

A beültetett vesében kialakuló transzplantációs
glomerulopátiához társult makro-, és
mikrocirkulációs elváltozások klinikopatológiai
jelentősége

PhD téziszfüzet

Dr. Dobi Deján

Szeged, 2018

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Patológiai Intézet

Témavezető: Professzor Dr. Iványi Béla, DSc

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD tézis a következő közleményeken alapul:

- I. Dobi D, Bodó Z, Kemény É, et al. Morphologic features and clinical impact of arteritis concurrent with transplant glomerulopathy. *Pathol Oncol Res.* 2015; 22:15–25. (Eredeti eredményeket bemutató tudományos közlemény) **IF: 1,736**
- II. Dobi D, Tatapudi V, Rajalingam R, et al. Quantitative changes of kidney microvasculature in transplant glomerulopathy *Virchows Arch.* 2015; 467:S34. (Előadás absztrakt)
- III. Dobi D, Bodó Z, Kemény É, et al. Peritubular capillary basement membrane multilayering in early and advanced transplant glomerulopathy: quantitative parameters and diagnostic aspects. *Virchows Arch.* 2016; 469:563-573. (Eredeti eredményeket bemutató tudományos közlemény) **IF: 2,848**

Bevezetés

Napjainkban a veseátültetés eredményességét hosszútávon korlátozó legfontosabb tényező a krónikus antitestes rejekció (antibody-mediated rejection – ABMR) [1, 2]. A klinikai képet változó fokú proteinuria és a vesefunkció végstádiumú veseelégtelenségbe torkolló lassú romlása jellemzi [3]. A rejekció kórismézésének az arany standardja a veseallograft biopsziás vizsgálata. Az antitestes, ill. a T-sejtes kilökődés - a biopsziás mintában jórészt gócosan manifesztálódó - diagnosztikus lézióit a kétévente frissített Banff-klasszifikáció rögzíti [4].

Krónikus ABMR-ben donor specifikus allo-antitestek (DSA-k) képződnek, melyek szublitikusan károsítják a veseallograft endotélsejtjeit. Az endotélsejtek aktiválódása, károsodása, majd regenerációja új bazális membrán (BM) rétegek képződéséhez vezet, melyek a glomerulusokban fénymikroszkópos speciális festésekkel (PAS, Jones-ezüst) kettős kontúrú kacsokként észlelhetők. Az elváltozást transzplantációs glomerulopátiának (TxG) nevezik. A peritubuláris kapillárisokban (peritubular capillaries, PTC) a BM többszöröződése (peritubular

capillary basement membrane multilayering – PTCBMML) legjobban elektronmikroszkóppal elemezhető [5]. Az endotél-károsodás az artériákban intimális fibrózist indukál, megállapításához fénymikroszkópos speciális festések (elasztika, trikróm) szükségesek.

A 2015-ös Banff klasszifikáció [6] a krónikus aktív ABMR diagnózisát három kritérium teljesüléséhez köti: 1) DSA-kiváltotta krónikus szövetkárosodás a biopsziás mintában (TxG, vagy PTCBMML, vagy újonnan keletkezett intimális fibrózis); 2) az alloantitest-endotél kölcsönhatás immunhisztokémiai bizonyítékeként komplement 4d (C4d)-pozitivitás a peritubuláris kapillárisokban, vagy fénymikroszkóppal legalább mérsékelt súlyosságú glomeruláris és peritubularis kapillaritisz; 3) DSA jelenléte a szérum mintában.

Bár a TxG önmagában is negatív prognosztikai értékű, a graft túlélését számos társult tényező is befolyásolja. Növeli a graftvesztés esélyét az emelkedett vizelet fehérje-kreatinin arány, a II. osztályú humán leukocyta antigén-ellenes DSA-k jelenléte, valamint a C4d pozitivitás a peritubuláris kapillárisokban [7]. Vannak azonban olyan morfológiai elváltozások, amelyek

prognosztikai jelentősége kevésbé ismert. Ilyen például a TxG-hez társult arteritisz, vagy a mikrocirkuláció átépülésének mértékét kifejező kvantitatív ultrastrukturális paraméterek.

A vesebiopsziás minta elektronmikroszkópos vizsgálata hozzájárulhat a krónikus ABMR korai diagnózisához. A Banff-kritériumok két ultrastrukturális eltérést sorolnak fel a DSA-kiváltotta krónikus szövetkárosodás jelei között [6]: az igen enyhe fokú TxG manifesztációjaként a glomeruluskacsok csak elektronmikroszkóppal észrevehető kettőződését, valamint a súlyos fokú PTCBMML-t (1 PTC \geq 7 BM réteggel és legalább 2 PTC \geq 5 réteggel).

Nézetünk szerint a PTCBMML enyhébb formái szintén DSA-közvetítette szövetkárosodásra utalnak, ha egyéb okok, mint pl. trombotikus mikroangiopátia, obstruktív uropátia és tubulointerstitiális nefritisz kizárhatók [8-10]. Nem ismert azonban, hogy a PTCBMML enyhébb formái közül melyik jellemzi a krónikus aktív ABMR korai, ill. az előrehaladott stádiumát, ennek megfelelően a diagnózisban értékesíthető szerepük sem tisztázott.

Célkitűzések

A TxG-hez köthető artéria-, és mikrovaszkuláris elváltozások klinikopatológiai jelentőségének megismerésére a következő vizsgálati tervet állítottuk össze:

- 1) A TxG-hoz társuló arteritisz prognosztikus jelentőségének, illetve morfológiai sajátosságainak a vizsgálata.
- 2) A TxG-ban megfigyelhető ultrastrukturális elváltozások kvantitatív jellemzése morfometriai eszközökkel, valamint ezen elváltozások klinikai jelentőségének a tanulmányozása.
- 3) Annak meghatározása, hogy milyen súlyosságú PTCBMMML küszöbérték jellemzi a korai, ill. az előrehaladt krónikus ABMR-t; a küszöbértékek diagnosztikus alkalmazhatóságának a vizsgálata.

Anyag és Módszer

Általános megfontolások

A célkitűzésben felsorolt kérdések megválaszolására egy-egy, retrospektív, eset-kontroll vizsgálatot terveztünk. A kutatások során a Szegedi Tudományegyetem, valamint a University of California, San Francisco, Patológiai Intézeteinek vesebiopsziás mintáit használtuk fel. A mintákat fénymikroszkópos, immunfluoreszcens és elektronmikroszkópos vizsgálatra az intézeti protokollok szerint dolgoztuk fel. A Banff 2015-ös klasszifikáció alapján [6] szövettanilag elemeztük az akut és krónikus elváltozások meglétét és súlyosságát az artériákban, a glomerulusokban, a PTC-okban, az intersticiumban és a tubulusokban. A DSA meghatározás Luminex technológiával történt.

A statisztikai feldolgozás során kétmintás t-próbát, Mann-Whitney U tesztet, Kruskal-Wallis tesztet, és khinégyszet próbát használtunk az adatok jellegzetességeitől függően. A graft-túlélés vizsgálatára Kaplan-Meier analízist alkalmaztunk. A graftvesztés időpontjaként a dialízis kezelés újratezdésének napját határoztuk meg.

A transzplantációs glomerulopátiához társuló arteritisz klinikopatológiai jellegzetességei

Tanulmányunkban egymást követő ötvenkilenc, TxG-t mutató beteget vizsgáltunk, akiket két csoportra osztottunk aszerint, hogy a biopsziás mintában fennállt-e arteritisz vagy sem, majd összehasonlítottuk ezeknek a csoportoknak a klinikai és morfológiai sajátosságait, valamint a medián graft-túlélésüket. Az artériás lumenszűkület osztályozására a Banff-klasszifikáció nem különít el kategóriákat. Magunk a lumenszűkületet okozó eltéréseket három csoportba soroltuk: 1) fibrotizáló intimális arteritisz [mononukleáris lőbsejtek a fibrotikus intimában (cv_{mo})]; 2) intimális fibrózis gyulladással sejt nélkül (cv_{IF}); és 3) intimális fibroelasztózis (cv_{IFE}). Utóbbi eltérés nem-alloimmun okú: magasvérnyomás betegségben, ill. a vese korosodásakor látjuk, a lamina elastika interna többszöröződése jellemzi. Az így képzett csoportokban összevetettük az artériás lumenszűkület mértékét, továbbá az általunk definiált morfológiai változók, ill. a Banff-léziók közötti statisztikai

összefüggéseket hierachikus klaszter analízissel tártuk fel. Az intimában megfigyelhető gyulladáso s sejtek immunfenotipusát CD8, valamint TIA-1 (cytotoxikus T-lymphocyta markerek), CD68 (makrofág marker), és CD3 (pan-T-sejt marker) immunfestésekkel elemeztük.

A transzplantációs glomerulopátiához társult mikrocirkulációs elváltozások kvantitatív elemzése

Ebbe a tanulmányba negyvenhét TxG-t mutató recipienst és tizenegy, eltérés nélküli, protokoll biopsziával vizsgált recipienst választottunk be. A rutin szövettani vizsgálat kiegészítéseként részletes elektronmikroszkópos analízist végeztünk, melynek során meghatároztuk a BM és az endotélréteg vastagságát, továbbá az endotél fenesztráció (EF) gyakoriságát mind a glomerulusokban mind a PTC-okban. Emellett a filtrációs rés (filtration slit - FS) gyakoriságát, továbbá a PTC-ok átlagos BM rétegszámát (PTC_{CIRC}) is elemeztük. A morfometriai adatokat a vesefunkciós, valamint a szerológiai paraméterekkel vetettük össze. A glomeruláris BM és endotél vastagság, valamint az EF és FS gyakoriság

felhasználásával a TxG csoportot klaszter analízis segítségével két alcsoportra bontottuk. A két alcsoport klinikai, szerológiai és morfológiai jellegzetességeit, valamint medián graft túlélésüket a már részletezett statisztikai módszerekkel hasonlítottuk össze.

A peritubuláris kapilláris bazális membrán többszöröződés diagnosztikus vontakozásai és kvantitatív jellegzetességei korai és előrehaladt transzplantációs glomerulopátiában.

A harmadik tanulmányban ötvenhét, TxG-t mutató biopsziás minta PTC elváltozásait elemeztük elektronmikroszkóppal. A DSA-kiváltotta PTCBMML diagnózisára a Banff klasszifikáció által használt kritérium mellett (elnevezése: “súlyos” PTCBMML) további két küszöbértéket is elemeztünk (elnevezésük: “mérsékelt” PTCBMML, ill. “megengedő” PTCBMML), melyeket korábban Iványi Béla alkalmazott a PTCBMML jelenségeinek a vizsgálatokor [8-10]. A “mérsékelt” kritérium teljesítéséhez a mintának legalább 3 PTC-t kellett tartalmaznia minimálisan 5 körkörös BM réteggel

vagy 1 PTC-t legalább 7 réteggel, míg a “megengedő” kritérium teljesítéséhez legalább 1 PTC-t kellett látnunk legalább 5 körkörös BM réteggel. Meghatároztuk a PTC_{CIRC} értékét is, az esetenként vizsgált PTC szám medián értéke 16 volt. Az enyhe és mérsékelt-súlyos TxG-t mutató betegek klinikai, szerológiai, szövettani és ultrastrukturális kvantitatív PTC paramétereit statisztikai módszerek segítségével hasonlítottuk össze. Külön meghatároztuk a $PTCBMML$ küszöbértékeknek az előrehaladt TxG-re mutatott szenzitivitását és specificitását.

Eredmények

A transzplantációs glomerulopátiához társuló arteritisz klinikopatológiai jellegzetességei

Tizenhat mintában állt fenn arteritisz (tizenöt fibrotizáló intimális, egy akut intimális morfológiát mutatott). Kilenc esetben C4d-pozitív, hat esetben C4d-negatív idült aktív ABMR, egy esetben pedig idült inaktív ABMR állt fenn. Tizenegy mintában az ABMR-hez T-sejt közvetítette alloimmun válasz jelei társultak (öt esetben akut T-sejtes rejekció, hat esetben borderline elváltozás). Az intersticiális gyulladás mértéke mind a fibrotikus mind a fibrózist nem mutató kéregállományban magasabb volt az arteritiszes csoportban, ahogy az artériás lumenszűkület súlyossága is. A klaszter analízis a fibrotizáló intimális arteritist jobbra az akut gyulladásos elváltozásokkal, az intimális fibrózist pedig a krónikus vaszkuláris eltérésekkel társította. Az intimális fibroelastosis nem mutatott statisztikai összefüggést más szövettani változókkal. Az immunhisztokémiai vizsgálat az intimális gyulladásos sejtes beszűrődésben tizennégy esetben a T-

sejtek dominanciáját mutatta a makrofágokkal szemben, tíz esetben pedig cytotoxikus T-sejteket is igazolt. Az arteritiszes betegcsoport medián graft túlélése 7,5 hónapnak adódott (95 % CI, 2 és 13 hónap között), mely szignifikánsan alacsonyabb volt az arteritisz-mentes csoport medián graft túlélésénél [29 hónap (95 % CI, 17 és 41 hónap között), $p = 0.001$].

A transzplantációs glomerulopátiához társult mikrocirkulációs elváltozások kvantitatív elemzése

A TxG és a protokoll csoport szignifikáns különbséget mutatott többek között az EF gyakoriságra [720 egység/mm (640) vs. 2160 egység/mm (120), a glomeruláris BM membrán vastagságra [890 nm (520) vs. 319 nm (90)] valamint a FS gyakoriságra nézve [1110 egység/mm (410) vs. 1490 egység/mm (280)]. Hasonló arányú (szignifikáns) különbség volt megfigyelhető a két csoport között a PTC-k ultrastrukturális eltéréseiben is. Szignifikáns korrelációt mutattunk ki az eGFR érték és a PTC-k endotélvastagsága ($r_s = - 0.713$, $p < 0.001$) valamint a vizelet fehérje/kreatinin arány és glomeruláris

BM vastagság között ($r_s = 0.626$, $p < 0.001$). A válogatott ultrastrukturális paraméterek alapján elvégzett HCA a TxG csoportot két alcsoportra bontotta. A kevésbé súlyos ultrastukturális eltérésekkel jellemezhető alcsoport kumulatív graft túlélési hányada nem csökkent 50 % alá a vizsgálati periódusban, még a másik alcsoport medián graft-túlélése 25 hónapnak bizonyult (95 % CI, 4 és 46 hónap között, $p < 0.0005$). A ROC-görbe analízis szerint a 925 nm-es glomeruláris BM vastagság küszöbérték a súlyos glomeruláris elváltozásokat mutató csoportot 100 %-os szenzitivitással és 95 %-os specificitással azonosította.

A peritubuláris kapilláris bazális membrán többszöröződés diagnosztikus vonatkozásai és kvantitatív jellegzetességei korai és előrehaladt transzplantációs glomerulopátiában

Az enyhe TxG a klinikai adatok elemzése alapján az idült ABMR korai morfológiai megnyilvánulásának, míg a mérsékelt-súlyos TxG a rejekció előrehaladott stádiumának felelt meg. A DSA-közvetítette PTCBMMML

három, különböző súlyosságú BM rétegződést alapul vevő meghatározása közül a “megengedő” kritérium mutatta a legalacsonyabb specificitást (73 %) ugyanakkor a legmagasabb szenzitivitást (83 %) a mérsékelt-súlyos TxG-re. Az átlagosan 3 BM réteg a PTC-k körül mint PTC_{CIRC} küszöbérték hasonló specificitási-szenzitivitási mutatókkal rendelkezett. A “mérsékelt” kritérium szenzitivitási és specificitási értékei 87 % és 64 % voltak. Ezekkel szemben a Banff-klasszifikáció “súlyos” $PTCBMML$ kritériuma 93 %-os specificitást és 52 % szenzitivitást mutatott mérsékelt-súlyos TxG-re. A súlyos $PTCBMML$ -t jellemző PTC_{CIRC} érték 4 BM rétegnek adódott. Míg az enyhe TxG-t mutató biopsziák 26 %-a felelt meg a “megengedő” kritériumnak, csupán 6 %-ukban észleltünk “súlyos” $PTCBMML$ -t. Az enyhe TxG-re jellemző PTC_{CIRC} érték 2,6 réteg volt, szemben a mérsékelt-súlyos TxG-ben mért 4,5 réteggel ($p < 0.0001$). Csak a “megengedő” $PTCBMML$ kritérium, valamint a $PTC_{CIRC} = 3$ küszöbérték bizonyult a graft-túlélés tekintetében prognosztikus értékűnek.

Összefoglalás

Első tanulmányunkban a TxG-hez társuló arteritisz klinikopatológiai jellegzetességeit vizsgáltuk és a két morfológiai elváltozás viszonylag gyakori együttállását figyeltük meg. Egy eset kivételével az arteritisz artériás intimális fibrózissal szövődött, ezt a szövettani képet fibrotizáló intimális arteritiszként (cv_{mo}) határoztuk meg. A klaszter analízis alapján a cv_{mo} lézió az egyéb gyulladásos szöveti jelekkel mutatott rokonságot, igazolva a folyamat aktív jellegét. Ezzel szemben a gyulladásos beszűrődéstől mentes intima fibrózis (cv_{IF}), a TxG és a PTCBMML léziókkal alkotott közös csoportot, hangsúlyozva ezen elváltozások krónikus karakterét. Az intimális fibroelasztózis (cv_{IFE}) nem mutatott statisztikai összefüggést a Banff-változókkal, utalva arra, hogy a lézió valóban nem-alloimmun tényezőkkel áll összefüggésben. Emellett a cv_{mo} léziót mutató szövettani mintákban súlyosabb volt az artériás lumenszűkület és a gyulladásos sejtes beszűrődés mértéke azokhoz a betegekhez képest, akiknek a mintája cv_{IF} vagy cv_{IFE} elváltozást mutatott.

Ezek a morfológiai jellegzetességek feltehetően hozzájárultak az arteritiszes betegek alacsonyabb graft túlélési rátájához. Az immunhisztokémiai vizsgálatok szerint az intimális gyulladásos beszűrődést elsősorban T-sejtek, kisebb részben makrofágok hozták létre. Ez az észlelet az irodalmi megfigyelésekkel összhangban arra utal, hogy az arteritisz létrejöttében a T-sejtes és a humorális immunválasz egyaránt szerepet játszott, tehát az artériák károsodását non-compliance vagy alulimmunszupprimált állapot okozta kevert rejekció idézte elő.

Következő vizsgálatunkban a mikrocirkuláció elváltozásaira összpontosítottunk, és igazoltuk, hogy a glomeruláris és peritubuláris kapilláris hálózat jelentős ultrastrukturális átépülésen megy keresztül mire az idült antitestes rejekció fénymikroszkóposan felismerhető stádiumba kerül. Emellett kimutattuk, hogy a glomeruláris BM megvastagodás szignifikáns pozitív korrelációt mutat a vizelet fehérje/kreatinin hányadossal és a 925 nm-es glomeruláris BM vastagság mint küszöbérték negatív prognosztikai tényező TxG-ban. Az ennél az értéknél enyhébb glomeruláris BM vastagságot mutató eseteknél,

annak ellenére, hogy fénymikroszkóposan fennáll TxG, szignifikánsan hosszabb túléléssel számolhatunk.

Utolsó vizsgálatunkban, a TxG-hoz kapcsolódó PTCBMML jellegzetességeit vizsgáltuk. Eredményeink alapján a DSA-közvetítette PTCBMML jelenlegi Banff küszöbértéke nem alkalmas a krónikus ABMR korai diagnózisára, mert a kilökődés azon stádiumában van elsősorban jelen, amikor a glomeruláris kapilláris kacs kettőződése már fénymikroszkópos vizsgálattal is nyilvánvaló, tehát az ultrastrukturális vizsgálat diagnosztikus szempontból nem indokolt; a küszöbértéknek nincs prognosztikai értéke ebben a betegcsoportban. Mindezek alapján javasoljuk a “megengedő” kritérium (valamint a $PTC_{CIRC} \geq 3$) használatát a DSA-közvetítette PTCBMML diagnózisának a felállítására. Ez a definíció képviseli ugyanis a legkorábbi, prognosztikus szempontból releváns krónikus ABMR-hez kapcsolható szövetkárosodást a PTC-okban, a megfelelő klinikopatológiai kontextusban (DSA jelenléte/C4d pozitivitás/legalább mérsékelt fokú mikrovaszkuláris gyulladás).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a krónikus ABMR továbbra is a legfontosabb kihívása a graft-túlélés javítását célzó törekvéseknek. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a beültetett vese érhalózatában kialakuló morfológiai elváltozások gondos tanulmányozása hozzájárulhat ezekhez az erőfeszítésekhez egyrészt új prognosztikus markerek azonosításával, másrészt a diagnosztikus kritériumok finomhangolásával, melyek együttesen lehetővé teszik a maximális terápiás haszon szempontjából ideális betegcsoport jobb azonosítását.

Irodalom

1. Sellares J, De Freitas D, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and non-adherence. *Am J Transplant.* 2012; 12: 388-399.
2. Sis B, Campbell PM, Mueller T, et al. Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. *Am J Transplant.* 2007; 7: 1743-1752.
3. Husain S, Sis B. Advances in the Understanding of Transplant Glomerulopathy. *Am J Kidney Dis.* 2013; 62: 352-363.
4. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, et al. The Banff 2017 kidney meeting report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant.* 2018; 18: 293-307.

5. Ivanyi B, Kemeny E, Rago P, et al. Peritubular capillary basement membrane changes in chronic renal allograft rejection: Comparison of light microscopic and ultrastructural observations. *Virchows Arch.* 2011; 459: 321-330.
6. Loupy A, Haas M, Solez K, et al. The Banff 2015 kidney meeting report: Current challenges in rejection classification and prospects for adopting molecular pathology. *Am J Transplant.* 2017; 17: 28-41.
7. Lesage J, Noël R, Lapointe I, et al. Donor-specific antibodies, C4d and their relationship with the prognosis of transplant glomerulopathy. *Transplantation.* 2014; 99: 69–76.
8. Iványi B, Fahmy H, Brown H, et al. Peritubular capillaries in chronic renal allograft rejection: a quantitative ultrastructural study. *Hum Pathol.* 2000; 31: 1129-1138.

9. Ivanyi B, Kemeny E, Szederkenyi E, et al. The value of electron microscopy in the diagnosis of chronic renal allograft rejection. *Modern Pathol.* 2001; 14: 1200-1208.

10. Ivanyi, B. Transplant capillaropathy and transplant glomerulopathy: ultrastructural markers of chronic renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18: 655-660.