

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

## ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ И РЕЦЕПТОРОВ КОМПЛЕМЕНТА В ДИАГНОСТИКЕ ОТТОРЖЕНИЯ ТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО СЕРДЦА

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

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

### АННОТАЦИЯ

**Цель.** Оценить изменения экспрессии молекул клеточной адгезии и рецепторов комплемента при отторжении сердечного трансплантата с использованием компьютерной морфометрии для улучшения эндомикардиальной биопсийной диагностики.

**Материалы и методы.** Для исследования использовали эндомикардиальные биоптаты 20 пациентов, перенесших трансплантацию сердца. Гистологические срезы были окрашены по стандартной методике гематоксилином и эозином, а также непрямым иммуногистохимическим методом с детекцией АВС на CD21 и CD31. Методом компьютерной морфометрии в биоптате оценивали площадь положительной реакции.

**Результаты.** Все биоптаты разделены по степеням отторжения следующим образом: степень 0R – 8 образцов, 1R – 10 образцов, 2R – 7 образцов, 3R – 4 образца. Экспрессия CD21 составляет 0,31% в образцах с 0R, 1,09% при 1R, при отторжении 2R – 2,01%, а для 3R – уже 4,15%. Занимаемая CD31-позитивными клетками площадь составляет 3,49% для биоптатов с 0R, при отторжении 1R этот показатель уменьшается в 1,3 раза, в биоптатах с 2R этот показатель меньше в 1,8 раза, а для образцов с 3R – в 2,6 раза.

**Заключение.** Определение содержания CD21-позитивных клеток в миокарде позволяет сделать прогноз развития кардиосклероза, а также склонность к хроническому клиническому течению реакции отторжения. Экспрессия CD31 дает возможность оценить состояние сосудов микроциркуляторного русла в трансплантированном органе, что также важно для предупреждения сердечной недостаточности.

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

**Для цитирования:** Веревкин А.А., Славинский А.А., Космачева Е.Д., Ставенчук Т.В. Экспрессия молекул клеточной адгезии и рецепторов комплемента в диагностике отторжения трансплантированного сердца. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2018; 25(2): 58-62. DOI: 10.25207 / 1608-6228-2018-25-2-58-62

**For citation:** Verevkin A.A., Slavinskiy A.A., Kosmacheva E.D., Stavenchuk T.V. Expression of cell adhesion molecules and complement receptors in diagnostics of transplanted heart rejection. *Kubanskiy nauchnyj medicinskiy vestnik*. 2018; 25(2): 58-62. (In Russ., English abstract). DOI: 10.25207 / 1608-6228-2018-25-2-58-62

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

### EXPRESSION OF CELL ADHESION MOLECULES AND COMPLEMENT RECEPTORS IN DIAGNOSTICS OF TRANSPLANTED HEART REJECTION

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

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

### ABSTRACT

**Aim.** Characterization of the changes in expression of cell adhesion molecules and complement receptors in the transplanted heart rejection using computer morphometry to improve the quality of endomyocardial biopsy diagnostics.

**Materials and methods.** Endomyocardial biopsies of 20 patients undergoing cardiac transplantation were used. Histological

sections were stained using a standard procedure with hematoxylin and eosin, as well as an indirect immunohistochemical method with the ABC detection system against CD21 and CD31. The area of the positive reaction was estimated with computer morphometry.

**Results.** All biopsies are divided according to the degrees of rejection as follows: degree 0R – 8 samples, 1R – 10 samples, 2R – 7 samples, 3R – 4 samples. CD21 expression is 0.31% in samples with 0R, 1.09% at 1R, 2R rejection of 2.01%, and for 3R – 4.15%. The area occupied by CD31-positive cells is 3.49% in 0R, at 1R rejection this index decreases by 1.3 times, in biopsy samples with 2R this index is 1.8 times less, and for samples with 3R it decreases by 2.6 times.

**Conclusion.** Evaluation of CD21-positive cells in the myocardium allows us to predict cardiosclerosis, as well as a tendency to a chronic clinical course of the rejection. Expression of CD31 makes it possible to assess condition of the microcirculatory vessels in the graft, which is also important for the heart failure prevention.

**Keywords:** endomyocardial biopsy; transplanted heart rejection; computer morphometry

## Введение

Отторжение трансплантированного сердца (ОТС) – состояние, существенно лимитирующее продолжительность и качество жизни реципиентов. Своевременное выявление этого патологического процесса позволяет скорректировать иммуносупрессивную терапию и таким образом предотвратить отказ донорского органа и увеличить выживаемость пациентов после трансплантации [1]. Учитывая большое количество операций по пересадке сердца, проводимых ежегодно в России и в мире [2], диагностика ОТС представляется чрезвычайно актуальной проблемой.

«Золотой стандарт» верификации реакции отторжения – эндомикардиальная биопсия (ЭМБ) с доступом через вену (чаще всего, бедренную) и забором кусочков ткани из межжелудочковой перегородки [3]. В дальнейшем полученные фрагменты ткани подлежат гистологическому и иммуногистохимическому исследованию. Общепринятая на сегодняшний день классификация ОТС, предложенная Международным сообществом трансплантации сердца и легких (ISHLT, 2010) [4], включает в себя четыре степени тяжести клеточного отторжения: Нулевая (0R, отсутствие лимфоцитарной инфильтрации и очагов повреждения кардиомиоцитов), Первая (1R, инфильтрат в интерстиции и периваскулярном пространстве, а также один локус миоцитарного поражения), Вторая (2R, несколько локусов повреждения кардиомиоцитов и инфильтрации), Третья (3R, инфильтрация миокарда лимфоцитами, эозинофилами и макрофагами носит диффузный характер, отмечается выраженный миоцитоз). Кроме того, различают антитело-опосредованное отторжение (Antibody-mediated rejection, AMR), для которого характерно наличие активированных макрофагов, отек стромы, а также депозиты компонентов компонента C3d и C4d по данным иммуногистохимического исследования [5].

Несмотря на общую тенденцию последних лет к разработке и внедрению неинвазивных методов диагностики ОТС, продолжают исследования и по уточнению и дополнению патогистологических критериев отторжения, в том числе поиск новых иммуногистохимических маркеров данного патологического процесса. Одними из возможных

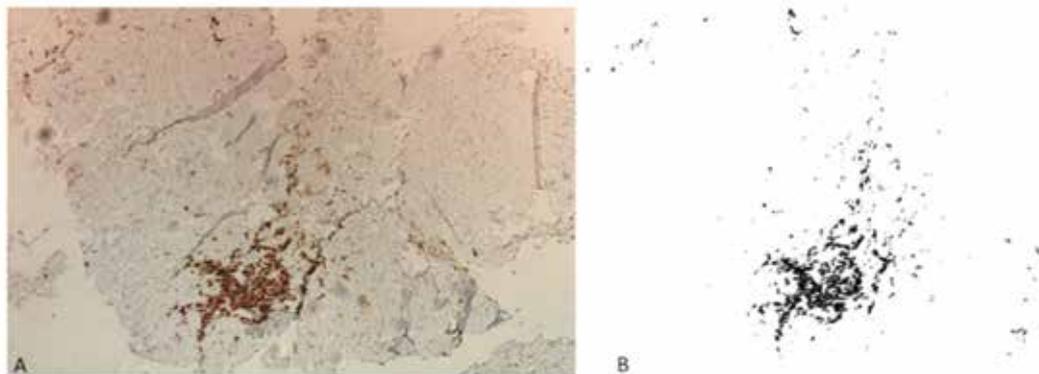
кандидатов на эту роль служат белки, образующие лимфоцитарный корецепторный комплекс (CD21) и тромбоцитарно-эндотелиальные молекулы клеточной адгезии первого типа (PECAM-1, или CD31).

**Цель исследования:** оценить изменения экспрессии маркеров CD21 и CD31 при отторжении сердечного трансплантата с использованием компьютерной морфометрии для повышения качества гистологической диагностики.

## Материалы и методы

В исследовании использовали 29 эндомикардиальных биоптатов от 20 пациентов (15 мужчин, 5 женщин; средний возраст 49 лет), которые перенесли ТС в Центре грудной хирургии НИИ ККБ №1 им. проф. С.В. Очаповского. Взятые кусочки миокарда зафиксировали в течение 24 часов в 10% растворе нейтрального забуференного формалина, после чего провели в парафин по стандартной методике с применением гистопроцессора STP120-2 (Thermo Scientific, США). Парафиновые блоки изготовили с помощью модульной установки EG1150H (Leica, Германия). В дальнейшем для приготовления срезов использовали ротационный микротом Rotary 3003 (PFM medical, Германия). Срезы толщиной 5 мкм помещали на предметное стекло, после чего подвергали депарафинизации и регидратации по общепринятой методике с применением ксилола и батареи спиртов нисходящей концентрации. Затем срезы окрашивали гематоксилином-эозином по стандартному протоколу, а также непрямым стрептавидин-биотиновым иммуногистохимическим методом с HRP-бензидином в качестве системы детекции (сыворотки anti-CD21 clone LT21 и anti-CD31 clone WM59, Sigma Aldrich, США) и, используя синтетическую монтирующую среду, заключали под покровное стекло.

Микроскопию и фотографирование полученных гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Olympus CX 41 (Япония). Морфометрический анализ выполняли с помощью распространяемого по GNU GPL программного обеспечения ImageJ (US National Institutes of Health, США) на фотографиях препаратов с увеличением окуляра x10 и объективов x20 и x40. Измерение площади биоптата выполняли во всех



**Рис. 1.** Компьютерная обработка изображений с помощью приложения ImageJ. А – исходное изображение. В – результат бинаризации изображения после подстройки чувствительности. Черным цветом окрашены CD21-позитивные клетки.

**Fig. 1.** Computer processing of images with program ImageJ. A – original image. B – result of binarization after threshold leveling. Black color means CD21-positive cells.

случаях. Для препаратов после иммуногистохимической реакции оценивали площадь положительно прореагировавшей области.

Цифровая обработка включала в себя последовательное подавление цветового канала, бинаризацию с заданием порога чувствительности и оценку площади окрашенных объектов. (рис. 1). Для количественной оценки результатов нами предложен показатель под названием процент площади (ПП), равный отношению площади прореагировавшей области к площади биоптата [6].

### Результаты и обсуждение

В зависимости от тяжести отторжения, биоптаты разделили следующим образом: нулевая степень (0R) диагностирована в 8 случаях; к первой степени (1R) отнесено 10 биоптатов; в 7 образцах наблюдается вторая степень (2R); к третьей степени (3R) отнесено 4 биоптата. Для препаратов, входящих в каждую из вышеперечисленных групп, определяли размеры области, давшей положительную иммуногистохимическую реакцию. Данные о маркерах CD21 и CD31 представлены в таблице.

Экспрессия CD21 повышается с нарастанием степени тяжести отторжения (рис. 2). Так, составляя всего 0,31% в образцах с 0R, она повышается для пациентов с 1R в 3,5 раза, при отторжении 2R – в 6,5 раз, а для 3R – уже в 13,4 раза.

Интересна динамика экспрессии тромбоцитарно-эндотелиальной молекулы клеточной адгезии.

Этот показатель снижается с повышением выраженности иммунного воспалительного процесса в миокарде: так, в биоптатах пациентов без отторжения занимаемая CD31-позитивными клетками площадь составляет 3,49%, при отторжении 1R этот показатель уменьшается в 1,3 раза, в биоптатах с 2R этот показатель меньше в 1,8 раза, а для образцов с 3R – в 2.6 раза. На рисунке 3 представлены сводные данные об экспрессии CD21 и CD31 в миокарде.

Данный график отражает характер зависимости между тяжестью реакции отторжения и экспрессией маркеров CD21 и CD31. С нарастанием выраженности иммунного воспаления также увеличивается и площадь положительной реакции на рецептор комплемента второго типа. В то же время число CD31-позитивных клеток будет тем меньше, чем выше интенсивность реакции отторжения.

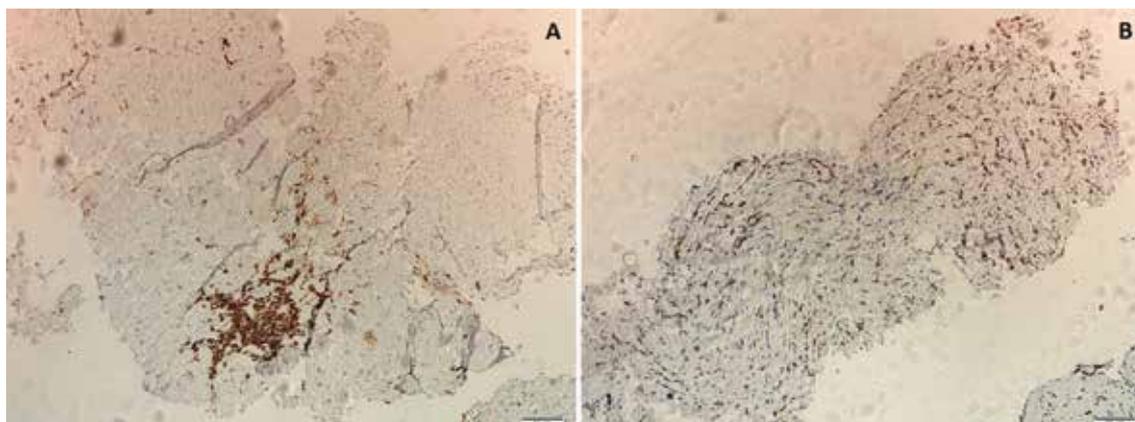
Рецептор комплемента второго типа (CD21) располагается на поверхности В- и (в меньшей степени) Т-лимфоцитов и участвует в связывании компонентов комплемента C3b, C3d и C3dg. В ассоциации с молекулами CD19 и CD27 он образует так называемый В-лимфоцитарный корецепторный комплекс [7]. Повышение его экспрессии напрямую связано с увеличением тяжести воспалительной реакции, что и наблюдалось в нашем исследовании. По имеющимся в литературе данным, увеличение содержания CD21-позитивных клеток напрямую связано с дальнейшим развити-

Таблица / Table

### Процент площади, занимаемой CD21- и CD31-позитивными клетками в биоптате, по данным компьютерной морфометрии

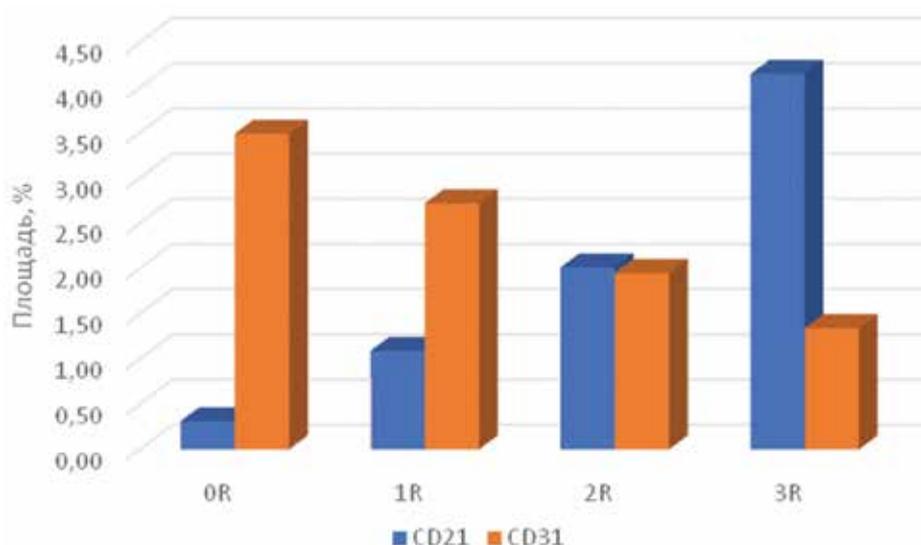
Area percentage of CD21- and CD31-positive cells according to computer morphometry

Степень тяжести отторжения	Площадь (M±m), %	
	CD21	CD31
0R (n=8)	0,31±0,01	3,49±0,12
1R (n=10)	1,09±0,08	2,72±0,09
2R (n=7)	2,01±0,10	1,95±0,05
3R (n=4)	4,15±0,20	1,34±0,10



**Рис. 2.** Экспрессия маркера CD21 в биоптате при отторжении 1R (A) и 3R (B). Инфильтрат в первом случае имеет очаговый, а во втором – диффузный характер. Непрямая иммуногистохимическая реакция. Увеличение: ок. 10х., об. 20х.

**Fig. 2.** CD21 expression in myocardium with 1R (A) and 3R (B) rejection. Focal infiltration in case A and diffuse infiltration in case B is observed. Indirect immunohistochemistry. Magnification: app. x10, obj. x20.



**Рис. 3.** Экспрессия маркеров CD21 и CD31 в эндомикардиальном биоптате в зависимости от тяжести реакции отторжения.

**Fig. 3.** CD21 and CD31 expression in endomyocardial biopsy depending on rejection severity.

ем выраженного фиброза в изучаемом органе [8]. Кроме того, наличие его на поверхности клеток тормозит процесс апоптоза В-лимфоцитов, что дополнительно усугубляет воспалительную реакцию [9].

Тромбоцитарно-эндотелиальная молекула клеточной адгезии первого типа (Platelet/endothelial cell adhesion molecule – 1, PECAM-1, или CD31) служит одной из главных молекул межклеточных контактов эндотелиальных клеток [10]. Кроме того, данный белок обеспечивает взаимодействие лейкоцитов с эндотелием на начальных этапах воспалительной реакции. В меньших количествах CD31 экспрессируется на поверхности тромбоцитов и Т-лимфоцитов, а также дендритных клеток. Распределение CD31-позитивных клеток в нашем исследовании соответствовало расположению кровеносных сосудов в миокарде, что соотносится с данными литературы [11], уменьшение же его экспрессии с нарастанием выраженности отторжения, по-видимому, означает повреждение

эндотелия в ходе воспалительной реакции. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что угнетение функции PECAM способствует ишемическому повреждению органа [12]. В нашем случае это означает развитие болезни коронарных сосудов пересаженного сердца (БКАПС), представляющей серьезную угрозу функционированию трансплантата [13].

### Заключение

Таким образом, определение содержания CD21-позитивных клеток в миокарде позволяет сделать прогноз развития кардиосклероза, а также установить хронический характер течения реакции отторжения. Связано это с тем, что длительное время персистирующие в миокарде В-лимфоциты вырабатывают цитокины и антитела, поддерживающие воспалительную реакцию и ремоделирование сердца. Экспрессия CD31 дает возможность оценить состояние эндотелия микрососудов миокарда, в частности, функции межкле-

точного взаимодействия. Поскольку коронарные артерии повреждаются при развитии ОТС в первую очередь, а их дисфункция приводит к дополнительному ишемическому поражению миокарда, оценка состояния микроциркуляторного русла имеет важное значение для предупреждения сердечной недостаточности.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Urbanowicz T., Baszyńska-Wachowiak H., Ligowski M. et al. Comparison of conventional tacrolimus versus prolong release formula as initial therapy in heart transplantation. *Ann Transplant.* 2014; 19: 295-99. DOI: <http://dx.doi.org/10.20883/jms.2016.125>.
- Барбухатти А. О., Космачева Е. Д., Кижватова Н. В. и др. Первый опыт трансплантации сердца в Краснодарском крае. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2014; 14 (3): 42-47. [Barbukhatti A.O, Kosmacheva E.D., Kizhvatova N.V. et al. First experience with heart transplantation in Krasnodar region. *Russian journal of transplantology and artificial organs.* 2014; 14 (3): 42-47. (In Russ., English abstract)].
- Васичкина Е.С., Митрофанова Л.Б., Татарский Р.Б. и др. Эндомиокардиальная биопсия у взрослых и детей. *Вестник аритмологии.* 2014; 76: 37-40. [Vasichkina E.S., Mitrofanova L.B., Tatarsky R.B. et al. Endocardial biopsy in adults and pediatric patients. *Journal of arrhythmology.* 2014; 76: 37-40. (In Russ., English abstract)].
- Berry G.J., Angelini A, Burke M.M. et al. The ISHLT working formulation for pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation: evolution and current status (2005–2011). *J Heart Lung Transplant.* 2011; 30: 601-611. DOI: 10.1016/j.healun.2011.02.015.
- Berry G.J., Burke M.M., Anderson C. et al: The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody – mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Transplant.* 2013; (32)12: 1147-61.
- Веревкин А.А., Славинский А.А., Космачева Е.Д., Ставенчук Т.В. Патоморфологические признаки повреждения миокарда при отторжении трансплантированного сердца. Ку-

банский научный медицинский вестник. 2017; 24(6): 27-31. [Verevkin A.A., Slavinskiy A.A., Kosmacheva E.D., Stavenchuk T.V. Pathomorphological signs of myocardium lesion in transplanted heart rejection. *Kubanskij nauchnyj medicinskiy vestnik.* 2017; 24(6): 27-31. (In Russ., English abstract)] DOI: 10.25207 / 1608-6228-2017-24-6-17-21.

- Thorarinsdottir K, Camponeschi A, Cavallini N, Grimsholm O, Jacobsson L, Gjertsson I, Mårtensson I L. CD21(-/low) B cells in human blood are memory cells. *Clin Exp Immunol.* 2016; 185(2): 252-62. DOI: 10.1111/cei.12795.

- Doi H., Tanoue S., Kaplan D.E. Peripheral CD27-CD21-B-cells represent an exhausted lymphocyte population in hepatitis C cirrhosis. *Clin Immunol.* 2014; 150(2): 184-91. DOI: 10.1016/j.clim.2013.12.001.

- Mitreviski M., Marrapodi R., Camponeschi A., Lazzeri C., Todi L., Quinti I., et al. Intravenous immunoglobulin replacement therapy in common variable immunodeficiency induces B cell depletion through differentiation into apoptosis-prone CD21(low) B cells. *Immunol Res.* 2014; 60(2-3): 330-8. DOI: 10.1007/s12026-014-8599-8.

- Newman P.J., Berndt M.C., Gorski J., et al. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science.* 1990; 247(4947): 1219-22.

- Lertkiatmongkol P., Liao D., Mei H., Hu Y., Newman P.J. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol.* 2016; 23(3): 253-9. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000239.

- Valentini X., Gossiaux A., Caron N., Nonclercq D., Legrand A., Toubeau G. Monoclonal antibody to CD31 (PECAM-1) inhibits tubular regeneration after ischemia reperfusion injury in the rat. *Nephron Exp Nephrol.* 2011; 118(3): e60-8. DOI: 10.1159/000322481.

- Zakliczyński M., Lekston A., Swierad M., Wnek A., Buszman P., Przybylski R., et al. Coronary artery disease in heart transplant recipients – diagnosis and treatment. Single centre experience based on results of elective coronary angiography. *Kardiol Pol.* 2003; 58(2): 109-20.

Поступила / Received 20.02.2018

Принята в печать / Accepted 02.04.2018

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

**Контактная информация:** Веревкин Александр Александрович. +7(964)9343006, e-mail: vilehand@bk.ru .  
350901 Краснодар, ул. Черкасская, 135, кв. 155.

**Corresponding author:** Aleksandr A. Verevkin, +7(964)9343006, e-mail: vilehand@bk.ru  
fl. 155, 135 Cherkasskaya str., Krasnodar, Russian Federation, 350901.