УДК 616.127-005.8:616-001.19]-092.9 DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-2-102-113

Морфологическая оценка экспрессии Е-кадгерина в кардиомиоцитах донорского сердца при различных сроках холодовой ишемии миокарда

В.Е. Кливер[1, 2], А.П. Надеев[1], А.В. Фомичев[2], Д.А. Сирота[1, 2], Е.Э. Кливер[1, 2], А.М. Волков[2], М.О. Жульков[2]

[1]*ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия*

[2]*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия*

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . Трансплантация сердца на сегодняшний день является основным методом лечения пациентов, находящихся в конечной стадии хронической сердечной недостаточности. На текущий момент отмечается отсутствие единой точки зрения на временные критерии холодовой ишемии донорского сердца. Несмотря на большое количество исследований, до сих пор остается неразрешенным вопрос об уровне повреждения белков цитоскелета кардиомиоцитов при различных сроках холодовой ишемии, нет четкой границы допустимого времени консервации и соответствующих патоморфологических данных о состоянии их структуры при ишемическом и реперфузионном повреждении.

Ц е л ь . Анализ особенностей патоморфологии кардиомиоцитов и экспрессии белка семейства молекул клеточной адгезии Е-кадгерина в миокарде донорского сердца при различных сроках холодовой ишемии.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . Для исследования использовали интраоперационные биоптаты миокарда ушка левого предсердия доноров возрастом до 60 лет после холодовой ишемии раствором «Кустодиол» длительностью до 240 мин (1-я группа, $n = 10$) и более 240 мин (2-я группа, $n = 7$). Гистологические срезы миокарда окрашивались по стандартной методике гематоксилином и эозином. Дальнейшее их изучение проводили посредством световой микроскопии, для анализа экспрессии Е-кадгерина применяли иммуногистохимический метод.

Р е з у л ь т а т ы . При оценке патоморфологии кардиомиоцитов в условиях различной продолжительности холодовой ишемии миокарда выявлена однородность и обратимость изменений клеточных структур, стабильная экспрессия белка клеточной адгезии Е-кадгерина в местах вставочных дисков у пациентов обеих групп.

З а к л ю ч е н и е . Полученные в ходе исследования результаты показали, что активность Е-кадгерина в условиях холодовой ишемии миокарда раствором «Кустодиол» в течение 240 мин и более 240 мин остается стабильной, что свидетельствует о сохранности его макромолекулярной структуры и функциональной полярности мышечных клеток миокарда.

Ключевые слова: трансплантация сердца, консервация донорского сердца, время холодовой ишемии, Е-кадгерин, морфологическая диагностика.

Образец цитирования: Кливер В.Е., Надеев А.П., Фомичев А.В., Сирота Д.А., Кливер Е.Э., Волков А.М., Жульков М.О. Морфологическая оценка экспрессии Е-кадгерина в кардиомиоцитах донорского сердца при различных сроках холодовой ишемии миокарда // Journal of Siberian Medical Sciences. 2024;8(2):102-113. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-2-102-113

Поступила в редакцию 15.02.2024
Прошла рецензирование 11.05.2024
Принята к публикации 11.06.2024

Автор, ответственный за переписку
Надеев Александр Петрович: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: nadeevngma@mail.ru

Received 15.02.2024
Revised 11.05.2024
Accepted 11.06.2024

Corresponding author
Alexandr P. Nadeev: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny prosp., Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: nadeevngma@mail.ru

Morphological evaluation of the E-cadherin expression in cardiomyocytes of the donor heart at different terms of cold myocardial ischemia

V.E. Kliver[1, 2], A.P. Nadeev[1], A.V. Fomichev[2], D.A. Sirota[1, 2], E.E. Kliver[1, 2], A.M. Volkov[2], M.O. Zhulkov[2]

[1]*Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia*

[2]*Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia*

ABSTRACT

Introduction. Heart transplantation is currently the mainstay of treatment for the end-stage chronic heart failure patients. To date, there is no consensus on the time criteria for cold ischemia of the donor heart. Despite a large number of studies, the question about the level of damage of cardiomyocyte cytoskeleton proteins at different terms of cold ischemia remains unresolved; there is no clear time limit of acceptable preservation time and corresponding pathomorphological data on the state of their structure at ischemic and reperfusion damage.

Aim. An analysis of pathomorphological characteristics of cardiomyocytes and the expression of E-cadherin, protein from the family of cell adhesion molecules in the myocardium of the donor heart at different terms of cold ischemia.

Materials and methods. Intraoperative biopsies of the myocardium of the left atrial appendage of donors aged up to 60 years after cold ischemia with Custodiol solution duration up to 240 min (group 1, $n = 10$) and over 240 min (group 2, $n = 7$) were used. Histological sections of the myocardium were stained according to the standard procedure with hematoxylin and eosin. Their further study was carried out by light microscopy, and to assess the E-cadherin expression immunohistochemistry was used.

Results. The assessment of cardiomyocyte pathomorphology under conditions of different duration of myocardial cold ischemia revealed homogeneity and reversibility of changes in cellular structures, steady-state expression of the cell adhesion protein, E-cadherin at the sites of intercalated discs in patients of both groups.

Conclusion. The results showed that the activity of E-cadherin under cold myocardial ischemia with Custodiol solution for 240 min and over 240 min remains in steady-state, indicating the preservation its macromolecular structure and functional polarity of myocardial muscle cells.

Keywords: heart transplantation, donor heart preservation, cold ischemia time, E-cadherin, morphological diagnosis.

Citation example: Kliver V.E., Nadeev A.P., Fomichev A.V., Sirota D.A., Kliver E.E., Volkov A.M., Zhulkov M.O. Morphological evaluation of the E-cadherin expression in cardiomyocytes of the donor heart at different terms of cold myocardial ischemia. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2024;8(2):102-113. DOI: 10.31549/2542-1174-2024-8-2-102-113

ВВЕДЕНИЕ

В структуре заболеваемости и смертности населения большинства стран мира ведущее место занимают заболевания органов системы кровообращения, часть из которых в исходе своего течения приводят к возникновению терминальной сердечной недостаточности [1, 2]. Трансплантация сердца является ключевым методом лечения данного осложнения, но только около 50 % пациентов из листа ожидания получают хирургическое лечение, что приводит к высокой летальности среди кандидатов на трансплантацию сердца. Проблема критического дефицита донорских органов и растущая потребность в трансплантации сердца требуют расширения критериев отбора доноров, включая оценку пред-

INTRODUCTION

The leading place in the structure of morbidity and mortality of the population of most countries of the world is occupied by cardiovascular diseases, some of which, on the advanced stages, lead to the end-stage heart failure [1, 2]. Heart transplantation is the key treatment for this complication, but only approximately 50% of patients from the waiting list receive this treatment, which results in a high mortality rate among heart transplant candidates. The problem of critical shortage of donor organs and the growing need for heart transplantation require expansion of donor selection criteria, including an assessment of ischemia time of the donor heart. Despite many studies to date, the safe duration of cold ischemia remains an open question. No clear

полагаемого времени ишемии донорского сердца. Несмотря на проведение множества исследований, на сегодняшний день остается открытым вопрос о безопасной продолжительности холодовой ишемии. Не установлены четкие границы допустимого времени консервации, а также соответствующих патоморфологических данных о состоянии миокарда донорского сердца при различных временных параметрах [2].

При микроскопическом изучении патоморфологических изменений, возникающих в сердечной мышце, могут возникать определенные трудности в случаях оценки степени тяжести при ишемическом и реперфузионном повреждении кардиомиоцитов [3–5]. В патологоанатомической практике для обнаружения ишемических повреждений миокарда применяют гистохимические методы окраски или микроскопию в поляризованном свете [6, 7]. В последние годы, в дополнение к исследованиям, посвященным особенностям реакции молекулярных структур клетки на повреждающее воздействие, которые обеспечивают связь клеточной мембраны с внутренней структурой клетки и входят в состав цитоскелета [8, 9], появились публикации, предлагающие определение экспрессии некоторых белков, отражающих состояние кардиомиоцитов. Наиболее перспективным в этом направлении является изучение семейства молекул клеточной адгезии. Имеющиеся на сегодняшний день данные о белках цитоскелета кардиомиоцитов открывают новые возможности для понимания механизмов повреждения их структуры при ишемическом и реперфузионном повреждении. Так, некоторые исследователи предлагают оценивать уровень экспрессии кадгеринов – особых белков, обеспечивающих межклеточные контакты, в частности, между кардиомиоцитами и эндотелиальными клетками [8–10].

Среди представителей суперсемейства кадгеринов, которые играют важную роль в поддержании цитоскелета, следует отметить Е-кадгерин, который относится к группе кадгеринов I типа, активно участвует в поддержании стабильной клеточной адгезии в эпителиальных тканях и обнаруживается в месте промежуточного контакта. Экспрессия Е-кадгерина строго регулируется как в физиологических, так и в патологических процессах, таких как онкогенез и эмбриональный морфогенез. Главная функция Е-кадгерина заключается в формировании адгезивного соединения клеток, которое необходимо для создания высокоорганизованных тканей. Адгезивные контакты между клетками способ-

time limits of acceptable preservation time have been established, and no corresponding pathomorphological data on the state of the donor heart myocardium at different time intervals have been established [2].

Microscopic examination of the pathomorphological changes occurring in the myocardium may present some difficulties in the assessment of severity of ischemic and reperfusion injury of cardiomyocytes [3–5]. In pathoanatomical practice, methods of histochemical staining or polarised light microscopy are used to detect myocardial ischemic lesions [6, 7]. In recent years, besides the studies focused on the peculiarities of the response of molecular cell structures to injury, which provide the link of the cell membrane with the internal structure of the cell and are part of the cytoskeleton [8, 9], the publications proposing determination of the expression of some proteins reflecting the state of cardiomyocytes have appeared. The most promising in this direction is the study of the family of cell adhesion molecules. Available current data on proteins of the cardiomyocyte cytoskeleton open up new opportunities for understanding the mechanisms of damage to their structure during ischemic and reperfusion injury. Thus, some researchers propose to assess the expression level of cadherins – special proteins providing intercellular contacts, in particular, between cardiomyocytes and endothelial cells [8–10].

Among the members of the cadherin superfamily that play an important role in the maintenance of the cytoskeleton, E-cadherin, which belongs to the group of type I cadherins, is actively involved in maintaining steady-state cell adhesion in epithelial tissues and is found at the site of zonulae adherentes, should be mentioned. The E-cadherin expression is highly regulated in both physiological and pathological processes, such as oncogenesis and embryonic morphogenesis. The main function of E-cadherin is to form cell-cell adhesive junctions, which are essential for complex tissue formation. Adhesive junctions between cells promote efficient intracellular communication, which greatly facilitates the interaction of cell membrane molecules with intracellular pathways. Also, E-cadherin plays an important role in maintaining tissue compaction throughout their development by regulating the epithelial-mesenchymal transition [11], supports homeostasis and integrity of mature epithelial tissue. There is some evidence that cadherins are not only targets for signaling pathways controlling adhesion, but may themselves act as a signaling center, regulating cellular processes such as proliferation, apoptosis and differentiation [12].

ствуют эффективной внутриклеточной коммуникации, что значительно упрощает взаимодействие молекул клеточной мембраны с внутриклеточными путями. Также Е-кадгерин играет важную роль в поддержании компактности тканей на протяжении их развития, регулируя эпителиально-мезенхимальный переход [11], осуществляет поддержку гомеостаза и целостности взрослой эпителиальной ткани. Есть несколько свидетельств того, что кадгерины не только являются целью для сигнальных путей, контролирующих адгезию, но и сами могут действовать как сигнальный центр, регулирующий клеточные процессы, такие как пролиферация, апоптоз и дифференцировка клеток [12].

Таким образом, Е-кадгерин активно участвует во множестве процессов, связанных с морфогенезом сердечной ткани. Он играет ключевую роль в межклеточной адгезии, обеспечивает поддержание структурной и функциональной полярности клеток и тканей, а также важен для поддержания пластичности и упругости миокарда.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ особенностей патоморфологии кардиомиоцитов и экспрессии белка семейства молекул клеточной адгезии Е-кадгерина в миокарде донорского сердца при различных сроках холодовой ишемии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Во время проведения основного этапа операции забирались образцы миокарда ушка левого предсердия (УЛП) донорского сердца после холодовой ишемии раствором «Кустодиол» (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Германия): первая группа – 10 случаев с холодовой ишемией трансплантата до 240 мин – 140 [140; 150] мин, и вторая группа – 7 случаев с холодовой ишемией трансплантата более 240 мин – 375 [245; 375] мин, $p \leq 0.05$. Пациенты, включенные в первую и вторую группы, были сопоставимы по среднему возрасту и антропометрическим показателям. Возраст 1-й группы составлял 50 [44; 59] лет, 2-й группы – также 50 [49; 50] лет, $p = 0.193$. Индекс массы тела (ИМТ) в 1-й группе – 25 [22; 27], во 2-й группе – 25 [21; 31], $p = 0.288$. В обеих группах отмечено преобладание пациентов мужского пола: 1-я группа – 8 (80 %) и 2-я группа – 6 (85.7 %) чел., $p = 0.256$.

Взятый из операционного блока материал был помещен в забуференный 10% формалин («БиоВитрум», Россия) на 24 ч. Затем производилась стандартная обработка материала в гисто-

Thus, E-cadherin is actively involved in a variety of processes related to cardiac tissue morphogenesis. It plays a key role in intercellular adhesion, ensures maintenance of structural and functional polarity of cells and tissues, and is important for maintenance of myocardial plasticity and elasticity.

AIM OF THE RESEARCH

An analysis of pathomorphological features of cardiomyocytes and the expression of E-cadherin, protein from the family of cell adhesion molecules in the myocardium of the donor heart at different terms of cold ischemia.

MATERIALS AND METHODS

During the main stage of surgery, samples of the myocardium of the left atrial appendage (LAA) of the donor heart were collected after cold ischemia with Custodiol solution (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Germany): the first group – 10 cases with cold ischemia of the donor heart up to 240 min – 140 [140; 150] min, and the second group – 7 cases with cold ischemia of the donor heart more than 240 min – 375 [245; 375] min, $p \leq 0.05$. Patients included in groups 1 and 2 were comparable regarding mean age and anthropometric parameters. The age of group 1 was 50 [44; 59] years, while group 2 was also 50 [49; 50] years, $p = 0.193$. Body mass index (BMI) in group 1 was 25 [22; 27] and in group 2 was 25 [21; 31], $p = 0.288$. Both groups showed predominance of male patients: group 1 – 8 (80%) and group 2 – 6 (85.7%) patients, $p = 0.256$.

The biopsy samples taken from the operating room was placed in 10% buffered formalin (BioVitrum, Russia) for 24 hours. Then standard processing of the samples was performed on a Leica TP 1020 tissue processor (Germany). Using a rotary microtome, approximately 5 μm thick sections were made from paraffin specimens, which were further stained with hematoxylin and eosin. For light microscopy of the myocardium, a Zeiss Axio Scope. A1 microscope with an analyzer, an AxioCam MRC5 camera with Zen Blue software (Zeiss) was used. Immunohistochemical staining of myocardial sections of LAA was used to assess the expression of E-cadherin, cell adhesion protein. Immunohistochemical staining was performed under the recommendations of the antibody manufacturer and the guidelines [13].

Before immunohistochemical study, the deparaffinized sections were subjected to demasking of tissue antigens in a PT module (Thermo Scientific, USA) using citrate buffer pH 6.0 at 95°C for 60 min. 3% H_2O_2 solution was used to block endogenous per-

процессоре Leica TP 1020 (Германия). С помощью ротационного микротома из парафиновых образцов изготавливали срезы толщиной примерно 5 мкм, которые далее окрашивали гематоксилином и эозином. Для проведения световой микроскопии миокарда использовался универсальный микроскоп Zeiss Axio Scope.A1, оснащенный анализатором и фотокамерой AxioCam MRC5 с программным обеспечением Zen Blue (Zeiss). Применялось иммуногистохимическое окрашивание срезов миокарда УЛП для оценки экспрессии белка клеточной адгезии — Е-кадгерина. Процедура иммуногистохимического окрашивания выполнялась в соответствии с рекомендациями производителя антител и представленными в [13] указаниями.

Перед проведением иммуногистохимического исследования депарафинизированные срезы были подвергнуты демаскировке антигенов тканей в PT модуле (Thermo Scientific, США) с использованием цитратного буфера pH 6.0 при 95 °C в течение 60 мин. Для блокировки эндогенной пероксидазы применялся 3% раствор H_2O_2, с последующим проведением протеинового блока сывороткой. Далее полученные срезы инкубировались с антителами к E-cadherin (clone EP700Y) (Dako, Дания). Иммунное окрашивание осуществлялось с использованием полимерной системы детекции с пероксидазной меткой (Envision Flex, Dako, Дания).

Статистический анализ полученных результатов проведен с использованием пакета статистических программ Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США). Количественные переменные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха Me [Q1 – Q3], качественные переменные – в виде частоты встречаемости и/или процентного отношения. Межгрупповое сравнение показателей производили по критерию Манна – Уитни или с помощью точного критерия Фишера. Значение $p < 0.05$ считали статистически значимым для всех видов анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате анализа образцов ткани, взятых от пациентов первой группы, в исследуемых участках миокарда УЛП, окрашенных гематоксилином-эозином, были выявлены характерные признаки фрагментации отдельных мышечных волокон и неравномерного полнокровия сосудов, сопровождающиеся умеренным межмышечным отеком и наличием эритроцитарных сладжей в микроциркуляторных сосудах. Кроме того, отмечался спазм мелких артерий, в то время

oxidase, followed by protein block with serum. Then, sections obtained were incubated with antibodies to E-cadherin (clone EP700Y) (Dako, Denmark). Immune staining was performed using a peroxidase-labeled polymer detection system (Envision Flex, Dako, Denmark).

A statistical analysis of the results was performed using Statistica 10.0 software (StatSoft, Inc., USA). Quantitative variables are presented as median and interquartile range Me [Q1–Q3], qualitative variables – as frequency of occurrence and/or percentage. Intergroup comparison was performed using the Mann-Whitney test or Fisher's exact test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant for all types of analyses.

RESULTS

As a result of the analysis of tissue samples taken from patients of the first group, in the studied sites of the LAA myocardium stained with hematoxylin-eosin, characteristic signs of fragmentation of individual muscle fibers and venous congestion were revealed, accompanied by moderate intermuscular edema and erythrocyte aggregation (sludge) in microcirculatory vessels. In addition, there was a spasm of small arteries, while the venous lumens were dilated and congested. Elongation of rod-shaped endothelial cells was observed in the wall of several vessels. In general, the vast majority of cardiomyocytes kept their normal structure, having weak signs of heterogeneous oxyphilic staining, which are characteristic of cells with myofibril contaction (Fig. 1).

During the immunohistochemical study, it was found that most of the muscle cells are separated by intercalated discs with clear boundaries. The strong activity of E-cadherin around discs was revealed in the form of a dark brown color during an immunohistochemical reaction. There is a homogeneous intensity of the E-cadherin expression both at the level of intercalated discs characterizing the sarcomeric cytoskeleton and outside the sarcomeric cytoskeleton linked with the sarcolemma (Fig. 2). This shows that the myocardium was protected sufficiently during cold ischemia. In the absence of such protection, long-term ischemia leads to dissociation of the actin cytoskeleton from the cardiomyocyte membrane, which causes cell degeneration and apoptosis. However, such processes were not detected in our study.

When analyzing the samples from patients of the 2nd group with long-term cold myocardial ischemia (over 240 min), a certain expansion of the perivascular spaces was observed, accompanied by edema of

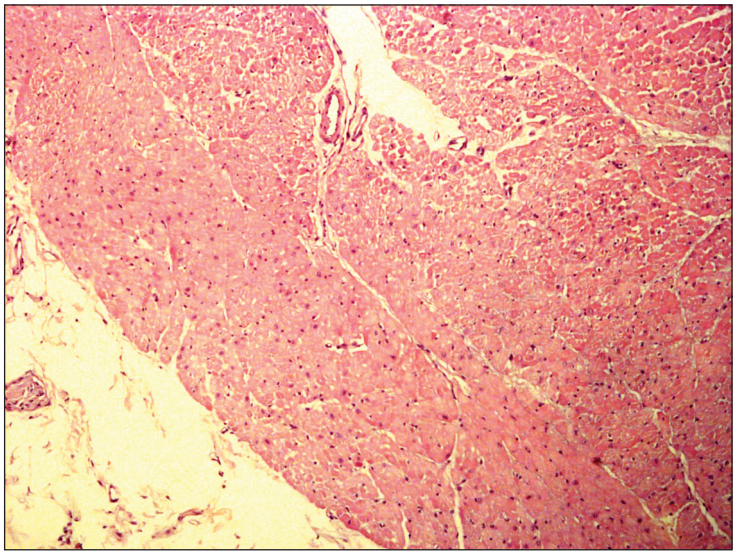

Рис. 1. Неравномерность оксифильной окраски миокарда левого предсердия у пациентов 1-й группы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение ×200
Fig. 1. Heterogeneous oxyphilic staining of the left atrial myocardium in patients of group 1. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification ×200

как просвет вен был расширен и полнокровен. В стенке ряда сосудов наблюдалось удлинение эндотелиоцитов палочковидной формы. В целом подавляющее большинство кардиомиоцитов сохраняло нормальную структуру, имея слабые признаки неравномерного оксифильного окрашивания, которые характерны для клеток с контрактурой миофибрилл (рис. 1).

В ходе проведения иммуногистохимического исследования обнаружено, что большая часть мышечных клеток разделена вставочными дисками с четкими границами. Интенсивная околодисковая активность Е-кадгерина была выявлена в виде темно-коричневой окраски в ходе иммуногистохимической реакции. Отмечается равномерная интенсивность экспрессии Е-кадгерина как в области вставочных дисков, характеризующих цитоскелет саркомера, так и вне саркомерного цитоскелета, связанного с сарколеммой (рис. 2). Это свидетельствует о том, что миокард был достаточно защищен при холодовой ишемии. В случае отсутствия такой защиты длительная ишемия приводит к диссоциации актинового цитоскелета от мембраны кардиомиоцита, что вызывает дегенерацию и апоптоз клеток. Однако в нашем исследовании такие процессы не были обнаружены.

При анализе материала, полученного от пациентов 2-й группы с длительной холодовой ишемией миокарда (более 240 мин), отмечалось определенное расширение околососудистых пространств, сопровождаемое отеком стенок интра-

the walls of the intramural arteries, with the preservation of paretic changes in some of them with congestion and dilation of the venous lumen. Spastic changes were noted in part of the arteries, accompanied by narrowing of the lumen with preserved endothelial lining.

In microcirculatory vessels, we have observed erythrocyte aggregation in individual fields of vision. Most of the muscle fibers had a uniform diameter and slight heterogeneous oxyphilic staining of cardiomyocytes; in certain places, single thinned and wavy myocardial fibers were found. Edema of the cytoplasm was also observed in cardiomyocytes, manifested by color heterogeneity (Fig. 3).

The immunohistochemical study revealed a decrease in the expression of E-cadherin in some fields of vision because of a decrease in the number of intercalated discs. Deformities resembling a broken line were found in some of them. In addition, some blurriness of cross striation and moderate changes in the cytoplasm structure of cardiomyocytes were observed (Fig. 4).

DISCUSSION

The histological analysis showed that in both groups, LAA cardiomyocytes, in sections stained immunohistochemically to detect the expression of E-cadherin, have a homogeneous light brown staining with contrasting dark brown sites in the areas of intercalated discs of cardiomyocytes and in the Z-lines throughout the entire muscle fiber.

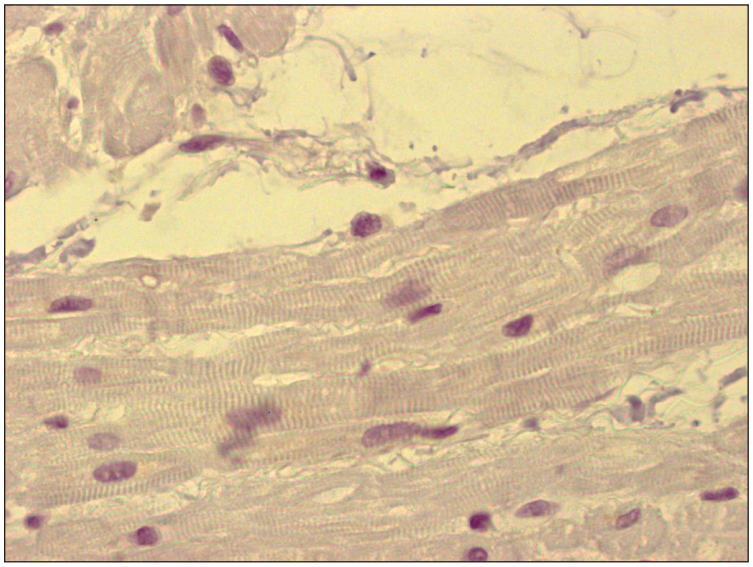

Рис. 2. Позитивная равномерная экспрессия Е-кадгерина в донорском сердце у пациентов 1-й группы. Иммуногистохимическое исследование. Доокраска гематоксилином. Увеличение ×630
Fig. 2. Positive homogeneous expression of E-cadherin in the donor heart in group 1 patients. Immunohistochemical study. Additional hematoxylin staining. Magnification ×630

муральных артерий, с сохранением в части из них паретических изменений с полнокровием и расширением просвета вен. В части артерий отмечены спастические изменения, сопровождающиеся сужением просвета при сохраненной эндотелиальной выстилке.

В микроциркуляторных сосудах мы наблюдали сладжи эритроцитов в отдельных полях зрения. Большинство мышечных волокон имели однородный диаметр и слабо выраженное нерав-

The supporting apparatus of cardiomyocytes comprises cytoskeletal elements that provide an ordered arrangement of myofilaments and myofibrils inside the fiber, as well as the basement membrane and sarcolemma. The structural and biochemical organization of the supporting apparatus is like that of skeletal muscle tissue fibers. However, a distinctive characteristic of cardiomyocytes is that the cytoskeletal elements are associated with intercalated discs, which are special intercellular junc-

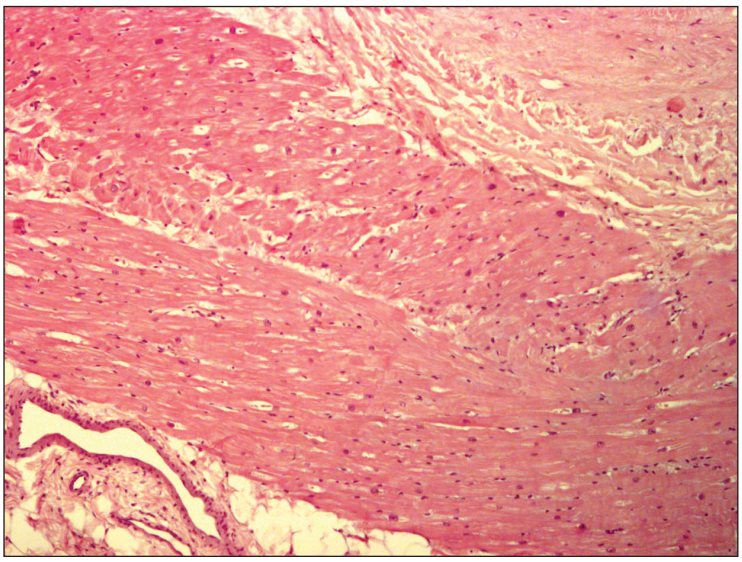

Рис. 3. Неравномерность оксифильной окраски, цитоплазматический отек миокарда левого предсердия у пациентов 2-й группы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение ×200
Fig. 3. Heterogeneous oxyphilic staining, edema of the cytoplasm of the left atrial myocardium in group 2 patients. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification ×200

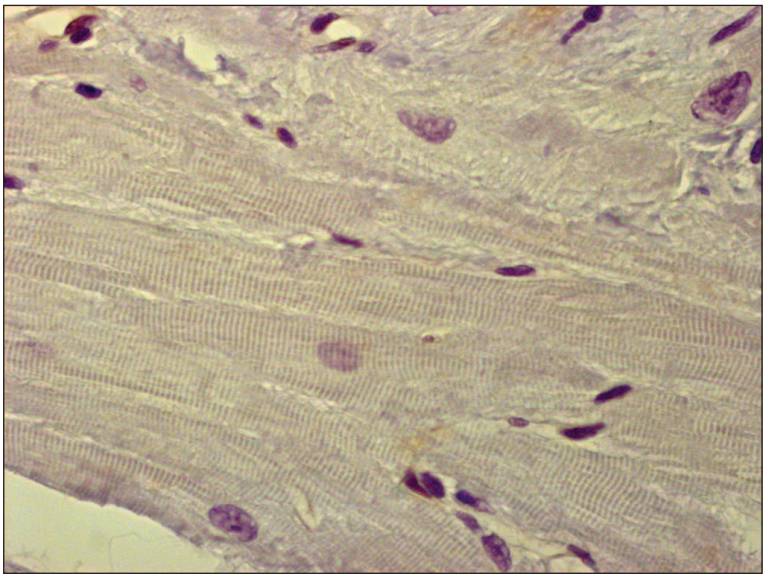

Рис. 4. Позитивная неравномерная экспрессия Е-кадгерина, размытость поперечной исчерченности кардиомиоцитов у пациентов 2-й группы. Иммуногистохимическое исследование. Доокраска гематоксилином. Увеличение ×630
Fig. 4. Positive heterogeneous expression of E-cadherin, blurriness of cross striation of cardiomyocytes in group 2 patients. Immunohistochemical study. Additional hematoxylin staining. Magnification ×630

номерное оксифильное окрашивание кардиомиоцитов, местами, в единичных волокнах отмечалось истончение и волнистость границ. В кардиомиоцитах также наблюдался цитоплазматический отек, проявляющийся неоднородностью окраски (рис. 3).

В результате иммуногистохимического исследования было обнаружено снижение экспрессии Е-кадгерина в некоторых полях зрения, обусловленное уменьшением количества вставочных дисков. В некоторых из них обнаружены деформации, напоминающие ломаную полосу. Кроме того, наблюдалась некоторая размытость поперечной исчерченности и умеренные изменения в структуре цитоплазмы кардиомиоцитов (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный гистологический анализ показал, что в обеих исследуемых группах кардиомиоциты УЛП, в срезах, окрашенных иммуногистохимически с целью выявления экспрессии Е-кадгерина, имеют равномерное светло-коричневое окрашивание с контрастирующими темно-коричневыми участками в местах вставочных дисков кардиомиоцитов и в области Z полос на протяжении всего мышечного волокна.

Опорный аппарат кардиомиоцитов состоит из элементов цитоскелета, которые обеспечивают упорядоченное расположение миофиламентов и миофибрилл внутри волокна, а также базальной

tions. The sarcolemma contains integrins – transmembrane glycoproteins that connect cytoskeleton elements of cardiomyocytes with components of extracellular matrix, such as collagen, laminin and fibronectin. Externally, the cardiomyocyte sarcolemma is surrounded by a basement membrane, into which reticular and thin collagen fibers are intertwined [14].

Intercalated discs play an important role in the cell-to-cell junction of cardiomyocytes. When studied with a light microscope, they appear as transverse straight or zigzag stripes crossing the functional fibers of the myocardium. In the area of the transverse sites of the intercalated disc, which are perpendicular to myofibrils, surrounding cardiomyocytes form many interdigitations. These interdigitations are connected by junctions such as desmosomes and adhesive stripes. Actin filaments are attached to the transverse sites of the sarcolemma of the intercalated disc at the level of the Z-line. In the area of the intercalated disc, such glycoproteins as cadherin are also found, which provide calcium-dependent adhesion between cardiomyocytes. There are many gap junctions on the sarcolemma of the longitudinal sites of the intercalated disc, which provide ionic bond continuity between adjacent cardiomyocytes and transmit of impulses that drive contractions [15].

It should be noted that a decrease in the expression of cadherin may indicate a disconnection of car-

мембраны и сарколеммы. Структурная и биохимическая организация опорного аппарата подобна опорному аппарату волокон скелетной мышечной ткани. Однако отличительной особенностью кардиомиоцитов является то, что элементы цитоскелета связаны с вставочными дисками, которые являются особыми межклеточными соединениями. Сарколемма содержит интегрины — трансмембранные гликопротеины, которые обеспечивают связь элементов цитоскелета кардиомиоцитов с компонентами межклеточного вещества, такими как коллаген, ламинин и фибронектин. Внешне сарколемма кардиомиоцитов окружена базальной мембраной, в которую вплетаются ретикулярные и тонкие коллагеновые волокна [14].

Вставочные диски играют важную роль в связи между кардиомиоцитами. При исследовании с помощью светового микроскопа они выглядят как поперечные прямые или зигзагообразные полоски, пересекающие функциональные волокна сердечной мышцы. В области поперечных участков вставочного диска, которые расположены перпендикулярно миофибриллам, соседние кардиомиоциты формируют множество интердигитаций. Эти интердигитации связаны контактами типа десмосом и полосок слипания. Актиновые филаменты присоединяются к поперечным участкам сарколеммы вставочного диска на уровне Z-полоски. В области вставочного диска также обнаруживаются гликопротеины кадгерины, которые обеспечивают адгезию между кардиомиоцитами, зависимую от кальция. На сарколемме продольных участков вставочного диска имеются многочисленные щелевые соединения, которые обеспечивают ионную связь между кардиомиоцитами и передачу импульсов сокращения [15].

Необходимо отметить, что снижение экспрессии кадгерина может свидетельствовать о разобщении мышечных клеток сердца, что, в свою очередь, может привести к нарушениям ритма сердца. Также сокращение экспрессии кадгеринов в эндотелиальных клетках может служить косвенным признаком эндотелиальной дисфункции [16].

Поэтому изучение промежуточных контактов, таких как вставочные диски в миокарде, играет особую роль в этой связи. Формирование промежуточного контакта включает трансмембранные белки адгезии из семейства кадгерина, которые соединяют не только мембраны соседних клеток, но и стабилизируют их цитоскелет, объединяя клетки с их содержимым в одну прочную систему.

diac muscle cells, which, in turn, can lead to cardiac arrhythmias. Also, a decrease in the cadherin expression in endothelial cells can serve as an indirect sign of endothelial dysfunction [16].

Therefore, the study of zonulae adherentes, such as intercalated discs in the myocardium, plays a special role in this junction. The formation of an zonula adherens includes transmembrane adhesive proteins from the cadherin family, which bind not only the membranes of surrounding cells, but also stabilize their cytoskeleton, uniting cells with their contents into one solid system.

The results of our study aimed at evaluating the expression of E-cadherin at different durations of cold myocardial ischemia showed its steady presence in the places of intercalated discs in patients of both groups.

CONCLUSION

The study showed that the activity of E-cadherin under cold myocardial ischemia using Custodiol solution remained steady-state for 240 min and over 240 min. Lytic lesions of individual cardiomyocytes were detected only in patients of the second group, while immunohistochemical reactions of cardiomyocytes to E-cadherin were in both groups at almost the same level, which shows the preservation of this protein macromolecular structure, the structural and functional polarity of cardiac muscle cells and, accordingly, its physical properties – plasticity and compaction.

Author contributions: V.E. Kliver, A.M. Volkov, A.P. Nadeev, A.V. Fomichev, D.A. Sirota, E.E. Kliver, M.O., Zhulkov – development of the concept and design of the study; D.A. Sirota, A.V. Fomichev, M.O. Zhulkov, E.E. Kliver – data collection; V.E. Kliver, A.M. Volkov, A.V. Fomichev – analysis and interpretation of the results; E.E. Kliver, M.O. Zhulkov – literature review, statistical analysis; V.E. Kliver, A.M. Volkov – drafting the manuscript and its final version; A.P. Nadeev, D.A. Sirota – critical revision of the draft of the manuscript with the valuable intellectual comments on the content. All authors approved the final version of the article before publication, and agreed to be responsible for all aspects of the work, implying appropriate study and resolution of issues related to the accuracy and scrupulousness of any part of the work.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Результаты нашего исследования, направленного на оценку экспрессии Е-кадгерина при различной продолжительности холодовой ишемии миокарда, показали его стабильное присутствие в местах вставочных дисков у пациентов обеих групп.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что активность Е-кадгерина в условиях холодовой ишемии миокарда с использованием раствора «Кустодиол» в течение 240 мин и более 240 мин остается стабильной. Лизисные изменения отдельных кардиомиоцитов были обнаружены только у пациентов второй группы, в то время как иммуногистохимические реакции кардиомиоцитов на Е-кадгерин были сохранены в обеих группах практически на одном уровне, что свидетельствует о сохранности макромолекулярной структуры данного белка, структурной и функциональной полярности мышечных клеток миокарда и соответственно его физических свойств – пластичности и компактности.

Вклад авторов: В.Е. Кливер, А.М. Волков, А.П. Надеев, А.В. Фомичев, Д.А. Сирота, Е.Э. Кливер, М.О. Жульков – разработка концепции и дизайна исследования; Д.А. Сирота, А.В. Фомичев, М.О. Жульков, Е.Э. Кливер – сбор данных; В.Е. Кливер, А.М. Волков, А.В. Фомичев – анализ и интерпретация результатов; Е.Э. Кливер, М.О. Жульков – обзор литературы, проведение статистического анализа; В.Е. Кливер, А.М. Волков – составление черновика рукописи и формирование его окончательного варианта; А.П. Надеев, Д.А. Сирота – критический пересмотр черновика рукописи с внесением ценного замечания интеллектуального содержания. Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой части работы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Готье С.В. Инновации в трансплантологии: развитие программы трансплантации сердца в Российской Федерации // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2017;21(3S):61-68. DOI: 10.21688/1681-3472-2017-3S-61-68.
2. Тенчурина Э.А., Минина М.Г. Современные представления о критериях селекции доноров сердца // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2020;22(3):174-181. DOI: 10.15825/1995-1191-2020-3-174-181.
3. Савченко С.В., Новоселов В.П., Скребов Р.В. и др. Оценка изменений белков миокарда при острой ишемии по данным иммуногистохимического исследования // Journal of Siberian Medical Sciences. 2019;3:95-104. DOI: 10.31549/2542-1174-2019-3-95-104.
4. Смирнов В.П., Панышева И.А. Патоморфология кардиомиоцитов при внезапной кардиальной смерти // Медицина: вызовы сегодняшнего дня: материалы III Междунар. науч. конф. (Москва, январь 2016 г.). М.: Буки-Веди, 2016. С. 43–46.
5. Кливер В.Е., Волков А.М., Надеев А.П. и др. Морфологическая оценка экспрессии актина и десмина при различных сроках холодовой ишемии миокарда: наблюдательное исследование // Кубанский научный медицинский вестник. 2024;31(1):15-26. DOI: 10.25207/1608-6228-2024-31-1-15-26.
6. Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М., Толстикова Т.Г. Патоморфология мышечных клеток сердца при действии циклофосфамида и тритерпеноидов. Новосибирск, 2009. 271 с.
7. Кливер В.Е., Надеев А.П., Фомичев А.В. и др. Влияние продолжительности холодовой ишемии транс-

REFERENCES

1. Gautier S.V. Innovations in transplantology: heart transplantation program development in Russian Federation. *Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2017;21(3S):61-68. DOI: 10.21688/1681-3472-2017-3S-61-68. (In Russ.)
2. Tenchurina E.A., Minina M.G. Modern ideas in heart donor selection criteria. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2020;22(3):174-181. DOI: 10.15825/1995-1191-2020-3-174-181. (In Russ.)
3. Savchenko S.V., Novoselov V.P., Skrebov R.V. et al. Evaluation of protein changes of the myocardium in acute ischemia according to the immunohistochemical study. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2019;3:95-104. DOI: 10.31549/2542-1174-2019-3-95-104.
4. Smirnov V.P., Panysheva I.A. (2016). Pathomorphology of cardiomyocytes in sudden cardiac death. In *Medicine: Challenges of the Present Day:Proceedings of the III International Scientific Conf. (Moscow, January, 2016)*. Moscow: Buki-Vedi. P. 43–46. (In Russ.)
5. Kliver V.E., Volkov A.M., Nadeev A.P. et al. Morphological assessment of actin and desmin expression at different cold myocardial ischemia times: observational study. *Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2024;31(1):15-26. DOI: 10.25207/1608-6228-2024-31-1-15-26. (In Russ.)
6. Lushnikova E.L., Nepomnyashchikh L.M., Tolstikova T.G. (2009). *Pathomorphology of Cardiac Muscle Cells during the Action of Cyclophosphamide and Triterpenoids*. Novosibirsk. 271 p. (In Russ.)
7. Kliver V.E., Nadeev A.P., Fomichev A.V. et al. Impact of the graft cold ischemia time on severity of cellu-

плантата на степень клеточного отторжения и исход операции трансплантации сердца // Дальневосточный медицинский журнал. 2023;1:31-36. DOI: 10.35177/1994-5191-2023-1-5.
8. Weber G. F., Bjerke M. A., DeSimone D. W. Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks// J. Cell Sci. 2011;124(8):1183-1193. DOI: 10.1242/jcs.064618.
9. Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции: пер. с англ. М.: Мир, 1997. 624 с.
10. Stromer M.H. The cytoskeleton in skeletal, cardiac and smooth muscle cells // Histol. Histopathol. 1998;13(1):283-291. DOI: 10.14670/HH-13.283.
11. Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression // Nature Rev. Cancer. 2002;2(6):442–454. DOI: 10.1038/nrc822.
12. van Roy F., Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin // Cell. Mol. Life Sci. 2008;65(23):3756-3788. DOI: 10.1007/s00018-008-8281-1.
13. Петров С.В., Т.Н. Райхлин С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. 4-е изд-е, перераб. и доп. Казань, 2012. 624 с.
14. Brigidi G.S., Bamji S.X. Cadherin-catenin adhesion complexes at the synapse // Curr. Opin. Neurobiol. 2011;21 (2): 208-214. DOI: 10.1016/j.conb.2010.12.004.
15. Kierszenbaum A.L., Tres L. Histology and Cell Biology. An Introduction to Pathology. Third edition. Philadelphia: Elsevier, 2012. 701 p.
16. Grabowska M.M., Day M.L. Soluble E-cadherin: more than a symptom of disease // Front. Biosci. 2012;17(5):1948-1764. DOI: 10.2741/4031.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кливер Владислав Евгеньевич – аспирант кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела хирургии аорты, коронарных и периферических артерий Института патологии кровообращения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-2245-1251.

Надеев Александр Петрович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-0400-1011.

Фомичев Алексей Вячеславович – канд. мед. наук, врач – сердечно-сосудистый хирург кардиохирургического отделения № 2 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0001-9113-4204.

Сирота Дмитрий Андреевич – канд. мед. наук, ассистент кафедры сердечно-сосудистой хирургии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; заведующий отделом хирургии аорты, коронарных

lar rejection and the outcome of heart transplantation. *Far East Medical Journal*. 2023;1:31-36. DOI: 10.35177/1994-5191-2023-1-5. (In Russ.)
8. Weber G.F., Bjerke M.A., DeSimone D.W. Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *J. Cell Sci*. 2011;124(8):1183-1193. DOI: 10.1242/jcs.064618.
9. Gennis R. (1997). *Biomembranes. Molecular Structure and Functions: Trans. from Engl*. Moscow: Mir. 624 p. (In Russ.)
10. Stromer M.H. The cytoskeleton in skeletal, cardiac and smooth muscle cells. *Histol. Histopathol*. 1998;13(1):283-291. DOI: 10.14670/HH-13.283.
11. Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev. Cancer*. 2002;2(6):442-454. DOI: 10.1038/nrc822.
12. Van Roy F., Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci*. 2008;65(23):3756-3788. DOI: 10.1007/s00018-008-8281-1.
13. Petrov S.V., Raichlin N.T. (2012*). Manual of Immunohistochemical Diagnosis of Human Tumours. 4th ed., revised*. Kazan. 624 p. (In Russ)
14. Brigidi G.S., Bamji S.X. Cadherin-catenin adhesion complexes at the synapse. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2011;21(2):208-214. DOI: 10.1016/j.conb.2010.12.004.
15. Kierszenbaum A.L., Tres L. *Histology and Cell Biology. An Introduction to Pathology. Third edition*. Philadelphia: Elsevier, 2012. 701 p.
16. Grabowska M.M., Day M.L. Soluble E-cadherin: more than a symptom of disease. *Front. Biosci*. 2012;17(5):1948-1764. DOI: 10.2741/4031.

ABOUT THE AUTHORS

Vladislav E. Kliver – Post-graduate Student, Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University; Junior Researcher, Research Department of Aorta, Coronary and Peripheral Artery Surgery, Institute of Circulatory Disorders, Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-2245-1251.

Alexander P. Nadeev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-0400-1011.

Alexei V. Fomichev – Cand. Sci. (Med.), Cardiovascular Surgeon, Cardiac Surgery Department No 2, Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-9113-4204.

Dmitry A. Sirota – Cand. Sci. (Med.), Assistant, Department of Cardiovascular Surgery, Novosibirsk State Medical University; Head, Department of Aorta, Coronary and Peripheral Artery Surgery, Institute of Circulatory Disorders, Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-9940-3541.

Evgeniy E. Kliver – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University; Head, Pathoanatomical Department, Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-3915-3616.

и периферических артерий Института патологии кровообращения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-9940-3541.

Кливер Евгений Эдуардович – д-р мед. наук, профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; заведующий патолого-анатомическим отделением ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-3915-3616.

Волков Александр Михайлович – д-р мед. наук, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 000-0001-9697-7091.

Жульков Максим Олегович – канд. мед. наук, научный сотрудник научно-исследовательского отдела хирургии аорты, коронарных и периферических артерий Института патологии кровообращения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0001-7976-596X.

Alexander M. Volkov – Dr. Sci. (Med.), Pathologist, Pathoanatomical Department, Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia. ORCID: 000-0001-9697-7091.

Maksim O. Zhulkov – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Research Department of Aorta, Coronary and Peripheral Artery Surgery, Institute of Circulatory Pathology, Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-7976-596X.