

ПРОБЛЕМА ОТТОРЖЕНИЯ СЕРДЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА И ПУТИ ОПТИМИЗАЦИИ ОЦЕНКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭНДОМИОКАРДИАЛЬНОЙ БИОПСИИ

Ставенчук Т.В.^{1,2}, Космачева Е.Д.^{1,2}, Шелестова И.А.^{1,2}, Славинский А.А.¹, Терман Е.А.²,
Веревкин А.А.¹, Медведева Л.А.², Барбухатти К.О.¹, Татаринцева З.Г.², Порханов В.А.¹

¹Кубанский Государственный Медицинский Университет Минздрава России

²ГБУЗ «НИИ-ККБ №1 им. профессора С.В. Очаповского»

Представлена тактика ведения реципиента при подозрении на криз отторжения сердечного трансплантата. Выявлены новые расчетные показатели оценки биоптата с помощью компьютерного морфометрического анализа, улучшающие и конкретизирующие результаты биопсии. Количественные параметры CD3+ (Т-лимфоцитов) и CD 68+ (макрофагов) позволяют определить степень отторжения трансплантата в соответствии с критериями диагноза Международного общества трансплантации сердца и легких, ISHLT (чувствительность 91%; специфичность 91%).

Ключевые слова: компьютерный морфометрический анализ, эндомиокардиальная биопсия, отторжение сердечного трансплантата.

THE PROBLEM OF HEART TRANSPLANT REJECTION AND WAYS OF OPTIMIZING THE ASSESSMENT OF ENDOMYOCARDIAL BIOPSY RESULTS

Stavenchuk T.V., Kosmachova E.D., Shelestova I.A., Slavinsky A.A., Terman E.A.,
Verevkin A.A., Medvedeva L.A., Barbhatty K.O., Tatarintseva Z.G., Porchanov V.A.

The following article describes tactics of recipient management when a rejection episode of a heart transplant is being suspected. We have discovered some new figures to assess biopsy samples through computerised morphometric study, which can both improve and clarify biopsy results. CD3+ (T-cells) and CD 68+ (macrophages) figures make it possible to determine the extent of transplant rejection in accordance with the International Society for Heart and Lung Transplantation diagnostic criteria (sensitivity 91%, specificity 91%).

Key words: computerised morphometric study, endomyocardial biopsy, heart transplant rejection.

Введение

Одной из ведущих причин смерти в течение первых трех лет после трансплантации является отторжение сердечного трансплантата [1, 2]. Острое клеточное отторжение в течение первого года жизни реципиентов встречается в 20-40% случаев, гуморальное – в 10% случаев [1, 2]. Острое клеточное отторжение развивается, как правило, в период от 1 недели до 6 месяцев, острое гуморальное – от нескольких дней до 4-х недель после трансплантации сердца в организме сенсibilизированного реципиента [1, 2].

Хроническое отторжение наблюдается от 6 месяцев и более. Большинство пациентов при отторжении не имеет клинических проявлений, что требует регулярного проведения эндомиокардиальной биопсии (ЭМБ) [1, 2].

Проведение ЭМБ с последующей гистологической и иммуногистохимической оценкой материала считается основным стандартизированным методом выявления и оценки степени тяжести отторжения [1, 2]. Несмотря на то, что ЭМБ представляет собой единственный стандартизированный метод диагностики отторже-

ния, в ряде случаев она может привести к противоречивой субъективной оценке степени отторжения и интерпретации образцов биопсии между патологами [1, 2].

Материалы и методы

В ГБУЗ «НИИ-ККБ №1 им. проф. С.В. Очаповского» проводилась научно-исследовательская работа, целью которой был иммуногистохимический подсчет одноядерных воспалительных клеток в 309 биоптатах с последующим сопоставлением с каждой степенью отторжения. Все биоптаты были разделены на 4 группы: **группа № 1 (n = 150)** – образцы, в которых не наблюдалось признаков клеточного и гуморального отторжения (ACR 0, AMR 0); **группа № 2 (n = 90)** – биоптаты с клеточным отторжением 1 степени (ACR 1); **группа № 3 (n = 45)** – образцы, соответствующие клеточному отторжению 2 степени (ACR2), **группа № 4 (n = 24)** – биоптаты с гуморальным отторжением (AMR 1).

С помощью компьютерного морфометрического анализа оценивали площадь биоптата, площадь инфильтрата, затем процентное содержание CD3+ (Т-лимфоцитов), CD20+ (В-лимфоцитов), CD68+ (макрофагов), C4d (компонента комплемента), C3d (компонента комплемента).

Результаты и их обсуждение

Существует ряд проблем при интерпретации результатов эндомикардиальной биопсии. Так, с гистологической точки зрения, результаты биопсии, расцениваемые в соответствии с классификацией клеточного отторжения как ACR 0 (без признаков клеточного отторжения) могут быть противоречивыми, так как те же данные, полученные из более глубокого слоя миокарда, будут расценены как ACR 1 (клеточное отторжение 1 степени) или даже ACR 2 (клеточное отторжение 2 степени), в зависимости от количества и площади охвата инфильтрата и миоцитарных повреждений. В другом случае – небольшая область с менее компактно-распространенным клеточным инфильтратом между миоцитами может быть определена как *диффузный процесс* одними патологами, а другими – как *фокусный очаг*, если основываться на утверждениях, что эта область представляет собой только малую часть одного из четырех фрагментов биопсии. Более того, присутствие внутритканевого инфильтрата с сопровождающимся фиброзом или старым миоцитарным повреждением может быть достоверно сложно или не-

возможно классифицировать – это могут быть последствия предыдущей биопсии, либо предыдущие ишемические повреждения с реактивным воспаленным инфильтратом, или частично вылеченный очаг клеточного отторжения с соответствующей структурой [4].

Проведение процедуры биопсии может быть сопряжено с артефактами, что также отразится на постановке диагноза в преувеличении или недооценке степени отторжения. Первая категория артефактов может быть связана с техникой биопсии. Вторая категория артефактов относится к предтрансплантационному периоду, что является следствием периода ишемии между извлечением сердца из организма донора и трансплантацией реципиенту. Третья категория артефактов является следствием предыдущих биопсий [5]. Причина сложности диагностики гуморального отторжения заключается в том, что гистологические признаки этого серьезного осложнения обычно очень «неуловимы» или даже почти полностью отсутствуют [6].

В 10-20% случаев биопсия показывает воспалительные инфильтраты из мононуклеаров в эндокарде. Многие патоморфологи расценивают проявление эффекта Quilty с развитием клеточного отторжения [7].

Все изложенное требует поиска объективной оценки результатов ЭМБ.

Результаты проведенного нами количественного анализа показали, что с увеличением степени клеточного отторжения отмечается нарастание степени выраженности клеточного инфильтрата, т.е. возрастает процентное содержание Т- и В- лимфоцитов, макрофагов, компонентов комплемента C3d и C4d. В воспалительных инфильтратах при клеточном отторжении преобладают преимущественно CD3+ (Т-лимфоциты) и CD68+ (макрофаги), в меньшей степени -CD20+ (В-лимфоциты). При гуморальном отторжении также преобладают в клеточном инфильтрате преимущественно CD3+ (Т-лимфоциты) и CD68+ (макрофаги). Процент содержания клеток в воспалительном инфильтрате при гуморальном отторжении выше, чем при клеточном отторжении.

Результаты дискриминантного анализа показали, что наилучшая разделительная способность при отторжении с целью дифференцировки групп принадлежит CD3+ (Т-лимфоцитам) и CD68+ (макрофагам). Чем ближе значения показателей CD3+ (Т-лимфоцитов) и CD68+(макрофагов) исследуемого реципиента

к одному из пороговых уровней, тем с большей вероятностью этого реципиента можно отнести к соответствующей группе отторжения. Для группы ACR0 пороговые значения составили: CD3+ (Т-лимфоцитов)-(0,98%), CD68+ (макрофагов) - (0,34%); для группы ACR1: CD3+(Т-лимфоциты) -(2,03%), CD68+ (макрофаги) -0,90%; для группы ACR2: CD3+(Т-лимфоциты) -(3,4%), CD68+(макрофаги)-(1,35%); для группы AMR1: CD3-(4,75%), CD68 (1,4%). Иммуногистохимический подсчет клеток CD68+ (макрофаги) и CD3+ (Т-лимфоциты) показал высокую чувствительность (91%) и специфичность (91%) в прогнозировании степени отторжения. ROC-анализ CD3+ (Т-лимфоцитов) в диагностике отторжения показал: вероятность болезни при положительном диагнозе – 90,5%, вероятность болезни при отрицательном диагнозе – 8%, AUC 90% (отличный классификатор), относительные риски 11,3 (рис. 1). ROC -анализ CD68 + (макрофагов) в диагностике отторжения показал: вероятность болезни при положительном диагнозе – 90,5%, вероятность болезни при отрицательном диагнозе – 8%, AUC 90 % (отличный классификатор), относительные риски 11,3 (рис. 2).

Мы представляем применение расчетных показателей в клинической практике.

Пациент, П., 19 лет. С 2012 г. установлен диагноз дилатационной кардиомиопатии, в апреле того же года в связи с ХСН IV ФК по NYHA выполнена операция трансплантации сердца. Ранний послеоперационный период протекал без осложнений. На протяжении последующих 5 лет реципиент планово госпитализировался в кардиологическое отделение в соответствии с графиком выполнения ЭМБ и коронароангиографии. В течение этого периода эпизоды отторжения не наблюдались, состояние коронарного русла удовлетворительное; результаты эхокардиографии (ЭХО-кг) с оценкой глобальной сократимости, параметры импульсно-волновой (PW) и тканевой доплерографии (PW-TDI) значимо не выходили за рамки нормативных значений. После оперативного вмешательства до настоящего времени реципиент находился на базовой иммуносупрессивной трехкомпонентной терапии: глюкокортикостероиды, ингибиторы кальциневрина, цитостатитки. Дополнительно принимал липидснижающие препараты, ингибиторы протонной помпы. К апрелю 2017 г. объективный статус пациента соответствовал I ФК по NYHA. В июне 2017 г. стал отмечать ухудше-

ние, присоединились жалобы на одышку, снижение толерантности к физической нагрузке, в связи с чем обратился к кардиологу поликлиники ГБУЗ «НИИ-ККБ №1 им. С.В. Очаповского». На амбулаторном приеме выполнены: ЭКГ, ЭХО-кг, ОАК, биохимия крови, оценка уровня тахролимуса. Результаты ЭХО-кг в сравнении с предыдущими выявили снижение фракции выброса (ФВ) с 60% до 40%, нарастание недостаточности митрального клапана, присоединение легочной гипертензии, выпот в полости перикарда, плевральных синусах, умеренную дилатацию предсердий и правого желудочка. Отрицательная динамика по данным ЭХО-кг, ухудшение состояния указывали на отторжение трансплантата, что потребовало экстренной госпитализации для выполнения ЭМБ и уточнения диагноза. На госпитальном этапе выполнялся спектр основных и дополнительных диагностических исследований в соответствии с рекомендациями ISHLT при подозрении на клеточное и гуморальное отторжение: ЭМБ с исследованием срезов с помощью световой микроскопии и иммуногистохимического исследования, оценка антител к комплексу HLA, ОАК, ОАМ, биохимии крови, контроль ЭХО-кг [3]. Результаты ЭМБ с помощью световой микроскопии выявили острое клеточное отторжение ACR 1 степени и отсутствие признаков гуморального отторжения в соответствии с критериями ISHLT диагноза клеточного отторжения от 2004 г. и гуморального отторжения от 2004 г., пересмотра критериев от 2013 г. Выполнялась дополнительно методика speckle-tracking echocardiography при подозрении на криз отторжения с целью получения более полной информации о миокардиальной функции желудочков. В дальнейшем биоптат подвергся иммуногистохимическому исследованию – признаков гуморального отторжения выявлено не было. Не были выявлены также антитела I и II класса к комплексу HLA. Несмотря на отрицательные результаты от выполненных ранее диагностических процедур, мы провели количественную оценку клеточного инфильтрата биоптата от 12.07.2017 с помощью компьютерного морфометрического анализа. Количественный подсчет клеток выявил: CD 3+ (Т-лимфоциты) -3,1%, CD 20+(В-лимфоциты) -6,5 %, C3d -2,23%, C4d -2,17%, CD 68+(макрофаги) -1,3%. Сопоставляя эти данные с результатами нашей научно-исследовательской работы, а также критериями диагноза отторжения ISHLT, количественные параметры соответ-

Таблица 1

Результаты динамического наблюдения параметров трансторакальной, импульсно-волновой и тканевой доплерографии у реципиента с подозрением на криз отторжения

Параметры	12.07.2017	18.07.2017	21.07.2017	03.08.2017
КДР ЛЖ, мм	50	50	49	48
КДО ЛЖ, мл	115	115	102	115
КСО ЛЖ, мл	67	63	46,7	53
ФВ, %	40-42	45-46	50-52	52-53
ПЖ, мм	34	34	33	30
СДЛА, мм рт.ст.	45	45	40	35
Е, см/сек	127	120	120	118
А, см/сек	67,5	60	58	59
Е/А	1,9	2,0	2,0	2,0
S лж, см/сек	7,8	7,9	8,7	9,0
S пж, сек	11,3	11,3	11,5	12,0
Е/Em лж	6,3	6,0	6,0	5,8
GLSLV, %	-7,0	-9,2	-11,0	-14,0
RadSLV, %	15,0	23,49	25,00	25,00
CirSLV, %	-17,00	-19,00	-19,88	-23,00
Rot base, °	-1,7	-4,3	-5,5	-10,0
Rot apex, °	1,0	4,4	5,7	7,2
Twist, °	2,17	7,66	10,67	17,00

Примечание: КДР ЛЖ – конечный диастолический размер левого желудочка, КДО ДЖ – конечный диастолический объем левого желудочка, КСО ЛЖ – конечный систолический объем левого желудочка, ФВ – фракция выброса, ПЖ – полость правого желудочка, СДЛА – систолическое давление в легочной артерии, Е – пик раннего диастолического наполнения, А – пик позднего диастолического наполнения, Е/А – соотношение пиков раннего и позднего наполнения, S – систолический пик левого и правого желудочков, Е/Em – соотношение пиков раннего диастолического наполнения к раннедиастолическому смещению тканей митрального кольца, GLSLV – пиковый продольный систолический стрейн левого желудочка, RadSLV – радиарный систолический стрейн левого желудочка, CirSLV – циркулярный систолический стрейн левого желудочка, Rot base – ротация базальных сегментов, Rot apex – ротация верхушечных сегментов, Twist – скручивание левого желудочка.

ствуют гуморальному отторжению.

Несмотря на продолжающийся диагностический поиск, пульс-терапия глюкокортикостероидами 1000 мг внутривенно №3 была начата сразу же после получения результатов ЭМБ с помощью световой микроскопии с последующим переводом на пероральный прием и постепенным снижением дозы. В течение 6 дней на фоне проводимой терапии отмечалась положительная клиническая динамика, а также увеличение ФВ с 40% до 45-46%, по данным speckle-tracking echocardiography – улучшение функции циркулярных, радиарных волокон, механики сердца, но сохранялась сниженной продольная функция миокарда (таблица 1). К 9 дню терапии ФВ увеличилась до 50-52%, но сохранялась сниженной функция продольных волокон, функция циркулярных, радиарных волокон и механика сердца были восстановлены (таблица 1). На 21-й день терапии ФВ увеличилась до 52-53%, повысилась толерантность к физической нагрузке, но сохранялась сниженной функция

продольных волокон, недостаточность митрального клапана, умеренная легочная гипертензия. Продолжен пероральный прием глюкокортикостероидов (метипред 4 мг 7 таблеток) с последующим уменьшением дозы, ингибиторы кальциневрина (такролимус 1,5 мг x 2 раза в день), цитостатики (микофеноловая кислота, микрофенолат мофетил 1000 мг x 2 раза в день). Решение об уменьшении дозы глюкокортикостероидов принимается в соответствии с результатами ЭХО-кг и методики speckle-tracking echocardiography. ЭМБ планируется в динамике через 3 недели.

Анализ клинического наблюдения

Как известно из источников мировой литературы, между морфологическими изменениями при остром, клеточном и гуморальном отторжении и параметрами ЭХО-кг, методики speckle-tracking echocardiography существует взаимосвязь [8-10]. Изменения, выявленные при ЭХО-кг у реципиента, указывали на криз гуморального отторжения: снижение ФВ левого желудочка, дилатация и снижение фрак-

ции правого желудочка, недостаточность митрального клапана; умеренная легочная гипертензия. Результаты методики speckle-tracking echocardiography выявили выраженное нарушение функции продольных волокон, а также циркулярных, радиарных волокон левого желудочка, продольных волокон правого желудочка, механики сердца. Такие изменения миокардиальной функции также больше указывают на гуморальное отторжение.

Наличие клинических проявлений у нашего реципиента, результаты ЭХО-кг, speckle-tracking echocardiography не исключали либо острого клеточного отторжения более высоких градаций, более 1 степени, либо наличие смешанного отторжения или присутствие гуморального отторжения AMR 1-2 степени, что способствовало продолжению диагностического поиска. Компьютерный морфометрический анализ выявил признаки гуморального отторжения.

Литература:

1. Пациент с трансплантированным сердцем: руководство для врачей по ведению пациентов, перенесших трансплантацию сердца / С. В. Готье, А. О. Шевченко, В. Н. Попцов. М. - Тверь: Триада, 2014: 144с.
2. Шумаков В.И. Трансплантология. 2-е издание: учебное пособие. Манн, Иванов и Фербер, 2006. 544с.
3. Costanzo M.R. [et al.] The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients J. Heart Lung Transplant. 2010. Vol. 29, N 8. P. 914-956.
4. Bocchi E.A. [et al.] Immunohistochemical Quantification of inflammatory Cells in Endomyocardial Biopsy fragments after heart transplantation: a new potential method to improve the diagnosis of rejection after heart transplantation. Transplant. Proc. 2014. Vol. 46, N 5. P. 1489-1496.
5. Nair V., Butany J. Heart transplant biopsies: interpretation and significance. J Clin Pathol. 2010. Vol.

Выводы

Отрицательные результаты, полученные при эндомикардиальной биопсии, не исключают криза отторжения.

Своевременная коррекция иммуносупрессивной терапии способствует быстрому купированию криза отторжения и улучшению отдаленных результатов.

Реципиенты нуждаются в регулярном мониторинге оценки жизнеспособности сердечного трансплантата с помощью неинвазивных методов исследования в центрах трансплантологии (ЭХО-кг, speckle-tracking echocardiography).

При несоответствии между клиническими проявлениями, результатами дополнительных исследований и эндомикардиальной биопсии можно рекомендовать количественную оценку клеточного инфильтрата биоптатов.

Подход к каждому из реципиентов должен быть индивидуальным и мультидисциплинарным.

63, N 1. P. 12–20.

6. Куприянова А.Г. [и др.] Ускоренное гуморальное отторжение аллотрансплантата сердца. Вестн. трансплантол и искусств органов. 2011. Т. 13, № 2. С. 70–77.

7. Ильинский, И. М. [и др.] Гистологическая характеристика эффекта QUILTУ Вестн. трансплантол и искусств органов. 2015. Т. 17, № 3. С. 14–23.

8. Шиллер Н.Б. Эхокардиография пересаженного сердца / Н. Б. Шиллер, Ю. С. Соболев, Р. Я. Абдуллаев // Междунар. мед. журн. 2006. Т. 12, № 4. С. 103–108.

9. Clemmensen T.S. [et. al.] Changes in longitudinal myocardial deformation during acute cardiac rejection: the clinical role of two-dimensional speckle-tracking echocardiography J Am Soc Echocardiogr. 2015. Vol. 28, N 3. P. 330-339.

10. Ciliberto, G. R. [et al.] Acute rejection after heart transplantation: noninvasive echocardiographic evaluation. J Am Coll Cardiol. 1994. Vol. 23 №5. P. 1156–1161.

Информация об авторах:

Ставенчук Татьяна Владимировна – врач ультразвуковой диагностики «НИИ-ККБ№1 им. С.В. Очаповского»№, ассистент кафедры кардиохирургии и кардиологии ФПК и ППС ВО ГБОУ КубГМУ Минздрава России, тел. 89182382695, e-mail: brilliant595@yandex.ru

Космачева Елена Дмитриевна – доктор мед. наук, профессор, заместитель главного врача по лечебной части «НИИ-ККБ№1 им. С.В. Очаповского», заведующая кафедрой терапии №1 ФПК и ППС ВО ГБОУ КубГМУ Минздрава России, тел. 89183644729, e-mail:kosmachova_h@mail.ru

Шелестова Инга Александровна – заместитель главного врача по поликлинической работе «НИИ-ККБ№1 им. С.В. Очаповского», доцент кафедры кардиохирургии и кардиологии ФПК и ППС ВО ГБОУ КубГМУ Минздрава России, тел. 89184870005, e-mail:inshel@mail.ru

*Славинский Александр Александрович – заведующий кафедрой патологической анатомии
ВО ГБОУ КубГМУ Минздрава России, профессор, доктор биологических наук,
тел.89181557731, e-mail:al-slavinsky@mail.ru*

*Веревкин Александр Александрович – ассистент кафедры патологической анатомии
ВО ГБОУ КУБГМУ Минздрава России,
тел. 89649343006, e-mail:vilehand111@gmail.com*

*Терман Евгений Александрович – врач-патологоанатом «НИИ-ККБ№1 им. С.В. Очаповского»,
тел.89183216692№*

*Медведева Лариса Афанасьевна – врач-патологоанатом, «НИИ-ККБ№1 им. С.В. Очаповского»,
тел. 89180251981№*

*Барбухатти Кирилл Олегович – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой кардиологии и кардиохирургии
ФПК и ППС ВО ГБОУ КубГМУ Минздрава России, главный кардиохирург Краснодарского края,
тел. 79882404500, e-mail: e-mail: barbuhatty_k@mail.ru№r 1*

*Татаринцева Зоя Геннадьевна – заведующая кардиологическим отделением №4,
«НИИ-ККБ№1 им. С.В. Очаповского»
тел.: 89034525838*

*Порханов Владимир Алексеевич – главный торакальный хирург Краснодарского края,
заведующий кафедрой онкологии с курсом торакальной хирургии ГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России,
член европейских научных обществ, доктор мед. наук, чл.-корр. РАН,
e-mail: kkb1@mail.ru*

*ГБОУ Кубанский ГМУ Минздрава России
Россия, Южный федеральный округ, Краснодарский край, г. Краснодар, Центральный микрорайон, ул. Митрофана Седина, 4*

*НИИ-Краевая клиническая больница №1 им. профессора С. В. Очаповского
Россия, Южный федеральный округ, Краснодарский край, г. Краснодар, ул. 1 Мая, 167*