

На правах рукописи

Соловьёва Светлана Евгеньевна

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТРОГО ОТТОРЖЕНИЯ И ВИРУСНОГО
ПОРАЖЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАТА ПОЧКИ**

14.03.02 – патологическая анатомия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

**Научный руководитель:
профессор РАН, д.м.н. Е.М. Пальцева**

Москва, 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Российский научный центр хирургии имени академика Б. В. Петровского».

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор медицинских наук, профессор РАН

Екатерина Михайловна Пальцева

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор медицинских наук, профессор, ведущий специалист патологоанатомического отделения Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Владимир Анатольевич Варшавский

кандидат медицинских наук, заведующая отделением патологической анатомии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Наталья Павловна Можейко

ВЕДУЩЕЕ УЧРЕЖДЕНИЕ:

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы» г. Москва, Большая Сухаревская площадь, дом 3

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2020 года

в ____ часов на заседании диссертационного совета (Д001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте www.morfolhum.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 года

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук Косырева Анна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

На сегодняшний день трансплантация почек признана золотым стандартом лечения терминальной стадии хронической почечной недостаточности. По данным информационного бюллетеня международного реестра донорства и трансплантации органов 2019 года в России количество трансплантаций на миллион населения составило 1,37 операций от родственного и 6,63 – от трупного доноров. Несмотря на прогресс в современной нефротрансплантологии, все еще высока частота потери трансплантата, обусловленная многочисленными факторами. Среди причин дисфункции трансплантата, в первую очередь, выделяют отторжение и осложнения, связанные с иммуносупрессивной терапией, в особенности развитие вирусных инфекций, представляющих особую опасность в раннем посттрансплантационном периоде, во время подбора терапии. Нередкое отсутствие характерной морфологической картины, сходство проявлений поражения почечного трансплантата различными вирусами с острым отторжением, возможность их сочетанного течения затрудняет диагностику без подтверждения ИГХ-исследованием [Saliba M. et al., 2019].

Пункционные биопсии являются необходимым методом мониторинга состояния аллотрансплантата. При отсутствии клинических проявлений дисфункции почечного аллотрансплантата протокольные биопсии позволяют выявить субклиническое течение острого отторжения и осложнений, вызываемых иммуносупрессивной терапией [Sakai K. et al., 2018].

Морфологическая оценка состояния трансплантата производится в соответствии с критериями Banff-классификации 2017 года – международной классификации биопсий почечных аллотрансплантатов. Применение Banff-классификации при диагностике состояния почечного аллотрансплантата является обязательным, но не всегда достаточным [Roufosse C. et al., 2018]. Возможность инфекционного поражения не позволяет использовать только Banff-критерии для диагностики острого отторжения, поскольку остается открытым вопрос: следует ли при наличии инфекционного процесса рассматривать воспаление в аллотрансплантате в качестве доказательства отторжения.

Степень разработанности темы

В литературе большое количество работ посвящено проблеме острого клеточно-опосредованного и антитело-опосредованного отторжения почечного аллотрансплантата, однако, несмотря на наличие четких диагностических критериев, при тяжелом течении данных осложнений морфологическая картина клеточно-опосредованного и антитело-опосредованного отторжения может быть сходной, а в случаях смешанного характера отторжения будут отсутствовать различия при иммуногистохимическом исследовании с антителами к C4d компоненту комплемента [Rodríguez C.B. et al., 2016; Hara S. et al., 2018; Namada A.M. et al., 2018]. Также является сложной диагностика пограничных изменений, недостаточно освещенная в современной литературе [Loupy A. et al., 2015].

Исследования роли вирусов в трансплантологии представлены большим количеством научных статей, поскольку реципиенты донорских органов, и, особенно, дети [Engen R.M. et al., 2018], находятся в группе риска развития оппортунистических инфекций. Однако в большинстве работ уделяется недостаточное внимание сочетанию нескольких вирусов, а также взаимному влиянию вирусного поражения и реакции отторжения трансплантата [LionT.2019, Solis M.et al., 2018; Vanichanan J. et al., 2018].

До сих пор не сформулировано единого алгоритма дифференциальной диагностики вирус-индуцированного поражения и острого отторжения почечного аллотрансплантата. Поэтому при подозрении на вирусную природу поражения аллотрансплантата важной теоретической и практической задачей является проведение комплексного исследования и анализа биоптатов трансплантатов почек с применением гистологических и иммуногистохимических методов.

Цель исследования:

Охарактеризовать морфологические и иммуногистохимические особенности острого отторжения и вирусного поражения трансплантата почки с целью их дифференциальной диагностики.

Задачи исследования:

1. Провести морфологическое исследование биоптатов почки при различных формах острого отторжения, вирусном нефрите и плановых контрольных исследованиях.
2. Провести иммуногистохимическое исследование экспрессии антигенов аденовируса, вирусов герпеса I (ВПГ-1) и II типов (ВПГ-2), цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейна-Барр (ЭБВ) в биоптатах трансплантатов почек при различных формах острого отторжения, вирусном нефрите, плановых контрольных исследованиях. Сопоставить результаты ИГХ-исследования цитомегаловируса в биоптатах с его выявлением в крови с помощью ПЦР.
3. Сопоставить результаты морфологического исследования трансплантатов почек при полиомавирусной нефропатии (ПВН) с данными ПЦР-исследования крови и мочи.
4. Сравнить результаты определения иммуногистохимическим методом Т- (CD3) и В-лимфоцитов (CD20) в биоптатах трансплантатов почки, а также С4d компонента комплемента в сосудах микроциркуляторного русла при различных формах острого отторжения, вирусном нефрите и плановых контрольных исследованиях.
5. Сопоставить морфологические и иммуногистохимические данные с клиническими показателями при остром отторжении и вирусном поражении почечных трансплантатов.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности: 14.03.02 «Патологическая анатомия» согласно пунктам 1, 2, 3, 4.

Научная новизна

Впервые установлена связь возраста пациентов, сроков после трансплантации почки и тяжести вирусного поражения с морфологическими, иммуногистохимическими и клиническими данными. Выявлено преобладание вирус-индуцированной потери трансплантата у пациентов младшего возраста (до

шести лет в первые два месяца после трансплантации). В случаях развития острого отторжения и нефрита без потери трансплантата связь с возрастом реципиента не обнаружена.

Подтверждена диагностическая значимость иммуногистохимического определения антигенов аденовируса при подозрении на вирус-индуцированное поражение трансплантата почки. Впервые показано, что при потере аллотрансплантата в биоптатах почки выявляется вирус простого герпеса I типа.

При вирус-индуцированной потере трансплантата наблюдается преобладание экспрессии антигенов Т-лимфоцитов по сравнению с В-лимфоцитами. Впервые установлено, что экспрессия маркеров Т- и В-лимфоцитов более выражена в группе острого отторжения и группе сочетания острого отторжения с нефритом. Показана эффективность применения иммуногистохимического исследования в оценке выраженности тубулита при дифференциальной диагностике пограничных изменений с вирус-индуцированным нефритом.

Оценка изменения режима иммуносупрессивной терапии с учетом результатов морфологического и ИГХ-исследования показала улучшение функции трансплантата у большинства реципиентов. Ухудшение функции отмечено только в 10,5% в группе вирус-индуцированного нефрита и в 38% случаев при сочетании клеточного отторжения с вирус-индуцированным нефритом, что свидетельствует о необходимости выявления вирусов для коррекции иммуносупрессивной терапии.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты исследования имеют теоретическое значение, расширяя представление о механизмах острого отторжения, вирус-индуцированного нефрита в аллотрансплантате почки и об их взаимном влиянии. Описана и проанализирована морфологическая и иммуногистохимическая картина данных патологических процессов, а также их связь с клиническими проявлениями и выживаемостью трансплантата.

Настоящая работа представляет практический интерес для морфологической диагностики различных форм отторжения трансплантата почки и вирус-индуцированного нефрита. Показано, что при наличии морфологической картины или клинических проявлений инфекционного поражения необходимо проведение

ИГХ-исследования для определения аденовирусов и герпес-вирусов в ткани трансплантата почки.

Выявление репликации ЦМВ при помощи ПЦР у реципиентов аллотрансплантатов почек и изучение морфологической картины биоптатов подтверждают эффективность проведения ПЦР для определения ДНК ЦМВ в крови для раннего выявления и предотвращения развития ЦМВ-болезни. Морфологическое исследование не выявило специфических признаков полиомавирусной нефропатии на ранних стадиях, поэтому для своевременного выявления полиомавирусной нефропатии необходимо проведение ПЦР для обнаружения вируса в крови и моче.

Дифференциальная диагностика пограничных изменений и вирус-индуцированного нефрита без специфических морфологических признаков вирусного поражения основывается на выявлении тубулита, для чего рекомендовано проведение ИГХ-исследования с антителами к Т- и В-лимфоцитам. Исследование экспрессии CD3 и CD20 позволяет оценить количество лимфоцитов, проникающих в эпителий канальцев, и площадь распространения воспалительного инфильтрата в интерстиции.

Морфологическая картина тяжелого вирус-индуцированного поражения трансплантата может напоминать антитело-опосредованное отторжение, поэтому целесообразно проводить ИГХ-исследование с антителами к С4d компоненту комплемента – определение С4d+ депозитов в перитубулярных капиллярах не наблюдается при вирусном поражении.

Полученные данные клинических, морфологического и ИГХ-исследований представляют практическую ценность для врачей-патологоанатомов, нефрологов, трансплантологов, так как позволяют оптимизировать проводимую терапию и улучшить качество жизни пациентов с трансплантатами почек.

Положения, выносимые на защиту

1. Морфологическая картина вирусного нефрита сходна с острым отторжением трансплантата почки. Изменения характеризуется тубулитом, интерстициальной инфильтрацией лимфоцитами и плазмócитами, некрозом эпителия извитых канальцев, что свойственно тубулоинтерстициальному типу

острого клеточного отторжения, и зонами кровоизлияний, которые более характерны для острого гуморального отторжения трансплантата.

2. В отличие от картины острого отторжения, при вирусном нефрите наблюдаются внутриядерные включения вирусных частиц, формирование гранулемоподобных структур. При иммуногистохимическом исследовании в цитоплазме эпителия канальцев наблюдаются вирусные частицы; отсутствуют C4d⁺ депозиты в перитубулярных капиллярах, характерные для гуморального отторжения трансплантата почки.
3. При полиомавирусной инфекции развитию специфических морфологических признаков вирусного поражения аллотрансплантата почки предшествует появление полиомавируса в моче и крови реципиентов, определение которого при помощи ПЦР способствует профилактике полиомавирусной нефропатии.
4. Дифференциальная диагностика пограничных изменений и вирус-индуцированного нефрита основывается на оценке выраженности тубулита и распространенности интерстициального воспаления, для выявления которых целесообразно проведение ИГХ-исследования с антителами к CD3 и CD20.

Методология и методы исследования

Методологическая работа включала анализ публикаций и клинических рекомендаций российских и иностранных авторов по диагностике отторжения и вирус-индуцированного поражения аллотрансплантата почки. Морфологические исследования проводили в соответствии с критериями Banff-классификации. Применяли современные методы исследования, такие как иммуногистохимическое исследование с широкой панелью антител и ПЦР-диагностика. Учитывали ряд клинических показателей (уровень креатинина, протеинурии, результаты ПЦР), что позволило провести сопоставление морфологической и иммуногистохимической картины с изменениями функции аллотрансплантата.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов основывалась на проспективном и ретроспективном исследовании аллотрансплантатов почки и состояния пациентов, разделенных на 5 групп в соответствии с клинко-морфологической картиной. Анализ статистических данных подтвердил наличие достоверных различий между

группами, что позволило сформулировать практические рекомендации к комплексной оценке пункционных биоптатов аллотрансплантата.

Основные положения работы доложены на: научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», Москва, 2016; V съезде Российского общества патологоанатомов с международным участием, Челябинск, 2017; всероссийской конференции молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии», Рязань, 2017 г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 4 статьи из перечня журналов, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ. Материалы конференций – 3 публикации.

Внедрение результатов исследования

Результаты настоящего исследования и рекомендации используются в практической работе патологоанатомических отделений ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского» и ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского».

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 137 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, главы, в которой представлены результаты собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Библиографический список включает 210 работ (из них 14 отечественных и 196 зарубежных авторов). Диссертация иллюстрирована 18 таблицами и 31 рисунком.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-морфологическое исследование было проведено на диагностическом материале 118 пункционных биопсий почечных трансплантатов, полученных от 98 пациентов (от 2 до 63 лет, медиана возраста 16,5 лет), проходивших лечение в РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского в период с 2004 по 2019

годы. В качестве группы сравнения использовали образцы 10 почек, которые были получены при нефрэктомии собственных почек реципиента.

Материал пункционных биопсий фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (рН 7,4), осуществляли проводку на гистопроцессоре TP1050 (Leica) и заливали в парафин. Для гистологического и ИГХ исследований изготавливали срезы толщиной 3-4 мкм на ротационном микротоме Leica RM2235. Для гистологического исследования биоптатов почечных трансплантатов изготавливали по 6 стекол, использовали окраску гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону, PAS-реакцию. Депарафинирование и ИГХ исследование проводили по стандартному протоколу в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Bond-Max (Leica) с первичными мышиными моноклональными антителами к: аденовирусу (Abcam, клон M58+M73; разведение 1:100), цитомегаловирусу pp56 (Abcam, клон 2+6; разведение 1:400), ядерному антигену вируса Эпштейна-Барр (Abcam, клон E1-2.5; разведение 1:3000), вирусу герпеса I типа (CellMarque, клон 10A3; разведение 1:800); поликлональными кроличьими антителами к вирусу герпеса II типа (CellMarque, поликлональные; разведение 1:600). В качестве маркера комплемент-фиксированных в эндотелии микроциркуляторного русла почки антител при подозрении на гуморальное отторжение определяли C4d+ депозиты (CellMarque, клон SP91; разведение 1:100). Для оценки выраженности тубулита и интерстициальной инфильтрации проводили ИГХ исследование с антителами к CD3 (Т-лимфоциты) (Dako, клон F7.2.38; разведение 1:200) и CD20 (В-лимфоциты) (Dako, клон L26; разведение 1:200). При ИГХ исследовании в каждой серии гистологических срезов использовали положительные и отрицательные контроли.

Препараты исследовали с помощью световой микроскопии при увеличениях x50, x100, x200, x400, x1000 на световых микроскопах Leica DM1000LED и Leica DM5000B. Оценку морфологической картины проводили в соответствии с критериями Vanff-классификации 2017 года. Экспрессию вирусных частиц определяли в цитоплазме клеток и оценивали полуколичественным методом: «+++» – выраженная, «++» – умеренная, «+» – слабая, «-» и «+/-» – отрицательная и незначительная экспрессия. Для визуализации изображения использовали

цифровую камеру Leica DFC490 с программным обеспечением LAS V4.8 (Leica Microsystems).

Проводили оценку следующих клинических и лабораторных данных: уровень креатинина и протеинурии; значения АД; заключения УЗИ-исследований; выявление ДНК вирусов в моче (полиомавирус) и крови (полиомавирус, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр) методом ПЦР.

Учитывался родственный либо трупный тип трансплантата, пол и возраст пациентов, было проанализировано наличие связи вышеперечисленных данных с морфологической картиной и результатами ИГХ-исследования.

При статистической обработке для выявления достоверных различий между группами в случае качественных переменных применяли точный тест Фишера с поправкой на множественные сравнения методом Холма. Для сравнения количественных переменных применяли тест Крускала-Уоллеса и попарный *post-hoc* анализ с помощью теста медиан Муда и поправкой на множественные сравнения методом Холма. Различия считали достоверными при значении $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам морфологического и иммуногистохимического исследований пациенты были разделены на 5 основных групп с:

1) морфологической и иммуногистохимической картиной вирусного нефрита с потерей трансплантата в ранние сроки после выявления изменений -5 пациентов (4,2%);

2) морфологической и иммуногистохимической картиной вирусного нефрита без потери трансплантата в 38 случаях (32,2%);

3) сочетанием клеточного отторжения и пограничных изменений с вирусным нефритом в 38 случаях (32,2%);

4) острым клеточным отторжением и пограничными изменениями в 23 случаях (19,5%);

5) пациенты без морфологических и иммуногистохимических признаков отторжения и вирус-индуцированного поражения в 14 случаях (11,9%).

Морфологическое исследование аллотрансплантатов

Морфологическую диагностику острого отторжения проводили в соответствии с Banff-классификацией 2017 года (международная классификация

биопсий почечных трансплантатов, впервые предложена в 1991 году в городе Банф, Канада, пересматривается раз в два года).

В нашем исследовании при распределении пациентов по группам на основании морфологической оценки биоптатов наибольшее значение имели «t» и «i» критерии Banff-классификации (таблица 1).

Значение Banff-критериев «t» и «i» по группам

Критерии Banff-классификации	Вирусный нефрит с потерей трансплантата	Вирусный нефрит без потери трансплантата	ТОО, ПИ и вирусный нефрит	ТОО, ПИ	Отсутствии признаков отторжения и вирусного нефрита
t0	4 (80%)	33 (86,9%)	2 (5,3%)	1 (4,35%)	12(85,7%)
t <1	0	4 (10,5%)	25 (65,8%)	11(47,8%)	2 (14,3%)
t1	1 (20%)	1 (2,6%)	8 (21%)	10(43,5%)	0
t1-2	0	0	1 (2,6%)	1 (4,35%)	0
t2	0	0	2 (5,35)	0	0
i0	5 (100%)	24 (63,2%)	1 (2,6%)	1 (4,35%)	11(78,6%)
i<1	0	9 (23,7%)	18 (47,4%)	10(43,5%)	3 (21,4%)
i1	0	4 (10,5%)	13 (34,2%)	10(43,5%)	0
i1-2	0	0	0	1 (4,3%)	0
i2	0	1 (2,6%)	6 (15,8%)	1 (4,3%)	0

**ТОО – Т-клеточно-опосредованное отторжение, ПИ – пограничные изменения*

В группе с морфологической и иммуногистохимической картиной вирусного нефрита с потерей трансплантата в ранние сроки после выявления изменений Banff критерии «i» во всех случаях равнялись нулю. В исследованных биоптатах интерстициальное воспаление в строме было представлено очагами гистиоцитарной инфильтрации с примесью единичных лимфоцитов, плазмоцитов, нейтрофилов и эозинофилов, что в сочетании с характерной морфологической картиной было расценено как проявление интерстициального нефрита, а не клеточного отторжения, которое кодируется в соответствии с Banff-критериями.

Banff критерий «t1» отмечался лишь в 1 биоптате, в остальных случаях тубулит не определялся – в участках инфильтрации наблюдалась пролиферация эпителия канальцев, местами с формированием единичных мелких гранул со стиранием рисунка строения тубул в центре, очаги некроза эпителия канальцев, сплющивание эпителиоцитов в просвет канальцев, изменения ядер.

Среди *пациентов с вирусным нефритом без потери трансплантата* наблюдалась морфологическая картина, сходная с описанной выше, за исключением меньшей степени выраженности характерных морфологических признаков и большем разбросе значений Banff-критериев.

Наиболее высокие значения Banff критериев «i» и «t» определялись при исследовании биоптатов из *группы с острым клеточным отторжением и пограничными изменениями*.

В *группе без признаков отторжения и вирус-индуцированного поражения трансплантата* воспалительная инфильтрация была представлена мелкими скоплениями лимфоцитов, что не имело диагностической значимости.

Ввиду отсутствия достоверных отличий вирус-индуцированного нефрита и пограничных изменений аллотрансплантата, при постановке диагноза «пограничные изменения» мы, в первую очередь, учитывали выраженность тубулита как проявление острого отторжения, а также наличие либо отсутствие характерных морфологических признаков цитопатического действия вирусов.

C4d+ депозиты отмечались в ПТК в 2 биоптатах из группы острого отторжения, в 2 биоптатах из группы сочетания острого отторжения с нефритом и в 1 биоптате из группы без морфологических и ИГХ-признаков отторжения и вирусного поражения. При этом во всех случаях, кроме одного (смешанное острое гуморальное и клеточное отторжение), наблюдалась картина хронической трансплантационной гломерулопатии. При тяжелом течении вирусного нефрита, вызванного репликацией аденовируса или ВК-вируса, может наблюдаться морфологическая картина, сходная с антитело-опосредованным отторжением, однако C4d+ депозиты в ПТК в биоптатах данных пациентов не выявляются [McGregor S.M. et al., 2015].

Морфологические изменения в аллотрансплантате, характерные для вирусного поражения

Морфологические изменения, характерные для вирусного поражения почечного трансплантата, такие как крупные гиперхромные ядра с внутриядерными включениями и гранулемоподобные структуры, наблюдались в 42 (35,6%) из 118 случаев. Выявлены статистически значимые различия частоты встречаемости характерных морфологических изменений между группами вирусного нефрита с потерей трансплантата и без его потери по сравнению с группой острого отторжения трансплантата и группой сочетанного течения отторжения и нефрита. Отмечена достоверная связь наличия патогномичных морфологических изменений с развитием нефрита, что позволяет подтвердить вирусную природу нефрита, а также косвенно использовать данный критерий для дифференциальной диагностики с отторжением трансплантата (рис. 1).

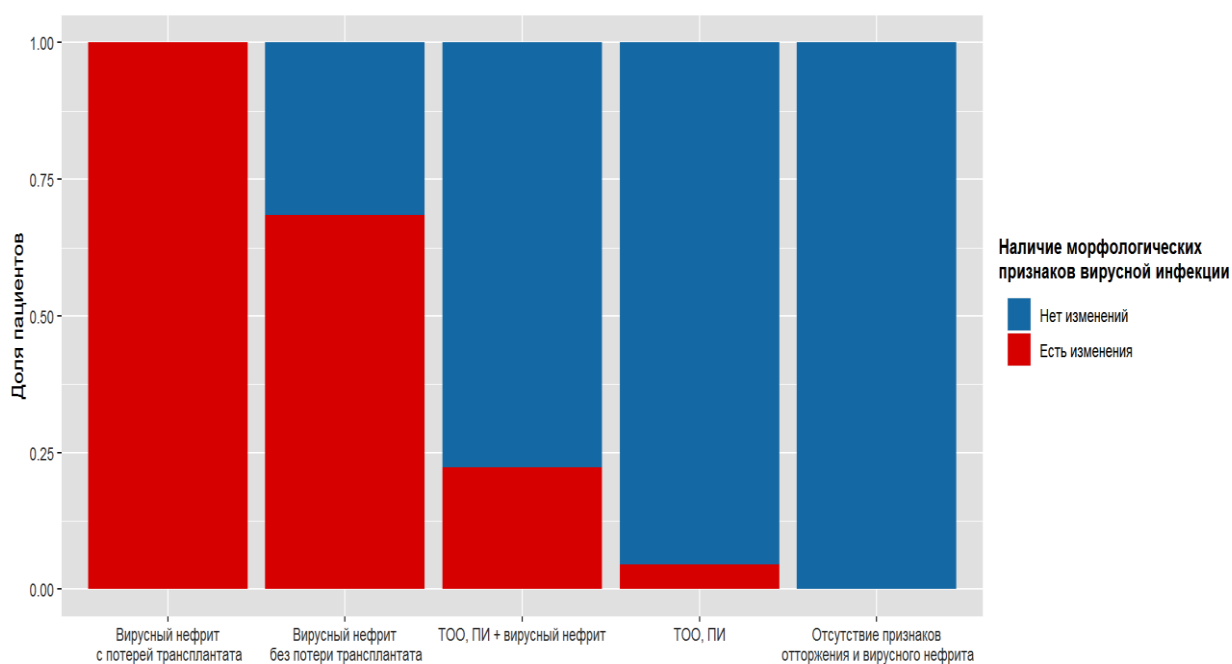


Рисунок 1. Выявление характерных морфологических признаков вирус-индуцированного поражения в различных группах (ТОО – Т-клеточно-опосредованное отторжение, ПИ – пограничные изменения)

Распределение экспрессии антигенов вирусов в биоптатах почек разных групп пациентов

При ИГХ-исследовании отмечалось следующее распределение экспрессии антигенов вирусов: в 83 (70,3%) случаях была выявлена экспрессия антигенов аденовируса, в 50 (42,4%) случаях – ВПГ I типа, в 1 (0,8%) случае – ЦМВ, экспрессия ВПГ II типа в 8 (6,8%) случаях была оценена как незначительная (табл.2).

Таблица 2. Экспрессия антигенов вирусов в биоптатах почечных трансплантатов

Выраженность экспрессии антигенов вирусов	Число наблюдений n=118			
	Аденовирусы	ВПГ-1	ВПГ-2	ЦМВ
Отрицательная и незначительная экспрессия «←» и «+/-»	35	68	8 «+/-» 110 «←»	2 «+/-» 115 «←»
Слабая «+»	40	29	-	1
Умеренная «++»	36	17	-	-
Выраженная «+++»	7	4	-	-

Выявление аденовируса в аллотрансплантатах пациентов различных групп

При ИГХ-исследовании во всех 5 группах отмечалось окрашивание цитоплазмы эпителиоцитов. Следует учитывать, что иммуногистохимическую и морфологическую диагностику аденовирус-индуцированного нефрита затрудняет разнообразие серотипов аденовирусов (более 50-ти), а также очаговый характер вирусного поражения паренхимы аллотрансплантата, из-за чего отрицательные результаты ИГХ-исследования не позволяют исключить наличия аденовирусной инфекции [Parasuraman R. et al., 2013].

При сопоставлении морфологических проявлений нефрита со степенью выраженности экспрессии аденовируса методом ИГХ были выявлены статистически значимые различия между группой вирус-индуцированного нефрита без потери аллотрансплантата (более выраженная экспрессия) и прочими группами, что указывает на необходимость проведения ИГХ-исследования при подозрении на развитие вирус-индуцированного нефрита.

При сопоставлении исследуемой группы с группой сравнения, не получавшей иммуносупрессивной терапии, экспрессия антигенов аденовируса достоверно чаще наблюдалась в посттрансплантационном периоде, что подтверждает роль иммуносупрессивной терапии в развитии аденовирусной инфекции [Seralathan G. et al., 2018].

Наиболее тяжелое течение аденовирусной инфекции чаще наблюдалось в раннем посттрансплантационном периоде, сопровождающемся интенсивной иммуносупрессивной терапией [Lee B. et al., 2018]. Результаты нашего исследования подтвердили связь возраста пациентов и сроков после трансплантации почки с тяжестью вирусного поражения: из 43 случаев вирусного нефрита потеря трансплантата отмечалась у 4 детей от 2 до 6 лет и 1 взрослого пациента, причем у детей потеря трансплантата наступала в первые месяцы после операции.

При микроскопическом исследовании в биоптатах удаленных аллотрансплантатов отмечались морфологические признаки вирусного нефрита [Rady K. et al., 2014; Masutani K. et al., 2018]: некроз тубулярного эпителия, изменения ядер эпителиоцитов, зоны кровоизлияний, стазы эритроцитов в сосудах микроциркуляторного русла. Во многих участках данные изменения были стерты за счет распространенных некротических изменений коркового и мозгового вещества. При ИГХ-исследовании аденовирус и ВПГ 1 встречались в следовых количествах. В сосудах микроциркуляторного русла C4d+ депозиты не определялись, что опровергло подозрение на течение активного антитело-опосредованного отторжения. Изменения были расценены как проявления аденовирусной инфекции в аллотрансплантате. Выраженная в 4 случаях и умеренная в 1 случае экспрессия антител к CD3 и незначительная экспрессия антител к CD20 в 4 случаях из 5 в сочетании с репликацией ВПГ I типа свидетельствуют о снижении реактивности иммунного ответа.

При микроскопическом исследовании в пункционных биоптатах у всех 5-ти пациентов отмечалось наличие морфологических признаков, типичных для тяжелого течения аденовирусного нефрита: наличие внутриядерных включений вирусных телец; повреждение эпителия канальцев с разрушением базальных мембран и фокусами некроза; лимфоцитарная и плазмоцитарная клеточная

инфильтрация, в отдельных случаях с формированием гранулем; фокальные интерстициальные кровоизлияния, внутриканальцевые скопления эритроцитов (рис. 2а,б).

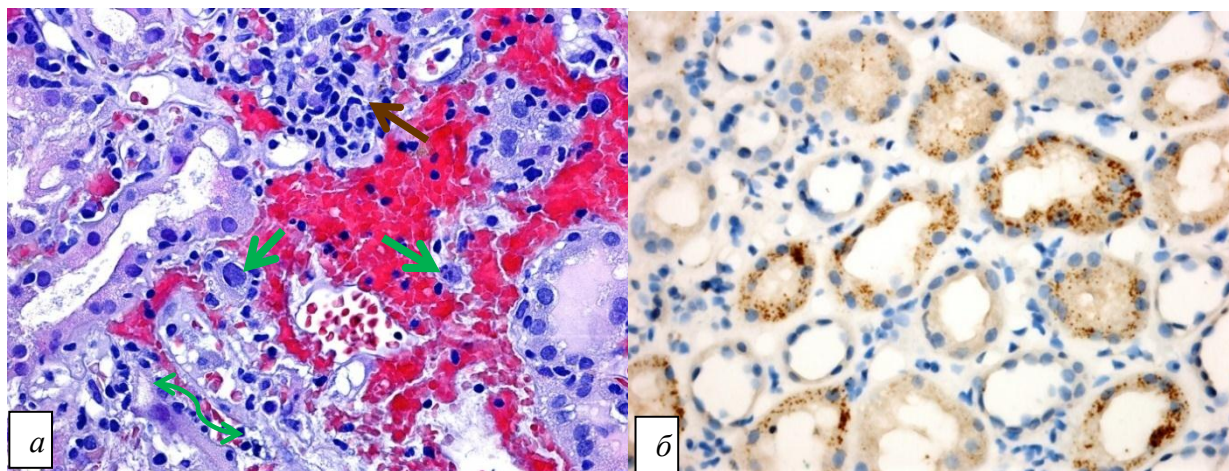


Рисунок 2. Морфологические и ИГХ изменения при аденовирусном нефрите

а – изменения ядер (крупные гиперхромные ядра с внутриядерными включениями (↖)), воспалительная инфильтрация интерстиция, кровоизлияния, гранулемоподобные структуры (↗), очаги некроза и регенераторные изменения эпителия канальцев (↘), х400, окраска гематоксилином и эозином, б – частицы аденовируса в эпителии почечных канальцев, х 400, иммуногистохимическое окрашивание с антителами к аденовирусу.

Герпес-вирусная инфекция

Трактовку роли ВПГ в развитии нефрита осложняло то, что у большинства пациентов с ВПГ-инфекцией одновременно выявлялись антитела к аденовирусам. ИГХ-исследование подтвердило широкую распространенность ВПГ в популяции: экспрессия антител к ВПГ-1, от слабой до значительной, была обнаружена в 50 (42,4%) биоптатах, в 8 (6,8%) биоптатах определялась незначительная экспрессия ВПГ-2, однако достоверная связь частоты выявления ВПГ с развитием морфологических изменений не была установлена. Экспрессия антигенов ВПГ-1 отмечалась у иммунокомпромитированных пациентов с тяжелым течением вирус-индуцированного нефрита с потерей трансплантата, что подтверждает данные о реактивации ВПГ в посттрансплантационном периоде, однако при сопоставлении результатов исследования биоптатов почек реципиентов с группой сравнения, не подвергавшейся иммуносупрессивной терапии, значимых различий в экспрессии антител к антигенам ВПГ-1 и ВПГ-2 не выявлено ($p > 0,05$).

Морфологических признаков ЭБВ отмечено не было, при ИГХ-исследовании в 100% случаев наблюдалось наличие ядерного антигена вируса ЭБВ, что

подтверждает широкое распространение латентно персистирующего вируса, при ПЦР ДНК вируса ЭБВ с низкой вирусной нагрузкой была выявлена у 6 пациентов. ДНК ЦМВ при ПЦР было выявлено у 9 пациентов, у 1 из них была отмечена экспрессия ЦМВ при ИГХ, сочетавшаяся с неспецифическими морфологическими проявлениями нефрита.

Полиомавирусная нефропатия

При снижении Т-клеточного иммунитета ВК-вирус (Humanpolyomavirus 1) семейства Polyomaviridae, может приводить к развитию полиомавирусной нефропатии трансплантата (ПВН). На ранних стадиях заболевания постановка диагноза ПВН при гистологическом исследовании может представлять сложность из-за возможности очагового поражения паренхимы, неравномерного распространения зон воспалительной инфильтрации и склероза, а также отсутствия патогномоничных внутриядерных включений [Sanders M.L. et al., 2019]. Для уточнения диагноза в нашем исследовании потребовалось сопоставление клинических и гистологических признаков. Ведущую роль сыграл метод ПЦР, при помощи которого ДНК ВК-вируса была выявлена в крови и моче в 19 случаях у 12 пациентов (16% случаев) (рис. 3).

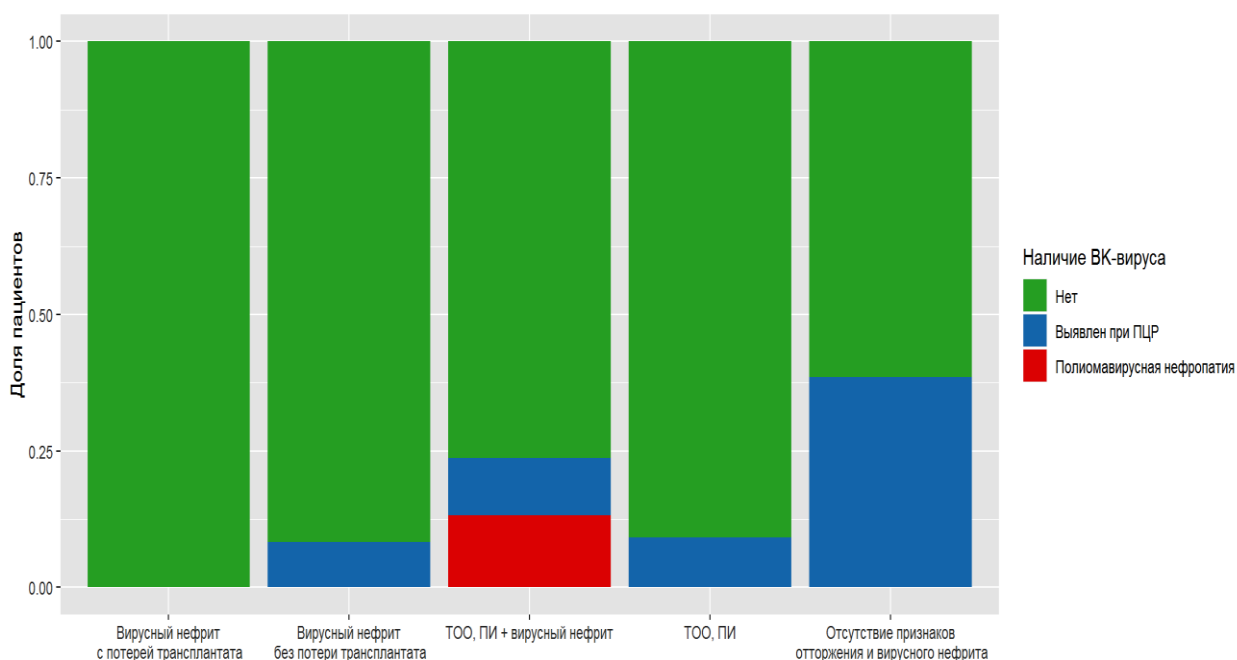


Рисунок 3. Распределение выявления ВК-вируса и ПВН в разных группах (ТОО – Т-клеточно-опосредованное отторжение, ПИ – пограничные изменения)

По данным литературы, при диагностике методом ПЦР на ранних сроках после трансплантации репликация вируса отмечается у 40-50% пациентов, но морфологическая картина ПВН и дисфункция трансплантата наблюдаются значительно реже: в 1–5% случаев [Cimbaluk D. et al., 2009, Lorentzen E.M. et al., 2020]. ПЦР-исследование позволяет обнаружить ДНК вируса в моче раньше, чем в крови, что объясняется тропизмом ВК-вируса к уротелию и может указывать на прогрессирование поражения эпителия канальцев с последующим выходом вируса в кровь при разрушении клеток.

Характерная морфологическая картина ПВН с очагами некроза канальцевого эпителия, наличием внутриядерных аморфных базофильных включений типа «матово-стекловидных» телец, интерстициальным воспалением, склерозом коркового и мозгового вещества почки наблюдалась в 5 биоптатах (4,2% случаев) у 3-х из этих пациентов, что согласуется с высокой чувствительностью ПЦР, позволяющей выявлять слабую репликацию вируса на ранних стадиях, еще не сопровождающихся выраженными гистологическими изменениями [Voan P. et al., 2016].

В то время как острое С4d-позитивное антитело-опосредованное отторжение и острое клеточное отторжение с трансплантационным эндартериитом могут быть легко диагностированы, дифференциальная диагностика ПВН и сопутствующего острого Т-клеточно-опосредованного отторжения тубулоинтерстициального типа довольно трудна [Halloran P. et al., 2013; Menter T. et al., 2013].

Учитывая схожесть морфологических проявлений и диаметрально противоположные подходы к терапии ПВН и острого клеточного отторжения, выявление ведущего звена патологического процесса имеет принципиальное значение для дальнейшего лечения.

Оценка экспрессии антигенов Т- и В-лимфоцитов в биоптатах аллотрансплантатов

При анализе распределения и соотношения экспрессии антигенов Т- и В-лимфоцитов статистически значимая разница выявлялась при сравнении группы нефритов с потерей трансплантата с прочими группами. В *случаях потери трансплантата* наблюдалась выраженная (80%) и умеренная (20%) степень экспрессии маркера Т-лимфоцитов CD3; незначительная (80%) и слабая (20%)

степень экспрессии маркера В-лимфоцитов CD20. В *группе вирус-индуцированного нефрита без потери трансплантата* отмечалось разнообразие значений преимущественно умеренной (55,3%) и слабой (36,8%) степенью экспрессии CD3; слабой (47,4%) и незначительной (34,2%) степенью экспрессии CD20. Наиболее выраженная степень экспрессии антигенов Т- и В-лимфоцитов определялась в *группе сочетания вирус-индуцированного нефрита с отторжением трансплантата*: преобладала умеренная (50%) и выраженная (42,1%) степень экспрессии CD3 и преимущественно слабая (57,9%) степень экспрессии CD20. В *группе отторжения аллотрансплантата* наблюдалась схожая иммуногистохимическая картина: умеренная (56,5%) и выраженная (26,1%) степень экспрессии CD3; слабая (52,2%) и умеренная (30,4%) степень экспрессии CD20. В *группе без признаков вирус-индуцированного нефрита и отторжения* наблюдалась в основном слабая (64,3%) степень экспрессии CD3; экспрессия CD20 – от отрицательной до слабо выраженной.

Несмотря на отсутствие статистически значимых различий, за исключением группы с потерей трансплантата, рассмотрение каждого случая в отдельности подтвердило, что проведение ИГХ-исследования с антителами к Т- и В-лимфоцитам облегчает определение тубулита и оценку интерстициального воспаления, упрощая дифференциальную диагностику острого отторжения, пограничных изменений, вирусного поражения [Storsley L. et al., 2011; Li P. et al., 2019; Moreira C.L. et al., 2019].

Анализ клинических данных

Проводили сопоставление морфологической и ИГХ-картины с результатами лабораторных исследований биоптатов почечных трансплантатов. Отмечалось наличие связи повышения уровня креатинина и протеинурии с неспецифическими морфологическими изменениями. Связи трупного либо родственного типа трансплантата, а также пола пациентов с развитием нефрита и частотой потери трансплантата не обнаружено ($p > 0,05$). Взаимосвязи показателей артериального давления с морфологическими признаками вирус-индуцированного поражения аллотрансплантата также не выявлено ($p = 1$). УЗИ не позволило дифференцировать острое отторжение и вирус-индуцированное поражение трансплантата, хотя выявило ряд изменений аллотрансплантата: увеличение

толщины трансплантата и коркового слоя, расширение чашечно-лоханочной системы, повышение периферического сопротивления в почечных сосудах.

В большей части случаев изменение терапии, опирающееся на результаты морфологических и ИГХ исследований, приводило к улучшению или сохранению функции аллотрансплантата. При ПВН коррекция иммуносупрессивной терапии требовалась во всех случаях. При выявлении аденовирусной этиологии развития интерстициального нефрита в большинстве случаев изменение режима терапии не требовалось, однако в случаях тяжелого течения с потерей аллотрансплантата обнаружение вирусов в ткани трансплантата с помощью ИГХ-исследования позволило существенно изменить терапию. Ухудшение функции трансплантатов в 10,5% случаев в группе вирус-индуцированного нефрита и в 38% случаев из группы сочетания клеточного отторжения с вирус-индуцированным нефритом после усиления иммуносупрессивной терапии не позволяет исключить роли вирусных инфекций в снижении функции трансплантата, а также указывает на сложность подбора иммуносупрессивной терапии у пациентов с сочетанием острого отторжения и вирусной инфекции трансплантата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реципиенты аллотрансплантатов почек разделены на 5 групп с учетом морфологической, иммуногистохимической и клинической картины. При морфологической оценке основное значение имели критерии Banff-классификации «t» и «i». У пациентов с картиной аденовирус-индуцированного нефрита отмечено наличие характерных морфологических изменений: крупные гиперхромные ядра с внутриядерными включениями, гранулемоподобные структуры.

При сравнении результатов морфологического и ИГХ-исследования с антителами к аденовирусу выявлены различия между группой вирус-индуцированного нефрита и прочими группами, что показало эффективность проведения ИГХ-исследования при подозрении на развитие вирус-индуцированного нефрита.

Сравнение результатов ИГХ-исследования биоптатов трансплантатов с биоптатами почек до назначения иммуносупрессивной терапии подтвердило роль иммуносупрессии в развитии аденовирусной инфекции в посттрансплантационном периоде.

ИГХ-исследование выявило широкую распространенность ВПГ в популяции. Высокая экспрессия антигенов ВПГ-1 отмечена у пациентов из группы вирус-индуцированного нефрита с потерей трансплантата.

При выявлении ДНК ЦМВ методом ПЦР морфологические изменения в биоптатах аллотрансплантатов не обнаружены. Выявление ДНК полиомавируса в крови и моче при помощи ПЦР позволило не только поставить диагноз полиомавирусной нефропатии, но и, в ряде случаев, определить репликацию ДНК полиомавируса в ранние сроки, до развития морфологической картины.

ИГХ-исследование с антителами к С4d эффективно при дифференциальной диагностике не только гуморального и клеточного отторжения, но и при подозрении на вирус-индуцированное поражение аллотрансплантата, морфологическая картина которого может напоминать антитело-опосредованное отторжение.

При ИГХ-исследовании с антителами к Т- и В-лимфоцитам в группе вирусного нефрита с потерей трансплантата наблюдали выраженную степень экспрессии CD3 и незначительную – CD20. ИГХ-исследование с антителами к Т- и В-лимфоцитам улучшает оценку распространенности интерстициального воспаления и определение степени тубулита, на выявлении которой основана постановка диагноза «пограничные изменения».

Морфологическое и ИГХ-исследование биоптатов трансплантатов необходимо для эффективной коррекции иммуносупрессивной терапии у пациентов с сочетанием острого отторжения и вирусной инфекции трансплантата. Таким образом, при подозрении на вирус-индуцированный нефрит целесообразно сочетать морфологическое исследование с иммуногистохимическим и оценкой комплекса клинических данных.

ВЫВОДЫ

1. Установлены морфологические изменения, характерные для вирусного нефрита (внутриядерные включения вирусных частиц, гранулемоподобные структуры). Выявлены статистически значимые различия частоты морфологических изменений между группами вирусного нефрита с потерей трансплантата и без потери по сравнению с группой острого отторжения

- трансплантата и группой сочетанного течения отторжения и вирус-индуцированного нефрита.
2. Показана более выраженная экспрессия антигенов аденовируса в аллотрансплантатах пациентов в группе вирус-индуцированного нефрита без потери аллотрансплантата по сравнению со следующими группами: острого отторжения трансплантата; сочетанного течения отторжения и нефрита; группы без морфологических проявлений.
 3. При ИГХ-исследовании антигены вируса простого герпеса I типа обнаружены в биоптатах аллотрансплантатов в 42,4%, вируса простого герпеса II типа в незначительном количестве – в 6,8%, цитомегаловируса – в 0,8% случаев. Достоверная связь выявления вирусов простого герпеса I и II типов и цитомегаловируса с развитием морфологических изменений не установлена.
 4. Показана необходимость определения ДНК полиомавируса методом ПЦР в крови и моче пациентов при дифференциальной диагностике сочетанного течения полиомавирусной нефропатии и острого отторжения почечного трансплантата: репликация полиомавируса выявлена при отсутствии характерных для полиомавирусной нефропатии морфологических изменений в 73,7% случаев.
 5. Оценка экспрессии антигенов Т- и В-лимфоцитов выявила значимую разницу при сравнении группы нефрита с потерей трансплантата и прочих групп. Достоверного различия экспрессии антигенов Т- и В-лимфоцитов между группами с отторжением аллотрансплантата и вирус-индуцированного нефрита не обнаружено, что не позволяет рекомендовать использование этого признака для дифференциальной диагностики.
 6. Тип аллотрансплантата (родственный или трупный) не оказывает влияния на частоту его потери и развитие таких осложнений, как нефрит и острое отторжение. Взаимосвязь вирусного поражения и возраста отмечена в группе нефрита с потерей трансплантата. В прочих группах достоверной связи между возрастом, а также полом и значением артериального давления с морфологическими признаками поражения трансплантата не выявлено.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук

1. **Соловьёва С.Е.**, Пальцева Е.М., Морозова М.М. Морфологическая диагностика вирусного поражения почечного трансплантата // Архив патологии. – 2016;3(78): 57-63.
2. Крайник Н.А., Садовников В.И., Платова Е.Н., Сандриков В.А., Пальцева Е.М., Морозова М.М., **Соловьёва С.Е.** Возможности ультразвуковой диагностики редкого осложнения – аденовирусного поражения почечного аллотрансплантата // Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2016;2: 17-26.
3. **Соловьёва С.Е.**, Пальцева Е.М., Морозова М.М., Каабак М.М., Крайник Н.А., Матвеев А.В. Клинико-морфологические признаки вирусного поражения почечного трансплантата. // Архив патологии. 2017;79(2): 22-28.
4. **Соловьёва С.Е.**, Пальцева Е.М., Морозова М.М., Зокоев А.К. Полиомавирусная нефропатия в сочетании с острым отторжением почечного трансплантата. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2019;1 (29) – 27-31.

Другие публикации

5. **Соловьёва С.Е.**, Пальцева Е.М., Морозова М.М., Крайник Н.А. Клинико-морфологические корреляции при вирусном поражении почечного трансплантата // Научная конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Сборник научных трудов. – Москва, 2016. – С. 168-169.
6. **Соловьёва С.Е.**, Пальцева Е.М., Морозова М.М. Применение иммуногистохимии для диагностики острого отторжения и вирусного поражения трансплантата почки // Материалы V съезда российского общества патологоанатомов с международным участием. – Челябинск, 2017. – С. 307.

7. **Соловьёва С.Е.,** Пальцева Е.М., Морозова М.М. Сопоставление морфологических и иммуногистохимических данных при вирусном поражении и остром отторжении трансплантата почки. // Сборник научных трудов. Всероссийской конференции молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии» – Рязань, 2017 г. – С.196.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВПГ-1 – вирус простого герпеса I типа
ВПГ-2 – вирус простого герпеса II типа
ИГХ – иммуногистохимическое исследование
МСВ – микрососудистое воспаление
ПБТ – пункционная биопсия трансплантата
ПВН – полиомавирусная нефропатия
ПИ – пограничные изменения
ПТК – перитубулярные капилляры
ЦМВ – цитомегаловирус
ЭБВ – Эпштейн-Барр вирус

Соискатель

С.Е. Соловьёва