

## ОБЗОР МАТЕРИАЛОВ БАНФФ-КОНФЕРЕНЦИИ 2011 ГОДА

Траилин А.В.<sup>1</sup>, Никоненко Т.Н.<sup>1</sup>, Никоненко А.С.<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Государственное учреждение «Запорожская медицинская академия последипломного образования» Министерства здравоохранения Украины

<sup>2</sup> Запорожский межрегиональный центр трансплантации

В июне 2011 года в пригороде Парижа состоялась 11-я Банфф-конференция, посвященная актуальным вопросам патологии аллотрансплантатов солидных органов. Были заслушаны доклады созданных на предыдущей конференции рабочих групп по оценке гломерулярных поражений, способам оценки интерстициального фиброза, изучению роли изолированного интимального артериита, оценке полиомавирусной нефропатии, молекулярной патологии трансплантатов и обеспечению качества иммуногистохимических исследований. Главными темами обсуждения были: антитело-опосредованное отторжение, ведение сенсibilизированных пациентов, подходы к диагностике отторжения трансплантатов на основе методов геномики и протеомики, роль протокольных биопсий. Поступили предложения пересмотреть способы оценки полиомавирусной нефропатии, гломерулита, трансплантационной гломерулопатии. Термин «эпителиально-мезенхимальное превращение» был признан неудачным и нуждающимся в замене.

*Ключевые слова:* Банфф, трансплантация, отторжение аллотрансплантата, гистологические изменения, геномные маркеры.

## BANFF-2011 CONFERENCE REPORT

Trailin A.V.<sup>1</sup>, Nikonenko T.N.<sup>1</sup>, Nikonenko A.S.<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Sl «Zaporizhzhia Medical Academy of Postgraduate Education of Ministry of Health of Ukraine»

<sup>2</sup> Zaporizhzhia interregional transplantation centre

The 11th Banff Conference of solid organs allografts pathology was held in a suburb of Paris from June 6 to 10. Papers were presented by created at the previous conference working groups on the following areas: isolated v-lesion, fibrosis scoring, glomerular lesions, molecular pathology, polyomavirus nephropathy and quality assurance of immunohistochemical procedures. The main topics of discussion were antibody-mediated rejection, management of sensitized patients, the approach to the diagnosis of transplant rejection by the methods of genomics and proteomics, and the role of protocol biopsies. There were suggestions to reconsider how to assess polyomavirus nephropathy, glomerulitis, transplant glomerulopathy. Term «epithelial-mesenchymal transition» was considered inappropriate and need to be replaced.

*Key words:* Banff, transplantation, allograft rejection, histological lesions, genomic markers.

В июне 2011 года в пригороде Парижа состоялась 11-я Банфф-конференция, посвященная актуальным вопросам патологии аллотрансплантатов. Клиницисты, патологи, иммунологи, исследователи и хирурги обсуждали актуальные вопросы трансплантации солидных органов. Главными темами обсуждения были: антитело-опосредованное отторжение (АОО), концепция C4d-негативного АОО, ведение сенсibilизированных пациентов, подходы к диагностике отторжения трансплантатов на основе методов геномики и протеомики и поиск светооптиче-

ских маркеров, хорошо коррелирующих с изменениями экспрессии отдельных генов в трансплантате (и наоборот). Также обсуждались: обновление классификации патологии трансплантатов солидных органов; потенциальная первичность повреждения эпителия и концепция эпителиально-мезенхимального превращения (ЭМП); значение изолированного интимального артериита; значение гломерулита и способы его оценки; способы оценки патологических изменений при полиомавирусной инфекции; роль и способы оценки протокольных биопсий; роль циф-

*Статья поступила в редакцию 05.12.11 г.*

**Контакты:** Траилин Андрей Вячеславович, доцент, к. м. н.

**Тел.** +38 061 279 17 19, **e-mail:** andrei\_traitlin@ukr.net

ровой патологии в диагностике поражений трансплантатов.

**Созданные на предыдущей конференции рабочие группы доложили результаты своей работы.**

1. Volker Nicleleit (США) доложил результаты работы рабочей группы по классификации полиомавирусной нефропатии (ПВН). Изучалось значение морфологии, скорости развития изменений, вирусной нагрузки в диагностике ПВН и прогнозировании ее исхода. Отмечено, что выявление SV40-антигена вируса свидетельствует о его активной репликации, а его количество является индикатором вирусной нагрузки. При оценке окрашивания антителами против SV40 предлагается оценивать интенсивность реакции в баллах (0–3), процент канальцев с окрашиванием клеток ( $< 1\%$ ,  $\geq 1\%$  и  $\leq 10\%$ ,  $> 10\%$ ) и процент окрашенных тубулярных клеток. Предложено усовершенствовать предложенные ранее стадии (паттерны) ПВН следующим образом [12].

А – ранние изменения (отдельно в коре и мозговом веществе), без острого канальцевого некроза (ОКН): активная репликация вируса; его антигены можно выявить иммуногистохимически с антителами к SV40 у 57% пациентов при отсутствии цитопатических изменений.

В – острые (цветущие) изменения, активная нефропатия с вирус-индуцированным ОКН; SV40-антиген выявляется у 19% пациентов.

С – поздняя (склерозирующая) нефропатия; SV40-антиген не выявляется.

Наиболее страдает функция почечного аллотрансплантата (ПАТ) у пациентов в С-стадию, и прогноз для них однозначно хуже. Клиническая значимость различий между стадиями А и В находится под вопросом. Более выраженная атрофия канальцев и активное воспаление в биоптате, а также высокий креатинин сыворотки на момент постановки диагноза ассоциированы с худшим исходом.

Вне зависимости от стадии инфекции у всех пациентов в моче выявляются клетки-ловушки (decoy-cells). Еще одним неинвазивным маркером инфекции является выявление в моче при электронной микроскопии (ЭМ) цилиндроподобных агрегатов зрелых вирионов и белка Тамма–Хорсвелла («Haufer»). Их количество отражает степень лизиса эпителиальных клеток (ЭК) канальцев и высвобождение вирионов в просвет и коррелирует с наличием в моче клеток-ловушек, вирурией и виремией [38].

Характерно, что у 30% пациентов с ПВН в момент постановки диагноза креатинин сыворотки не изменен, что свидетельствует о необходимости протокольных биопсий. Посттрансплантационный мониторинг реактивации вируса должен включать поиск клеток-ловушек в моче и вируса в плазме мето-

дом полимеразной цепной реакции (ПЦР) вне зависимости от уровня функции ПАТ.

2. Banu Sis (Канада) и Marc Haas (США) доложили о результатах исследований рабочей группы по оценке гломерулярных поражений. Индекс трансплантационного гломерулита g имеет высокую вариабельность, плохую корреляцию с клиникой и характеризуется слабой межисследовательской воспроизводимостью. Поэтому рабочей группой были изучены несколько модификаций способа оценки гломерулита. Наилучшая воспроизводимость показана при способе оценки, учитывающем процент клубочков с моноклеарным инфильтратом и набуханием эндотелия, вызывающими полную или почти полную окклюзию одного или более просветов капилляров (опция – из подсчета исключаются частично склерозированные и ишемизированные клубочки). Эти способы, а также способ, при котором учитывается процент клубочков с моноклеарным инфильтратом без учета набухания эндотелия, показали наилучшую корреляцию с наличием в сыворотке крови анти-HLA-II-донор-специфических антител (ДСА) и с депозитами C4d в ПАТ.

Parmjeet Randhawa (США) сообщил, что если при учете процента клубочков с гломерулитом установить порог ( $\geq 5$  лейкоцитов на клубочек), то результаты коррелируют наилучшим образом с другими гистологическими изменениями (наличие капиллярита перитубулярных капилляров (ПТК), C4d-позитивность, развитие в последующем трансплантационной гломерулопатии (ТГ)), клиническими показателями (протеинурия, уровень сывороточного креатинина через один год после биопсии, появление в последующем ДСА) и являются индикатором неблагоприятного прогноза [7].

Гломерулит ассоциируется с субоптимальной функцией ПАТ. Он чаще выявляется в биоптатах с признаками смешанного отторжения: острое Т-клеточно-опосредованное отторжение (ОТОО) и острое антитело-опосредованное отторжение ОАОО, что подтверждают и наши данные [2]. В биопсиях с гломерулитом достоверно чаще выявляется C4d+-окрашивание гломерулярных капилляров (ГК), и степень окрашивания выше при наличии ДСА. В них также выявляется больше гранзим Б-позитивных лейкоцитов в клубочках и ПТК и фактора фон Виллебранда в капиллярах и мезангии, который при более тяжелом повреждении появляется в интерстиции. Эти результаты свидетельствуют, что воспаление в клубочках опосредовано как компонентом, так и клеточной цитотоксичностью [8].

James Gloor (США) в своем докладе постулировал точку зрения, что ТГ – не явление, а процесс, оценка которого имеет приемлемую межисследовательскую воспроизводимую. Он доложил результаты исследований рабочей группы, которая пред-

ложила пересмотреть текущий способ оценки ТГ. Лучшую воспроизводимость и корреляцию с С4d и ДСА показал способ, в котором учитывался процент клубочков с двойными контурами. Предиктором ТГ является капиллярит ПТК [31]. J. Gloog обратил внимание, что ультраструктурные изменения ПТК и ГК выявляются задолго до светооптических. ТГ имеет место даже при блокаде С5-компонента комплемента, что свидетельствует в пользу возможного участия НК-клеток или С3а-компонента. ТГ не всегда имеет негативный прогноз: среднее время до развития ТГ – 30 месяцев, а до потери ПАТ – 50 месяцев.

Enver Akalin (Великобритания) отметил, что имеются случаи ТГ, не опосредованные С4d и ДСА, и предложил добавить в ее классификацию С4d-/ДСА-случаи. Причинами этих случаев ТГ могут быть хроническое активное Т-клеточно-опосредованное отторжение (ХАТОО), нефротоксичность ингибиторов кальциневрина (ИКН), аутоантитела (к агрину и не-HLA-антигенам). Microarray-анализ показал, что ТГ достоверно коррелирует с признаками клеточной активации в ПАТ, в частности с увеличением содержания транскриптов ICAM1, IL10, CCL3, VCAM1, MMP 7, 9. За развитие ТГ могут быть ответственны секретлируемые моноцитами провоспалительные цитокины: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  [11]. Enver Akalin предложил также добавить к диагностическим критериям ХАТОО тубулоинтерстициальный и/или гломерулярный инфильтрат.

3. Banu Sis доложила результаты исследований рабочей группы по изучению патогенеза, диагностического и прогностического значения изолированного интимального артериита (без или с минимальным тубулоинтерстициальным воспалением), который встречается редко и имеет неустановленный прогноз. Если исключить случаи, где подозревается ОАОО, то изолированный интимальный артериит не имеет независимого прогностического значения и не влияет на выживание ПАТ. Его причинами могут быть ОТОО либо неспецифическое повреждение.

4. Helen Lapis (США) доложила предварительные результаты исследований рабочей группы по усовершенствованию методики оценки дотрансплантационных биопсий. Она подчеркнула, что дооперационные биопсии необходимы для оценки состояния органа маргинального донора, подбора оптимального реципиента и модификации тактики лечения. Объективные данные в пользу отказа от использования органа только по данным гистологии отсутствуют. Рабочая группа рекомендует оценивать количество клубочков в биопсии, процент полностью склерозированных, с признаками ФСГС и перигломерулярного фиброза, количество артерий, но не артериол, степень ОКН. Предлагается

добавить в схему оценки дооперационных биопсий оценку интерстициального (i) и тотального воспаления (ti). Значение тромбов в клубочках, артериологиалиноза, ИФ и КА, интимального фиброза еще предстоит установить. Вместе с тем имеются данные, что артериологиалиноз и артериосклероз донора являются независимыми предикторами нарушения начальной функции и субоптимального выживания ПАТ [1, 27].

Относительно методики было отмечено, что изучение замороженных срезов в целом не уступает оценке гистологии в парафиновых, однако артериологиалиноз и ИФ могут быть переоценены. Обсуждались «за» и «против» пункционной и краевой биопсий. Имеется мнение, что пункционная биопсия имеет ряд преимуществ перед краевой [50].

Функцию ПАТ от маргинальных доноров через 1 год после трансплантации наилучшим образом можно предсказать, используя комбинацию клинических (сывороточный креатинин донора перед забором  $\geq 150$  мкмоль/л, гипертензия донора) и гистологических критериев (гломерулосклероз  $\geq 10\%$ ) [6].

5. Michael Mengel (Канада) и Parmjeet Randhawa доложили результаты трайла по обеспечению качества при иммуногистохимическом выявлении С4d и ВК-вируса (BIFQUIT). Диффузное С4d-позитивное окрашивание имеет хорошую/отличную межисследовательскую и межлабораторную воспроизводимость, в отличие от фокального и минимального. Для стандартизации исследования необходима немедленная фиксация биоптатов погружением в 4% забуференный формалин на 24 часа (недофиксация – главный источник ошибок). Лучший протокол выявления С4d предусматривает использование высокотемпературной демаскировки в цитратном буфере в течение 20–40 минут. Разведение поликлональных антител должно быть не менее 1:80, а время инкубации – не менее 60 минут.

Констатировано, что иммуногистохимия для выявления ВК-вируса имеет достаточную межисследовательскую воспроизводимость, но ограниченную межлабораторную (так как используются наборы разных фирм, варьируют разведение антител против SV40-антигена вируса и время инкубации). Ввиду большой межлабораторной вариабельности и локального характера ПВН необходимо сопоставлять данные биопсийного исследования с выявлением вирусии и виремии методом ПЦР.

6. Robert Colvin (США) доложил результаты исследований рабочей группы по изучению способов оценки ИФ – визуальных и морфометрических. Для морфометрии в качестве красителей можно использовать трихром, сириус красный, иммуногистохимическое выявление коллагена III. При фотографировании нужно избегать клубочков, сосудов,

мозгового вещества и субкапсулярной коры. Разработана техника сканирования изображения со стекол. Оценка степени ИФ/КА при окраске трихромом имеет преимущества по сравнению с окраской ШИК. Таким образом, по мнению рабочей группы, лучше оценивать ИФ, чем КА. Визуальная и морфометрические методики имеют хорошую воспроизводимость ( $R = 0,74$ ,  $p = 0,0001$  [3]), однако морфометрия имеет меньшую межисследовательскую вариабельность. Наилучшую эффективность, воспроизводимость и корреляцию со скоростью клубочковой фильтрации (СКФ) имеют результаты морфометрии срезов, окрашенных антителами к коллагену III и визуальной оценки стекол, окрашенных трихромом [15].

Данные морфометрии ИФ свидетельствуют, что в значительной степени ИФ присутствует уже на момент трансплантации и наиболее быстро прогрессирует в первые 3 месяца жизни ПАТ, что свидетельствует о необходимости его ранней оценки. Кроме того, процент ИФ в 3 месяца имеет предикторное значение, так как коррелирует с СКФ в 3, 12 и 24, 36 и 48 месяцев [36].

## АНТИТЕЛО-ОПОСРЕДОВАННОЕ ОТТОРЖЕНИЕ (АОО)

Lynn Cornell (США) обратила внимание на значение поражений микроциркуляторного русла (МЦР) у сенсibilизированных пациентов и влияние терапии на патологические изменения. Воспаление в МЦР имеет негативные последствия для ПАТ: при выявлении в первичных биоптатах капиллярита, через 13 месяцев в повторных биоптатах регистрируется ТГ.

Anthony Chang (США) доложил результаты работ по иммунофенотипированию интимального артериита. При ОТОО и ОАОО отсутствует достоверная разница в инфильтрации интимы CD3, CD8, CD68, CD163-позитивными лейкоцитами. CD56+ NK-клетки чаще выявляются в интиме при ОАОО.

Carmen Lefaucheur (Франция) также посвятила доклад интимальному артерииту. В результате проведенного кластерного анализа оказалось, что отторжение с артериитом (как ДСА+, так и ДСА-) представляет собой промежуточную группу между ОТОО без артериита и ОАОО без артериита в плане иммунологии и прогноза. В этой группе часто выявляется тубулит (63%), и ИВ (72%), и гломерулит (88%), и капиллярит ПТК. Отторжение с артериитом не отвечает на применение стероидов, протекает более тяжело, чем ОТОО, имеет худший прогноз и часто ассоциируется с ОАОО.

Прогностическими факторами несостоятельности ПАТ у пациентов с интимальным артериитом являются 3-я степень артериита, титр ДСА более

3000 СИФ (средняя интенсивность флюоресценции) в Luminex-исследовании, сумма индексов i+t (по Банфф-97) больше 3 баллов. СИФ позволяет также достоверно предсказать развитие АОО: для пациентов с СИФ более 6000 риск АОО возрос в 100 раз по сравнению с СИФ менее 465 [28].

Brian Nankivell (Австралия) доложил о роли ЭМ в ранней диагностике антитело-опосредованных повреждений. Ранние изменения в поврежденном эндотелии ГК и ПТК включают увеличение эндотелиоцитов в размере, их вакуолизацию, зубчатые контуры, потерю фенестр, изменения микроворсинок. Эти реактивные изменения коррелируют с уровнем ДСА. Для диагностики и прогнозирования достаточно оценить 3–4 петли капилляров на клубочек и 3–4 ПТК.

Gary Hill (Франция) посвятил свой доклад антитело-опосредованному артериосклерозу. У пациентов ДСА+ с капилляритом ПТК, гломерулитом, интерстициальным воспалением и другими признаками АОО (даже при отсутствии интимального артериита) отмечено достоверно более быстрое прогрессирование артериосклероза между 3-м и 12-м месяцами после трансплантации по сравнению с пациентами ДСА-. Наблюдения свидетельствуют, что ускоренный артериосклероз представляет собой немой, обычно сублейкоцитарный воспалительный и пролиферативный ответ [23].

Артериосклероз при старении характеризуется почти полным отсутствием клеток в фиброзированной интиме, склерозом и эластозом, тогда как при артериосклерозе в трансплантате клеточность повышена кнутри от внутренней эластической мембраны, прежде всего за счет присутствия  $\alpha$ -SMA-позитивных фибробластов. Поэтому если индекс  $cv \geq 2$ , вероятность трансплантационной артериопатии составляет 80–90%.

Поскольку артериопатия при ХААОО ускоряет развитие артериосклероза, а ускорение артериосклероза, в свою очередь, ускоряет трансплантационную артериопатию, граница между ними является эфемерной, и даже в разных сегментах одного сосуда можно наблюдать оба процесса. Поэтому доктор Hill предложил считать ускоренный после трансплантации артериосклероз формой трансплантационной артериопатии.

Michael Mengel подытожил результаты работы симпозиума по АОО. Для профилактики АОО необходимо выявление сенсibilизированных реципиентов, поскольку наличие антител к HLA достоверно повышает риск потери ПАТ. За последние годы чувствительность и специфичность методов детекции ДСА повысилась [9, 10, 48], но «хромает» стандартизация. Среди них «лидирует» технология Luminex [10], которая позволяет более полно оценивать активность анти-HLA-антител, их кли-

нический эффект, силу и специфичность и разработать протоколы пересадки при наличии у реципиента ДСА (десенсибилизация и обмен почками между несовместимыми парами).

Тем не менее ОАОО остается серьезной проблемой, поскольку его частота составляет 20–50% при наличии ДСА. Хотя терапия, направленная на снижение активности ДСА, может привести к обратному развитию проявлений ОАОО, оно, тем не менее, имеет негативное влияние на выживание ПАТ. Кроме того, субклиническое ОАОО, которое часто наблюдается при кросс-матч-позитивной трансплантации, также ведет к хроническим гистологическим изменениям в ПАТ и сокращает его жизнь [17].

Перспективным методом профилактики и лечения АОО является применение ингибитора протеасом бортезомиба, который индуцирует апоптоз плазматиков [25]. Профилактическое назначение бортезомиба снижает частоту ОАОО. При терапии раннего ОАОО бортезомиб достоверно снижает уровень ДСА, улучшает структуру и функцию ПАТ; при позднем ОАОО степень резистентности к препарату выше [35, 45, 46].

Ингибирование терминальных звеньев активации системы комплемента с помощью гуманизованного анти-C5-антитела экулизумаба позволяет снизить частоту АОО при позитивном кросс-матче (7,7 против 41,2%). В одногодичных протокольных биопсиях частота ТГ у пациентов, получавших эклизумаб, составляла 6,7 против 35,7% [42, 47].

Широко признано существование С4d-негативного АОО, и разрабатываются его диагностические критерии.

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПАТОЛОГИЯ

Задачей развиваемого лабораторией Halloran P.F. (Канада) направления является создание интегральной системы молекулярных находок, имеющих отношение к гистологии ПАТ. Банфф-классификация описывает гистологические изменения в ПАТ, но не учитывает их взаимоотношения друг с другом и лежащие в основе повреждений биологические процессы. Патологические изменения в ПАТ относятся к различным группам патогенетических механизмов, что можно выявить при проведении кластерного анализа: 1) изменения микроциркуляции, в том числе воспаление (гломерулит, капиллярит) и деграция (двойные контуры ГК, экспансия мезангия); 2) рубцевание/гиалиноз; 3) тубулоинтерстициальное воспаление.

Применение методики *microarray* («молекулярный микроскоп») для изучения биоптатов ПАТ дает возможность определить молекулярный фенотип процесса и интегрировать молекулярный диагноз в Банфф-классификацию. Интеграция гисто-

логического и молекулярного фенотипов позволит не только поставить диагноз, но и определиться с активностью процесса, стадией, прогнозом и предполагаемым ответом на терапию (тераностика), что лучше удовлетворит запросы нефрологов [14].

Благодаря проделанной его коллективом работе выделены наборы патогенетически-обусловленных транскриптов, характеризующих состояние ЭК, работу канальцевых транспортеров, присутствие и активность в ПАТ цитотоксических Т-лимфоцитов, макрофагов, эффекты IFN- $\gamma$ , процессы деления клеток и апоптоза.

Результаты показали, что изменения одиночных молекул и патогенетически обоснованных наборов транскриптов отражают крупномасштабные координированные нарушения, стереотипные при различных заболеваниях и повреждениях. Тем не менее количественные изменения экспрессии молекул и их наборов специфичны. Еще до морфологических проявлений увеличивается экспрессия генов, участвующих в процессах деления клеток и апоптоза, и подавляется экспрессия генов дифференцированного эпителия. При отторжении выявляются транскрипты эффектов IFN- $\gamma$ ; при ОТОО – транскрипты Т-клеток и макрофагов; при АОО – транскрипты эндотелия и НК-клеток. Гены, связанные с несостоятельностью ПАТ, прежде всего имели отношение к острому повреждению ткани, дедифференцировке эпителия, ремоделированию матрикса и эффектам TGF- $\beta$ , однако у них было мало общего с генами, связанными с отторжением. На основании полученных данных для каждого пациента можно рассчитать молекулярный индекс риска потери ПАТ. Этот индекс коррелирует с ИФ, КА, тубулитом, интерстициальным воспалением, протеинурией и СКФ. При многофакторном анализе молекулярный индекс риска, многослоистость базальной мембраны ПТК, гиалиноз артериол и протеинурия были независимыми предикторами потери трансплантата.

Молекулярный фенотип лучше всего описывается в терминах трех элементов: 1) специфические заболевания, 2) повреждение и активный ответ на него, 3) суммарный эффект повреждений [19, 40]. Транскрипты, характеризующие регенеративный ответ на повреждение, являются лучшими коррелятами функциональных нарушений и риска потери трансплантата в будущем. Установлено, что при воспалении в ПАТ увеличивается содержание транскриптов цитотоксических Т-лимфоцитов, макрофагов, эффектов IFN- $\gamma$ . При повреждении и репарации снижается содержание транскриптов транспортеров. Максимум нарушений имеет место при ОТОО. Когда повреждение активно, увеличивается содержание транскриптов, характерных для деления и апоптоза клеток. Когда оно угасает – увеличивается содержание транскриптов дедифференцировки.

В поздних биопсиях с ИФ/КА, фиброзирующим утолщением интимы артерий и гиалинозом артериол, что отражает суммарный эффект повреждений, увеличивается содержание транскриптов В-лимфоцитов, плазматических и тучных клеток. Однако эти изменения не прогрессируют без продолжающегося заболевания или повреждения.

Vanu Sis посвятила доклад молекулярной диагностике АОО. Она обратила внимание на ограниченные возможности гистологических и серологических исследований в оценке активности АОО. Например, установлено, что при ОАОО С4d-депозиты могут быть фокальными или вовсе отсутствовать. ДСА являются плохими индикаторами для постановки диагноза и предикторами прогноза. Применение *microarray*-методики в таких случаях позволяет выявить увеличение содержания в ПАТ транскриптов эндотелиальных, НК-клеток и моноцитов и диагностировать С4d-негативные случаи.

Для АОО характерно повышение транскриптов эндотелиальных транспортеров (ENDAT), IFN- $\gamma$ , макрофагов и цитотоксических Т-лимфоцитов. Выживание ПАТ при наличии ТГ в биоптатах наилучшее, если ENDAT не определяются, хуже при наличии ENDAT, но отсутствии С4d, и еще хуже при ENDAT- и С4d-позитивности. В прогнозировании развития АОО может помочь выявление в ПАТ следующих транскриптов: кадгерин 5 (CDH5), фактор фон Виллебранда (VWF), рецептор хемокинов DARC, молекула клеточной адгезии тромбоцитов/эндотелия Pecam 1.

В своем докладе Guinilla Einecke (Германия) остановилась на молекулярных механизмах утраты нефронов. Ответом ткани на повреждение является потеря переносчиков растворенных в моче веществ и экспрессия транскриптов, относящихся к процессам повреждения/восстановления. Потеря транспортеров начинается с 1-го дня после пересадки: она коррелирует со степенью тубулита и может быть признаком ранней стадии ОТОО [13]. Повреждению ЭК-каналцев предшествует увеличение содержания в биоптате транскриптов моноцитов/макрофагов, Т-лимфоцитов и признаки нарушения микроциркуляции. Изменения транскриптов в 0-биопсиях коррелируют с риском отсроченной функции, тогда как изменения транскриптов в поздних биопсиях позволяют идентифицировать пациентов с высоким молекулярным риском потери ПАТ.

Последовательность событий, ведущих к потере нефронов, можно представить следующим образом. Вслед за повреждением эпителия в перитрансплантационном периоде следует гомеостатическая попытка восстановления повреждения в виде избыточной регенерации. На данном этапе повреждения потенциально обратимы. При неудаче репарации

(если персистирует причина) со временем снижается количество нефронов [18].

Luis Hidalgo (Канада) доложил об изменениях в ПАТ, инициированных *de novo* ДСА-антителами. В биоптатах пациентов с ОАОО изменяется экспрессия 132 транскриптов, все из которых ассоциированы с ДСА 2-го класса. Отмечено избирательное усиление экспрессии транскриптов НК-клетками и эндотелия. Под влиянием секретируемого НК-клетками IFN- $\gamma$  увеличивается экспрессия HLA-молекул эндотелиальными клетками, они активируются и пролиферируют [22]. Гистологически с *de novo* ДСА ассоциированы воспаление (гломерулит и капиллярит) и повреждение (ТГ, многослойность базальной мембраны капилляров, С4d-позитивность) МЦР, но не степень ИФ, артериального фиброза и тубулоинтерстициального воспаления. *De novo* ДСА коррелируют со снижением выживания ПАТ после биопсии [21].

## ПРОТОКОЛЬНЫЕ БИОПСИИ

Доклад Brian Nankivell был посвящен обзору изменений в протокольных биопсиях на фоне современной иммуносупрессивной терапии и сравнению эффективности ЦсА и такролимуса в плане предотвращения морфологических изменений в ПАТ. При приеме такролимуса по сравнению с ЦсА тубулит и интерстициальное воспаление выражены в меньшей степени, но только в течение года после трансплантации. В последующие годы выбор препарата не влияет на индекс «i», а «t» меньше у пациентов, получающих ЦсА. Степени ИФ, ИФ в сочетании с воспалением, ТГ, увеличения мезангиального матрикса, гломерулосклероза выше у пациентов, получающих ЦсА. Закономерно функция ПАТ лучше у пациентов, получающих такролимус. Артериологиалиноз приобретает важность с 5-го года после пересадки. Помимо совершенствования иммуносупрессивной терапии причинами улучшения функции ПАТ являются тщательное выявление ДСА, диагностика и лечение ЦМВ-инфекции.

Verena Brocker (Германия) доложила о 10-летнем опыте работы по исследованию протокольных биопсий. При изучении 6-недельных, 3- и 6-месячных протокольных биопсий наиболее частой находкой были субклинические пограничные изменения. При обнаружении в протокольных биопсиях капиллярита ПТК в сочетании с гломерулитом затем в 30% случаев развивалась ТГ, и 28% пациентов потеряли ПАТ через 2 года, тогда как при изолированном гломерулите – только в 10%, а ПАТ потеряли 5% пациентов. При наличии инфильтратов в зонах ИФ/КА (даже не отвечающих критериям отторжения) развитие дисфункции ускоряется. Однако на сегодня целесообразность включения в классификацию «ми-

норных или неспецифических» клеточных инфильтратов и их интерпретация остаются неясными, поскольку их частота в протокольных биопсиях и биопсиях по показаниям не отличается. Установлено, что единственным предиктором функции ПАТ является персистирующее воспаление в последовательных биопсиях вне зависимости от типа, локализации и состава инфильтрата, что указывает на продолжающееся повреждение аллографта. Таким образом, по ее мнению, в Банфф-классификации следует учитывать любые инфильтраты [32].

Результаты исследования 1- и 5-летних протокольных биопсий показали, что в последние годы в срок до 5 лет отмечаются более редкие и менее тяжелые и прогрессирующие хронические морфологические изменения в ПАТ, о чем сообщалось ранее. Они выражены в легкой степени как в 1 год, так и в 5 лет. Умеренно-тяжелый ИФ присутствует в 13% биоптатов в 1 год и в 17% – в 5 лет. Только у 23% пациентов легкий ИФ в 1 год прогрессировал в умеренно-тяжелый в 5 лет [41].

Daniel Seron (Испания) сообщил о негативных последствиях сочетания в биоптате воспаления и ИФ. Выживаемость ПАТ снижается при наличии в биоптатах и воспалительных изменений, и ИФ (которым заканчивается воспаление), но при сочетании воспаления с ИФ прогноз ухудшается в еще большей степени [34]. Иммунофенотипирование этих биоптатов показало, что среди CD3-, CD20-, CD45-, CD68-позитивных лейкоцитов только увеличение количества CD20+ В-лимфоцитов в инфильтрате негативно влияло на выживание ПАТ.

Большое внимание коллектив доктора D. Seron уделяет установлению прогностического значения субклинических изменений в графте, поскольку, по имеющимся данным, субклиническое отторжение влечет за собой значительное тубулоинтерстициальное повреждение с последующим ИФ и КА [24]. Частота субклинического острого отторжения составляет 60,8; 45,7; 25,8 и 17,7% через 1, 3, 12 и более 12 месяцев после трансплантации соответственно. Комбинация такролимуса и ММФ более эффективно предотвращает субклиническое отторжение.

Michael Mengel посвятил свой доклад обзору молекулярных фенотипов 6-недельных протокольных биопсий. Находки в них позволяют осуществить раннюю интервенцию. Среди субклинических процессов 1/3 составляют пограничные изменения и ОТОО, 2/3 – другие формы воспаления. Изменения транскрипции генов были классифицированы на неперекрывающиеся патогенетически обоснованные наборы транскриптов, отражающих воспаление в ПАТ, продолжающееся активное повреждение, репаративный ответ на повреждение паренхимы, стромы и микроциркуляции, угасание повреждения. Содержание транскриптов активного

повреждения (но не гистологические изменения) коррелировало с функцией ПАТ. Выявление в ПАТ транскриптов угасающего повреждения и воспаления коррелировало с гистологическими признаками воспаления в интерстиции и канальцах, причем больше воспалительных транскриптов обнаруживалось при ОТОО или пограничных изменениях. Эти изменения скорее отражают репаративный ответ на повреждение при имплантации почки [33]. Отмечено, что молекулярные изменения не позволяли предсказать потребность в биопсии по клиническим показаниям, функциональный износ или потерю ПАТ в будущем.

## НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

David Rush (США) провел обзор методов неинвазивной диагностики патологии ПАТ. Предпочтительно определение гранзима А (а не гранзима Б) в моче для диагностики субклинического отторжения. Содержание мРНК гранзима Б и перфорина достоверно выше при клинически значимом отторжении, чем у пациентов с ОКН или стабильной функцией ПАТ, но не повышается при субклиническом отторжении [43].

Наши данные свидетельствуют, что определение в крови в раннем посттрансплантационном периоде sCD30 и IP10 позволяет предсказать развитие острого отторжения [4, 5]. В моче также можно выявлять IP10, CXCL 4, 9, 11, NGAL, альфа1-микроглобулин. Уровень IP10 в моче повышается при клиническом тубулите [37].

Sophie Brouard из университета г. Нанта (Франция) посвятила свой доклад В-клеточной толерантности, которая остается малоизученной, в отличие от центральной роли регуляторных Т-лимфоцитов. При толерантности в графтах увеличивается содержание специфичных для В-лимфоцитов мРНК CD79 и CD19, а в периферической циркуляции увеличивается абсолютное количество В-клеток памяти и экспрессирующих маркеры активации (CD40, CD86) CD20+ В-лимфоцитов [30].

## ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ (ЭМП)

Одно из пленарных заседаний называлось: «Роль паренхимы в ухудшении функции аллотрансплантата», на котором обсуждалась роль ЭМП в патологии трансплантатов. ЭМП – это биологический процесс, в ходе которого ЭК дедифференцируются, а затем приобретают фенотип мезенхимальных клеток, а именно: расширение миграционного потенциала, инвазивность, повышенную устойчивость к апоптозу и значительно увеличенное производство компонентов внеклеточного матрикса.

Alexandre Hertig (Франция) высказался в пользу этой концепции. По его данным, повреждение ПАТ ведет к гибели части клеток тубулярного эпителия путем апоптоза [16]. Другие эпителиоциты теряют присущую им ориентацию, в частности бета-катенин, который в норме фиксирует клетку к базальной мембране, мигрирует в цитоплазму. Эпителиальные клетки канальцев начинают экспрессировать мезенхимальные маркеры: виментин, альфа-актин, S100A4 [20], утрачивают адгезию, превращаются в миофибробласты интерстиция и начинают миграцию через внеклеточный матрикс [44], секретировав матриксные белки и иницируя ИФ [26, 49].

Виментин и транслокация бета-катенина, по мнению А. Hertig, – это два лучших маркера, позволяющих предсказать развитие ИФ/КА, функцию ПАТ и исход трансплантации. Их раннее выявление в биоптатах может служить индикатором необходимости конверсии иммуносупрессии.

Hermann-Josef Grone (Германия) выступил с докладом, в котором отрицалось существование ЭМП. В пользу этого говорят результаты работы [29], в которой не выявлена миграция ЭК-канальцев в интерстиций. Напротив, доказано, что миофибробласты интерстиция образуются из резидентных фибробластов и моноцитов крови. На сегодняшний день отсутствуют понятные данные об ЭМП в других органах.

В результате дискуссии наибольшую поддержку получило мнение, что ЭМП не существует, поскольку не получены убедительные доказательства миграции ЭК через базальную мембрану и продукции соединительной ткани в интерстиции трансплантата. Однако *in situ* ЭК дедифференцируются, принимают эмбриональный и мезенхимальный фенотип, продуцируют TGF- $\beta$  как результат повреждения и попытки регенерации. В ходе постконгрессной интернет-дискуссии производился поиск наиболее подходящего термина (эпителиально-мезенхимальная метаплазия, эпителиально-мезенхимальная трансдифференцировка, эпителиальная дедифференцировка, регенеративный ответ эпителия на повреждение).

Окончательные решения о модификации классификации будут приняты и опубликованы позже.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трайлин А.В., Никоненко Т.Н., Остапенко Т.И. и др. Исходное состояние донорской почки и риск развития отсроченной и замедленной функции почечного аллотрансплантата // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2008. Т. 41. № 3. С. 13–18.
2. Трайлин А.В., Никоненко Т.Н., Остапенко Т.И. и др. Морфологические и иммуногистохимические проявления различных форм острого отторжения почечного аллотрансплантата // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2009. Т. 11. № 2. С. 29–36.
3. Трайлин А.В., Никоненко Т.М. Спосіб визначення ступеня хронічної недостатності ниркового алотрансплантату Пат. 46208 Україна, МПК G01N 33/50. Заявник і патентовласник Запорізька медична академія післядипломної освіти. – № у 2009 06739. Заявл. 26.06.09. Опубл. 10.12.09. Бюл. № 23.
4. Трайлин А.В. Оценка концентрации в сыворотке растворимого CD30 в диагностике ранней дисфункции почечного аллотрансплантата // Клінічна хірургія. 2009. № 10. С. 44–46.
5. Трайлин А.В., Никоненко А.С., Никоненко Т.Н. и др. Оценка риска развития острой реакции отторжения почечного аллотрансплантата путем определения сывороточной концентрации IP10 // Медицина сегодня и завтра. 2011. № 1–2. С. 263–265.
6. Anglicheau D., Loupy A., Lefaucheur C. et al. A simple clinico-histopathological composite scoring system is highly predictive of graft outcomes in marginal donors // Am. J. Transplant. 2008. Vol. 8. P. 2325–2334.
7. Batal I., Lunz J.G. 3rd, Aggarwal N. et al. A critical appraisal of methods to grade transplant glomerulitis in renal allograft biopsies // Am. J. Transplant. 2010. Vol. 10. P. 2442–2452.
8. Batal I., Azzi J., El-Haddad N. et al. Immunohistochemical markers of tissue injury in biopsies with transplant glomerulitis. Hum Pathol. 2011.
9. Bray R.A., Nickerson P.W., Kerman R.H., Gebel H.M. Evolution of HLA antibody detection: technology emulating biology // Immunol. Res. 2004. Vol. 29. P. 41–54.
10. Bray R.A., Tarsitani C., Gebel H.M., Lee J.H. Clinical cytometry and progress in HLA antibody detection // Methods Cell. Biol. 2011. Vol. 103. P. 285–310.
11. De Serres S.A., Vadivel N., Mfarrej B.G. et al. Monocyte-secreted inflammatory cytokines are associated with transplant glomerulopathy in renal allograft recipients // Transplantation. 2011. Vol. 15. P. 552–559.
12. Drachenberg C.B., Papadimitriou J.C., Hirsch H.H. et al. Histological Patterns of Polyomavirus Nephropathy: Correlation with Graft Outcome and Viral Load // Am. J. Transplant. 2004. Vol. 4. P. 2082–2092.
13. Einecke G., Broderick G., Sis B., Halloran P.F. Early Loss of Renal Transcripts in Kidney Allografts: Relationship to the Development of Histologic Lesions and Alloimmune Effector Mechanisms // Am. J. Transplant. 2007. Vol. 7. P. 1121–1130.
14. Einecke G., Reeve J., Sis B. et al. A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies // J. Clin. Invest. 2010. Vol. 120. P. 1862–1872.
15. Farris A.B., Adams C.D., Broussard N. et al. Morphometric and visual evaluation of fibrosis in renal biopsies // J. Am. Soc. Nephrol. 2011. Vol. 22. P. 176–186.
16. Frisch S.M. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis // J. Cell Biol. 1994. Vol. 124. P. 619–626.
17. Gloor J., Stegall M.D. Sensitized renal transplant recipients: current protocols and future directions // Nat. Rev. Nephrol. 2010. Vol. 6. P. 297–306.
18. Halloran P.F., de Freitas D.G., Einecke G. et al. An integrated view of molecular changes, histopathology and outcomes in kidney transplants // Am. J. Transplant. 2010. Vol. 10. P. 2223–2230.

19. *Halloran P.F., de Freitas D.G., Einecke G. et al.* The molecular phenotype of kidney transplants // *Am. J. Transplant.* 2010. Vol. 10. P. 2215–2222.
20. *Hertig A., Anglicheau D., Verine J. et al.* Early Epithelial Phenotypic Changes Predict Graft Fibrosis // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008. Vol. 19. P. 1584–1591.
21. *Hidalgo L.G., Campbell P.M., Sis B. et al.* De Novo Donor-Specific Antibody at the Time of Kidney Transplant Biopsy Associates with Microvascular Pathology and Late Graft Failure // *Am. J. Transplant.* 2009. Vol. 9. P. 2532–2541.
22. *Hidalgo L.G., Sis B., Sellares J. et al.* NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection // *Am. J. Transplant.* 2010. Vol. 10. P. 1812–1822.
23. *Hill G.S., Nochy D., Bruneval P. et al.* Donor-Specific Antibodies Accelerate Arteriosclerosis after Kidney Transplantation // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2011. Vol. 22. P. 975–983.
24. *Ibernón M., Gomá M., Moreso F. et al.* Subclinical rejection impairs glomerular adaptation after renal transplantation // *Kidney Int.* 2006. Vol. 70. P. 557–561.
25. *Jordan S.C., Reinsmoen N., Peng A. et al.* Advances in diagnosing and managing antibody-mediated rejection // *Pediatr. Nephrol.* 2010. Vol. 25. P. 2035–2048.
26. *Kalluri R. and Weinberg R.A.* The basics of epithelial-mesenchymal transition // *J. Clin. Invest.* 2009. Vol. 119. P. 1420–1428.
27. *Kayler L.K., Mohanka R., Basu A. et al.* Correlation of histologic findings on preimplant biopsy with kidney graft survival // *Transpl. Int.* 2008. Vol. 21. P. 892–908.
28. *Lefaucheur C., Loupy A., Hill G.S. et al.* Preexisting Donor-Specific HLA Antibodies Predict Outcome in Kidney Transplantation // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010. Vol. 21. P. 1398–1406.
29. *Le Hir M., Hegyi I., Cueni-Loffing D. et al.* Characterization of renal interstitial fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells in healthy and inflamed rodent kidneys // *Histochem. Cell. Biol.* 2005. Vol. 123. P. 335–346.
30. *Le Texier L., Thebault P., Lavault A. et al.* Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile // *Am. J. Transplant.* 2011. Vol. 11. P. 429–438.
31. *Loupy A., Suberbielle-Boissel C., Hill G.S. et al.* Outcome of Subclinical Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplant Recipients with Preformed Donor-Specific Antibodies // *Am. J. Transplant.* 2009. Vol. 9. P. 2561–2570.
32. *Mengel M., Gwinner W., Schwarz A. et al.* Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts // *Am. J. Transplant.* 2007. Vol. 7. P. 356–365.
33. *Mengel M., Chang J., Kayser D. et al.* The molecular phenotype of 6-week protocol biopsies from human renal allografts: reflections of prior injury but not future course // *Am. J. Transplant.* 2011. Vol. 11. P. 708–718.
34. *Moreso F., Ibernón M., Gomá M. et al.* Subclinical Rejection Associated with Chronic Allograft Nephropathy in Protocol Biopsies as a Risk Factor for Late Graft Loss // *Am. J. Transplant.* 2006. Vol. 6. P. 747–752.
35. *Sadaka B., Alloway R.R., Woodle E.S.* Clinical and investigational use of proteasome inhibitors for transplant rejection // *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2011. Vol. 20. P. 1535–1542.
36. *Servais A., Meas-Yedid V., Noël L.H. et al.* Interstitial Fibrosis Evolution on Early Sequential Screening Renal Allograft Biopsies Using Quantitative Image Analysis // *Am. J. Transplant.* 2011. Vol. 11. P. 1456–1463.
37. *Schaub S., Nickerson P., Rush D. et al.* Urinary CXCL9 and CXCL10 levels correlate with the extent of subclinical tubulitis // *Am. J. Transplant.* 2009. Vol. 9. P. 1347–1353.
38. *Singh H.K., Andreoni K.A., Madden V. et al.* Presence of Urinary Haufen Accurately Predicts Polyomavirus Nephropathy // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009. Vol. 20. P. 416–427.
39. *Sis B., Mengel M., Haas M. et al.* Banff '09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups // *Am. J. Transplant.* 2010. Vol. 10. P. 464–471.
40. *Sis B., Einecke G., Chang J. et al.* Cluster analysis of lesions in nonselected kidney transplant biopsies: microcirculation changes, tubulointerstitial inflammation and scarring // *Am. J. Transplant.* 2010. Vol. 10. P. 421–430.
41. *Stegall M.D., Park W.D., Larson T.S. et al.* The histology of solitary renal allografts at 1 and 5 years after transplantation // *Am. J. Transplant.* 2011. Vol. 11. P. 698–707.
42. *Stegall M.D., Diwan T., Raghavaiah S. et al.* Terminal Complement Inhibition Decreases Antibody-Mediated Rejection in Sensitized Renal Transplant Recipients // *Am. J. Transplant.* 2011. Vol. 11. P. 2405–2413.
43. *Van Ham S.M., Heutinck K.M., Jorritsma T. et al.* Urinary granzyme A mRNA is a biomarker to diagnose subclinical and acute cellular rejection in kidney transplant recipients // *Kidney Int.* 2010. Vol. 78. P. 1033–1040.
44. *Vongwiwatana A., Tasanarong A., Rayner D.C. et al.* Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: the role of tubular cells in fibrogenesis // *Am. J. Transplant.* 2005. Vol. 5. P. 1367–1374.
45. *Walsh R.C., Everly J.J., Brailey P. et al.* Proteasome inhibitor-based primary therapy for antibody-mediated renal allograft rejection // *Transplantation.* 2010. Vol. 89. P. 277–284.
46. *Walsh R.C., Brailey P., Girmita A. et al.* Early and late acute antibody-mediated rejection differ immunologically and in response to proteasome inhibition // *Transplantation.* 2011. Vol. 91. P. 1218–1226.
47. *Wang H., Rollins S.A., Gao Z. et al.* Complement inhibition with an anti-C5 monoclonal antibody prevents hyperacute rejection in a xenograft heart transplantation model // *Transplantation.* 1999. Vol. 68. P. 1643–1651.
48. *Ward W.W.* Biochemical and physical properties of green fluorescent protein // *Methods Biochem. Anal.* 2006. Vol. 47. P. 39–65.
49. *Yang J., Liu Y.* Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis // *Am. J. Pathol.* 2001. Vol. 159. P. 1465–1475.
50. *Yushkov Y., Dikman S., Alvarez-Casas J. et al.* Optimized technique in needle biopsy protocol shown to be of greater sensitivity and accuracy compared to wedge biopsy // *Transplant Proc.* 2010. Vol. 42. P. 2493–2497.