

DOI: 10.15825/1995-1191-2016-3-39-49

## АНАЛИЗ МЕТОДОВ СКРИНИНГОВОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К HLA В ДИАГНОСТИКЕ АНТИТЕЛО-ОПОСРЕДОВАННОГО ОТТОРЖЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАТА ПОЧКИ

Е.С. Иванова<sup>1,2</sup>, Е.С. Столяревич<sup>1,3</sup>, О.Е. Гичкун<sup>1</sup>, Н.Б. Богданова<sup>1</sup>, Ф.С. Баранова<sup>2</sup>, Л.Ю. Артюхина<sup>2</sup>, Н.А. Томилина<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ГБУЗ «Городская клиническая больница № 52 Департамента здравоохранения г. Москвы», Московский городской нефрологический центр, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Кафедра нефрологии ФПДО ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», Москва, Российская Федерация

**Цель исследования:** оценка возможности скринингового выявления антител (АТ) к HLA I и II классов в сочетании с морфологическими и иммуногистохимическими методами для диагностики гуморального отторжения трансплантата и сравнение полученных данных в зависимости от применяемого метода определения АТ к HLA (ELISA и LUMINEX). **Материалы и методы.** Проанализированы данные 192 пациентов с дисфункцией почечного трансплантата, которым была выполнена биопсия трансплантата (с определением C4d) и исследованы АТ к HLA (у 109 пациентов методом ELISA, у 58 – методом LUMINEX, у 25 пациентов – и ELISA, и LUMINEX). На основании морфологического диагноза пациенты были разделены на 3 группы: 85 пациентов с хроническим отторжением трансплантата (ХОТ), 39 пациентов с острым гуморальным отторжением трансплантата (ОГО), 68 пациентов с иной патологией трансплантата (группа контроля). **Результаты.** АТ к HLA определялись у 84,7% пациентов с ХОТ, 84,6% пациентов с ОГО и у 33,8% ( $p < 0,001$ ) в контрольной группе, причем резко доминировали АТ к HLA II класса. Между уровнем антител, выявляемых различными методами, определялась тесная корреляция ( $r^2$  для АТ к HLA I класса составил 0,773, для АТ к HLA II класса – 0,379,  $p < 0,01$ ). Однако при применении метода LUMINEX АТ к HLA выявлялись чаще во всех группах, что свидетельствует о большей его чувствительности. Особенно это значимо для диагностики C4d-негативного острого отторжения, частота которого составила 22,2% при LUMINEX vs. 4,8% при использовании метода ELISA. С другой стороны, АТ к HLA методом LUMINEX выявлялись у 55% пациентов контрольной группы, что требовало определения их донорспецифичности. **Заключение.** При наличии характерной морфологической картины и экспрессии C4d-фрагмента компонента скрининговое определение АТ к HLA (методами ELISA, LUMINEX) является достаточным для диагностики гуморального отторжения. Однако в некоторых случаях необходимо применение более специфичных методов диагностики.

**Ключевые слова:** АТ к HLA, C4d-компонент компонента, антитело-опосредованное отторжение, трансплантационная гломерулопатия.

**Для корреспонденции:** Иванова Екатерина Сергеевна. Адрес: 123182, г. Москва, ул. Пехотная, д. 3. Тел. (499) 196-17-94. E-mail: katerineiv@mail.ru.

**For correspondence:** Ivanova Ekaterina Sergeevna. Address: 3, Pekhotnaya St., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (499) 196-17-94. E-mail: katerineiv@mail.ru.

# COMPARISON OF DIFFERENT METHODS OF ANTI-HLA ANTIBODIES DETECTION IN DIAGNOSIS OF ANTIBODY-MEDIATED RENAL ALLOGRAFT REJECTION

*E.S. Ivanova<sup>1,2</sup>, E.S. Stolyarevich<sup>1,3</sup>, O.E. Gichkun<sup>1</sup>, N.B. Bogdanova<sup>1</sup>, F.S. Baranova<sup>2</sup>, L.Yu. Artyukhina<sup>2</sup>, N.A. Tomilina<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup> V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Moscow City Nephrology Center, Moscow City Hospital N 52, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Chair of Nephrology, A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

**Aim:** to analyze the relationship between circulating anti-HLA antibodies (class-I and class-II), renal pathology and C4d deposition in cases of late acute and chronic antibody-mediated renal allograft rejection according to the method of antibodies detection (ELISA and LUMINEX). **Materials and methods.** The study included 192 patients with indicative graft biopsies (with C4d-staining) and screening detection of anti-HLA antibodies (109 patients by ELISA, 58 patients by LUMINEX, 25 patients – both methods). Patients were divided into 3 groups based on pathology findings: 85 patients with chronic graft rejection, 39 patients with acute antibody-mediated rejection (AMR), 68 patients of control group had no signs of AMR. **Results.** Anti-HLA antibodies (predominantly class-II anti-HLA) were identified in 84.7% of patients with chronic graft rejection, in 84.6% of patients with acute AMR and 33.8% of control group ( $p < 0.001$ ). Close correlation between the levels of anti-HLA antibodies detected by different methods was revealed for both classes of antibodies ( $r^2$  class-I anti-HLA = 0.773,  $r^2$  class-II anti-HLA = 0.379,  $p < 0.01$ ). LUMINEX proved to be more sensitive in anti-HLA antibodies detection in all groups. It was especially significant for the diagnosis of C4d-negative acute AMR whose frequencies were 22.2% and 4.8% in detection by LUMINEX and ELISA, respectively ( $p < 0.01$ ). On the other hand, anti-HLA antibodies being detected by LUMINEX in 55% of patients of the control group more often required determination of donor specificity. **Conclusion.** Screening of anti-HLA antibodies (by ELISA and LUMINEX) along with specific renal pathology and C4d deposition is sufficient for the diagnosis of acute and chronic AMR in most cases. Being more sensitive LUMINEX method is preferable for the revealing of C4d-negative AMR, but it requires specific DSA detection in many cases.

*Key words:* anti-HLA antibodies, C4d, antibody-mediated rejection, transplant glomerulopathy.

## ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация почки является методом выбора в лечении хронической болезни почек, обеспечивая максимальную продолжительность и качество жизни. Вероятность развития отторжения трансплантационной почки наиболее высока в ранние сроки после операции, однако и в более поздние сроки оно представляет собой значимую клиническую проблему. Так, по данным DeCAF-исследования, именно гуморальное отторжение является наиболее частой причиной поздней дисфункции трансплантата и основной причиной его потерь в отдаленные сроки после аллотрансплантации почки (АТП) [1–3].

Традиционно диагноз антитело-опосредованного или гуморального отторжения ставится при выявлении донор-специфических антител (ДСА) в крови пациента и характерной морфологической картины микроциркуляторного воспаления в сочетании с экспрессией C4d-фрагмента комплемента на перитубулярных капиллярах (ПТК). При этом появление антител, как правило, предшествует и

клиническим, и морфологическим симптомам гуморального отторжения [4–6].

Развитие новых диагностических методов в течение последних 10 лет способствовало улучшению понимания биологии и механизмов аллоиммунного ответа. Во-первых, возможность идентификации активации комплемента на поверхности клеток эндотелия трансплантата при использовании специальных методов (иммуногистохимический, иммунофлуоресцентный) позволяет выявить C4d-фрагмент комплемента в биоптатах трансплантата [7, 8]. Во-вторых, твердофазный иммунологический анализ применяется для идентификации ДСА в крови с соответствующей точностью и чувствительностью [9, 10].

В твердофазном иммуноферментном анализе для обнаружения антител в сыворотке крови пациента используется смесь аффинно-очищенных антигенов гистосовместимости 1-го или 2-го классов, иммобилизованных на поверхности лунок полистироловых планшетов (ИФА). В твердофазном иммунолюминесцентном анализе на платформе

LUMINEX смесь очищенных антигенов гистосовместимости иммобилизована на полистироловых микросферах [11–14].

Известно, что ДСА могут появляться в любой период времени после трансплантации и к 5 годам после АТП наблюдаются у 20–25% реципиентов почечного трансплантата, приводя к развитию целого комплекса различных вариантов антитело-опосредованного отторжения трансплантата – от минимальных субклинических форм до хронической трансплантационной гломерулопатии (ХТГ), характеризующейся резистентностью к терапии и неблагоприятным прогнозом [2].

Экспрессия C4d-фрагмента комплемента является маркером антитело-опосредованного повреждения клеток эндотелия. Однако, как показывают данные литературы, его отсутствие не исключает участия антител в патогенезе ХТГ, то есть обнаружение экспрессии C4d-фрагмента комплемента является специфичным, но недостаточно чувствительным методом диагностики гуморального отторжения. Так, по данным различных авторов, в случаях ХТГ экспрессия C4d обнаруживается в широких пределах (от 25 до 61%), что может объясняться волнообразным характером процесса [15–19]. Недостаточная специфичность морфологических проявлений гуморального отторжения при поздней манифестации клинических проявлений еще больше затрудняет диагностику гуморального отторжения в поздние сроки после АТП. Таким образом, определение антидонорских антител является обязательным компонентом ранней диагностики этой патологии, а в случаях C4d-негативного отторжения этот показатель может считаться ключевым диагностическим признаком.

В литературе обсуждается вопрос о диагностической роли и прогностической значимости АТ к HLA, как наиболее раннем проявлении гуморального отторжения. Однако скрининговое определение АТ к HLA является недостаточно специфичным, так как помимо ДСА включает и недонор-специфические антитела. Тем не менее, будучи дополненным морфологическими и иммуногистохимическими данными, этот метод может быть применен для диагностики гуморального отторжения.

Целью настоящего исследования является оценка возможностей скринингового выявления циркулирующих АТ к HLA I и II классов в сочетании с морфологическими и иммуногистохимическими методами для диагностики гуморального отторжения, а также сравнение данных, полученных разными методами анализа антител (ИФА и LUMINEX).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 192 пациента с дисфункцией почечного трансплантата. Средний

возраст пациентов составил  $43,0 \pm 12,4$  года. Медиана среднего срока после АТП на момент выявления дисфункции была 63,8 (12,1; 94,1) мес.

Всем пациентам помимо стандартного клинического обследования выполнялась пункционная биопсия трансплантата почки. Показанием к биопсии являлось появление либо нарастание дисфункции трансплантата, под которой подразумевалось повышение креатинина сыворотки крови выше 0,13 ммоль/л и/или протеинурия выше 0,3 г/сут. Медиана креатинина сыворотки крови составила 0,24 (0,16; 0,27) ммоль/л, медиана протеинурии – 1,7 (0,3; 2,4) г/сут.

Гистологическое исследование биоптатов трансплантата почки включало в себя световую микроскопию и иммунофлюоресцентное исследование на замороженных срезах. При проведении световой микроскопии проводились окраски гематоксилином и эозином, ШИК-реакция и окраска трихромом по Массону. При иммунофлюоресцентном исследовании помимо стандартных сывороток (анти-IgG, анти-IgA, анти-IgM, анти-C3) использовались моноклональные FITC-меченные антитела анти-C4d. Заключение гистологического исследования формулировалось согласно классификации Banff 2009.

По результатам биопсии трансплантата почки все пациенты были разделены на 3 группы. Первую группу (85 человек) составили пациенты с ХОТ, морфологически по большей части представленные ХТГ (80 человек) и реже хронической трансплантационной васкулопатией (5 человек). Ко 2-й группе (39 человек) относились пациенты с кризами отторжения трансплантата с признаками микроциркуляторного воспаления (ОГО – острое гуморальное отторжение). Третья группа (68 человек) являлась группой контроля и была представлена пациентами с иной патологией трансплантата, включая хроническую трансплантационную нефропатию, хроническую нефротоксичность ингибиторов кальциневрина, гломерулонефрит трансплантата и т. д., а также 23 случая клеточных кризов отторжения без признаков микроциркуляторного воспаления.

Исследование АТ к HLA I и II классов проводилось в сыворотке крови всех пациентов после биопсии, выявившей гистологические признаки гуморального отторжения трансплантата почки, а также при подозрении на активацию гуморального звена иммунитета на основании клинических данных (развитие дисфункции на фоне низких уровней концентраций ингибиторов кальциневрина в крови, эпизодов пропуска иммуносупрессивной терапии и т. д.). В этих случаях исследование АТ к HLA выполнялось до биопсии трансплантата.

АТ IgG изотипа к HLA I и II классов исследовались методом ИФА (LIFECODES QuikScreen и LIFECODES B-Screen, IMMUCOR, USA) и твер-

дофазным иммунолюминесцентным анализом на платформе LUMINEX (LABScsreen Mixed, One Lambda, USA). Методом ИФА определяли анти-тела у 109 пациентов, у 58 пациентов – методом LUMINEX, у 25 пациентов – обоими методами (ИФА и LUMINEX). Результаты оценивали спектрофотометрически по уровню оптической плотности обработанных образцов в ИФА и по уровню медианной интенсивности флуоресценции (MFI) в анализе на платформе LUMINEX.

При статистической обработке данных переменные, имеющие нормальное распределение, описывались как среднее  $\pm$  средне-квадратичное отклонение. При сравнении средних значений использовали критерий Стьюдента. Для оценки достоверности различий качественных признаков применялся точный критерий Фишера и  $\chi^2$  критерий. Для переменных с распределением, отличным от нормального, вычислялись медиана и интерквартильный размах. Для сравнения этих переменных использовались критерии Манна–Уитни и Краскела–Уолиса. Результаты считались статистически достоверными при значениях  $p < 0,05$ . Статистический анализ выполнялся при помощи пакета программ SPSS.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинико-демографическая характеристика групп представлена в табл. 1. Пациенты выделенных групп не различались по возрасту и уровню креатинина крови ( $p > 0,3$  и  $p > 0,06$  соответственно). Средний возраст пациентов представленных групп был  $43,0 \pm 12,4$  года. Средний уровень креатинина на момент выполнения биопсии составлял

0,24 (0,16; 0,27) ммоль/л. Уровень протеинурии у пациентов группы ХОТ составил 2,3 (0,5; 3,7) г/сутки, что было значимо выше, чем у пациентов с ОГО и в группе контроля ( $p < 0,001$ ). У пациентов с ХОТ срок после АТП также был больше, чем в остальных группах, и составил 85,8 (38,9; 123,9) месяца. Между группами ОГО и контроля значимых различий в сроке возникновения дисфункции не выявлялось ( $p = 0,6$ ).

Частота выявления АТ к HLA I и II классов в выделенных группах представлена в табл. 2. АТ к HLA обнаружили у 84,7% пациентов с ХОТ, у 84,6% пациентов с ОГО и статистически значимо реже – у 33,8% ( $p < 0,001$ ) в контрольной группе, причем резко доминировали АТ к HLA II класса. Последние обнаруживались с частотой 75,3% (64 человека) в группе ХОТ и 71,8% (28 человек) в группе ОГО, а в контрольной группе – лишь у 26,5% (18 человек). Таким образом, АТ к HLA II класса у пациентов контрольной группы выявлялись статистически значимо реже ( $p < 0,02$ ).

Среди 23 человек контрольной группы, у которых обнаружили АТ к HLA, у 12 использовали метод ИФА, у 11 – метод LUMINEX. При анализе этих 23 случаев оказалось, что 8 пациентов были с картиной острого клеточного отторжения (морфологически пограничные изменения, клеточное отторжение 1а и 1б), 5 имели признаки нефротоксичности ингибиторов кальциневрина, у 4 пациентов выявлялась ХТН, еще у 2 – ТМА, 2 пациента были с острым канальцевым некрозом и у 2 других диагностирован гломерулонефрит трансплантата (IgA-нефропатия и фокальный некротизирующий

Таблица 1

**Клинико-демографическая характеристика групп**  
**Clinical and demographic characteristics of the groups**

	ХОТ (n = 85)	ОГО (n = 39)	Контроль (n = 68)	Всего (n = 192)
Возраст реципиентов (лет)	43,9 $\pm$ 12,5	43,4 $\pm$ 11,0	41,6 $\pm$ 13,0	43,0 $\pm$ 12,4
Срок после АТП (мес.)	85,8 (38,9; 123,9)*	43,2 (9,0; 62,2)	48,3 (6,6; 72,0)	63,8 (12,1; 94,1)
Креатинин (ммоль/л)	0,22 (0,16; 0,25)	0,28 (0,17; 0,34)	0,25 (0,15; 0,29)	0,24 (0,16; 0,27)
Протеинурия (г/сут)	2,3 (0,5; 3,7)*	1,1 (0,2; 1,0)	1,1 (0,2; 1,0)	1,7 (0,3; 2,4)

Примечание. \* – Статистически значимо больше, чем во 2-й и 3-й группах ( $p < 0,001$ ).

Таблица 2

**Частота выявления АТ к HLA в исследованных группах**  
**The frequency of anti-HLA detection in the study groups**

	ХОТ (n = 85)		ОГО (n = 39)		Контроль (n = 68)		Всего (n = 192)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
АТ к HLA отсутствуют	13	15,3*	6	15,4*	45	66,2	64	33,3
АТ к HLA, I класс	8	9,4	5	12,8	5	7,3	18	9,4
АТ к HLA, II класс	44	51,8*	20	51,3*	11	16,2	75	39,1
АТ к HLA, I + II класс	20	23,5	8	20,5	7	10,3	35	18,2

Примечание. \* –  $p < 0,001$  в сравнении с контрольной группой.



и склерозирующий гломерулонефрит). При анализе возможных причин присутствия АТ к HLA у описанных 23 пациентов выяснили, что 8 из них были после повторной трансплантации, причем у 4 реципиентов предыдущие трансплантаты прекратили свою функцию вследствие отторжения, еще двое имели в анамнезе эпизоды гуморального отторжения. В то же время у 13 других реципиентов явного объяснения выявления АТ к HLA мы не нашли. Все пациенты находились под динамическим наблюдением: в дальнейшем у одного при контроле через 6 месяцев АТ к HLA не обнаружилось, а у троих развилось гуморальное отторжение трансплантата (через 3, 9 и 14 месяцев), морфологически верифицированное и потребовавшее активного лечения. Таким образом, обнаруженные АТ к HLA у пациентов контрольной группы можно объяснить выработкой АТ к HLA еще до трансплантации (вследствие наличия предшествующей трансплантации в анамнезе, гемотрансфузий, для женщин – беременностей). Появление же АТ к HLA после трансплантации даже при отсутствии соответствующей морфологической картины может быть первым этапом в развитии гуморального отторжения трансплантата, что требует определения донор-специфичности антител и тщательного динамического наблюдения таких пациентов.

При сравнительном анализе уровней АТ к HLA, обнаруженных у 25 пациентов одновременно двумя методами (и ИФА, и LUMINEX), была выявлена

значимая корреляция для АТ как I, так и II классов. Коэффициент корреляции Спирмена для АТ к HLA I класса составил 0,879 ( $r^2 = 0,773$ ), для АТ к HLA II класса – 0,616 ( $r^2 = 0,379$ ),  $p < 0,01$  (рис. 1).

Тем не менее в зависимости от метода (ИФА или LUMINEX), используемого для определения АТ к HLA, частота их выявления в группах несколько различалась (рис. 2). При применении метода LUMINEX АТ к HLA выявлялись чаще во всех группах. Особенно это было значимо для группы ОГО, где при использовании метода LUMINEX диагноз был подтвержден у всех пациентов, тогда как при применении метода ИФА АТ к HLA выявлялись в 71% случаев. С другой стороны, при использовании LUMINEX АТ к HLA выявлялись более чем у половины пациентов в контрольной группе, а при применении ИФА – у 25%, что согласуется с существующими представлениями о более высокой чувствительности, но недостаточной специфичности метода LUMINEX.

Другой компонент активации гуморального звена иммунитета – экспрессия C4d при иммунофлюоресцентном исследовании – выявлялся чаще всего в группах ХОТ и ОГО (рис. 3). При этом в группе ХОТ C4d обнаруживался в 65,9% (56 человек), при ОГО – в 84,6% случаев (33 человека), что было статистически значимо чаще ( $p < 0,001$ ), чем в контрольной группе – 2,9% (2 человека). Один из пациентов контрольной группы с положительным C4d морфологически имел картину острого каналь-

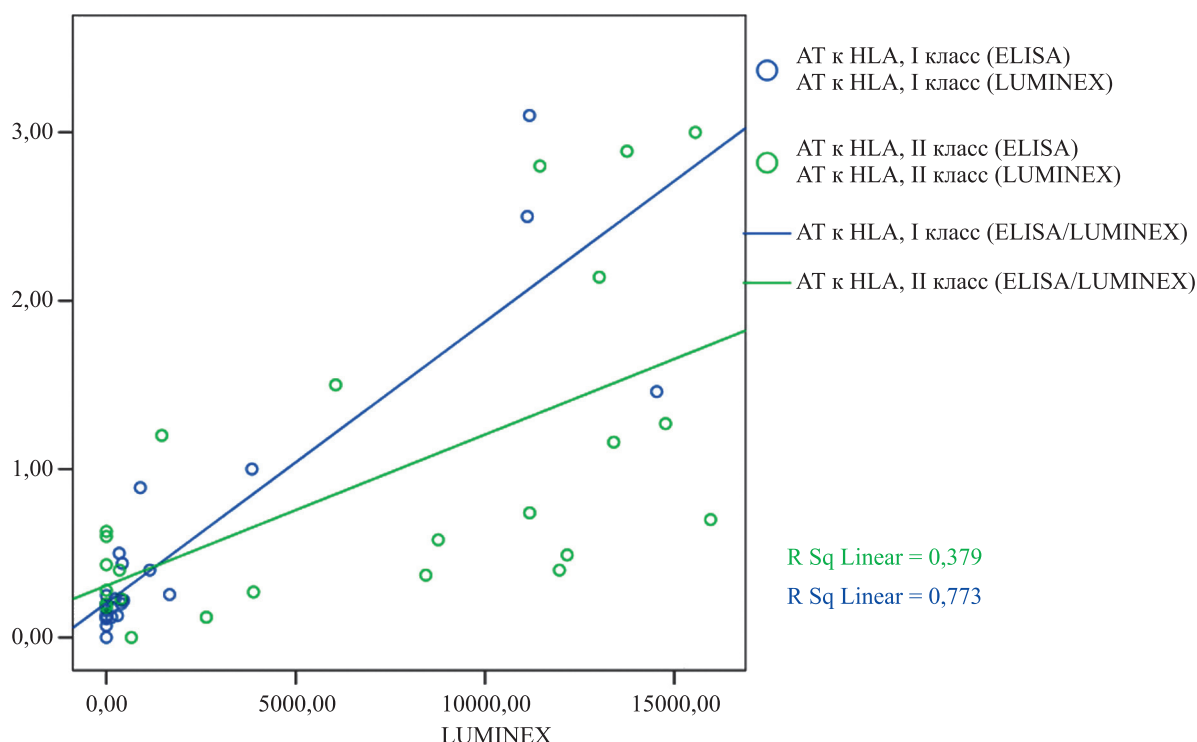


Рис. 1. Корреляция между обнаружением АТ к HLA I и II классов методами ИФА и LUMINEX

Fig. 1. Correlation of anti-HLA antibodies class I and II expression detected by ELISA and LUMINEX

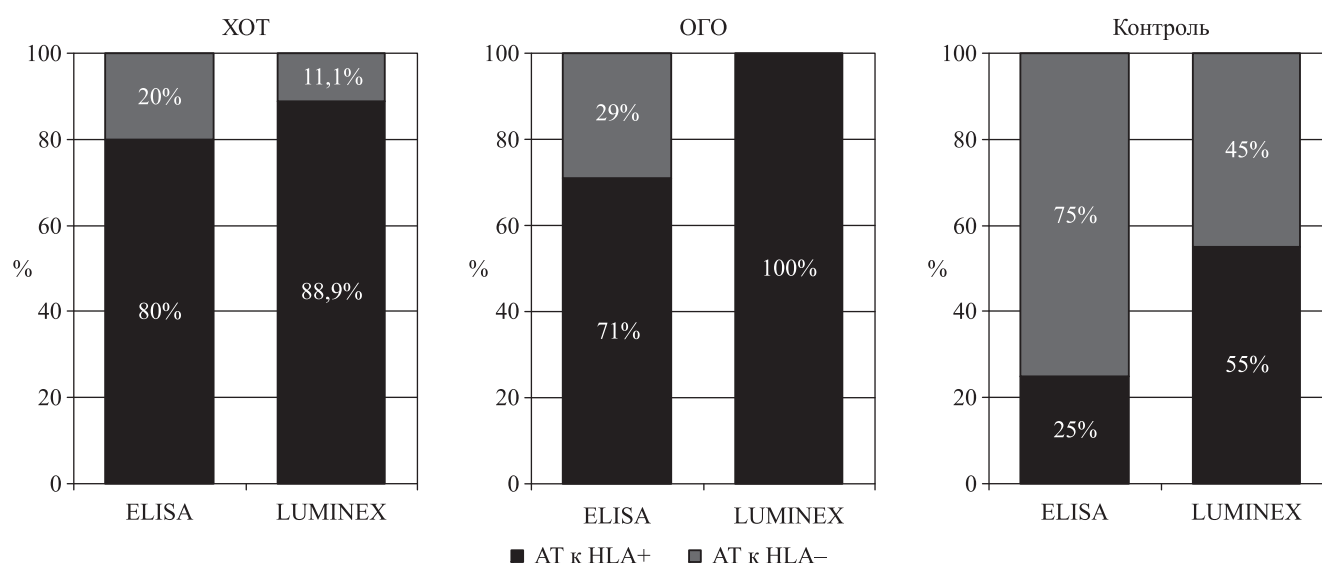


Рис. 2. Частота выявления АТ к HLA в группах в зависимости от метода (ИФА, LUMINEX)

Fig. 2. The incidence of anti-HLA antibodies in groups depending on the method (ELISA, LUMINEX)

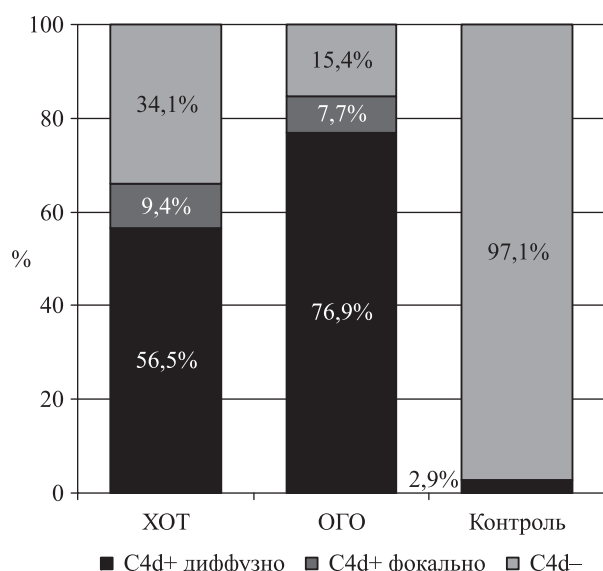


Рис. 3. C4d в группах

Fig. 3. The incidence of C4d in groups

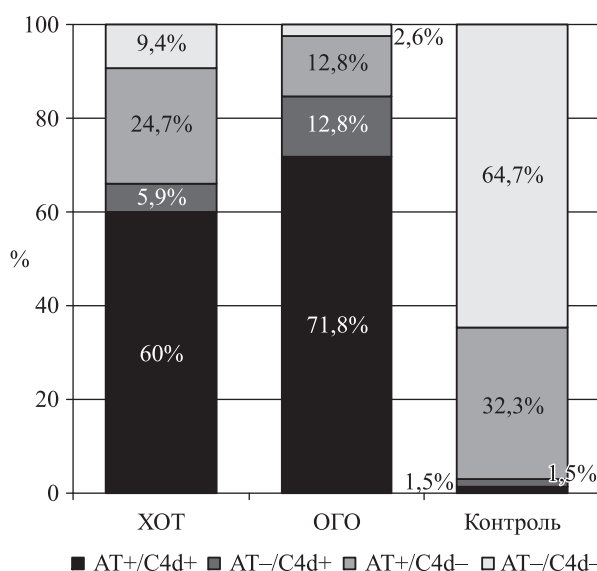


Рис. 4. Распределение пациентов по сочетанию признаков гуморального отторжения в группах

Fig. 4. Distribution of patients by a combination of antibody-mediated rejection features in the groups

цевого некроза с клинической картиной диализ-потребной почечной недостаточности; в динамике функция трансплантата почки восстановилась до исходной и остается стабильной (период наблюдения 12 месяцев). У второго пациента выявлялась картина нефротоксичности ингибиторов кальциневрина на фоне неадекватной фармакокинетики препаратов циклоспорина, что потребовало конверсии на такролимус. При динамическом наблюдении в течение года после биопсии функция трансплантата остается на тех же уровнях креатинина и протеинурии (креатинин 0,14 ммоль/л, протеинурия 0,2 г/л).

Распределение пациентов в зависимости от присутствия обоих признаков гуморального отторжения в группах представлено на рис. 4. Оба маркера (АТ к HLA и экспрессия C4d) определялись у 60% реципиентов (51 человек) в группе ХОТ и у 71,8% (28 человек) в группе ОГО. При ХОТ без признаков гуморального отторжения было 9,4% пациентов (8 человек), при ОГО – 2,6% (1 человек), в контрольной группе эти признаки отсутствовали в 64,7% случаев (44 человека). Особый интерес представляли пациенты с ХОТ и ОГО, у которых выявлялся только один признак активации гуморального звена иммунитета. АТ к HLA при отсутствии экс-

Таблица 3

**Распределение пациентов по сочетанию признаков гуморального отторжения в группах в зависимости от метода (ELISA, LUMINEX)**

**The distribution of patients by a combination of antibody-mediated rejection features in groups depending on the method (ELISA, LUMINEX)**

	ХОТ (n = 85)		ОГО (n = 39)		Контроль (n = 68)	
	ELISA (n = 40)	LUMINEX (n = 45)	ELISA (n = 21)	LUMINEX (n = 18)	ELISA (n = 48)	LUMINEX (n = 20)
C4d-/AT-	5 (12,5%)	3 (6,7%)	1 (4,8%)	0 (0%)	36 (75%)	8 (40%)
C4d-/AT+	8 (20%)	13 (28,9%)	1 (4,8%)*	4 (22,2%)*	12 (25%)*	10 (50%)*
C4d+/AT-	3 (7,5%)	2 (4,4%)	5 (23,8%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)
C4d+/AT+	24 (60%)	27 (60%)	14 (66,6%)	14 (77,8%)	0 (0%)	1 (5%)

Примечание. \* –  $p < 0,001$ .

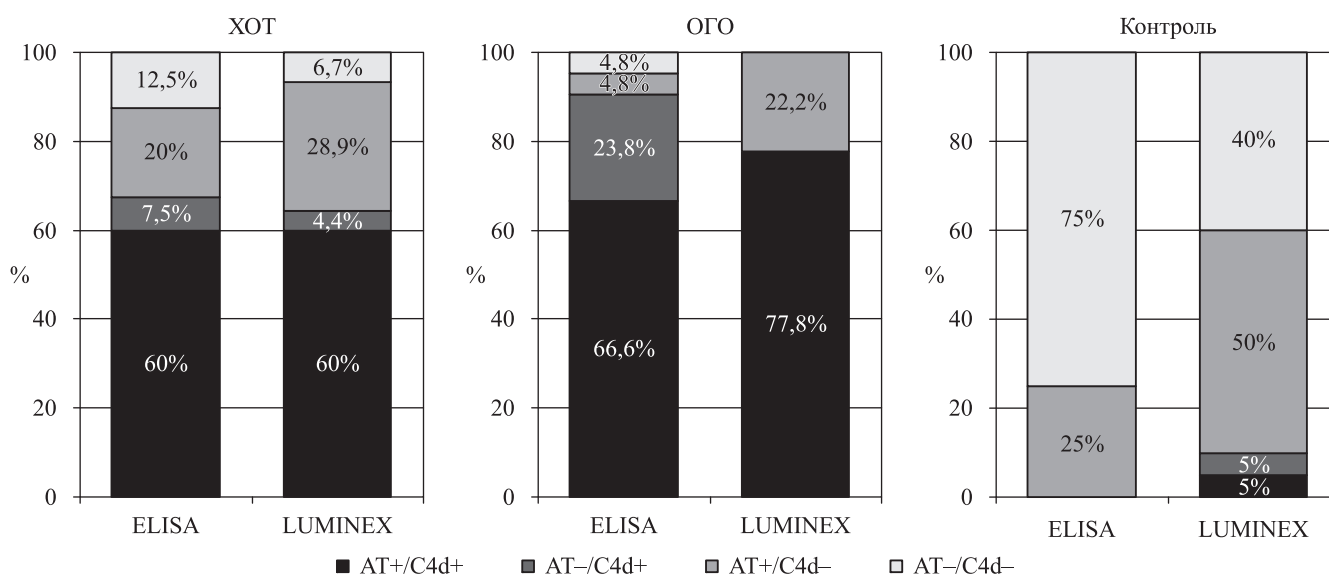


Рис. 5. Распределение пациентов по сочетанию признаков гуморального отторжения в группах в зависимости от метода (ELISA, LUMINEX)

Fig. 5. The distribution of patients by a combination of antibody-mediated rejection features in groups depending on the method (ELISA, LUMINEX)

прессии C4d в группе ХОТ определялись у 24,7% пациентов. При ОГО таких пациентов было 12,8%. 5% реципиентов группы ХОТ и 12,8% группы ОГО экспрессировали C4d при отсутствии AT к HLA.

Если рассмотреть набор критериев гуморального отторжения в зависимости от применяемого метода определения AT к HLA, то прослеживаются некоторые различия (табл. 3 и рис. 5). Так, в группе ОГО при определении AT к HLA методом LUMINEX пациенты были либо с полным набором критериев (AT+/C4d+) – 77,8%, либо с AT и без C4d (AT+/C4d-) – 22,2%. А при использовании метода ELISA группу ОГО составляли пациенты и с другим набором критериев: с AT-/C4d+ (23,8%) и с AT-/C4d- (4,8%). В контрольной группе при применении метода LUMINEX в сравнении с методом ELISA выявился 1 пациент (5%) и с C4d, и с AT к HLA при отсутствии морфологической картины от-

торжения. Приведенные данные еще раз подтверждают большую чувствительность метода LUMINEX в сравнении с ELISA.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В последние 5 лет накопились доказательства, которые свидетельствуют о важной роли аллоантител к антигенам HLA в патогенезе прогрессирующей дисфункции трансплантата. Несколько исследований показали, что циркулирующие *de novo* анти-HLA AT I или II класса, и ДСА [20, 21], и не ДСА [22, 23], обнаруживаются у значительной доли реципиентов почечного трансплантата, приводя в ряде случаев к развитию дисфункции и последующей потере трансплантата. Так, по данным Terasaki и Ozawa, среди 2278 реципиентов, которые наблюдались проспективно, через 1 год дисфункция трансплантата встречалась чаще у пациентов с ал-

лоантителами по сравнению с пациентами без аллоантител (8,6% против 3,0%,  $p < 0,0001$ ), при этом риск потери трансплантата наиболее высок у пациентов с уже имеющейся дисфункцией на момент определения антител (креатинин от 2,0 до 3,9 мг/дл) [22]. По данным других авторов, потери трансплантата в течение первого года с момента выявления ДСА составили 9%, а к концу 3-го года этот показатель достигал 24% независимо от функции трансплантата на момент их выявления [23].

ДСА ответственны за развитие как острого, так и хронического антитело-опосредованного отторжения трансплантата, по сути являющимися стадиями одного и того же процесса. Ранними его проявлениями считаются признаки микроциркуляторного воспаления с задержкой воспалительных клеток в просвете капиллярных петель и ПТК, ведущего к повреждению клеток эндотелия и последующему ремоделированию капиллярной стенки с формированием двойных контуров капилляров клубочка и расслоением базальной мембраны ПТК, характерных уже для хронического гуморального отторжения [24]. Имеется множество данных, подтверждающих стадийность морфологических изменений при антитело-опосредованном отторжении и их связь с ДСА [4, 15, 25]. Так, у пациентов, имеющих ДСА перед трансплантацией (положительный кросс-матч), чаще наблюдалась трансплантационная гломерулопатия через 1 год при протокольных биопсиях (22% против 8%), а у реципиентов с острым гуморальным отторжением она развивается уже в 44% случаев (коэффициент вероятности 17,5) [26].

Процесс редко выявляется на ранней стадии, поскольку клиническая симптоматика может быть крайне скудной или вообще отсутствовать. Выраженность клинических симптомов при остром антитело-опосредованном отторжении может зависеть от ряда факторов ДСА, таких как титр, avidность, эффекторные функции, а также от резистентности эндотелия трансплантата [16]. Однако важнейшим фактором, определяющим клиническую картину и течение отторжения, является комплаентность пациента и адекватность иммуносупрессивной терапии в целом. Так, по данным Döge с соавторами, клинически манифестные формы острого гуморального отторжения были ассоциированы именно с этими факторами [27]. В нашем исследовании преобладали случаи вялотекущего/субклинического течения ОГО, и значительно чаще процесс выявлялся на стадии ХОТ (39 vs 85 пациентов).

Морфологическими признаками ХОТ, обусловленных аллоиммунным механизмом, являются трансплантационная гломерулопатия и реже артериопатия [24]. Действительно, по нашим данным, среди 85 пациентов с ХОТ 80 имели морфологи-

чески картину ХТГ и лишь 5 – трансплантационную васкулопатию без вовлечения капилляров клубочков.

При этом, будучи проявлением уже поздней стадии антитело-опосредованного отторжения, трансплантационная гломерулопатия характеризуется резистентностью к терапии и плохим прогнозом. Так, даже при субклиническом варианте ТГ, выявленном при протокольной биопсии через 1 год, выживаемость трансплантата не превышала 50% через 3 года после постановки диагноза [26, 28], что делает диагностику процесса на ранней стадии крайне актуальной.

Сочетание присутствия аллоантител, расслоение базальной мембраны, экспрессия C4d и удвоение ГБМ было названо «ABCD-тетрадой» в работе Halloran с соавторами [29]. Пациенты с полным набором критериев антитело-опосредованного отторжения трансплантата (морфологическая картина + экспрессия C4d на ПТК + выявление АТ к HLA) вопросов по диагнозу и прогнозу не вызывают. Действительно, большинство пациентов в нашем исследовании при обоих вариантах отторжения имели полный набор диагностических критериев (60% при ХОТ и 71,8% при ОГО). При этом частота их выявления не зависела от применяемого метода (60 и 60% при ХОТ, 66 и 77,8% при ОГО методами ELISA и LUMINEX соответственно,  $p = NS$ ), а уровень АТ к HLA в этих случаях был максимальным [30]. Напротив, пациенты с неполным набором критериев представляют особый интерес. Самостоятельное прогностическое значение каждого из факторов и возможности различных методов их определения активно обсуждаются в литературе последних лет.

Под неполным набором критериев подразумеваются следующие варианты.

1. C4d-негативное отторжение при наличии циркулирующих АТ к HLA (АТ+/C4d–), что может объясняться действием других, не связанных с активацией комплемента, механизмов повреждения, а также волнообразным характером течения процесса [16, 28]. По нашим данным, этот вариант отторжения наблюдался у 12,8% пациентов с ОГО и у 24,7% с ХОТ.
2. Отсутствие АТ к HLA при имеющейся экспрессии C4d на ПТК (АТ–/C4d+), что может объясняться абсорбцией имеющихся антител на трансплантате [31], а также действием не-HLA-антител, таких как антитела к рецептору 1-го типа ангиотензина II (АТ1R), в развитии острого повреждения трансплантата [32]. Помимо этого, отсутствие циркулирующих антител возможно вследствие недостаточной чувствительности методов, используемых для определения АТ к HLA.



3. Признаки микроциркуляторного воспаления при отсутствии циркулирующих антител и экспрессии C4d на ПТК (АТ-/C4d-). При антитело-опосредованном повреждении, как правило, наблюдается волнообразное течение процесса с вариабельностью продукции антител, поэтому биопсия может потенциально пропустить периоды пиковой продукции антител и положительный результат C4d. В этих случаях необходима дифференциальная диагностика с другой, не связанной с отторжением, патологией, вызывающей микроциркуляторное повреждение (гломерулонефрит трансплантата, тромботическая микроангиопатия и др.).

Именно в случаях неполного набора критериев особое значение приобретают различия в специфичности и чувствительности существующих методов определения АТ к HLA. Метод LUMINEX в сравнении с ELISA является более чувствительным, позволяя выявить низкие уровни АТ к HLA. Огромный спектр частых и более редких HLA аллелей для всех 11 HLA локусов (A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPBA1 и DPB1), сорбированных на микросферах в анализе на платформе LUMINEX, позволяет более точно определить АТ к HLA, присутствующие в сыворотке [11, 13, 14, 33, 34]. Наше исследование полностью согласуется с этими представлениями. Так, при применении метода ELISA АТ к HLA при ХОТ выявлялись у 80% пациентов, а при методе LUMINEX – у 88,9%, при ОГО различия были еще более значимыми (71,2 и 100%). При этом наиболее существенными эти различия оказались у пациентов с C4d-негативным отторжением, составив соответственно 4,8 и 22,2% при ОГО и 20 и 28,9% при ХОТ (табл. 3). Согласно данным, полученным в различных исследованиях, C4d-негативное отторжение не является редкой патологией, занимая до 36% в структуре антитело-опосредованного отторжения и, по разным данным, до 50% и более зарегистрированных случаев с ТГ [35–37]. Можно думать, что низкая его выявляемость, полученная в нашем исследовании при использовании метода ELISA, объясняется недостаточной чувствительностью данного метода.

С другой стороны, высокая чувствительность метода LUMINEX может быть причиной гипердиагностики антитело-опосредованного отторжения [11, 38]. Так, по нашим данным, при использовании этого метода АТ к HLA выявлялись у 55% контрольной группы, тогда как при определении методом ELISA они выявлялись в 24% случаев (в подавляющем большинстве у пациентов после повторной АТП).

Отсутствие АТ к HLA у пациентов с признаками антитело-опосредованного отторжения и экспрессией C4d на ПТК может объясняться волнообразным течением процесса, либо абсорбцией их на

трансплантате. В исследовании Sis и соавт. среди 28 пациентов с ТГ лишь у 64% были циркулирующие антитела к донорским HLA антигенам: I класса (28%), II класса (39%) или I и II классов (33%) [29]. Однако в ряде случаев результат может быть ложноотрицательным вследствие ограниченности представленных антигенов на панели того или другого метода. В этих ситуациях рекомендуется повторить исследование с использованием другого метода определения АТ к HLA и лишь при повторном отрицательном результате констатировать отсутствие антител [11].

Не меньшее значение имеет метод определения АТ к HLA у пациентов с картиной микроциркуляторного воспаления либо ТГ в отсутствие C4d. В протокольных биопсиях, выполненных через 10 лет после трансплантации, 6 из 11 C4d-негативных пациентов имели ТГ без C4d или АТ к HLA [39]. Поскольку в значимом числе случаев ТГ не выявляются циркулирующие АТ к HLA или экспрессия C4d на ПТК на момент постановки диагноза, взаимоотношения между этими факторами непростые, а некоторые даже ставят под сомнение, существует ли между ними какая-то связь [40, 41]. Тем не менее в ряде исследований была показана высокая частота C4d-негативных форм при доказанной ТГ (до 62% всех случаев) [35–37]. При этом она может характеризоваться экспрессией C4d в клубочках в отсутствие перитубулярного отложения C4d [6]. С другой стороны, светооптическая картина при ТГ неотличима от таковой при повреждении гломерулярного эндотелия другой природы (гломерулонефрит трансплантата, тромботическая микроангиопатия). В нашем исследовании 9,4% пациентов с ХОТ не имели АТ к HLA и экспрессии C4d в ПТК. Во всех этих случаях лишь тщательное динамическое наблюдение пациентов, а у некоторых и проведение повторных биопсий трансплантата позволили верифицировать диагноз [37, 42, 43].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее время важная роль в диагностике и мониторинге антитело-опосредованного отторжения принадлежит контролю АТ к HLA, что подтверждают представленные результаты и данные литературы.

При наличии свечения C4d-компонента комплемента в сочетании с характерной морфологической картиной метод выявления АТ к HLA не имеет принципиального значения, а донорспецифичность их определяется способностью активировать систему комплемента в сосудах микроциркуляторного русла трансплантата (свечение C4d на ПТК). Определение АТ к HLA методом ELISA может использоваться в качестве скринингового метода, данные которого хорошо коррелируют с особенностями морфоло-

гической и иммуногистохимической картины, что позволяет в большинстве случаев с высокой достоверностью диагностировать гуморальное отторжение. Метод LUMINEX в сравнении с ELISA является более чувствительным, позволяя выявить низкие уровни АТ к HLA, что особенно важно в диагностике C4d-негативного отторжения. С другой стороны, высокая чувствительность метода LUMINEX может быть причиной гипердиагностики антителоопосредованного отторжения, что в отсутствие других его критериев требует обязательного подтверждения донорспецифичности выявляемых антител.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Gourishankar S, Leduc R, Connett J et al. Pathological and clinical characterization of the «troubled transplant»: data from the DeKAF study. *Am. J. Transplant.* 2010 Feb; 10 (2): 324–330.
2. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation.* 2010 Jul 15; 90 (1): 68–74.
3. Столяревич ЕС, Артюхина ЛЮ, Ким ИГ, Куренкова ЛГ, Томили娜 НА. Морфологические особенности позднего отторжения трансплантированной почки и их влияние на течение и прогноз нефропатии. *Нефрология и диализ.* 2012; 4: 242–252. Stolyarevich ES, Artyukhina LYu, Kim IG, Kurenkova LG, Tomilina NA. Morfologicheskie osobennosti pozdnego ottorzheniya transplantirovannoy pochki i ikh vliyaniye na techeniye i prognoz nefropatii. *Nefrologiya i dializ.* 2012; 4: 242–252.
4. Mauviyyedi S, Pelle PD, Saidman S et al. Chronic humoral rejection: Identification of antibody-mediated chronic allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001; 12: 574–582.
5. Regele H, Bohmig GA, Habicht A et al. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: A contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002; 13: 2371–2380.
6. Sijpkens YW, Joosten SA, Wong MC et al. Immunologic risk factors and glomerular C4d deposits in chronic transplant glomerulopathy. *Kidney Int.* 2004; 65: 2409–2418.
7. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int.* 1993; 43: 1333.
8. Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999; 10: 2208.
9. Kerman RH, Susskind B, Buelow R et al. Correlation of ELISA-detected IgG and IgA anti-HLA antibodies in pre-transplant sera with renal allograft rejection. *Transplantation.* 1996; 62: 201.
10. Lee PC, Ozawa M. Reappraisal of HLA antibody analysis and crossmatching in kidney transplantation. *Clinical Transplants.* Los Angeles: The Terasaki Foundation Laboratory; 2007: 219.
11. Tait BD, Süsal C, Gebel HM et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation.* 2013; 95 (1): 19–47.
12. Zachary AA, Ratner LE, Graziani JA et al. Characterization of HLA class I specific antibodies by ELISA using solubilized antigen targets: II. Clinical relevance. *Hum. Immunol.* 2001; 62: 236.
13. Pei R, Lee J, Chen T et al. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Hum. Immunol.* 1999; 60: 1293.
14. Pei R, Lee JH, Shin NJ et al. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation.* 2003; 75: 43.
15. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 18: 1046–1056.
16. Hanf W, Bonder CS, Coates PTH. Transplant Glomerulopathy: The Interaction of HLA Antibodies and Endothelium. *Journal of Immunology Research.* 2014: 1–12.
17. Hidalgo LG 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; 10: 1812–1822.
18. Hirohashi T et al. A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *Am. J. Transplant.* 2012; 12: 313–321.
19. Platt JL. Antibodies in transplantation. *Discov. Med.* 2010; 10: 125–133.
20. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation.* 2003; 75: 1034–1040.
21. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, Mizutani K, Moreau A, Meurette A et al. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005; 16: 2804–2812.
22. Terasaki PI, Ozawa M. Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: Results of a 2-year prospective trial. *Transplantation.* 2005; 80: 1194–1197.
23. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE et al. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation.* 2013; 95 (3): 410.
24. Colvin RB, Nickleleit V. Heptinstall's Pathology of the Kidney. Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG, editors. Vol. 2. Lippincott-Raven. Philadelphia. 2006: 1347–1490.
25. Gloor J, Cosio F, Lager DJ, Stegall MD. The Spectrum of Antibody-Mediated Renal Allograft Injury: Implications for Treatment. *American Journal of Transplantation.* 2008; 8: 1367–1373.
26. Gloor JM, Cosio FG, Rea DJ, Wadei HM, Winters JL, Moore SB et al. Histologic findings one year after posi-

- tive crossmatch or ABO blood group incompatible living donor kidney transplantation. *Am. J. Transplant.* 2006; 6: 1841–1847.
27. Dörje C, Midtvedt K, Holdaas H et al. Early Versus Late Acute Antibody-Mediated Rejection in Renal transplant recipients. 15 July 2013; 96 (1): 79–84. doi: 10.1097/TP.0b013e31829434d4.
28. Gloor JM, Sethi S, Stegall MD et al. Transplant Glomerulopathy: Subclinical Incidence and Association with Alloantibody *American Journal of Transplantation.* 2007; 7: 2124–2132.
29. Sis B, Mueller T, Campbell P, Hunter C, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Transplant glomerulopathy, late antibody mediated rejection, and the ABCD tetrad. *Am. J. Transplant [Suppl].* 2006: 469–470.
30. Иванова ЕС, Столяревич ЕС, Баранова ФС и др. Диагностическое значение антител к HLA при хроническом и позднем остром отторжении трансплантата почки. *Нефрология и диализ.* 2015; 17 (4): 437–444. Ivanova ES, Stolyarevich ES, Baranova FS i dr. Diagnosticheskoe znachenie antitel k HLA pri khronicheskom i pozdnem ostrom ottorzhenii transplantata pochki. *Nefrologiya i dializ.* 2015; 17 (4): 437–444.
31. Martin L, Guignier F, Bocrie O, D'Athis P, Rageot D, Riffe G et al. Detection of anti-HLA antibodies with flow cytometry in needle core biopsies of renal transplants recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation.* 2005; 79: 1459–1461.
32. Dragun D, Muller DN, Brasen JH et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 558–569.
33. Taylor CJ, Kosmoliaptsis V, Summers DM et al. Back to the future: application of contemporary technology to long-standing questions about the clinical relevance of HLA-specific alloantibodies in renal transplantation. *Hum. Immunol.* 2009; 70: 563.
34. Shevchenko OP, Khalilulin TA, Shevchenko AO et al. Predictive value of PAPP-A, sCD40L, anti-HLA Antibodies detected by ELISA and Luminex in heart transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2014; 33 (4S): 135.
35. Rotman S, Collins AB, Colvin RB. C4d deposition in allografts: Current concepts and interpretation. *Transplant. Rev.* 2005; 19: 65–77.
36. Sis B, Jhangri G, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am. J. Transplant.* 2009; 9: 2312–2323.
37. Haas M. Pathology of C4d-negative antibody-mediated rejection in renal allografts. *Curr. Opin. Organ. Transplant.* 2013; 18: 319–326.
38. Picascia A, Infante T, Napoli C. Luminex and antibody detection in kidney transplantation. *Clin. Exp. Nephrol.* 2012; 16 (3): 373–381.
39. Namba Y, Oka K, Moriyama T, Kyo M, Imamura R, Shi Y et al. Incidence of positive C4d deposition in long-term survival cases over 10 yr after renal transplantation. *Clin. Transplant.* 2006; 20 [Suppl 15]: 20–25.
40. Al Aly Z, Yalamanchili P, Cortese C, Salinas-Madrigal L, Bastani B. C4d peritubular capillary staining in chronic allograft nephropathy and transplant glomerulopathy: An uncommon finding. *Transpl. Int.* 2005; 18: 800–805.
41. Nickleit V, Zeiler M, Gudat F, Thiel G, Mihatsch MJ. Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts: Diagnostic and therapeutic implications. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002; 13: 242–251.
42. Torres IB, Salcedo M, Moreso F, Sellarés J, Castellá E, Azancot MA et al. Comparing transplant glomerulopathy in the absence of C4d deposition and donor-specific antibodies to chronic antibody-mediated rejection. *Clin. Transplant.* 2014; 28 (10): 1148–1154.
43. Lesage J, Noël R, Lapointe I, Côté I, Wagner E, Désy O et al. Donor-specific antibodies, C4d and their relationship with the prognosis of transplant glomerulopathy. *Transplantation.* 2015; 99 (1): 69–76.

Статья поступила в редакцию 10.05.2016 г.  
The article was submitted to the journal on 10.05.2016