

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ОСТРОГО ОТТОРЖЕНИЯ ПОЧЕЧНОГО АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА

Траилин А.В.², Никоненко Т.Н.², Остапенко Т.И.¹, Поляков Н.Н.^{1,2}, Никоненко А.С.^{1,2}

¹Запорожский межрегиональный центр трансплантации, Украина

²Запорожская медицинская академия последипломного образования, Украина

Целью исследования была морфологическая характеристика острого отторжения (ОРО) почечных аллотрансплантатов: Т-клеточно- (ОТОО) и антитело-опосредованного (ОАОО). Гистологические срезы биоптатов исследовались после их окрашивания рутинными методами, а также антителами к С4d-компоненту комплемента, CD45R0-антигену Т-лимфоцитов и CD68-антигену макрофагов. Показано, что для ОТОО характерно усиление Т-лимфоцитарной инфильтрации интерстиция по сравнению с дотрансплантационным этапом при сохранении степени макрофагальной инфильтрации, минимальный мононуклеарный гломерулит и капиллярит; тубулит. Морфологическими признаками ОАОО являются: нейтрофильный и Т-лимфоцитарный гломерулит, диффузный капиллярит с дилатацией ПТК, маргинацией моноцитов с примесью нейтрофилов, усиление по сравнению с дотрансплантационным этапом макрофагальной инфильтрации интерстиция при полуколичественной оценке; более высокая по сравнению с ОТОО степень Т-лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрации интерстиция с преобладанием лимфоцитов при количественной оценке.

Ключевые слова: трансплантация почки, острое отторжение, С4d-компонент комплемента

MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL MANIFESTATIONS OF DIFFERENT VARIANTS OF ACUTE KIDNEY ALLOGRAFT REJECTION

Trailin A.V.², Nikonenko T.N.², Ostapenko T.I.¹, Polyakov N.N.^{1,2}, Nikonenko A.S.^{1,2}

¹Zaporozhsky interregional transplant center, Ukraine

²Zaporozhskaya medical academy of postgraduate education, Ukraine

The aim of this study was morphological characteristics of peculiar properties of acute T-cells- (ATMR) and antibody-mediated kidney allograft rejection (AAMR). Histological slices of kidney allograft biopsies were examined after coloration by routine methods and immunohistochemical proceeding for C4d, CD45R0 T-lymphocytes antigen and CD68 macrophages antigen. We've determined that the key features of ATMR are: increasing of T-lymphocytes interstitial infiltration with the same level of macrophages infiltration comparing with implantation biopsies, mild mononuclear glomerulitis and capillaritis; tubulitis. Morphological traits of AAMR are neutrophilic and T-lymphocytes glomerulitis, diffuse capillaritis, capillaries dilatation and margination of mononuclear cells with admixture of neutrophils, macrophagal interstitial infiltration under semiquantitative evaluation, as well as, more pronounced, than in ATMR, T-lymphocytes and macrophages interstitial infiltration under quantitative evaluation.

Key words: kidney transplantation, acute rejection, C4d

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация почки является эффективным методом лечения пациентов в терминальной стадии хронической почечной недостаточности. Одним из

серьезных осложнений у реципиентов являются острые реакции отторжения (ОРО) почечного аллотрансплантата (ПАТ), которые достоверно снижают продолжительность его функционирования [7].

Статья поступила в редакцию 26.02.09 г.

Контакты: Траилин Андрей Вячеславович, доцент, к. м. н. Запорожская медицинская академия последипломного образования, Украина. Тел. +380-612-79-17-19, e-mail: andrei_traitlin@ukr.net

Патогенетической основой отторжения является повреждение ПАТ, обусловленное клеточным и/или гуморальным аллоиммунным механизмами [3]. Среди вариантов ОРО различают пограничные изменения, острое Т-клеточно-опосредованное отторжение (ОТОО), острое антитело-опосредованное отторжение (ОАОО); возможно сочетание ОТОО и ОАОО [15]. Считается, что по сравнению с ОТОО ОАОО имеет худший прогноз, поскольку с большей вероятностью ведет к развитию хронического отторжения и прекращению функционирования ПАТ [2, 3, 7, 8, 10]. Золотым стандартом в диагностике ОРО является гистологическое исследование биоптатов в соответствии с рекомендациями Banff-классификации [13–15], однако во многих случаях этого недостаточно для определения варианта отторжения. Диагностика ОАОО значительно облегчилась с момента внедрения в практику иммуногистохимического окрашивания биоптатов антителами к С4d-компоненту комплемента [5]. При ОРО ПАТ инфильтрируется Т-лимфоцитами и макрофагами, и выявление этих клеток также может повысить качество диагностики, однако степень их участия в патогенезе разных типов ОРО окончательно не установлена [4, 6, 8, 19, 20].

Целью настоящего исследования было изучение морфологических проявлений различных гистологических вариантов ОРО и их иммуногистохимическая характеристика с использованием антител к антигенам Т-лимфоцитов и моноцитов/макрофагов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили истории болезни, пункционные биопсии (11) и фрагменты удаленных трансплантатов (9) из архивного материала, полученные от 20 пациентов с дисфункцией ПАТ вследствие отторжения. Средняя длительность функционирования ПАТ до выполнения биопсии или трансплантэктомии (ТЭ) составила 172 дня (10–1058). Для контроля использовали биоптаты из донорских почек, полученные на дооперационном этапе.

Из клинических данных учитывали уровень креатинина и мочевины крови, протеинурии на момент биопсии или ТЭ, потребность в проведении плазмафереза, применении антилимфоцитарных антител, наличие спонтанного разрыва ПАТ, уровень креатинина при выписке.

Материал фиксировали в 10% забуференном формалине (рН 7,2–7,4), заливали в парафин и срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, ШИК, трихромом по Массону. Изучали морфологические изменения, характерные для ОАОО и ОТОО [2, 3, 10, 13, 14]. Оценивали наличие или отсутствие (1/0) инфаркта, фибриноидного некроза артерий, тромботической микроангиопатии (ТМА).

Определяли степень острого канальцевого некроза (ОКН): 0–5% паренхимы – отсутствие поражения (0), 6–25% – 1-я степень, 25–50% – 2-я степень, >50% – 3-я степень. Подсчитывали процент клубочков, в капиллярах которых находились: 1) лимфоциты; 2) моноциты; 3) нейтрофилы.

Кроме того, для диагностики ОАОО срезы окрашивали антителами к С4d-компоненту комплемента (первичные кроличьи поликлональные антитела к С4d (Biomedica, Австрия); конъюгированные с пероксидазой вторичные антитела к иммуноглобулинам кролика, диаминобензидин (DakoCytomation, Дания). Определяли процент ткани с линейным окрашиванием вдоль контура перитубулярных капилляров (ПТК) как минимум в 5 полях зрения коркового либо мозгового вещества без рубцов и инфарктов (рис. 1, д, е). Негативным считалось окрашивание 0–10% ткани, позитивным – >10%, сильнопозитивным – >50% [2]. Тяжесть морфологических изменений при ОТОО выражали в баллах от 1 – пограничные изменения – до 5 – ОРО Пб-типа. Наличие ОАОО оценивали в 2 балла.

Для идентификации в срезах Т-лимфоцитов и макрофагов использовались первичные мышинные моноклональные антитела к 1) CD45R0 (маркер активированных после стимуляции антигеном Т-лимфоцитов) и 2) CD68 (маркер моноцитов/макрофагов) человека; конъюгированные с пероксидазой вторичные антитела к иммуноглобулинам мыши, диаминобензидин (DakoCytomation, Дания). Срезы докрашивались гематоксилином и заключались в бальзам. С целью негативного контроля вместо первичных антител использовался буферный раствор.

При полуколичественной оценке окрашивания с антителами к CD45R0 и CD68 подсчитывалось максимальное количество CD45R0+ и CD68+ клеток в ПТК, клубочках, в стенке артерий и канальцев, определяли степень клеточной инфильтрации интерстиция в баллах (0–3).

Для количественной оценки Т-клеточной и макрофагальной инфильтрации интерстиция исследовался 1 срез на биоптат; в корковом веществе почек методом систематического случайного отбора выбиралось 10 полей интерстициальной ткани для фотографирования. Изображение, получаемое на микроскопе Axiostar-plus (Zeiss, Germany), оцифровывалось и захватывалось с помощью цифровой фотокамеры (Canon PowerShot A620) при увеличении $\times 400$, затем вводилось в компьютер для последующей обработки. Изображение анализировалось с помощью программ Adobe Photoshop 8.0 (Adobe Systems Inc.) и ImageJ 1.34s (Nat. Inst. of Health, USA). Для оценки степени инфильтрации ПАТ CD45R0+ лимфоцитами и CD68+ моноцитами/макрофагами подсчитывалось их среднее количество в поле зрения.

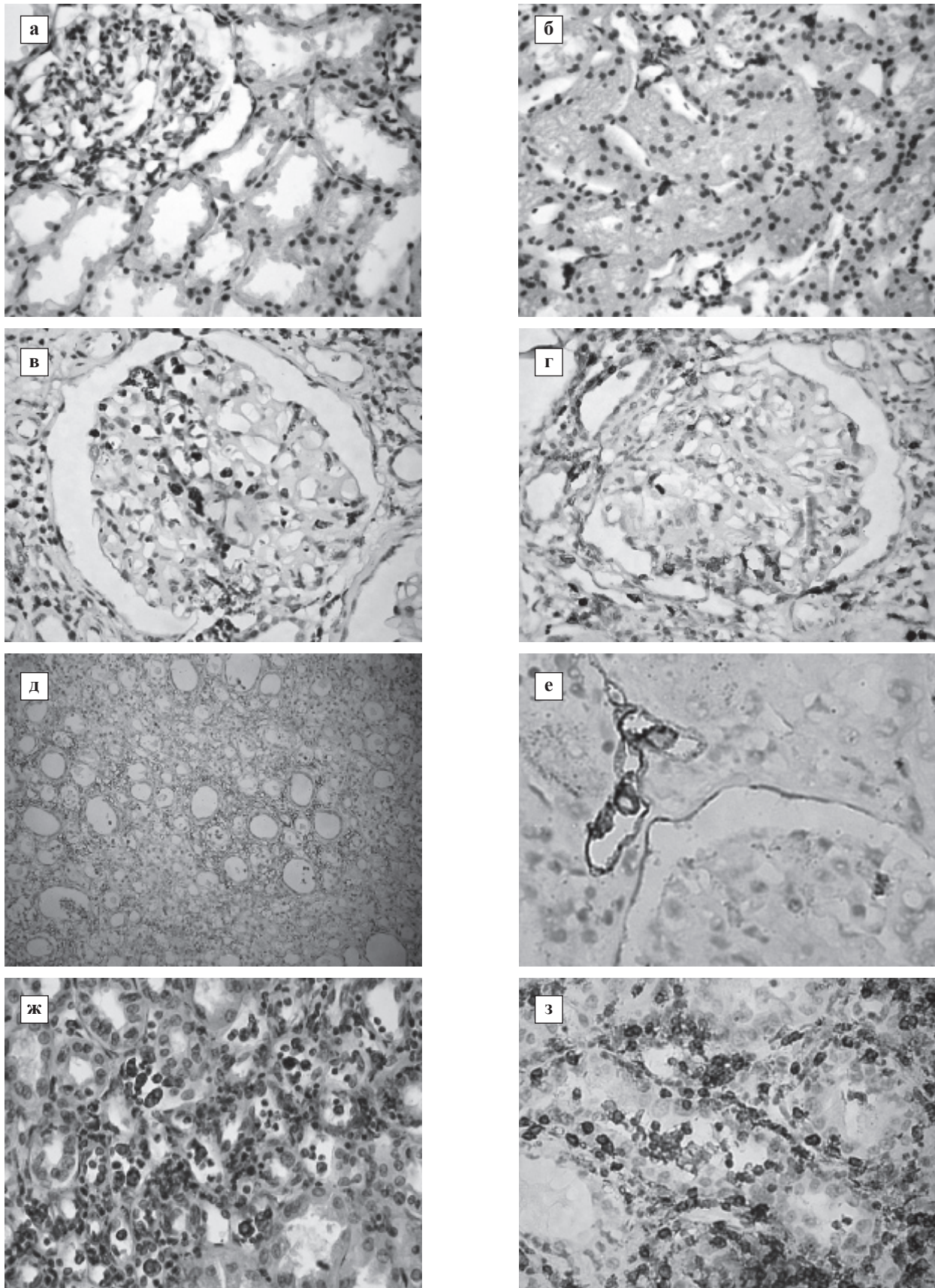


Рис. 1. Морфологические находки в биоптатах ПАТ: а – CD45R0+ лимфоциты в имплантационных биопсиях, $\times 450$; б – CD68+ моноциты в имплантационных биопсиях, $\times 450$; в – CD68+ моноциты в клубочке при OAOO, $\times 800$; г – CD45R0+ лимфоциты в клубочке при OAOO, $\times 800$; д – депозиты C4d-компонента комплемента в перитубулярных капиллярах при OAOO, $\times 200$; е – то же, $\times 1000$; ж – нейтрофилы и CD68+ моноциты в перитубулярных капиллярах при OAOO, $\times 800$; з – CD45R0+ лимфоциты в интерстиции и канальцах при OTOO, $\times 800$. Иммунопероксидазный метод с антителами к C4d, CD45R0, CD68 с докраской гематоксилином

Для описания дискретных, а также непрерывных данных с распределением, отличающимся от нормального, использовали медиану, нижний и верхний квартили; достоверность отличий сначала оценивалась с помощью анализа Краскелла–Уоллиса, а для попарного сравнения групп использовался U-тест Манна–Уитни. Для описания частотных данных использовали проценты, а отличия между группами оценивались с помощью χ^2 -теста. Непрерывные нормально распределенные данные выражали средним значением и стандартным отклонением; для сравнения результатов между двумя группами использовали T-тест. Наличие связи между параметрами оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (R). Все виды анализа выполнялись с использованием программы Статистика 7,0 (StatSoft Inc., USA). Отличия между группами и предсказательная ценность критерия считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам окрашивания с антителами к C4d биопсии были классифицированы на C4d+ (n = 16) и C4d- (n = 4). C4d+ биопсии могут быть разделены на подгруппы: изолированное ОАОО (n = 3); пограничные изменения, свидетельствующие о возможном наличии ОТОО (n = 5); ОАОО в сочетании с ОТОО (n = 8). Анализ не выявил достоверных отличий ни по одному из параметров между ОАОО с достоверными признаками ОТОО и без таковых (данные не показаны).

Клинико-лабораторные показатели достоверно не отличались у пациентов с C4d+ и C4d- ОРО (табл. 1), что подтверждает мнение о невозможности отдифференцировать ОТОО и ОАОО без выполнения биопсийного исследования [3].

Уровень мочевины крови на момент биопсии коррелировал со степенью интерстициального воспаления (R = 0,62, p = 0,008), наличием фибриноидного некроза артерий (R = 0,53, p = 0,029) и тяжестью гистологических изменений (R = 0,52, p = 0,033).

Протеинурия коррелировала со степенью гломерулита (R = 0,50, p = 0,050), а разрыв ПАТ – с тяжестью гистологических изменений (R = 0,52, p = 0,037). Наличие артериита (R = 0,57, p = 0,014) и интерстициальных кровоизлияний (R = 0,52, p = 0,026) коррелировало с необходимостью выполнения ТЭ. Креатинин крови при выписке достоверно коррелировал с наличием в биоптатах интерстициальных кровоизлияний (R = 0,63, p = 0,006) и тяжестью гистологических изменений (R = 0,47, p = 0,06).

Корреляционный анализ выявил морфологические изменения, которые были достоверно ассоциированы с C4d-позитивностью: степень гломерулита, присутствие моноцитов и нейтрофилов в клубочках, степень капиллярита, диффузный капиллярит (табл. 2). При сравнении гистологических признаков C4d-негативной и C4d-позитивной ОРО по ряду из них были выявлены достоверные отличия (табл. 2).

Степень гломерулита была достоверно выше при C4d+ ОРО. Более чем в половине случаев у пациентов с ОАОО в клубочках присутствовали нейтрофилы, которые отсутствовали у пациентов без ОАОО (табл. 2). Степень гломерулита коррелировала с количеством CD45R0+ (R = 0,79, p = 0,0007) и CD68+ мононуклеаров (R = 0,52, p = 0,054) в клубочках (рис. 1, в, г), частота выявления которых не зависела от гистологического типа ОРО (табл. 2). Это свидетельствует об одновременном участии Т-клеточных и гуморальных механизмов в повреждении клубочков. И действительно, эндотелий может служить мишенью как для клеточного, так и для гуморального иммунного ответа [18]. Поэтому гломерулит является признаком острого активного отторжения: как ОТОО [3, 12], так и ОАОО [3, 10, 12, 17], однако встречается достоверно чаще при ОАОО [2, 3, 10, 12, 17]. Для дифференциальной диагностики этих двух типов ОРО имеет значение состав инфильтрата: для ОАОО характерно присутствие в клубочках нейтрофилов и моноцитов [3, 10, 17], а для ОТОО характерно преобладание Т-лимфоцитов [17].

Сравнение иммуногистохимической картины Т-лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрации клубочков позволило установить, что количество активированных Т-лимфоцитов и моноцитов в клубочках пациентов с C4d+ ОРО превышало эти показатели в C4d-негативной группе; при этом достоверно отличалось только количество Т-лимфоцитов (табл. 3). Преобладание лимфоцитов в клу-

Таблица 1

Клинические данные пациентов с C4d+ и C4d- ОРО

	C4d+ (16)	C4d- (4)	p
Креатинин крови на момент биопсии (мкмоль/л)	340 (205–520)	211 (116–427)	0,19
Мочевина крови на момент биопсии (ммоль/л)	24,3 (13–27,2)	14,9 (7,6–22,1)	0,13
Протеинурия на момент биопсии (г/л)	0,33 (0,12–0,71)	0,1 (0,05–0,17)	0,10
Применение плазмафереза	25%	0	0,29
Применение антилимфоцитарных антител	23%	0	0,29
Разрыв/некроз ПАТ	42%	0	0,12
Трансплантэктомия	43%	25%	0,52
Креатинин на момент выписки (мкмоль/л)	226 (170–300)	207 (107–427)	0,48

Таблица 2

Корреляция морфологических проявлений ОРО с С4d (R); их частота и степень выраженности в биоптатах С4d+ и С4d-

	R	p	С4d+ (16)	С4d- (4)	p
Гломерулит	0,71	0,001	2 (2,0–2,5)	0,75 (0,25–1,5)	0,039
Лимфоциты	0,33	0,149	94%	75%	0,264
Моноциты	0,46	0,039	75%	50%	0,329
Нейтрофилы	0,51	0,022	56%	0%	0,043
ОКН	0,07	0,765	2 (1–3)	1,5 (1–2)	0,437
Кровоизлияния	0,17	0,443	31%	25%	0,807
Инфаркт	0,1	0,674	31%	25%	0,807
Наличие тубулита	-0,24	0,238	75%	100%	0,264
Степень тубулита	-0,37	0,106	1 (0,5–1,5)	2 (1,5–2)	0,122
Интерстициальное воспаление	0,03	0,888	2 (1,3–3)	1 (1–1,5)	0,099
Капиллярит	0,50	0,025	2 (1–3)	0 (0–0,5)	0,002
Только мононуклеары	-0,18	0,446	31%	25%	0,807
<50% нейтрофилов	0,31	0,177	56%	0%	0,043
>50% нейтрофилов	0,4	0,082	13%	0%	0,456
Диффузный капиллярит	0,69	0,001	81%	0%	0,002
Дилатация ПТК	0,40	0,082	13%	0%	0,043
Повреждение эндотелия ПТК	0,32	0,166	19%	0%	0,348
Наличие артериита	0,19	0,415	50%	50%	1,000
Степень артериита	0,04	0,863	0,5 (0–2)	1 (0–2,3)	0,892
Фибриноидный некроз артерий	-0,18	0,452	44%	25%	0,494
ТМА	0,07	0,771	50%	25%	0,369
Тяжесть ОРО	0,48	0,03	3,5 (3,0–6,5)	3,5 (1,5–5,0)	0,291

Таблица 3

Корреляция степени Т-лимфоцитарной (CD45R0) и макрофагальной (CD68) инфильтрации структур ПАТ с С4d (R), и ее особенности в биоптатах С4d- и С4d+

	R	p	С4d+ (16)	С4d- (4)	p
Количество CD45R0+ клеток на клубочек	0,55	0,042	2,4 (0,3–8)	0 (0–0,7)	0,038
Количество CD68+ клеток на клубочек	0,19	0,513	4,4 (0,9–8,1)	1 (0–1,9)	0,225
Количество CD45R0+ клеток на ПТК	0,06	0,829	4,5 (3–9,5)	2 (2–5)	0,233
Количество CD68+ клеток на ПТК	-0,1	0,728	4 (2,5–6)	3 (0–6)	0,633
Количество CD45R0+ клеток на артерию	0,27	0,378	2 (0–20)	0 (0–40)	0,692
Количество CD68+ клеток на артерию	0,45	0,125	2,5 (0–6)	0 (0–20)	0,573
CD45R0+ в интерстиции	0,28	0,314	1,8 (0,8–2,8)	1 (0–1)	0,233
CD68+ в интерстиции	0,34	0,209	1 (1–1,5)	0 (0–0)	0,009
Количество CD45R0+ клеток в поле зрения интерстиция	0,56	0,031	144 ± 94	62 ± 28	0,001
Количество CD68+ клеток в поле зрения интерстиция	0,13	0,634	75 ± 41	25 ± 19	0,003
Количество CD45R0+ клеток на каналец	-0,16	0,577	1,5 (0–3,5)	2 (1–3)	0,734
Количество CD68+ клеток на каналец	0,06	0,843	0,5 (0–1,5)	0 (0–3)	0,840

бочках в С4d+ биопсиях, как мы полагаем, связано с одновременным наличием у половины пациентов ОТОО. Таким образом, полученные нами данные совпадают с сообщениями о том, что для ОАОО характерно присутствие в клубочках нейтрофилов и моноцитов [3, 10, 17], привлекаемых антителами.

Степень капиллярита была достоверно выше в биоптатах пациентов с ОАОО (табл. 2). Для ОАОО была также характерна сочетанная маргинация мононуклеарных лейкоцитов и нейтрофилов в ПТК (рис. 1, ж), тогда как при ОТОО в ПТК идентифицировались только мононуклеары. Количество CD45R0+ и CD68+ мононуклеаров в ПТК досто-

верно не отличалось у пациентов с ОАОО и ОТОО (табл. 3). Тем не менее степень капиллярита достоверно коррелировала с количеством активированных Т-лимфоцитов в ПТК (R = 0,65, p = 0,008), что свидетельствует о значительной роли Т-клеточных механизмов в повреждении ПАТ. В отличие от ОТОО, при ОАОО капиллярит имел диффузный характер (более 50% ПТК) и сопровождался дилатацией ПТК, что находит подтверждение в литературе [2, 10, 12, 13, 15].

При количественной оценке инфильтрации интерстиция было установлено, что если в дотрансплантационных биоптатах количество CD45R0+

Т-лимфоцитов в поле зрения составляло 16 ± 9 , CD68+ макрофагов – 23 ± 11 (рис. 1, а, б), то при ОРО – 136 ± 93 и 65 ± 42 соответственно. Количество Т-лимфоцитов в поле зрения в обеих группах было достоверно большим, чем количество макрофагов ($p = 0,0001$). В интерстиции С4d– биопсий достоверно увеличивалось количество Т-лимфоцитов ($p = 0,0001$), а количество макрофагов не менялось по сравнению с дотрансплантационным этапом (табл. 3). В С4d+ биопсиях достоверно увеличивалось количество как Т-лимфоцитов, так и макрофагов ($p < 0,0001$). По данным ряда авторов, при ОТОО в инфильтратах в основном выявляются активированные CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты [6, 19]. Однако современные данные ставят под сомнение ключевую роль Т-лимфоцитов в ОТОО [3]; имеются указания, что только моноцитарная инфильтрация ассоциируется с повреждением канальцев и с дисфункцией ПАТ при ОРО [4, 20]. Отсутствие усиления макрофагальной инфильтрации интерстиция при ОТОО у наших пациентов может объяснить относительно доброкачественное течение этой формы ОРО. Уровень моноцитарной инфильтрации имеет и прогностическое значение, поскольку эти клетки ответственны за последствия отторжения [8], развитие склероза ПАТ [21] и длительность его жизни [16].

Хотя, по данным рутинного гистологического исследования, степень интерстициального воспаления достоверно не отличалась между двумя группами (табл. 2), иммуногистохимическое окрашивание выявило более высокую степень макрофагальной инфильтрации интерстиция в С4d+ биоптатах (табл. 3), что согласуется с литературными данными [17]. В отличие от метода полуколичественной оценки было показано, что при ОАОО по сравнению с ОТОО достоверно увеличивается присутствие в интерстиции не только макрофагов, но и Т-лимфоцитов. Таким образом, количественный подход к оценке степени инфильтрации является более чувствительным. Литературные данные свидетельствуют, что нарушение функции ПАТ достоверно ассоциируется со степенью инфильтрации [3, 14]. Мы показали, что для С4d+ ОРО (которое имеет более тяжелое течение) характерна более высокая степень инфильтрации интерстиция ПАТ активированными Т-лимфоцитами (рис. 1, з) и макрофагами. Однако, вне зависимости от типа ОРО, в интерстиции Т-лимфоциты достоверно преобладают над макрофагами.

Степень инфильтрации интерстиция активированными Т-лимфоцитами при ее оценке в баллах достоверно коррелировала со степенью интерстициального воспаления ($R = 0,53$, $p = 0,04$). Если же для оценки использовать количественные критерии, то со степенью интерстициального воспа-

ления коррелировало как количество активированных Т-лимфоцитов в поле зрения ($R = 0,56$, $p = 0,03$), так и количество макрофагов в поле зрения ($R = 0,53$, $p = 0,04$).

Степень тубулита и количество иммунопозитивных мононуклеаров в стенке канальцев достоверно не отличались между двумя группами, однако коэффициент корреляции с присутствием Т-лимфоцитов в стенке канальца (рис. 1, з) был достаточно высоким ($R = 0,44$, $p = 0,102$). Отсутствие ожидаемых отличий в степени тубулита было связано с наличием у 13 из 16 пациентов в С4d+ группе ОТОО. Если же отделить пациентов с изолированным ОАОО ($n = 3$), у которых тубулит отсутствовал 0 (0–0), то у 17 пациентов с признаками ОТОО степень тубулита была достоверно ($p = 0,012$) выше – 1 (1–2).

Наличие артериита и его степень, а также количество лейкоцитов в артериальной стенке достоверно не отличались в двух группах. Только количество CD68+ мононуклеаров в артериальной стенке достоверно коррелировало с наличием артериита ($R = 0,58$, $p = 0,04$) и его степенью ($R = 0,61$, $p = 0,028$). Эндартериит характеризуется субэндотелиальной и интимальной инфильтрацией CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитами и CD68+ макрофагами. Артериит выявляется примерно в 25–40% нефробиопсий при ОРО и крайне редко ($<0,5\%$) – в стабильно функционирующих ПАТ [11]. Литературные данные подтверждают наши находки, и свидетельствуют, что в отличие от тубулита при артериите в стенке артерий преобладают макрофаги [9].

Далее мы проанализировали отличия морфологических параметров между С4d– ОРО, фокально С4d+ ОРО и диффузно С4d++ ОРО (табл. 4).

Непараметрический дисперсионный анализ Краскелла–Уоллиса выявил отличия между тремя группами по степени гломерулита ($p = 0,0056$), количеству нейтрофилов в клубочках (0,043), степени капиллярита (0,013), количеству CD45R0+ Т-лимфоцитов на клубочек (0,05), степени инфильтрации интерстиция CD68+ макрофагами (0,023), количеству CD45R0+ Т-лимфоцитов в интерстиции (0,043). Данные, полученные при попарных сравнениях, приведены в табл. 4.

Полученные данные свидетельствуют, что гломерулит является признаком, который наиболее чувствительно реагирует на отложение в капиллярах клубочка С4d, и, по-видимому, на изменение концентрации антител в сыворотке пациента. Привлечение нейтрофилов и Т-лимфоцитов в клубочки, по-видимому, происходит только при достаточно высоком титре антител, поскольку только у пациентов с диффузным окрашиванием степень нейтрофильного гломерулита и присутствие в клубочках CD45R0+ достоверно отличаются от контроля. Капиллярит, макрофагальная и Т-лимфоцитарная

Таблица 4

Морфологические и иммуногистохимические проявления ОРО в биоптатах C4d-, C4d+ и C4d++

	C4d- (4)	C4d+ (9)	C4d++ (7)	p C4d+ против C4d-	p C4d++ про- тив C4d-	p C4d++ про- тив C4d+
Гломерулит	0,75 (0,25–1,5)	2 (1,5–2)	3 (2–3)	1	0,01	0,01
Наличие нейтрофилов в клубочках	0%	44%	71%	0,11	0,02	0,28
Количество нейтрофилов в клубочках	0 (0–0)	0 (0–2)	2 (0–3)	0,26	0,04	0,11
Степень капиллярита	0 (0–0,5)	2 (1–3)	2 (2–3)	0,011	0,01	0,83
Диффузный капиллярит	0%	67%	100%	0,03	0,001	0,09
Количество CD45RO+ на клубочек	0 (0–0,7)	0,73 (0,32–2,4)	3,2 (2,2–8)	0,14	0,05	0,11
CD68+ в интерстиции	0 (0–0)	1 (1–2)	1 (1–1)	0,02	0,05	0,91
Количество CD45RO+ в поле зрения	57 (41–78)	106 (87–115)	165 (131–180)	0,02	0,17	0,24

инфильтрация интерстиция, напротив, отмечаются уже при минимальном депонировании C4d в ПТК.

Нами показано, что у 65% пациентов имеет место сочетание ОАОО и ОТОО: гуморальный ответ против капиллярных антигенов, клеточный ответ против эндотелия артерий (артериит) или канальцев (тубулит). При рутинной световой микроскопии это может быть установлено не всегда, поэтому считаем необходимым рутинное использование окрашивания с антителами к C4d всех биопсийных образцов.

Выявленные различия картины инфильтрации структур ПАТ Т-лимфоцитами и макрофагами при ОАОО и ОТОО могут объяснить более тяжелое клиническое течение ОАОО и худший прогноз [1–3]. Согласно полученным данным, среди морфологических вариантов ОАОО преобладает капиллярный [2, 13]. Другие 2 варианта морфологических проявлений ОАОО – ОКН и артериит – могут иметь место и при ОТОО [2, 13]. Столь высокий процент случаев ОАОО, по-видимому, объясняется более тяжелым его клиническим течением, что являлось основанием для биопсии/трансплантэктомии, в то время как изолированное ОТОО у ряда пациентов могло протекать субклинически. Важность ранней диагностики ОАОО объясняется не только более тяжелым его течением и худшим прогнозом, но и иными подходами к терапии. Таким пациентам показаны плазмаферез, введение иммуноглобулинов, антител к антигенам В-лимфоцитов, спленэктомия; однако наиболее эффективно зарекомендовала себя иммуноадсорбция [1, 2, 10, 12].

ВЫВОДЫ

1. Для ОТОО характерно усиление Т-лимфоцитарной инфильтрации интерстиция по сравнению с

дотрансплантационным этапом при сохранении степени макрофагальной инфильтрации, минимальный мононуклеарный гломерулит и капиллярит; тубулит.

2. Ключевыми морфологическими признаками ОАОО являются: а) нейтрофильный и Т-лимфоцитарный гломерулит; б) диффузный капиллярит ПТК с их дилатацией, маргинацией моноцитов с примесью нейтрофилов; в) усиление по сравнению с дотрансплантационным этапом макрофагальной инфильтрации интерстиция при полуколичественной оценке; г) более высокая по сравнению с ОТОО степень Т-лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрации интерстиция с преобладанием лимфоцитов при количественной оценке.
3. Автоматизированный метод более чувствительно выявляет количественные различия в степени инфильтрации интерстиция.
4. У 80% пациентов диагностировано ОАОО, причем у 65% пациентов имеет место сочетание ОАОО и ОТОО.
5. В патогенезе артериита главную роль играют макрофаги.
6. Необходимо рутинное окрашивание с антителами к C4d всех биопсийных образцов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Böhmig G.A., Wahrmann M., Regele H. et al. Immunoabsorption in severe C4d-positive acute kidney allograft rejection: a randomized controlled trial // Am. J. Transplant. 2007. V. 7. № 1. P. 117–121.
2. Colvin R.B. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis // J. Am. Soc. Nephrol. 2007. V. 18. № 4. P. 1046–1056.
3. Cornell L.D., Smith R.N., Colvin R.B. Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance // Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2008. V. 3. P. 189–220.

4. *Girlanda R., Kleiner D.E., Duan Z. et al.* Monocyte Infiltration and Kidney Allograft Dysfunction During Acute Rejection // *Am. J. Transplant.* 2008. V. 8. P. 600–607.
5. *Feucht H.E., Schneeberger H., Hillebrand G. et al.* Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss // *Kidney Int.* 1993. V. 43. P. 1333–1338.
6. *Hadley G.* Role of integrin CD103 in promoting destruction of renal allografts by CD8 T cells // *Am. J. Transplant.* 2004. V. 4. P. 1026–1032.
7. *Hariharan S., Johnson C.P., Bresnahan B.A. et al.* Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996 // *N. Engl. J. Med.* 2000. V. 342. P. 605–612.
8. *Kirk A.D., Mannon R.B., Kleiner D.E.* Monocytes, not T-cells, primarily determine the functional significance of a rejection // *Abstracts of the World Transplant Congress.* Boston. July 22–27. 2006. P. 409.
9. *Matheson P.J., Dittmer I.D., Beaumont B.W. et al.* The macrophage is the predominant inflammatory cell in renal allograft intimal arteritis // *Transplantat.* 2005. V. 79. P. 1658–1662.
10. *Mauyyedi S., Crespo M., Collins B.A. et al.* Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002. V. 13. P. 779–787.
11. *Mengel M., Chapman J.R., Cosio F.G. et al.* Protocol biopsies in renal transplantation: Insights into patient management and pathogenesis // *Am. J. Transplant.* 2007. V. 7. P. 512–517.
12. *Nickeleit V., Zeiler M., Gudat F. et al.* Detection of the Complement Degradation Product C4d in Renal Allografts: Diagnostic and Therapeutic Implications // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002. V. 13. P. 242–251.
13. *Racusen L.C., Colvin R.B., Solez K. et al.* Antibody-mediated rejection criteria- an addition to the Banff-97 classification of renal allograft rejection // *Am. J. Transplant.* 2003. V. 3. P. 708–714.
14. *Racusen L.C., Solez K., Colvin R.B. et al.* The Banff-97 working classification of renal allograft pathology // *Kidney Int.* 1999. V. 55. № 2. P. 713–723.
15. *Solez K., Colvin R.B., Racusen L. et al.* Banff-05 Meeting Report: Differential Diagnosis of Chronic Allograft Injury and Elimination of Chronic Allograft Nephropathy ('CAN') // *American Journal of Transplantation.* 2007. V. 7. P. 518–526.
16. *Srinivas T.R., Kubilis P.S., Croker B.P.* Macrophage index predicts short-term renal allograft function and graft survival // *Transpl. Int.* 2004. V. 17. P. 195–201.
17. *Tinckam K.J., Djurdjev O., Magil A.B.* Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status // *Kidney Int.* 2005. V. 68. P. 1866–1874.
18. *van der Woude F.J., Deckers J.G., Mallat M.J. et al.* Tissue antigens in tubulointerstitial and vascular rejection // *Kidney Int. Suppl.* 1995. V. 52. S11–S13.
19. *Veronese F.V., Noronha I.L., Manfro R.C. et al.* Prevalence and immunohistochemical findings of subclinical kidney allograft rejection and its association with graft outcome. *Clin. Transplant.* 2004. V. 18 (4). P. 357–364.
20. *Wyburn K.R., Jose M.D., Wu H. et al.* The role of macrophages in allograft rejection // *Transplantat.* 2005. V. 80. P. 1641–1647.
21. *Yilmaz S., Gonul I., Sar A. et al.* Does interstitial inflammation have a value in the Banff-97 chronic/sclerosing lesion scoring? In: *Abstracts of the World Transplant Congress.* Boston. July 22–27, 2006. P. 457–458.