

УДК 616.61-089.843-076-037

© Траилин А.В., Никоненко Т.Н., 2009

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ ЛЕЙКОЦИТОВ В КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ВАРИАНТОВ ОСТРОГО ОТТОРЖЕНИЯ ПОЧЕЧНОГО АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА

Траилин А.В., Никоненко Т.Н.

Запорожская медицинская академия последипломного образования

Траилин А.В., Никоненко Т.Н. Иммунофенотипирование лейкоцитов в комплексной диагностике вариантов острого отторжения почечного аллотрансплантата // Украинський морфологічний альманах. – 2009. – Том 7, №1. – С. 108-111.

Целью исследования была иммуногистохимическая характеристика гистологических вариантов острого отторжения почечных аллотрансплантатов. Гистологические срезы биоптатов исследовались после их окрашивания рутинными методами, а также антителами к C4d, CD45R0-антигену Т-лимфоцитов и CD68-антигену макрофагов. Показано, что для острого Т-клеточно-опосредованного отторжения характерно усиление Т-лимфоцитарной инфильтрации интерстиция по сравнению с дотрансплантационным этапом, минимальный гломерулит. Для острого антителоопосредованного отторжения характерны усиление макрофагальной инфильтрации интерстиция и более высокая степень Т-лимфоцитарной интерстиция с преобладанием лимфоцитов, Т-лимфоцитарный гломерулит.

Ключевые слова: почечный аллотрансплантат, острое отторжение, морфологическая диагностика, Т-лимфоциты, макрофаги, C4d.

Траїлін А.В., Никоненко Т.М. Імунофенотипування лейкоцитів у комплексній діагностиці варіантів гострого відторгнення ниркового алотрансплантату // Український морфологічний альманах. – 2009. – Том 7, №1. – С. 108-111.

Метою дослідження була імуногістохімічна характеристика різних гістологічних варіантів гострого відторгнення. Гістологічні зрізи біоптатів ниркових алотрансплантатів досліджувалися після їх фарбування рутинними методами, а також антитілами до C4d, CD45R0-антигену Т-лімфоцитів і CD68-антигену макрофагів. Показано, що для гострого Т-клітинно-опосередкованого відторгнення притаманне посилення Т-лімфоцитарної інфільтрації інтерстиція в порівнянні з дотрансплантацийним етапом, мінімальний гломерулит. Для гострого антитілоопосередкованого відторгнення характерні посилення макрофагальної інфільтрації та більше високий ступінь Т-лімфоцитарної інфільтрації інтерстицію з перевагою лімфоцитів, Т-лімфоцитарний гломерулит.

Ключові слова: нирковий алотрансплантат, гостре відторгнення, морфологічна діагностика, Т-лімфоцити, макрофаги, C4d.

Trailin A.V., Nikonenko T.N. Complex diagnostics of acute kidney allograft rejection with the use of leucocytes immunophenotyping // Український морфологічний альманах. – 2009. – Том 7, №1. – С. 108-111.

We aimed to characterize immunohistochemically different morphological variants of acute kidney allograft rejection. Histological slices of kidney allograft biopsies were examined after coloration by routine methods and immunohistochemical proceeding for C4d, CD45R0 T-lymphocytes antigen and CD68 macrophages antigen. Increasing of interstitial T-lymphocytes infiltration and minimal glomerulitis are characteristic of acute T-cells-mediated rejection. More pronounced T-lymphocytes and macrophages interstitial infiltration with predominance of lymphocytes, T-lymphocytes glomerulitis are characteristic of acute antibody-mediated rejection.

Key words: kidney allotransplantat, acute rejection, morphological diagnostics, T-lymphocytes, macrophages, C4d.

Трансплантация почки является эффективным методом лечения пациентов в терминальной стадии ХПН. Одним из серьезных осложнений при трансплантации почки являются острые реакции отторжения (ОРО) почечного аллотрансплантата (ПАТ) [3]. Патогенетической основой отторжения является повреждение ПАТ, обусловленное клеточным и/или гуморальным аллоиммунным механизмами [3]. Согласно Banff-2005-гистологической классификации форм па-

тологии ПАТ [8], среди вариантов острого отторжения различают пограничные изменения, острое Т-клеточно - опосредованное отторжение (ОТОО), острое антителоопосредованное отторжение (ОАОО); возможно сочетание ОТОО и ОАОО. Тем не менее, во многих случаях рутинного гистологического исследования биоптатов недостаточно для определения варианта отторжения. При ОРО ПАТ инфильтрируется Т-лимфоцитами и макрофагами [4, 5], выявляе-

ние которых может повысить качество диагностики, однако степень их участия в патогенезе разных типов ОРО окончательно не установлена.

Целью настоящего исследования была иммуногистохимическая характеристика различных гистологических вариантов ОРО с использованием антител к антигенам Т-лимфоцитов и моноцитов/макрофагов.

Материал и методы. Проведено ретроспективное морфологическое исследование пункционных биопсий и удаленных трансплантатов 20-ти реципиентов с дисфункцией ПАТ, обусловленной ОРО.

Материал фиксировали в 10% формалине, заливали в парафин и срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, ШИК, трихромом по Массону. Оценивали морфологические изменения, характерные для ОАОО и ОТОО [7, 8]. Кроме того, для диагностики ОАОО срезы окрашивали антителами к С4d-компоненту комплемента. Определяли процент ткани с линейным окрашиванием вдоль контура ПТК. Негативным считалось окрашивание 0-10% ткани, позитивным - >10% [2].

Для идентификации в срезах Т-лимфоцитов и макрофагов использовались антитела к CD45R0 и CD68, соответственно. Срезы докрасивались гематоксилином и заключались в бальзам.

При полуколичественной оценке окрашивания с антителами к CD45R0 и CD68 подсчитывалось максимальное количество CD45R0+ и CD68+ клеток в перитубулярных капиллярах (ПТК), клубочках, в стенке артерий и канальцев, определяли степень инфильтрации интерстиция в баллах (0-3). Для количественной оценки Т-клеточной и макрофагальной инфильтрации интерстиция в корковом веществе почек фотографировали 10 полей интерстициальной ткани. Изображение анализировалось с помощью программ Adobe Photoshop 8.0 и ImageJ 1.34s. Для оценки степени инфильтрации ПАТ CD45R0+ лимфоцитами и CD68+ моноцитами/макрофагами подсчитывалось их среднее количество в поле зрения.

Для описания дискретных данных, а также непрерывных с распределением, отличающимся от нормального, использовали медиану, и квартили; достоверность отличий оценивалась с помощью анализа Краскелла-Уоллиса и Mann-Whitney U-теста. Для описания частотных данных использовали проценты, а отличия между группами оценивались с помощью χ^2 -теста. Непрерывные нормально распределенные данные вы-

ражали средним значением и стандартным отклонением; для сравнения результатов между двумя группами использовали Т-тест. Наличие связи между параметрами оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (R). Все виды анализа выполнялись с использованием программы Статистика 7,0. Отличия между группами и предсказательная ценность критерия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. По результатам окрашивания с антителами к С4d, биопсии с различными вариантами ОРО были разделены на С4d+ и С4d- (табл. 1). В 4-х С4d- биопсиях было диагностировано ОТОО. В 3-х случаях С4d+ ОРО имело место изолированное ОАОО. В 5-и биопсиях были выявлены пограничные изменения. В 8-и биопсиях ОАОО сочеталось с ОТОО. Если учесть, что пограничные изменения свидетельствуют о возможном ОТОО, то у 65% пациентов отмечалось сочетание ОАОО и ОТОО.

Таблица 1. Гистологический диагноз при С4d- и С4d+ ОРО.

	С4d+(16)	С4d- (4)
ОАОО	3	0
ОАОО+острое Т-клеточно-опосредованное ОРО	8	0
ОАОО+пограничные изменения	5	0
Острое Т-клеточно-опосредованное ОРО	0	3
Пограничные изменения	0	1

Далее мы сравнили степень и характер Т-лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрации структур ПАТ в С4d- и С4d+ биоптатах. В обеих группах пациентов в клубочках идентифицировались как Т-лимфоциты, так и макрофаги, причем последние преобладали (табл. 2). Количество активированных Т-лимфоцитов и моноцитов в клубочках пациентов с С4d+ ОРО превышало эти показатели в С4d- биоптатах, однако достоверно отличалось только количество Т-лимфоцитов. Степень гломерулита коррелировала с количеством CD45R0+лимфоцитов ($R=0,79$, $p=0,054$) и CD68+ моноцитов ($R=0,52$, $p=0,0007$) в клубочках, что свидетельствует об одновременном участии Т-клеточных и гуморальных механизмов в повреждении ПАТ. Гломерулит является признаком острого активного отторжения: как ОТОО [3], так и ОАОО [3, 9]. Для дифференциальной диагностики двух типов ОРО имеет значение состав инфильтрата: для ОАОО

характерно присутствие в клубочках нейтрофилов и моноцитов [3, 9], а для ОТОО - преобладание Т-лимфоцитов [9].

Степень макрофагальной инфильтрации интерстиция в С4d+ биоптатах была достоверно выше, чем при ОТОО, что согласуется с литературными данными [9], тогда как степень лимфоцитарной ин-

фильтрации не отличалась от ОТОО (табл. 2). При количественной оценке инфильтрации интерстиция было установлено, что если в дотрансплантационных биоптатах количество CD45R0+ Т-лимфоцитов в поле зрения составляло 16 ± 9 , CD68+ макрофагов - 23 ± 11 , то при ОРО: 136 ± 93 и 65 ± 42 , соответственно.

Таблица 2. Корреляция степени лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрации структур ПАТ с С4d, и иммуногистохимическая характеристика С4d- и С4d+ ОРО

	R	p	C4d+ (16)	C4d- (4)	p
CD45R0+ на клубочек	0,55	0,042	2,4 (0,3-8)	0 (0-0,7)	0,038
CD68+ на клубочек	0,19	0,513	4,4 (0,9-8,1)	1 (0-1,9)	0,225
CD45R0+ на ПТК	0,06	0,829	4,5 (3-9,5)	2 (2-5)	0,233
CD68+ на ПТК	-0,1	0,728	4 (2,5-6)	3 (0-6)	0,633
CD45R0+ на артерию	0,27	0,378	2 (0-20)	0 (0-40)	0,692
CD68+ на артерию	0,45	0,125	2,5 (0-6)	0 (0-20)	0,573
CD45R0+ в интерстиции	0,28	0,314	1,8 (0,8-2,8)	1 (0-1)	0,233
CD68+ в интерстиции	0,34	0,209	1 (1-1,5)	0 (0-0)	0,009
Количество CD45R0+ в п/з интерстиция	0,56	0,031	144±94	62±28	0,001
Количество CD68+ в п/з интерстиция	0,13	0,634	75±41	25±19	0,003
CD45R0+ на каналец	-0,16	0,577	1,5 (0-3,5)	2 (1-3)	0,734
CD68+ на каналец	0,06	0,843	0,5 (0-1,5)	0 (0-3)	0,840

Количество Т-лимфоцитов в поле зрения в обеих группах было достоверно большим, чем количество макрофагов ($p=0,0001$). В интерстиции С4d- биопсий достоверно увеличивалось количество Т-лимфоцитов ($p=0,0001$), а количество макрофагов не менялось по сравнению с дотрансплатационным этапом. В С4d-позитивных биопсиях достоверно увеличивалось количество как Т-лимфоцитов, так и макрофагов ($p<0,0001$).

В отличие от метода полуколичественной оценки было показано, что при ОАОО, по сравнению с ОТОО, достоверно увеличивается присутствие в интерстиции не только макрофагов, но и Т-лимфоцитов. Таким образом, количественный подход является более чувствительным.

Степень инфильтрации интерстиция активированными Т-лимфоцитами при ее оценке в баллах достоверно коррелировала со степенью интерстициального воспаления ($R=0,53$, $p=0,04$). Если же для оценки использовать количественные критерии, то со степенью интерстициального воспаления коррелировало как количество активированных Т-лимфоцитов ($R=0,56$, $p=0,031$), так и количество CD68+ макрофагов ($R=0,53$, $p=0,04$). Литературные данные свидетельствуют, что нарушение функции ПАТ достоверно ассоциируется со степе-

нью инфильтрации [3]. Мы показали, что для С4d+ ОРО (которое имеет более тяжелое течение) характерна более высокая степень инфильтрации интерстиция ПАТ активированными Т-лимфоцитами и макрофагами. По данным ряда авторов [5, 10] при ОТОО в инфильтратах в основном выявляются активированные CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты. Однако современные данные ставят под сомнение ключевую роль Т-лимфоцитов при ОТОО [3]; имеются указания, что только моноцитарная инфильтрация ассоциируется с повреждением каналцев и с дисфункцией ПАТ при ОРО [4]. Отсутствие усиления макрофагальной инфильтрации интерстиция при ОТОО может объяснить относительно доброкачественное течение этой формы ОРО.

Количество CD45R0+ и CD68+ в ПТК достоверно не отличалось у пациентов с ОАОО и ОТОО. Степень капиллярита достоверно коррелировала с количеством активированных Т-лимфоцитов в ПТК ($R=0,65$, $p=0,008$), что свидетельствует о значительной роли Т-клеточных механизмов в повреждении ПАТ при ОРО. Степень тубулита достоверно не отличалась между двумя группами, однако коэффициент корреляции с присутствием Т-лимфоцитов в стенке канала был высоким ($R=0,44$, $p=0,102$).

Количество мононуклеаров в артериаль-

ной стенке достоверно не отличалось в двух группах. Только количество CD68+ макрофагов в артериальной стенке достоверно коррелировало с наличием артериита ($R=0.58$, $p=0,04$) и его степенью ($R=0.61$, $p=0,028$). Артериит выявляется примерно в 25%–40% нефробиопсий при ОАО и крайне редко ($<0.5\%$) в стабильно функционирующих ПАТ [7]. Литературные данные подтверждают наши находки, и свидетельствуют, что, в отличие от тубулита, в стенке артерий преобладают макрофаги. Было отмечено различие в инфильтрации структур ПАТ Т-лимфоцитами и макрофагами при ОАО и ОТОО могут объяснить более тяжелое клиническое течение ОАО и худший прогноз [1, 2, 3]. Важность ранней диагностики ОАО объясняется не только более тяжелым его течением и худшим прогнозом, но и иными подходами к терапии. Таким пациентам, в отличие от терапии отторжения, опосредованного Т-лимфоцитами, показаны плазмаферез, введение иммуноглобулинов, антител к антигенам В-лимфоцитов, спленэктомия; однако наиболее эффективной зарекомендовала себя иммуноадсорбция [1, 2].

Выводы:

1. Для ОТОО характерно усиление Т-лимфоцитарной инфильтрации интерстиция по сравнению с дотрансплантационным этапом при сохранении степени макрофагальной инфильтрации, минимальный гломерулит.

2. Для ОАО характерно усиление как Т-лимфоцитарной, так и макрофагальной инфильтрация интерстиция по сравнению с дотрансплантационным этапом, Т-лимфоцитарный гломерулит.

3. Для ОАО по сравнению с ОТОО, характерна более высокая степень Т-лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрации интерстиция с преобладанием лимфоцитов.

4. Автоматизированный метод более чувствительно выявляет количественные различия в степени инфильтрации интерстиция.

5. У 65% пациентов имеет место сочетание ОАО и ОТОО.

6. В патогенезе артериита главную роль играют макрофаги.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Böhmig G.A., Wahrmann M., Regele H., et al. Immunoabsorption in severe C4d-positive acute kidney allograft rejection: a randomized controlled trial // *Am. J. Transplant.* - 2007. - V. 7, № 1. - P. 117-121.
2. Colvin R.B. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis // *J. Am. Soc. Nephrol.* - 2007. - V. 18, № 4. - P. 1046-1056.
3. Cornell L.D., Smith R.N., Colvin R.B. Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* - 2008. - V. 3. - P. 189-220.
4. Giralda R., Kleiner D. E., Duan Z., et al. Monocyte Infiltration and Kidney Allograft Dysfunction During Acute Rejection // *Am. J. Transplant.* - 2008. - V. 8. - P. 600-607.
5. Hadley G. Role of integrin CD103 in promoting destruction of renal allografts by CD8 T cells // *Am. J. Transplant.* - 2004. - V. 4. - P. 1026-1032.
6. Matheson P.J., Dittmer I.D., Beaumont B.W., et al. The macrophage is the predominant inflammatory cell in renal allograft intimal arteritis // *Transplantat.* - 2005. - V. 79. - P. 1658-1662.
7. Racusen L.C., Solez K., Colvin R.B., et al. The Banff-97 working classification of renal allograft pathology // *Kidney Int.* - 1999. - V. 55, № 2. - P. 713-723.
8. Solez K., Colvin R. B., Racusen L. et al. Banff '05 Meeting Report: Differential Diagnosis of Chronic Allograft Injury and Elimination of Chronic Allograft Nephropathy ("CAN") // *American Journal of Transplantation.* - 2007. - V. 7. - P. 518-526.
9. Tinckam K.J., Djurdjev O., Magil A.B. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status // *Kidney Int.* - 2005. - V. 68. - P. 1866-1874.
10. Veronese F.V., Noronha I.L., Manfro R.C., et al. Prevalence and immunohistochemical findings of subclinical kidney allograft rejection and its association with graft outcome // *Clin. Transplant.* - 2004. - Vol. 18 (4). - P. 357-364.

Надійшла 12.12.2008 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін