

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ  
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. ШУМАКОВА»

На правах рукописи

МАМЕДОВА АНАСТАСИЯ АЛЕКСЕЕВНА

**ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА БЕТА-1  
ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ:  
АНАЛИЗ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ**

3.1.14 – трансплантология и искусственные органы

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель  
доктор медицинских наук,  
профессор  
ШЕВЧЕНКО ОЛЬГА ПАВЛОВНА

Москва – 2024

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

	Страница
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>ГЛАВА 1. ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА БЕТА-1 У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧКИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)</b>	12
1.1 Биологическая роль TGF- $\beta$ и Smad в развитии патологических процессов	12
1.2 TGF- $\beta$ 1 у реципиентов солидных органов	21
1.3 Плейотропный цитокин TGF- $\beta$ 1 в развитии патологий почечного трансплантата	26
1.4 TGF- $\beta$ 1 и иммуносупрессивная терапия	29
1.5 Терапевтический потенциал TGF- $\beta$ 1	31
1.6 Заключение	34
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	36
2.1 Характеристика пациентов, включенных в исследование	36
2.2 Методы обследования пациентов	36
2.3 Определение концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови	38
2.4 Гистологическое и иммуногистохимическое исследование биоптатов трансплантированной почки	39
2.5 Определение диагностической значимости лабораторного теста	43
2.6 Статистическая обработка результатов исследования	44

<b>ГЛАВА 3. АНАЛИЗ УРОВНЯ TGF-<math>\beta</math>1 У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧКИ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ</b>	<b>45</b>
3.1 Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование	45
3.2 Сравнительная оценка концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови реципиентов почки и здоровых лиц	47
3.3 Анализ связи концентрации TGF- $\beta$ 1 с клинико-демографическими данными реципиентов почки	48
3.4 Анализ связи концентрации TGF- $\beta$ 1 с величиной лабораторных показателей реципиентов почки	50
<b>ГЛАВА 4. АНАЛИЗ КОНЦЕНТРАЦИЙ TGF-<math>\beta</math>1 ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ПУНКЦИОННЫХ БИОПТАТОВ АЛЛОТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПОЧКИ</b>	<b>59</b>
4.1 Анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови и лабораторных показателей функции почек у реципиентов с дисфункцией нефротрансплантата и у реципиентов с нормальной функцией	60
4.2 Характеристика вариантов патологии трансплантата, выявленной по результатам морфологических исследований биопсийного материала, у реципиентов с дисфункцией трансплантированной почки	62
4.3 Сравнительный анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови реципиентов с гистологическими и иммуногистохимическими признаками патологии нефротрансплантата	65

<b>ГЛАВА 5. АНАЛИЗ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ УРОВНЯ TGF-<math>\beta</math>1 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ РЕЦИПИЕНТОВ С ДИСФУНКЦИЕЙ ТРАНСПЛАНТАТА, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ИММУННЫМИ МЕХАНИЗМАМИ</b>	<b>67</b>
5.1 Сравнительный анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 у реципиентов с повреждением нефротрансплантата иммунной и иной природы.	68
5.2 Сравнительный анализ классических лабораторных параметров функции почек у реципиентов с повреждениями трансплантата иммунной и неиммунной природы	69
5.3 Анализ диагностической значимости TGF- $\beta$ 1 для выявления реципиентов почки с дисфункцией трансплантата, обусловленной иммунными механизмами	73
<b>ОБСУЖДЕНИЕ</b>	<b>76</b>
<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>82</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b>	<b>84</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	<b>85</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>87</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Хроническая болезнь почек (ХБП) характеризуется высокой распространенностью во всем мире и относится к числу заболеваний с глубокими социально-экономическими последствиями [1]. Ключевую роль в прогрессировании ХБП играют интерстициальный фиброз и гломерулосклероз, что в итоге приводит к терминальной стадии почечной недостаточности [2]. Трансплантация почки – радикальный и наиболее эффективный способ лечения терминальной стадии ХБП [3]. Ежегодно число трансплантаций почки в мире неуклонно возрастает. Только в РФ в 2023 году было выполнено более 1640 трансплантации [4]. Однако, несмотря на высокую эффективность трансплантации почки, риск развития дисфункции трансплантата сохраняется на протяжении всей последующей жизни реципиента.

От характера повреждения трансплантата зависят подходы к терапии. Объективным методом верификации патологии трансплантированного органа является биопсия, выполнение которой сопряжено с ограничениями и рисками инвазивных вмешательств, которые могут привести не только к нарушению функции органа, но и трансплантатэктомии[5]. В связи с этим, одной из актуальных задач в трансплантологии является поиск малоинвазивных методов диагностики, которые с помощью специфичных биомаркеров или аналитов помогут диагностировать осложнения в различные периоды после трансплантации [6]. Ведется постоянный поиск специфичных биомаркеров, сигнализирующих не только о развитии патологии трансплантированной почки, но и о природе или степени повреждения органа [7].

К числу факторов, регулирующих взаимоотношения организма реципиента и трансплантата, относится трансформирующий фактор роста бета-1 (TGF- $\beta$ 1), оказывающий многообразные эффекты: обладает противовоспалительным действием, участвует в развитии иммунной толерантности, а также играет

ключевую роль в синтезе белков внеклеточного матрикса, что приводит к гиперпролиферации фибробластов и избыточному накоплению коллагена. В свою очередь коллаген является основным компонентом фиброзной ткани, избыточное накопление которой приводит к необратимой функциональной деградации органа [8].

Оценка уровня концентрации TGF- $\beta$ 1 в крови реципиентов почки может быть полезной для совершенствования уже существующих методов диагностики отторжения и фиброза, где TGF- $\beta$ 1 может выступать индикатором патологического процесса и иметь практическое значение при выборе тактики лечения.

### **Цель исследования**

Определить клиническое значение концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови при трансплантации почки, в том числе при развитии дисфункции нефротрансплантата, с целью повышения эффективности обследования и лечения реципиентов.

### **Задачи исследования**

1. Охарактеризовать концентрацию TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови реципиентов почки и здоровых лиц; оценить ее связь с клиническими и лабораторными показателями.
2. Провести сравнительный анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 у реципиентов почки с дисфункцией трансплантата и без таковой.
3. Провести сравнительный анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 у реципиентов почки с дисфункцией трансплантата различной этиологии, верифицированной по данным исследования биопсийного материала, и у реципиентов с нормальной функцией трансплантата.

4. Провести сравнительный анализ концентрации TGF- $\beta$ 1, рутинных лабораторных показателей крови и мочи, отражающих функцию почек у реципиентов с дисфункцией нефротрансплантата, вызванной иммунными (острое клеточное, острое гуморальное, хроническое отторжение) и неиммунными (острый канальцевый некроз, интерстициальный фиброз с признаками нефротоксичности ингибиторов кальциневрина) механизмами.

5. Определить диагностическую значимость TGF- $\beta$ 1 при дисфункции нефротрансплантата.

### **Научная новизна**

Новыми являются данные о связи концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови реципиентов почки с объективными лабораторными параметрами функции почек (клиническим и биохимическим анализом крови, общим анализом мочи, скоростью клубочковой фильтрации и др.)

Впервые выявлена и охарактеризована связь повышения концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови реципиентов с дисфункцией трансплантированной почки, вызванной острым клеточным, острым гуморальным и хроническим отторжением.

Новыми являются данные о диагностической значимости измерения концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови для выявления реципиентов с дисфункцией нефротрансплантата, обусловленной острым и хроническим отторжением; и диагностической эффективности теста на TGF- $\beta$ 1 в отношении выявления риска развития дисфункции нефротрансплантата, обусловленной иммунными механизмами.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Данные о концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови реципиентов почки и связи этого показателя с клиническими и лабораторными признаками

дисфункции нефротрансплантата указывают на участие TGF- $\beta$ 1 в развитии посттрансплантационных осложнений и могут быть использованы для прогноза результатов трансплантации почки. Выявленная связь концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови реципиентов почек с наличием острого клеточного, острого гуморального и хронического отторжения указывает на участие цитокина TGF- $\beta$ 1 в иммунном механизме повреждения трансплантата и может иметь перспективу использования для коррекции лечения при осложнениях посттрансплантационного периода.

Определение концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови может быть использовано в качестве скринингового лабораторного теста, для выявления пациентов с высоким риском осложнений иммунологической природы.

Перспективы практического использования имеет рассчитанная диагностически значимая пороговая концентрация TGF- $\beta$ 1 при развитии острого и хронического отторжения трансплантата.

### **Методология и методы исследования**

В работе представлен анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови реципиентов трансплантированной почки, оперированных в период с 1999 по 2022 год. Образцы крови забирались в утренние часы натощак, в день получения образцов для других клинических лабораторных исследований. Полученные образцы крови немедленно замораживались в морозильной камере (- 40 C°), где хранились до проведения анализа.

Морфологическую верификацию патологий аллотрансплантированной почки осуществляли путём исследования биопсийного материала иммуногистохимическим и микроскопическим методами.

Валидизация и оценка диагностических характеристик лабораторного теста проводилась с помощью ROC-анализа, определения порогового значения, чувствительности, специфичности, позитивной и негативной предсказательной

значимости, диагностической эффективности. Статистический анализ и интерпретация полученных результатов производились с использованием непараметрических методов статистики, исходя из характеристики распределения значений исследуемых величин.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Концентрация TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови реципиентов почки выше, чем у здоровых лиц; у реципиентов с дисфункцией нефротрансплантата достоверно выше, чем у реципиентов без таковой.

2. В отличие от рутинных лабораторных показателей (уровня креатинина и мочевины в крови, белка в моче, СКФ), концентрация TGF- $\beta$ 1 в сыворотке кровисвязана с этиологией дисфункции трансплантированной почки.

3. Измерение концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови обладает диагностической эффективностью в отношении выявления реципиентов почки с дисфункцией трансплантата, обусловленной механизмами острого и хронического отторжения.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов определяется объёмом проведённых исследований (129 образцов сыворотки крови, полученные от реципиентов почки в различные сроки после трансплантации) с использованием современных и стандартизированных методов исследования и статистической обработки.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России на осуществление научных исследований и разработок по теме: «Биомаркеры фиброза трансплантированной почки: клинические, морфологические, биохимические корреляции и роль в улучшении отдалённого прогноза реципиентов» (2021-2023 гг.).

Апробация работы состоялась 10 сентября 2024 года на совместной конференции научных и клинических подразделений федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедры трансплантологии и искусственных органов Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова).

Основные результаты работы доложены и обсуждены на: Юбилейном XII Всероссийском съезде трансплантологов с международным участием (Москва, 30 сентября – 2 октября 2024 г.), VI Российском национальном конгрессе с международным участием «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 25-27 сентября 2023 г.)

### **Внедрение в практику**

Результаты исследования используются в клинико-диагностической лаборатории и лаборатории иммунологического мониторинга, хирургическом отделении №1, в отделе регуляторных механизмов в трансплантологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также в учебном процессе на кафедре трансплантологии и искусственных органов Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

### **Личный вклад автора**

Автор принимала непосредственное участие в разработке концепции и постановке задач исследования; самостоятельно осуществляла сбор материала для исследования, выполняла определение концентрации TGF- $\beta$ 1 методом ИФА. Автором самостоятельно сформирована база данных, проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, из них 3 статьи в российских журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

### **Объем и структура работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной характеристике пациентов и методам исследования, 3 глав результатов собственных исследований, обсуждения, 5 выводов, практических рекомендаций и указателя используемой литературы, включающего 138 источников, из них 13 отечественных и 125 зарубежных. Работа изложена на 103 страницах машинописного текста, иллюстрирована 16 таблицами и 16 рисунками.

# ГЛАВА 1. ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА БЕТА-1 У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧКИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1 Биологическая роль TGF- $\beta$ 1 и Smad в развитии патологических процессов

Трансформирующий фактор роста-бета 1 (TGF- $\beta$ 1) является одним из основателей суперсемейства белков трансформирующего ростового фактора. Суперсемейство TGF- $\beta$  включает в себя большое количество регуляторных белков, таких как костные морфогенетические белки (BMP), факторы дифференцировки роста (GDF), ингибирующее вещество Мюллера (MIS), а также активины (ACT) и ингибрины (INH) [9]. Зрелая молекула TGF- $\beta$ 1 –относится к группе цитокинов и состоит из двух субъединиц размером в 12,5 кДа, соединенных между собой дисульфидной связью. В настоящее время известно три изоформы TGF- $\beta$ 1 (наиболее распространенный), TGF- $\beta$ 2 и TGF- $\beta$ 3 [10]. Секретируется TGF- $\beta$  в форме предшественника, связанного с пропептидом (LAP), и активируется в присутствии различных молекул, таких как тромбоспондин-1, интегрины, матриксные металлопротеиназы (MMPs), костный морфогенетический 1 (BMP-1) и активные формы кислорода (АФК) [11].

TGF- $\beta$ 1 экспрессируется в эндотелиальных, гемопоэтических и соединительных тканях, оказывает множество иммунологических эффектов за счет продукции цитокина Т-лимфоцитами; TGF- $\beta$ 2 экспрессируется в основном в эпителиальных, соединительных и нейронных тканях, участвует в развитии иммунной толерантности и подавляет активацию макрофагов; TGF- $\beta$ 3 обладает преимущественно антифибротическим эффектом и чаще встречается в мезенхимальных клетках [12]. Несмотря на то, что все изоформы TGF- $\beta$  гомологичны по своей аминокислотной последовательности, накопленные литературные данные указывают на их различные биологические свойства: TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 реализуют в основном профибротические эффекты, а TGF- $\beta$ 3 – напротив, охарактеризован как антифибротический маркер [13].

Реализация эффектов TGF- $\beta$  происходит через внутриклеточную передачу сигнала путем связывания с рецепторными комплексами TGF $\beta$ RI, -II и -III, после взаимодействия с рецепторами, TGF- $\beta$  запускает активацию сигнальных путей, таких как Smad-зависимые и Smad-независимые [14].

Smad – цитоплазматические белки принадлежащие к факторам транскрипции, которые участвуют в реализации биологического действия TGF- $\beta$  и активируются при развитии широкого круга патологических процессов [14].

На данный момент известны три класса факторов транскрипции Smads: общие Smads (Co-Smads), регулируемые рецепторами Smads (R-Smads) и ингибирующие Smads (I-Smads). Активированный рецептор TGF $\beta$ RI фосфорилирует Smad2 и Smad3 (R-Smads) затем они связывается со Smad4 (Co-Smads) с образованием гетеро-олигомерного комплекса R-Smad/Co-Smad, он транслоцируется в ядро клетки для регуляции транскрипции генов-мишеней. Белки I-Smads конкурируют с белками R-Smads, образующийся комплекс I-Smads/Co-Smad функционирует как репрессор транскрипции [15]. Помимо канонического пути Smad, TGF- $\beta$  может активировать другие пути передачи сигнала, включая митоген-активированную протеинкиназу (МАРК) и фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K) [15].

Следует отметить что, Smad2 и Smad3 являются ключевыми посредниками в развитии фиброза почек, многие фиброгенные гены становятся мишенями при активации TGF- $\beta$ / Smad3. Профибротический эффект Smad3 проявляется увеличением синтеза коллагена и запускает эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) в здоровых тканях почки; в свою очередь Smad7 осуществляют защитные функции и является ингибитором Smad3, взаимодействуя с TGF- $\beta$  разрушает рецептор TGF $\beta$ RI прерывая сигнализацию и таким образом блокирует воспаление и фиброз [16].

Сигнальный путь TGF- $\beta$ /Smad3 воспринимается как главный индуктор экспрессии генов ответственных за развитие фиброза, это создаёт предпосылки

рассматривать TGF- $\beta$  и факторы транскрипции Smad в качестве конкретных мишеней для терапии [17].

Активная форма TGF- $\beta$ 1 влияет на процессы пролиферации и дифференцировки благодаря возможности накапливать белки внеклеточного матрикса в структуре клеток. Изоформы TGF- $\beta$  обладают способностью запускать экспрессию фибриллярных белков – коллагена, эластина и фибронектина в мезенхимальных клетках, а также стимулировать выработку ингибиторов протеазы, которые блокируют расщепление белков внеклеточного матрикса (ECM). К основным иммуногистохимическим признакам того, что в тканях реализуется процесс эпителиально-мезенхимального перехода, можно отнести потерю эпителиальными клетками E-кадгерина и цитокератина, и повышенную экспрессию фибробластоспецифического белка 1/S100A4, виментина и  $\alpha$ -гладкого мышечного актина. Накопление этих продуктов приводит к изменению структуры цитоскелета, утрате клетками эпителиальных свойств и, как следствие, приобретению мезенхимальных [18, 19]. Таким образом, активация TGF- $\beta$  способствует пролиферации фибробластов с последующим преобразованием в миофибробласты, избыточному накоплению белков внеклеточного матрикса и ингибированию распада коллагена, что является ключевым механизмом фиброзирования [20].

Исходя из этого, многообразие эффектов TGF- $\beta$  может быть обусловлено изменчивостью активированных каскадов реакций в различных типах клеток и влиянием других регуляторных молекул.

### ***Участие TGF- $\beta$ 1 в иммунном ответе***

Плейотропный цитокин TGF- $\beta$ 1 вносит существенный вклад в регуляцию иммунного ответа. При этом действие TGF- $\beta$ 1 может быть разнонаправленным: в одних случаях TGF- $\beta$ 1 ингибирует воспалительные реакции и дифференцировку T-клеток, в других – выступает мощным стимулятором пролиферации T-

клеточного звена иммунитета, способствуя накоплению иммунореактивных клеток в различных органах и тканях.

Следует отметить, что основной изоформой, представленной в иммунной системе, является TGF- $\beta$ 1. Данный цитокин высвобождается и взаимодействует почти со всеми иммунными клетками, регулируя как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ [21].

После активации TGF- $\beta$  связывается с одноимённым рецептором II типа TGF $\beta$ RII, который в свою очередь запускает рецептор I типа TGF $\beta$ RI, что в итоге приводит к фосфорилированию R-Smad. В области связки TGF- $\beta$ , Smad2/3 при стандартном пути активации образует комплекс Smad4, который должен быть транслоцирован в ядро для регулирования целевых генов. В ряде экспериментальных исследований на мышах показано, что селективное удаление рецептора TGF $\beta$ RI, TGF $\beta$ RII или Smad2/3 в Т-клетках приводит к комплексной активации Т-клеток, системному воспалению и ранней гибели всех экспериментальных животных [22, 23].

TGF- $\beta$  играет значимую роль в регуляции гомеостаза CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Известно, что TGF- $\beta$  ингибирует дифференцировку Т-хелперов Th1 и Th2, но способствует генерации клеток Th17, клеток Th9 и Tregs [24, 25]. Дифференцировка клеток Th1 обусловлена IL-12, который экспрессируется миелоидными клетками, и провоцирует Т-клетки, воспроизводить больше IFN- $\gamma$  и фактора транскрипции T-bet [26]. TGF- $\beta$ , блокирует дифференцировку клеток Th1, за счет ингибирования фактора транскрипции T-bet или опосредованно, ингибируя выработку IFN- $\gamma$  естественными киллерами, однако, есть данные о том, что TGF- $\beta$  при объединении с IL-4 и IFN- $\gamma$ , усиливает генерацию клеток CD103<sup>+</sup> Th1 [27].

Регуляция дифференцировки Th2 хелперов, осуществляется за счёт ингибирования цитокином TGF- $\beta$  одного из факторов транскрипции GATA3, который играет важную роль в пролиферации и дифференцировке различных

типов клеток [28]. В исследованиях *in vivo*, на мышах, нарушение сигнала TGF- $\beta$  в Т-лимфоцитах, направляло дифференцировку к клеткам с фенотипом Th1, а дополнительная потеря фактора транскрипции T-bet, вела к усиленной дифференцировке клеток с фенотипом Th2, и как следствие, к полиорганному воспалению [29].

Значимым является вклад TGF- $\beta$  в подавление аутоиммунных реакций, хотя механизм реализации подобных эффектов изучен не до конца. Известные данные позволяют предположить, что TGF- $\beta$  принимает участие в регуляции наивных Т-лимфоцитов nTregs и активированных Т-лимфоцитов iTregs, увеличивая экспрессию фактора транскрипции Foxp3[30].

Как отмечалось выше, эффекты TGF- $\beta$  зависят от условий их реализации, и если в одних случаях TGF- $\beta$  блокирует или подавляет пролиферацию, то в других – выступает стимулятором провоспалительных реакций.

Фундаментальную роль TGF- $\beta$  играет в индукции Th17 - CD4+ Т-хелперов через фактор транскрипции ROR $\gamma$ t, активированные Th17 - продуцируют серию специфических интерлейкинов IL-17A, IL-17F и IL-22, IL-21 участвующих в воспалении. Некоторые данные свидетельствуют о том что разнонаправленность эффектов TGF- $\beta$  связана с концентрацией, низкие концентрации блокируют рецептор IL-23 и запускают активацию Foxp3, высокие концентрации TGF- $\beta$  в сочетании с IL-6 и IL-21, приводит к активации IL-23 и дифференцировке в направлении Th17 - CD4+ Т хелперов[31].

Как и в случае с Th17, TGF- $\beta$  является ключевым фактором в дифференцировке Th9 хелперов продуцирующих IL-9, который занимает не последнее место в запуске аллергических реакции и противоопухолевом иммунитете [32].

**Таблица 1 – Влияние TGF-β1 на T-клеточное звено иммунитета**

Цитокин	Факторы транскрипции	Дифференцировка клеток	Эффекты	
<b>TGF-β1</b>	T-bet	Th1	<b>Противо-воспалительный</b>	<i>регуляция клеточного звена иммунитета</i>
	GATA3	Th2		<i>регуляция гуморального звена иммунитета</i>
	FOXP3	Tregs		<i>- регулирование дифференцировки Th1/Th2 - фиброз</i>
	RORγt	Th17	<b>Про-воспалительный</b>	<i>воспаление, аутоиммунные и аллергические реакции</i>
	PU.1	Th9		<i>воспаление, аллергические реакции</i>

Регуляция T-клеточного звена иммунитета – сложнейший высокоорганизованный процесс, который ещё не до конца изучен. Активация, пролиферация и дифференцировка иммунных клеток, зависит от высокоточных сигналов специфичных цитокинов, и TGF-β в этом процессе играет решающую роль. Комбинация TGF-β с различными интерлейкинами, формирует предпосылки для реализации множества эффектов в иммунной системе и открывает большое поле для дальнейших исследований.

***Связь TGF-β с биомаркерами посттрансплантационных осложнений:  
микроРНК***

Современные исследования показали перспективность применения малых некодирующих РНК (микроРНК), в качестве биомаркеров посттрансплантационных осложнений. Группа молекул длиной около 22 нуклеотидов циркулирует в биологических средах организма и влияет на экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Активное участие микроРНК во всех процессах организма, даёт возможность рассматривать данный класс сигнальных молекул в качестве малоинвазивных маркеров для диагностики патологий трансплантата. Определение экспрессии специфичных микроРНК в тканях может предоставить клинически значимую информацию о текущем состоянии органа и применяться для мониторинга функции трансплантата [33,34].

Недавние исследования выделили целый ряд микроРНК, которые участвуют в реакции иммунного ответа и развитии структурных изменений трансплантированных органов (фиброза и отторжения). Анализ механизмов действия данных микроРНК в большинстве случаев был связан с сигнальными путями TGF- $\beta$ 1.

Описаны микроРНК, участвующие в воспалении и фиброгенезе почек. Например, при заболеваниях почек miR-21, miR-93, miR-192, miR-216a, miR-377, miR-29 и miR-200 регулируются TGF- $\beta$ 1 через Smad3 механизм [35].

Так же Zhang X.L. с соавт. продемонстрировал в своём исследовании что miR-27 уменьшает повреждения кардиомиоцитов после ишемии, за счёт подавления клеточного апоптоза и ингибирования рецептора TGF $\beta$ RI.

В исследовании Wang X. H. с соавт. описано влияние miR-27 на мышечные атрофии и то, что сигнальный путь TGF- $\beta$  провоцирует мышечное истощение, однако увеличение экспрессии miR-27 снижает миостатин и увеличивает клеточную пролиферацию, что положительно сказывается на регенерации миоцитов [36].

Исследование Suzuki H.I. и соавт. в экспериментах на мышах, показало участие miR-27 в индуцированном TGF- $\beta$  мезенхимальном замещении клеток поджелудочной железы [37].

Участие miR-27 в механизмах развития фиброза миокарда, а также формирование иммунного ответа через влияние на TGF- $\beta$  отражает перспективность последнего в качестве маркера структурных изменений трансплантированных органов. В более ранних исследованиях наличие гистологических признаков фиброза миокарда трансплантированного сердца ассоциировано со сверхэкспрессией miR-27 и -339 в плазме крови реципиентов [38]. Так же у реципиентов сердца с острым клеточным отторжением отмечается значимое снижение уровня miR-27 по сравнению с реципиентами без признаков осложнений [39].

Некоторые исследования с miR-192 показывают, что микроРНК является посредником в патогенезе почечного фиброза. Smad3 взаимодействует с промоторной областью miR-192 и индуцирует его экспрессию. Дезактивация Smad3 блокирует TGF- $\beta$ 1-индуцированную экспрессию miR-192 и фиброз почек [40].

Так же исследована функциональная роль miR-29 в патогенезе развития фиброза почек у мышей. В эпителиальных клетках почки Smad3 путем связывания с промотором miR-29 блокировал его, это приводило к прогрессированию почечного фиброза и развитию нефропатии, однако сверхэкспрессия miR-29 практически блокировала TGF- $\beta$ 1-индуцированный синтез коллагена I и III [41].

В работе Cuiqiong W. с соавт. показали, что miR-101 с помощью сигнального пути TGF- $\beta$  участвует в патогенезе фиброза печени. miR-101 регулирует активацию звездчатых клеток печени через TGF- $\beta$  и ингибирует фиброз [42].

Недавние исследования Li X. [43] показало, что miR-101 блокирует сигнальный путь TGF- $\beta$ 1 / Smad2 путем подавления RUNX1, в результате улучшаются функциональные показатели сердца и уменьшается фиброз после индуцированного инфаркта миокарда, что подтверждает кардиопротективное влияние miR- 101.

В исследовании Patel V. и Nouredine L. изучалась роль микроРНК в патогенезе фиброза почек в экспериментах на мышах. Было показано, miR-21, miR-200 и miR-29 с помощью сигнального пути TGF- $\beta$  влияют на развитие фиброза разнообразно. Повышенная экспрессия miR-21 усиливает сигнализацию TGF- $\beta$  и способствует развитию фиброза. И наоборот, miR-200 и miR-29 уменьшают фиброз, ингибируя эпителиально-мезенхимальный переход, снижает отложение внеклеточного матрикса [44].

В настоящее время имеется множество доказательств, что конкретное влияние Smad3-зависимых микроРНК, связанных с фиброгенезом или воспалением, является возможно одним из лучших терапевтических подходов для борьбы с посттрансплантационными осложнениями [45].

### *Галектин - 3*

Главной целью трансплантологии является наиболее длительное выживание трансплантата. Наличие хронического воспаления приводит к сокращению времени функционирования трансплантата и прогрессированию фиброза. Совместно с TGF- $\beta$ 1, еще одним перспективным малоинвазивным маркером посттрансплантационных осложнений является Галектин-3 (Gal-3), который играет значительную роль в взаимодействии различных цитокинов и хемокинов. Как и TGF- $\beta$ 1, Gal-3 находится во многих клетках, включая макрофаги, моноциты, дендритные клетки, а также Т-и В- лимфоциты.

Изначально исследования указывали на роль Gal-3 в развитии острого воспаления, однако в дальнейшем было отмечено его значительное влияние в формировании фиброза [46].

Некоторые исследования показывают, что цитокины TGF- $\beta$ 1 и Gal-3 могут активировать сигнальный путь Smad2/3 и увеличивать способность клеток к пролиферации и миграции. Имеются данные, что TGF- $\beta$ 1 и Gal-3 могут взаимно регулировать уровни экспрессии белка и мРНК. Кроме того, повышенный уровень TGF- $\beta$ 1 может стимулировать экспрессию Gal-3 и наоборот, эти два белка действуют синергически, иницируя последующий путь TGF- $\beta$ 1/Smad [47].

Известно, что TGF- $\beta$ 1 является основным профиброгенным цитокином, который запускает процесс фиброгенеза в различных органах и тканях. Но вероятно имеются и другие механизмы запуска тканевого фиброза, не зависящие от TGF- $\beta$ 1, и возможно, ключевую роль в них играет Gal-3. В исследовании Henderson с соавт. продемонстрировали, что при высоких концентрациях TGF- $\beta$ 1 и Gal-3, поломка в гене Galectin-3 существенно ингибирует фиброз, причем высокие

концентрации TGF- $\beta$ 1 не могут этому препятствовать. Таким образом, авторы делают вывод, что TGF- $\beta$ 1 стимулирует выработку проколлагена, только в присутствии Gal-3. Повышенная выработка коллагена приводит к трансформации фибробластов в миофибробласты, и развитию фиброза в различных органах. Некоторые работы показали, что Gal-3 ключевой игрок в развитии фиброза печени и почек [48, 49].

Недавно проведенное нами исследование показывает, что повышенная концентрация Gal-3 в крови у реципиентов почки может быть предиктором неблагоприятного исхода в виде хронической дисфункции трансплантата, а также необходимости возврата реципиента на гемодиализ [50].

Имеются данные, об экспрессии Gal-3 в кардиомиоцитах желудочков при ремоделирования сердца с высокой преднагрузкой, а высокая концентрация Gal-3 в крови напрямую коррелирует с нарушением сердечной функции. Активация Gal-3/TGF- $\beta$ 1 профибротического пути может быть основной причиной развития интерстициального фиброза предсердий и желудочков [51].

Полученные результаты помогут эффективно верифицировать патологии при дисфункции солидных органов. Поскольку TGF- $\beta$ 1 и Gal-3 в сердце, почках и печени являются важными клиническими маркерами, которые дают представление о патологическом процессе, подразумевается, разработка комплексных диагностических панелей.

## **1.2 TGF- $\beta$ 1 у реципиентов солидных органов**

T-лимфоциты, моноциты, сосудистый эндотелий и стромальные клетки – это неполный список клеток, которые продуцируют TGF- $\beta$ 1. Секретируемый цитокин TGF- $\beta$ 1 контролирует пролиферацию, дифференцировку, выживаемость и апоптоз T-клеток, B-клеток, а также играет ведущую роль в развитии иммунной толерантности [52]. Многие научные труды, описывали концентрацию TGF- $\beta$ 1 в крови у здоровых людей. Согласно литературным данным TGF- $\beta$ 1 варьирует в

широких пределах (от 0,5 до 80 нг/мл) и не зависит от пола, однако может меняться с возрастом [53,54]. В предыдущих исследованиях нами были выявлены различия средних уровней TGF- $\beta$ 1 в плазме здоровых детей и взрослых ( $22,2 \pm 4,9$  нг/мл и  $8,1 \pm 7,6$  нг/мл) [55]. Похожая тенденция наблюдается и в работе Y. Okamoto с соавт. концентрация TGF- $\beta$ 1 в их исследовании обратно коррелирует с возрастом; в сыворотке здоровых детей до 14 лет уровень цитокина был достоверно выше, чем у взрослых [56].

В последнее время появляется всё больше исследований, которые демонстрируют зависимость концентрации TGF- $\beta$ 1 в крови зависит от его генетического полиморфизма, а некоторые его гаплотипы участвуют в развитии эпизодов острого и хронического отторжения [57].

Подобные данные помогают рассматривать TGF- $\beta$ 1 как эффективный маркер посттрансплантационных осложнений и дают шанс на разработку избирательных методов лечения в трансплантологии.

### ***TGF- $\beta$ у реципиентов печени***

Основным источником TGF- $\beta$ 1 в печени, являются активированные звездчатые клетки. Стимулируя продукцию белков внеклеточного матрикса TGF- $\beta$ 1 выступает как ключевой профиброгенный цитокин [58].

Согласно данным, полученным нами ранее, в плазме крови детей с терминальной печеночной недостаточностью концентрация TGF- $\beta$ 1, достоверно ниже, чем у здоровых детей того же возраста. Содержание TGF- $\beta$ 1 у детей с врожденных заболеваний гепатобилиарной системы, также ниже, чем у здоровых детей [59]. Измерение TGF- $\beta$ 1 в крови имеет клиническое значение и может отражать состояние печени. Подобные результаты помогают рассматривать TGF- $\beta$ 1 в качестве диагностического и прогностического маркера у реципиентов печени [59].

Однако исследования пациентов, перенесших трансплантацию печени, показали тенденцию к более высокому содержанию TGF- $\beta$ 1 в крови при

сохранной функции трансплантата ( $44,7 \pm 7,3$  нг/мл) в сравнении с реципиентами с кризами отторжения ( $32,7 \pm 3,3$  нг/мл) [60].

Исследования ряда авторов, в том числе и наши работы, предполагают, что развитие посттрансплантационных осложнений ассоциированы с различными полиморфизмами гена *Tgfb1*. Подразумевается, что определённые гаплотипы, могут генетически детерминировать уровень экспрессии цитокина TGF- $\beta$ 1 и коррелировать с дисфункцией трансплантата в раннем и отдалённом посттрансплантационном периоде [61, 62].

### ***TGF- $\beta$ у реципиентов сердца***

Синтез коллагена и пролиферация фибробластов – процессы, регулируемые TGF- $\beta$ 1 и имеющие ключевое значение в развитии хронической сердечной недостаточности (ХСН). В сердце TGF- $\beta$ 1 синтезируется кардиомиоцитами и фибробластами, высвобождается при инфаркте миокарда, перегрузке давлением, введении ангиотензина II и норадреналина, ингибируется оксидом азота [63].

Исследования пациентов с ХСН показывают, что сверхэкспрессия генов коллагена I и III типа, коррелировала с TGF- $\beta$ 1 [64]. Уровень TGF- $\beta$ 1 был выше у пациентов с ХСН по сравнению с здоровыми лицами и коррелировал с классом сердечной недостаточности по NYHA [65].

Исследование в Центре Шумакова пациентов с дилатационной кардиомиопатией показывало аналогичные результаты: уровень TGF- $\beta$ 1 в плазме крови пациентов с ХСН был выше, чем у здоровых лиц ( $29,9 \pm 19,7$  нг/мл vs.  $8,7 \pm 7,5$  нг/мл,  $p = 0,001$ ). При этом в посттрансплантационном периоде уровень TGF- $\beta$ 1 в плазме крови реципиентов значимо снижался, а в отдаленные сроки достигал уровня, характерного для здоровых лиц [66].

Роль TGF- $\beta$ 1 при патологии трансплантата у реципиентов сердца представляет существенный практический интерес. Исследование Aziz E. позволило оценить величину экспрессии TGF- $\beta$ 1 в сердечных трансплантатах.

Результаты исследования демонстрируют прямую корреляцию между накоплением TGF- $\beta$ 1 в эндомиокарде и увеличенными показателями гемодинамики конечным диастолическим давлением в левом желудочке и давлением заклинивания в легочной артерии, что в итоге приводит к стойкой диастолической дисфункции левого желудочка. Частые эпизоды клеточного отторжения в течение первых двух лет после трансплантации сопровождались высоким содержанием TGF- $\beta$ 1 тканях и инициировали серию воспалительных и иммунологических ответов с последующим нарушением сократительной функции и фиброзом миокарда [67].

Фиброз миокарда, ассоциированный с терапией циклоспорином, послужил основанием для предположения, что данный препарат при участии TGF- $\beta$ 1 может способствовать диастолической дисфункции сердечного аллотрансплантата [68]. Однако, оказываемые эффекты TGF- $\beta$ 1 на пролиферацию фибробластов сердца разнонаправлены. В некоторых исследованиях сообщалось, что TGF- $\beta$ 1 стимулирует пролиферацию сердечных фибробластов, тогда как в других продемонстрированы его антипролиферативные эффекты. Различие в результатах возможно объяснить возможными различиями в дифференцировке популяций фибробластов, а также влиянием иных факторов роста [69].

В другом исследовании авторам удалось показать связь экспрессии TGF- $\beta$ 1 в образцах биопсии трансплантированного сердца с развитием васкулопатии и низкими показателями выживаемости реципиентов ( $r=0,73$ ,  $p < 0,0007$ ) [70].

У реципиентов сердца носителей аллеля G фиброз миокарда верифицированный по данным морфологического исследования, выявлялся гораздо реже, чем у носителей генотипа AA полиморфизма rs1800470 гена, что может указывать на связь полиморфизма гена TGF- $\beta$ 1 с фиброзом миокарда трансплантата [71].

Накопленные данные о влиянии TGF- $\beta$ 1 на сердечный трансплантат помогут разработать новые подходы в диагностике посттрансплантационных

осложнений, и улучшить выживаемость пациентов в раннем и отдалённом посттрансплантационном периоде.

### *TGF- $\beta$ 1 у реципиентов легких*

Несмотря на совершенствование подходов медикаментозного и хирургического лечения, хроническое отторжение является основным фактором, ограничивающим отдаленную выживаемость, у 30% - 75% пациентов развивается синдромом облитерирующего бронхиолита в течении пяти лет после трансплантации [72]. СОБ сопровождается ограничением воздушного потока ввиду частичной или полной окклюзией просвета дыхательных путей, за счёт разрушения гладкомышечных и эластиновых волокон. TGF- $\beta$  индуцирует активацию и пролиферацию фибробластов, а также осаждение компонентов коллагена и внеклеточного матрикса в легких. Недавно было показано, что экспрессия TGF- $\beta$  увеличивается у потенциальных реципиентов с синдромом облитерирующего бронхиолита еще до начала заболевания [73].

Более ранние исследования показали прямое влияние TGF- $\beta$ 1 на развитие интерстициального фиброза, намного позже в ряде исследований авторами изучались зависимость частоты развития СОБ от уровня экспрессии TGF- $\beta$ 1 [74, 75]. Более того в 1998 г. Charpin J. с соавт. в своей работе показали, что увеличенная экспрессия TGF- $\beta$  у реципиентов легких еще до проявления явных клинических признаков СОБ [76]. У реципиентов легких повышение TGF- $\beta$ 1 можно рассматривать в качестве прогностического маркера хронического отторжения.

TGF $\beta$ 1 занимает ведущую роль в патогенезе фиброза легких, повышая фиброгенную, сократительную и миграционную активность фибробластов. Ингибирование активированного TGF- $\beta$ 1, а также сигнального пути TGF $\beta$ /Smad лежит в основе разработок мишеней для терапии, направленных на улучшение результатов трансплантации легких [77, 78].

### 1.3 Плейотропный цитокин TGF- $\beta$ 1 в развитии патологий почечного трансплантата

Известно, что трансплантация почки – самый продуктивный способ лечения терминальной стадии почечной недостаточности, но несмотря на высокую эффективность, улучшение долгосрочных результатов трансплантации по-прежнему является актуальной задачей.

Во время прогрессирования ХБП возникает стойкая воспалительная реакция с привлечением макрофагов и моноцитов, которые в свою очередь провоцируют массивную продукцию цитокинов и хемокинов, и значимую роль в этих процессах играет TGF- $\beta$ 1, в результате процессов разрушения и регенерации в почечной паренхиме происходит чрезмерное накопление белков внеклеточного матрикса, что заставляет мезенхимальные почечные клетки трансформироваться в миофибробласты. В свою очередь рост количества миофибробластов положительно коррелирует с тяжестью фиброза [79].

В почке TGF- $\beta$ 1 секретируются клетками паренхимы, лимфоцитами или TGF- $\beta$ 1циркулирующие в сосудистом русле. Концентрация TGF- $\beta$ 1 в первую очередь регулируется преобразованием латентного TGF- $\beta$  в активную форму [80].

Эффективным диагностическим признаком прогрессирования болезни почек может являться повышенная концентрация TGF- $\beta$ 1 крови [81]. Исследования на животных показали, что сверхэкспрессия TGF- $\beta$ 1 в почках индуцировала пролиферацию, аутофагию, накопление внеклеточного матрикса в тубулоинтерстиции, капиллярах и клубочках [82]. Прогрессирование фиброза в почках способствовало изменению структуры нефрона и нарушению функции, а также проявлялось протеинурией [83]. Известно, что повышенная экспрессия TGF- $\beta$  может способствовать развитию патологических процессов в различных органах, однако необратимое ингибирование TGF- $\beta$ 1 при исследовании мышей также приводит к воспалению сразу нескольких органов [84].

Механизмы участия TGF- $\beta$ 1 в заболеваниях трансплантированной почки изучены не до конца. При исследовании уровня TGF- $\beta$ 1 у реципиентов в отдаленные сроки после трансплантации было показано увеличение уровня TGF- $\beta$ 1 при хроническом отторжении в сравнении с пациентами без признаков отторжения. Концентрация TGF- $\beta$  положительно коррелировала с общим показателем клеточного инфильтрата при морфологическом исследовании тканей почки. У пациентов в этом исследовании в обеих группах в анамнезе были кризы острого отторжения, подтвержденные биопсией, что характеризует TGF- $\beta$  именно как маркер хронического отторжения [85].

Другие исследования, так же подтверждают роль TGF- $\beta$  в развитии хронической нефропатии трансплантата (хронического отторжения), предполагается, что TGF- $\beta$ , транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B, а также HMGB1 могут образовывать сигнальный путь, который приводит к воспалению и интерстициальному фиброзу в почке [86].

В исследовании Du X.X. с соавт. обнаружили, что уровень TGF- $\beta$ 1 в крови прямо коррелирует с длительностью выживаемости трансплантата. Расчетная СКФ положительно коррелировала с уровнем TGF- $\beta$ 1, а уровень креатинина в сыворотке крови – отрицательно [87].

Представления о роли TGF- $\beta$ 1 постоянно расширяются, например стало известно, что гену TGFB1 свойственен некоторый полиморфизм, и количество экспрессии TGF- $\beta$ 1 генетически детерминировано. Для большинства исследователей в области трансплантации солидных органов особый интерес представляет 3 полиморфизма в гене TGFB1: rs1800470 (+869) T/C, rs1800469 (-509) C/T, rs1800471 (+915) C/G. Предположительно, подобные генетические вариации могут быть основой плеiotропных свойств TGF- $\beta$ 1 [88].

Данные о влиянии полиморфизмов противоречивы и неоднозначны. Согласно опубликованным исследованиям, полиморфизмы (+869) T/C и (+915) C/G расположены в участках гена, которые отвечают за количество

экспрессируемого белка, так исследования китайских коллег показали связь генотипа с высокой экспрессией TGF- $\beta$ 1 и возникновением хронического отторжения трансплантата почки [89].

Недавнее когортное исследование на 1271 паре реципиентов и доноров почки показало, что частота генотипа rs1800472 донора в TGF- $\beta$ 1 значительно различалась у реципиентов с сохраненной функцией трансплантата и без нее ( $p=0,014$ ), а реципиенты, которым была пересажена почка, несущая T-аллель полиморфизма rs1800472 TGF- $\beta$ 1, имели более высокий риск потери трансплантата в отдаленные сроки. Учитывая, что T-аллель имеет более низкий уровень экспрессии TGF- $\beta$ 1, эти результаты позволяют сделать вывод о позитивном влиянии передачи сигналов TGF- $\beta$ 1 на отдаленную выживаемость трансплантированной почки [90].

Отдельные исследования показали, что донорский полиморфизм TGFB1 + 869 T/C (rs1800470) может способствовать запуску реакции острого отторжения при трансплантации почки и других солидных органов [91].

Несмотря на прорывные достижения в области трансплантации почки, повышение долгосрочной выживаемости трансплантата остается приоритетной задачей клиницистов. Постоянный риск развития посттрансплантационных осложнений, стимулирует разработку новых подходов к диагностике и индивидуальной терапии. Цитокин TGF- $\beta$ 1 участвует в различных патологических процессах в трансплантированных органах и участвует в развитии отторжения и фиброза. Как профибротический, так и антипролиферативный эффекты TGF- $\beta$ 1, изучены не до конца, и порой могут быть достаточно разнонаправленными, что создает предпосылки к более детальному изучению этого многофункционального цитокина.

## 1.4 TGF- $\beta$ 1 и иммуносупрессивная терапия

Ингибиторы кальциневрина, например, являются основными препаратами для профилактики отторжения после трансплантации солидных органов. Открытие иммуносупрессивного действия циклоспорина А (CsA) стало новой ступенью в развитии трансплантологии [92]. Позже были обнаружены иммуносупрессивные эффекты и другого препарата – такролимуса [93].

Циклоспорин А и такролимус снижают риск развития отторжения и увеличивают выживаемость аллотрансплантата и реципиента. Уменьшение концентрации ингибиторов кальциневрина в крови увеличивает риск острого отторжения, однако повышение концентрации, приводит к развитию CNI-нефротоксичности [94].

Несмотря на большой опыт успешного применения указанных препаратов, недостатком большинства иммуносупрессивных схем остается ряд побочных эффектов, и главный из них – нефротоксичность.

Фиброз тканей происходит путём индукции TGF- $\beta$ 1 процессов эпителиально-мезенхимального перехода (EMT). Плейотропный цитокин TGF- $\beta$ 1, продуцируемый поврежденными клетками паренхимы и макрофагами, запускает сигнальный каскад и приводит к повышенной экспрессии неактивной формы GSK-3 $\beta$  и накоплению  $\beta$ -катенина в цитоплазме [95].

Участие TGF- $\beta$ 1 в CsA-индуцированном EMT позволяет предположить возможные способы ингибирования этого процесса. В недавнем исследовании была описана нефропротекторная роль природного флавоноида – кризина, который ингибировал передачу сигналов TGF- $\beta$ 1 и препятствовал накоплению цитоплазматического  $\beta$ -катенина. Авторы приводят многообещающие результаты и указывают на эффективность и безопасность применения CsA в сочетании с кризином, что позволит значительно снизить нежелательные эффекты от иммуносупрессивной терапии [96].

Поскольку такролимус прямо или косвенно индуцирует экспрессию TGF- $\beta$ 1, разрабатываются пути борьбы с хронической нефропатией и в отношении схем иммуносупрессивной терапии [97].

Zhang L.Y. с соавт. на крысиной модели изучили влияние традиционного китайского фитотерапевтического средства, применяемого при различных воспалительных процессах в почках, на действие такролимуса. В ходе экспериментов совместное применение препаратов подавляло экспрессию TGF- $\beta$ 1/Smad2/3/ $\beta$ ig-h3 и провоспалительных цитокинов, а также ослабляло оксидативный стресс и апоптоз [98].

Турецкие коллеги опубликовали результаты исследования где показано, что у пациентов с генотипом rs1800470 (+869) T/C концентрация циклоспорина (CsA) в крови была ниже, чем у реципиентов с другими генотипами. При этом в этой же группе реципиентов число эпизодов острого отторжения была достоверно ( $P = 0,033$ ) выше [99].

Такролимус, провоцирует повышенную экспрессию TGF- $\beta$ 1 в почках, что в итоге приводит к интерстициальному фиброзу, накоплению белков (ECM), и потере функции. Недавние эксперименты на крысах продемонстрировали, что совместное использование эверолимуса и такролимуса снижает неблагоприятные эффекты последнего. Эверолимус подавляет экспрессию белка внеклеточного матрикса и активацию почечных фибробластов, индуцированных TGF- $\beta$ , путем ингибирования сигнала mTOR. Подобный защитный эффект эверолимуса полезно учитывать при разработке индивидуальных схем лечения [100].

В дополнение стоит отметить, что оппортунистическая инфекция остается серьезным осложнением на протяжении всего срока после трансплантации, ставя под угрозу преимущества любой длительной иммуносупрессивной терапии. С этой точки зрения немалый интерес представляют данные Voix F. с соавт. о TGF- $\beta$  как о предикторе развития оппортунистических инфекций в первый год после трансплантации печени и почек. В своем исследовании авторы приводят

пороговые концентрации TGF- $\beta$  у реципиентов печени и почки (363,25 пг/мл и 808,51 пг/мл соответственно), превышение которых свидетельствует о высоком риске развития инфекционных осложнений, а чувствительность и специфичность разработанного теста составила более 70% [101].

Побочные эффекты иммуносупрессии являются основными проблемами, ограничивающими развитие трансплантологии. Наиболее значительным побочным эффектом является нефротоксичность. В свою очередь, регуляция TGF- $\beta$  выступает важным этиологическим фактором хронической нефротоксичности и других осложнений, вызванных приемом иммуносупрессантов, а воздействие на этот путь способно снизить нежелательные эффекты от терапии и потенциально улучшить отдаленные результаты трансплантации.

### **1.5 TGF- $\beta$ как мишень для терапии**

Достижение долгосрочной выживаемости трансплантата – одна из главных задач трансплантологии. Снижение риска возможных осложнений и уменьшение побочных эффектов является актуальной задачей и в настоящее время. Несмотря на разработку новых эффективных методов диагностики осложнений, ведутся активные поиски терапевтических мишеней как возможного пути решения проблемы. Известно множество стратегий ингибирования TGF- $\beta$ , но в каждой из них существует риск неблагоприятных последствий. Ингибирование TGF- $\beta$  через его сигнальные пути считается наиболее оптимальным подходом в борьбе с фиброзом, в то время как прямая блокада TGF- $\beta$  связана с высокими рисками воспаления.

С момента открытия роли TGF- $\beta$ 1 в патогенезе фиброза, значительно вырос интерес к разработке новых препаратов нацеленных на TGF- $\beta$ 1 и его сигнальные пути. Нейтрализующие антитела, антисмысловые олигонуклеотиды, ловушки для лигандов, циклические пентапептиды – неполный список разработанных препаратов для TGF- $\beta$ 1. Но несмотря на успешное прохождение доклинических

испытаний, результаты клинических испытаний показывали в лучшем случае лишь незначительную пользу выживаемости и даже иногда побочные эффекты [102].

В исследованиях Border W. A. с соавт. впервые применил инъекции *in vivo* анти-TGF- $\beta$ 1 нейтрализующих антител чтобы остановить прогрессирующий фиброз при пролиферативном гломерулонефрите подавляло выработку белков внеклеточного матрикса и замедляло прогрессирующий фиброз, что было гистологически подтверждено [103].

Продолжался поиск мишеней для подавления избыточных эффектов TGF- $\beta$ 1. Другим направлением экспериментальной терапии, было введение анти-TGF- $\beta$  рецепторных антител II типа (TGF $\beta$ RII), ингибирующих разрастание фиброз, что подтверждалось снижением белка в моче у крыс с экспериментальным гломерулонефритом [104].

Некоторые антитела обеспечивают селективное ингибирование активации TGF- $\beta$ 1 через интегрины  $\alpha$ v $\beta$ 1 и  $\alpha$ v $\beta$ 6 и  $\alpha$ v $\beta$ 8. Было показано, что ингибирование анти- $\alpha$ v $\beta$ 6 антитела и ингибиторы  $\alpha$ v $\beta$ 1 на доклинических моделях уменьшает фиброз в легких, печени и почках [105].

Современные разработки нацелены на представителей суперсемейства TGF- $\beta$  или их рецепторы, испытываются десятки противофиброзных агентов с различными мишенями, в основном – химически синтезированные олигонуклеотиды. Например, инъекции miR-326 мышам с индуцированным фиброзом легких сопровождались противофиброзными эффектами за счет регуляции Smad7 и значимого снижения TGF- $\beta$ 1, Smad3, матричной металлопротеиназы-9 (MMP-9) [106].

Уже известным противофиброзным и противовоспалительным препаратом, нацеленным на TGF- $\beta$  и ФНО- $\alpha$ , является Пирфенидон. Он уже одобрен в лечении идиопатического легочного фиброза, и продемонстрировал многообещающие эффекты при лечении фиброза почек [107].

Доклиническими испытаниями на животных показана эффективность терапии антисмысловыми олигонуклеотидами, ингибирующими экспрессию гена TGF- $\beta$  и снижающими фиброзирование ткани при гломерулонефрите [108]. Также изучаются возможности применения высокоселективного антитела SRK-181, его ключевой механизм состоит в предотвращении расщепления предшественника TGF- $\beta$ 1 и высвобождении зрелого TGF- $\beta$ 1 [109].

Еще один высокоэффективный селективный ингибитор – AVID200, нацеленный на измененный рецептор TGF $\beta$ RII. Он усиливает связывающую активность TGF $\beta$ RII с TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 3 и, таким образом, значительно снижает связывающую активность с TGF- $\beta$ 2 [110].

В своей работе Luangmonkong T. и соавт. не обнаружили видимых побочных эффектов пожизненной блокировки активности TGF- $\beta$  у мышей, хотя в организме человека его длительное системное подавление влекло высокий риск токсичности терапии и снижение регенеративной функции тканей, что обусловлено функциональной плейотропностью TGF- $\beta$  [111].

В последнее время изучают роль антиоксидантов в ингибировании сигнального пути TGF- $\beta$ /SMAD. Неожиданный эффект обнаружили у препарата лозартана: увеличивая тиоловые группы с антиоксидантной активностью он ингибирует Smad 7 и вызывает распад рецептара TGF $\beta$ RI. Также ингибирующее действие на сигнальный путь TGF- $\beta$ /SMAD оказывает N-ацетилцистеин и Витамин E [112].

Повышенная экспрессия TGF- $\beta$  рассматривается как основная причина развития фиброза в различных органах и тканях. Следовательно, прямое или косвенное влияние на активацию TGF- $\beta$ 1 является основной стратегией в разработке терапевтических мишеней [113]. Однако, для сохранения защитных эффектов TGF- $\beta$ 1, наиболее предпочтительным считается селективное ингибирование TGF- $\beta$ 1 и его путей активации. Все результаты свидетельствуют о

том, что процесс разработки и внедрения терапии, направленной на TGF- $\beta$ 1 сложен и требует дополнительных фундаментальных исследований.

## 1.6 Заключение

Трансплантация – единственный эффективный метод лечения пациентов с терминальной стадией недостаточности солидных органов. С каждым годом число реципиентов, нуждающихся в пересадке, неуклонно возрастает. Основной задачей трансплантологии остается достижение долгосрочных показателей выживаемости реципиентов, несмотря на все риски посттрансплантационных осложнений. Самыми распространёнными осложнениями после трансплантации считается отторжение и фиброз, и не последнюю роль в развитии этих процессах играет цитокин TGF- $\beta$ 1.

Многофункциональный цитокин TGF- $\beta$ 1 регулирует ряд важных процессов таких как, макрофагальная инфильтрация, подавление функции лимфоцитов, пролиферация фибробластов, а также синтез коллагена. В ранние периоды исследований TGF- $\beta$ 1 рассматривался в основном, как профибротический цитокин, так как было показано его участие в накоплении белков внеклеточного матрикса и ингибировании экспрессии матриксных металлопротеаз. Более поздние исследования рассматривали TGF- $\beta$ 1 уже в качестве регулятора иммунного ответа благодаря непосредственному участию TGF- $\beta$ 1 в пролиферации и дифференцировке Т- и В-лимфоцитов [114]. За годы исследований стало очевидно, что большинство, если не все типы клеток вырабатывают, секретируют и взаимодействуют с TGF- $\beta$ .

В настоящее время некоторые авторы рассматривают TGF- $\beta$  как маркер инфекционных осложнений и отторжения, однако большинство авторов склоняется к тому, что TGF- $\beta$  является перспективным прогностическим маркером фиброза солидных органов [115].

Благодаря современным исследованиям стало возможным использование TGF- $\beta$  и его рецепторов в качестве мишеней для терапии, однако побочные эффекты были неоднозначны, и обусловлены плеiotропностью TGF- $\beta$ . Это указывает на необходимость проведения более детальных исследований для решения проблемы посттрансплантационных осложнений.

Ввиду актуальности данной темы было решено провести настоящее исследование, включающее несколько основных пунктов.

Во-первых, изучены концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови у реципиентов почки. Проведен сравнительный анализ с группой здоровых лиц, а также проведена оценка связи с демографическими, клиническими и лабораторными данными. Исследована концентрация TGF- $\beta$ 1 у реципиентов почки в различные сроки после трансплантации.

Во-вторых, проведен сравнительный анализ концентраций TGF- $\beta$ 1 между реципиентами с дисфункцией нефротрансплантата и без таковой, проведен сравнительный анализ между реципиентами с дисфункцией трансплантата различной этиологии, верифицированной по данным морфологического исследования биоптатов.

В-третьих, проведен сравнительный анализ концентраций TGF- $\beta$ 1 между реципиентами с дисфункцией трансплантата, обусловленный иммунными и неиммунными механизмами.

В завершении была оценена диагностическая значимость TGF- $\beta$ 1 при дисфункции нефротрансплантата вызванной иммунными процессами (острым и хроническим отторжением) на основании результатов ROC-анализа: рассчитан диагностически значимый пороговый уровень TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови; оценены диагностические характеристики разработанного теста.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Характеристика пациентов, включенных в исследование**

В исследование включены 129 реципиентов почки в возрасте от 17 до 68 (в среднем  $41,2 \pm 12,7$ ) лет, которым в период с 1999 года по 2022 год была выполнена трансплантация от родственного (РАТП) 28 или посмертного донора (АТП) 101 трансплантация почки в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

Отбор, обследование и лечение пациентов осуществлялись в специализированных отделениях ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России.

У всех реципиентов почки посттрансплантационный период был условно разделен на ранний (до 1 месяца после трансплантации) и отдаленный (более 1 месяца после трансплантации). Все пациенты подлежат стандартному общемедицинскому и лабораторному обследованию.

Сравнение проводилось с контрольной группой здоровых лиц ( $n=35$ ), в возрасте от 21 до 64 (в среднем  $32,7 \pm 9,9$ ) существенно не отличающейся по возрасту и гендерной принадлежности от основной группы.

### **2.2 Методы обследования пациентов**

Обследование и лечение пациентов проводилось в хирургическом отделении № 1 (зав. отделением – к.м.н. Сайдулаев Д. А.) согласно протоколу ведения пациентов в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России в соответствии с клиническими рекомендациями Российского трансплантологического общества и включало плановое физикальное, инструментальное и лабораторное обследования.

Плановое обследование после трансплантации почки включало в себя клинический осмотр, термометрию, мониторинг АД, расчет СКФ, осмотр профильных специалистов в зависимости от наличия сопутствующих патологий и оценку психоэмоционального статуса реципиента.

Помимо физикального обследования, всем реципиентам почки с целью исключения послеоперационных осложнений проводили инструментальных исследований, таких как УЗИ органов брюшной полости в том числе почек и мочевыводящей системы, доплерография сосудов нижних конечностей и таза, МСКТ органов грудной клетки и брюшной полости, ЭКГ и ЭхоКГ.

Лабораторное обследование проводилось в клинко-диагностической лаборатории (зав. к.м.н. Н.П. Шмерко) и включало общеклинический анализ крови (включая количество тромбоцитов, лейкоцитов и уровень гемоглобина), общий анализ мочи, так же проведен анализ кислотно-щелочного состояния, газового и электролитного состава крови.

С целью исключения нарушений системы гемостаза во время проведения гепаринового протокола проведены исследования свертывающей системы крови (включая уровень фибриногена, антитромбина-III, протромбиновый индекс, АЧТВ).

Всем реципиентам был выполнен биохимический анализ крови (включая определение уровня общего билирубина, общего белка, глюкозы креатинина, мочевины, АСТ, АЛТ)

Все реципиенты имели стандартный протокол иммуносупрессии, который состоял из ингибиторов кальциневрина (такролимус), цитостатиков (микофенолата мофетил или микрофеноловая кислота) и преднизолона, и применялся в зависимости от сроков после трансплантации и при возникновении эпизодов отторжения.

Концентрацию такролимуса измеряли автоматизированным методом, используя анализатор ARCHITECT i2000 (Abbott, США) и набор реагентов

ARCHITECT TacrolimusKit (Abbott, США) (в лаборатории иммунологического мониторинга – зав. к.м.н. Н.П. Шмерко).

Оценка функции почек проводилась с использованием расчетной формулы скорости клубочковой фильтрации (СКФ) СКD-EPI, которая учитывает расу, пол, возраст и уровень креатинина в сыворотке крови пациента [116].

Формула СКD-EPI для расчета СКФ у женщин с уровнем креатинина  $\leq 0,7$  мг/дл:  
 $СКФ = 144 \times (0,993)^{\text{Возраст (годы)}} \times (\text{Креатинин (мг/дл)} / 0,7)^{-0,328}$ .

Формула СКD-EPI для расчета СКФ у женщин с уровнем креатинина  $> 0,7$  мг/дл:  
 $СКФ = 144 \times (0,993)^{\text{Возраст (годы)}} \times (\text{Креатинин (мг/дл)} / 0,7)^{-1,21}$ .

Формула СКD-EPI для расчета СКФ у мужчин с уровнем креатинина  $\leq 0,9$  мг/дл:  
 $СКФ = 141 \times (0,993)^{\text{Возраст (годы)}} \times (\text{Креатинин (мг/дл)} / 0,7)^{-0,412}$ .

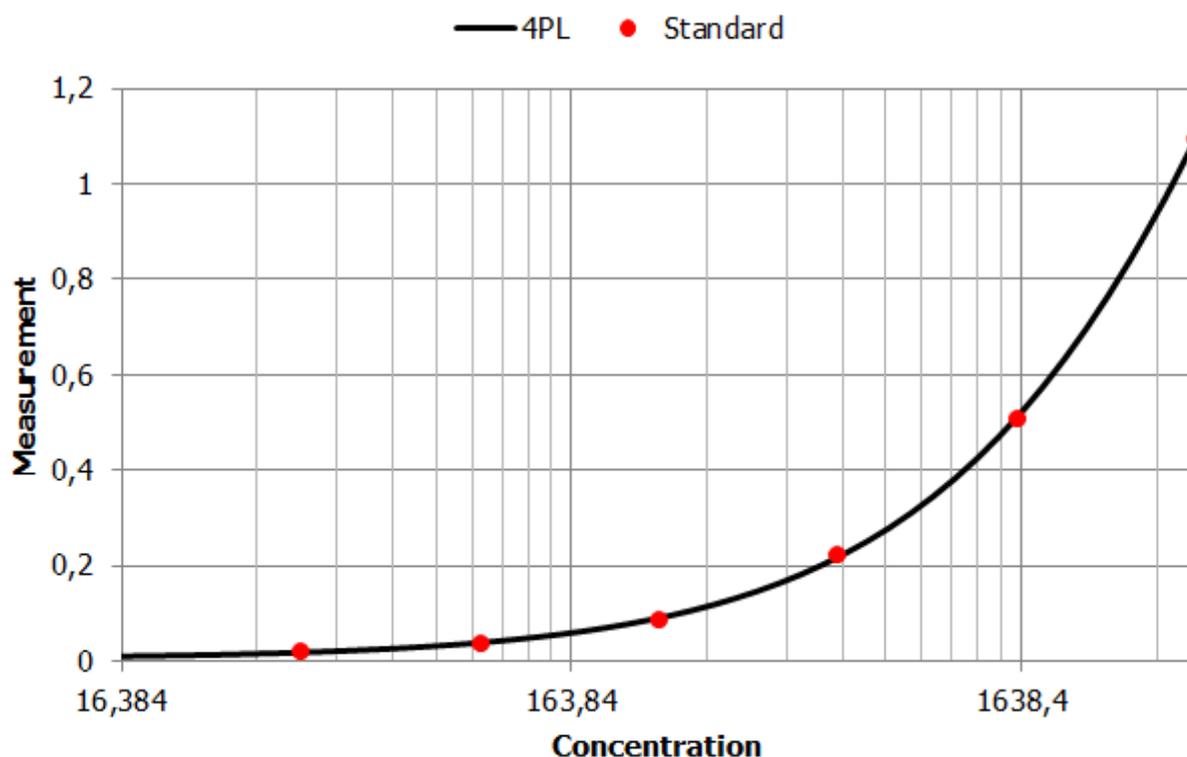
Формула СКD-EPI для расчета СКФ у мужчин с уровнем креатинина  $> 0,9$  мг/дл:  
 $СКФ = 141 \times (0,993)^{\text{Возраст (годы)}} \times (\text{Креатинин (мг/дл)} / 0,7)^{-1,21}$ .

### 2.3 Измерение концентрации TGF- $\beta$ 1

Забор крови осуществляли в утренние часы натощак, из периферической вены, одновременно с другими лабораторными анализами. Забор крови проводили в вакуумные пробирки без наполнителя. Полученную кровь 10 мин. центрифугировали при относительной центробежной силе 1300G, для получения сыворотки. Содержание биомаркера TGF- $\beta$ 1 измеряли в сыворотке крови. Полученная сыворотка отбиралась в одноразовые пробирки типа эппендорф по 2 мл. и замораживалась в морозильной камере ( $- 40 \text{ C}^\circ$ ), образцы хранились до проведения анализа. Перед исследованием сыворотку размораживали при комнатной температуре ( $18 - 25 \text{ C}^\circ$ ) в течении 30 минут, затем перемешивали 4-6 раз. Концентрацию TGF- $\beta$ 1 определяли с помощью количественного твердофазного иммуноферментного анализа с использованием специфических наборов реагентов (RayBio® Human TGF-beta 1 ELISA Kit, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Измерение оптической плотности проводили с помощью автоматического спектрофотометра Zenyth 340r (Biochrom Anthos, Великобритания) при длине волны 450 нм; диапазон построения стандартной кривой составлял от 16,38 до 4000 пг/мл.

На рисунке 1 изображен пример построенной стандартной калибровочной кривой из семи точек для определения концентрации TGF- $\beta$ 1. Далее результаты измерений представлены в нг/мл.



*Рисунок 1 – Калибровочная кривая определения концентрации TGF- $\beta$ 1 иммуноферментным методом*

#### **2.4 Гистологическое и иммуногистохимическое исследование биоптатов трансплантированной почки**

На сегодняшний день наиболее точным методом диагностики патологии нефротрансплантата является пункционная биопсия. Клинические проявления различных вариантов патологии трансплантата зачастую не различаются, и

морфологическая верификация диагноза признана необходимой во всех случаях дисфункции аллотрансплантата.

Морфологическую верификацию (морфологическую диагностику) патологии в аллотрансплантированной почке осуществляли путем исследования материала, полученного с помощью чрескожной пункционной биопсии.

Исследование биоптатов проводилось в патологоанатомическом отделении (зав. отделением д.м.н. Н.П. Можейко) и включало световую микроскопию на срезах толщиной 3-4 мкм окрашенных гематоксилином и эозином, по Массону и Шифф-реактивом, а также иммунофлюоресцентное исследование, выполнявшееся на замороженных срезах толщиной 4 мкм с моноклональными FITC-мечеными антителами к IgG, IgM, IgA, C3 и C1q-фрагментам комплемента. Степень выраженности фиброза оценивали согласно Banff-классификации патологии аллотрансплантата почки 2017 года.

Клинический диагноз отторжения трансплантированной почки не может быть поставлен без заключения о результатах исследования биоптата почки.

Острое отторжение характеризуется нарушением функции трансплантата в совокупности с наличием установленных морфологических признаков, выявляемых при биопсии. Классификация Banff 97 определяет типы острого отторжения [117].

### ***Морфологические типы отторжения трансплантированной почки***

#### **1. Сверхострое отторжение аллотрансплантированной почки.**

Наличие в крови предсуществующих цитотоксических антител на момент трансплантации, обуславливает развитие сверхострого отторжения. При исследовании биоптатов выявляют обширный тромбоз сосудов микроциркуляторного русла, а также дистрофические изменения извитых канальцев. В биоптатах, взятых в течение первых 3-х суток наблюдается диффузная инфильтрация интерстиция нейтрофилами. Отмечается некроз паренхимы почки, с преимущественным тромбозом микроциркуляторного русла.

## 2. Ускоренное отторжение аллотрансплантированной почки.

Гистологически выявляется полнокровие и стазы крови в сосудах микроциркуляторного русла и коркового вещества, инфильтрация лимфоцитами и повреждение паренхимы почек.

## 3. Острое отторжение аллотрансплантированной почки (ACR).

В настоящее время для оценки степени острого отторжения используется классификация Banff 97 [117]. В зависимости от полуколичественных показателей диагностируют следующие виды отторжения:

- пограничные изменения – не относятся к острому отторжению, но являются его предикторами g0, t1, v0, i1;

- острое отторжение интерстициального типа (типы 1a, 1b)

Тип1a: g0-1, t2, v0, i2-3;

Тип2b: g0-2, t3, v0, i2-3;

- острое отторжение сосудистого типа (типы 2a, 2b)

Тип2a: g0-1, t0-1, v1, i2-3;

Тип2b: g0-2, t0-2, v2, i2-3;

-тяжелое острое отторжение

Тип 3: g2-3, t2-3, v3, i2-3;

При исследовании пункционных биоптатов аллотрансплантированной почки оценку наличия или отсутствия ACR проводят по следующим полуколичественным параметрам:

а) оценка степени воспаления клубочков (гломерулит-g): g0-нет гломерулита; g1- гломерулит <25% клубочков; g2 – гломерулит 25%-75% клубочков; g3- гломерулит всех или почти всех клубочков.

б) оценка стенки воспаления канальцев (тубулит-t): t0-отсутствие лимфоцитов в стенке канальцев; t1-1-4 лимфоцита в стенке поперечного среза канальца; t2-5-10 лимфоцитов в стенке канальца; t3-более 10 лимфоцитов в стенке поперечного среза канальца.

в) оценка степени воспаления стенки артерий (вакулиты-в): v0-артериит отсутствует; v1-эндартериит с воспалением <25% интимы по окружности хотя бы одной артерии; v2- эндартериит с воспалением >25% интимы по окружности хотя бы одной артерии; v3- тяжелый панартериит с некрозом гладкомышечных клеток и/или фибриноидным некрозом.

г) оценка степени воспаления интерстиция (i): i0 – отсутствие либо инфильтрация интерстиция лимфоцитами <10% кортикального слоя; i2 – 26-50% кортикального слоя инфильтрировано лимфоцитами; i3- инфильтрация лимфоцитами > 50% кортикального слоя.

Острое антителоопосредованное (гуморальное) отторжение (AMR) характеризуется острой стероидрезистентной дисфункцией трансплантата, положительной посттрансплантационной донорспецифической перекрестной пробой и наличием компонента комплимента C4d в перитубулярных капиллярах.

### ***Хроническое отторжение аллотрансплантированной почки***

По классификации Banff 97 при хроническом отторжении выявляется атрофия канальцев, склероз интерстициальной ткани, продуктивный эндартериит. В интерстиции как в зонах склероза так вне этих участков, различная степень очаговой инфильтрации мононуклеарными клетками, среди которых большое количество плазматических клеток. В артериальных ветвях – пролиферация соединительной ткани в интима с уменьшением сечения их просветов. Выявляется различная степень склеротического поражения клубочков. Нарушения кровообращения при хроническом отторжении ведет к развитию диффузного нефросклероза [118].

### ***Нефротоксичность ингибиторов кальциневрина***

Гистологическим признаком острой токсичности ингибиторов кальциневрина является появление вакуолизации в цитоплазме проксимальных отделов извитых канальцев, выявляемая с помощью окраски гематоксилином и эозином.

Хроническая нефротоксичность развивается не ранее чем через четыре месяца после трансплантации почки. Гистологически выявляется полосчатый склероз интерстициальной ткани, атрофия канальцев, нодулярный гиалиноз артериол и мелких артерий [118].

## **2.5 Определение диагностической значимости лабораторного теста**

В настоящем исследовании диагностическая значимость выражена показателями чувствительности (Se), специфичности (Sp), относительного риска (RR), диагностической эффективности (De), положительного и отрицательного прогностического значения теста (PPV и NPV соответственно), а также прогностической и диагностической эффективности (De) теста при выявлении острого или хронического отторжения трансплантата почки.

Чувствительность и специфичность тестов оценена посредством предварительного формирования следующих групп [119]:

- *истинно положительные случаи* (TP – True positives) – когда пробы пациентов с наличием признаков конкретных осложнений демонстрируют уровень биомаркера, выше его порогового значения;

- *истинно отрицательные случаи* (TN – True negatives) – случаи уровня биомаркера, ниже его порогового значения в пробах пациентов без осложнений;

- *ложноотрицательные случаи* (FN – False negatives) – случаи, при которых уровень биомаркера был ниже его порогового значения, однако у пациентов было установлено наличие исследуемого осложнения;

- *ложноположительные случаи* (FP – False positives) – пробы с уровнем биомаркера, превышающим его пороговое значение, однако отсутствием осложнения у пациентов.

Чувствительность теста (Se) представлена долей истинно положительных случаев:  $Se = TP / (TP + FN) \times 100\%$ , а специфичность (Sp) – долей истинно отрицательных случаев:  $Sp = TN / (TN + FP) \times 100\%$ . Диагностическая эффективность теста (De) выражена процентным соотношением суммы всех истинных случаев к общему числу полученных результатов:

$$De = (TN + TP) \times 100\% / (TN + TP + FN + FP);$$

$$PPV = TP \times 100\% / (TP + FP);$$

$$NPV = TN \times 100\% / (TN + FN).$$

С помощью ROC-анализа осуществлялась оценка диагностической силы теста, построена ROC-кривая. Так оптимальный порог отсечения для данной работы выявлен посредством определения наибольшего значения индекса Юдена.

## 2.6 Статистическая обработка результатов исследования

После проведения анализа все данные объединялись в таблицу MicrosoftOfficeExcel. Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel и пакета прикладных программ Statistica v. 13.0 (StatSoftInc, США). Для параметрических величин данные представлены средним арифметическим и стандартным отклонением ( $M \pm S.D.$ ), для непараметрических – медианой и интерквартильным размахом.

Для независимых – U-критерий Манна-Уитни. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена рассчитывался для оценки связи качественных и количественных порядковых признаков.

Для непараметрических переменных данные представлены медианой (M) и интерквартильным размахом [25%-75%], а для параметрических – верхней и нижней границами 95%-ого доверительного интервала (95% ДИ).

Для всех критериев и тестов критический уровень значимости принимался равным 5%, т.е. нулевая гипотеза отвергалась при  $p < 0,05$ .

### **ГЛАВА 3. АНАЛИЗ УРОВНЯ TGF- $\beta$ 1 У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧКИ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ**

Согласно данным отечественной и зарубежной литературы, биомаркер TGF- $\beta$ 1 принимает участие в ряде системных процессов организма, а повышенная концентрация связана с рядом посттрансплантационных осложнений реципиентов солидных органов, что характеризует TGF- $\beta$ 1 в качестве перспективного биомаркера [55].

В настоящей главе описаны следующие этапы исследования:

- анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови здоровых лиц и реципиентов почки;
- сравнительный анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови реципиентов, в зависимости от возраста, пола;
- сравнительный анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 в зависимости от вида и срока после трансплантации;
- определение связи концентрации TGF- $\beta$ 1 с клиническими и лабораторными данными реципиентов почки;
- исследование связи уровня TGF- $\beta$ 1 с концентрацией такролимуса в крови реципиентов почки.

#### **3.1 Клиническая характеристика пациентов включенных в исследование**

В исследование включены 129 реципиентов почки среди них 62 (48%) мужчин и 67 (52%) женщин в возрасте от 17 до 68 (в среднем  $41,2 \pm 12,7$ ) лет. Основная доля пациентов 78% перенесли аллотрансплантацию почки от посмертного донора (АТП), остальные 22% – от живого родственного донора (РАТП). Срок наблюдения реципиентов составлял от 2 до 4748 суток (медиана - 345 суток); 76% пациентов обследованы в отдаленные сроки

(более 1 месяца с момента трансплантации). Сохранная функция трансплантата при этом была у 34 (26%) реципиентов, у 95 (74%) отмечались признаки дисфункции трансплантат, а именно: высокие показатели азотистого обмена, присутствие белка в моче, снижение СКФ.

Сравнение проводилось с контрольной группой здоровых лиц (n=35), существенно не отличающихся по возрасту и гендерной принадлежности от основной исследуемой группы (Таблица 2).

**Таблица 2 – Характеристика групп пациентов, включенных в исследование**

Параметр	Реципиенты почки	Здоровые лица
<b>Число наблюдаемых реципиентов, n</b>	<b>129</b>	<b>35</b>
<b>Пол, n (%):</b>		
<i>Мужской</i>	62(48%)	18(52%)
<i>Женский</i>	67(52%)	17(48%)
<b>Возраст, лет:</b>		
<i>диапазон вариаций</i>	от 17 до 68	от 21 до 64
<i>медиана [интерквартильный размах]</i>	40 [33;51]	38[26;50]
<b>Вид трансплантации n (%):</b>		
<i>АТПП</i>	101(78,3%)	—
<i>РАТПП</i>	28(21,7%)	—
<b>Сроки после трансплантации почки n (%):</b>		
<i>Ранние (до 1 месяца)</i>	31(24%)	—
<i>Отдалённые (больше 1 месяца)</i>	98(76%)	—
<b>Длительность наблюдения, сутки:</b>		
<i>диапазон вариаций</i>	от 2 до 4748	—
<i>медиана [интерквартильный размах]</i>	325 [39; 1448]	—
<b>Функция трансплантата, n (%):</b>		
<i>нормальная функция</i>	34 (26%)	—
<i>признаки дисфункции</i>	95 (74%)	—
<b>Концентрация TGF- <math>\beta</math>1, нг/мл:</b>		
<i>медиана</i>	104,0	6,66
<i>[интерквартильный размах]</i>	[79,10; 138,80]	[3,87; 17,45]

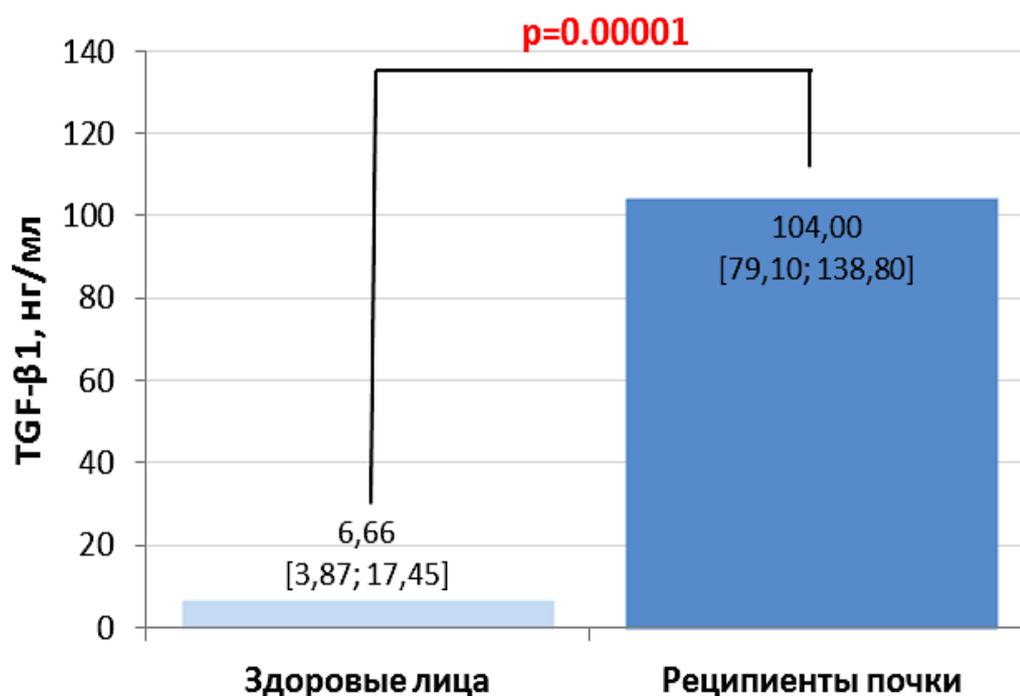
В таблице 2 представлены медианы значений концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови здоровых лиц и реципиентов почки.

### 3.2 Сравнительная оценка концентрации TGF-β1 в сыворотке крови реципиентов почки и здоровых лиц

Проведен сравнительный анализ медиан концентраций TGF-β у реципиентов почки и здоровых лиц.

У реципиентов почки концентрация TGF-β1 в сыворотке крови достоверно выше в сравнении со здоровыми лицами ( $p=0,00001$ ), что может свидетельствовать о возможном участии TGF-β1 в развитии почечной недостаточности.

Результаты сравнительного анализа концентрации TGF-β1 в исследуемых группах отражены на рисунке 2.



*Рисунок 2 – Сравнительный анализ концентрации TGF-β1 в сыворотке крови реципиентов почки и здоровых лиц*

### 3.3 Анализ связи концентрации TGF-β1 с клинико-демографическими данными реципиентов почки

Концентрация TGF-β1 в сыворотке крови лиц, вошедших в исследование, варьировала в широких пределах, и не коррелировала с возрастом ( $r=0,09$ ;  $p=0,18$ ).

Оценены показатели медиан концентрации TGF-β1 у реципиентов мужского и женского пола.

В таблице 3 представлены медианы значений концентрации TGF-β1 у мужчин и женщин.

**Таблица 3 – Сравнительный анализ концентрации TGF-β1 у реципиентов почки различной гендерной принадлежности**

Реципиенты почки	Концентрация TGF-β1 медиана [интерквартильный размах]	Достоверность, р
мужчины	96,7 [91,9; 141,7]	0,37
женщины	92,1 [74,4; 137,5]	

Сравнительный анализ у реципиентов мужского и женского пола, не выявил достоверных различий ( $p=0,37$ ).

Оценены показатели концентрации TGF-β1 в зависимости от вида трансплантации от живого родственного донора РАТП или от посмертного донора АТПП (Таблица 4).

**Таблица 4 – Сравнительный анализ концентрации TGF-β1 при родственной трансплантации и трансплантации от посмертного донора**

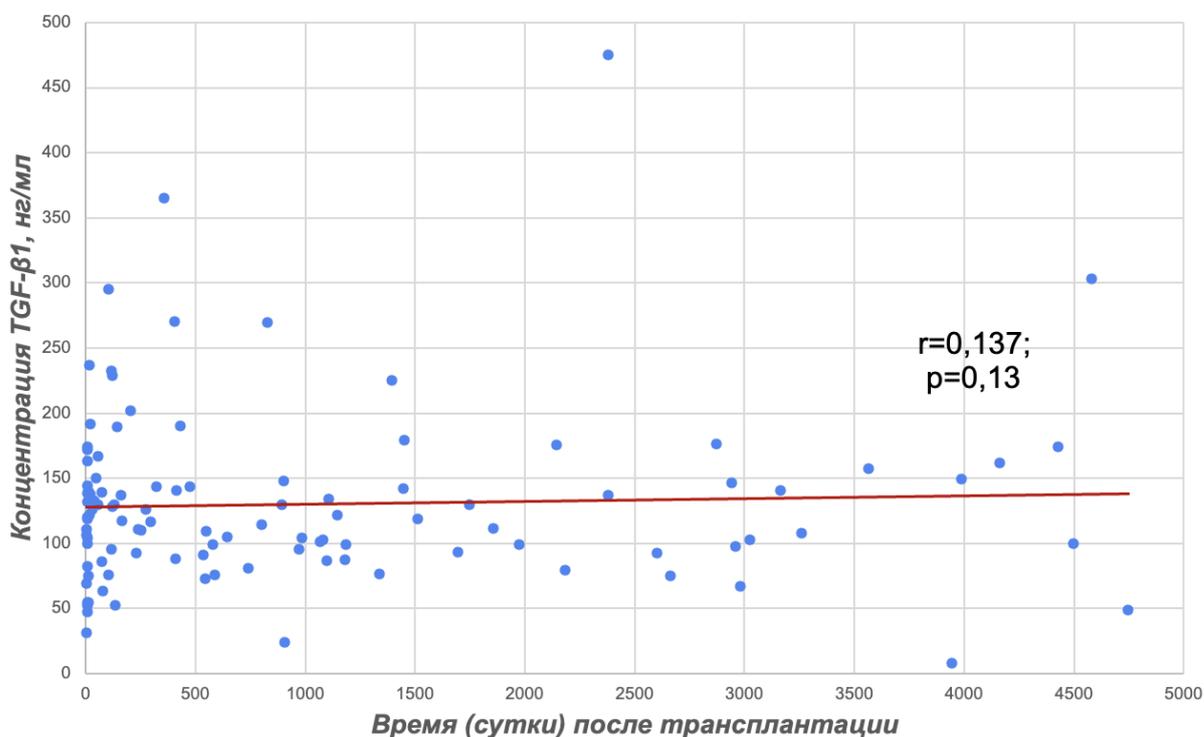
Вид трансплантации	Концентрация TGF-β1 медиана [интерквартильный размах]	Достоверность, р
РАТП	116,25 [89,22; 144,10]	0,32
АТПП	101,4 [78,40; 135,58]	

\* АТПП – аллотрансплантация почки; РАТП – родственная аллотрансплантация почки

Сравнительный анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 у реципиентов с родственной трансплантацией и трансплантацией от посмертного донора не выявил достоверных различий ( $p=0,32$ ).

Проанализирована зависимость уровня TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови реципиентов от длительности времени, прошедшего с момента трансплантации.

На рисунке 3 представлен корреляционный анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 и длительности времени (сутки), прошедшего с момента трансплантации.



**Рисунок 3 – Корреляционный анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 и длительностью времени (сутки), прошедшего с момента трансплантации**

Отсутствовала значимая корреляция уровня TGF- $\beta$ 1 с длительностью времени (сутки), прошедшего с момента трансплантации ( $r=0,137$ ;  $p=0,13$ ).

Результаты сравнительного анализа концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови реципиентов в ранний (до 1 мес.) и отдаленный (более 1 мес.) послеоперационный период представлены в таблице 5.

**Таблица 5 – Сравнительный анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 у реципиентов почки в раннем и отдалённом периоде после трансплантации**

<b>Период после трансплантации</b>	<b>Концентрация TGF-<math>\beta</math>1 медиана [интерквартильный размах]</b>	<b>Достоверность, р</b>
<b>Ранний</b> (до 1 месяца)	104,2 [74,8; 131,6]	0,47
<b>Отдаленный</b> (более 1 месяца)	109,5 [86; 141,7]	

Не выявлено значимых различий концентрации TGF- $\beta$ 1 у реципиентов почки в ранние и отдаленные сроки после трансплантации (p=0,47).

### **3.4 Анализ связи концентрации TGF- $\beta$ 1 с величиной лабораторных показателей реципиентов почки**

Проведен корреляционный анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 у реципиентов почки с основными лабораторными данными, к которым относились показатели клинического и биохимического анализа крови, общего анализа мочи, а также концентрацией такролимуса в сыворотке крови и скоростью клубочковой фильтрации (СКФ) почек.

*Анализ связи концентраций TGF-β1 с величиной показателей  
общеклинического анализа крови*

Данные общеклинического анализа крови составили следующие параметры: содержание гемоглобина, лейкоцитов, тромбоцитов.

У большинства реципиентов средние значения общеклинических показателей не выходили за пределы референсных значений (Таблица 6).

**Таблица 6 – Медианы показателей общего анализа крови у реципиентов почки и референсные значения**

Параметры общего анализа крови	Медиана [интерквартильный размах]	Референсные значения
Гемоглобин (г/л)	105 [95;120]	110 – 170
Лейкоциты (10 <sup>9</sup> /л)	7,3[5,8;8,9]	4,0 – 9,0
Тромбоциты (10 <sup>9</sup> /л)	223[180;281]	150 – 380

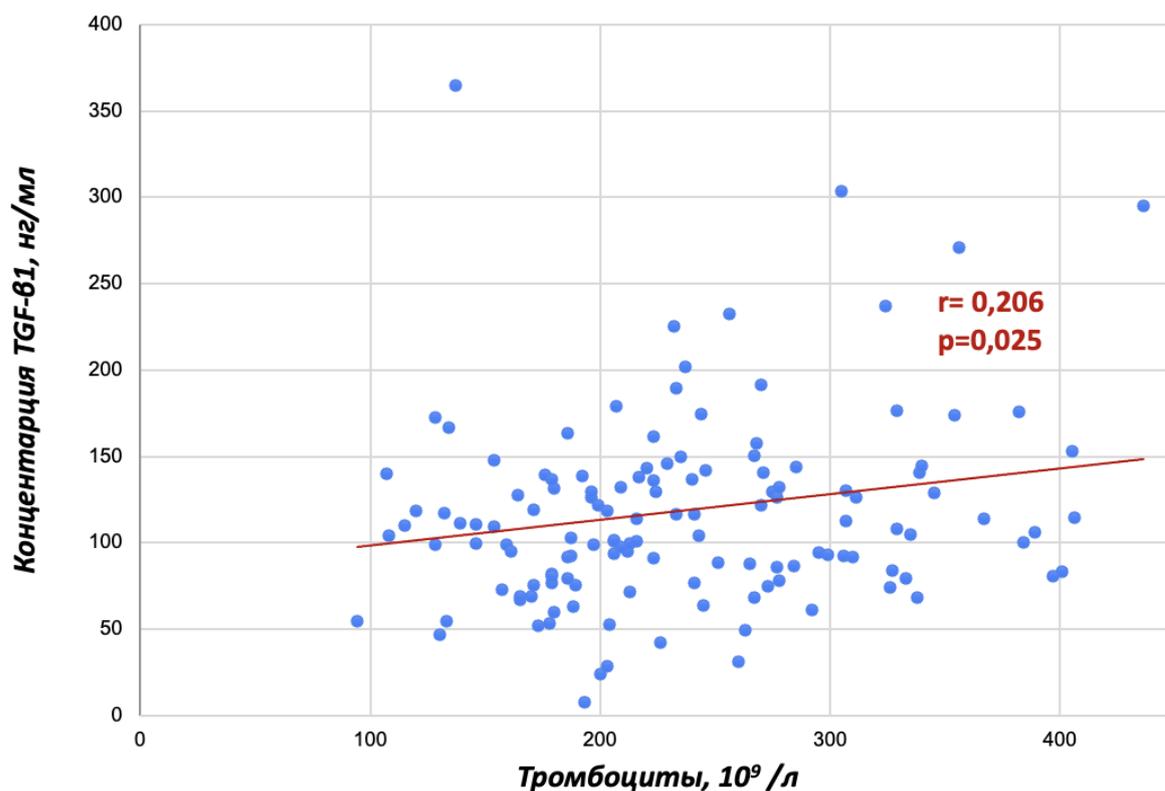
Проведен корреляционный анализ между содержанием в сыворотке крови реципиентов почки TGF-β1 и величиной показателей общего анализа крови.

Результаты корреляционного анализа указанных показателей крови и концентрации TGF-β1 отражены в таблице 7 в виде значений коэффициента корреляции Спирмена (r) и уровня значимости (p).

**Таблица 7 – Корреляционный анализ концентрации TGF-β1 и показателей общего анализа крови у реципиентов почки**

Параметры общего анализа крови	Корреляция Спирмена	
	r	p
Гемоглобин (г/л)	r= 0,037	p=0,689
Лейкоциты (10 <sup>9</sup> /л)	r= 0,075	p=0,496
Тромбоциты (10 <sup>9</sup> /л)	<b>r= 0,206</b>	<b>p=0,025</b>

Корреляционный анализ показал наличие прямой связи концентрации TGF-β1 с содержанием в крови тромбоцитов (r=0,206; p=0,025), рисунок 4.



**Рисунок 4 – Корреляционный анализ концентрации TGF-β1 и тромбоцитов в крови реципиентов почки**

***Анализ связи концентраций TGF-β1 с показателями биохимического анализа крови***

Изучена связь концентрации TGF-β1 с биохимическими параметрами крови: активностью АЛТ, АСТ, креатинина, мочевины, общего белка и глюкозы.

У включенных в исследование реципиентов почки средние величины большинства биохимических показателей находились в пределах референсных значений (Таблица 8).

**Таблица 8 – Медиана уровня биохимических показателей крови у реципиентов почки и референсные значения**

Параметры биохимического анализа крови	Значения	
	Медиана [интерквартильный размах]	Референсные
Белок общий (г/л)	65,9[60,0;71]	66,0 - 83,0
Мочевина (ммоль/л)	13,7[8,8;23,5]	2,1 - 7,1
Креатинин (мкмоль/л)	162,5[98;346]	59,0 - 104,0
АЛТ (Ед/л)	16,7[12,8;25,9]	0,0 - 65,0
АСТ (Ед/л)	20,6[14,9;27,3]	0,0 - 50,0
Глюкоза (ммоль/л)	5,4[4,5;6,7]	4,1 - 5,9

Однако медиана содержания мочевины значительно превышала верхнюю границу показателей референсного диапазона и в среднем составляли 13,7ммоль/л. Также значительно превышало содержание в крови креатинина, при референсных значениях 59,0 - 104,0 мкмоль/л его уровень составлял 162,5 мкмоль/л.

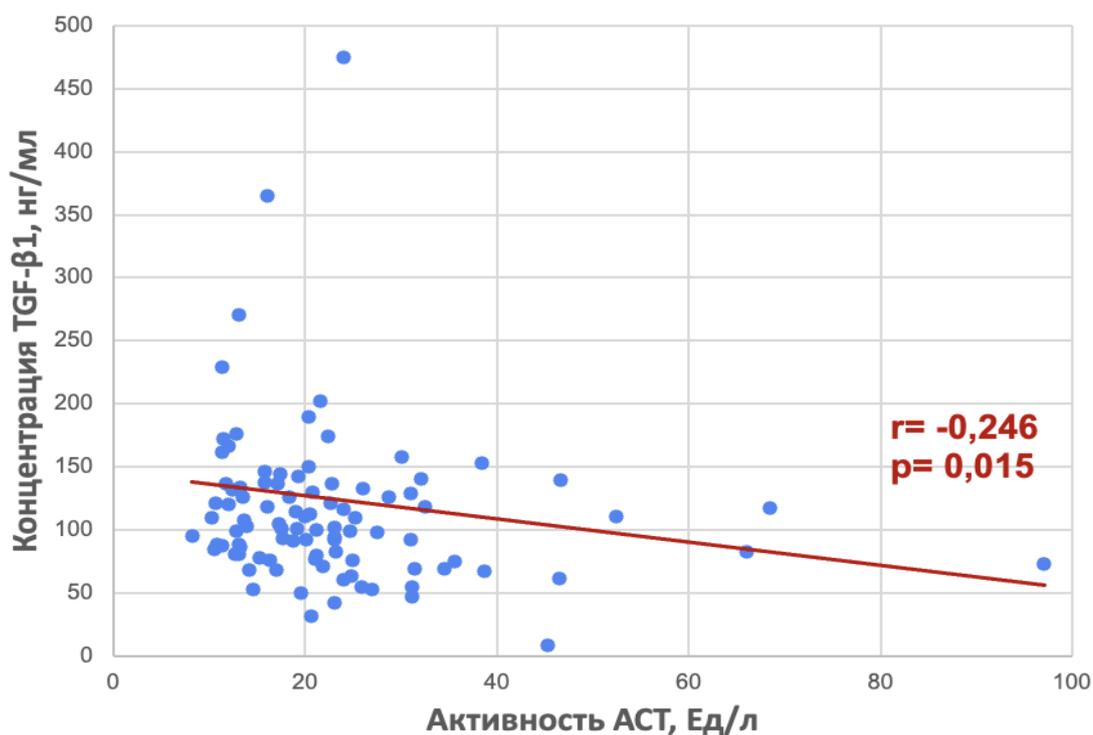
Основную долю реципиентов почки, включённых в исследование, составили пациенты с признаками дисфункции трансплантата, что подтверждается полученными данными о нарушении экскреторной функции почек.

Проведен корреляционный анализа концентрации TGF- $\beta$ 1 и основных параметров биохимического анализа крови: креатинина, мочевины, общего белка, глюкозы и активностью трансаминаз (АЛТ, АСТ), результаты которого представлены в таблице 9.

**Таблица 9 – Корреляционный анализ концентрации TGF-β1 с показателями биохимического анализа крови у реципиентов почки**

Параметры биохимического анализа крови	Корреляция Спирмена	
	г	р
Белок общий (г/л)	r= -0,115	p= 0,234
Мочевина (ммоль/л)	r= 0,111	p= 0,219
Креатинин (мкмоль/л)	r= 0,121	p= 0,179
АЛТ (Ед/л)	r= -0,095	p= 0,355
АСТ (Ед/л)	<b>r= -0,246</b>	<b>p= 0,015</b>
Глюкоза (ммоль/л)	r= 0,102	p= 0,308

Как видно из таблицы 9, отсутствовала значимая связь уровня TGF-β1 с большинством биохимических показателей, однако имела место обратная корреляция уровня TGF-β1 с активностью трансаминазы АСТ (r=-0,246; p=0,015) (Рисунок 5).



**Рисунок 5 – Корреляционный анализ концентрации TGF-β1 и активности трансаминазы АСТ в крови реципиентов почки**

***Анализ связи концентрации TGF-β1 с основными показателями общего анализа мочи***

Важное диагностическое значение при оценке функции почечного трансплантата имеют лабораторные показатели общего анализа мочи, такие как белок, эритроциты и лейкоциты. Увеличение этих показателей при повторных исследованиях явно указывает на наличие патологического процесса в почках.

***Таблица 10 – Значения медианы лабораторных показателей общего анализа мочи у реципиентов почки и референсные значения***

<b>Параметры общего анализа мочи</b>	<b>Медиана [интерквартильный размах]</b>	<b>Референсные значения</b>
<b>Белок (г/л)</b>	0,105 [0,032;0,305]	0,012г/л
<b>Эритроциты в п/зр.</b>	5[2;15]	до 3 в п/зр.
<b>Лейкоциты в п/зр.</b>	5[2;10]	до 5 в п/зр.

У всех, включенных в исследование, реципиентов почки показатели общего анализа мочи, превышали абсолютные референсные значения (0,012 г/л и 3 и 5 клеток в поле зрения – соответственно).

Изучена связь концентрации TGF-β1 с основными показателями общего анализа мочи. Результаты представлены в таблице 11.

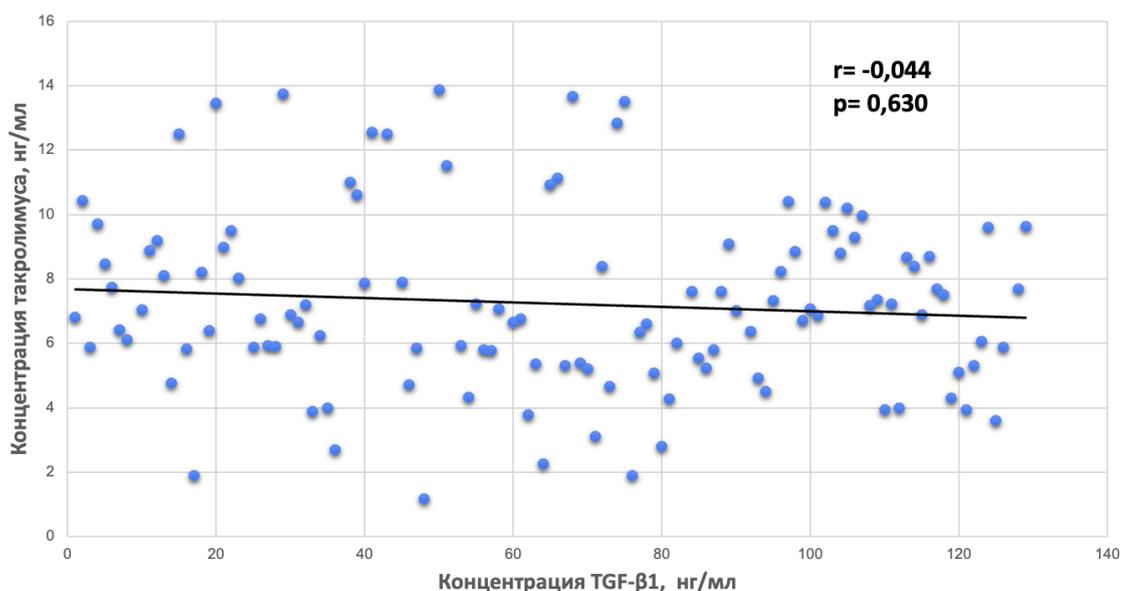
***Таблица 11 – Корреляционный анализ концентрации TGF-β1 с показателями общего анализа мочи у реципиентов почки***

<b>Параметры общего анализа мочи</b>	<b>Корреляция Спирмена</b>	
	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>Белок (г/л)</b>	<b>r= 0,280</b>	<b>p= 0,001</b>
<b>Эритроциты в п/зр.</b>	<b>r= 0,354</b>	<b>p= 0,00001</b>
<b>Лейкоциты в п/зр.</b>	<b>r= 0,245</b>	<b>p= 0,006</b>

Статистический анализ показал наличие значимой прямой корреляции TGF-β1 с содержанием в моче белка (r=-0,280; p=0,001), эритроцитов (r=0,354; p=0,00001), лейкоцитов (r=0,245; p=0,006).

***Анализ связи концентрации TGF- $\beta$ 1 с концентрацией такролимуса в крови у реципиентов почки***

Так как все реципиенты получали иммуносупрессивную терапию, была изучена связь концентрации TGF- $\beta$ 1 с содержанием такролимуса в сыворотке крови (Рисунок 6).

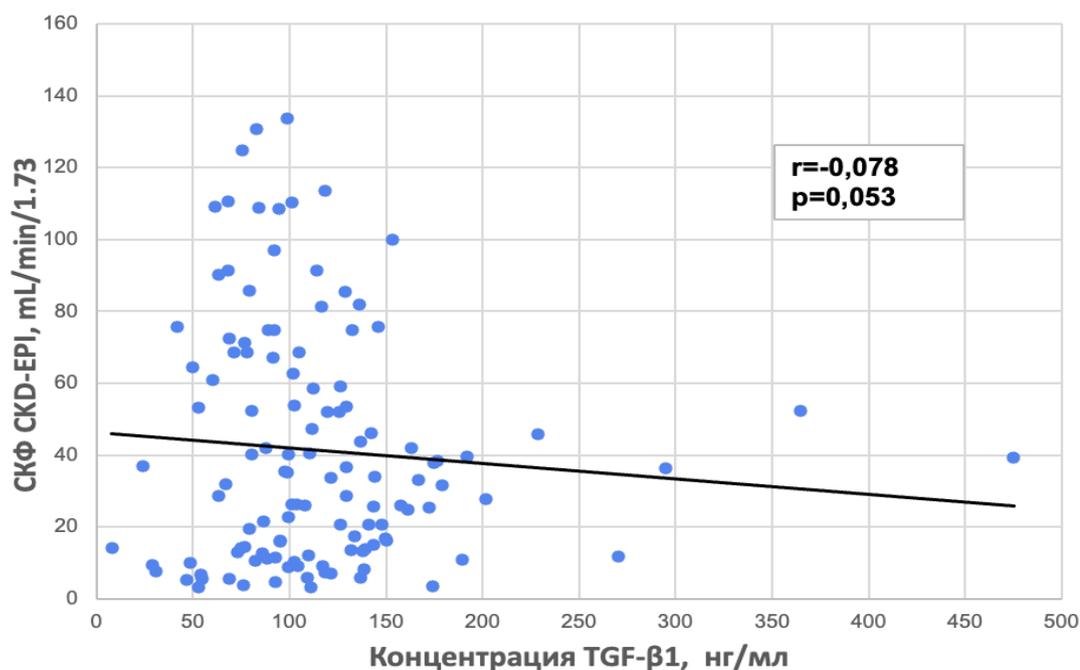


***Рисунок 6 – Корреляционный анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 и концентрации такролимуса в крови реципиентов почки***

Результаты, представленные на рисунке 6, показали отсутствие достоверной связи уровня TGF- $\beta$ 1 с концентрацией такролимуса.

***Анализ связи концентрации TGF- $\beta$ 1 с СКФ у реципиентов почки***

Изучена связь концентрации TGF- $\beta$ 1 с скоростью клубочковой фильтрации у реципиентов почки (Рисунок 7).



**Рисунок 7 – Корреляционный анализ концентрации TGF-β1 и СКФ у реципиентов почки**

Корреляционный анализ показал отсутствие достоверной связи уровня TGF-β1 с СКФ.

Согласно данным, приведенным в настоящей главе, концентрация TGF-β1 в сыворотке крови реципиентов почки варьирует в широких пределах и достоверно выше, чем у группой здоровых лиц ( $p=0,00001$ );

Уровень TGF-β1 значимо не различался в группах мужчин и женщин, а также не коррелировал с возрастом пациентов. Также не было значимых различий в концентрации TGF-β1 у от живого родственного или посмертного донора. Концентрация TGF-β1 не коррелировала с длительностью срока, прошедшего с момента после трансплантации, и не различалась у реципиентов в раннем (менее 30 дней) и отдаленном (более 30 дней) посттрансплантационном периоде.

Результаты статистического анализа показали отсутствие достоверной связи TGF-β1 с большинством общеклинических и биохимических лабораторных показателей. Обнаружена прямая корреляция с содержанием

тромбоцитов ( $r=0,206$ ;  $p=0,025$ ), и обратной корреляции с активностью трансаминазы АСТ ( $r=-0,213$ ;  $p=0,024$ ) в крови. Также не выявлено значимой корреляции TGF- $\beta$ 1 со скоростью клубочковой фильтрации (СКФ), рассчитанной по формуле СКД-ЕРІ.

Вместе с тем, показана значимая прямая корреляция концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови с содержанием эритроцитов ( $r=0,354$ ;  $p=0,00001$ ), лейкоцитов ( $r=0,245$ ;  $p=0,006$ ) и белка ( $r=-0,280$ ;  $p=0,001$ ) в моче.

Данные, представленные в настоящей главе, отражают наличие связи TGF- $\beta$ 1 с почечной патологией, а также с рядом основных клинических и лабораторных показателей, рутинно применяемых для диагностики системных нарушений в организме.

#### **ГЛАВА 4. АНАЛИЗ КОНЦЕНТРАЦИЙ TGF- $\beta$ 1 ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ПУНКЦИОННЫХ БИОПТАТОВ АЛЛОТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПОЧКИ**

В предыдущем разделе настоящего исследования представлены данные, отражающие связи уровня TGF- $\beta$ 1 с рядом основных клинических и лабораторных показателей; в настоящей главе представлены результаты анализа концентраций TGF- $\beta$ 1 в группе реципиентов почек с дисфункцией нефротрансплантата.

Из всех 129 включенных в исследование реципиентов 95 пациентов на основании лабораторных и клинических данных были отнесены к группе «с дисфункцией трансплантата» и 34 обозначены как реципиенты «с нормальной функцией».

Выполнены следующие этапы:

- проанализирован уровень TGF- $\beta$ 1 и проведен сравнительный анализ клинических и лабораторных показателей у реципиентов с дисфункцией нефротрансплантата и у реципиентов с нормальной функцией;
- на основании результатов морфологического исследования биоптатов почки выявлены следующие варианты патологий: острый канальцевый некроз, острое клеточное отторжение (ACR), острое гуморальное отторжение (AMR), не связанный с иммунным ответом интерстициальный фиброз с признаками нефротоксичности ингибиторов кальциневрина (CNI-нефротоксичность), возвратный гломерулонефрит в исходе хронического отторжения;
- проведен сравнительный анализ уровня TGF- $\beta$ 1 у реципиентов почки с морфологически верифицированной патологией трансплантата различного генеза и реципиентов без дисфункции трансплантата

#### 4.1 Анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови и лабораторных показателей функции почек у реципиентов с дисфункцией нефротрансплантата и у реципиентов с нормальной функцией

На основании клинических и результатов лабораторных исследований, в первую очередь креатинина и мочевины в крови, а также белка в моче и снижения СКФ, у 95 реципиентов была диагностирована дисфункция трансплантата.

Остальные 34 реципиента не имели лабораторных и клинических признаков дисфункции и были отнесены в группу «без дисфункции».

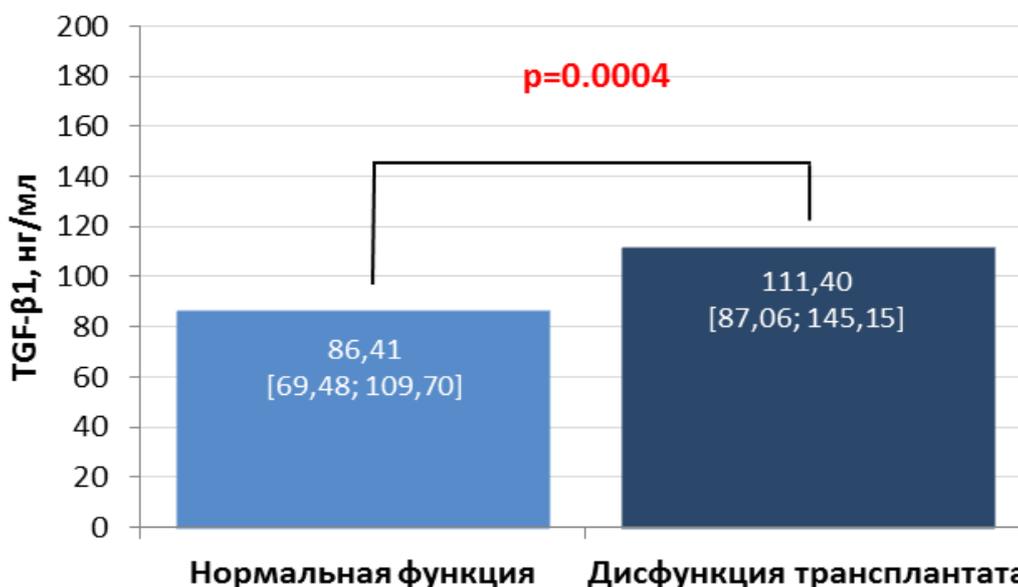
В таблице 12 представлена характеристика групп реципиентов почки с дисфункцией и нормальной функцией.

**Таблица 12 – Характеристика групп реципиентов почки с дисфункцией трансплантата и без таковой**

Параметр	Дисфункция трансплантата	Нормальная функция
Число реципиентов, n	95	34
Пол, n (%):		
<i>Мужской</i>	49(52%)	13(38%)
<i>Женский</i>	46(48%)	21(62%)
Возраст, лет:		
<i>диапазон вариаций</i>	от 17до 68	от 17до 64
<i>медиана [интерквартильный размах]</i>	40 [33;50]	45[31;58]

Как видно из таблицы исследуемые группы значимо не различались по возрасту и гендерному составу.

Проведен сравнительный анализ концентраций TGF- $\beta$ 1 у реципиентов почки с дисфункцией и нормальной функцией трансплантата. (Рисунок 8).



**Рисунок 8 – Сравнительный анализ концентрации TGF- $\beta$ 1 у реципиентов с нормальной функцией и у реципиентов с дисфункцией трансплантата**

Как показано на рисунке, у реципиентов почки с дисфункцией трансплантата, уровень TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови достоверно выше, в сравнении с группой реципиентов с нормальной функцией ( $p=0,0004$ ).

Для сравнения двух групп реципиентов учитывались основные клинические и лабораторные показатели, которые свидетельствовали о нарушении почечной экскреторной функции. Среди них: содержание креатинина и мочевины в крови и белка в моче. Для исследования фильтрационной способности почек определяли скорость клубочковой фильтрации (СКФ) с помощью формулы СКД-ЕРІ. Результаты сравнительного анализа представлены в таблице 13.

**Таблица 13 – Сравнительный анализ лабораторных показателей функции почек у реципиентов с дисфункцией трансплантата и без таковой**

Показатель	Нормальная функция	Дисфункция трансплантата	Уровень значимости
Креатинин в крови, мкмоль/л	85,30 [71,50; 95,00]	250,05 [160,76; 425,23]	<b>p&lt;0,00001</b>
Мочевина в крови, ммоль/л	7,69 [6,20; 8,80]	19,88 [12,86; 28,10]	<b>p&lt;0,00001</b>
Белок в моче, г/л	0,03 [0,03; 0,04]	0,14 [0,04; 0,40]	<b>p&lt;0,00001</b>
СКФ, мл/мин	81,30 [68,50; 100,00]	20,80 [11,35; 36,50]	<b>p&lt;0,00001</b>

Как видно из таблицы 13, у реципиентов почки с дисфункцией трансплантата при сравнении с реципиентами без таковой имели место значимо более высокие уровни креатинина и мочевины в крови, белка в моче ( $p<0,00001$ ), а также значимо более низкие показатели скорости клубочковой фильтрации (СКФ).

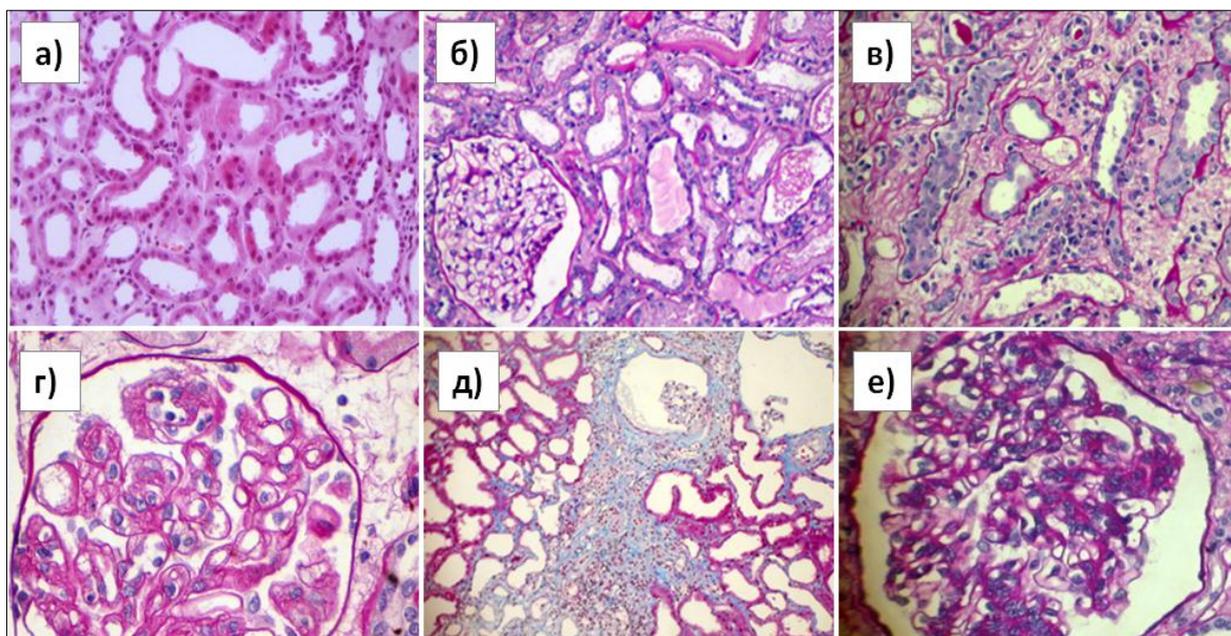
#### **4.2 Характеристика вариантов патологии трансплантата, выявленной по результатам морфологических исследований биопсийного материала, у реципиентов с дисфункцией трансплантированной почки**

Для наиболее точной диагностики патологии нефротрансплантата осуществлялось гистохимическое и иммуногистохимическое исследование биопсийного материала, взятого в процессе пункционной биопсии трансплантированной почки у реципиентов с дисфункцией трансплантата.

На основании результатов морфологического исследования биоптатов у реципиентов с дисфункцией трансплантата выделены следующие варианты патологии: острый канальцевый некроз раннего посттрансплантационного периода (ОКН), острое клеточное отторжение (англ., acute cellular rejection;

ACR), острое гуморальное отторжение (англ., antibody mediated rejection, AMR), интерстициальный фиброз с признаками нефротоксичности ингибиторов кальциневрина (англ., calcineurin inhibitors, CNI-нефротоксичность) не связанный с иммунным ответом, возвратный гломерулонефрит (хроническое отторжение трансплантата).

На рисунке 9 представлены примеры изображения образцов биоптатов почки с указанными вариантами патологий.



**Рисунок 9 – Изображение образцов биоптатов почки с окрашиванием гематоксилином и эозином: а) норма, окраска Трихромом по Массону \* 40; б) Острый канальцевый некроз (ОКН) Окраска PAS \* 100; в) острое клеточное интерстициальное отторжение (ACR), окраска PAS \* 100; г) гуморальное отторжение, трансплантационная гломерулопатия (AMR), краска PAS \* 200; д) Интерстициальный фиброз при CNI-нефротоксичности, окраска Трихромом по Массону \* 40; е) возвратный гломерулонефрит (IgA-нефропатия)**

Среди обследуемых реципиентов 95 реципиентов были отнесены к группе «с дисфункцией трансплантата», в их числе: 11 реципиентов с острым канальцевым некрозом в возрасте от 21 до 60 (в среднем  $41,3 \pm 15,6$ ) лет, 26 реципиентов с острым клеточным отторжением в возрасте от 17 до 63 (в среднем  $37,8 \pm 14,3$ ) лет, 35 реципиентов с острым гуморальным отторжением

в возрасте от 17 до 68 (в среднем  $40,5 \pm 15,2$ ) лет, 13 реципиентов с интерстициальным фиброзом с признаками нефротоксичности ингибиторов кальциневрина в возрасте от 22 до 56 (в среднем  $44,5 \pm 14,4$ ) лет, 10 реципиентов с возвратным гломерулонефритом (хроническое отторжение трансплантата) в возрасте от 38 до 53 (в среднем  $45 \pm 12,1$ ) лет.

В таблице 14 представлена характеристика реципиентов с патологией трансплантата диагностированной на основании морфологического исследования биоптата.

**Таблица 14 – Характеристика групп реципиентов на основании морфологического исследования биоптатов**

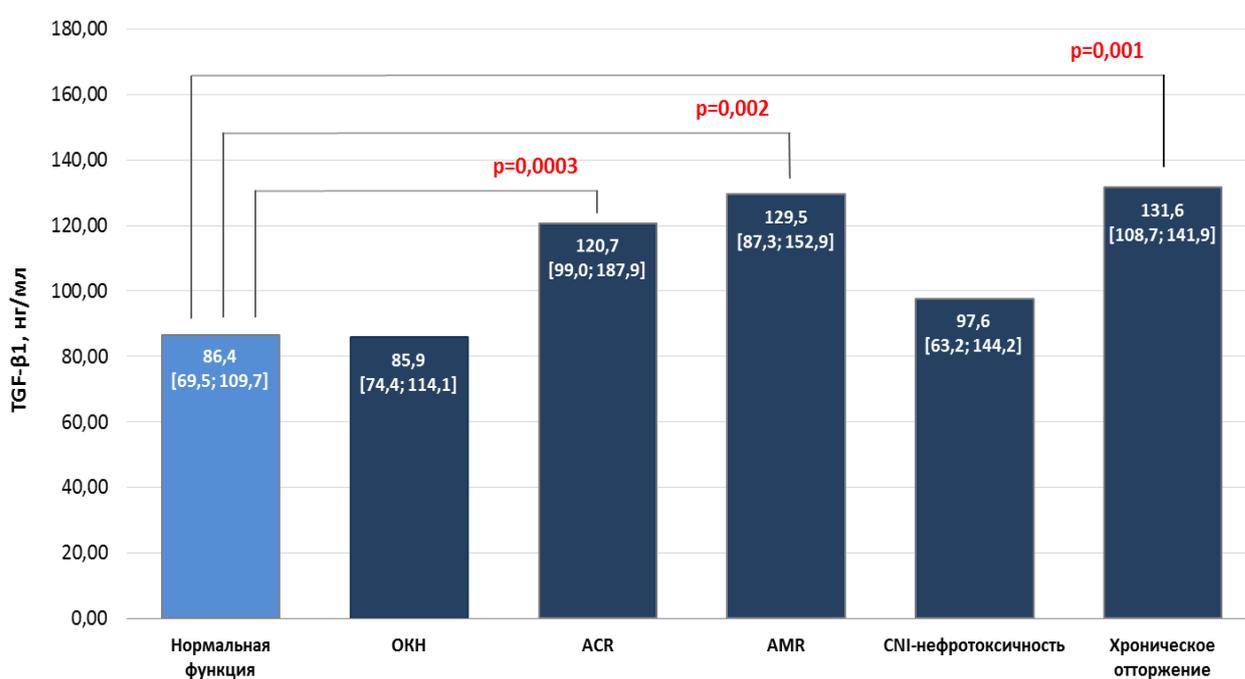
Патологии трансплантата	ОКН	ACR	AMR	CNI-нефротоксичность	Хроническое отторжение
Доля среди общего числа реципиентов с дисфункцией трансплантата, %	11,6	27,4	36,9	13,6	10,5
Возраст, лет	от 21 до 60 $41,3 \pm 15,6$	от 17 до 63 $37,8 \pm 14,3$	от 17 до 68 $40,5 \pm 15,2$	от 22 до 56 $44,5 \pm 14,4$	От 38 до 53 $45 \pm 12,1$
Пол, n (%)					
Мужской	6 (55%)	13(50%)	18(51%)	5 (38,5%)	6 (60%)
Женский	5(45%)	13(50%)	17(49%)	8 (61,5%)	4 (40%)

*ОКН – острый канальцевый некроз; ACR – острое клеточное отторжение; AMR – острое гуморальное отторжение; CNI-нефротоксичность интерстициальный фиброз с признаками нефротоксичности ингибиторов кальциневрина;*

Группы пациентов с дисфункцией трансплантата существенно не различались по полу и возрасту.

### 4.3 Сравнительный анализ концентрации TGF-β1 в сыворотке крови реципиентов с гистологическими и иммуногистохимическими признаками патологии нефротрансплантата

Проведен сравнительный анализ концентрации TGF-β1 в сыворотке крови реципиентов с дисфункцией трансплантата с различными видами патологий выявленной при гистохимическом и иммуногистохимическом исследовании биоптатов трансплантированной почки и реципиентов без дисфункции трансплантата. (Рисунок 10)



*ОКН – острый канальцевый некроз; ACR – острое клеточное отторжение; AMR – острое гуморальное отторжение; CNI-нефротоксичность интерстициальный фиброз с признаками нефротоксичности ингибиторов кальциневрина;*

**Рисунок 10 – Сравнительный анализ уровня TGF-β1 в крови реципиентов почки с дисфункцией трансплантата различной этиологии**

Сравнительный анализ показал достоверно более высокие уровни TGF-β1 у реципиентов с ACR ( $p=0,0003$ ), AMR ( $p=0,002$ ) и хроническим отторжением ( $p=0,001$ ) в сравнении с реципиентами без дисфункции. Значимых различий уровня TGF-β1 при ОКН или CNI-нефротоксичности в

сравнении с реципиентами с нормальной функцией трансплантата не установлено ( $p=0,82$  и  $p=0,36$ , соответственно).

Учитывая, что у реципиентов с острым гуморальным и клеточным и хроническим отторжением в основе патологических изменений в трансплантате лежат иммунные механизмы, эти реципиенты были объединены в группу с «иммунными механизмами» повреждения трансплантата.

Реципиенты с ОКН и CNI-нефротоксичностью составили группу с дисфункцией трансплантата, обозначенную как «иные процессы».

Анализ диагностической значимости уровня TGF- $\beta$ 1 в этих группах стал предметом изучения следующей главы нашей работы.

## **ГЛАВА 5. АНАЛИЗ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ УРОВНЯ TGF- $\beta$ 1 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ РЕЦИПИЕНТОВ С ДИСФУНКЦИЕЙ ТРАНСПЛАНТАТА, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ИММУННЫМИ МЕХАНИЗМАМИ**

Реципиенты почки с острым клеточным, острым гуморальным и хроническим отторжением (ACR, AMR и хроническое отторжение соотв.), ведущую роль в развитии которых играют иммунные процессы, были объединены в группу с «иммунными механизмами» повреждения трансплантата. Пациенты с острым канальцевым некрозом и интерстициальным фиброзом, вызванным нефротоксичностью ингибиторов кальциневрина (ОКН и CNI-нефротоксичность соотв.) составили группу с дисфункцией трансплантата, обозначенную как «неиммунные процессы».

Настоящая глава включает следующие этапы исследования:

- сравнительный анализ уровня TGF- $\beta$ 1 у реципиентов почки с повреждением нефротрансплантата иммунной и иной природы;
- сравнительный анализ величины классических лабораторных параметров функции почек у реципиентов с повреждениями иммунной и неиммунной природы;
- оценку диагностической значимости концентрации TGF- $\beta$ 1 для выявления дисфункции трансплантата, вызванной иммунными процессами;
- определение пороговой концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови реципиентов почки для выявления пациентов с острым или хроническим отторжением трансплантата;
- оценку диагностических характеристик теста для выявления пациентов с высоким риском развития отторжения нефротрансплантата;

## 5.1 Сравнительный анализ концентрации TGF-β1 у реципиентов с повреждением нефротрансплантата иммунной и иной природы

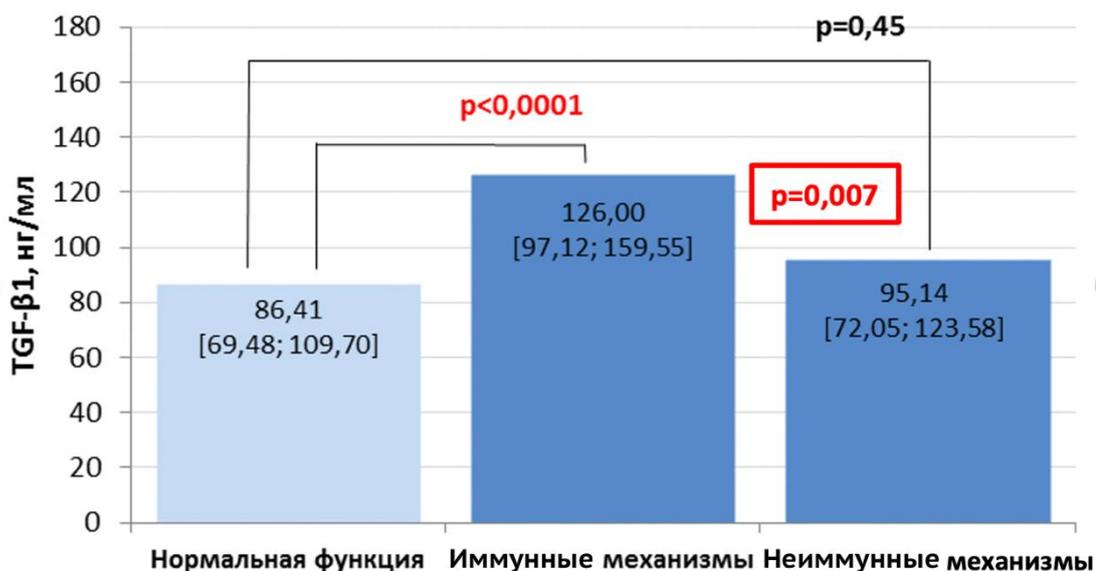
Природа повреждения трансплантата может быть различного генеза, но именно участие иммунных клеток и цитокинов в реакции отторжения позволяет предположить, что увеличение концентрации TGF-β в крови может быть связано именно с «иммунными механизмами» повреждения трансплантата, в отличие от повреждений, вызванных иными процессами.

В таблице 15 приведена характеристика групп с дисфункцией трансплантата, вызванной «иммунными» и «неиммунными» механизмами

*Таблица 15 – Характеристика групп реципиентов с «иммунными механизмами» повреждения, «неиммунными механизмами» и без дисфункции*

Параметр	Повреждение нефротрансплантата связанное с «иммунными механизмами»	Повреждение нефротрансплантата связанное с иными процессами	Нормальная функция
<b>Число наблюдаемых реципиентов, n</b>	<b>71</b>	<b>24</b>	<b>34</b>
<b>Пол, n (%):</b> <i>Мужской</i> <i>Женский</i>	38(53%) 36(47%)	13(54%) 11(46%)	13(38%) 21(62%)
<b>Возраст, лет:</b> <i>диапазон вариаций</i> <i>медиана</i> <i>[интерквартильный размах]</i>	от 17 до 68 41,1[33;50]	от 21 до 60 42,9 [31;58]	от 17 до 64 45[31;58]

На рисунке 11 представлены результаты сравнительного анализ уровня TGF-β1 у реципиентов с дисфункцией нефротрансплантата вызванной иммунными процессами и неиммунными процессами и реципиентов без дисфункции. (Рисунок 11).



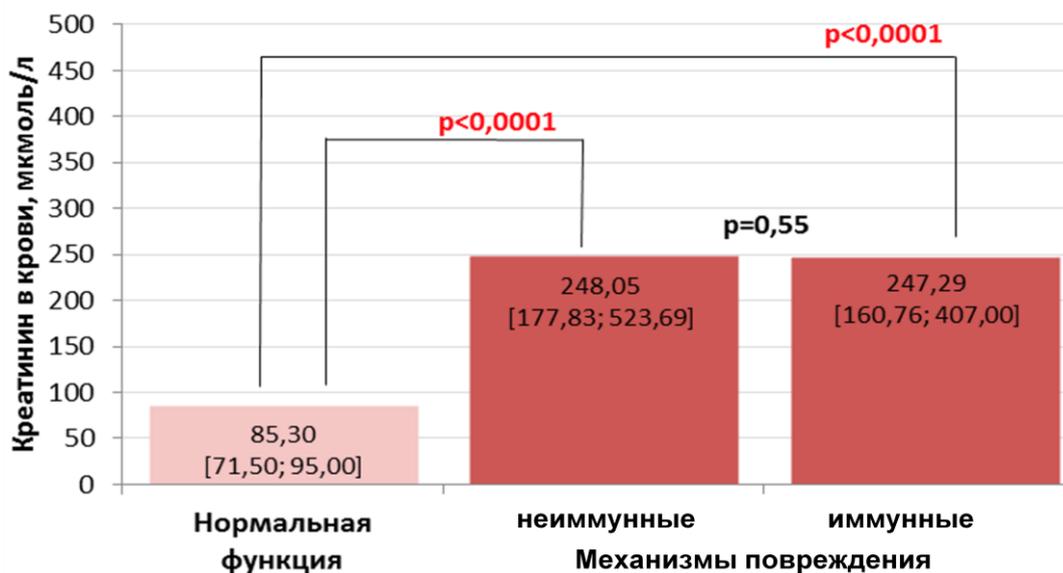
**Рисунок 11 – Сравнительный анализ уровня TGF-β1 у реципиентов почки с нормальной функцией трансплантата и с дисфункцией, вызванной иммунными механизмами (острое клеточное, гуморальное и хроническое отторжение) и неиммунными механизмами (острый канальцевый некроз, CNI-нефротоксичность)**

У реципиентов с дисфункцией трансплантата, вызванной иммунными механизмами, уровень TGF-β1 не только значительно отличался от такового у реципиентов с нормальной функцией ( $p < 0,0001$ ), но и был выше, чем при дисфункции, вызванной неиммунными процессами ( $p = 0,007$ ). Последнее может служить косвенным свидетельством участия TGF-β1 в процессах повреждения трансплантата, вызванных иммунной реакцией отторжения.

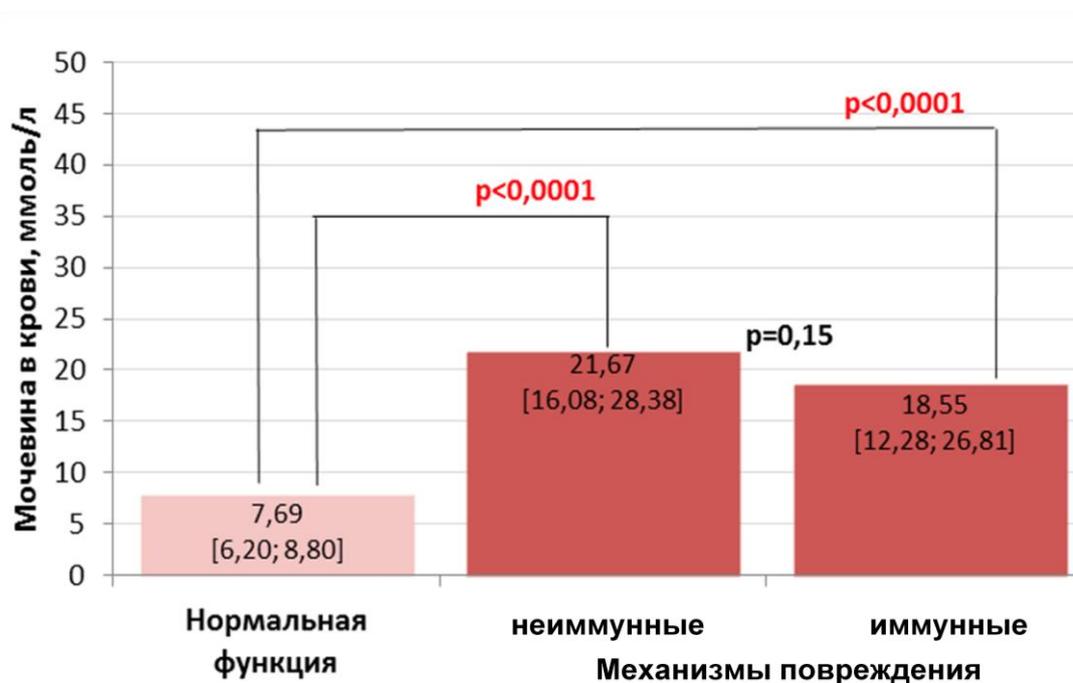
## **5.2 Сравнительный анализ классических лабораторных параметров функции почек у реципиентов с повреждениями трансплантата иммунной и неиммунной природы**

Сравнение трех групп реципиентов проводилось и в отношении лабораторных параметров (креатинина и мочевины в крови, содержание белка в моче и СКФ) рутинно используемым для оценки нарушения экскреторной функции у реципиентов почки.

Ниже представлен сравнительный анализ концентраций креатинина (рисунок 12) и мочевины (рисунок 13), в крови реципиентов с иммунными повреждениями, неиммунными повреждениями и нормальной функцией трансплантата.



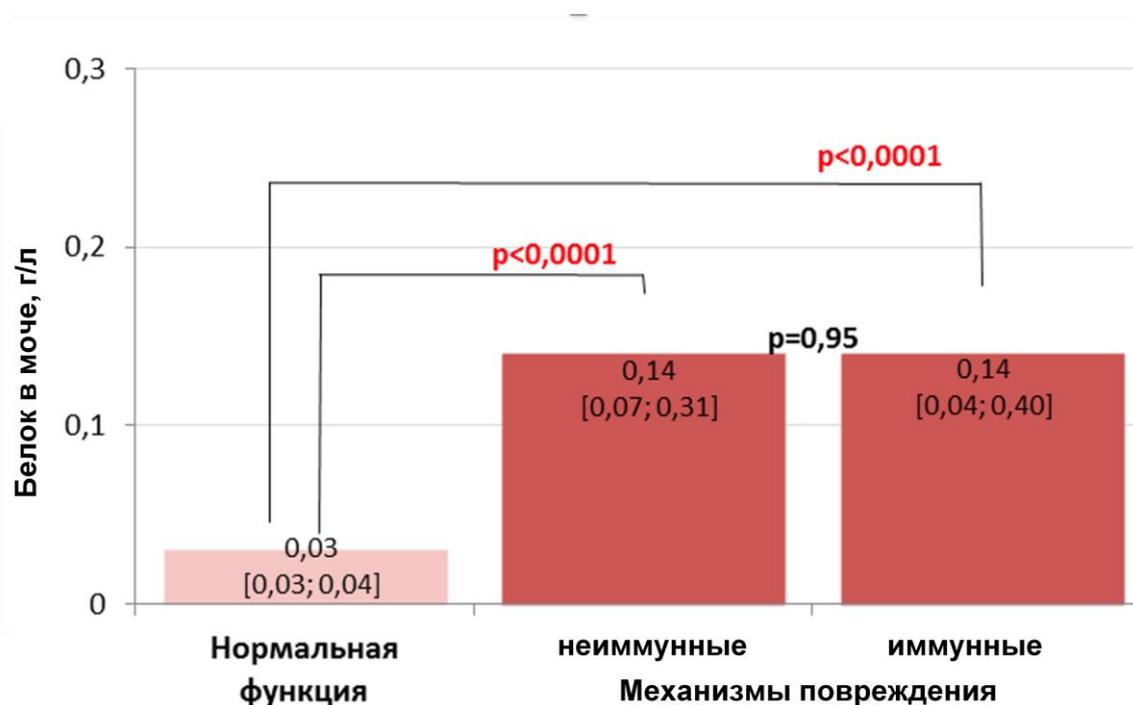
*Рисунок 12 – Сравнительный анализ уровня креатинина в крови у реципиентов почки с нормальной функцией трансплантата и с дисфункцией, вызванной иммунными и неиммунными повреждениями*



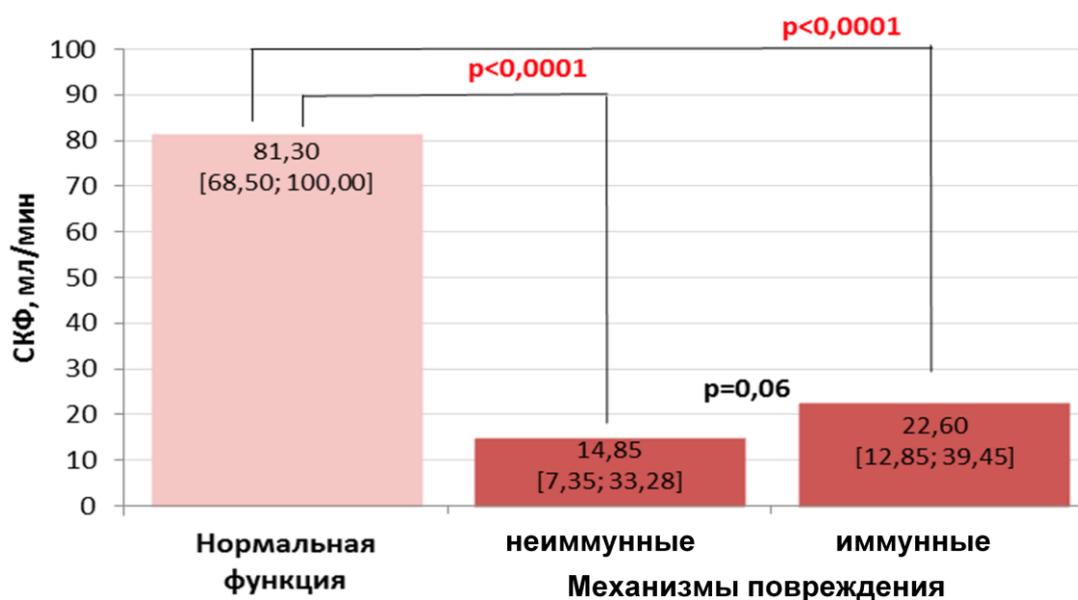
*Рисунок 13 – Сравнительный анализ уровня мочевины в крови у реципиентов почки с нормальной функцией трансплантата и с дисфункцией, вызванной иммунными и неиммунными повреждениями*

Результаты анализа показали, что уровни креатинина и мочевины в крови реципиентов почки с дисфункцией трансплантата, независимо от этиологии, достоверно выше, чем у реципиентов с нормальной функцией. Однако сравнительный анализ содержания креатинина и мочевины в группах реципиентов с иммунным и неиммунным характером повреждения трансплантата значимых различий не выявил ( $p=0,55$  и  $p=0,15$ , соотв.).

Аналогичные закономерности выявлены и при сравнительном анализе исследуемых групп реципиентов в отношении уровня белка в моче (рисунок 14) и СКФ (рисунок 15).



**Рисунок 14 – Сравнительный анализ уровня белка в моче у реципиентов почки с нормальной функцией трансплантата и с дисфункцией, вызванной иммунными и неиммунными повреждениями**



**Рисунок 15 – Сравнительный анализ СКФ у реципиентов почки с нормальной функцией трансплантата и с дисфункцией, вызванной иммунными и неиммунными повреждениями**

Содержание белка в моче у реципиентов с иммунными и неиммунными механизмами повреждения трансплантата также было выше, чем в группе реципиентов с нормальной функцией трансплантата ( $p < 0,0001$ ); вместе с тем, уровень белка в моче у реципиентов с различной природой повреждения значимо не различался ( $p = 0,95$ ).

Оценка значений СКФ показывала достоверно более высокие значения при нормальной функции трансплантата в сравнении с реципиентами с дисфункцией различной природы ( $p < 0,0001$ ), но значимых различий СКФ у реципиентов с иммунными и неиммунными механизмами повреждения трансплантата не установлено ( $p = 0,06$ )

Результаты настоящего фрагмента исследования позволили установить, что при сравнительном анализе классических лабораторных параметров функции почек, таких как уровень креатинина и мочевины в крови, белок в моче и СКФ, реципиенты с повреждениями трансплантата различного генеза достоверно отличались от реципиентов с нормальной функцией, при этом

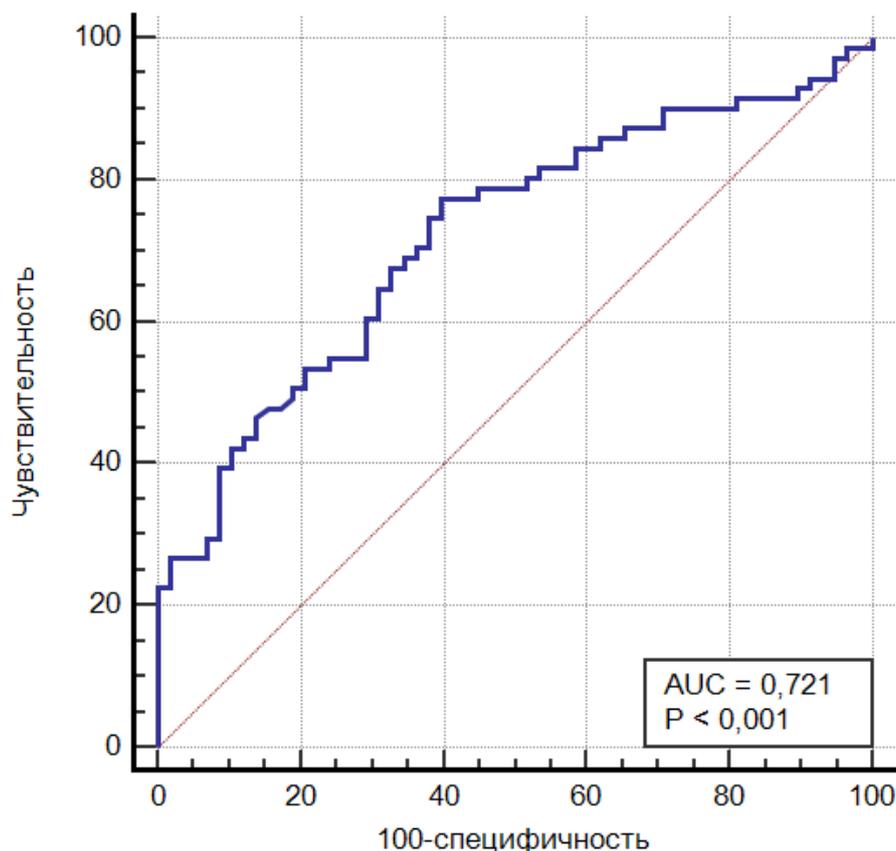
значимых различий между пациентами с повреждениями трансплантата иммунной и неиммунной природы не установлено.

Полученные результаты подтверждают, что используемые на практике рутинные лабораторные параметры функции почек, не позволяют определить природу нарушений, в отличие от TGF- $\beta$ 1 концентрация которого в сыворотке крови реципиентов почки связана с этиологией возникающих нарушений, что может способствовать коррекции и подбору наиболее эффективного лечения.

### **5.3 Анализ диагностической значимости TGF- $\beta$ 1 для выявления реципиентов с дисфункцией трансплантата, обусловленной иммунными механизмами**

В ходе настоящего исследования были выявлены значимо более высокие показатели концентрации TGF- $\beta$ 1 у реципиентов с дисфункцией трансплантата, вызванной иммунными механизмами отторжения, в отличие от реципиентов, у которых повреждение трансплантата вызвано иными процессами.

На основании полученных результатов оценена диагностическая значимость концентрации TGF- $\beta$ 1 для выявления реципиентов с дисфункцией трансплантата, обусловленной иммунными механизмами (ACR, AMR, хроническое отторжение). Площадь под ROC-кривой составила  $0,721 \pm 0,04$  [95% ДИ 0,64–0,80] и достоверно отличалась от величины 0,5,  $p < 0,001$



***Рисунок 16 – ROC-кривая концентрации TGF-β1 в сыворотке крови реципиентов почки с дисфункцией трансплантата, вызванной иммунными механизмами***

Пороговая концентрация в сыворотке крови TGF-β1 для выявления дисфункции трансплантированной почки, обусловленной механизмами острого и хронического отторжения, составила 94,3 нг/мл.

У реципиентов почки с уровнем TGF-β1, превышающим рассчитанное пороговое значение, риск выявления при морфологическом исследовании острого или хронического отторжения трансплантата, обусловленного иммунными механизмами, в 2,2 раза выше, чем у остальных реципиентов почки (RR=2,2±0,22 [95% ДИ 1,46–3,46] при чувствительности 77,5%, специфичности 60,3% и общей диагностической эффективности теста 70,0%). Положительная и отрицательная диагностическая значимость измерения TGF-β1 в сыворотке крови для выявления пациентов с высоким риском осложнений иммунной природы после трансплантации почки

составили 70,5% и 68,6% соответственно. В таблице 16 представлены основные диагностические характеристики теста.

**Таблица 16 – Диагностические характеристики TGF- $\beta$ 1 для выявления дисфункции трансплантата, вызванной иммунным ответом при уровне выше пороговой концентрации**

Пороговая концентрация	RR	95% ДИ	Se	Sp	PPV	NPV	De
94,3 нг/мл	2,2	1,46–3,46	77,5%	60,3%	70,5%	68,6%	70,0%

*RR – относительный риск; 95% ДИ – границы доверительного интервала; Se – чувствительность; Sp – специфичность; PPV – положительное прогностическое значение; NPV – отрицательное прогностическое значение; De – диагностическая эффективность*

Результаты настоящей главы показали, что у реципиентов трансплантированной почки с уровнем TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови, превышающим рассчитанное пороговое значение (94,3 нг/мл), риск выявления, при исследовании биопсийного материала, повреждения трансплантата иммунной природы (острое и хроническое отторжение) после трансплантации в 2,2 раза выше, чем у всех остальных реципиентов почки, что позволяет рассматривать TGF- $\beta$ 1 в качестве перспективного биомаркера для диагностики отторжения трансплантрованной почки, на любом сроке после трансплантации.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Современные исследования в области молекулярной биологии и иммунологии расширили представления о взаимодействии организма реципиента и трансплантата. Благодаря развитию трансплантационной иммунологии стало возможным создание более эффективных методов диагностики и лечения.

Основными факторами, ограничивающими продолжительность жизни реципиентов, являются осложнения, которые могут возникнуть как в ранний, так и в отдалённый период после трансплантации. Кроме хирургических и инфекционных осложнений, самым непредсказуемым считается реакция отторжения трансплантата. Тем не менее, частоту реакций острого отторжения благодаря современным подходам в диагностике и совершенствованию иммуносупрессивной терапии удалось предотвратить, однако хроническое отторжение является основной причиной потери трансплантата в отдалённые сроки [120].

«Золотым стандартом» верификации патологий почечного трансплантата принято считать биопсию, однако данная методика, как правило часто применяется при наличии уже выраженной клинической картины нарушения функции почек и является инвазивной процедурой, что сопряжено с риском развития инфекционных и иных осложнений. Также может быть неоднозначна морфологическая картина повреждения трансплантата ввиду риска забора неинформативного участка ткани [121].

В настоящее время постоянно ведется работа по совершенствованию уже существующих методов в диагностике и лечении. Лабораторные исследования обладают рядом преимуществ по сравнению с другими методами диагностики, повсеместная распространенность, малоинвазивность и широкий спектр исследуемых биомаркеров позволяет своевременно распознать заболевание и определиться с тактикой лечения [122].

Многочисленные современные исследования были сосредоточены на биомаркере TGF- $\beta$ 1 и его роли в развитии осложнений после трансплантации. Активация TGF- $\beta$ 1 происходит путем высвобождения зрелой формы TGF- $\beta$ 1 из латентного комплекса, через связывание интегринов  $\alpha$ V $\beta$ 6 и  $\alpha$ V $\beta$ 8. Биологический потенциал TGF- $\beta$ 1 реализуется в основном через канонический SMAD-зависимый путь, однако множество реакций, вызываемых TGF- $\beta$ 1, может идти и через SMAD-независимые пути, такие как p38 MAPK, JNK, NF- $\kappa$ B [123,124].

Роль канонического SMAD-зависимого пути в патогенезе повреждения нефротрансплантата неоднозначна, с одной стороны Smad3 является главным посредником сигнального пути TGF- $\beta$ , с помощью которого активируются профиброгенные гены [125], с другой – Smad7 который оказывает противовоспалительное действие [126,127].

Учитывая современные данные о биологическом потенциале TGF- $\beta$ 1 у реципиентов солидных органов, в нашей работе была поставлена задача определить клиническое значение концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови при трансплантации почки, а также оценить диагностическую значимость TGF- $\beta$ 1 при развитии дисфункции нефротрансплантата [58].

Рядом зарубежных авторов были опубликованы работы о роли TGF- $\beta$ 1 в повреждении почек, описано участие TGF- $\beta$ 1 в развитии канальцевого некроза и фиброза [119]. Du X.X. с соавт. в своих исследованиях продемонстрировали обратную корреляцию уровня TGF- $\beta$ 1 в крови со скоростью клубочковой фильтрации, что соотносится с нашими данными о повышенной концентрации TGF- $\beta$ 1 у реципиентов со сниженной функцией почек [128]. Так же нами были получены данные о корреляции уровня TGF- $\beta$ 1 с протеинурией (содержание белка в моче), что подтверждается другими авторами, Н. Kasuga с соавт. опубликовали данные о снижении содержания белка в моче путем введения антител к рецептору TGF $\beta$ RII при экспериментах на крысах с гломерулонефритом [129].

В ряде работ исследователи пытались установить связь TGF- $\beta$ 1 с отторжением трансплантированной почки, в исследовании, Couper В.М, с соавт. показали, что уровень TGF- $\beta$ 1 был достоверно выше у всей группы реципиентов почки в отличии от группы сравнения, однако достоверные различия в уровне TGF- $\beta$ 1 между верифицированными по данным биопсии патологиями почечного трансплантата, острым и хроническим отторжением, и интерстициальным фиброзом отсутствовали. Также уровень TGF- $\beta$ 1 не коррелировал с показателями функции почек – креатинином и мочевиной, что не согласуется с данными, полученными в нашем исследовании и очевидно, требует проведения дополнительных исследований [130].

Высказываются также противоречивые предположения, что увеличенная концентрация TGF- $\beta$ 1 коррелирует с отсутствием хронического отторжения в отдаленные сроки после трансплантации и выполняет защитную функцию при остром отторжении у реципиентов почки [84]. Однако, в большинстве публикаций представлены данные указывающие на непосредственную роль TGF- $\beta$ 1 в развитии хронического отторжения.

Опубликованы результаты исследования Zhao S.Q с соавт. в которых отмечено влияние TGF- $\beta$ 1 при развитии хронического отторжения, предполагается что TGF- $\beta$ 1, взаимодействуя с другими транскрипционными факторами, индуцирует хроническую нефропатию трансплантата [131].

Увеличение концентрации TGF- $\beta$ 1 у реципиентов почки без признаков дисфункции описывает Citterio и Pozzetto, при этом повышенную концентрацию TGF- $\beta$ 1 связывают с применением различных иммуносупрессивных препаратов [132].

По результатам нашего исследования у реципиентов почки при концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови выше 94,3 нг/мл риск развития отторжения в 2,2 раза выше, чем у остальных реципиентов почки. При этом

верификация острого и хронического отторжения произведена с помощью морфологического исследования биоптата.

Исследования последних лет связывали риск развития острого или хронического отторжения почечного трансплантата с полиморфизмом гена TGFB1. Исследователи Campistol J.M. и Iñigo P. связывали полиморфизм TGF-beta 1 с развитием хронического отторжения трансплантата почки, а низкое содержание TGF-β1 в крови было связано с более длительным сроком выживаемости трансплантата [133,134].

Особое внимание уделяется разработкам, направленным на возможность использования TGF-β1 в качестве мишени для терапии. В исследовании Sun D. с соавт., показано, что ингибирование активатора TGF-β1 в экспериментах на мышах привело к уменьшению фиброза почек и активации ангиогенеза [135]. Применение пирфенидона снижает выработку TGF-β1 на уровне транскрипции, что в результате приводит к уменьшению воспаления и фиброза [136]. В исследовании Zou с соавт. были отмечены противифибротические эффекты при лечении лозартаном: увеличивая количество нефропротекторных факторов транскрипции Smad 7, лозартан индуцировал распад рецептора TGFβRI [137].

Несмотря на усилия, направленные на регулирование сигнального пути TGF-β/Smad, эффективная терапия интерстициального фиброза почек по-прежнему отсутствует. Разработка новых методов диагностики и лечения фиброза почек, остаётся актуальной и перспективной задачей [138].

Результаты, которые мы получили в ходе нашего исследования согласуются с данными зарубежных коллег. Высокая концентрация TGF-β1 в сыворотке крови у реципиентов почки связана с иммунными повреждением трансплантата, однако в нашем исследовании высокая концентрация TGF-β1 не коррелировала с временем, прошедшим после трансплантации, это создает предпосылки для перспективного применения TGF-β1, в качестве

биомаркера иммунных осложнений в различные сроки после трансплантации.

Своевременная диагностика дисфункции трансплантата играет важную роль для выбора подходящей терапии и имеет ключевое значение для прогнозирования результатов трансплантации.

Применение лабораторных технологий совместно с данными гистологического исследования позволили более точно интерпретировать механизмы повреждения трансплантата и использовать персоналицированный подход при подборе терапии.

Возможно рассматривать биомаркер TGF- $\beta$ 1 для скрининга осложнений; малоинвазивный метод позволяет в короткие сроки выделить пациентов с высоким риском иммунологических осложнений. Результаты настоящей работы показали, что увеличение концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови реципиентов почки позволяет предположить иммунную природу развития посттрансплантационных осложнений.

Повышенная концентрация TGF- $\beta$ 1 совместно со снижением почечной функции может быть значимым диагностическим признаком острого или хронического отторжения, ещё до получения результатов морфологического исследования. Применение биомаркера TGF- $\beta$ 1 в качестве индикатора риска развития отторжения у реципиентов почки, поможет применить персонализированный подход к выбору тактики лечения.

Постоянный поиск малоинвазивных маркеров отторжения представляется актуальной задачей в трансплантологии. Широкий спектр биомаркеров применяемых в лабораторной диагностике, облегчает постановку диагноза и позволяет предсказать исход трансплантации. Применение малоинвазивных лабораторных технологий делает возможным постоянный мониторинг состояния трансплантата и коррекцию проводимой терапии.

Рассчитанный нами пороговый уровень концентрации биомаркера TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови позволяет выявить реципиентов почки с высоким риском развития острого или хронического отторжения, которым рекомендовано проведение внеплановой биопсии.

Механизм участия TGF- $\beta$ 1 в развитии патологий трансплантированной почки не до конца изучен, однако TGF- $\beta$ 1 обладает широким диагностическим и прогностическим потенциалом, который вероятно будет востребован в клинической практике.

## ВЫВОДЫ

1. У реципиентов почки концентрация TGF- $\beta$ 1 достоверно выше, чем у здоровых лиц ( $p=0,00001$ ); не различается у мужчин и женщин ( $p=0,37$ ); не коррелирует с возрастом ( $r=0,09$ ;  $p=0,18$ ) и большинством параметров анализа крови: имеет место значимая прямая корреляция с содержанием эритроцитов ( $r=0,354$ ;  $p=0,00001$ ), лейкоцитов ( $r=0,245$ ;  $p=0,006$ ) и белка в моче ( $r=-0,280$ ;  $p=0,001$ ).

2. У реципиентов с дисфункцией трансплантата в сравнении с реципиентами с нормальной функцией трансплантата имеет место значимо более высокий уровень TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови ( $p=0,0004$ ).

3. Уровень TGF- $\beta$ 1 в крови реципиентов почки с дисфункцией трансплантата, вызванной иммунными механизмами (острым клеточным, острым гуморальным и хроническим отторжением) достоверно выше, чем у реципиентов с нормальной функцией трансплантата ( $p=0,0003$ ,  $p=0,002$ ,  $p=0,001$ , соответственно). Уровни TGF- $\beta$ 1 у реципиентов с острым канальцевым некрозом и интерстициальным фиброзом с признаками нефротоксичности ингибиторов кальциневрина, значимо не отличались от такового у реципиентов с нормальной функцией ( $p=0,82$ ,  $p=0,36$ , соответственно).

4. Уровень TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови достоверно выше у реципиентов с острым и хроническим отторжением трансплантата ( $p<0,0001$ ), нежели у реципиентов с дисфункцией, обусловленной неиммунными механизмами. Концентрация креатинина и мочевины в крови, белка в моче, СКФ у реципиентов с дисфункцией трансплантата, обусловленной иммунными и неиммунными механизмами достоверно не различалась ( $p=0,55$ ,  $p=0,15$ ,  $p=0,95$  и  $p=0,06$ , соотв.).

5. Пороговая концентрация в сыворотке крови TGF- $\beta$ 1 для выявления дисфункции трансплантированной почки, обусловленной механизмами

острого и хронического отторжения, составила 94,3 нг/мл; у реципиентов почки с уровнем TGF- $\beta$ 1, превышающим рассчитанное пороговое значение, риск выявления острого или хронического отторжения трансплантата в 2,2 раза выше, чем у остальных реципиентов почки, (RR=2,2 $\pm$ 0,22 [95% ДИ 1,46–3,46] при чувствительности 77,5%, специфичности 60,3% и общей диагностической эффективности теста 70,0%).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Уровень концентрации TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови целесообразно использовать как дополнительный метод диагностики при обследовании реципиентов почки с дисфункцией трансплантата, которым назначено проведение плановой биопсии.

Определение концентрации TGF- $\beta$ 1 у реципиентов почки может иметь значение для персонафицированного подхода к выбору оптимального режима иммуносупрессивной терапии.

Измерение концентрации TGF- $\beta$ 1 у реципиентов почки целесообразно использовать для скрининга риска иммуноопосредованного повреждения трансплантата (острого клеточного, острого гуморального и хронического отторжения).

Реципиенты почки с уровнем TGF- $\beta$ 1 в сыворотке крови выше 94,3 нг/мл относятся к группе пациентов с высоким риском развития отторжения, которым рекомендовано выполнение пункционной биопсии с целью верификации диагноза отторжения и своевременной коррекции проводимой терапии.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АД – артериальное давление

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспаратаминотрансфераза

АТП – аллотрансплантация почки

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

ДИ – доверительный интервал

ИФА – иммуноферментный анализ

микроРНК – микроРибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная Рибонуклеиновая кислота

РАТП – родственная аллотрансплантация почки

СКФ – скорость клубочковой фильтрации

СОБ – синдром облитерирующего бронхиолита

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России – федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова – федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации

ХБП – хроническая болезнь почек

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЭКГ – электрокардиограмма

ЭхоКГ – эхокардиография

ACR – (англ., acute cellular rejection) – острое клеточное отторжение

АСТ – активины

AMR – (англ., antibody mediated rejection) – острое гуморальное отторжение

BMP – (англ., bone morphogenetic proteins) – костные морфогенетические белки

CKD – EPI – (англ., chronic kidney disease epidemiology collaboration) – формула оценки СКФ

CNI-нефротоксичность – (англ., calcineurin inhibitors) – нефротоксичности ингибиторов кальциневрина

CsA – циклоспорин А

De – диагностическая эффективность метода

ECM – (англ., extracellular matrix) – внеклеточный матрикс

EMT – (англ., Epithelial-mesenchymal transition) – эпителиально-мезенхимальный переход

GDF – факторы дифференцировки роста

HLA – (англ., Human Leukocyte Antigens) – лейкоцитарный антиген человека

INH – ингибрины

LAP – латентно-ассоциированный пептид

miR – микроРНК

MIS – ингибирующее вещество Мюллера

MMPs – матриксные металлопротеиназы

p – уровень значимости различий между сравниваемыми величинами

r – коэффициент корреляции Спирмена

ROC-анализ – (англ., Receiver operating characteristic ) метод сравнения и оценки качества моделей бинарных классификаторов

RR – отношение рисков

Se – диагностическая чувствительность метода

Sp – диагностическая специфичность метода

TGF- $\beta$  – трансформирующий фактора роста-бета

TGF $\beta$ RI – рецептор трансформирующего фактора роста-бета

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Efficacy of pre-emptive kidney transplantation for adults with end-stage kidney disease: a systematic review and meta-analysis / T. Azegami, N. Kounoue, T. Sofue [et al]. // *Ren Fail.* – 2023. – Vol. 45. – Iss. 1. – P. 2169618. – DOI: 10.1080/0886022X.2023.2169618.

2. Central role of dysregulation of TGF- $\beta$ /Smad in CKD progression and potential targets of its treatment / L. Chen, T. Yang, D.W. Lu [et al]. // *Biomed Pharmacother.* – 2018. – Vol. 101. – P. 670-681. – DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.090.

3. Морфологическая структура патологии почечного аллотрансплантата и ее влияние на отдаленный прогноз / Е. С. Столяревич, Т. Р. Жилинская, Л. Ю. Артюхина, Ким И.Г., Зайденов В.А., Томилина Н.А. [и др.] // *Вестник трансплантологии и искусственных органов. Вестник трансплантологии и искусственных органов.* – 2018. – Том XX. – № 1. – С. 45-54.

4. **Готье, С. В.** Трансплантология: итоги и перспективы. Том XIV. 2022 год. / Под ред. С.В. Готье. – М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада» (2023), 284 с.

5. **Slotkin, E. A.** Complications of renal biopsy: incidence in 5000 reported cases / E. A. Slotkin, P. O. Madsen // *J Urol.* – 1962. – Vol. 87. – Iss. 1. – P. 13-15. – DOI: 10.1016/S0022-5347(17)64898-5.

6. **Шарапченко, С.О.** Диагностический и терапевтический потенциал трансформирующего фактора роста  $\beta 1$  при трансплантации солидных органов: результаты последних исследований / С.О. Шарапченко, А. А. Мамедова, О.П. Шевченко // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* – 2023. – Т. 25, № 2. – С. 148-157.

7. **Herath, S.** Advances in detection of kidney transplant injury / S. Herath, J. Erlich, A. Y. M. Au, Z. H. Endre // *Mol Diagn Ther.* – 2019. – Vol. 23. – Iss. 3. – P. 333- 351.

8. The Genomic Response to TGF- $\beta$ 1 Dictates Failed Repair and Progression of Fibrotic Disease in the Obstructed Kidney / C. E. Higgins, J. Tang, S. P. Higgins [et al]. // *Front*

9. **Javelaud, D.** Mammalian transforming growth factor- $\beta$ s: smad signaling and physio-pathological roles / D. Javelaud, A. Mauviel // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* – 2004. – Vol. 36. – Iss. 7. – P. 1161- 1165.

10. **Poniatowski, L. A.** Transforming growth factor beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications / A. Poniatowski, P. Wojdasiewicz, R. Gasik, D. Szukiewicz // *Mediators In.* – 2015. – Vol. 2015. – Iss. 1:137823. – DOI: 10.1155/2015/137823.

11. **Wang, W.** Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases / W. Wang, V. Koka, H. Y. Lan // *Nephrology (Carlton).* – 2005. – Vol. 10. – Iss. 1. – P. 48- 56.

12. Involvement of Foxp3-expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the development of tolerance induced by transforming growth factor-beta2-treated antigen-presenting cells / H. Zhang, P. Yang, H. Zhou [et al]. // *Immunology.* – 2008. – Vol. 123. – Iss. 3. – P. 304-314.

13. **Wilson, S. E.** TGF beta -1, -2 and -3 in the modulation of fibrosis in the cornea and other organs / S. E. Wilson // *Exp Eye Res.* – 2021. – Vol. 207: 108594. – DOI: 10.1016/j.exer.2021.108594.

14. Essential role of Smad3 in angiotensin II-induced vascular fibrosis / W. Wang, X. R. Huang, E. Canlas [et al]. // *Circ Res.* – 2006. – Vol. 98. – Iss. 8. – P. 1032- 1039.

15. **Vander, Ark. A.** TGF- $\beta$  receptors: in and beyond TGF- $\beta$  signaling / Ark. A. Vander, J. Cao, X. Li // *Cell. Signal.* – 2018. – Vol. 52.– P. 112- 125. – DOI:10.1016/j.cellsig.2018.09.002.

16. Central role of dysregulation of TGF- $\beta$ /Smad in CKD progression and potential targets of its treatment / L. Chen, Y. Tian, D. W. Lu [et al]. // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2018. – Vol. 101.– P. 670- 681.

17. Mice lacking Smad3 are protected against streptozotocin-induced diabetic glomerulopathy / M. Fujimoto, Y. Maezawa, K. Yokote [et al]. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – Vol. 305. – Iss. 4. – P. 1002-1007.

18. **Franck, V.** Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling Through the Smad Pathway: Role in Extracellular Matrix Gene Expression and Regulation / F. Verrecchia, A. Mauviel // *J Invest Dermatol.* – 2002. – Vol. 118. – Iss. 2. – P. 211-2015.

19. **Guarino, M.** Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition / M. Guarino, A. Tosoni, M. Nebuloni // *Hum Pathol.* – 2009. – Vol. 40. – Iss. 10. – P. 1365- 1378.

20. Transforming growth factor- $\beta$  signaling: From tissue fibrosis to therapeutic opportunities / L. L. Ren, X.J. Li, T.T. Duan [et al]. // *Chem Biol Interact.* – 2023. – Vol. 369:110289. – DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110289.

21. **Chen, W.** TGF- $\beta$  Regulation of T Cells / W. Chen // *Annu Rev Immunol.* – 2023. – Vol. 41.– P. 483- 512.

22. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells / Y. Liu, P. Zhang, J. Li [et al]. // *Nat. Immunol.* – 2008. – Vol. 9. – Iss. 6. – P. 632- 640.

23. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development / T. Takimoto, Y.

Wakabayashi, T. Sekiya [et al]. // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185. – Iss. 2. – P. 842- 855.

24. **Gorelik, L.** Transforming growth factor-beta in T-cell biology / L. Gorelik, R. A. Flavell // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 2. – Iss. 1. – P. 46-53.

25. **Flavell, R. A.** The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF $\beta$  / R. A. Flavell, S. Sanjabi, S. H. Wrzesinski, P. Licona-Limon // *Nat. Rev.* – 2010. – Vol. 10. – Iss. 8. – P. 554-567.

26. **O'Garra, A.** Quantitative events determine the differentiation and function of helper T cells / A. O'Garra, L. Gabrysova, H. Spits // *Nat Immunol.* – 2011. – Vol. 12. – Iss. 4. – P. 288-294.

27. Identification of a new pathway for Th1 cell development induced by cooperative stimulation with IL-4 and TGF- $\beta$  / S.Tofukuji, M. Kuwahara, J. Suzuki [et al]. // *J Immunol.* – 2012. – Vol. 188. – Iss. 10. – P. 4846-4857.

28. TGF- $\beta$ 1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression / V. L. Heath, E. E. Murphy, C. Crain [et al]. // *Eur J Immunol.* – 2000. – Vol. 30. – Iss. 9. – P. 2639-2649.

29. **Li, M.O.** Transforming growth factor- $\beta$  controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms / M. O. Li, S. Sanjabi, R. A. Flavell // *Immunity.* – 2006. – Vol. 25. – Iss. 3. – P. 455-471.

30. **Liu, M.** TGF- $\beta$  Control of Adaptive Immune Tolerance: A Break From Treg Cells / M. Liu, S. Li, M.O. Li // *Bioessays.* – 2018. – Vol. 40. – Iss. 11: e1800063. – DOI: 10.1002/bies.201800063.

31. **Chen, W.** TGF- $\beta$  Regulation of T Cells / W. Chen // *Annu Rev Immunol.* – 2023. – Vol. 41. – P. 483-512.

32. Discordant expression of circulating microRNA from cellular and extracellular sources / R. Shah, K. Tanriverdi, D. Levy [et al]. // PLoS One. – 2016. – Vol. 11. – Iss. 4 :e0153691. – DOI: 10.1371/journal.pone.0153691.

33. MicroRNAs as theranostic markers in cardiac allograft transplantation: from murine models to clinical practice / J. Novák, T. Macháčková, J. Krejčí [et al.]. // Theranostics. – 2021. – Vol. 11. – Iss. 12. – P. 6058-6073.

34. Transforming Growth Factor- $\beta$  and Long Non-coding RNA in Renal Inflammation and Fibrosis / Y. Y. Gu, J. Y. Dou, X. R. Huang [et al]. // Front Physiol. – 2021. – Vol. 12:684236. – DOI: 10.3389/fphys.2021.684236.

35. **Zhang, X. L.** MiR-27 alleviates myocardial cell damage induced by hypoxia/reoxygenation via targeting TGFBR1 and inhibiting NF- $\kappa$ B pathway / X. L. Zhang, B. F. An, G.C. Zhang // Kaohsiung J Med Sci. – 2019. – Vol. 35. – Iss. 10. – P. 607-614.

36. **Wang, X.H.** MicroRNA in myogenesis and muscle atrophy / X.H. Wang // Curr Opin Clin Nutr Metab Care. – 2013. – Vol. 16. – Iss. 3. – P. 258-266.

37. Regulation of TGF- $\beta$ -mediated endothelial-mesenchymal transition by microRNA-27 / H. I. Suzuki, A. Katsura, H. J. Mihira [et al]. // J Biochem. – 2017. – Vol. 161. – Iss. 5. – P. 417-420.

38. МикроРНК-27 и -339 при фиброзе миокарда трансплантированного сердца: анализ диагностической значимости / О.П. Шевченко, Д.А. Великий, С.О. Шарапченко [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – Т. 23. – № 3. – С. 73-81.

39. Диагностическое значение микроРНК-101 и микроРНК-27 при остром отторжении трансплантированного сердца / Д.А. Великий, О.Е. Гичкун, С.О. Шарапченко [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № 4. – С. 20-26.

40. **Chung, A.C.** MiR-192 mediates TGF- $\beta$ /Smad3-driven renal fibrosis / A.C Chung, X.R. Huang, X. Meng, H.Y. Lan // J Am Soc Nephrol. – 2010. – Vol. 21. – P. 1317-1325.
41. TGF- $\beta$ /Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29 / W. Qin, A. C. Chung, X.R. Huang [et al]. // J Am Soc Nephrol. – 2011. – Vol. 22. – Iss. 8. – P. 1462-74.
42. Cuiqiong, W. Schisandrin B suppresses liver fibrosis in rats by targeting miR-101-5p through the TGF- $\beta$  signaling pathway / W. Cuiqiong, X. Chao, F. Xinling J. F. Yinyan // Artif Cells Nanomed Biotechnol. – 2020. – Vol. 48. – Iss. 1. – P. 473-478.
43. MicroRNA-101 Protects Against Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction via Downregulation of Runt-Related Transcription Factor 1 / X. Li, S. Zhang, M. Wa [et al]. // J Am Heart Assoc. – 2019. – Vol. 8. – Iss. 23: e013112 – DOI: 10.1161/JAHA.119.013112.
44. **Patel, V.** MicroRNAs and fibrosis / V. Patel, L. Nouredine // Curr Opin Nephrol Hypertens. – 2012. – Vol. 21. – Iss. 4. – P. 410-406.
45. Transforming Growth Factor- $\beta$  and Long Non-coding RNA in Renal Inflammation and Fibrosis. / Y.Y. Gu, J.Y. Dou, X.R. Huang [et al]. // Front Physiol. – 2021. – Vol. 12:684236.
46. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis / N. C. Henderson, A. C. Mackinnon, S.L. Farnworth [et al]. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2006. – Vol. 103. – Iss. 13. – P. 5060-5065.
47. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis / N. C. Henderson, A. C. Mackinnon, S.L. Farnworth [et al]. // Am J Pathol. – 2008. – Vol. 172. – Iss. 2. – P. 288-298.
48. Activation of TGF- $\beta$ 1/ $\alpha$ -SMA/Col I profibrotic pathway in fibroblasts by galectin-3 contributes to atrial fibrosis in experimental models and patients /H.

Shen, J. Wang, J. Min [et al]. // Cell Physiol Biochem. – 2018. – Vol. 47. – Iss. 2. – P. 851-863.

49. **Jung, B.** Transforming growth factor  $\beta$  super- family signaling in development of colorectal cancer / B. Jung, J.J. Staudacher, D. Beauchamp // Gastroenterology. – 2017. – Vol. 152. – P. 36-52.

50. Галектин-3 у реципиентов с дисфункцией трансплантированной почки: анализ прогностической значимости / Д. А. Великий, С. О. Шарапченко, О. Е. Гичкун [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2024. – Т. XXVI, № 3. – С. 159 – 167.

51. **Meng, X. M.** TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis / X. M. Meng, D.J. Nikolic-Paterson, H. Y. Lan // Nat Rev Nephrol. – 2016. – Vol. 12. – Iss. 6. – P. 325- 338.

52. TGF- $\beta$  in transplantation tolerance / F. S. Regateiro, D. Howie, S. P. Cobbold [et al]. // Curr Opin Immunol. – 2011. – Vol. 23. – Iss. 5. – P. 660- 669.

53. **Jung, B.** Transforming growth factor  $\beta$  super- family signaling in development of colorectal cancer / B. Jung, J.J. Staudacher, D. Beauchamp // Gastroenterology. – 2017. – Vol. 152. – P. 36-52.

54. **Meng, X. M.** TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis / X. M. Meng, D.J. Nikolic-Paterson, H. Y. Lan // Nat Rev Nephrol. – 2016. – Vol. 12. – Iss. 6. – P. 325- 338.

55. Связь уровня трансформирующего фактора роста бета 1 с фиброзом печени у детей с врожденными заболеваниями гепатобилиарной системы / Р. М. Курабекова, О.П. Шевченко, О.М. Цирульникова [и др.] // Клини. Лаб. Диаг. – 2017. – Vol. 62. – Iss. 4. – P. 221- 225.

56. Age-dependent decrease in serum transforming growth factor (TGF)-beta 1 in healthy Japanese individuals; population study of serum TGF-beta 1

level in Japanese / Y. Okamoto, Y. Gotoh, O. Uemura [et al]. // *Dis Markers*. – 2005. – Vol. 21. – Iss. 2. – P. 71- 74.

57. Combined effects of TGF $\beta$ 1 +869 T/C and +915 G/C polymorphisms on acute rejection risk in solid organ transplant recipients: a systematic review and meta-analysis / Y. Z. Ge, R. Wu, T. Z. Lu [et al]. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – Iss. 4: e93938. – DOI: 10.1371/journal.pone.0093938.

58. **Travis, M.A.** TGF- $\beta$  Activation and Function in Immunity / M. A. Travis, D. Sheppard // *Annu. Rev. Immunol.* – 2014. – Vol. 32. – Iss. 1. – P. 51-82.

59. Уровень трансформирующего фактора роста бета-1 связан с тяжестью врожденных заболеваний печени у детей раннего возраста / Р.М. Курабекова, О.П. Шевченко, О.М. Цирульникова [и др.] // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2016. – Т. 28, № 3. – С. 16-21.

60. Peripheral blood biomarkers for the characterization of alloimmune reactivity after pediatric liver transplantation / A. Briem-richter, A. Leuschner, T. Krieger [et al]. // *Pediatr. Transplant.* – 2013. – Vol. 17. – Iss. 8. – P. 757- 764.

61. **Zhang, X.X.** Relationship between cytokine gene polymorphisms and acute rejection following liver transplantation / X. X. Zhang, R. J. Bian, J. Wang, Q. Y. Zhang // *Genet Mol Res.* – 2016. – Vol. 15. – Iss. 2 : 15027599.

62. Анализ связи между гаплотипом гена Tgfb1 и заболеваниями печени у детей / Р. М. Курабекова, О. Э. Гичкун, О. М. Цирульникова [и др.] // *Акта Природа*. – 2023. – Vol. 15. – Iss. 3. – P. 75- 81.

63. **Sun, Y.** Infarct scar: a dynamic tissue / Y. Sun, K. T. Weber // *Cardiovasc Res.* – 2000. – Vol. 46. – Iss. 2. – P. 250- 256.

64. **Moses, H. L.** TGF- $\beta$  regulations of epithelial cell proliferation / H. L. Moses // *Mol Prod Dev.* – 1992. – Vol. 32. – Iss. 2. – P. 179- 183

65. **Dixon, D.L.** Systemic inflammation and cell activation reflects morbidity in chronic heart failure / D. L. Dixon, K.M. Griggs, A. D. Bersten, C.G. De Pasquale // *Cytokine*. – 2011. – Vol. 56. – Iss. 3. – P. 593–599

66. Динамика трансформирующего фактора роста- бета1 у реципиентов сердца / Гичкун О.Е., Курабекова Р.М., Олефриенко Г.А. [и др.] // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2019. – Vol. 21. – S. – P. 56

67. Transforming growth factor beta and myocardial dysfunction following heart transplantation / T. Aziz, R. A. Saad, M. Burgess [et al]. // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. – 2001. – Vol. 20. – Iss. 1. – P. 177- 186.

68. **Karch, S.B., Billingham ME.** Cyclosporin-induced myocardial fibrosis: An unequally controlled case report / S. B. Karch, M. E. Billingham // *Heart Transplant*. – 1985. – Vol. 4. – Iss. 2. – P. 210- 212.

69. **Frangogiannis, N. G.** Cardiac fibrosis / N. G. Frangogiannis // *Cardiovasc Res*. – 2021. – Vol. 117. – Iss. 6. – P. 1450-1488.

70. Transforming growth factor  $\beta$  in relation to cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation / T. Aziz, P. Hasleton, A. W. Hann [et al]. // *J Thorac Cardiovasc Surg*. – 2000. – Vol. 119. – Iss. 4. Pt. 1 – P. 700-708.

71. Полиморфизм rs1800470 гена *tgfb1* связан с фиброзом миокарда у реципиентов сердца / О.Е. Гичкун, О.П. Шевченко, Р.М. Курабекова [и др.] // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). – 2021. – Vol. 13. – Iss. 4. – P. 42-46.

72. **DerHovanesian, A.** The role of TGF- $\beta$  in the association between primary graft dysfunction and bronchiolitis obliterans syndrome / A. DerHovanesian, S. S. Weigt, V. Palchevskiy [et al]. // *Am J Transplant*. – 2016. – Vol. 16. – Iss. 2. – P. 640 -649.

73. Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection / S. Stewart, M. C. Fishbein, G. I. Snell [et al]. // *J Heart Lung Transplant.* – 2007. – Vol. 26. – Iss. 12. – P. 1229-1242.

74. Activin biology after lung transplantation / G. P. Westall, G. I. Snel, M. Loskot [et al.]. // *Transplant Direct.* – 2017. – Vol. 3. – Iss. 6: e159. – DOI: 10.1097/TXD.0000000000000676.

75. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung / P. J. Sime, Z. Xing, F. L. Graham [et al]. // *J Clin Invest.* – 1997. – Vol. 100. – Iss. 4. – P. 768–776.

76. Peaks of transforming growth factor- $\beta$  in alveolar cells of lung transplant recipients as an early marker of chronic rejection / J.M. Charpin, J. Valcke, L. Kettaneh [et al]. // *Transplantation* . – 1998. – Vol. 65. – Iss. 5. – P. 752–755.

77. The role of autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis: from mechanisms to therapies / Y. L. Yue, M.Y. Zhang, J.Y. Liu [et al]. // *Ther Adv RespirDis.* – 2022. – Vol. 16: 17534666221140972. – DOI: 10.1177/17534666221140972.

78. **Ye, Z.** TGF  $\beta$ 1: Gentlemanly orchestrator in idiopathic pulmonary fibrosis (Review) / Z. Ye, Y. Hu // *Int J Mol Med.* – 2021. – Vol. 48. – Iss. 1. – P. 132.

79. **Sun, Y. B.** The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis / Y. B. Sun, X. Qu, G. Caruana, J. Li // *Differentiation.* – 2016. – Vol. 92. – Iss. 3. – P. 102–107.

80. Association of donor inflammation- and apoptosis-related genotypes and delayed allograft function after kidney transplantation / A.K. Israni, N. Li, B. B. Cizman [et al]. // *Am J Kidney Dis.* – 2008. – Vol. 52. – Iss. 2. – P. 331–339.

81. **Lee, S.B.** Circulating TGF- $\beta$ 1 as a reliable biomarker for chronic kidney disease progression in the African-American population / S. B. Lee, K. Kanasaki, R. Kalluri // *Kidney Int.* – 2009. – Vol. 76. – Iss. 1. – P.10–12.

82. **Meng, X. M.** Inflammatory processes in renal fibrosis / X. M. Meng, D. J. Nikolic-Paterson, H. Lan, Y. Nat // *Rev. Nephrol.* – 2014. – Vol. 10. – Iss. 9. – P. 493–503.

83. **Yuan, Q.** Myofibroblast in kidney fibrosis: origin, activation, and regulation / Q. Yuan, R. J. Tan, Y. Liu // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2019. – Vol. 1165.– P. 253–283.

84. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$ 1 gene results in multifocal inflammatory disease / M. M. Shull, I. Ormsby, A.B. Kier [et al]. // *Nature.* – 1992. – Vol. 359. – Iss. 6397. – P. 693–699.

85. High transforming growth factor- $\beta$  and extracellular matrix mRNA response in renal allografts during early acute rejection is associated with absence of chronic rejection / M. Eikmans, Y. W. J. Sijpkens, H. J Baelde [et al]. // *Transplantation.* – 2002. – Vol. 73. – Iss. 4. – P. 573–579.

86. **Zhao, S.Q.** HMGB1, TGF- $\beta$  and NF- $\kappa$ B are associated with chronic allograft nephropathy / S. Q. Zhao, Z. Z. Xue, L.Z. Wang // *Exp Ther Med.* – 2017. – Vol. 14. – Iss. 6. – P.6138-6146.

87. Relationship of transforming growth factor- $\beta$ 1 and arginase-1 levels with long-term survival after kidney transplantation / X. X. Du, Y. L. Guo, M. Yang [et al]. // *Curr Med Sci.* – 2018. – Vol. 38. – Iss. 3. – P. 455–460.

88. Polymorphisms of TGFB1 and VEGF genes and survival of patients with gastric cancer / Guan X, Zhao H, Niu [et al]. – // *Clin Cancer Res.* – 2009. – Vol. 28. – Iss. 1:94.

89. Relationship between TGF- $\beta$ 1 +869 T/C and +915 G/C gene polymorphism and risk of acute rejection in renal transplantation recipients / H. Y. Li, T. Zhou, S. Lin [et al]. – // BMC Med Genet. – 2019. – Vol. 20. – Iss. 1:113.

90. A functional TGFB1 polymorphism in the donor associates with long-term graft survival after kidney transplantation / F. Poppelaars, M. Gaya da Costa, B. Faria // Clin Kidney J. – 2021. – Vol. 15. – Iss. 2. – P. 278–286.

91. Association between transforming growth factor beta-1 +869T/C polymorphism and acute rejection of solid organ allograft: A meta-analysis and systematic review / Y. Z. Ge, P. Yu, R. P. Jia [et al]. // Transpl Immunol. – 2014. – Vol. 30. – Iss. 2-3. – P. 76-83.

92. Cyclosporine: A New Immunosuppressive Agent for Organ Transplantation / D.J. Cohen, R. Loertcher, M. F. Rubin [et al]. // Ann. Intern. Med. – 1984. – Vol. 101. – Iss. 5. – P. 667–682.

93. **Bentata, Y.** Tacrolimus: 20 years of use in adult kidney transplantation. What we should know about its nephrotoxicity / Y. Bentata // Artif Organs. – 2020. – Vol. 44. – Iss. 2. – P. 140-152.

94. Immunosuppressive therapy for kidney transplantation in adults: a systematic review and economic model / T. Jones-Hughes, T. Snowsill, M. Haasova [et al]. // Health Technol Assess. – 2016. – Vol. 20. – Iss. 62. – P. 1-594.

95. Mitigates Cyclosporine A (CsA)-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) and Renal Fibrosis in Rats / Q. Liu, J. Ye, L. Yu [et al]. // Int. Urol. Nephrol. – 2017. – Vol. 49. – Iss. 2. – P. 345–352.

96. Ameliorates Cyclosporine-A-Induced Renal Fibrosis by Inhibiting TGF- $\beta$ 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition / R. R. Nagavally, S. Sunilkumar, M. Akhtar [et al]. // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22. – Iss. 19 :10252. – DOI: 10.3390/ijms221910252.

97. Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity / A. Khanna, M. Plummer, C. Bromberek [et al]. // *Kidney Int.* – 2002. – Vol. 62. – Iss. 6. – P. 2257-2263

98. Shen-Kang protects against tacrolimus-induced renal injury / L. Y. Zhang, j. Jin, K. Luo [et al]. // *Korean J Intern Med.* – 2019. – Vol. 34. – Iss. 5. – P. 1078-1090

99. Genetic association of interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, transforming growth factor- $\beta$ , tumour necrosis factor- $\alpha$  and blood concentrations of calcineurin inhibitors in Turkish renal transplant patients / Y. Seyhun, H. S. Ciftci, C. Kekik [et al]. // *Int J Immunogenet.* – 2015. – Vol. 42. – Iss. 3. – P. 147-160

100. The mTOR inhibitor everolimus attenuates tacrolimus-induced renal interstitial fibrosis in rats / T. Shigematsu, S. Tajima, R. Fu [et al]. // *Life Sci.* – 2022. – Vol. 288: 120150. – DOI:10.1016/j.lfs.2021.120150.

101. A high concentration of TGF- $\beta$  correlates with opportunistic infection in liver and kidney transplantation / F. Boix, R. Alfaro, V. Jiménez-Coll [et al]. // *Human Immunology.* – 2021. – Vol. 82. – Iss. 6. – P. 414–421.

102. Targeting the TGF $\beta$  pathway for cancer therapy / C. Neuzillet, A. Tijeras-Raballand, R. Cohen [et al]. // *Pharmacol Ther.* – 2015. – Vol. 147. – P. 22–31.

103. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1/ W. Border, A. S. Okuda, L. R. Languino [et al]. // *Nature.* – 1990. – Vol. 346. – Iss. 6282. – P. 371–374.

104. Effects of anti-TGF- $\beta$  type II receptor antibody on experimental glomerulonephritis / H. Kasuga, Y. Ito, S. Sakamoto [et al]. // *Kidney Int.* – 2001. – Vol. 60. – P.1745–1755.

105. TGF- $\beta$  as a driver of fibrosis: physiological roles and therapeutic opportunities / E. H. Budi, J. R. Schaub, M. Decaris [et al]. // J Pathol. – 2021. – Vol. 254. – Iss. 4. – P. 358-373.

106. MicroRNA-326 regulates profibrotic functions of transforming growth factor- $\beta$  in pulmonary fibrosis / S. Das, M. Kumar, V. Negi [et al]. // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2014. – Vol. 50. – Iss. 5. – P. 882–892.

107. Kidney Allograft Fibrosis: Diagnostic and Therapeutic Strategies / T. Saritas, R. Kramann // Transplantation. – 2021. – Vol. 105. – Iss. 10: e114-e130.

108. **Isaka, Y.** Targeting TGF- $\beta$  Signaling in Kidney Fibrosis / Y. Isaka // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – Vol. 19. – Iss. 9: 2532

109. Selective inhibition of TGF- $\beta$ 1 produced by GARP-expressing Tregs overcomes resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer / de Stree G, C. Bertrand, N. Chalon [et al]. // Nat Commun. – 2020. – Vol. 11. – Iss. 1: 4545.

110. Immunological and regenerative aspects of hepatic mast cells in liver allograft rejection and tolerance / T. Nakano, C. Y. Lai, S. Goto [et al]. // PloS One. – 2012. – Vol. 7. – Iss. 5: 15.

111. Evaluating the antifibrotic potency of galunisertib in a human ex vivo model of liver fibrosis / T. Luangmonkong, S. Suriguga, E. Bigaeva [et al]. // Br. J. Pharmacol. – 2017. – Vol. 174. – Iss. 18. – P. 3107-3117.

112. Antioxidant therapy against TGF- $\beta$ /SMAD pathway involved in organ fibrosis / S. Ghafouri-Fard, A. Askari, H. Shoorei [et al]. // J Cell Mol Med. – 2024. – Vol. 28. – Iss. 2:e18052.

113. Targeting TGF- $\beta$  signal transduction for fibrosis and cancer therapy / D. Peng, M. Fu, M. Wang [et al]. // Mol Cancer. – 2022. – Vol. 21. – Iss. 1. – P. 104.

114. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses / M. O. Li, Y.Y. Wan, S. Sanjabi [et al]. // *Annu Rev Immunol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 99-146.
115. L(59) TGF- $\beta$  LAP degradation products serve as a promising blood biomarker for liver fibrogenesis in mice / M. Hara, I. Inoue, Y. Yamazaki [et al]. // *Fibrogenesis Tissue Repair.* – 2015. – Vol. 15. – Iss. 8. – P. 17.
116. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate» / Andrew S. Levey, Lesley A. Stevens, Christopher H. Schmid [et al]. // *Ann Intern Med.* – 2009. – Vol. 150. – Iss. 9. – P. 604-612.
117. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology / L.C. Racusen, K. Solez, R. B. Colvin [et al]. // *Kidney Int.* – 1999. – Vol. 55. – Iss. 2. – P. 713-723.
118. Трансплантация почки, наличие трансплантированной почки, отмирание и отторжение трансплантата почки. Клинические рекомендации / С. В. Арзуманов, А. Р. Багдасарян, Л. В. Бельских [и др.] – Москва: «Российское трансплантологическое общество», 2020. – 95 с
119. **Loong T.W.** Understanding sensitivity and specificity with the right side of the brain / Loong T.W // *BMJ.* – 2003. – Vol. 327. – Iss. 7417. – P. 716-719.
120. Морфологические особенности позднего отторжения трансплантированной почки и их прогностическое значение / Е. С. Столяревич, Л. Ю. Артюхина, И. Г. Ким [и др.] // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* – 2014. – Т. 16, № 2. – С. 30-38.
121. **Cornell, L.D.** Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance / L.D. Cornell, R. N. Smith, R. B. Colvin // *Annu Rev Pathol.* – 2008. – Vol. 3. – P. 189-220.

122. **Plebani, M.** Evaluating laboratory diagnostic tests and translational research / M. Plebani // *Clin Chem Lab Med.* . – 2010. – Vol. 48. – Iss. 7. –P. 983-988.
123. **Massagué, J.** TGF- $\beta$  signaling in health and disease / J. Massagué, D. Sheppard // *Cell.* – 2023. – Vol. 186. – Iss. 19. –P. 4007-4037.
124. Role of TGF- $\beta$ 1 +869T>C polymorphism in renal dysfunction one year after heart transplantation / J.V. López-Ibor, M.J. Citores, J.J. Portoles [et al]. // *Heart Lung Transplant.* – 2022. – Vol. 41. – Iss. 12. –P1672-1678.
125. **Verrecchia, F.** Transforming growth factor- $\beta$  signaling through the smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation / F. Verrecchia, A. Mauviel // *J Invest Dermatol.* – 2002. – Vol. 118. – Iss. 2. – P. 211-215.
126. Mice lacking Smad3 are protected against streptozotocin-induced diabetic glomerulopathy / M. Fujimoto, Y. Maezawa, K. Yokote [et al]. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – Vol. 305. – Iss. 2. – P. 1002–1007.
127. **Meng, X. M.** Inflammatory processes in renal fibrosis / X. M. Meng, D. J. Nikolic-Paterson, H. Y.Lan // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2014. – Vol. 10. – P. 493–503.
128. Relationship of transforming growth factor- $\beta$ 1 and arginase-1 levels with long-term survival after kidney transplantation / X.X. Du, Y. L. Guo, M. Yang [et al]. // *Curr Med Sci.* – 2018. – Vol. 38. – P. 455–460.
129. Effects of anti-TGF- $\beta$  type II receptor antibody on experimental glomerulonephritis / H. Kasuga, Y. Ito, S. Sakamoto [et al]. // *Kidney Int.* – 2001. – Vol. 60. – P. 1745–1755.
130. Transforming growth factor beta 1 in renal allograft recipients / B. M. Coupes, C. G.Newstead, c.D. Short [et al]. // *Transplantation.* . – 1994. – Vol. 57. – Iss. 12 – P. 1727-1731.

131. HMGB1, TGF- $\beta$  and NF- $\kappa$ B are associated with chronic allograft nephropathy / S. Q. Zhao, Z.Z. Xue, L.Z. Wang [et al]. // *Exp Ther Med.* – 2017. – Vol. 14. – Iss. 6. – P. 6138-6146.

132. Plasma levels of transforming growth factor-beta1 in renal transplant recipients receiving different immunosuppressive regimens. / F.Citterio, U. Pozzetto, J. Romagnoli [et al]. // *Transplant Proc.* – 2004. – Vol. 36. – Iss. 3. – P. 698-699.

133. Role of transforming growth factor-beta1 in the progression of chronic allograft nephropathy / J.M. Campistol, P. Iñigo, S. Larios [et al]. // *Nephrol Dial Transplant.* – 2001. – Vol. 16. – Iss. 1. – P. 114-116.

134. Cytokine gene polymorphisms in kidney transplantation / T. Dhaouadi, I. Sfar, R. Bardi [et al]. // *Transplant Proc.* – 2013. – Vol. 45. – Iss. 6. – P. 2152-2157.

135. Thrombospondin-1 short hairpin RNA suppresses tubulointerstitial fibrosis in the kidney of ureteral obstruction by ameliorating peritubular capillary injury / D. Sun, Y. Ma, H. Han [et al]. // *Kidney Blood Press Res.* – 2012. – Vol. 35. – P. 35–47.

136. Renoprotective effects of pirfenidone on chronic renal allograft dysfunction by reducing renal interstitial fibrosis in a rat model / Z. Z. Qiu, J. M. He, H. X. Zhang [et al]. // *Life Sci.* – 2019. – Vol. 233: 116666.

137. **Zou, J.** Losartan ameliorates renal interstitial fibrosis through metabolic pathway and Smurfs-TGF- $\beta$ /Smad / J. Zou, X. Zhou, Y. Ma, Yu RJB // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2022. – Vol. 149: 112931.

138. **Wang, L.** TGF-Beta as a Master Regulator of Diabetic Nephropathy / L. Wang, H.L. Wang, T.T. Liu, H.Y. Lan // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22:7881.