

МАМЕДОВА АНАСТАСИЯ АЛЕКСЕЕВНА

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

3.1.14 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Шевченко Ольга Павловна

Официальные оппоненты:

Зулькарнаев Алексей Батыргараевич – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник хирургического отделения трансплантологии и диализа, профессор кафедры трансплантологии, нефрологии и искусственных органов Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского».

Кирпатовский Владимир Игоревич – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Научно–исследовательского института урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «24» декабря 2024 г. в 14⁰⁰ часов на заседании Диссертационного Совета ДСТИО 001.21 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России по адресу: 123182, Москва, ул. Щукинская, дом 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, а также на сайте <http://www.transpl.ru>.

Автореферат разослан «____»

2024 г.

Ученый секретарь

диссертационного Совета ДСТИО 001.21

кандидат ветеринарных наук

Волкова Елена Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Хроническая болезнь почек (ХБП) характеризуется высокой распространенностью во всем мире и относится к числу заболеваний с глубокими социально-экономическими последствиями [Azegami T. et al., 2023]. Ключевую роль в прогрессировании ХБП играют интерстициальный фиброз и гломерулосклероз, что в итоге приводит к терминальной стадии почечной недостаточности [Chen L. et al., 2018]. Трансплантация почки – радикальный и наиболее эффективный способ лечения терминальной стадии ХБП [Столяревич Е. С. и соавт., 2018]. Ежегодно число трансплантаций почки в мире неуклонно возрастает. Только в РФ в 2023 году было выполнено более 1640 трансплантации [Готье С. В., 2023]. 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 [Slotkin E. A., 1962]. В связи с этим, одной из актуальных задач в трансплантологии является поиск малоинвазивных методов диагностики, которые с помощью специфичных биомаркеров или анализов помогут диагностировать осложнения в различные периоды после трансплантации [Шарапченко С. О. и соавт., 2023]. Ведется постоянный поиск специфичных биомаркеров, сигнализирующих не только о развитии патологии трансплантированной почки, но и о природе или степени повреждения органа [Herath S. et al., 2019].

К числу факторов, регулирующих взаимоотношения организма реципиента и трансплантата, относится трансформирующий фактор роста бета-1 (TGF- β 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 [Higgins C. E. et al., 2019].

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

Цель исследования

Определить клиническое значение концентрации TGF- β 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- β 1 в сыворотке крови реципиентов почки и здоровых лиц; оценить ее связь с клиническими и лабораторными показателями.
2. Провести сравнительный анализ концентрации TGF- β 1 у реципиентов почки с дисфункцией трансплантата и без таковой.
3. Провести сравнительный анализ концентрации TGF- β 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- β 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- β 1 при дисфункции нефротрансплантата.

Научная новизна

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

Теоретическая и практическая значимость

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

Определение концентрации TGF- β 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- β 1 при развитии острого и хронического отторжения трансплантата.

Методология и методы исследования

В работе представлен анализ концентрации TGF- β 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 ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$), 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- β 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- β 1 в сыворотке крови связана с этиологией дисфункции трансплантированной почки.

3. Измерение концентрации TGF- β 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 объемом проведенных 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- β 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 источник, из них 13 отечественных и 125 зарубежных. Работа изложена на 103 страницах машинописного текста, иллюстрирована 16 таблицами и 16 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

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.

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), биохимический анализ, общий анализ мочи, а также анализ газового и электролитного состава крови.

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

Оценка функции почек проводилась с использованием расчетной формулы скорости клубочковой фильтрации (СКФ) CKD-EPI, которая учитывает расу, пол, возраст и уровень креатинина в сыворотке крови пациента [Andrew S. et al., 2009].

Забор крови осуществляли в утренние часы натощак, из периферической вены, одновременно с другими лабораторными анализами. Содержание биомаркера TGF- β 1 измеряли в сыворотке крови. Полученная сыворотка отбиралась в одноразовые пробирки типа эппендорф по 2 мл. и замораживалась в морозильной камере (- 40 C°), образцы хранились до проведения анализа. Концентрацию TGF- β 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.

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.

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 [Loong T.W., 2003].

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 (М) 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 $p < 0,05$.

Результаты исследования

Анализ уровня TGF- β 1 в сыворотке крови у реципиентов почки

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, остальные 22% – от живого родственного донора. 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 трансплантата, а именно: высокие показатели креатинина и мочевины в крови, присутствие белка в моче, снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ).

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

Результаты сравнительного анализа концентрации TGF- β 1 в исследуемых группах отражены на рисунке 1.

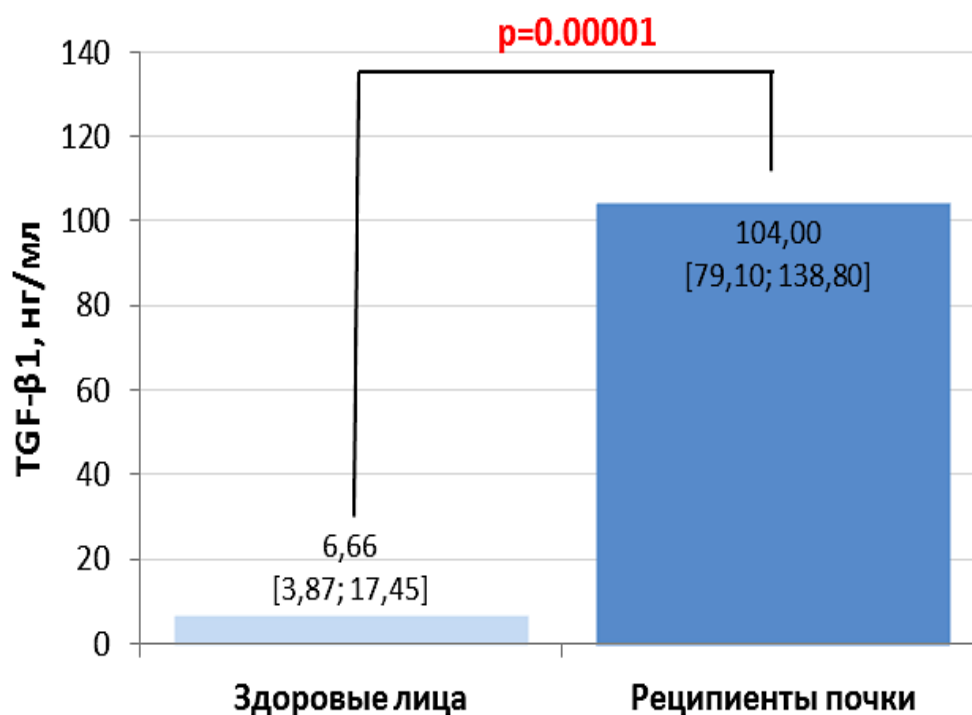


Рисунок 1 – Сравнительный анализ концентрации TGF-β1 в сыворотке крови реципиентов почки и здоровых лиц

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.

Концентрация TGF-β1 в сыворотке крови у лиц, вошедших в исследование, варьировала в широких пределах, не различалась у мужчин и женщин ($p=0,37$); и не коррелировала с возрастом ($r=0,09$; $p=0,18$).

Также отсутствовала значимая корреляция уровня TGF-β1 с длительностью времени (сутки), прошедшего с момента трансплантации ($r=0,137$; $p=0,13$). Не выявлено значимых различий концентрации TGF-β1 у реципиентов почки в ранние и отдаленные сроки после трансплантации ($p=0,47$).

Проведен корреляционный анализ концентрации TGF-β1 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.

Таблица 1 – Корреляционный анализ уровня TGF-β1 с показателями общего и биохимического анализа крови и мочи реципиентов почки

Параметр	Корреляция Спирмена (r)	Уровень значимости (p)
Общий анализ крови		
Гемоглобин (г/л)	r= 0,037	p= 0,689
Лейкоциты (10 ⁹ /л)	r= 0,075	p= 0,496
Тромбоциты (10 ⁹ /л)	r= 0,206	p= 0,025
Биохимический анализ крови		
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)	r= -0,246	p= 0,015
Глюкоза (ммоль/л)	r= 0,102	p= 0,308
Специальный анализ		
СКФ (мл/мин/1.73м ²)	r= -0,026	p= 0,76
Такролимус (нг/мл)	r= -0,044	p= 0,630
Анализ мочи		
Эритроциты (в п/зр.)	r= 0,354	p= 0,00001
Лейкоциты (в п/зр.)	r= 0,245	p= 0,006
Протеинурия (г/л)	r= 0,280	p= 0,001

Корреляционный анализ показал отсутствие связи уровня TGF-β1 с большинством параметров анализа крови, а также со скоростью клубочковой фильтрации (СКФ) трансплантата, однако имела место прямая корреляция с числом тромбоцитов (r=0,206; p=0,025) и обратная – с активностью трансаминазы АСТ (r=-0,213; p=0,024). Уровень TGF-β1 не зависел от концентрации такролимуса в крови реципиентов.

Оценка связи содержания TGF-β1 в сыворотке крови с показателями анализа мочи показала значимую прямую корреляцию с содержанием эритроцитов (r=0,354; p=0,00001), лейкоцитов (r=0,245; p=0,006) и протеинурией (r=-0,280; p=0,001).

Полученные данные отражают наличие связи TGF-β1 с почечной патологией, а также с рядом основных клинических и лабораторных показателей, рутинно применяемых для диагностики системных нарушений в организме.

Анализ концентрации TGF-β1 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».

Проведен сравнительный анализ концентраций TGF-β1 у реципиентов почки с дисфункцией и нормальной функцией трансплантата (рисунок 2).

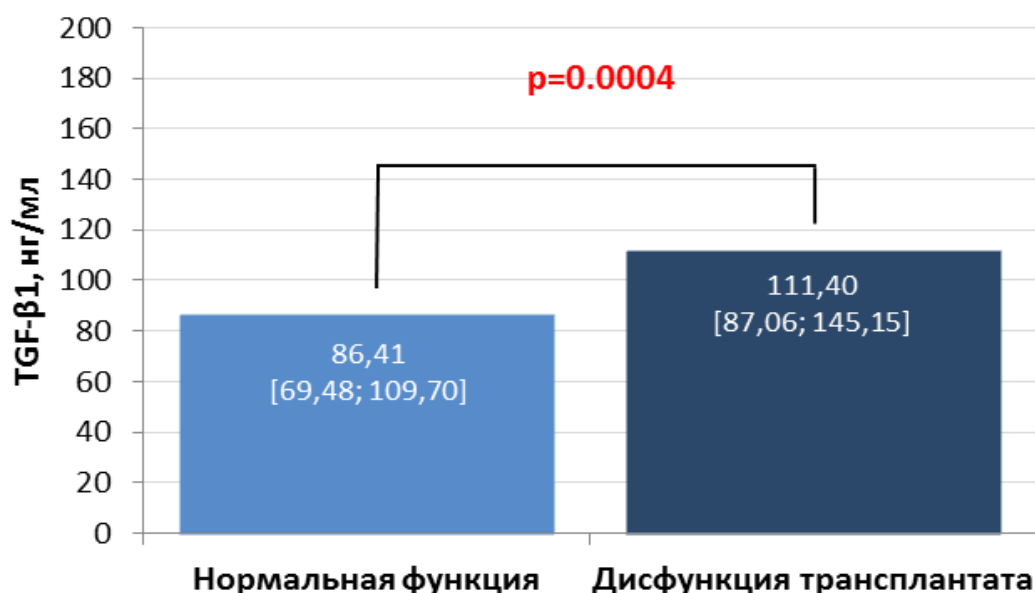


Рисунок 2 – Сравнительный анализ концентрации TGF-β1 у реципиентов с нормальной функцией и у реципиентов с дисфункцией трансплантата

Как показано на рисунке, у реципиентов почки с дисфункцией трансплантата, уровень TGF-β1 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-EPI. Результаты сравнительного анализа представлены в таблице 2.

Таблица 2 – 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]	p<0,00001
Мочевина в крови, ммоль/л	7,69 [6,20; 8,80]	19,88 [12,86; 28,10]	p<0,00001
Белок в моче, г/л	0,03 [0,03; 0,04]	0,14 [0,04; 0,40]	p<0,00001
СКФ, мл/мин	81,30 [68,50; 100,00]	20,80 [11,35; 36,50]	p<0,00001

Как видно из таблицы 2, 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).

Характеристика вариантов патологии трансплантата, выявленной по результатам морфологических исследований биопсийного материала, у реципиентов с дисфункцией трансплантатированной почки

Для наиболее точной диагностики патологии нефротрансплантата осуществлялось гистохимическое и иммуногистохимическое исследование биопсийного материала, взятого в процессе пункционной биопсии трансплантатированной 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 3 представлены примеры изображения образцов биоптатов почки с указанными вариантами патологий.

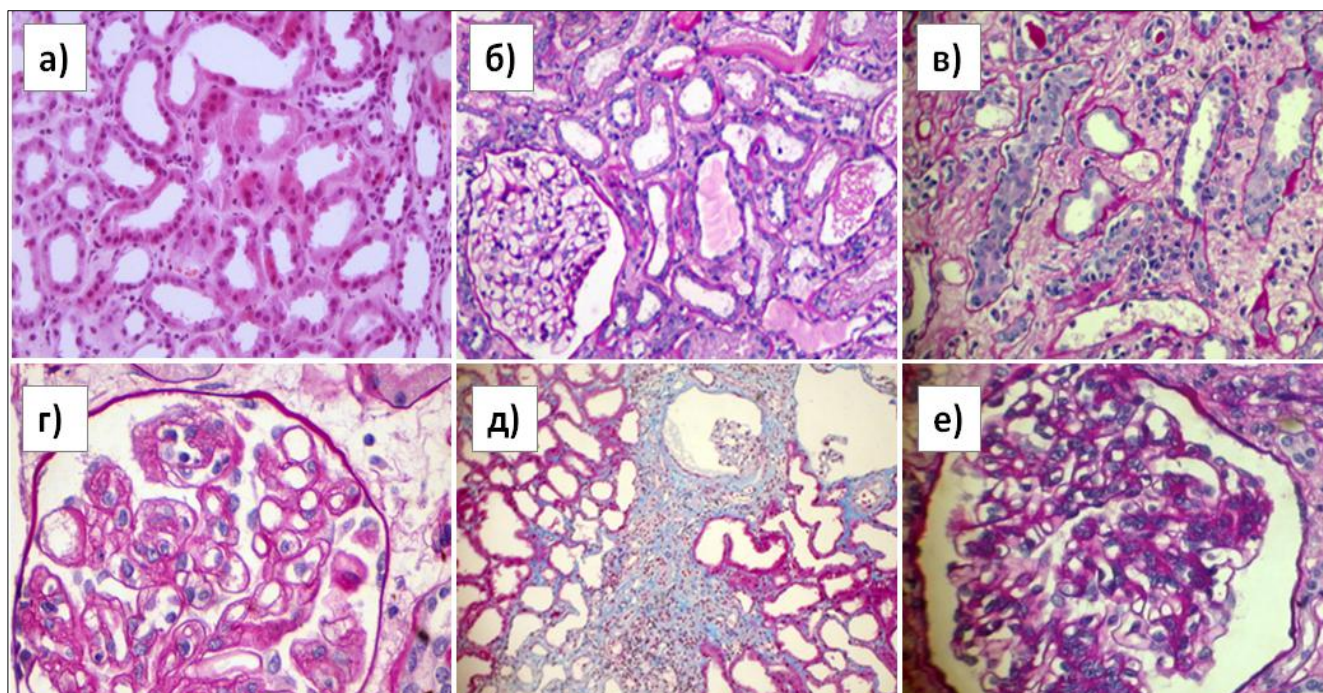


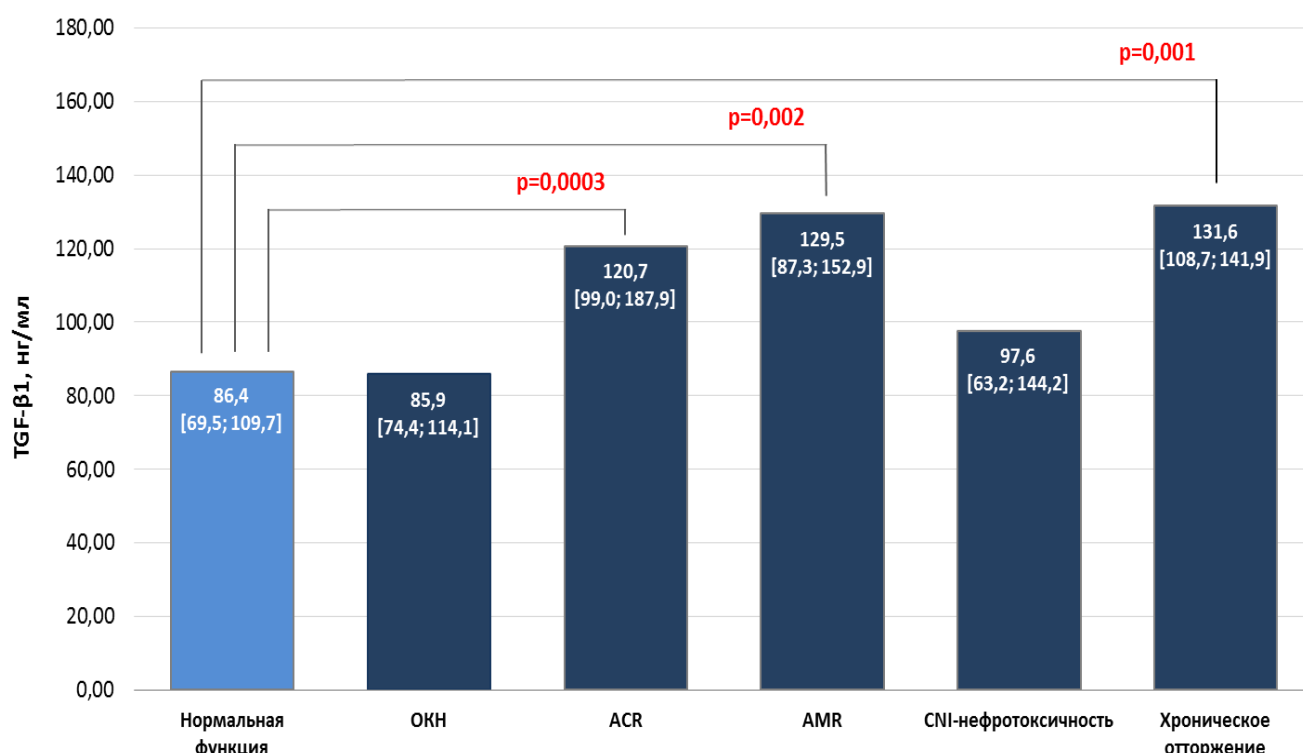
Рисунок 3 – Изображение образцов биоптатов почки с окрашиванием гематоксилином и эозином: а) норма, окраска Трихромом по Массону * 40; б) острый канальцевый некроз (ОКН) Окраска PAS * 100; в) острое клеточное интерстициальное отторжение (ACR), окраска PAS * 100; г) гуморальное отторжение, трансплантационная 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.

Сравнительный анализ концентрации $TGF-\beta 1$ в сыворотке крови реципиентов с гистологическими и иммуногистохимическими признаками патологии нефротрансплантата

Установлено, что у реципиентов почки с дисфункцией трансплантата уровень креатинина, мочевины, показателя СКФ и протеинурии в моче достоверно выше, чем у реципиентов без дисфункции трансплантата.

Проведен сравнительный анализ концентрации $TGF-\beta 1$ в сыворотке крови реципиентов с нормальной функцией трансплантата и реципиентов с дисфункцией трансплантированной почки, обусловленной различными видами патологии, верифицированной по результатам гистологического и иммуногистохимического исследования биоптатов трансплантата (рисунок 4).



ОКН – острый канальцевый некроз; АСР – острое клеточное отторжение; АМР – острое гуморальное отторжение; СNI-нефротоксичность – интерстициальный фиброз с признаками нефротоксичности ингибиторов кальциневрина

Рисунок 4 – Сравнительный анализ уровня $TGF-\beta 1$ в крови реципиентов почки с дисфункцией трансплантата различной этиологии

Сравнительный анализ показал достоверно более высокие уровни $TGF-\beta 1$ у реципиентов с АСР (p=0,0003), АМР (p=0,002) и хроническим отторжением (p=0,001) в сравнении с реципиентами без дисфункции. Значимых различий уровня $TGF-\beta 1$ при ОКН или СNI-нефротоксичности в сравнении с

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

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».

На рисунке 5 представлены результаты сравнительного анализ уровня TGF- β 1 у реципиентов с дисфункцией нефротрансплантата вызванной иммунными процессами и неиммунными процессами и реципиентов без дисфункции (рисунок 5).

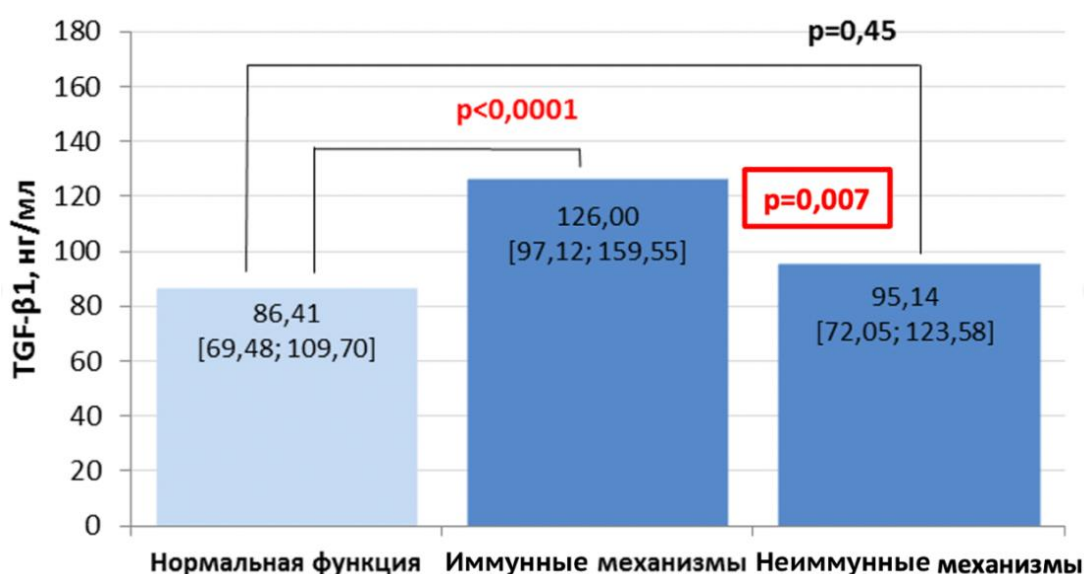


Рисунок 5 – Сравнительный анализ уровня TGF- β 1 у реципиентов почки с нормальной функцией трансплантата и с дисфункцией, вызванной иммунными механизмами (острое клеточное, гуморальное и хроническое отторжение) и неиммунными механизмами (острый канальцевый некроз, CNI-нефротоксичность)

У реципиентов с дисфункцией трансплантата, вызванной иммунными механизмами, уровень TGF- β 1 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- β 1 в процессах повреждения трансплантата, вызванных иммунной реакцией отторжения.

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 (рисунок 6).

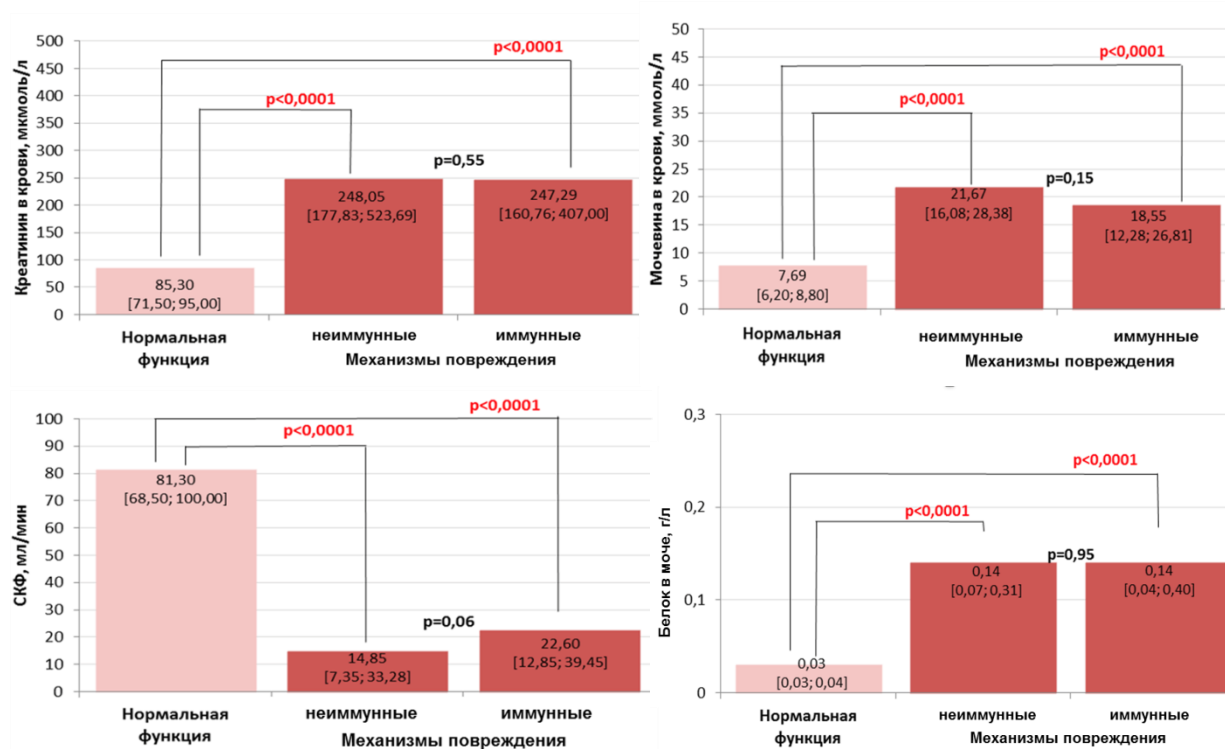


Рисунок 6 – Сравнительный анализ креатинина и мочевины в крови, СКФ и содержания белка в моче у реципиентов почки с нормальной функцией трансплантата и с дисфункцией, вызванной иммунными и неиммунными повреждениями

Вместе с тем, значимых различий величины креатинина и мочевины в крови, белка в моче и СКФ у пациентов с повреждениями трансплантата иммунной и неиммунной природы не установлено ($p = 0,55$, $p = 0,15$, $p = 0,95$, $p = 0,06$, соответственно).

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

Анализ диагностической значимости TGF- β 1 для выявления реципиентов с дисфункцией трансплантата, обусловленной иммунными механизмами

В ходе настоящего исследования были выявлены значимо более высокие показатели концентрации TGF- β 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- β 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 7).

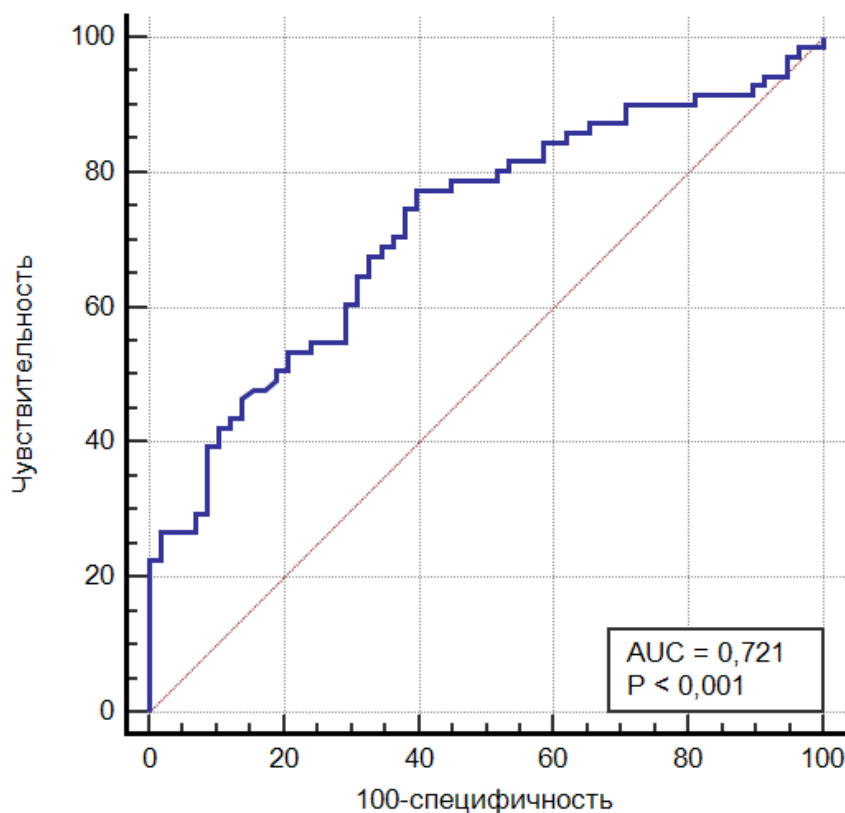


Рисунок 7 – ROC-кривая концентрации TGF- β 1 в сыворотке крови реципиентов почки с дисфункцией трансплантата, вызванной иммунными механизмами

Пороговая концентрация в сыворотке крови TGF- β 1 для выявления дисфункции трансплантацированной почки, обусловленной механизмами острого и хронического отторжения, составила 94,3 нг/мл.

У реципиентов почки с уровнем TGF- β 1, 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 ($RR=2,2\pm 0,22$ [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- β 1 в сыворотке крови для выявления пациентов с высоким риском осложнений иммунной природы после трансплантации почки составили 70,5% и 68,6% соответственно. В таблице 3 представлены основные диагностические характеристики теста.

Таблица 3 – Диагностические характеристики TGF- β 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

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

ВЫВОДЫ

1. У реципиентов почки концентрация TGF- β 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- β 1 в сыворотке крови ($p=0,0004$).

3. Уровень TGF- β 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- β 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- β 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- β 1 для выявления дисфункции трансплантированной почки, обусловленной механизмами острого и хронического отторжения, составила 94,3 нг/мл; у реципиентов почки с уровнем TGF- β 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- β 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- β 1 у реципиентов почки может иметь значение для персонифицированного подхода к выбору оптимального режима иммуносупрессивной терапии.

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

Реципиенты почки с уровнем TGF- β 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 ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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.
2. Анализ концентраций TGF- $\beta 1$ у реципиентов с дисфункцией трансплантированной почки / С.О. Шарапченко, А.А. Мамедова, Д.А. Великий, М.А. Особливая, О.Е. Гичкун, О.Р. Быстрова, Д.А. Сайдулаев, О.П. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25, № 5. – С. 139-140.
3. Изменение концентрации галектина-3 при дисфункции трансплантата у реципиентов почки / Д.А. Великий, М.А. Особливая, С.О. Шарапченко, А.А. Мамедова, О.Е. Гичкун, О.Р. Быстрова, И.А. Милосердов, О.П. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25, № 5. – С. 138.
4. Диагностическая значимость TGF- $\beta 1$ у реципиентов с дисфункцией трансплантированной почки / О.П. Шевченко, С.О. Шарапченко, Д.А. Великий, О.Е. Гичкун, Е.С. Столяревич, Н.П. Можейко, Д.А. Сайдулаев, Р.М. Курабекова, Е.А. Вакурова, А.А. Мамедова, М.А. Особливая // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25, № 4. – С. 130-138.
5. Галектин-3 у реципиентов с дисфункцией трансплантированной почки: анализ прогностической значимости / Д.А. Великий, С.О. Шарапченко, О.Е. Гичкун, Е.С. Столяревич, Д.А. Сайдулаев, М.А. Особливая, А.А. Мамедова, О.П. Шевченко [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2024. – Т. XXVI, № 3. – С. 159 – 167.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – артериальное давление

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АТП – аллотрансплантация почки

ДИ – доверительный интервал

ИФА – иммуноферментный анализ

СКФ – скорость клубочковой фильтрации

ХБП – хроническая болезнь почек

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

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

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

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

De – диагностическая эффективность метода

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- β – трансформирующий фактора роста-бета