

## НАРУШЕНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ КАРДИОМИОЦИТОВ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА СЕРДЦА КАК ПРИЗНАК ХРОНИЧЕСКОГО ОТТОРЖЕНИЯ

*Куприянова А.Г., Белецкая Л.В., Ильинский И.М., Зайденов В.А., Можейко Н.П.,  
Саитгареев Р.Ш., Кормер А.Я., Гольц А.М., Захаревич В.М., Готье С.В.*

ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова»  
Минздрава России, ГБОУ ВПО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова», кафедра трансплантологии  
и искусственных органов, г. Москва

Хроническое отторжение, и прежде всего болезнь коронарных артерий, является основным лимитирующим фактором длительной функции аллотрансплантата сердца. Данный процесс затрагивает не только сосуды, изменениям также подвержены и кардиомиоциты. Однако сообщений, касающихся оценки состояния их макромолекулярной структуры, крайне мало. Целью нашей работы явилось исследование состояния структурных белков кардиомиоцитов (актин, миозин, тропонин I, титин, десмин, винкулин) аллотрансплантата сердца в разные периоды после операции (от 6 дней до 15 лет). Основные изменения макромолекулярной структуры выявлены в подгруппе позднего периода (6 мес.–15 лет). Продемонстрирован вклад гуморального звена иммунного ответа в процесс хронического отторжения аллотрансплантата сердца: у восьми из двенадцати реципиентов данной подгруппы неоднократно регистрировали эпизоды острого антителоопосредованного отторжения; нарушения экспрессии пяти белков из шести охарактеризованных были обнаружены у реципиентов с возвратным и персистирующим антителоопосредованным отторжением.

*Ключевые слова:* структурные белки, кардиомиоциты, гуморальное (антителоопосредованное) отторжение, хроническое отторжение.

## DISTURBANCE OF THE CARDIOMYOCYTE'S MACROMOLECULAR STRUCTURE IN HEART ALLOGRAFTS AS A SIGN OF CHRONIC REJECTION

*Kupriyanova A.G., Beletskaya L.V., Ilyinsky I.M., Zaidenov V.A., Mozeiko N.P.,  
Saitgareev R.S., Kormer A.Y., Golts A.M., Zakharevich V.M., Gautier S.V.*

Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs,  
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Department of transplantology and artificial organs

Chronic rejection, especially cardiac allograft vasculopathy, is a major limiting factor for long-term transplant survival. This process affects not only the blood vessels, but also cardiomyocytes. However, there are extremely few reports on the evaluation of their macromolecular structure state. The aim of the study was to evaluate the structural proteins of cardiomyocytes (actin, myosin, troponin I, titin, desmin, vinculin) of heart allografts in different periods after the operation (from 6 days to 15 years). Major changes of macromolecular structure were revealed in late period after transplantation (6 months – 15 years). The contribution of humoral immune response in the process of chronic cardiac allograft rejection was observed: in eight of twelve recipients episodes of acute humoral rejection had been repeatedly registered; disorders of the expression of 5 proteins out of 6 characterized were found in recipients with recurrent and persistent antibody-mediated rejection.

*Key words:* structural proteins, cardiomyocytes, humoral (antibody-mediated) rejection; chronic rejection.

*Статья поступила в редакцию 13.09.12 г.*

*Контакты:* Куприянова Анна Геннадьевна, к. м. н., заведующая лабораторией иммуногистохимии  
Тел. 8 (916) 353-76-06, e-mail: annak2003@bk.ru

С момента пересадки аллотрансплантат сердца подвергается целому ряду негативных воздействий, способных привести к утрате функции и потере органа. В период первого посттрансплантационного года, и особенно первого месяца, серьезным осложнением, порой угрожающим жизни реципиента, является острое отторжение. В последние годы научный поиск исследователей направлен на изучение гуморального (антителоопосредованного) отторжения, поскольку проблема диагностики и лечения клеточной формы в настоящее время не вызывает затруднений. В частности, Международным обществом по трансплантации сердца и легкого (ISHLT) наряду с пересмотром диагностических критериев острого гуморального отторжения от 2005 г. было признано существование асимптоматической формы этого типа отторжения [13]. Патологическая роль данной формы и возможное влияние на функцию трансплантата в настоящее время всесторонне изучается.

В более позднем посттрансплантационном периоде к основным лимитирующим факторам функции аллотрансплантата сердца относится хроническое отторжение, ведущим проявлением которого является болезнь коронарных артерий трансплантата. Связь развития васкулопатии аллотрансплантата сердца с эпизодами острого гуморального отторжения была продемонстрирована рядом авторов [11, 18, 19]. Характерно, что внимание клиницистов и патологов, как при остром, так и при хроническом отторжении, в основном сосредоточено на сосудистых изменениях, касающихся дистального и проксимального русла, либо некротических повреждениях кардиомиоцитов, заканчивающихся формированием интерстициального склероза [4, 10, 15, 17, 18]. Сообщений, касающихся состояния макромолекулярной структуры кардиомиоцитов аллотрансплантата сердца, в настоящее время крайне мало. Однако логично предположить, что при перманентной ишемии, развивающейся в результате повторных эпизодов острого отторжения того или иного типа, повреждающих капиллярную сеть миокарда, либо при развитии стенозов коронарных артерий, может происходить компенсаторное перераспределение структурных белков кардиомиоцитов, направленное на сохранение функции органа. При изучении состояния макромолекулярных белков миокарда больных в терминальной стадии хронической сердечной недостаточности рядом исследователей было сделано предположение, что наряду с генетически обусловленными нарушениями существуют общие механизмы, приводящие к изменению структурных белков вне зависимости от основной причины заболевания [12]. Данное предположение нашло подтверждение в одной из наших последних работ [6].

**Целью** настоящего исследования явилась оценка состояния ряда структурных белков кардиомиоцитов аллотрансплантата сердца в разные периоды после операции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследован материал плановых и экстренных эндомикардиальных биоптатов (ЭМБ) аллотрансплантата сердца больных, подвергшихся ортотопической аллотрансплантации сердца в ФГБУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России в период с февраля 2008-го по июнь 2011 года, а также миокард, полученный при аутопсии и при повторной трансплантации сердца. Всего оценено 30 биоптатов 20 пациентов (эндомикардиальные биопсии двух реципиентов исследовали как в раннем, так и в позднем периоде): 13 (10 реципиентов – 5 мужчин, 5 женщин) выполнены в раннем послеоперационном периоде – от 6 до 34 дней после трансплантации; 17 (12 реципиентов – 9 мужчин, 3 женщины) – в позднем: от 6 месяцев до 15 лет после пересадки). Плановые ЭМБ выполняли по принятой в ФНЦТИО схеме: первая биопсия проводится через 5–7 суток после трансплантации сердца, в течение первого месяца после операции – 1 раз в неделю, в течение 2-го месяца – один раз в две недели, затем, в течение первого полугодия – один раз в месяц, и до истечения 1-го года после трансплантации ЭМБ повторяют 1 раз в два месяца. В течение 2-го года посттрансплантационного периода – раз в 3 месяца, 3-го года – раз в 4 месяца, а начиная с 4-го года – 1 раз в 6 месяцев. У больных, проживших более пяти лет, ЭМБ выполняют один раз в год. Следует подчеркнуть, что в последнее время отмечена тенденция к увеличению периода между проведением плановых биопсий. В группе реципиентов позднего посттрансплантационного периода до начала исследования было выполнено от 3 до 29 эндомикардиальных биопсий.

Диагностику гуморального (антителоопосредованного) отторжения проводили согласно рекомендациям ISHLT от 2004 г. [5]. Степень клеточного отторжения оценивали по Стэнфордской классификации 1990 г.

Образцы тканей миокарда заключали в среду Thermo scientific (Shandon Cryomatrix) и замораживали при температуре – 25 °С. Криостатные срезы исследовали с помощью прямого и непрямого метода иммуофлюоресценции. Использовали моноклональные антитела к ряду основных белков кардиомиоцитов: миозину (Myosin Cardiac, Heavy Chain, US Biological, USA), актину (Sarcomeric Actin, GenWay Biotech, USA), тропонину I (Troponin I cardiac, US Biological, USA), десмину (mouse anti-Human Desmin, US Biological, USA), винкулину

(mouse anti-Human Vinculin, US Biological, USA), титину (mouse anti-Human Titin, US Biological, USA). В качестве вторых антител применяли антитела к иммуноглобулину мыши, меченные FITC (Dako). Часть срезов окрашивали гематоксилином и эозином и оценивали состояние миокарда при помощи световой микроскопии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В период исследования морфологический диагноз острого гуморального отторжения был поставлен шести реципиентам: два эпизода (2 реципиента) относились к раннему периоду. В одном случае отторжение развивалось по ускоренному типу и закончилось гибелью пациентки. В другом отмечали субклиническую форму отторжения. Признаки острого антителоопосредованного отторжения были обнаружены также при исследовании 6 биоптатов позднего периода (4 реципиента). В одном случае у пациентки отмечали повторный эпизод острого гуморального отторжения. Через два месяца после этого больная умерла от острого отторжения смешанного типа. У другого больного на протяжении всего посттрансплантационного периода отмечали персистирующее гуморальное отторжение (в дальнейшем пациент перенес ретрансплантацию). В третьем случае криз отторжения успешно купировали. И один эпизод относился к субклинической форме отторжения.

Степень клеточного отторжения в подгруппе раннего посттрансплантационного периода была следующей: 1В – три эпизода; в двух биоптатах клеточная инфильтрация полностью отсутствовала – 0; в остальных восьми биоптатах не превышала степени 1А. В подгруппе позднего периода в трех биоптатах отторжение соответствовало степени 1В, в двух полностью отсутствовало (0) и в двенадцати случаях не превышало степени 1А.

Нормальная локализация структурных белков кардиомиоцитов была продемонстрирована нами ранее на срезах миокарда быка, крысы и человека [1, 3, 8]. Результаты исследования структурных белков кардиомиоцитов аллотрансплантата сердца раннего и позднего посттрансплантационного периода сведены в таблицы (табл. 1, 2).

При оценке состояния структурных белков миокарда реципиентов раннего посттрансплантационного периода выраженных изменений в большинстве случаев отмечено не было. Незначительное ослабление экспрессии миозина и тропонина I отмечали у одной пациентки при исследовании второй эндомикардиальной биопсии. Этому предшествовало клеточное отторжение степени 1В, потребовавшее проведения пульсгормональной терапии. Через 6 месяцев после трансплантации у данной

больной была выявлена субклиническая форма гуморального отторжения, при этом ослабление экспрессии миозина в единичных кардиомиоцитах сохранялось, кроме того, при исследовании экспрессии винкулина была отмечена гипертрофия косташеров. Изменений в содержании тропонина I в данном биоптате выявлено не было. Отмечали четкую реакцию в области сократительных дисков кардиомиоцитов.

Выраженные нарушения экспрессии белков сократительного комплекса кардиомиоцитов – миозина и тропонина I – были выявлены при оценке эндомикардиальной биопсии другой реципиентки в период развития криза ускоренного антителоопосредованного отторжения, а также при исследовании аутопсийного материала. В кардиомиоцитах наряду с участками нормальной экспрессии белка имелись очаги выраженной деструкции и почти полного отсутствия реакции (рис. 1, 2).

Состояние актина, белков истинного цитоскелета (десмин, винкулин), белка скелета саркомера (титин) во всех остальных случаях в данной подгруппе оставалось в норме.

Незначительная гипертрофия косташеров при исследовании содержания винкулина была отмечена в подгруппе раннего периода у одного реципиента с субклинической формой антителоопосредованного отторжения.

При исследовании состояния белков сократительного комплекса миокарда аллотрансплантата сердца (миозин, актин, тропонин I) в подгруппе позднего периода результаты получились следующие.

Нарушения экспрессии миозина были отмечены в четырех биоптатах (3 реципиента). При этом во всех случаях выявляли признаки антителоопосредованного отторжения. Наиболее выраженные изменения были зарегистрированы у реципиента с персистирующим гуморальным отторжением: на значительной площади исследуемого материала в центре кардиомиоцитов реакция почти полностью отсутствовала (рис. 3). Данная картина была сходна с теми изменениями, которые мы выявляли у больных с ишемической кардиомиопатией [6]. В остальных тринадцати биоптатах экспрессия миозина сохранялась в норме – в области широких (анизотропных) дисков.

Актин в пятнадцати эндомикардиальных биоптатах позднего послеоперационного периода оставался в характерной локализации: в зоне узких изотропных дисков (рис. 4). В трех биоптатах были выявлены изменения экспрессии. В одном случае незначительное ослабление экспрессии актина отмечали при исследовании третьей последовательной эндомикардиальной биопсии у реципиентки с возвратной формой антителоопосредованного оттор-

Таблица 1

**Макромолекулярная структура кардиомиоцитов аллотрансплантата сердца в раннем послеоперационном периоде (6–34 дня)**

№	Боль-ной	Дата пересадки	Дата вы-полнения биопсии	AMR (0/I)	R	Экспрессия структурных белков (норма / изменения)					
						Десмин	Винкулин	Миозин	Актин	Титин	Тропонин I
1	К.	18.02.08	28.02.08 ЭМБ № 1	AMR 0	1B	Н	Н	Н	Н	Н	Н
			12.03.08 ЭМБ № 2	AMR 0	1B	Н	Н	Н	Н	Н	Н
2	Р.♀	20.04.08	28.04.08 ЭМБ № 1	AMR 0	1B	Н	Н	Н	Н	Н	Н
			21.05.08 ЭМБ № 2	AMR 0	1A	Н	Н	Ослабл. (незначит.)	Н	Н	Ослабл. (незначит.)
3	П.♀	17.12.08	22.12.08 ЭМБ № 1	AMR 0	0	Н	Н	Н	Н	Н	Н
			12.01.09 ЭМБ № 3	AMR 0	1A	Н	Н	Н	Н	Н	Н
4	Я.♀	15.02.09	11.03.09 ЭМБ № 2	AMR 0	0–1A	Н	Н	Н	Н	Н	Н
5	К.	16.02.09	16.03.09 ЭМБ № 2	AMR 0	1A	Н	Н	Н	Н	Н	Н
6	Куз.♀	11.02.09	17.03.09 ЭМБ № 3 (34 сут.)	AMR 0	0–1A	Н	Н	Н	Н	Н	Н
7	Рыб.	03.05.09	7.05.09 ЭМБ № 1	AMR 0	1A	Н	Н	Н	Н	Н	Н
8	Г.	06.12.08	12.01.09 ЭМБ № 3	AMR 0	0–1A	Н	Н	Н	Н	Н	Н
9	Ящ.	10.10.10	09.11.10 ЭМБ	AMR I	0–1A	Н	Гипертр.	Н	Н	Н	Н
10	М.♀	02.11.10	08.11.10	AMR I	0	Н	Н	Ослабл.	Н	Н	Ослабл.

*Примечание.* AMR – гуморальное отторжение (antibody-mediated rejection); R – клеточное отторжение; Н – нормальная локализация белка; ♀ – реципиент-женщина; Ослабл. – ослабление экспрессии белка; Гипертр. – гипертрофия клеток.

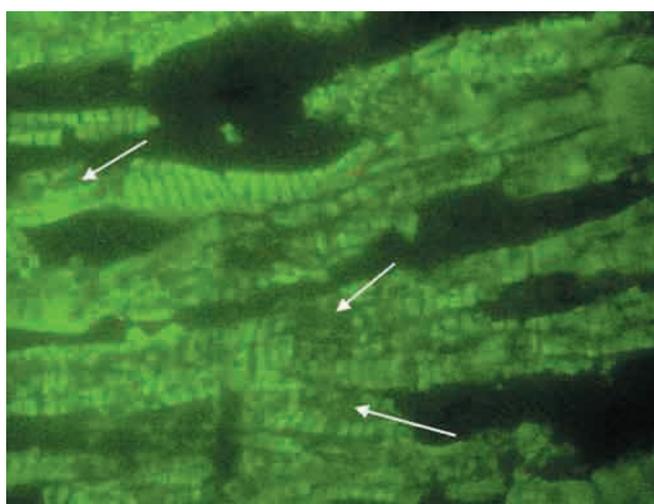


Рис. 1. Миокард аллотрансплантата сердца (аутопсийный материал), ускоренное антителоопосредованное отторжение. Шесть дней после операции. Очаги отсутствия экспрессии (стрелки) миозина в зоне широких (анизотропных) дисков кардиомиоцитов. Криостатный препарат, непрямой метод иммунофлюоресценции. ×400, фотоувеличение

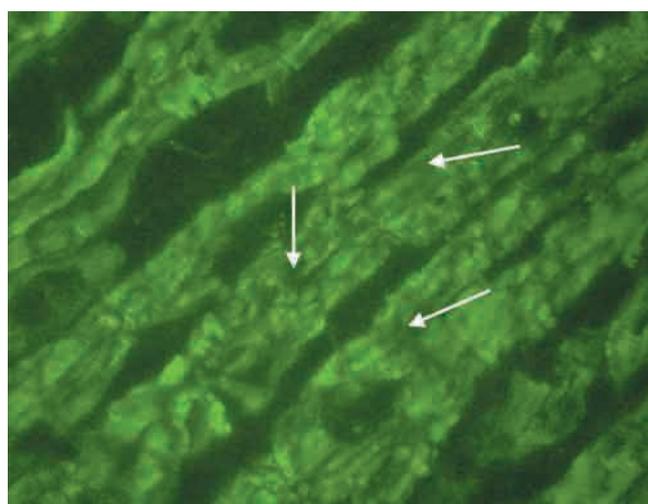


Рис. 2. Миокард аллотрансплантата сердца (аутопсийный материал). 6 дней после операции, ускоренное антителоопосредованное отторжение. Очаги отсутствия экспрессии (стрелки) тропонина I в зоне сократительных дисков кардиомиоцитов. Криостатный препарат, непрямой метод иммунофлюоресценции. ×400, фотоувеличение

Таблица 2

**Макромолекулярная структура кардиомиоцитов аллотрансплантата сердца в позднем послеоперационном периоде (6 мес. – 15 лет)**

№	Больной	Дата пересадки	Дата выполнения биопсии	AMR (0/I)	R	Признаки AMR в предыдущих биопсиях (да/нет)	Экспрессия структурных белков (норма/изменения)					
							Десмин	Винкулин	Миозин	Актин	Титин	Тропонин I
1	С.♀	25.10.05	10.04.08 (2,5 г.)	AMR 0	1A	да (2 эп.)	Н	Н	Н	Н	Н	Н
			21.08.08	<b>AMR I</b>	1B		Н	Гипертр.	Н	Н	Н	Н
			29.01.09	<b>AMR I</b>	1B		desmin-free	Гипертр.	Ослабл.	Ослабл.	Ослабл.	Н
2	Р.♀	20.04.08	07.10.08	<b>AMR I</b>	1A	нет	Н	Гипертр.	Ослабл.	Н	Н	Н
3	Пат.	18.02.92	1.04.08 (15 лет)	AMR 0	0–1A	нет	Н	Гипертр.	Н	Н	Ослабл	Н
4	Пов.	02.01.99	15.04.08 (9 лет)	AMR 0	1A	нет	Н	Гипертр.	Н	Н	Н	Н
5	Т.	02.02.00	8.04.08 (8 лет)	AMR 0	1A	да (3 эп.)	desmin-free	Гипертр.	Н	Н	Ослабл.	Н
6	Ком.	27.11.99	19.02.09 (9 лет)	AMR 0	0	нет	Н	Гипертр.	Н	Н	Н	Н
7	Ков.	06.04.98	8.04.08 (10 лет)	AMR 0	1A	да (1 эп.)	Н	Н.	Н	Н	Ослабл.	Н
			28.04.09 (11 лет)	AMR 0	0		Н	Н	Н	Н	Ослабл.	Н
			25.08.09 (11 лет)	AMR 0	1A		Н	Гипертр.	Н	Н	Ослабл.	Н
8	Г.♀	27.04.04	27.04.09 (5 лет)	AMR 0	1A	да (4 эп.)	desmin-free	Гипертр.	Н	Н	Ослабл.	Н
9	Теп.	18.03.04	16.10.08	<b>AMR I</b>	1B	да (7 эп.)	desmin-free	Гипертр. Ослабл.	Ослабл.	Ослабл.	Ослабл	Н
			21.05.09 (5 лет)	<b>AMR I</b>	1A		desmin-free	Гипертр. Ослабл.	Ослабл.	Ослабл.	Ослабл	Н
10	Д.	14.10.03	24.08.09 (6 лет)	AMR 0	1A	да (1 эп.)	Н	Гипертр.	Н	Н	Ослабл.	Н
11	С.	27.11.07	18.01.10 (2 г. 3мес.)	AMR 0	1A	нет	Н	Н	Н	Н	Н	Н
12	Я.	10.10.10	12.04.11 (6 мес.)	AMR I	0-1A	да (3 эп.)	desmin-free	Гипертр.	Н	Н	Н	Н

*Примечание.* AMR – гуморальное отторжение (antibody-mediated rejection); R – клеточное отторжение; Н – нормальная локализация белка; ♀ – реципиент-женщина; Ослабл. – ослабление экспрессии белка; Гипертр. – гипертрофия клеток; desmin-free – отсутствие десмина в области Z-линий кардиомиоцитов; эп. – эпизод острого гуморального отторжения.

жения. Отсутствие реакции в значительном числе кардиомиоцитов было выявлено также в двух последовательных биоптатах реципиента с персистирующим гуморальным отторжением (рис. 5).

При исследовании тропонина I в подгруппе позднего посттрансплантационного периода выраженных изменений отмечено не было. Белок визуализировался в характерной локализации: в области сократительных дисков кардиомиоцитов (рис. 6).

При исследовании состояния титина в миокарде реципиентов позднего послеоперационного периода уменьшение содержания белка отмечали в десяти биоптатах (7 реципиентов) из семнадцати. При этом у одной пациентки отмечали возвратную форму гуморального отторжения, у другого больного – персистирующее антителоопосредованное отторжение и у троих реципиентов в течение всего послеоперационного периода неоднократно регистрировали эпизоды острого отторжения гуморального типа.

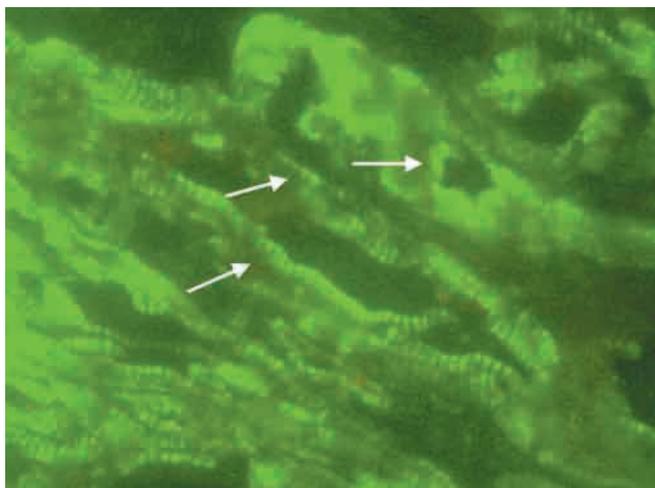


Рис. 3. Материал эндокардиальной биопсии, продольный срез кардиомиоцитов. Четыре года после аллотрансплантации сердца, персистирующее гуморальное отторжение. Отсутствие экспрессии миозина в центре кардиомиоцитов. Криостатный препарат, непрямой метод иммунофлюоресценции  $\times 400$ , фотоувеличение

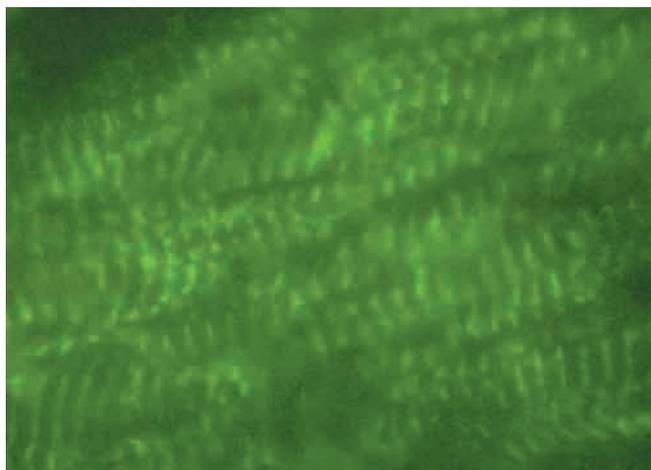


Рис. 4. Материал эндокардиальной биопсии, 15 лет после аллотрансплантации сердца. Нормальная экспрессия актина в зоне узких (изотропных) дисков. Криостатный препарат, непрямой метод иммунофлюоресценции, продольный срез кардиомиоцитов  $\times 400$ , фотоувеличение

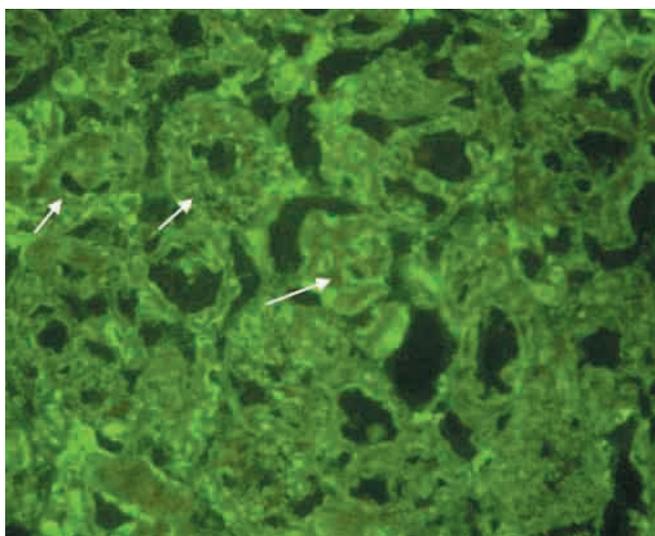


Рис. 5. Материал эндокардиальной биопсии, четыре года после аллотрансплантации сердца, персистирующее гуморальное отторжение. Отсутствие экспрессии актина в центре кардиомиоцитов (стрелки). Криостатный препарат, непрямой метод иммунофлюоресценции, поперечный срез кардиомиоцитов  $\times 400$

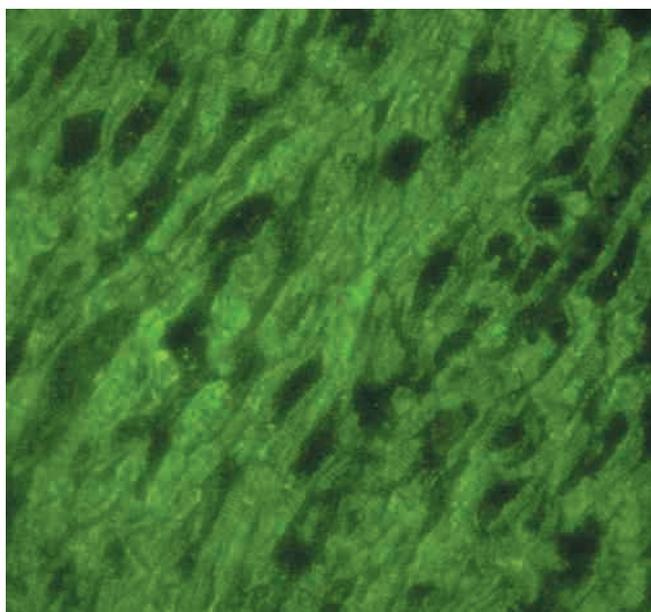


Рис. 6. Материал эндокардиальной биопсии аллотрансплантата сердца, 3 года после операции; R-1B, AMR-I. Нормальная локализация тропонина I в зоне сократительных дисков. Криостатный препарат, непрямой метод иммунофлюоресценции  $\times 400$

Яркие изменения в подгруппе позднего послеоперационного периода были выявлены при изучении состояния белков истинного цитоскелета кардиомиоцитов – десмина и винкулина. В 6 образцах (5 реципиентов) длительно функционирующего миокарда были отмечены обширные зоны «desmin-free» кардиомиоцитов, подобно тем, что мы наблюдали в миокарде пациентов с ишемической и постмиокардитической дилатационной кардиомиопатиями. Данный факт указывает на наличие общих механизмов, приводящих к нарушению

структурных белков вне зависимости от основной причины заболевания. Интересно, что у троих реципиентов в послеоперационном периоде неоднократно регистрировали эпизоды острого гуморального отторжения, в одном случае диагностировано персистирующее отторжение гуморального типа и у одной реципиентки отмечена возвратная форма гуморального отторжения (рис. 7). Следует отметить, что в работе S. Di Somma с соавторами, исследовавшими состояние десмина у больных ишемической кардиомиопатией, была выявлена четкая

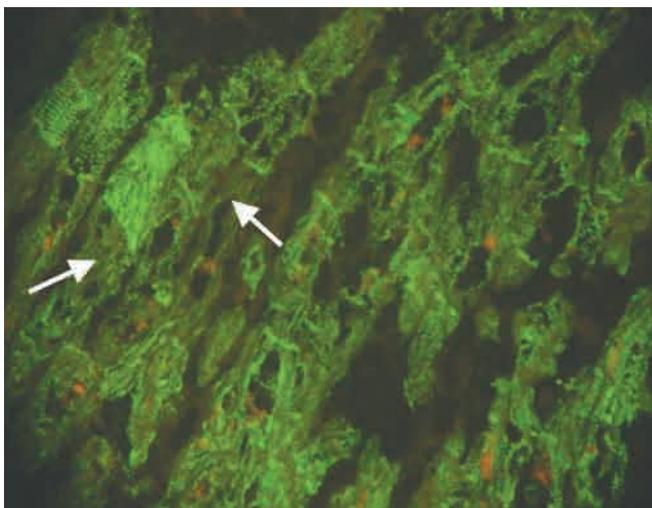


Рис. 7. Материал эндокардиальной биопсии аллотрансплантата сердца, 3 года после операции. Частичное сохранение экспрессии десмина в зоне Z-линий и во вставочных дисках кардиомиоцитов. Наличие «desmin-free» кардиомиоцитов (стрелки). Криостатный препарат, непрямой метод иммунофлюоресценции  $\times 400$

обратная корреляция между наличием «desmin-free» кардиомиоцитов и фракцией изгнания левого желудочка [9]. В остальных 11 биоптатах десмин выявляли в нормальной локализации – в области вставочных дисков и Z-линий кардиомиоцитов.

При исследовании экспрессии винкулина в подавляющем числе случаев (13 биоптатов из 17) отмечали гипертрофию костамеров разной степени выраженности (рис. 8, а). Нередко отмечали накопление белка в области T-трубочек, что визуализировалось при иммунофлюоресцентном окрашивании как усиление реакции в саркоплазме кардиомиоцитов. Данное перераспределение содержания винкулина было отмечено нами ранее у больных различными формами кардиомиопатии [6]. Вероятно, на определенном этапе усиление экспрессии винкулина в данных областях является компенсаторным механизмом. Однако чрезмерное его накопление затрудняет передачу сигнала сокращения и расслабления из клетки экстрацеллюлярному матриксу и обратно в области костамеров, а также препятствует выходу ионов кальция из T-трубочек в саркоплазму клетки, что снижает способность сердечной мышцы к сокращению [14, 16, 20].

В четырех биоптатах экспрессию винкулина регистрировали в характерной локализации: в области сарколеммы, в костамерах, а также во вставочных дисках кардиомиоцитов. Интересное перераспределение содержания данного белка было отмечено при исследовании миокарда пациента с персистирующим отторжением гуморального типа: наряду с увеличением содержания винкулина в области костамеров и T-трубочек ряда кардиомиоцитов отмечали также отсутствие экспрессии винку-

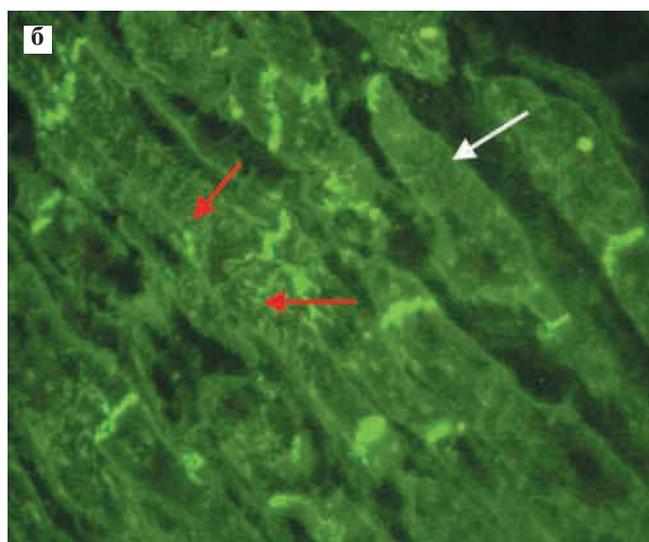
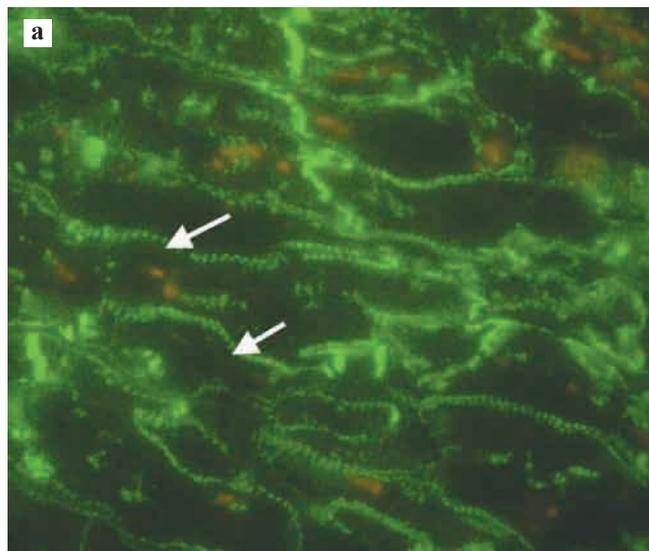


Рис. 8. Материал эндокардиальных биоптатов аллотрансплантата сердца. Обработка антителами к винкулину: а) 8 лет после трансплантации сердца. Гипертрофия костамеров (стрелки); б) 4 года после трансплантации, персистирующее отторжение гуморального типа. Накопление винкулина в области T-трубочек кардиомиоцитов (красные стрелки). Ослабление реакции в зоне сарколеммы кардиомиоцитов (белая стрелка). Криостатные препараты, непрямой метод иммунофлюоресценции  $\times 400$

лина в зоне сарколеммы некоторых кардиомиоцитов (рис. 8, б).

Таким образом, основные изменения макромолекулярной структуры кардиомиоцитов были выявлены нами в миокарде длительно функционирующего трансплантата. Причем из шести охарактеризованных белков нарушения экспрессии пяти белков были обнаружены у реципиентов с возвратным и персистирующим антителоопосредованным отторжением. При этом у пациента П., трансплантат которого на момент исследования функционировал в течение 15 лет, отмечали лишь незначительное накопление винкулина в области костамеров и некото-

рое ослабление экспрессии титина. Следует отметить, что в течение всего посттрансплантационного периода пациенту выполнено 30 эндомикардиальных биопсий, степень клеточной реакции лишь в трех случаях оценивалась как 1В (в остальных 0–1А), не было зарегистрировано ни одного эпизода гуморального отторжения.

В качестве наиболее яркого примера нарушения макромолекулярной структуры кардиомиоцитов при аллотрансплантации сердца приводим следующее наблюдение.

Больному Т. 18.03.04 выполнена ортотопическая аллотрансплантация сердца. 30.10.09 (через 5 лет 7 мес.) произведена ретрансплантация. За период функционирования первого трансплантата с целью мониторинга отторжения выполнено 10 эндомикардиальных биопсий. Начиная со второй ЭМБ, у пациента во всех биоптатах при иммуногистохимическом исследовании регистрировали четкие признаки отторжения гуморального типа: в стенках капилляров миокарда отмечали распространенную фиксацию комплемента (C4d фрагмента), иммуноглобулинов (G и/или M), в просвете капилляров нередко выявляли макрофагальные (CD68+) элементы. Клеточное отторжение в трех случаях соответствовало степени 1В, в остальных не превышало степени 1А. Выраженных клинических проявлений отторжения не было, однако неоднократно отмечали накопление жидкости в полости перикарда. В связи с этим, с учетом данных исследования эндомикардиальной биопсии, в течение посттрансплантационного периода было проведено два курса пульсгормональной терапии. В остальных случаях проводили сеансы плазмафереза. Ритуксимаб не применяли.

Жалобы на одышку и перебои в работе сердца у больного появились через 4 года и 7 месяцев (госпитализация 09.10.2008 г.). По данным коронарографии патологии коронарных артерий не выявлено. По данным сцинтиграфии миокарда отмечена патологическая асинхрония базальных отделов ЛЖ и более выраженная внутрижелудочковая асинхрония ПЖ. Снижение ФВ ЛЖ с 68 до 47%. При исследовании ЭМБ с целью мониторинга отторжения: R-1В; AMR-I. На материале данной биопсии пациенту впервые было проведено исследование состояния структурных белков миокарда. **При этом обнаружено выраженное нарушение экспрессии пяти белков из шести исследуемых.**

Через 5 лет и 2 месяца (21.05.09 г.) больной госпитализирован с жалобами на одышку при нагрузке и в покое, слабость. По данным коронарографии отмечен гемодинамически незначимый стеноз передней межжелудочковой ветви (<50%) в проксимальной и средней трети. Степень отторжения: R-1В; AMR-I. **Сохраняется резкое на-**

**рушение экспрессии структурных белков миокарда.**

28.05.09 выполнено стентирование ПМЖВ (2 стента), однако состояние пациента существенно не улучшилось.

17.08.09 г больной госпитализирован с жалобами на одышку в покое. По данным сцинтиграфии миокарда отмечено значительное увеличение полости левого желудочка и снижение ФИ ЛЖ до 29%. Функционировала только заднебоковая стенка ЛЖ.

Консилиум в составе ведущих сердечно-сосудистых хирургов и кардиологов Центра расценил состояние больного как медикаментозно-рефрактерную сердечную недостаточность и рекомендовал выполнение повторной трансплантации сердца.

Из приведенных данных видно, что выраженные нарушения экспрессии и распределения структурных белков миокарда сформировались еще до развития незначительных стеногических изменений коронарных артерий. Таким образом, нарушения макромолекулярной структуры большого числа кардиомиоцитов существенно ухудшили сократительную способность миокарда, что и явилось истинной причиной тяжелого состояния пациента. Это подтверждается отсутствием положительного эффекта после проведения стентирования и улучшения коронарного кровотока, а также прогрессированием медикаментозно-рефрактерной сердечной недостаточности.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании наименьшее число изменений было отмечено при изучении состояния белков сократительного комплекса миокарда: актина, миозина, тропонина I. Функция данных белков не компенсируется (или компенсируется незначительно) другими структурными белками, поэтому выраженное повреждение сократительного аппарата кардиомиоцитов (особенно нескольких белков одновременно) достаточно быстро заканчивается функциональной несостоятельностью органа.

Чаще всего в миокарде аллотрансплантата сердца, даже при нормальной функции пересаженного органа, мы выявляли нарушения экспрессии и перераспределение содержания титина и винкулина. Это, с одной стороны, свидетельствует о наибольшей чувствительности данных белков к действию внешних факторов (прежде всего ишемии). С другой стороны, может означать наличие достаточно большого компенсаторного резерва данных белков, а также существование возможности частичного замещения их функции другими белками.

Как упоминалось выше, основные нарушения макромолекулярной структуры кардиомиоцитов

были выявлены нами в образцах длительно функционирующего трансплантата. При этом у восьми из двенадцати реципиентов данной подгруппы неоднократно регистрировали эпизоды антителоопосредованного отторжения (либо в период настоящего исследования, либо при оценке предыдущих ЭМБ). Данный факт подтверждает утверждение профессора Белецкой Л.В. о «ревмоподобном» течении гуморальной реакции [2, 7]. Эпизоды острого гуморального отторжения, даже в отсутствие выраженных клинических проявлений или гемодинамических нарушений, разворачиваясь на территории микроциркуляторного русла, вызывают состояние ишемии отдельных кардиомиоцитов, что при достаточно длительном или периодическом воздействии может приводить к структурным нарушениям миокарда и неуклонному угасанию функции сердца в целом. Все вышеизложенное подтверждает тезис о том, что гуморальное звено иммунного ответа вносит значительный вклад в процесс хронического отторжения аллотрансплантата сердца.

Выявленные нарушения белковой структуры миокарда позволяют точнее и глубже охарактеризовать само понятие хронического отторжения, поскольку большинство исследователей и клиницистов до настоящего времени рассматривают данный процесс исключительно как болезнь коронарных артерий пересаженного сердца, что, на наш взгляд, неверно. Кроме того, тот факт, что наиболее выраженные изменения состояния структурных белков кардиомиоцитов были выявлены у пациента с персистирующим гуморальным отторжением, когда на протяжении достаточно длительного времени клинические проявления отторжения отсутствовали, указывает на возможный путь повреждения миокарда аллотрансплантата, который не учитывается при стандартном исследовании эндомикардиальной биопсии. Дальнейшее изучение макромолекулярной структуры кардиомиоцитов могло бы прояснить роль субклинической (асимптоматической) формы гуморального отторжения в судьбе трансплантата и оценить необходимость коррекции иммуносупрессивной терапии у пациентов с данной формой отторжения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гуморальное (антителоопосредованное) отторжение трансплантата лежит в основе хронического отторжения пересаженного сердца, которое выражается не только в поражении сосудистого русла, но обусловлено также нарушением макромолекулярной структуры кардиомиоцитов. Нарушения структуры кардиомиоцитов, вызванные перманентной ишемией, кумулируются и с течением времени

могут приводить к функциональной несостоятельности органа.

Результаты изучения состояния структурных белков миокарда аллотрансплантата сердца вносят существенный вклад в понимание роли и оценку влияния субклинической (асимптоматической) формы гуморального отторжения на функцию аллотрансплантата сердца.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белецкая Л.В., Куприянова А.Г., Ильинский И.М. и др. Молекулярно-биологическая структура кардиомиоцита // Вестник трансплантолог. и искусств. органов. М., 2006. № 4. С. 89–94.
2. Белецкая Л.В., Куприянова А.Г., Кормер А.Я. и др. Ревмоподобное течение отторжения гуморального (сосудистого) типа при аллотрансплантации сердца // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т. 142. № 9. С. 337–340.
3. Белецкая Л.В., Куприянова А.Г., Куренкова Л.Г. и др. Изменения макромолекулярной структуры кардиомиоцитов при идиопатической кардиомиопатии // Вестник трансплантолог. и искусств. органов. 2007. Т. 34. № 2. С. 33–35.
4. Ильинский И.М. Патология коронарных артерий аллотрансплантированного сердца // Вестник трансплантолог. и искусств. органов. М., 2001. № 3–4. С. 41–46.
5. Куприянова А.Г., Белецкая Л.В., Зайденев В.А. и др. Опыт использования иммуногистохимического метода исследования эндомикардиальных биопсий в диагностике отторжения гуморального типа у больных с аллотрансплантатом сердца // Вестник трансплантолог. и искусств. органов. М., 2009. Т. XI. № 3. С. 30–36.
6. Куприянова А.Г., Белецкая Л.В., Зайденев В.А. и др. Оценка состояния макромолекулярной структуры кардиомиоцитов у больных различными формами кардиомиопатии // Вестник трансплантолог. и искусств. органов. М., 2012. Т. XIV. № 2. С. 32–42.
7. Beletskaya L.V., Kupriyanova A.G., Kormer A.Ya. Heart allograft rejection of the humoral type is a continuing «rheum-like» process // J. Heart Lung. Transplant. 2006. Vol. 25. № 8. P. 998–1000.
8. Beletskaya L.V., Kupriyanova A.G., Zaidenov V.A. et al. Altered cytoskeletal protein localization in cardiomyocytes of idiopathic cardiomyopathy patients // J. Heart Lung. Transplant. Aug. 2007. Vol. 26. № 8. P. 868–870.
9. Di Somma S., Di Benedetto M.P., Slavatore G. et al. Desmin-free cardiomyocytes and myocardial dysfunction in end stage heart failure // Eur. J. Heart Fail. 2004. Vol. 6. P. 389–398.
10. Franz M., Neri D., Berndt A. Chronic cardiac allograft rejection: critical role of ED-A(+) fibronectin and implications for targeted therapy strategies // J. Pathol. 2012. Mar. Vol. 226 (4). P. 557–561.
11. Hammond E.H., Yowell R.L., Price G.D. et al. Vascular rejection and its relationship to allograft coronary arte-

- ry disease // *J. Heart Lung. Transplant.* 1992 May-Jun. Vol. 11 (3 Pt 2). P. 111–119.
12. *Hein S., Kostin S., Heling A. et al.* The role of cytoskeleton in heart failure // *Cardiovascular Research.* 2000. Vol. 45. P. 273–278.
  13. *Kobashigawa J., Crespo-Leiro M.G., Ensminger S.M. et al.* Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation // *J. Heart Lung. Transplant.* 2011 March. Vol. 30 (3). P. 252–269.
  14. *Kostin S., Hein S., Arnon E., Scholz D., Schaper J.* The cytoskeleton and related proteins in human failing heart // *Heart Fail. Rev.* 2000. Vol. 3. P. 271–280.
  15. *Schmauss D. and Weis M.* Cardiac Allograft Vasculopathy: Recent Developments // *Circulation.* 2008. Vol. 117. P. 2131–2141.
  16. *Shaper J., Froede R., Hein St. et al.* Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy // *Circulation.* 1991. Vol. 83. № 2. P. 504–505.
  17. *Suzuki J-i., Isobe M., Morishita R., Nagai R.* Characteristics of Chronic Rejection in Heart Transplantation: Important Elements of Pathogenesis and Future Treatments // *Circulation Journal.* Feb. 2010. Vol. 74. P. 233–239.
  18. *Tan C.D., Baldwin W.M. 3rd, Rodriguez E.R.* Update on cardiac transplantation pathology // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2007 Aug. Vol. 131 (8). P. 1169–1191.
  19. *Wehner J., Morrell C, Reynolds T. et al.* Antibody and complement in transplant vasculopathy // *Circulation Research.* Feb. 2007. Vol. 100 (2). P. 191–203.
  20. *Zemljic-Harpf A., Manso A.M., Ross S.R.* Vinculin and Talin: Focus on the Myocardium. *J. Investig Med.* 2009. Vol. 57 (8). P. 849–855.