ВИТАЛЬНАЯ КОМПЬЮТЕРНАЯ МОРФОМЕТРИЯ ЛИМФОЦИТОВ В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРОГО ОТТОРЖЕНИЯ ПОЧЕЧНОГО АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА

Ватазин А.В.[1], Василенко И.А.[2], Валов А.Л.[3], Метелин В.Б.[2], Круглов Е.Е.[1], Цалман А.Я.[1]

[1] ГУ «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», г. Москва

[2] ФГУ «Российский геронтологический научно-клинический центр» Росздрава, г. Москва

[3] ГУ «Российская детская клиническая больница» Росздрава, г. Москва

В статье обобщены результаты исследования морфофункционального состояния циркулирующих лимфоцитов периферической крови практически здоровых добровольцев и реципиентов почечного аллотрансплантата (ПАТ) в течение раннего послеоперационного периода. Предложен неинвазивный способ диагностики острого отторжения ПАТ, основанный на измерении методом когерентной фазовой микроскопии (КФМ) морфометрических параметров клеток. Установлено, что фазовая высота лимфоцита, пропорциональная оптической плотности и геометрической толщине клетки, является интегральным параметром, отражающим ее функциональное состояние. Показано, что изменения морфометрических показателей иммунокомпетентных клеток могут опережать динамику повышения креатинина сыворотки крови и, следовательно, служить ранними критериями развития острой реакции отторжения трансплантированного органа.

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

VITAL COMPUTER MORPHOMETRY OF LIMPHOCYTES IN DIAGNOSIS OF ACUTE RENAL ALLOGRAFT REJECTION

Vatazin A.V., Vasilenko I.A., Valov A.L., Metelin V.B., Kruglov E.E., Tsalman A.Ya.

[1] M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow

[2] Russian Research Clinical Centre of Gerontology, Moscow

[3] Russian Children Clinical Hospital, Moscow

The article focuses on the results of the investigation of peripheral blood lymphocyte morphofunctional status in healthy volunteers and renal allograft recipients for early postoperative period. Working out noninvasive tests for diagnosis of acute renal allograft rejection based on the measuring of cell morphometric parameters by method of coherent phase microscopy (CPM). It was found out that the lymphocyte phase height was proportional cell image density and its geometrical thickness. Our results showed that the variations of immunocompetent cell morphometric indicants can be in advance the dynamics of blood creatine increasing and answer for early criteria of acute renal allograft rejection.

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

ВВЕДЕНИЕ

В лечении терминальной стадии хронической почечной недостаточности (ХПН) аллотрансплантация трупной почки (АТТП) является основным методом, благодаря которому поддерживается жизнь больного, достигается его социальная и медицинская реабилитация. Известно, что судьба трансплантата и характер развивающихся в пересаженном органе изменений зависят от действия многочисленных иммунных (тканевая совместимость донора и реципиента, предсуществующие антидонорские антитела, иммунодепрессанты) и неиммун-

Статья поступила в редакцию 09.09.09 г.

Контакты: *Василенко Ирина Анатольевна, д. м. н., профессор, зав. лабораторией компьютерной цитоморфометрии.*
Тел. *(495) 6817859,* ***e-mail:*** *svia@rambler.ru*

ных (антиген-независимых) факторов [4, 9]. Однако одной из главных проблем для реципиента остается острая реакция отторжения (ОРО), развитие которой в раннем послеоперационном периоде не только приводит к потере почечного аллотрансплантата (ПАТ), но и отрицательно влияет на длительность его выживания [1, 9, 12].

Можно считать доказанным, что гарантией длительного и эффективного существования трансплантированного органа является проведение постоянного контроля за его функцией, позволяющего с достаточной степенью достоверности прогнозировать и предупреждать возможные послеоперационные осложнения. Существуют общепризнанные морфологические критерии различных нарушений функции ПАТ. Однако следует признать, что возможности пункционной биопсии в диагностике развития патологических процессов аллотрансплантата, оценке эффективности и адекватности проводимой иммуносупрессии несколько ограничены. Метод не позволяет прогнозировать риск возникновения острого отторжения, в режиме *on line* наблюдать за его течением. Кроме того, в условиях очагового острого отторжения в биоптат может не попасть пораженный фрагмент ткани. Для более полной интерпретации результатов морфологического исследования оптимальным является их одновременное сопоставление с клиническими и лабораторными данными. Поэтому в настоящее время не прекращаются поиски методов, способных дополнить, а в отдельных случаях ограничить применение инвазивных способов обследования.

Из неинвазивных методов диагностики острого отторжения почки в настоящее время используют данные ультразвукового и доплерографического исследований [2, 3, 5]. Известен ряд лабораторных параметров, уровень которых изменяется в сыворотке крови или моче при остром отторжении ПАТ. Так, в клинике традиционно применяют определение уровня креатинина и мочевины, клубочковую фильтрацию и др. [9, 4, 16]. Предпринимаются попытки выявлять острую реакцию отторжения (ОРО) пересаженного органа, используя данные проточной цитометрии, измерение уровней С-реактивного протеина, β_2-микроглобулина, экспрессии генов и рецепторов различных хемо- и цитокинов [10, 13, 15]. Достаточно высокой специфичностью и чувствительностью обладают современные иммунохимические (ИФА, ПЦМФ) и молекулярно-биологические (ПЦР) методы исследования [14, 17–19].

Однако все эти методы не нашли широкого распространения в клинической практике по ряду причин: отчасти в силу своей сложности и трудоемкости, а также из-за неоднозначности получаемых результатов. Кроме того, многие лабораторные параметры имеют слабую предикторную способность, а их изменения в сыворотке крови или в моче могут встречаться при многих других состояниях, не связанных с развитием острого отторжения трансплантата.

Одним из аспектов решения данной проблемы является совершенствование методов мониторинга иммунного статуса реципиента. Многие исследователи единодушны во мнении, что мониторирование 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, 11]. При этом быстрое развитие компьютерных технологий требует обратить соответствующее внимание на эффективное использование возможностей современных диагностических методов, аппаратов и приборных комплексов, обладающих минимальной инвазивностью, позволяющих проводить объективный многофакторный анализ и интерпретацию полученных данных с учетом клиники послеоперационного периода и особенностей функционирования трансплантированной почки.

Целью проведенного исследования явилась разработка критериев доклинической диагностики острого отторжения трансплантированной почки на основе изучения морфофункционального состояния иммунокомпетентных клеток крови экспресс-методом витальной компьютерной фазовой микроскопии (КФМ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования служили лимфоциты периферической крови 20 практически здоровых добровольцев (в возрасте от 21 до 54 лет, средний возраст 36,4 ± 3,5 года) и 37 больных ХПН (в возрасте от 20 до 52 лет, средний возраст 35,9 ± 4,1 года). Из них группу морфометрического стандарта – «идеальных» реципиентов с удовлетворительной и стабильной функцией ПАТ – составили 26 пациентов. Во вторую группу были включены 11 реципиентов, 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 ПАТ включала внутривенное капельное введение моноклональных антител к рецептору IL-2 (семулект или зенопакс) за 30–60 мин до операции и болюсное введение метилпреднизолона в дозе 250–750 мг перед васкуляризацией почечного ал-

лотрансплантата. После пуска кровотока больному внутривенно назначали инфузию циклоспорина А в дозе 2,5 мг/кг в сутки. Протокол трехкомпонентной базовой иммуносупрессии, который назначался через 6–12 ч 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/сут) или майфортик (1440 мг/сут) – 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. В случаях отсутствия клинического эффекта назначались антитимоцитарный глобулин – АТГ Фрезениус с начальной лечебной дозой из расчета 3–5 мг/кг веса больного.

Всем пациентам проводились стандартные клинико-лабораторные, рентгенологические, ультразвуковые обследования. 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 в сыворотке крови и клиренса креатинина и мочевины, определение белковых фракций, ферментов АсАТ и АлАТ, общего холестерина и холестерина липопротеидов высокой и низкой плотности, триглицеридов, концентрации циклоспорина А, вирусологическое и бактериологическое исследование.

Для оценки функции пересаженного органа определяли уровень сывороточного креатинина, скорость клубочковой фильтрации, уровень креатинина в моче, уровень сывороточной мочевины, уровень 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 (p = 1,077 г/см^3) производства Amersham Biosciences (Швеция). Разделение лимфоцитов на Т- и В-популяции производили по степени их адгезивности к пластику.

Морфофункциональное состояние лимфоцитов *in situ* оценивали экспресс-методом витальной компьютерной морфометрии на основе отечественного компьютерного фазово-интерференционного микроскопа «Цитоскан» (МГИРЭА, Москва), позволяющего исследовать нативные клетки [7].

КФМ представляет собой модифицированный интерферометр Линника с модуляцией фазы опорной волны (рис. 1). В основе принципа действия микроскопа, содержащего идентичные объективы

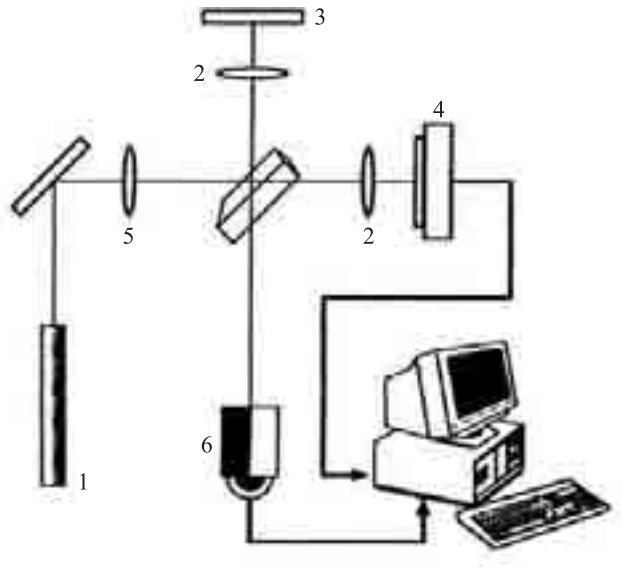

Рис. 1. Оптическая схема когерентного фазово-интерференционного микроскопа «Цитоскан»: 1 – лазерный осветитель, 2 – объективы, 3 – предметное зеркало, 4 – опорное зеркало на пьезоэлементе, 5 – конденсор, 6 – фотоприемник

в сигнальном и реперном плечах, лежит сравнение волнового фронта, прошедшего через объект, с опорным, отраженным от высококачественного зеркала. Преобразование сигнала состоит в его дискретизации с последующей записью распределения фаз в виде цифровой матрицы x, y, размером m × n, где m – число строк, n – число столбцов. Значения x, y представляют собой оптическую толщину объекта H в точке с координатами x, y:

$$H(X, Y) = [n (x, y) – nc]´h(x, y),$$

где n (x, y) – показатель преломления, h (x, y) – физическая толщина в направлении Z, nc – показатель преломления среды.

Результат обратного преобразования цифрового массива в видимое изображение и восстановление фазового портрета объекта отображался на экране монитора компьютера.

Источником света является гелий-неоновый лазер (λ = 633 нм). Основные параметры КФМ: объектив 30×, общее увеличение системы 5000×, точность измерения по высоте – 0,5 нм, по полю – 20,0 нм; дискретность изображения 128 × 128, при минимальном размере пиксела – 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, производили съемку изучаемых цитообъектов. Оптимальный объем выборки

составлял 50–100 клеток. Для проведения исследований использовали штатный 30-кратный микрообъектив с числовой аппертурой 0,65. Увеличение в канале регистрации составляло 500×. Время сканирования одной клетки не превышало 12 с.

Комплексный алгоритм морфометрии включал автоматическое определение заданных размерных параметров отдельных лимфоцитов, статистическую обработку данных и документирование результатов в виде протоколов I, II и III уровней. I уровень (программа TLUCK) обеспечивал визуализацию фазово-интерференционного образа клетки (топограмму, 3D-изображение, профиль, гистограмму распределения фазовых высот). II уровень (программа MORPH) – расчет морфометрических показателей отдельных клеток (диаметр – Dmax, периметр – Per, высота – Height, площадь – Area, объем – Vol); оценку распределения объема и площади фазово-интерференционного образа клетки по уровням сканирования (взаимодействие с чужеродной поверхностью); контурное изображение топографии интерференционного поля (послойная интерферограмма клетки в псевдоцвете). III уровень (программа StatM) – интегральный анализ клеточной популяции по мерным признакам (Dmax, Per, Height, Area, Vol), построение лимфоцитограмм (рис. 2).

Рис. 2. Блок-схема алгоритма витальной компьютерной морфометрии лимфоцитов

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 аккумулируют, хранят и переносят информацию о реализации адаптивных и дезадаптивных процессов в системе иммунитета. 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. При этом морфоцитохимические свойства лимфоцитов достаточно лабильны и могут изменяться в зависимости от функционального состояния клетки, фазы ее клеточного цикла, возраста, степени дифференцировки и т. д.

Фазовый портрет (топограмма) живого лимфоцита, полученный методом КФМ, совпадает с реальными контурами клетки, в нем 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 (рис. 3). Важной особенностью КФМ является то, что параметры фазового изображения содержат информацию не только о пространственно-объемных характеристиках живой клетки, но и ее оптических свойствах, в частности, внутриклеточной анизотропии. Величина показателя преломления, измеряемая в каждой точке цитообъекта, непосредственно зависит от концентрации, химического состава и агрегатного состояния внутриклеточного вещества, наличия или отсутствия органелл и включений. Изменение любого из указанных условий находит отражение в характерных локальных трансформациях фазового изображения

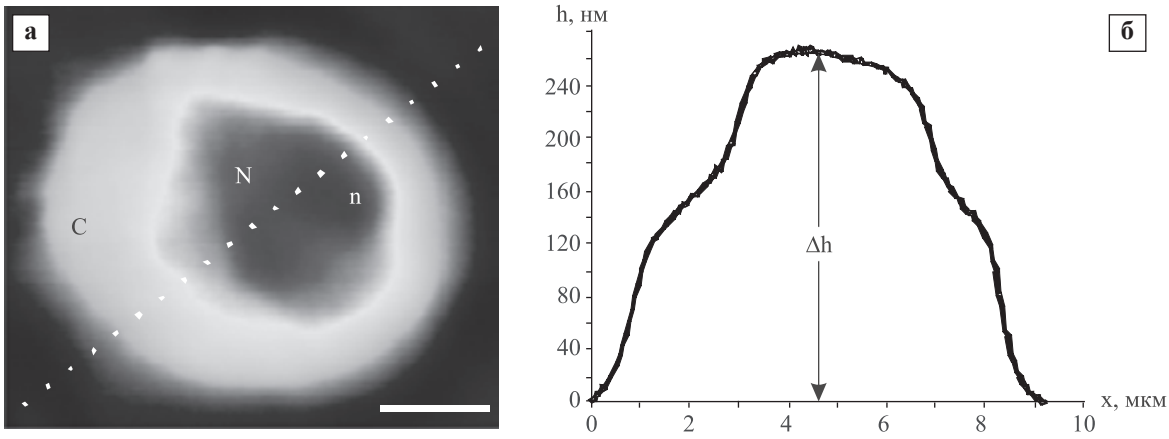

Рис. 3. Топограмма (а) и фазовый профиль (б) интактного лимфоцита периферической крови

клетки. Известно, что гетерохроматин может располагаться в ядре равномерно с эухроматином или образовывать крупные конгломераты по периферии и в центре ядра. В процессе дифференцировки клеток меняются и конформационные свойства хроматина их ядер. При этом конденсированный хроматин метаболически менее активен в отношении синтеза ДНК по сравнению с его диффузным состоянием [8]. Для количественной оценки морфофункционального состояния живых лимфоцитов использовали параметр Δhcell, называемый фазовой высотой клетки, которую определяли как максимальную высоту профиля относительно уровня подложки (h = 0). Измерение фазовой высоты лимфоидной клетки позволяет количественно оценить степень упаковки хроматина в ядре: чем выше показатель, тем более плотными являются ядерные структуры. То есть 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.

Нами выявлена высокая степень корреляции определяемых морфометрических параметров лимфоцитов с показателями традиционной иммунограммы. Так, в Т-популяции величины фазовых 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 (CD25+) и поздней (HLA-DR+) активации ($r = –0,36$, $p > 0,05$ и $r = –0,36$, $p > 0,05$ соответственно). В В-популяции значения диаметра, периметра и площади положительно коррелируют с CD20+ и HLA-DR+-клетками ($r = 0,41$, $p < 0,05$, $r = 0,52$, $p < 0,05$; $r = 0,52$, $p < 0,05$ и $r = 0,40$, $p < 0,05$, $r = 0,51$, $p < 0,05$; $r = 0,52$, $p < 0,05$ соответственно). Следовательно, степень увеличения диаметра, периметра и площади при снижении фазовой высоты количественно отражает уровень активности иммунокомпетентных клеток. При этом величины фазовой высоты и объема характеризуют состояние хроматина в ядре клетки и позволяют 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.

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 ± 1,2; 21,1 ± 3,7; 2,2 ± 0,4 мкм; 33,4 ± 12,5 мкм^2; 39,5 ± 15,9 мкм^3 соответственно против нормативных 7,0 ± 1,1; 20,4 ± 3,2; 2,2 ± 0,4 мкм; 30,3 ± 10,1 мкм^2; 36,5 ± 13,95 мкм^3 (M ± σ) соответственно. Для В-клеток характерным было уменьшение диаметра, периметра и площади по сравнению с контрольными значениями на 7–10% ($p < 0,05$): 8,8 ± 1,6; 26,0 ± 4,8 мкм; 49,3 ± 18,9 мкм^2; 50,0 ± 19,2 мкм^3 соответственно против нормативных 9,2 ± 2,3; 27,6 ± 6,7 мкм; 52,6 ± 24,8 мкм^2; 45,8 ± 22,9 мкм^3 (M ± σ). Фазовая высота, напротив, увеличивалась на 10% (2,0 ± 0,4 против 1,8 ± 0,5 мкм, $p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют, что у больных ТХПН в В-звене иммунитета имеются признаки функциональной недостаточности, соответствующие состоянию приобретенного иммунодефицита.

Выявленные нами закономерности изменения морфофункционального статуса лимфоцитов при

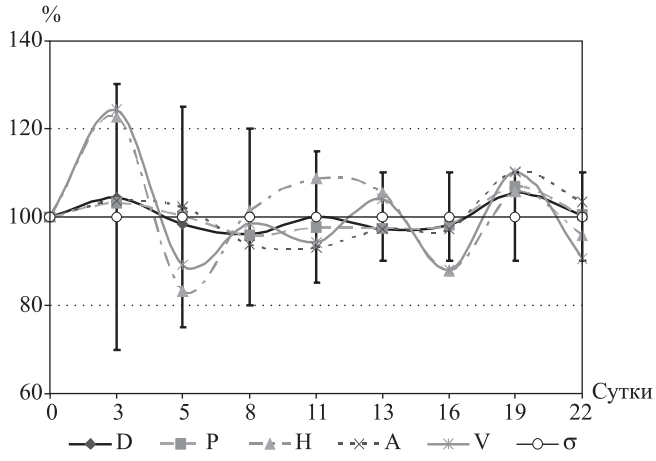

Рис. 4. Динамика оптико-геометрических показателей Т-лимфоцитов: D – диаметр, P – периметр, H – высота, A – площадь, V – объем, σ – допустимое отклонение показателей. По оси абсцисс – сутки мониторинга после АТТП, по оси ординат – изменение анализируемых параметров в % по отношению к показателям нормы

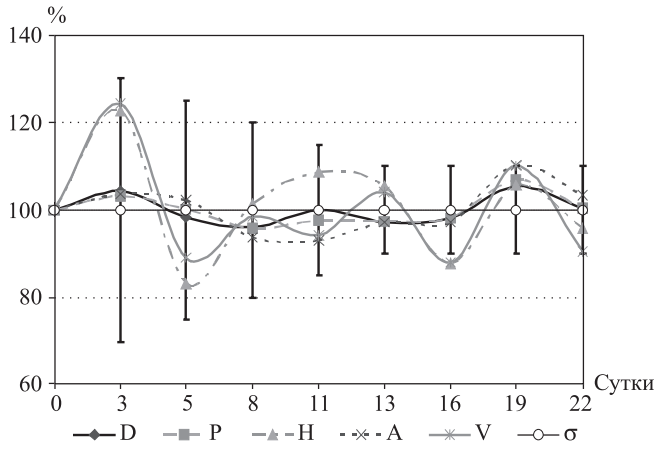

Рис. 5. Динамика оптико-геометрических показателей В-лимфоцитов: D – диаметр, P – периметр, H – высота, A – площадь, V – объем, σ – допустимое отклонение показателей. По оси абсцисс – сутки мониторинга после АТТП, по оси ординат – изменение анализируемых параметров в % по отношению к показателям нормы

бескризовом течении послеоперационного периода легли в основу «морфометрического стандарта» для выявления возможных иммунологических нарушений при возникновении эпизодов ОРО.

На рис. 4 и 5 представлены стандартные кривые динамики морфометрических параметров Т- и В-лимфоцитов периферической крови реципиентов со стабильной функцией ПАТ в течение раннего послеоперационного периода. Является очевидным, что 3, 5 и 8-е сутки послеоперационного периода можно считать определяющими в плане нормального течения адаптационных реакций при реализации механизмов трансплантационного иммунитета. 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.

Морфометрические параметры объективно отражают процессы перестройки клеточных звеньев иммунной системы реципиентов ПАТ 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 (диаметр, периметр, высота, площадь и объем) 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 ОРО приводим результаты мониторинга морфофункционального состояния лимфоцитов больного Б. (история болезни № 2820) под контролем содержания креатинина (рис. 6).

Как видно из представленных данных, до 8-х суток послеоперационного периода наблюдались волнообразные колебания размерных показателей Т- и В-лимфоцитов, сопровождаемые до-

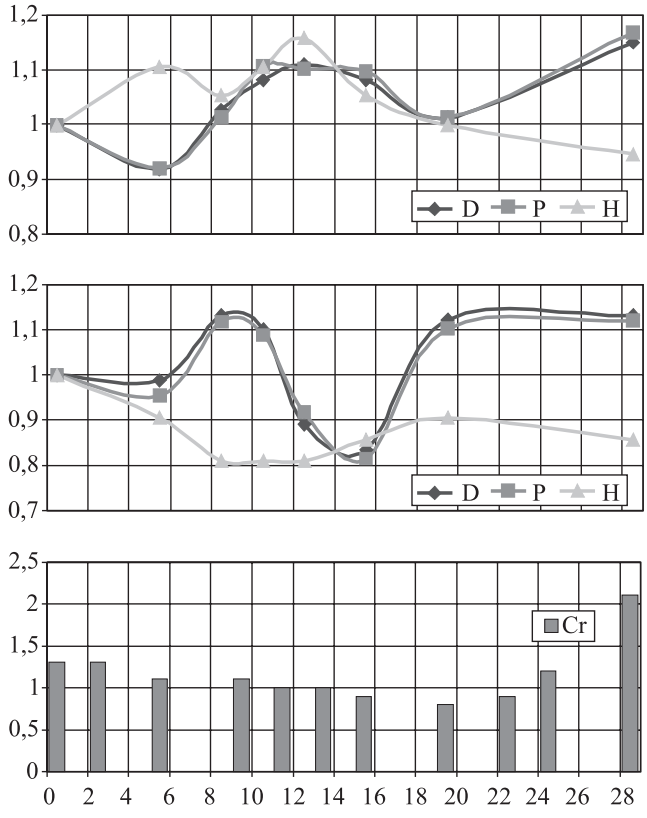

Рис. 6. Результаты мониторинга морфофункционального состояния лимфоцитов крови и динамика креатинина в плазме крови больного Б. По оси абсцисс – сутки мониторинга после АТТП, по оси ординат – условные единицы; D – диаметр, P – периметр, H – высота, Cr – креатинин

статочно 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 нами 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 ОРО. 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 3 дней. Последующие данные компьютерной морфометрии продемонстрировали стабилизацию морфометрических показателей лимфоцитов в результате эффективно проведенной антикризовой терапии.

Данный клинический пример свидетельствует о том, что изменения морфометрических показателей иммунокомпетентных клеток могут опережать динамику повышения креатинина сыворотки крови с последующим выявлением гистологических признаков ОРО и, следовательно, служить ранними неинвазивными критериями развития острой реакции отторжения трансплантированного органа. В процессе работы было установлено, что для острой реакции отторжения клеточного типа наиболее значимыми являются изменения морфометрических показателей Т-лимфоцитов; для ОРО гуморального типа – В-лимфоцитов; для ОРО смешанного типа – и Т-, и В-лимфоцитов. Они заключаются в прогрессирующем и достоверном увеличении диаметра, периметра, площади и уменьшении фазовой высоты клеток, свидетельствующих об активации соответствующего звена иммунитета и внутрипопуляционной перестройке лимфоцитов в процессе реализации реакций трансплантационного иммунитета (патент РФ «Способ диагностики отторжения почечного аллотрансплантата» № 2348932, 2008).

Представленные результаты продемонстрировали возможности метода по выявлению в режиме реального времени изменений фазовых параметров живых лимфоцитов, связанных непосредственно с их активацией. Выбор КФМ в качестве перспективного метода исследований был также продиктован следующими его преимуществами: возможностью изучения живых нативных клеток крови, не подвергавшихся предварительной обработке, окрашиванию или фиксации; оперативному получению высокоточных и объективных данных на основе компьютерной технологии; использованию универсальных критериев оценки для любых типов клеток, характеризующих как морфологические, так и функциональные их особенности; потребностью малого (не более 5 мл) объема крови для одновременного проведения анализа морфофункционального состояния любых клеточных элементов.

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о важной диагностической и прогностической роли неинвазивного мониторинга морфометрических показателей циркулирующих лимфоцитов периферической крови реципиентов ПАТ. С учетом отсутствия во многих случаях четких клинико-морфологических и временных критериев при диагностике ОРО оптимальным является комплексный подход с применением всех доступных дополнительных инструментальных, функциональных и лабораторных методов исследования, что позволит своевременно и на ранних сроках определить эффективную лечебную тактику. Активное использование современных достижений науки в практическую деятельность отделений трансплантации будет способствовать оптимизации процесса 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ватазин А.В., Шумский В.И., Астахов П.В., Круглов Е.Е.* Комплексное лечение хирургических заболеваний у больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности. М.: МОНИКИ, 2002. 304 с.
2. *Доровских Н.В.* Ультразвуковая доплеровская диагностика сосудистых осложнений пересаженной почки // Вестник транспл. и искусств. органов. 2003. № 4. С. 41–45.
3. *Жеребцов Ф.К., Гринев К.М., Енькина Т.Н.* Состояние гемодинамики почечных трансплантатов от асистолических доноров и доноров со смертью мозга в ближайшем послеоперационном периоде по дан-

ным доплерографического исследования // Вестник трансп. и искусств. органов. 2001. № 2. С. 31–35.
4. Руководство по трансплантации почки / Пер. с англ. под ред. Я.Г. Мойсюка. Третье издание. Тверь: Триада, 2004. 472 с.
5. *Сандриков В.А., Садовников В.И.* Клиническая физиология трансплантированной почки. М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. 288 с.
6. *Труфакин А.В., Робинсон М.В.* Иммуноморфология: вчера, сегодня, завтра // Вестник РАМН. 1997. № 6. С. 37–42.
7. *Тычинский В.П.* Когерентная фазовая микроскопия внутриклеточных процессов // Успехи физических наук. 2001. Т. 171, № 6. С. 649–662.
8. *Ченцов Ю.С.* Введение в клеточную биологию. М.: Академкнига, 2005.
9. *Шумаков В.И., Мойсюк Я.Г., Томилина Н.А.* Трансплантация почки // Нефрология: Руководство для врачей / Под ред. И.Е. Тареевой. М.: Медицина, 2000. С. 658–682.
10. *Butani L., Johnson J., Troppmann C. et al.* Predictive value of pretransplant inflammatory markers in renal allograft survival and rejection in children // Transplant. Proc. 2005. Vol. 37, № 2. P. 679–681.
11. *Diaz I., Sanchez P., Alonso C., Valdes F.* Immunological profile of patients awaiting a renal transplant // Clin. Transplant. 2004. Vol. 18, № 5. P. 529–535.
12. *Divate S.A.* Acute renal allograft rejection: progress in understanding cellular and molecular mechanisms // Transplantation. 2000. Vol. 46, № 4. P. 293–296.
13. *Kang N., Guan D., Xing N. et al.* Expression of CD158b on peripheral blood lymphocytic cell after kidney transplantation // Transplant. Proc. 2005. Vol. 37, № 2. P. 782–784.
14. *Kishimoto K., Sandner S., Imitola J. et al.* Th1 cytokines, programmed cell death, and alloreactive T cell clone size in transplant tolerance // J. Clin. Invest. 2002. Vol. 109, № 11. P. 1471–1479.
15. *Posselt A.M., Vincenti F., Bedolli M. et al.* CD69 expression on peripheral CD8 T cells correlates with acute rejection in renal transplant recipients // Transplantation. 2003. Vol. 76, № 1. P. 190–195.
16. *Reinsmoen N., Cornett K.J., Matas A., Savik K.* Determing level of immunological risk for early graft dysfunction using pretransplant immune response indicators // Abstracts of the World Transplant Congress, July 22–27, 2006, Boston. 696 p.
17. *Sarwal M., Chua M.S., Kambham N. et al.* Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection idettified by DNA microarray profiling // N. Engl. J. Med. 2003. Vol. 349, № 2. P. 125–138.
18. *Sarwal M., Jani A., Chang S. et al.* Granulysin expression is a marker for acute rejection and steroid resistance in human renal transplantation // Hum. Immunol. 2001. Vol. 62, № 1. P. 21–31.
19. *Tinckam K.J., Wood I.G., Ji F., Milford E.L.* ATG induction is associated with an increase in anti-HLA antibodies after kidney transplantation // Hum. Immunol. 2004. Vol. 65, № 11. P. 1281–1287.

Комментарий редколлегии

Авторы обнаружили новые признаки активации лимфоцитов – изменение их размеров и формы, выявляемое при компьютерной фазово-интерференционной микроскопии. Тем не менее общее мнение редколегии заключается в том, что самостоятельного значения морфометрия лимфоцитов в диагностике острого отторжения не имеет. Активация лимфоцитов происходит как при реакции отторжения, так и при формировании иммунного ответа на инфекцию. Патофизиологическая сущность иммунного ответа и в том и в другом случае одинакова, именно поэтому попытки построить алгоритм диагностики отторжения на основании изучения динамики концентраций цитокинов и многих других молекул не привели к успеху. На сегодняшний день только пункционная биопсия позволяет установить, что мишенью активированных иммунных механизмов является именно трансплантат.

Роль нового метода диагностики активизации лимфоцитов в наблюдении за течением реакции отторжения и оценки эффективности лечебных мероприятий также сомнительна – если признаки уменьшения активации лимфоцитов и могут свидетельствовать об успешном подавлении отторжения, то их отсутствие либо повторная активация лимфоцитов могут быть как признаком неэффективного лечения отторжения или его рецидива, так и признаком генерализации инфекционного процесса, который является нередким спутником иммуносупрессии. Поскольку лечебная тактика при инфекции и отторжении диаметрально противоположна, а морфометрия лимфоцитов не позволяет отличить эти процессы, новый диагностический метод не может заменить в клинике общепринятые методы диагностики, в первую очередь пункционную биопсию.

В то же время компьютерная морфометрия лимфоцитов дополняет наши знания о процессе активации лимфоцитов, знакомство с этим методом может повлиять на нашу философию и наше понимание сложных иммунологических механизмов. Поэтому, несмотря на ряд спорных утверждений, содержащихся в статье, редколлегия решила опубликовать статью, сопроводив ее редакционным комментарием.

Профессор М.М. Каабак,
руководитель отдела трансплантации органов
РНЦХ им академика Б.В.Петровского РАМН