

Perspektivy: Interpretace změn v Banffské klasifikaci hodnocení morfoloických nálezů v transplantované ledvině

MUDr. Eva Honsová, Ph.D.

Pracoviště klinické a transplantační patologie IKEM, Praha

K hodnocení rejekčních a nerejekčních změn v ledvinných štěpech se nejčastěji používá tzv. *Banffská klasifikace*. Jde o klasifikační systém, který definuje a standardizuje interpretaci morfoloických znaků v biopsiích ledvinných štěpů, který byl poprvé dohodnut na pracovním setkání v kanadském Banffu v roce 1991.¹⁻³ Od té doby se periodicky ve dvouletých intervalech tato pracovní jednání opakují. Krátký interval umožňuje rychlou reakci a event. změnu klasifikačních systémů i terapeutických přístupů podle toho, jak se zlepšují znalosti patofyziologie rejekce. Protože se na poškození ledvinného štěpu podílejí velmi různorodé příčiny, které jsou navíc často přítomné v kombinacích, zůstává biopsie štěpu nejdůležitější metodou přinášející zásadní diagnostickou informaci, která vede ke zlepšení péče o pacienty. Včasná indikace k biopsii mnohdy významně ovlivňuje budoucí funkci štěpu. Podle výsledků jedné prospektivní studie, se klinická diagnóza před biopsií liší ve 42 % případů od biopsicky verifikovaného diagnostického závěru a biopsická diagnóza často vede k významné změně v péči o pacienta.⁴ Současně platná klasifikace (2007) je v uvedena tabulce 1.

První Banffské klasifikace navrhly kritéria pro definování celulární (zprostředkované lymfocyty T) rejekce, která prakticky nezměněna platí dosud. Klíčovým znakem je rozpoznání zánětlivé celulizace a její a semikvantitativní zhodnocení (intersticiální celulizace: i, tubulitida: t, endotelialitida: v). Od počátku bylo jasné, že tubulitida a zánětlivá celulizace v intersticiu není specifická pro celulární rejekci a je současně diagnostickým znakem infekčních i léky navozených intersticiálních nefritid, pokročilé akutní tubulární nekrózy nebo lymfoproliferativních onemocnění. Z obav před nadměrnou imunosupresivní terapií byly definovány prahové hodnoty pro skórování (nejméně 25 % zánětlivé celulizace v intersticiu a nejméně 4–5 lymfocytů v epitelu tubulů, při absenci endoteliality). V posledních letech s novými účinnými imunosupresivními protokoly ubýlo těžších forem celulárních rejekcí a vedle toho narůstá počet případů tzv. hraničních změn s ne úplně jasným klinickým významem, a to zvláště u pacientů s normální funkcí štěpu. To vede k úvahám, zda dokážeme tento typ celulizace správně interpretovat a zda někdy vedle zvažované subklinické rejekce nejde u některých pacientů spíše o „hodně“ tzv. regulační lymfocyty. Otázka zůstává zatím otevřená. Autoři některých studií tvrdí, že většina případů s morfologií hraničních změn představuje celulární rejekce. Na druhé straně jsou velké rozdíly ve výsledcích různých studií, které udávají rozptyl 30–80 % u případů hraničních změn, které bez léčby skutečně do rejekce progredovaly.

Zásadní změny v nahlížení na mechanismus rejekčního poškození štěpů vedly k významným modifikacím klasifikačního schématu v letech 2001–2005. V roce 2001 byla opuštěna kategorie hyperakutní rejekce a současně byla nově formulována kritéria *pro protilátkami zprostředkovanou rejekci* (humorální rejekci). Humorální mechanismy byly dlouho považovány za základ pouze hyperakutní rejekce, která byla příčinou velmi rychlé destrukce štěpu (během minut), a to v případech, kdy byly protilátky proti systému HLA dárce přítomny již před transplantací. Po zavedení citlivějších metod detekce protilátek do vyšetřovacích protokolů tento typ rejekce z klinické praxe téměř vymizel. Od 90. let 20. století

H. Feucht a spol. začali publikovat práce s důkazy o vztahu mezi přítomností depozit C4d frakce komplementu v peritubulárních kapilárách a horší funkcí štěpů.⁵ Současně P. Halloran uveřejnil výsledky studie se skupinou příjemců s „de novo“ protilátkami (proti antigenům dárce) a s horší funkcí štěpů. To byly dva zásadní milníky, které předznamenaly rozsáhlé aktivity v klinickém výzkumu, který během několika let umožnil definici kritérií humorální rejekce a její začlenění do Banffské klasifikace. Základními kritérii jsou: pozitivní průkaz depozit C4d v peritubulárních kapilárách, současná přítomnost protilátek proti antigenům dárce v séru a znaky morfoloického poškození tkáně. Nejprve byla definována kategorie „Akutní rejekce zprostředkovaná protilátkami“ (viz tabulka 1).

Tab. 1 Diagnostické kategorie pro ledvinné štěpy (Banff 97 – 2007 update;1)

1. Normální nález

2. Změny zprostředkované protilátkami (může být současně s 3, 4, 5 a 6)

2a) C4d depozita bez morfoloického průkazu aktivní rejekce

C4d+, přítomnost cirkulujících protilátek (DSA), bez známek akutní nebo chronické rejekce (g0, cg0, ptc0, bez laminace bazálních membrán ptc)

2b) Akutní rejekce zprostředkovaná protilátkami

C4d+, přítomnost cirkulujících protilátek (DSA), morfoloický průkaz akutního poškození tkáně

I. ATN-like minimum zánětu

II. Zánětlivé elementy v kapilárách (ptc/g > 0) a/nebo trombózy

III. Arteriální v3

2c) Chronická aktivní rejekce zprostředkovaná protilátkami

C4d+, přítomnost cirkulujících protilátek (DSA), morfoloický průkaz chronického poškození tkáně, takového jako dvojité kontury GBM a/nebo vrstvení bazálních membrán PTC a/nebo intersticiální fibróza/tubulární atrofie a/nebo fibrózní ztlustění intimy arterií.

3. Hraniční změny

Podezření na akutní rejekci zprostředkovanou lymfocyty T (může být současně s 2, 5 a 6). Tato kategorie se užívá, když není přítomna intimální arteriitida, ale jsou ložiska tubulitidy (t1, t2, t3) s minimální celulizací v intersticiu (i0 nebo i1). Nebo obráceně, když je intersticiální zánět (i2, i3) s mírnou tubulitidou (t1).

4. Rejekce zprostředkovaná lymfocyty T (může být současně s 2, 5 a 6)

4a) Akutní rejekce zprostředkovaná lymfocyty T (typ/grade)

IA. Případy se zánětem v intersticiu >25 % a středně těžké tubulitidy (t2)

IB. Případy se zánětem v intersticiu >25 % a těžké tubulitidy (t3)

IIA. S v1 (stenóza lumina <25 % nejméně v jedné arterii)

IIB. S v2 (stenóza lumina >25 %)

III. Případy s transmuralní arteriitidou, v3

4b) Chronická aktivní rejekce zprostředkovaná lymfocyty T

Chronická alograft arteriopatie (arteriální intimální fibróza s mononukleární celulizací tamtéž a s formací neointimy).

5. Intersticiální fibróza a tubulární atrofie bez průkazu jiné specifické etiologie

(může obsahovat nespecifické vaskulární změny a glomerulární sklerózu, stupeň změn je určen podle postižení intersticia)

Grade

I. Mírná intersticiální fibróza a tubulární atrofie (<25 % kůry)

II. Střední intersticiální fibróza a tubulární atrofie (26–50 % kůry)

III. Těžká intersticiální fibróza a tubulární atrofie (>50 % kůry)

6. Jiné: Změny, které nejsou považovány za rejekční (mohou být současně s 2, 3, 4 a 5)

C4d je koncový štěpný produkt aktivace klasické cesty komplementu. Klasická cesta komplementu je aktivována protilátkami. Během aktivace C4 dochází ke štěpení do několika fragmentů, z nichž C4d se kovalentně váže na cílové struktury (tj. buněčné membrány). Kovalentní vazba je stabilní a relativně dlouhodobá, a proto se C4d stává velmi vhodným markerem pro detekci a současně představuje otisk proběhlé reakce spuštěné protilátkami přímo ve tkáni. Cílovou strukturou je endotel a depozita se hodnotí v endotelu peritubulárních kapilár (PTC). C4d má navíc i další výhodu, kterou je fakt, že je jen velmi zřídka detekován v peritubulárních kapilárách v průběhu jiných ledvinových onemocnění.

Depozita C4d mohou být prokazována imunofluorescencí (vyžaduje nefixovanou tkáň) nebo imunohistochemicky (lze z tkáně fixované formolem). Průkaz imunofluorescencí je citlivější a v současně platné klasifikaci je návrh rozdílného hodnocení podle použité metodiky (tab. 2).

Pozitivní detekci C4d časně po transplantaci obvykle doprovází zánětlivá celulizace v lumenech peritubulárních kapilár. Část případů časně po transplantaci tyto morfologické znaky nemá, stejně tak jako většina biopsií provedených déle než rok po transplantaci. Protože neexistují žádné jiné morfologické znaky, které by byly přítomny společně s depozity C4d, měl by být průkaz C4d proveden v každé biopsii štěpu. Klasifikovat by se měla i peritubulární kapilaritida (znak ptc, tj. přítomnost zánětlivých elementů v peritubulárních kapilárách).

Vedle termínu akutní rejekce zprostředkovaná protilátkami zařadila poslední klasifikace do schématu kategorií: C4d depozita bez morfologického průkazu aktivní rejekce. Kritéria této kategorie jsou: přítomnost depozit C4d v peritubulárních kapilárách, cirkulující protilátky proti antigenům dárce a žádné histologické znaky aktivní rejekce (tj. g0, cg0, ptc0 a nepřítomnost štěpení bazálních membrán peritubulárních kapilár). Většinou jsou obdobné nálezy přítomny u příjemců s nestejno-skupinovým štěpem (v systému ABO), kteří mají v době biopsie dobrou a dlouhodobě stabilní funkci štěpu. Teoretickou otázkou zůstává, zda tito příjemci mají jen částečně aktivovanou komplementovou kaskádu, která je v některém dalším kroku přerušena, či zda jde u nich o tzv. doutnající rejekci. Protože v současnosti nemáme dost důkazů a znalostí, abychom na takto položenou otázku dokázali odpovědět, bylo doporučeno nepoužívat termín „akomodace“, který by předpovídal neškodný proces.

Modifikace Banffské klasifikace z roku 2005 se věnovala *eliminaci termínu chronická alograft nefropatie (CAN)*. Pozměnila klasifikační schéma definováním chronických rejekčních (aloantigen dependentních) změn. Nově vznikla kategorie: chronická aktivní rejekce zprostředkovaná protilátkami a chronická aktivní rejekce zprostředkovaná lymfocyty T.

Pojem chronická alograft nefropatie představoval velmi nesourodou skupinu, kde se mísily a byly bez bližší interpretace zařazeny imunitně podmíněné (rejekční) i zcela patogeneticky odlišné nerekční příčiny, které vedly k fibróze intersticia. Byl to termín, který zahrnoval do jedné skupiny pozdní následky řady patologic-

kých procesů, a přestože i v minulých klasifikačních schématech zřetelně představoval diagnostický „odpadkový koš“, byl překvapivě velmi oblíben a často interpretován jako jednotka.

Zavedení detekce průkazu C4d do rutinní praxe přineslo lepší pochopení humorální rejekce jako procesu, a ne pouze jako jednorázové ataky, a umožnilo definovat znaky *chronické aktivní rejekce zprostředkované protilátkami*. Většina transplantčních center postupně získala zkušenosti s fakty, že humorální rejekce se může objevit kdykoli po transplantaci, že pozitivní průkaz depozit C4d má svoji dynamiku, že může přetrvávat a že čím déle od transplantace je detekován, tím obtížněji se na tuto skutečnost terapeuticky reaguje. Současně s tím byly přiřazeny morfologické znaky poškození endotelu v různých lokalitách ve tkáni k humorálnímu poškození. Tak se kritérii chronické aktivní humorální rejekce staly vedle pozitivního průkazu C4d a cirkulujících protilátek proti antigenům dárce také morfologické znaky děletrvajícího (chronického) poškození tkáně, v první řadě endotelu v glomerulech, v peritubulárních kapilárách a ve svalových arteriích. V glomerulech se děletrvající poškození endotelu projevuje tvorbou dvojkontur glomerulárních bazálních membrán, což je podkladem tzv. transplantční glomerulopatie, znak cg. V peritubulárních kapilárách je morfologickým znakem děletrvajícího poškození laminace bazálních membrán. Ve svalových arteriích dochází k ztlustění, proliferaci intimy, která je prostoupena různým množstvím zánětlivých elementů. Proliferace intimy svalových arterií vede ke stenóze cévního průsvitu a důsledkem takového stavu je chronická ischemizace ledvinové tkáně. Dlouhotrvající chronická ischemie poškozuje intersticiu (tubuly) i glomeruly a je-li významná, nastartuje začarovaný kruh změn podmíněný neimunitními mechanismy. Úbytek glomerulů podmíněný ischemickými kolapsy vede k prohloubení ischemizace intersticia a hypertrofii zbývajících glomerulů, které rychleji podléhají kolapsům a sklerotizaci (z přetížení). V klinice narůstá proteinurie a zhoršuje se funkce štěpu. Výše popsaná situace dobře ilustruje komplexnost chronických změn v ledvinové tkáni, kdy může být proces nastartován a dlouhodobě zapříčiněn imunitním mechanismem (jako zde chronickou aktivní rejekcí zprostředkovanou protilátkami), ale v určité fázi se začne kombinovat s neimunitními mechanismy, které nakonec mohou převážit a stát se rozhodujícím faktorem ovlivňujícím další funkci štěpu. Experimenty na primátech ukázaly vývojová stadia v procesu chronické aktivní rejekce zprostředkované protilátkami. Jako první jsou detekovány protilátky proti antigenům dárce v séru, poté následuje depozice komplementu C4d v peritubulárních kapilárách. Později se objeví histologicky zjevné poškození tkáně, a teprve potom dojde k dysfunkci štěpu. Obdobné zkušenosti s biopsiemi pozitivními na C4d má většina patologů z rutinní diagnostické praxe; první biopsie mají často pouze pozitivní průkaz depozit C4d a následující biopsie v odstupu několika měsíců i let začnou postupně vykazovat znaky poškození tkáně, zvl. transplantční glomerulopatii.

Obdobnou morfologii změn intimy arterií svalového kalibru lze pozorovat i v případech, které jsou negativní na C4d a podle současných kritérií je nelze klasifikovat jako chronickou aktivní rejekci zprostředkovanou protilátkami. Protože takovou morfologii nemají jiná cévní onemocnění, jde téměř s jistotou o rejekční imunitně podmíněný mechanismus a afekce je hodnocena jako *chronická aktivní rejekce zprostředkovaná lymfocyty T*. Z morfologického hlediska není překvapivé, že stejný morfologický obraz vyvolávají různé příčiny, naopak v ledvinové patologii jsou takové situace běžné (např. příčiny membranoproliferativní glomerulonefritidy). Úvahy, zda jde skutečně o proces zprostředkovaný lymfocyty T,

Tab. 2 Hodnocení C4d v peritubulárních kapilárách a vliv použité metody

C4d	% biopsie (kúra a/nebo dřeň)	Význam a interpretace podle metody	
		Imunofluorescence	Imunohistochemie
C4d0 negativní	0	Negativní	Negativní
C4d1 minimální	>10	Negativní	Neznámé
C4d2 fokální	10–50	Neznámé	? Pozitivní
C4d3 difuzní	>50	Pozitivní	Pozitivní

vyvolávají data z experimentů. Již dlouho jsou známy experimenty na hlodavcích, které prokazují, že zvířata bez lymfocytů B (tj. bez možnosti tvorby protilátek a humorální rejekce) nejsou schopna vyvinout rozšíření intimy arterií, i když ničí štěp klasickou rejekcí zprostředkovanou lymfocyty T. Navíc po podání protilátek začnou intimální proliferaci tvořit. To je svým způsobem alarmující zjištění, které volá po dalším experimentálním i klinicky orientovaném výzkumu, abychom dokázali jednoznačně rozhodnout, zda jde skutečně o dva různé mechanismy, nebo zda je vždy přítomna humorální rejekční složka, kterou nyní nedokážeme z různých důvodů detekovat. Možností, proč v současnosti nejsme schopni humorální rejekční složku vždy odhalit, je několik. Jednou z nich je fakt, že v diagnostice detekujeme pouze protilátky, které fixují komplement, a tím startují klasickou komplementovou kaskádu s depozicí C4d. Existují i protilátky, které poškozují endotel a komplement nefixují (biopsie budou C4d negativní). Další známou příčinou může být, že koncentrace protilátek v séru je pro dnešní detekce příliš nízká a protilátky jsou deponované v tkáni. Je známo, že až ze 70 % biopsií s diagnózou akutní rejekce lze získat protilátky proti antigenům dárce a že jen 30 % z nich má současně protilátky detekovatelné v séru. Navíc koncentrace protilátek i detekce C4d v tkáni mají svoji dynamiku a mohou v čase kolísat. Část pacientů s průkazem pozitivních C4d, která nemá v séru identifikovatelné protilátky, může mít protilátky proti jiným než HLA nebo AB0 antigenům dárce.

V současném klasifikačním systému nejvíce diagnostických problémů představuje kategorie *Intersticiální fibróza a tubulární atrofie bez průkazu jiné specifické etiologie (IF/TA)*. Definice této kategorie představuje snahu o vyloučení pokud možno všech příčin morfologických změn závislých na aloantigenech do jiných kategorií tak, aby zde zůstaly pouze „nespecifické“ (spíše morfologicky necharakteristické) změny. Interpretace fibrotických změn je stejně komplikovaná jako důvody vzniku fibrózy. IF/TA je jizva a představuje reziduum po předcházejících atakách jakékoli etiologie (epizoda léčené rejekce stejně jako infarkt), a pokud původní příčina nepokračuje, nelze podle našich současných znalostí identifikovat původ jizvy. IF/TA může být výsledkem jednorázového poškození (ataka pyelonefritidy), stejně tak jako přetrvávající afekce (např. stenózy lumen arterií nebo arteriol). Poškozené nefrony nemohou být nahrazeny a přesáhne-li poškození/úbytek nefronů kompenzatorní možnosti tkáně, dochází k akcelerovanému zániku. Ve většině případů (mimo infekce, obstrukci, lymfoproliferaci apod.) o funkci štěpu v dlouhodobém horizontu rozhoduje stav arterií a arteriol. Na poškození arteriol se významnou měrou podílí hlavně léková toxicita (toxicita kalcineurinových inhibitorů) a hypertenze. V morfologii je diagnóza cévní toxicity

diagnózou per exclusionem, protože nemá žádné jednoznačně specifické charakteristiky a např. od morfologie těžších hypertenzních změn je neodlišitelná. Na vývoji fibrózy ve štěpu se běžně podílejí nejrůznější kombinace příčin, např. rejekce štěpu u pacienta s hypertenzí a hyperplazií prostaty léčeného imunosupresí s kalcineurinovými inhibitory. Nutno podotknout, že stejně jako nejde IF/TA (jizvu) léčit, stejně tak většinou nelze diagnostikovat, co k jejímu vývoji vedlo.

Úloha patologa při posuzování morfologických změn v biopsiích ledvinných štěpů v delším časovém období od transplantace spočívá především v diagnostice chronických (tj. cévních) rejekčních změn (chronická aktivní rejekce zprostředkovaná protilátkami a chronická aktivní rejekce zprostředkovaná lymfocyty T) a samozřejmě také v odlišení jiných příčin dysfunkce štěpu, jako jsou infekce (polyoma virová nefropatie), hypertenzní změny nebo rekurence základních onemocnění.

Cílem je zabránit vzniku IF/TA a udržet co nejdéle fungující štěp. Dnes v době poklesu epizod akutních rejekcí se zájem všech zainteresovaných v transplantační medicíně soustředí na zabránění chronických cévních změn. Ovlivnit se více či méně daří změny nerejekční (hypertenze, diabetes mellitus, toxicita kalcineurinových inhibitorů), v případech chronických rejekčních změn (chronická aktivní rejekce zprostředkovaná lymfocyty T i chronické aktivní rejekce zprostředkované protilátkami) je situace komplikovanější a léčba chronické humorální rejekce není dosud definována.

V diagnostice se otevírají další možnosti s novými stále dostupnějšími technikami (analýzy genových expresí), které stojí na biologických základech a dokáží rozpoznat mnohem citlivěji než histologie např. „zlé a hodné“ lymfocyty. A také velmi pravděpodobně umožní zjistit změny, na které se bude terapeuticky reagovat mnohem dříve, než jsou rozpoznány v histologii. Začlenění těchto metod bude v budoucnosti velmi pravděpodobně významným způsobem doplňovat histologické vyšetření a možná ho i v některých typických případech dokáže nahradit.

Literatura

- Feucht H. Complement C4d in graft capillaries-the missing link in the recognition of humoral alloreactivity. *Am J Transplant* 2003;3:646–652.
- Pascual M, Vallhonrat H, Cosimi AB, et al. The clinical usefulness of the renal allograft biopsy in the cyclosporine era: a prospective study. *Transplantation* 1999; 67:737–741.
- Racusen LC, Colvin RB, Solez K, et al. Antibody-mediated rejection – an addition to the Banff '97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplantation* 2003;3: 708–714.
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. Meeting report. *Am J Transpl* 2008;8: 753–760.
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff'05 meeting report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (CAN). *Am J Transpl* 2007;7:518–526.