

ВИТАЛЬНАЯ КОМПЬЮТЕРНАЯ МОРФОМЕТРИЯ ЛИМФОЦИТОВ КАК НЕИНВАЗИВНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ОСТРОГО ОТТОРЖЕНИЯ ПОЧЕЧНОГО АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА

А.Л. Валов¹, И.А. Василенко², А.В. Ватазин³, И.В. Троянский³, В.Б. Метелин², А.Я. Цалман³, Т.В. Вишенская⁴

¹ГУ Российская детская клиническая больница Росздрава

²ФГУ Российский геронтологический научно-клинический центр Росздрава

³ГУ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

⁴МГУ им. М.В. Ломоносова

Представлены результаты использования в клинической практике метода витальной компьютерной морфометрии для диагностики острых кризов отторжения почечного аллотрансплантата. Обследованы в динамике раннего послеоперационного периода больные с терминальной стадией хронической почечной недостаточности; в том числе реципиенты с удовлетворительной и стабильной функцией почечного аллотрансплантата и с острой реакцией отторжения, подтвержденной клинически и лабораторно. На основе данных мониторинга морфофункционального состояния живых функционирующих лимфоцитов периферической крови предложены критерии ранней диагностики криза отторжения трансплантированного органа.

Ключевые слова: трансплантация почки, острое отторжение, лимфоциты, морфометрия.

VITAL COMPUTER MORPHOMETRY OF LYMPHOCYTES AS A NON-INVASIVE METHOD FOR DIAGNOSIS OF ACUTE REJECTION OF RENAL ALLOGRAFT

A.L. Valov¹, I.A. Vasilenko², A.V. Vatazin³, I.V. Troyansky³, V.B. Metelin², A.Ya. Tsalman³, T.V. Vishenskaya⁴

¹ Russian Child Clinical Hospital, Russian Health care

² Russian Gerontologic Research and Clinical Center, Russian Health Care

³ M.F. Vladimirsky Moscow Regional Clinical and Research Institute (MONIKI)

⁴ M.V. Lomonosov Moscow State University

Results of clinical application of acute vital computer morphometry to diagnose acute rejection of renal allograft are presented. Patients with the end stage renal disease were observed in dynamics of the early post-operative period including recipients with satisfactory and stable function of renal allograft and those with acute allograft rejection confirmed by clinical and laboratory data. Criteria for the early diagnosis of allograft rejection were proposed on the basis of the morphofunctional condition monitoring of living lymphocytes of the peripheral blood.

Key words: renal transplantation, acute rejection, lymphocytes, morphometry.

Успехи трансплантологии, достигнутые за последние десятилетия, убедительно свидетельствуют о том, что пересадка почки несомненно является наиболее эффективным методом лечения больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности (ХПН). Однако увеличение количества трансплантаций неизбежно ведет к росту числа пациентов, потерявших трансплантат в результате ранних или поздних послеоперационных осложнений. Одной из основных причин потери трансплантированного органа в раннем послеоперационном периоде является острая реакция отторжения [5, 8]. Поэтому проблема выбора

специфичных и информативных лабораторных тестов для мониторинга состояния реципиента и своевременной диагностики посттрансплантационных осложнений у больных ХПН в терминальной стадии остается актуальной.

Среди направлений, по которым активно ведутся научные поиски, можно условно выделить две большие группы: разработка инструментальных способов обследования реципиентов почечного аллотрансплантата и использование лабораторных методов на основе учета и анализа патогенетических факторов дисфункции трансплантированной почки. При этом

если использование современных инструментальных методов в определенной мере ограничено наличием существующих диагностических аппаратов и приборных комплексов, то широкий круг лабораторных возможностей с применением различных тестов отдельно или комплексно продолжает увеличиваться [1, 2, 3, 4].

Особую актуальность приобретают результаты научных изысканий, посвященных развитию и совершенствованию способов ранней диагностики острой реакции отторжения и оценке эффективности превентивных или лечебных мероприятий на основе современных достижений медицинской науки. В этом плане важную роль играет изучение иммунологических аспектов аллотрансплантации. Многие исследователи единодушны во мнении, что мониторинг морфофункционального состояния иммунокомпетентных клеток после трансплантации в сопоставлении с клинико-биохимическими данными может оказаться крайне важным для прогнозирования состояния больного, построения индивидуальных лечебно-реабилитационных программ, сравнения эффективности различных видов иммуносупрессивной терапии, своевременного выявления осложнений и побочных эффектов лечения [6, 7].

В настоящей работе представлена апробация витальной компьютерной фазовой морфометрии (КФМ) для ранней диагностики кризов отторжения почечного аллотрансплантата на основе анализа динамики оптико-геометрических параметров живых циркулирующих лимфоцитов периферической крови.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили 20 практически здоровых добровольцев в возрасте от 21 года до 54 лет (средний возраст $36,4 \pm 3,5$ лет) и 37 больных с терминальной ХПН в возрасте от 20 до 52 лет (средний возраст $35,9 \pm 4,1$ лет). Группу морфометрического стандарта «идеальных» реципиентов с удовлетворительной и стабильной функцией почечного аллотрансплантата составили 26 пациентов. В другую группу были включены 11 человек, у которых причиной дисфункции в раннем послеоперационном периоде явился иммунологический конфликт с донорским органом. Диагноз ставился клинически и лабораторно с обязательным морфологическим подтверждением.

Иммуносупрессивная индукционная терапия реципиентов почечного аллотрансплантата включала внутривенное капельное введение моноклональных антител к рецептору IL-2 (семулект или зенопакс) за 30-60 минут до операции и болюсное введение метилпреднизолона в дозе 250–750 мг перед васкуляризацией почечного аллотрансплантата. После пуска кровотока больным назначали инфузию циклоsporина А внутривенно в дозе 2,5 мг/кг в сутки. Протокол трех-

компонентной базовой иммуносупрессии, который проводили через 6-12 часов после операции, включал сандимун-неорал в начальной дозе 5 мг/кг в сутки; глюкокортикостероиды – преднизолон в начальной дозе 0,5 мг/кг; селективные цитостатики – селл-септ (2000 мг в сутки) или майфортик (1440 мг в сутки) независимо от веса реципиента.

Лечение острой реакции отторжения проводили пульс-терапией метилпреднизолона в дозе 250-750 мг в сутки в виде инфузии в течение 3-5 дней. При отсутствии клинического эффекта назначались антитимоцитарный глобулин – АТГ (Фрезениус) – с начальной лечебной дозой из расчета 3-5 мг на 1 кг веса больного.

Всем пациентам проводились стандартные клинико-лабораторные, рентгенологические, ультразвуковые исследования. При наличии показаний выполняли пункционную биопсию и морфологическое исследование трансплантата.

Плановое клинико-лабораторное обследование пациентов включало общий и биохимический анализ крови, общий анализ мочи, определение уровня креатинина сыворотке крови и его клиренса, белковых фракций, ферментов АсАТ и АлАТ, общего холестерина и холестерина липопротеидов высокой и низкой плотности, триглицеридов, концентрации циклоsporина А, вирусологическое и бактериологическое исследования.

Для оценки функции пересаженного органа определяли уровень сывороточного креатинина, скорость клубочковой фильтрации, уровень креатинина в моче, уровень сывороточной мочевины, концентрацию общего белка в плазме и в моче, уровень суточной протеинурии.

Забор крови (4-5 мл) для морфометрических исследований производили из локтевой вены, кровь стабилизировали гепарином в концентрации 25 ЕД на 1 мл. Мононуклеары выделяли стандартным методом по Boyum на градиенте плотности для лимфоцитов Ficoll-Paque ($\rho=1,077$ г/см³) производства Amersham Biosciences (Швеция). Разделение мононуклеаров на Т- и В-популяции лимфоцитов выполняли по их адгезивности к пластику.

Морфофункциональное состояние лимфоцитов *in situ* оценивали экспресс-методом витальной компьютерной морфометрии с помощью отечественного компьютерного фазово-интерференционного микроскопа «Цитоскан» (МГИРЭА, Москва), позволяющего исследовать нативные нефиксированные и неокрашенные клетки.

Компьютерная фазовая морфометрия представляет собой модифицированный интерферометр Линника с модуляцией фазы опорной волны. Источником света является гелий-неоновый лазер ($\lambda=633$ нм). Основные параметры КФМ: объектив $\times 30$, общее увеличение системы $\times 5000$, точность измерения по высо-

те – 0,5 нм, по полю – 20 нм; дискретность изображения 128×128 при минимальном размере пикселя 3 нм. Микроскоп обладает разрешением, незначительно уступающим растровому электронному микроскопу, и позволяет регистрировать параметры биологических объектов, не подвергавшихся предварительной фиксации или окрашиванию.

Взвесью клеток заполняли камеру Горяева, рабочая поверхность которой имеет зеркальное напыление. После 3-5-минутного интервала, необходимого для оседания клеток, проводили съемку изучаемых цитообъектов. Оптимальный объем выборки составлял 50-100 клеток. Для исследований использовали штатный 30-кратный микрообъектив с числовой апертурой 0,65. Увеличение в канале регистрации составляло ×500. Время сканирования одной клетки не превышало 12 секунд.

Комплексный алгоритм морфометрии включал автоматическое определение заданных размерных параметров отдельных лимфоцитов (диаметр, периметр, высота, площадь, объем), статистическую обработку данных на популяционном уровне и документирование результатов в виде лимфоцитограмм.

Статистический анализ данных проводили с помощью алгоритмов среды MatLab и математического пакета «Statistica 6». Стандартная обработка выборок включала подсчет значений средних арифметических величин, ошибок средних, а также величины дисперсии, среднего квадратического отклонения и анализа асимметричности распределения. Различия между сравниваемыми группами рассчитывали по критериям Вилкоксона – Манна – Уитни, Колмагорова – Смирнова или Стьюдента. Уровень значимости устанавливался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Лимфоциты как объект привлекают внимание исследователей тем, что наряду с контролем антигенного гомеостаза они аккумулируют, хранят и переносят информацию об адаптивных и дезадаптивных процессах, могут активно воздействовать на организм, вплоть до его гибели. Установлено, что структурно-временная организация лимфоидной системы представлена комплексом биоритмов основных динамических формообразовательных процессов – пролиферации, миграции и метаболизма – с определенными фазовыми и коррелятивными взаимоотношениями внутри данного комплекса. Морфоцитохимические свойства лимфоцитов довольно лабильны и могут изменяться в зависимости от функционального состояния клетки, фазы ее клеточного цикла, возраста, степени дифференцировки и т.д.

Исследования образцов с лимфоцитами практически здоровых доноров показали, что фазовое изо-

бражение (топограмма) лимфоцита, полученное методом КФМ, совпадает с реальными контурами клетки. В ней хорошо различимы цитоплазма и, как правило, несимметрично расположенное ядро со слабо контрастным ядрышком. Сечение топограммы по выбранному отрезку прямой позволяет получить фазовый профиль, детально отражающий особенности распределения фазовых высот в данной области клетки.

Для количественной оценки морфофункционального состояния живых лимфоцитов использовали параметр Δh_{cell} , называемый фазовой высотой клетки, которую определяли как максимальную высоту профиля относительно уровня подложки ($h=0$). Очевидно, что по фазовому профилю лимфоцита можно также измерить фазовую толщину цитоплазмы (Δh_{cyt}), ядра ($\Delta h_{nucleus}$) и его ядрышка ($\Delta h_{nucleolus}$) (рис. 1,а). У активированных лимфоцитов наблюдается уменьшение фазовой высоты практически вдвое, а внутри ядрышка визуализируются многочисленные фибриллярные центры (рис. 1,б).

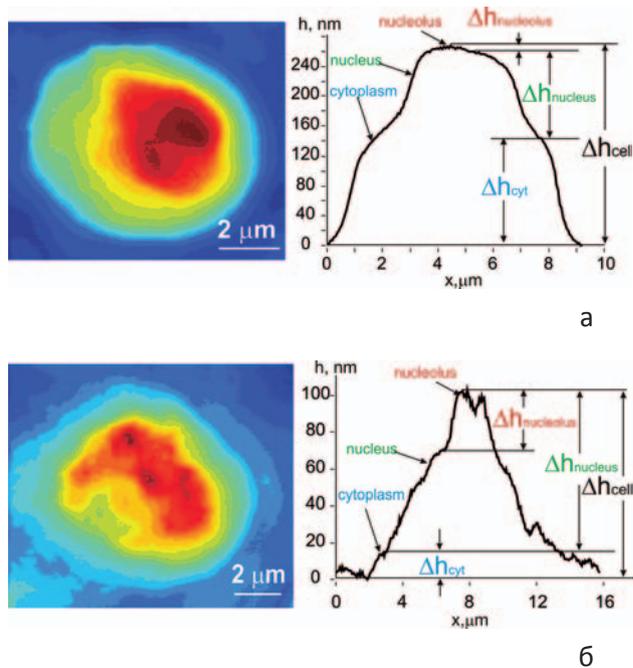


Рис. 1. Топограмма (слева) и фазовый профиль (справа) живого лимфоцита периферической крови: а – в состоянии покоя; б – активированного:

Δh_{cell} – фазовая высота клетки; Δh_{cyt} – фазовая высота цитоплазмы; $\Delta h_{nucleus}$ – фазовая высота ядра; $\Delta h_{nucleolus}$ – фазовая высота ядрышка

Выявлена высокая степень корреляции определяемых морфометрических параметров лимфоцитов с показателями традиционной иммунограммы. Так, в Т-популяции величины диаметра, периметра и площади положительно коррелируют с содержанием активированных (HLA-DR+) лимфоцитов ($r=0,39$,

$p=0,09$; $r=0,42$, $p<0,05$; $r=-0,41$, $p<0,05$, соответственно); высота отрицательно коррелирует с числом лимфоцитов, имеющих признаки ранней и поздней активации (CD25+ и HLA-DR+); ($r=-0,36$, $p>0,05$ и $r=-0,36$, $p>0,05$, соответственно). В В-популяции значения диаметра, периметра и площади достоверно положительно коррелируют с CD20+ и HLA-DR+ клетками. То есть степень увеличения диаметра, периметра и площади при снижении фазовой высоты количественно отражают уровень активности иммунокомпетентных клеток. При этом величина фазовой высоты и объема характеризует состояние хроматина в ядре клетки и позволяет количественно оценить пролиферативную способность лимфоцитов. Увеличение этих параметров свидетельствует о снижении пролиферативной активности, а уменьшение, напротив, указывает на повышенную способность к пролиферации. Кроме того, изменение средних значений диаметра, периметра и площади анализируемых клеток свидетельствует о наличии популяционной перестройки в иммунной системе, которая сопровождается появлением групп клеток с иными размерными параметрами, характеризующими состояние внутриклеточного метаболизма и содержание белкового вещества в клетке. Следовательно размерные (оптико-геометрические) параметры живых Т- и В-лимфоцитов периферической крови позволяют оперативно и с высокой точностью оценить морфологические особенности и функциональную активность каждой иммунокомпетентной клетки в отдельности и всей популяции в целом.

У обследованных нами больных до трансплантации не выявлено значимых изменений клеточных параметров Т-лимфоцитов: средние в популяции диаметр, периметр, высота, площадь и объем Т-клеток составляли $7,1\pm 1,2$ мкм, $21,1\pm 3,7$ мкм, $2,2\pm 0,4$ мкм, $33,4\pm 12,5$ мкм², $39,5\pm 15,9$ мкм³ соответственно, против нормативных $7,0\pm 1,1$ мкм, $20,4\pm 3,2$ мкм, $2,2\pm 0,4$ мкм, $30,3\pm 10,1$ мкм², $36,5\pm 13,95$ мкм³ ($M\pm\sigma$) соответственно.

Для В-клеток характерно было уменьшение диаметра, периметра и площади по сравнению с контрольными значениями на 7-10% ($p<0,05$): $8,8\pm 1,6$ мкм, $26,0\pm 4,8$ мкм, $49,3\pm 18,9$ мкм², $50,0\pm 19,2$ мкм³ соответственно, против нормативных $9,2\pm 2,3$ мкм, $27,6\pm 6,7$ мкм, $52,6\pm 24,8$ мкм², $45,8\pm 22,9$ мкм³ ($M\pm\sigma$). Фазовая высота, напротив, увеличивалась на 10% ($2,0\pm 0,4$ мкм против $1,8\pm 0,5$ мкм, $p<0,05$). Полученные результаты дают основание предполагать, что у больных с терминальной ХПН в В-звене иммунитета имеются признаки функциональной недостаточности, соответствующие состоянию приобретенного иммунодефицита. Выявленные закономерности изменения морфофункционального статуса лимфоцитов при бескризовом течении послеопераци-

онного периода легли в основу «морфометрического стандарта» для выявления возможных иммунологических нарушений при возникновении эпизодов острой реакции отторжения.

На рис. 2 и 3 представлены стандартные кривые динамики морфометрических параметров Т- и В-лимфоцитов периферической крови реципиентов со стабильной функцией почечного аллотрансплантата в течение раннего послеоперационного периода.

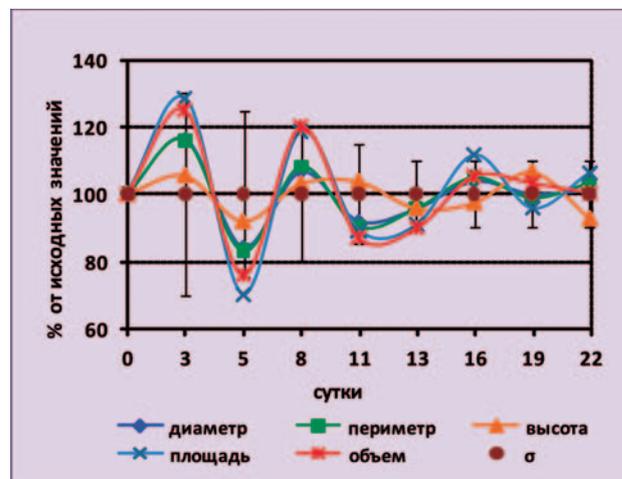


Рис. 2. Динамика оптико-геометрических показателей Т-лимфоцитов. По оси абсцисс – сутки мониторинга после аллотрансплантации трупной почки, по оси ординат – изменение анализируемых параметров в % по отношению к исходным значениям

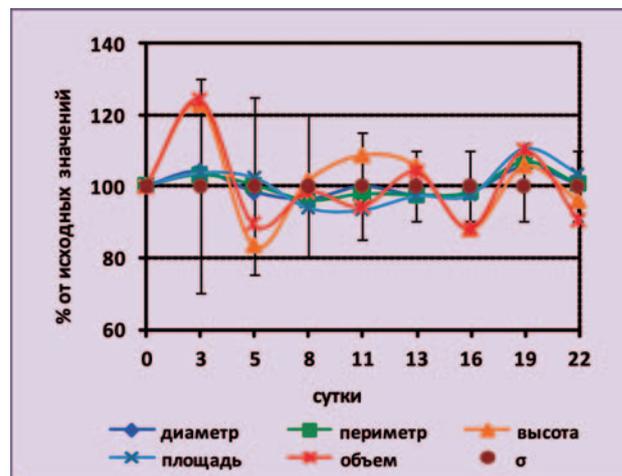


Рис. 3. Динамика оптико-геометрических показателей В-лимфоцитов. По оси абсцисс – сутки мониторинга после аллотрансплантации трупной почки, по оси ординат – изменение анализируемых параметров в % по отношению к исходным значениям

Очевидно, что 3-и, 5-е и 8-е сутки послеоперационного периода можно считать определяющими в плане нормального течения адаптационных реакций при реализации механизмов трансплантационного имму-

нитета. Наиболее выраженные изменения морфометрических показателей в течение всего срока наблюдения зарегистрированы в популяции Т-лимфоцитов. Основные размерные параметры В-клеток отличались большей стабильностью, за исключением величин фазовой высоты и объема.

В клинической практике основным диагностическим критерием оценки функции почечного аллотрансплантата в раннем послеоперационном периоде остается содержание креатинина в плазме крови (CrP). Прогрессирующее повышение CrP более чем на 15-20% в сутки при отсутствии других причин дисфункции трансплантата служит одним из лабораторных критериев развития криза отторжения.

Рис. 4 иллюстрирует динамику уровня креатинина и диуреза в группе пациентов с немедленной и стабильной функцией почечного аллотрансплантата в течение раннего послеоперационного периода (1-20-е сутки). Признаки нормализации CrP и диуреза отмечались на 8-11-е сутки наблюдения. Эти результаты полностью совпадают со сроками стабилизации морфофункционального состояния Т- и В-лимфоцитов по данным компьютерной морфометрии.

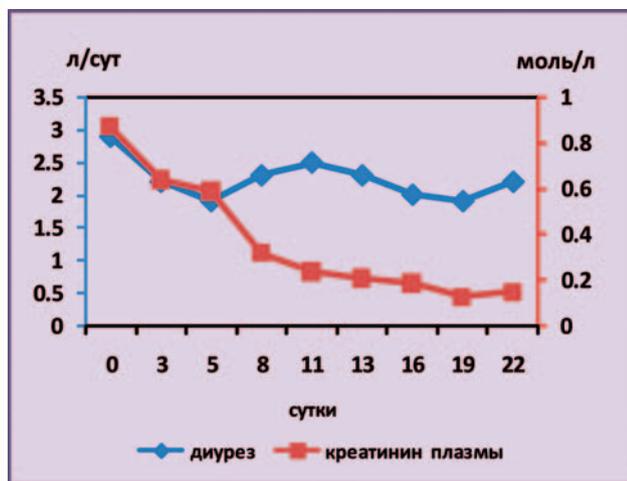


Рис. 4. Динамика уровня креатинина плазмы и диуреза в группе реципиентов с немедленной и стабильной функцией почечного аллотрансплантата в течение раннего послеоперационного периода. По оси абсцисс – сутки наблюдения; по оси ординат слева – диурез (л/сут), справа – креатинин (моль/л)

Следовательно морфометрические параметры объективно отражают процессы перестройки клеточных звеньев иммунной системы реципиентов почечного аллотрансплантата под влиянием различных внешних и внутренних факторов: оперативного вмешательства, антигенного воздействия клеток трансплантата, индукционной иммуносупрессии и др. При этом является очевидным, что изменения величин размерных показателей клеток (диаметра, периметра,

высоты, площади и объема) больше диапазона указанных допустимых отклонений могут расцениваться как нарушение иммунореактивности пациента с формированием морфологического субстрата острой реакции отторжения.

В качестве иллюстрации практического использования данных КФМ для диагностики острой реакции отторжения приводим результаты мониторинга морфофункционального состояния лимфоцитов больного Б. (история болезни № 2820) под контролем содержания креатинина (рис. 5).

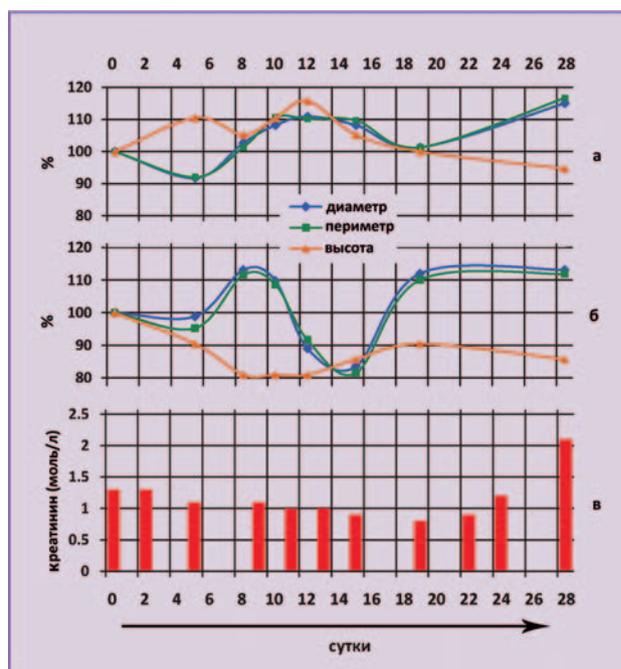


Рис. 5. Результаты мониторинга морфофункционального состояния: а – Т-лимфоцитов, б – В-лимфоцитов и в – динамика креатинина в плазме крови больного Б.

По оси абсцисс – сутки мониторинга после аллотрансплантации трупной почки, по оси ординат – изменения морфофункциональных параметров в процентах от значений до операции

Как видно из представленных данных, до 8-х суток послеоперационного периода наблюдались волнообразные колебания размерных показателей Т- и В-лимфоцитов, сопровождаемые высоким уровнем креатинина. На фоне интенсивной иммуносупрессии к 10-м суткам после аллотрансплантации почки отмечалась нормализация клеточных параметров и уменьшение уровня CrP. Однако, несмотря на дальнейшее снижение креатинина, с 16-18-х суток были зарегистрированы изменения морфометрических показателей иммунокомпетентных клеток, превышающие диапазон допустимых отклонений. В то же время первые результаты, свидетельствующие о повышении уровня креатинина в сыворотке крови, были получены только к 24-м суткам наблюдения.

Проведенное ультразвуковое обследование реципиента подтвердило наличие признаков острой реакции отторжения. В биоптате были обнаружены диффузные инфильтраты лимфоидных клеток, свидетельствующие об остром отторжении аллотрансплантированной почки типа 1b. Криз купировали внутривенным введением метилпреднизолона по 500 мг/сут в течение трех дней. Последующие данные компьютерной морфометрии продемонстрировали стабилизацию морфометрических показателей лимфоцитов в результате эффективно проведенной антикризовой терапии.

Приведенный клинический пример свидетельствует о том, что изменения морфометрических показателей иммунокомпетентных клеток могут опережать динамику повышения креатинина сыворотки крови с последующим выявлением гистологических признаков острой реакции отторжения и, следовательно, служить ранними неинвазивными критериями развития криза отторжения трансплантированного органа. Установлено, что для острой реакции отторжения клеточного типа наиболее значимыми являются изменения морфометрических показателей Т-лимфоцитов; для реакции гуморального типа – В-лимфоцитов; для смешанного типа – Т- и В-лимфоцитов. Они заключаются в прогрессирующем и достоверном изменении размерных параметров клеток (увеличение диаметра, периметра, площади; уменьшение фазовой высоты), свидетельствующем об активации соответствующего звена иммунитета и внутрипопуляционной перестройке лимфоцитов в процессе реализации реакций трансплантационного иммунитета.

Представленные результаты демонстрируют возможности метода компьютерной фазовой морфометрии по выявлению в режиме реального времени изменений фазовых параметров лимфоцитов, связанных непосредственно с их активацией. В целом внедрение итогов работы в клиническую практику позволило улучшить результаты трансплантации аллогенной трупной почки: снизить частоту острого отторжения с 32,5 до 23,1% и уменьшить число некупируемых кризов отторжения почечного трансплантата с 12,4 до 3,2%. Экономический эффект составляет

не менее 800 тыс. руб. на каждый сохраненный трансплантат почки.

Заключая изложенное, можно констатировать, что активное использование современных достижений науки в практической деятельности отделений трансплантации позволит в значительной мере оптимизировать процесс диагностики и лечения реципиентов почечного трансплантата, своевременно выделять группы риска, проводить адекватные профилактические мероприятия и обеспечивать эффективную иммуносупрессию с учетом индивидуального подхода к каждому пациенту.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Беляев А.Ю., Мойсюк Я.Г., Ильинский И.М. и др.* Роль различных методов исследования в прогнозировании и диагностике первично-нефункционирующего трансплантата // *Вестн. трансплантол. искусств. органов.* 2000. №3. С.12-17.
2. *Доровских Н.В.* Ультразвуковая доплеровская диагностика сосудистых осложнений пересаженной почки // *Вестн. трансплантол. искусств. органов.* 2003. №4. С.41-45.
3. *Драник Г.Н., Лунева А.Г., Баран Е.Я. и др.* Интерлейкин-10 продуцирующая функция лимфоцитов – критерий диагностики посттрансплантационных осложнений у реципиентов с аллогенной почкой // *Лаб. диагн.* 2000. №4. С.14-18.
4. *Козинец Г.И., Погорелов В.М., Шмаров Д.А. и др.* Клетки крови – современные технологии их анализа. М., 2002.
5. *Руководство по трансплантации почки / Пер. с англ. под ред. Я.Г. Мойсюка.* Третье издание. Тверь, 2004.
6. *Труфакин А.В., Робинсон М.В.* Иммуноморфология: вчера, сегодня, завтра // *Вестн. РАМН.* 1997. №6. С.37-42.
7. *Diaz I., Sanchez P., Alonso C., Valdes F.* Immunological profile of patients awaiting a renal transplant // *Clin. Transplant.* 2004. V.18, No.5. P.529-535.
8. *Divate S.A.* Acute renal allograft rejection: progress in understanding cellular and molecular mechanisms // *Transplantation.* 2000. V.46, No.4. P.293-296.