

Кливер Владислав Евгеньевич

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО
СЕРДЦА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СРОКАХ ХОЛОДОВОЙ ИШЕМИИ**

3.3.2. Патологическая анатомия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е. Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Надеев Александр Петрович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Клиникова Марина Геннадьевна

(Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Институт молекулярной патологии и патоморфологии, лаборатория молекулярных и ультраструктурных основ патологии, главный научный сотрудник – руководитель лаборатории, г. Новосибирск)

доктор биологических наук, профессор

Славинский Александр Александрович

(Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической анатомии, заведующий)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва)

Защита диссертации состоится «___» _____ 2024 г. в «___» часов на заседании диссертационного совета 21.2.046.05, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Залесского, д. 4; <https://new.ngmu.ru/dissers/get-file/4295>)

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

С. В. Залавина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. На современном этапе развития медицины одной из основных проблем мирового здравоохранения является хроническая сердечная недостаточность (ХСН), одно из самых частых осложнений заболеваний сердечно-сосудистой системы (Зайратьянц О. В. и соавт., 2014; Page K. et al., 2015; Theresa A McDonagh et al., 2021; Heidenreich P. A., 2022). Количество больных, которые достигают терминальной стадии ХСН, постоянно растет (Резник Е. В. и соавт., 2010; Можейко Н. П., 2020; Pieske B., 2019; Bozkurt B., et al. 2021; Crespo-Leiro M. G. et al., 2021).

Несмотря на достижения в области фармакотерапии сердечно-сосудистых заболеваний, ведущим методом её лечения остается трансплантация сердца (ТС), которая существенно улучшает прогноз и качество жизни пациентов (Храмых Т. П. и соавт. 2021; Готье С. В. и соавт., 2023; Maddox T. M. et al., 2021; McDonagh T. A. et al., 2021). Ежегодно в мире выполняется более 5 500 трансплантаций сердца, подавляющее большинство вмешательств – в странах Европы и Северной Америки. В России на протяжении последних лет отмечается значительный рост числа трансплантации сердца (Готье С. В., 2023).

Вопрос острого отсутствия донорских органов при повышении необходимости в ТС указывает на неизбежность расширения критериев выбора доноров, среди которых увеличение количества изъятий органов у доноров высокого риска станет вероятным решением проблемы нехватки донорских органов, без риска отрицательного влияния на последующие результаты ТС (Тенчурина Э. А. и соавт., 2020; Попцов В. Н. и соавт., 2022; Ertugrul I. A. et al., 2021).

Одним из важнейших критериев является время ишемии донорского сердца. В настоящее время нет общей позиции по временным критериям холодовой ишемии донорского сердца. Длительная доставка и увеличение времени холодовой ишемии являются негативными факторами в поддержке жизнеспособности трансплантата на до- и послеоперационном этапах и могут оказаться решающими в развитии его дисфункции (Currie M. E. et al., 2018; Reich H. J. et al., 2018). Повышение продолжительности данного показателя более 240 минут, по мнению некоторых авторов, увеличивает опасность развития нарушения деятельности трансплантата и может привести к летальному исходу (Erasmus M. et al., 2017; Тенчурина Э. А. и соавт., 2020). В то же время нормотермическое ишемическое повреждение миокарда сопряжено с разрушающим влиянием гипоксии на структуры клеточных белков, составляющих клеточный каркас кардиомиоцитов (Kuprytė M. et al., 2023). Вместе с тем, в части исследований отмечается, что продолжительный срок холодовой ишемии трансплантата не может быть фактором его дисфункции и не оказывает какого-либо влияния на результаты хирургического лечения и, таким образом, несомненно, заслуживает должного внимания и тщательного анализа (Чернявский А. М. и соавт., 2019; Каменская О. В. и соавт., 2021; Фомичев А. В. и соавт., 2023;

Chambers D. C. et al., 2017).

На основании вышеизложенного, несмотря на множество исследований, в настоящее время остается открытым вопрос о «безопасной» длительности холодовой ишемии, нет четкой границы допустимого времени консервации и соответствующих патоморфологических данных о состоянии миокарда донорского сердца при различных временных параметрах. Становление выводов при использовании различных методов сохранения донорского сердца усложнено также разнообразием клинических характеристик потенциальных реципиентов (Carter K. T. et al., 2019).

Степень разработанности темы диссертации. На сегодняшний день значительная часть научных исследований, посвященных изучению изменений в структуре кардиомиоцитов при различных интервалах холодовой ишемии миокарда, является недостаточной и основана преимущественно на экспериментальных данных (Минасян С. М. и соавт., 2010; Заднипрый И. В. и соавт., 2019; Bryner B. S. et al., 2021). Это свидетельствует о недостаточном пуле информации, необходимой для полного понимания основных механизмов патоморфологического ремоделирования сердца при продолжительной холодовой ишемии миокарда. Именно этот факт определил цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования. Изучить патоморфологические особенности донорского и трансплантированного сердца при различной длительности холодовой ишемии трансплантата.

Задачи исследования

1. Изучить характер патоморфологических изменений миокарда донорского сердца при холодовой ишемии миокарда до 240 минут и более 240 минут.
2. Провести сравнительную оценку экспрессии белков-маркеров – актина и десмина и белка семейства молекул клеточной адгезии Е-кадгерина в миокарде донорского сердца после холодовой ишемии до 240 минут и более 240 минут.
3. Изучить на тканевом и ультраструктурном уровне особенности изменений кардиомиоцитов биоптатов донорского сердца в условиях холодовой ишемии до 240 минут и более 240 минут.
4. Оценить частоту и степени острого клеточного отторжения трансплантированного сердца у пациентов с продленной холодовой ишемией более 240 минут по сравнению с холодовой ишемией трансплантата до 240 минут в отдаленном 30-дневном послеоперационном периоде.

Научная новизна. Впервые определены особенности патоморфологических изменений миокарда донорского сердца при холодовой ишемии миокарда до 240 минут и более 240 минут, характеризующиеся стереотипными дистрофическими изменениями кардиомиоцитов на тканевом и ультраструктурном уровне

Впервые показано, что при различных сроках холодовой ишемии экспрессия Е-кадгерина в кардиомиоцитах остается на стабильно высоком уровне.

Впервые продемонстрировано, что длительная холодовая ишемия (более 240 минут) донорского сердца не оказывает отрицательного влияния на стабильность экспрессии актина, десмина в миокарде, что указывает на обратимость структурных изменений в виде развития контрактур не более I-II степени и позволяет судить о достаточно высокой степени сохранности их макромолекулярной структуры для восстановления адекватной сердечной деятельности после трансплантации сердца.

Впервые показано, что длительность холодовой ишемии не оказывает влияния на степень острого клеточного отторжения трансплантированного сердца.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты проведенного исследования расширяют современные представления об особенностях морфологии донорского и трансплантированного сердца при длительной холодовой ишемии.

Установлено, что выполнение трансплантации сердца с продолжительностью холодовой ишемии как до 240 минут, так и более 240 минут не оказывает необратимого влияния на структурную целостность трансплантата и не приводит к увеличению частоты развития его первичной дисфункции и смертности реципиентов в отдаленный период после операции.

Полученные данные об изменениях кардиомиоцитов на тканевом и ультраструктурном уровне позволяют судить о достаточно высокой степени сохранности их структуры для восстановления адекватной сердечной деятельности после трансплантации сердца.

Результаты представленного комплексного морфологического подхода к оценке изменений миокарда при длительной холодовой ишемии донорского сердца могут быть использованы для дальнейших разработок методов его защиты на этапе транспортировки.

Методология и методы диссертационного исследования. Методология исследования основана на применении современных принципов системного комплексного анализа данных, включавших сведения медицинских историй болезни стационарных больных, результаты световой, поляризационной микроскопии, иммуногистохимического и ультраструктурного исследования кардиомиоцитов полученных у реципиентов с разной продолжительностью ишемии сердечного трансплантата. Полученные результаты исследования были проанализированы и обработаны корректными статистическими методами. Дизайн работы согласуется с принципами проведения современных научных исследований с полным соблюдением правил биоэтики.

Положения, выносимые на защиту

1. Выполнение трансплантации сердца с продолжительностью холодовой ишемии как до 240 минут, так и более 240 минут не оказывает необратимого влияния на структурную

целостность донорского сердца и позволяет судить о достаточно высоком уровне его структурной сохранности для восстановления адекватной сердечной деятельности в посттрансплантационном периоде.

2. Холодовая ишемия донорского сердца раствором Bretschneider как до 240 мин, так и более 240 мин не влияет в послеоперационном периоде на степень острого клеточного отторжения трансплантированного сердца.

Степень достоверности. Все использованные методические приемы и способы статистической обработки соответствуют поставленным цели и задачам, позволяют получить достоверные и доступные анализу результаты. Диссертация выполнена на достаточном клинико-морфологическом материале с использованием сертифицированного оборудования, современных высокоинформативных методов морфологического исследования (световая и поляризационная микроскопия, морфометрия, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследование) и анализа полученных результатов. Сформулированные научные положения и выводы основаны на результатах собственных исследований и не носят характера умозрительных заключений.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: Российских (итоговых) научно-практических конкурс-конференциях с международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна» (Новосибирск, 2022, 2023, 2024); 6-м Съезде Российского общества патологоанатомов (Новосибирск, 2022); международных морфологических научно-практических конкурс-конференциях студентов и молодых ученых «Морфологические науки – фундаментальная основа медицины» (Новосибирск 2021; 2022; 2023); 11-м Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2022); 4-м Дальневосточном международном медицинском конгрессе в конференции-конкурсе научных работ «Аспирантские чтения 2023», (Хабаровск, 2023); 8-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы патологоанатомической практики (Челябинск, 2024).

Диссертационная работа апробирована на заседании проблемной комиссии «Морфологические основы компенсаторно-приспособительных реакций» ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Новосибирск, 2024).

Диссертация выполнена в соответствии с утвержденным направлением научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России по теме «Изучение закономерностей развития нормальных и патологических процессов в организме при действии факторов экзо- и эндогенной природы: межклеточные и межсистемные взаимодействия при остром и хроническом воспалении,

репаративной регенерации, онкогенезе, фиброзировании, дисплазии соединительной ткани; возможности диагностики, профилактики, лечения», номер государственной регистрации 121061500014-3.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследования внедрены для практического применения в патологоанатомическом отделении ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е. Н. Мешалкина» Минздрава России, г. Новосибирск, а также используются для проведения учебного процесса на кафедре патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и в Институте высшего и дополнительного профессионального образования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е. Н. Мешалкина» Минздрава России.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 13 научных работ, в том числе 6 статей в научных журналах и изданиях, включённых 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, из них 3 статьи в журналах категории K1, 1 статья в журнале категории K2, входящих в список изданий, распределённых по категориям K1, K2, K3, в том числе 3 статьи в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus, PubMed и Web of Science.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста; состоит из введения, 3 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы представлен 218 источниками, из которых 139 в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 9 таблиц и 21 рисунка, 5 из которых многокомпонентные комбинированные.

Личное участие автора. Все исследования проводились при непосредственном участии автора: анализ данных отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационного исследования; сбор материала; морфометрия и анализ статистической обработки материала; подготовка научных докладов и диссертации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на кафедре патологической анатомии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е. Н. Мешалкина»

Министерства здравоохранения Российской Федерации и выполнено в соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 № 323-ФЗ, Федеральным законом «О персональных данных» от 27.07.2006 № 152-ФЗ (ред. от 21.07.2014, с изм. и доп., вступ. в силу с 01.09.2015) и Хельсинкской декларацией, разработанной Всемирной медицинской ассоциацией «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (1964 г., с 9 пересмотрами, последний из которых имел место в 2013 г.). Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, от всех пациентов (реципиентов) до включения в исследование было получено письменное информированное согласие. Протокол исследования одобрен Комитетом по этике ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России от 25.11.2021, протокол № 139.

Критерии соответствия (реципиенты). *Критерии включения:* перенесенная ТС. *Критерии исключения:* отказ от участия в исследовании, возраст младше 18 лет.

Критерии соответствия (доноры). *Критерии включения:* сердца от доноров возрастом до 60 лет. Отсутствие травмы грудной клетки, длительных гипотензии и гипоксемии, стабильная гемодинамика, среднее артериальное давление (САД) > 60 мм рт. ст., центральное венозное давление (ЦВД) от 8 до 12 мм рт. ст., инотропная поддержка менее 10 мг/кг/мин (допамин), электрокардиография и эхокардиография без патологических изменений. *Критерии исключения.* Возраст доноров младше 18 лет. Сложные нарушения ритма сердца, необходимость в чрезмерной инотропной поддержке (допамин в дозе 20 мкг/ кг/мин или аналогичных дозах другими адренергическими препаратами несмотря на агрессивную оптимизацию пред- и постнагрузки), нарушения сократимости по данным эхокардиографии или фракцией выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) < 40 %, несмотря на оптимизацию гемодинамики инотропными препаратами. Прижизненный отказ пациента от изъятия внутренних органов.

Описание критериев соответствия (диагностические критерии). Отбор доноров для участия в исследовании включал установление смерти головного мозга на основании клинической картины, результатов лабораторных и инструментальных исследований, которые проводились коллегиально в соответствии с Национальными рекомендациями и принятыми клиническими протоколами (Министерство здравоохранения Российской Федерации приказ от 25 декабря 2014 г. № 908н «О порядке установления диагноза смерти мозга человека»).

Дизайн исследования. Исследование проводилось в два этапа: I этап – морфологический, включал в себя изучение миокарда левого предсердия (ЛП) донорских сердец. В условиях операционного блока во время проведения основного этапа операции забирались образцы миокарда ЛП после холодовой ишемии раствором Bretschneider (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, (Custodiol®, НТК, Германия): первая группа – 10 случаев с холодовой

ишемией трансплантата до 240 минут – 140 [140; 150] минут и вторая группа – 7 случаев с холодовой ишемией трансплантата более 240 минут – 375 [245; 375] минут. В обеих группах отмечено преобладание пациентов мужского пола: 1-я группа 8 (80 %) и 2-я группа 6 (85,7 %) человек.

В клинико-морфологический – II этап исследования, вошли 54 пациента с хронической сердечной недостаточностью, которым в 2011–2023 годах в ФГБУ «НМИЦ им. академика Е. Н. Мешалкина» Минздрава России выполнена ТС. Данная операция осуществлялась по классической бикавальной технологии. Изъятие сердца выполнялось стандартным методом, с консервацией холодным кардиopleгическим раствором Bretschneider. В ряде случаев использовались донорские сердца из отдаленных регионов: Алтайский край, Кемеровская область, Красноярский край. Пациенты, в зависимости от длительности холодовой ишемии донорского сердца, были разбиты на 2 группы: 1-я группа (менее 240 минут) – 27 человек (26 мужчин и 1 женщина), возраст 47 [38; 51] лет, длительность холодовой ишемии трансплантата 167 [157–184] минут; 2-я группа (более 240 минут) – 27 человек (20 мужчин и 7 женщин), возраст 42 [32;51] года, длительность холодовой ишемии трансплантата 349 [285; 395] минут. При выполнении данного этапа проведено изучение основных клинико-функциональных показателей дооперационного, интраоперационного и послеоперационного этапов ведения больных, а также выполнена морфологическая оценка степени острого клеточного отторжения взятых в послеоперационном периоде (30 дней) эндомиокардиальных биопсий (Рисунок 1).

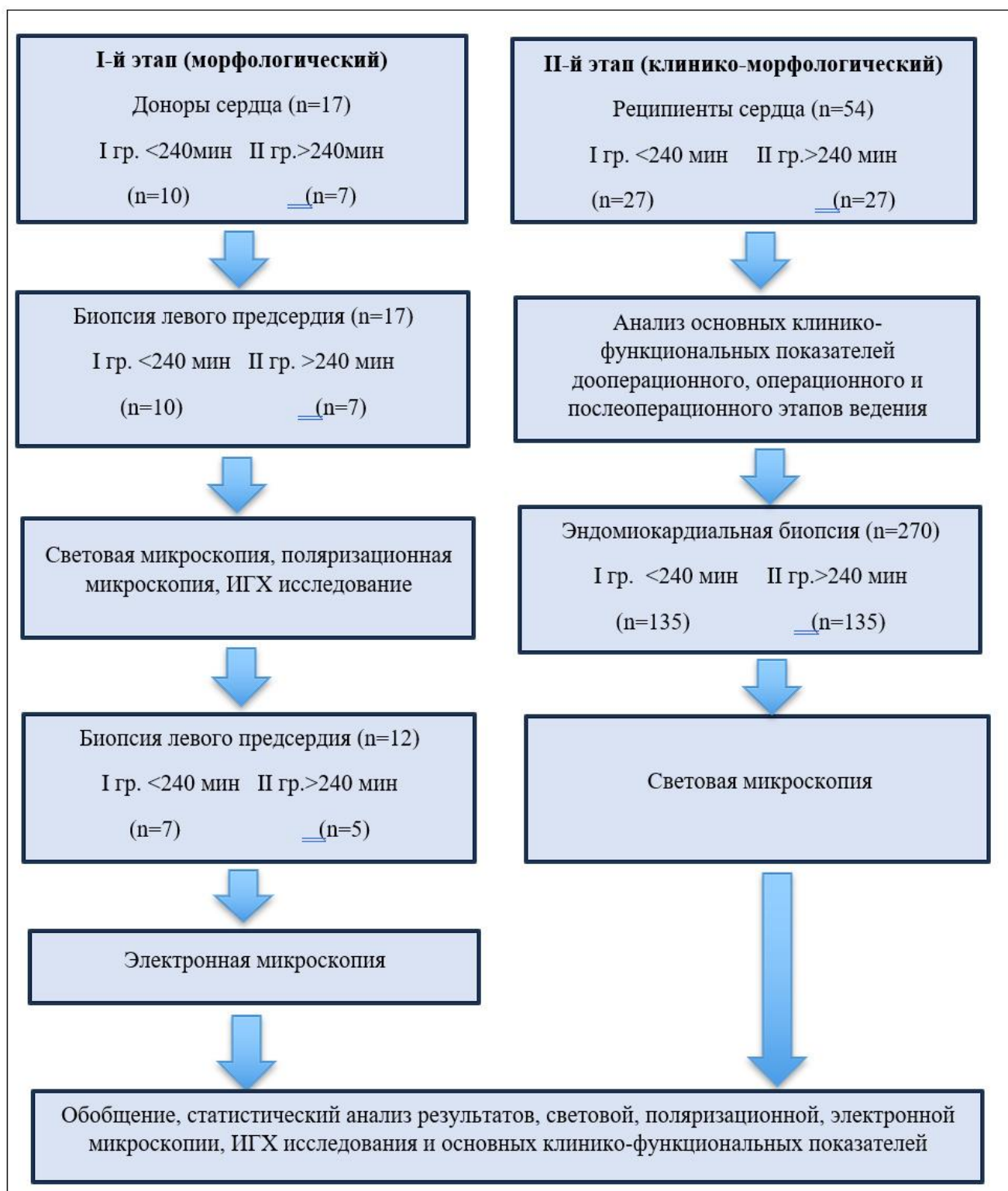


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Световая и поляризационная микроскопия миокарда. Забор образцов миокарда левого предсердия для морфологического исследования производился сердечно-сосудистыми хирургами. Для проведения исследования были сформированы две группы: первая группа – 10 случаев с холодовой ишемией трансплантата до 240 минут – 140 [140; 150] минут, вторая группа – 7 случаев с холодовой ишемией трансплантата более 240 минут – 375 [245; 375] минут.

Пациенты, включенные в первую и вторую группы, были сопоставимы по среднему возрасту и антропометрическим показателям. В обеих группах отмечено преобладание пациентов мужского пола: 1-я группа 8 (80 %) и 2-я группа 6 (85,7 %) человек.

Фиксацию в 10 % нейтральном формалине, проводку и окрашивание парафиновых срезов гематоксилином и эозином проводили согласно имеющимся рекомендациям. Изучение изготовленных микропрепаратов выполняли на универсальном микроскопе Axio Scope.A1 («Zeiss», Германия), оснащенном анализатором и поляризатором, с фотокамерой AxioCam MRc5 («Zeiss», Германия) и программным обеспечением ZEN blue («Zeiss», Германия).

Иммуногистохимическое исследование миокарда. Окрашивание срезов миокарда для проведения иммуногистохимического анализа осуществляли согласно имеющимся предложениям фирмы производителя антител и эталонам, изложенным в руководствах по иммуногистохимическим исследованиям (Buchwalow I., 2010). Морфометрия осуществлялась с применением программы ImageJ 1,7 (США). Определение объемной плотности миофибрилл проводили методом подсчета числа попаданий точек (пересечений тестовых линий) тестовой решетки на профили исследуемых структур в гистологическом срезе. Каждый параметр просчитывали по 20 изображениям с увеличением 40×10 . Для изучения интенсивности степени иммунной реакции использовали полуколичественный метод: (+/+++) с подсчетом числа клеток в случайно выбранных 25 полях зрения (100 %); (–) отсутствие окрашивания; (+) слабая – при окрашивании только цитоплазмы клеток; (++) умеренная – при окрашивании цитоплазмы клеток и очаговом окрашивании внеклеточных компонентов < 50 %; (+++) выраженная экспрессия – (при окрашивании как цитоплазмы клеток, так и большей части внеклеточных компонентов > 50 %) (Лискова Ю. В., 2018). Типы контрактурных повреждений миокарда оценивали согласно рекомендациям (Целлариус Ю. Г. и соавт., 1980; Кактурский Л. В. и соавт., 2008).

Электронная микроскопия кардиомиоцитов. Для электронно-микроскопического анализа ультраструктуры кардиомиоцитов забирались образцы миокарда левого предсердия донорского сердца после холодовой ишемии раствором Bretschneider, которые были получены в условиях операционного блока во время проведения основного этапа операции: от 7 доноров первой группы (холодовая ишемия миокарда менее 240 минут) и 5 доноров второй группы (холодовая ишемия миокарда более 240 минут). После забора фиксацию, проводку и окрашивание срезов осуществляли в соответствии с имеющимися рекомендациями (Уикли Б., 1975). Полутонкие (1 мкм) и ультратонкие (300–500 нм) срезы получали на ультрамикротоме LKB III (Швеция). Полутонкие срезы монтировали на обезжиренные предметные стекла и окрашивали на гистологическом столике (37 °C) в капле 1 % раствора толуидинового синего, затем изучали с помощью микроскопа Axio Scope.A1 (C. Zeiss, Германия) при увеличении $\times 630$.

Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным спиртовым раствором уранилацетата и цитратом свинца в парах щелочи натрия по Рейнольдсу и исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВт и увеличении от 2 до 20 тысяч раз. Тканевый и ультраструктурный стереологический анализ проводили на продольных срезах кардиомиоцитов (по 26 наложений тестовой решетки на группу) с помощью программы ImageJ 1.7. Электронная микроскопия проводилась при консультировании заведующего лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России д-ра биол. наук, профессора С. В. Айдагуловой на базе Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>).

Статистический анализ. Статистический анализ полученных результатов проведен с использованием пакета статистических программ Statistica 10,0 (StatSoft, США) и программного обеспечения MedCalc Statistical Software, version 18.9.1 (<http://www.medcalc.org>; 2018) и пакета RStudio (<http://www.rstudio.com/>). Проверку нормальности распределения полученных данных в группах осуществляли с помощью критерия Шапиро – Уилка. При отсутствии нормального распределения применяли для сравнения методы непараметрической статистики: межгрупповые сравнения данных проводили с помощью критерия Манна – Уитни или с помощью точного критерия Фишера. Количественные переменные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха Me [Q1–Q3], а также минимального (Min) и максимального (Max) показателей в выборке. Качественные переменные – в виде частоты встречаемости и/или процентного отношения. Для оценки выживаемости применили метод Каплана – Мейера, сравнение выживаемости производили с помощью логрангового (log-rank) критерия. Значение $p < 0,05$ считали статистически значимым для всех видов анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка патоморфологических изменений миокарда, экспрессии актина, десмина и Е-кадгерина. В исследовании материала пациентов первой группы, в препаратах миокарда ЛП, окрашенного гематоксилином и эозином, в целом бóльшая часть кардиомиоцитов сохраняла правильное строение со слабо выраженным признаком неравномерного оксифильного окрашивания, характерного для клеток с контрактурой миофибрилл. Во второй группе наблюдалось некоторое расширение околососудистых пространств с отеком стенок интрамуральных артерий с сохранением в части из них паретических изменений с полнокровием и расширением просвета венозного русла. В кардиомиоцитах встречался цитоплазматический отек, который сопровождался неравномерной ее окрашенностью цитоплазмы. При проведении окраски методом ГОФП в обеих группах определялись небольшие

очаги раннего ишемического повреждения. При микроскопическом исследовании в поляризационном свете выявлено наличие контрактурных изменений в мышечных клетках ЛП как 1-й, так и 2-й группы. В основном такие изменения не превышали уровня субсегментарных (сокращения отдельных групп саркомеров миофибрилл кардиомиоцитов) и сегментарных контрактур I-II степени и характеризовались усилением анизотропии диска А, саркомеров с укорочением различной степени изотропных I дисков. Кардиомиоциты со слившимися между собой дисками А в виде гомогенной анизотропии (контрактура III степени) были единичными в обеих группах.

Проведенный иммуногистохимический анализ показал, что в обеих исследуемых группах кардиомиоциты ЛП имеют однородную реакцию окрашивания светло-коричневого цвета с резкими ее перепадами до темно-коричневого цвета в местах вставочных дисков мышечных клеток и на протяжении всего мышечного волокна в области Z-полос. Экспрессия Е-кадгерина при различной продолжительности холодовой ишемии миокарда стабильно присутствует в местах вставочных дисков у пациентов обеих групп.

В разные временные промежутки холодовой ишемии (до 240 минут и более 240 минут) в миокарде прослеживается достаточно стабильная морфологическая динамика уровня экспрессии актина и десмина по показателю объемной плотности (Рисунок 2).

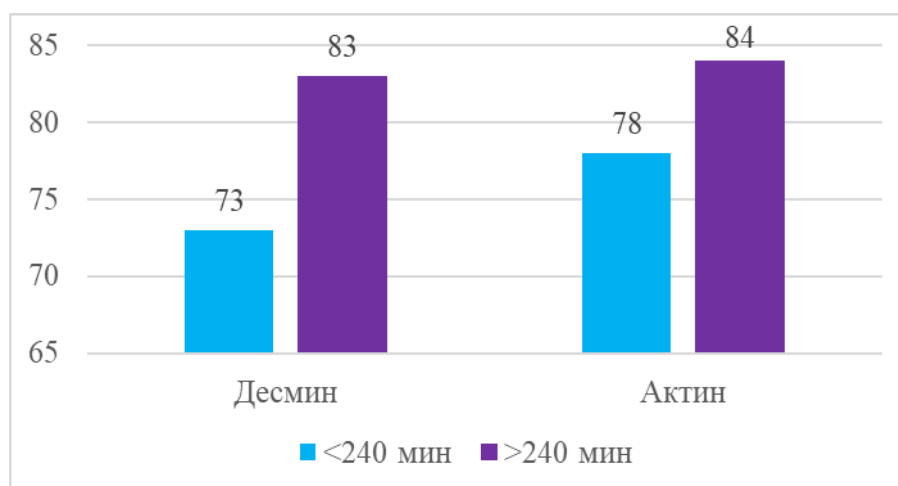


Рисунок 2 – Объемная плотность (%) экспрессии кардиомиоцитами левого предсердия актина и десмина у пациентов с холодовой ишемией миокарда до 240 минут (1-я группа) и более 240 минут (2-я группа)

Проведенное определение данного показателя в срезах миокарда ЛП в сравнении 1-й и 2-й групп показало его небольшое, но статистически значимое увеличение во 2-й группе: десмина в 1,13 раза, актина в 1,07 раза, которое может быть связано с продолжающимся

набуханием мышечных клеток вследствие появления лизисных изменений миофибрилл, а также с отсутствием клеточно-интерстициального обмена при тотальной холодовой ишемии миокарда.

При сравнении двух групп холодовой ишемии (до 240 минут и более 240 минут) по уровню интенсивности экспрессии актина и десмина морфологическая динамика была противоположна. Если показатель иммуногистохимически выявляемого актина и десмина увеличивался одновременно, то значение показателя интенсивности экспрессии по ним носило разнонаправленный характер. Интенсивность экспрессии десмина уменьшалась в 1,6 раза за счет увеличения КМЦ со слабым уровнем интенсивности. Напротив, интенсивность экспрессии актина увеличивалась в 1,5 раза за счет увеличения КМЦ с умеренным и выраженным уровнем интенсивности иммуногистохимической реакции (Рисунок 3).

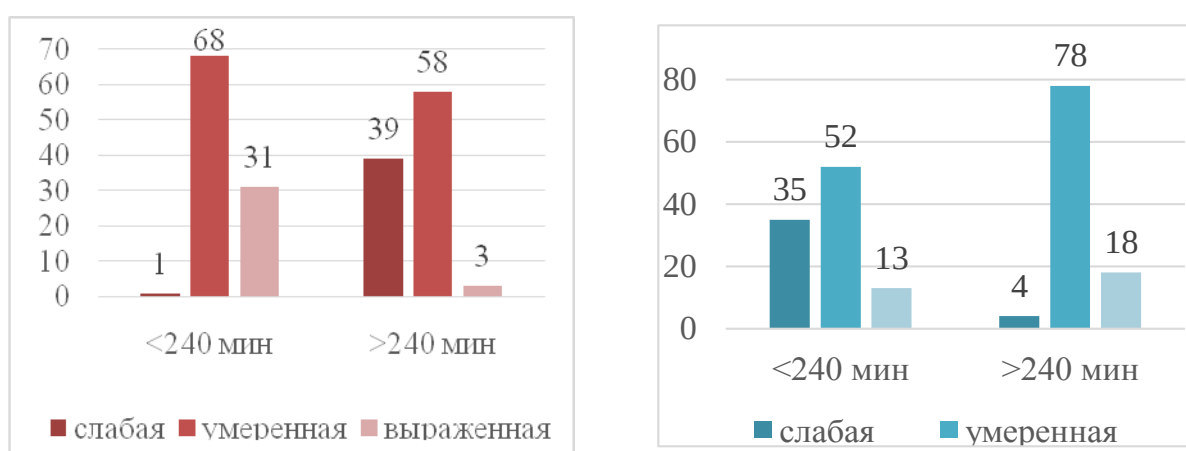


Рисунок 3 – Интенсивность экспрессии (%) кардиомиоцитами левого предсердия актина и десмина у пациентов с холодовой ишемией миокарда до 240 минут (1-я группа) и более 240 минут (2-я группа)

Такое разнонаправленное изменение показателя интенсивности экспрессии изучаемых клеточных белков может быть связано для актина с сократительной структурой мышечной клетки – саркомером, являющимся основной структурной единицей сердечной мышцы и играющего важную роль в эффективной регуляции сердечного ритма и поддержания гемодинамики, а для десмина с участием только компартментов вне саркомерного цитоскелета, обеспечивающих физическую поддержку и структурную целостность клеток сердца. Также стоит отметить, что характер и степень изменения экспрессии десмина могут различаться в разных стадиях и формах ишемического повреждения миокарда. Так в работе Заднипрный И. В. и др. (2017) указывают на достоверное снижение экспрессии десмина при различных формах ишемического повреждения миокарда, но при этом отмечают гетерогенность его присутствия на различных участках – от полного отсутствия реакции кардиомиоцитов на десмин до её усиления в области Z-полос и вставочных дисков.

Тканевый и ультраструктурный анализ биоптатов донорского сердца. Биоптаты ЛП донорских сердец после холодовой ишемии трансплантата в растворе Bretschneider (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Германия): 7 образцов (до 240 мин: Me 140 [Q1 140; Q3 150]) и 5 образцов после продленного периода (более 240 мин: Me 375 [Q1 245; Q3 375]) исследованы с помощью световой микроскопии полутонких срезов и трансмиссионной электронной микроскопии с последующим стереологическим и статистическим анализом. В обеих группах при светооптическом исследовании полутонких срезов биоптатов ЛП выявлены в различной степени выраженные дистрофические изменения большинства кардиомиоцитов, сопровождающиеся отеком периваскулярных межклеточных пространств с выпотом белков крови, а также очаговой или диффузной конденсацией компонентов межклеточного матрикса. Следует отметить, что слабо и умеренно выраженные нарушения структурной организации кардиомиоцитов были заметными лишь при изучении продольных срезов, в отличие от поперечных срезов, на которых особенности сократительного аппарата сердечных мышечных клеток вообще не просматривались. На первый план выступали диффузные контрактурные изменения сердечных миоцитов, обусловленные зонами сокращения миофибрилл 1-2-й степени (обратимыми), но достигающими 3-й степени на единичных полях зрения в образцах 2-й группы, что визуализировалось по ретракции и интенсивной азурофилии цитоплазмы. Кроме того, на продольных срезах некоторых мышечных клеток в обеих группах обращали на себя внимание скопления гетерогенных плотных включений преимущественно в перинуклеарных зонах, которые при электронно-микроскопическом исследовании были расценены как эквиваленты массовой аутофагии по типу митофагии.

При проведении тканевого стереологического исследования на продольных полутонких срезах миокарда оценивали объемную плотность (V_v) паренхимы (кардиомиоцитов) без признаков аутофагии, клеточных фокусов с наличием аутофагосом в цитоплазме, а также показатель стромы (в т.ч. микроциркуляторное русло и межклеточный матрикс). При сравнении первичных стереологических данных, а также полученных на их основе вторичных стереологических показателей (отношения паренхимы к строме и отношения фокусов аутофагии к сердечной паренхиме без аутофагии), статистически значимые различия между двумя группами не выявлены, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния на тканевую организацию миокарда и, следовательно, возможности безопасного продления периода консервации донорского органа (Таблица 1).

Таблица 1 – Первичные стереологические показатели тканевой и внутриклеточной организации донорского миокарда в условиях холодовой ишемии менее 240 мин (1-я группа) и более 240 мин (2-я группа)

Стереологические показатели, V_v	1-я группа Me (Q1; Q3) Min–Max	2-я группа Me (Q1; Q3) Min–Max
Тканевые		
Кардиомиоциты вне зон аутофагии	0,794 (0,775; 0,825) 0,713–0,888	0,800 (0,750; 0,825) 0,725–0,900
Фокусы аутофагии	0,0125 (0,013; 0,025) 0,00125–0,0250	0,0125 (0,0125; 0,0125) 0,00125–0,0250
Строма	0,181 (0,163; 0,213) 0,100–0,275	0,188 (0,163; 0,238) 0,088–0,263
Клеточные (ультраструктурные)		
Миофибриллы	0,444 (0,383; 0,475) 0,284–0,519	0,469 (0,309; 0,512) 0,259–0,543
Митохондрии*	0,117 (0,098; 0,160) 0,074–0,198	0,0988 (0,049; 0,117) 0,025–0,148
Лизосомы и аутофагосомы	0,037 (0,025; 0,086) 0,012–0,235	0,0494 (0,012; 0,074) 0,013–0,136
Саркоплазматическая сеть**	0,0123 (0,0123; 0,0123) 0,0123–0,0247	0,0123 (0,0123; 0,0247) 0,0123–0,0741
Цитозоль	0,370 (0,309; 0,420) 0,235–0,556	0,401 (0,333; 0,463) 0,272–0,568
Примечание. При сравнении 1-й и 2-й групп по критерию Манна – Уитни * – $p = 0,0196$; ** – $p = 0,0106$.		

Также при сравнении первичных стереологических показателей обращало на себя внимание статистически значимое превосходство объемной плотности митохондрий кардиомиоцитов в 1-й группе ($p = 0,0196$, критерий Манна – Уитни) и меньшее – саркоплазматической сети ($p = 0,0106$) при относительном равенстве показателей других органелл и цитозоля. При отсутствии различий между группами в объемной плотности миофибрилл выявлена статистическая значимость вторичного стереологического параметра – показателя «насыщенности» миофибрилл митохондриями, вычисляемого как отношение объемной плотности митохондрий к объемной плотности миофибрилл: она принимала более

высокие значения в образцах 1-й группы ($p = 0,0019$), т. е. с меньшей продолжительностью холодовой ишемии.

Оценка клинико-функциональных показателей реципиентов с холодовой ишемией миокарда до 240 минут и более 240 минут. Характеристика основных исходных клинико-функциональных показателей на дооперационном этапе. Для изучения основных клинико-функциональных характеристик на до-, операционном и послеоперационном этапах ведения нами подвергнуто ретроспективному комплексному анализу 54 пациента (реципиента): 46 мужчин и 8 женщин, которым в ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е. Н. Мешалкина» Минздрава России в период с июля 2011 года по октябрь 2023 года была выполнена ТС. В зависимости от длительности времени холодовой ишемии трансплантата пациенты разделены на две группы. В первую группу исследования включены 27 реципиентов с холодовой ишемией донорского сердца < 240 мин, во вторую группу 27 реципиентов с холодовой ишемией донорского сердца > 240 мин. Возраст доноров варьировал от 23 до 56 лет, медиана возраста во второй группе – 40 [34; 46] лет, в первой группе – 43 [40; 51] года. Изъятие сердца выполнялось стандартным методом, с консервацией охлажденным кардиopleгическим раствором Bretschneider (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Германия). ТС была выполнена по классической бикавальной технологии.

Средний возраст, антропометрические показатели, наличие сопутствующей патологии не различались в исследуемых группах. В обеих группах было отмечено преобладание пациентов мужского пола: в первой группе 26 (96 %), во второй 20 (74 %) человек. Механическая поддержка кровообращения в виде имплантации системы обхода левого желудочка INCOR в качестве «моста» к трансплантации выполнялась 8 пациентам (по 4 случая в каждой группе). Проведенная посредством трансторакальной эхокардиографии оценка функции и объемных характеристик камер сердца реципиента, давления в легочной артерии не показала различий основных показателей в исследуемых группах: фракция выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ), (%) при длительности холодовой ишемии до 240 минут и более 240 минут составила соответственно 20 (19–26) и 22 (19–25) ($p = 0,444$); фракционное изменение площади правого желудочка (ФИП ПЖ)(%) 30 (25–35) и 31 (26–34) ($p = 0,267$) и систолическое давление в легочной артерии (мм рт. ст.) 45 (36–49) и 39 (31–48) ($p = 0,153$).

Характеристика основных клинико-функциональных показателей в интраоперационном и раннем послеоперационном этапах. У пациентов 1-й группы длительность холодовой ишемии составила 167 (157–184); минимально – 135 мин, максимально – 230 мин, у пациентов 2-й группы – 349 (285–395) мин; минимально – 240 мин, максимально – 456 мин ($p < 0,001$). Показатели интраоперационного периода, длительность искусственного кровообращения, длительность окклюзии аорты, общая длительность операции не различались

в исследуемых группах. Среди показателей раннего послеоперационного периода обращает на себя внимание различие в уровне инотропной поддержки, который был достоверно выше во второй группе, чем в первой: 96 (57–139) против 56 (34–77) часов, $p = 0,014$. Необходимость в продолжении механической поддержки сердца в раннем послеоперационном периоде во второй группе с длительной ишемией трансплантата возникла у 5 пациентов (18,5 %), в первой группе с холодовой ишемией миокарда менее 240 минут – у 2 пациентов (7,5 %). Оценка функции и объемных характеристик камер сердца реципиента, давления в легочной артерии показала статистически значимое повышение по отношению к исходному значению в обеих исследуемых группах таких показателей, как ФВ ЛЖ и ФИП ПЖ: первая группа 60,5 % (57–65) и 41 % (39–43), вторая группа 61 % (56–66) и 39 % (35–42) соответственно.

Характеристика основных клинико-функциональных показателей в отдаленные сроки наблюдения. Отдаленный период наблюдения после ТС составил 30 дней (Таблица 3). Большинство пациентов относились к III ФК по классификации NYHA: в первой группе 22 (88,0 %), во второй группе 20 (80,0 %) случаев. В то же время в сравнении с исходными данными улучшили свой ФК и перешли из III во II класс соответственно 4 (14,8 %) пациентов первой группы и 6 (22,2 %) второй группы. Сократительная способность миокарда, показатель систолического давления в легочной артерии в 30-дневном периоде после ТС соответствовали нормальным значениям, без значимых отличий между группами: ФВ ЛЖ (%) при длительности холодовой ишемии до 240 минут и более 240 минут составила соответственно: 65 (61–66) и 64 (59–67) ($p = 0,521$); ФИП ПЖ, (%) 45 (40–46) и 45 (40–46) ($p = 0,523$); систолическое давление в легочной артерии (мм рт. ст.) 31 (28–35) и 33 (32–36) ($p = 0,545$).

Оценка степени острого клеточного отторжения. Забор эндомикардиальных биоптатов из межжелудочковой перегородки со стороны полости правого желудочка проводился в отделении рентгенфункциональных методов диагностики. За одну процедуру брали 5 образцов. За 30-дневный период наблюдения было взято 270 биоптатов (по 135 в каждой группе). По результатам гистологического исследования эндомикардиальной биопсии, в течение месяца в динамике изменения степени острого клеточного отторжения у больных как в первой, так и во второй исследуемых группах наблюдались равнонаправленные положительные тенденции. Стоит отметить, что в результатах первой биопсии в обеих группах доминировала легкая степень G1R – 25 (92,5 %) в 1-й группе и 21 (77,8 %) случаев во 2-й группе, при этом в последней были выше показатели степени G0R – 3 (11,1 %) против 1 (3,7 %) случая 1-й группы. Степень G3R была отмечена однократно у 1 (11,1 %) больного 1-й группы.

К 30-дневному сроку наблюдения у пациентов 1-й группы степень отторжения G0R была выявлена у 3 пациентов (11,1 %), G1R – у 22 пациентов (81,5 %). Степени G2R и G3R не встречались. Во 2-й группе степень отторжения G0R была выявлена у 2 пациентов (7,5 %), G1R

– у 21 пациента (77,8 %). Степень G2R встречалась в 2 случаях (7,5 %), степень G3R не была диагностирована.

Госпитальная выживаемость в обеих группах составила по 92,5 % ($n = 25$), при летальных 2 (7,5 %) случаях в каждой, при степени отторжения, не превышающей G1R. По данным анализа выживания Каплана – Мейера разницы между группами не выявлено (логарифмический ранг, $P = 1/4 \ 0,5025$). При этом причиной летальности в 1-й группе в обоих случаях являлась развившаяся пневмония. Во второй группе причиной смерти в одном из случаев явилось случившееся послеоперационное кровотечение, в другом случае инфаркт мозга. Все умершие пациенты относились ко второму классу ургентности в соответствии с рекомендациями UNOS (United Network of Organ Sharing, 1989 год).

ВЫВОДЫ

1. При различных сроках холодовой ишемии (до 240 минут и более 240 минут) структурная организация миокарда донорского сердца характеризуется мозаичностью изменений, обусловленной контрактурными I-II степени и менее выраженными литическими изменениями кардиомиоцитов, сопровождающимися отеком стромы миокарда и не имеет статистически значимых отличий в обеих группах по данным стереологического исследования.

2. Иммуногистохимическое исследование миокарда, проведенное при различных сроках холодовой ишемии, выявило стабильную экспрессию E-кадгерина в кардиомиоцитах обеих исследуемых групп.

3. В разные временные промежутки холодовой ишемии прослеживается стабильная морфологическая динамика уровня экспрессии актина и десмина в кардиомиоцитах по показателю объемной плотности: в группе с длительностью холодовой ишемии миокарда более 240 минут характеризуется минимальным, но статистически значимым увеличением десмина (в 1,13 раза), актина в 1,07 раза ($p < 0,05$). Интенсивность экспрессии актина и десмина в кардиомиоцитах носила разнонаправленный характер в исследуемых группах: уменьшение десмина в 1,6 раза в группе с длительностью более 240 мин по сравнению с группой с длительностью ишемии до 240 минут за счет увеличения числа кардиомиоцитов со слабым уровнем интенсивности экспрессии; увеличение актина за счет повышенного в 1,5 раза количества кардиомиоцитов с умеренной и выраженной интенсивностью, что свидетельствует о достаточно высокой степени сохранности структурного резерва миокарда для восстановления адекватной сердечной деятельности после трансплантации сердца.

4. Сравнительное исследование биоптатов левого предсердия донорских сердец в условиях стандартного и продленного периода холодовой ишемии выявило стереотипные дистрофические изменения кардиомиоцитов на тканевом и ультраструктурном уровне. При холодовой ишемии миокарда менее 240 минут значимо доминировала объемная плотность

митохондрий кардиомиоцитов (V_v) 0,117 (0,098; 0,160) ($p = 0,0196$, критерий Манна – Уитни) и в меньшей степени – саркоплазматической сети 0,0123 (0,0123; 0,0123) ($p = 0,0106$) при относительном равенстве показателей других органелл и цитозоля. Отношение объемной плотности митохондрий к объемной плотности миофибрилл имеет более высокие значения также в группе с холодовой ишемией миокарда менее 240 минут ($p = 0,0019$).

5. Длительность холодовой ишемии трансплантированного сердца не влияет на степень острого клеточного отторжения: в отдаленном 30-дневном послеоперационном периоде пациенты с длительностью холодовой ишемии сердца до 240 минут и более 240 минут имели одинаково высокую выживаемость (92,5 %), преимущественно легкую степень (G1R) клеточного отторжения (81,5 % и 77,8 % соответственно) со стабильно высокими показателями сердечной гемодинамики.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты выполненного клинико-морфологического комплексного исследования могут быть использованы в практической работе патологоанатомических отделений кардиохирургических центров, выполняющих трансплантацию сердца, при исследовании операционных образцов миокарда донорского сердца (левого предсердия), взятых на основном этапе операции для прогноза степени ишемического повреждения после предшествующей холодовой ишемии.

2. Применение донорских сердец с длительной холодовой ишемией (более 240 минут) в условиях дефицита донорских органов является эффективным приемом для увеличения числа трансплантаций и снижения смертности пациентов, ожидающих пересадку в «листе ожидания».

3. Полученные данные о структурных изменениях миокарда могут быть информативными для понимания особенностей патогенеза развития ишемических повреждений миокарда при различных сроках холодовой ишемии, а также для разработки перспективных методов консервации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Среднесрочные и отдаленные результаты трансплантации сердца с длительной холодовой ишемией / А. В. Фомичев, В. Н. Попцов, Д. А. Сирота [и др., в том числе **В. Е. Кливер**] // **Вестник трансплантологии и искусственных органов**. – 2023. – Т. 25, № 1. – С. 99–105.

2. Влияние продолжительности холодовой ишемии трансплантата на степень клеточного отторжения и исход операции трансплантации сердца / **В. Е. Кливер**, А. П. Надеев, А. В. Фомичев [и др.] // **Дальневосточный медицинский журнал**. – 2023. – № 1. – С. 31–36.

3. Морфологическая оценка экспрессии актина и десмина при различных сроках холодовой ишемии миокарда: наблюдательное исследование / **В. Е. Кливер**, А. М. Волков, А. П. Надеев [и др.] // **Кубанский научный медицинский вестник**. – 2024. – Т. 31, № 1. – С. 15–26.
4. Морфологическая оценка экспрессии Е-кадгерина в кардиомиоцитах донорского сердца при различных сроках холодовой ишемии миокарда / **В. Е. Кливер**, А. П. Надеев, А. В. Фомичев [и др.] // **Journal of Siberian Medical Sciences**. – 2024. – № 8 (2). – С. 102–113.
5. Комплексная патоморфологическая оценка биоптатов донорского сердца при использовании раствора кустодиол / **В. Е. Кливер**, А. П. Надеев, А. М. Волков [и др.] // **Сибирский медицинский вестник**. – 2024. – Т 8, № 3. – С. 13–18.
6. Тканевый и ультраструктурный анализ биоптатов донорского сердца в условиях продления периода холодовой ишемии / А. П. Надеев, **В. Е. Кливер**, А. М. Волков [и др.] // **Архив патологии**. – 2024. – Т. 86, № 5. – С. 33–41.
7. **Кливер, В. Е.** Сравнительная характеристика степени клеточного отторжения у пациентов с различной длительностью холодовой ишемии миокарда / **В. Е. Кливер** // Материалы XIII Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна–2022». – Новосибирск, 2022. – Т. 2 – С. 381–382.
8. Влияние длительной холодовой ишемии миокарда на степень клеточного отторжения после ортотопической пересадки сердца / А. П. Надеев, **В. Е. Кливер**, А. В. Фомичев [и др.] // Материалы VI съезда Российского общества патологоанатомов. – Новосибирск, 2022. – С. 117–119.
9. Сравнительная характеристика степени клеточного отторжения у пациентов с различной длительностью холодовой ишемии миокарда / А. В. Фомичев, **В. Е. Кливер**, Д. В. Доронин [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т. 24, № 5. – С. 40.
10. **Кливер, В. Е.** Результаты долгосрочного наблюдения пациентов после ортотопической трансплантации сердца и влияния на них длительности холодовой ишемии трансплантата / **В. Е. Кливер** // Материалы XIV Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна–2023». – Новосибирск, 2023. – Т. 2. – С. 431–432.
11. **Кливер, В. Е.** Патоморфология кардиомиоцитов и экспрессия актина и десмина и при различных сроках холодовой ишемии миокарда / **В. Е. Кливер** // Материалы VII Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки – фундаментальная основа медицины»,

посвящённой 100-летию со дня рождения профессора Н. В. Донских. – Новосибирск, 2023. – С. 213–216.

12. **Кливер, В. Е.** Сравнительная оценка экспрессии актина и десмина в миокарде донорского сердца с различной длительностью холодовой ишемии / **В. Е. Кливер** // Материалы XV Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна-2024». – Новосибирск, 2024. – Т. 2. – С. 67–68.

13. **Кливер, В. Е.** Продленная холодовая ишемия миокарда более 240 минут: тканевый и ультраструктурный анализ биоптатов донорского сердца / **В. Е. Кливер, А. П. Надеев** // Материалы VIII Всероссийская научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы патологоанатомической практики. – Челябинск, 2024. – Т. 2. – С. 113–116.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АД	артериальное давление
АСТ	активированное время свертываемости
КДО	конечно-диастолический объем
КСО	конечно-систолический объем
ЛДГ	лактатдегидрогеназа
СН	сердечная недостаточность
ТС	трансплантация сердца
ЛП	левое предсердие
ФИП ПЖ	фракционное изменение площади правого желудочка
ФК	функциональный класс
ФВ	фракция выброса
ЦВД	центральное венозное давление
ЧСС	частота сердечных сокращений
ЭМБ	эндомиокардиальная биопсия