрашенной области (рис. 1). На основании полученных данных вычисляли показатель процента площади (ПП), равный отношению площади патологического изменения к площади биоптата.

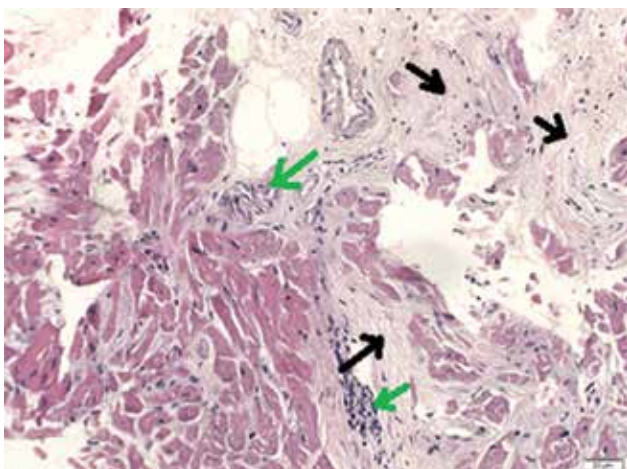
### Результаты и обсуждение

Все биоптаты разделили по тяжести отторжения следующим образом: к нулевой степени (0R) отнесено 16 биоптатов; к первой степени (1R) – 14; в 10 биоптатах выявлена вторая степень (2R); к третьей степени (3R) отнесено 4 биоптата (рис. 2).

Для препаратов, входящих в каждую из вышеперечисленных групп, оценивали выраженность кровоизлияний, некроза, липоматоза и фиброза. Полученные данные о каждом патологическом процессе представлены в таблице.

В препаратах с нулевой степенью отторжения некроз не выявлен. Выраженность некроза в биоптатах с первой степенью отторжения в 165 раз меньше, чем аналогичный показатель для степени отторжения 2R, и в 580 раз – чем при 3R. Площадь кровоизлияний в биоптатах с 1R в 2,3 раза превышает площадь при 1R. В свою очередь, данный показатель для 2R в 5,2 раза выше, чем в 1R. В биоптатах с отторжением третьей степени кровоизлияния отсутствуют. Процент площади фиброза имеет наименьшее значение в биоптатах с нулевой степенью отторжения и составляет 2,36%. Повышение этого показателя в 1,6 раз отмечается в биоптатах с первой степенью отторжения и в 3,7 – с 2R. Для биоптатов с 3R этот показатель составляет 4,5% (рис. 3).

Наибольшее значение процента площади липоматоза выявлено при третьей степени отторже-

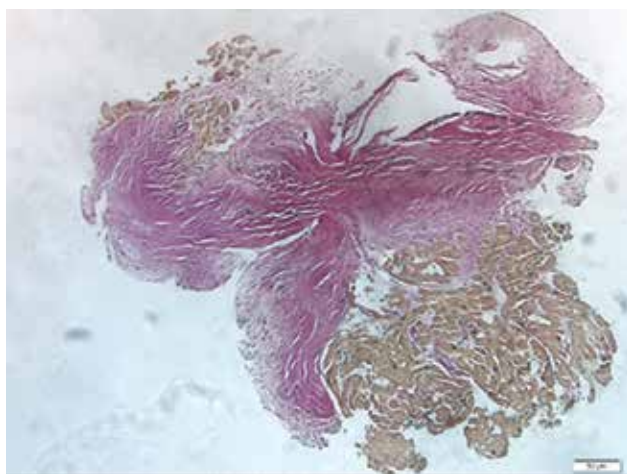


**Рис. 2.** Отторжение трансплантата 2R. Зелеными стрелками отмечен лимфоцитарно-макрофагальный инфильтрат, черными – кардиосклероз. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение: ок.  $\times 10$ , об.  $\times 20$ .

**Fig. 2.** Transplant rejection 2R. Green arrows stand for lymphomacrophagal infiltration, black ones for cardiosclerosis. HE staining. Magnification: oc.  $\times 10$ , obj. lens  $\times 20$ .

**Процент площади патологических изменений  
в миокарде по данным компьютерной морфометрии**  
Square percentage of myocardial pathologic alterations according  
to computer morphometry

Степень тяжести отторжения	Площадь (M±m),%			
	Некроз	Кровоизлияние	Фиброз	Липоматоз
0R (n=16)	0	0,83±0,11	2,36±0,24	0,16±0,05
1R (n=14)	0,03±0,01	1,91±0,20	3,80±0,37	5,88±0,30
2R (n=10)	4,95±0,56	9,89±0,61	8,69±0,77	14,70±0,90
3R (n=4)	17,40±0,70	0	4,50±0,17	16,50±2,23



**Рис. 3.** Отторжение трансплантата 3R. Окрашенные фуксином розовые участки соответствуют кардиосклерозу. Окраска по ван Гизону. Увеличение: ок. x10, об. x20.

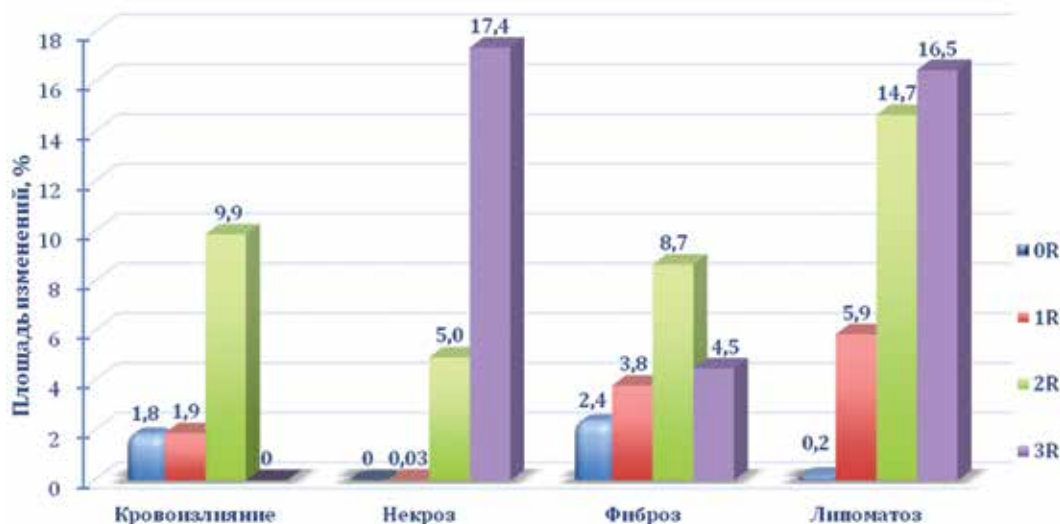
**Fig. 3.** Transplant rejection 3R. Fuchsin-stained pink areas stand for cardiosclerosis. Van Gieson staining. Magnification: oc. x10, obj. lens x20.

ния, для второй степени этот показатель меньше на 10%. Затем выраженность липоматоза снижается в 2,6 раз для пациентов с первой степенью

отторжения и в 92 раза для 0R. На рисунке 4 представлены сводные данные о патологических изменениях в миокарде.

Кровоизлияния свидетельствуют об остром повреждении стенок кровеносных сосудов. В биоптатах с нулевой степенью отторжения наличие незначительных кровоизлияний (менее 1% площади) связано, по-видимому, с повреждением миокарда в ходе проведения эндомикардиальной биопсии [7]. Значительная их площадь свидетельствует о выраженной острой воспалительной реакции. Отсутствие кровоизлияний у пациентов с 3R говорит о наличии хронического отторжения. В данном случае имеет место развитие периваскулярного фиброза, препятствующего выходу эритроцитов в окружающие сосуд ткани.

Некроз, также сопровождающий острую воспалительную реакцию, усиливается при выраженном её течении. Аналогичные результаты получены Frangogiannis N.G. [8]. При этом на развитие некроза в меньшей степени влияет состояние капилляров, чем и объясняется его наличие при отторжении 3R. Липоматоз служит выражением хронической гипоксии, которая при-



**Рис. 4.** Гистологические изменения в миокарде в зависимости от степени тяжести отторжения.

**Fig. 4.** Histological alterations in myocardium in relation to rejection severity.

водит к нарушению метаболизма нейтральных жиров. Сопоставляя данные о его выраженности с другими исследуемыми признаками, такими как фиброз, можно сделать вывод о длительности течения ОТС [9]. Поскольку фиброз выступает проявлением репаративного процесса в исходе воспаления, его развитие будет тем сильнее, чем интенсивнее протекало воспаление. Ввиду необратимости фиброза, процент его площади также нарастает с каждым последующим кризом отторжения. Таким образом, интенсивность фиброза также будет зависеть от количества времени после трансплантации [10]. Кроме того, в литературе имеются данные о том, что источником соединительной ткани в случае отторжения служат клетки экстракардиального происхождения, привлекаемые в очаг воспаления макрофагами [11].

### Заключение

Таким образом, описанные гистологические признаки повреждения миокарда позволяют детально оценить степень тяжести отторжения, а также характер клинического течения воспалительной реакции в миокарде, что позволит улучшить качество патоморфологической диагностики реакции отторжения трансплантированного сердца.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Барбухатти А.О., Космачева Е.Д., Кижватова Н.В. и др. Первый опыт трансплантации сердца в Краснодарском крае. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2014; 14(3): 42-47. [Barbukhatti K.O., Kosmacheva E.D., Kizhvatoва N.V., Gordeeva E.V., Aleksandrova E.D., Kruberg L.K., Pozdnyakova O.A., Raff C.A., Yakuba I.I., Porkhanov V.A. First experience with heart transplantation in Krasnodar region. *Russian journal of transplantology and artificial organs*. 2014; 14(3): 42-47. In Russ., English abstract].
2. Ситникова М.Ю., Лясникова Е.А., Трукшина М.А. Хроническая сердечная недостаточность: эпидемиология и перспективы планирования. *Сердечная недостаточность*. 2012; 13(6): 372-376. [Sitnikova M.Yu., Lyasnikova E.A., Trukshina M.A. Khronicheskaya serdechnaya nedostatochnost': epidemiologiya i perspektivy planirovaniya. *Serdechnaya nedostatochnost'*. 2012; 13(6): 372-376. In Russ.].
3. Фролова Э.Б., Яушев М.Ф. Современное представление о хронической сердечной недостаточности. *Вестник современной клинической медицины*. 2013; 6(2): 87-92. [Frolova E.B., Yaushev M.F. Current understanding of chronic heart failure. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2013; 6(2): 87-92. In

Russ., English abstract].

4. Urbanowicz T., Baszyńska-Wachowiak H., Ligowski M., Straburzyńska-Migaj E., Misterski M., Jemielity M. Comparison of conventional tacrolimus versus prolong release formula as initial therapy in heart transplantation. *Ann Transplant*. 2014; 19: 295-99. DOI: <http://dx.doi.org/10.20883/jms.2016.125>
5. Васичкина Е.С., Митрофанова Л.Б., Татарский Р.Б., Лебедев Д.С. Эндомиокардиальная биопсия у взрослых и детей. *Вестник аритмологии*. 2014; 76: 37-40. [Vasichkina E.S., Mitrofanova L.B., Tatarsky R.B., Lebedev D.S. Endocardial biopsy in adults and pediatric patients. *Journal of arrhythmology*. 2014; 76: 37-40. In Russ., English abstract].
6. Berry G.J., Angelini A., Burke M.M., Bruneval P., Fishbein M.C., Hammond E., Miller D., Neil D., Revelo M.P., Rodriguez E.R., Stewart S., Tan C.D., Winters G.L., Kobashigawa J., Mehra M.R. The ISHLT working formulation for pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation: evolution and current status (2005-2011). *J Heart Lung Transplant*. 2011; 30: 601-611. doi/10.1016/j.healun.2011.02.015.
7. Holzmann M, Nicko A, Kuhl U, Noutsias M, Poller W, Hoffmann W, Morguet A, Witzenbichler B, Tschöpe C, Schulteiss HP, Pauschinger M.. Complication rate of right ventricular endomyocardial biopsy via the femoral approach. *Circulation*. 2008; 118: 1722-1728. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.743427.
8. Frangogiannis N.G. Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr Opin Cardiol*. 2015; 30(3): 240-245. doi: 10.1097/HCO.000000000000158.
9. Bonacina E., Recalcati F., Mangiavacchi M., Gronda E. Interstitial myocardial lipomatosis: a morphological study on endomyocardial biopsies and diseased hearts surgically removed for heart transplantation. *Eur Heart J*. 1989; 10: 100-102.
10. Ставенчук Т.В., Космачева Е.Д., Славинский А.А. и др. Роль методики speckle-tracking echocardiography на стадии субклинического отторжения сердечного трансплантата. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2015; 17(4): 24-32. DOI: 10.15825/1995-1191-2015-4-24-32. [Stavenchuk T.V., Kosmacheva E.D., Slavinsky A.A., Chuprinenko L.M., Shelestova I.A., Barbukhatti K.O., Porkhanov V.A. The role of Speckle-tracking echocardiography technique at the stage of subclinical heart transplant rejection. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2015; 17(4): 24-32. (In Russ.) DOI: 10.15825/1995-1191-2015-4-24-32].
11. Pichler M, Rainer P, Schauer S et al. Cardiac fibrosis in human transplanted hearts is mainly driven by cells of intracardiac origin. *J Am Coll Cardiol*. 2012; 59(11): 1008-1016. doi:10.1016/j.jacc.2011.11.036.

Поступила / Received 26.10.2017

Принята в печать / Accepted 28.11.2017

*Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflict of interest*

**Контактная информация:** Веревкин Александр Александрович; +7 (964) 934-30-06; e-mail: vilehand@bk.ru.  
Россия, 350012, г. Краснодар, ул. Академика Лукьяненко, д. 36, кв. 34.

**Corresponding author:** Aleksandr A. Verevkin; tel.: +7 (964) 934-30-06; e-mail: vilehand@bk.ru;  
36, Akademika Lukyanenko str., 34, Krasnodar, Russia, 350012.