

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДОНОРОВ И РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧЕЧНОГО АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА

Василенко И.А.¹, Валов А.Л.², Ватазин А.В.³, Нестеренко И.В.⁴, Круглов Е.Е.³

¹ ФГУ «Российский геронтологический научно-клинический центр» Росздрава, Москва

² ГУ «Российская детская клиническая больница» Росздрава, Москва

³ ГУ «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», Москва

⁴ Московский городской центр трансплантации почки ГКБ № 7 Департамента здравоохранения г. Москвы

Методом витальной компьютерной фазовой морфометрии (фазово-интерференционный микроскоп «Цитоскан») исследовали состояние тромбоцитарного звена гемостаза 16 реципиентов, 16 оптимальных и 16 маргинальных доноров ПАТ. Установлено, что как у доноров, так и у реципиентов ПАТ имеются нарушения клеточного звена гемостаза, которые могут оказывать определенное влияние на функционирование пересаженного органа, провоцировать развитие тромботических осложнений и нарушение микроциркуляции в паренхиме почки.

Ключевые слова: реципиенты, доноры почки, гемостаз, тромбоциты, морфометрия

SOME FEATURES OF MORPHOFUNCTIONAL STATUS OF PERIPHERAL BLOOD PLATELETS IN DONORS AND RECIPIENTS OF RENAL ALLOGRAFT

Vasilenko I.A.¹, Valov A.L.², Vatazin A.V.³, Nesterenko I.V.⁴, Kruglov E.E.³

¹ Russian Research Clinical Centre of Gerontology, Moscow

² Russian Children Clinical Hospital, Moscow

³ M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow

⁴ Clinical Hospital 7, Kidney Transplant Center, Moscow

The morphofunctional status of peripheral blood platelets from 16 recipients, 16 optimal and 16 marginal donors renal allograft were investigated by method of vital computer phase morphometry (phase-interference microscope «Cytoscan»). The abnormality of platelet hemostasis was found out in recipients and potential renal allograft donors. Such hemostasis damages can promote the thrombotic complications and failure of microcirculation in renal parenchymatous tissue.

Key words: recipients, kidney donors, hemostasis, platelets, morphometry

ВВЕДЕНИЕ

Функция почечного аллотрансплантата (ПАТ) в раннем послеоперационном периоде во многом определяется состоянием органа на момент его изъятия. Поэтому требования к принципам кондиционирования потенциального донора включают

обеспечение адекватной гидратации и диуреза, достаточное снабжение кислородом органов и тканей, предупреждение вазоконстрикции, медикаментозную защиту клеток от отека и ионного дисбаланса, снижение клеточного метаболизма, подавление токсического метаболизма и выброса ферментов в

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

кровеносное русло, профилактику инфекционных и тромботических осложнений. Недооценка любого из этих факторов ведет к увеличению риска возникновения первично нефункционирующей почки [5, 6, 10].

После трансплантации до 5,4% случаев осложнений составляют венозные тромбозы, стеноз или окклюзия почечной артерии и ее ветвей [1, 15]. В развитии тромботических осложнений важную роль могут играть различные нарушения гемостаза и микроциркуляции как у донора, так и у реципиента [7, 9, 14].

У потенциальных доноров ПАТ достаточно часто микроваскулярные тромбозы встречаются в ассоциации с проявлениями диссеминированного внутрисосудистого свертывания. Однако по-прежнему остается открытым вопрос, как эти процессы могут влиять на функцию пересаженного органа.

Состояние гемостаза у больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН) в терминальной стадии изучено более подробно. Установлено, что азотемическая интоксикация, изменение гуморальной среды (анемия, гипопротеинемия, ацидоз, нарушения иммунитета, эндокринные сдвиги) провоцируют нарушение проницаемости и генерализованное поражение эндотелия сосудистых стенок токсичными продуктами, множественные геморрагии, блокаду микроциркуляторного русла, гипоксические нарушения функций органов и т. п. При этом по мере усугубления почечной недостаточности нарастает и выраженность гемостазиологических нарушений [3, 13].

Внедрение в практическую медицину современных технологических средств, совершенствование биохимических и биофизических методов исследования позволяет значительно расширить наши представления об особенностях перестройки гемостатических механизмов организма донора на этапе забора органов и принципах реагирования организма реципиента на трансплантацию, своевременно выявить факторы риска и выбрать рациональный путь необходимого лечебного воздействия.

В настоящем исследовании мы сосредоточили внимание на некоторых особенностях тромбоцитарного звена гемостаза. Используемый в данной работе метод компьютерной морфометрии позволил осуществить экспресс-диагностику нарушений витального морфофункционального состояния тромбоцитов периферической крови потенциальных доноров и реципиентов почечного аллотрансплантата.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованы 16 больных с ХПН в терминальной стадии в возрасте от 22 до 50 лет (средний возраст

$38,0 \pm 2,3$), находящихся на гемодиализе в течение $3,1 \pm 1,2$ года, и 32 потенциальных донора ПАТ. 16 из них составили группу оптимальных, а 16 – маргинальных доноров в возрасте старше 50 лет, имеющих различные сопутствующие заболевания (сахарный диабет, атеросклероз, артериальная гипертензия), наличие анурии, креатининемии и т. п. В группу сравнения были включены 20 практически здоровых добровольцев (средний возраст $35,2 \pm 3,7$).

Венозную кровь (2–3 мл) заготавливали в пробирку из ареактивного пластика («Sarstedt Monovette», Германия) с антикоагулянтном (цитрат натрия). Для приготовления плазмы, обогащенной тромбоцитами, кровь центрифугировали при 1000 об./мин в течение 5–7 минут [2].

Морфофункциональное состояние циркулирующих тромбоцитов *in situ* оценивали экспресс-методом витальной компьютерной морфометрии на основе отечественного компьютерного фазово-интерференционного микроскопа «Цитоскан» (КФМ) [4].

КФМ представляет собой модифицированный интерферометр Линника с модуляцией фазы опорной волны. Источником света является гелий-неоновый лазер ($\lambda = 633$ нм). Основные параметры КФМ: объектив 30×, общее увеличение системы 5000×, точность измерения по высоте 0,5 нм, по полю – 20 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 нативных клеток заполняли камеру Горяева, рабочая поверхность которой имела зеркальное напыление. Оптимальный объем выборки составлял 50 клеток. Время измерения одного интерференционного поля, соответствующего изображению одной клетки, не превышало 14 секунд. Комплексный алгоритм морфометрии клеток периферической крови предполагал автоматическое определение заданных размерных параметров изучаемых цитообъектов, статистическую обработку данных и документирование результатов в виде протоколов трех уровней: I уровень включал анализ структурно-объемных параметров (топограмма, 3-мерное изображение клетки, профиль, гистограмма распределения фазовых высот); II уровень – расчет морфометрических показателей отдельных клеток (диаметр – D, периметр – P, высота – H, площадь – S, объем – V); оценка распределения объема и площади клетки по уровням сканирования (взаимодействие с чужеродной поверхностью); контурное изображение топографии интерференционного поля (послойная интерферограмма клетки в псевдоцвете); III уровень – интегральный морфомет-

рический анализ клеточной популяции по мерным признакам (D, P, H, S, V), построение цитограмм.

Статистический анализ экспериментальных и клинических 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 квадратичного 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

Система гемостаза подразумевает синергичное взаимодействие четырех важнейших систем: сосудистой сети, тромбоцитов, факторов свертывания и фибринолиза. В обеспечении нормального гемостаза основную роль играют констрикция сосуда, образование тромбоцитарного тромба и выработка фибрина. Первичный же гемостаз осуществляется преимущественно тромбоцитами. Поэтому возможность проведения в режиме реального времени детального анализа морфофункционального состояния живых функционирующих клеток экспресс-методом компьютерной морфометрии представлялась весьма важной и интересной.

Ретроспективный анализ литературы и полученная нами база данных фазово-интерференционных изображений живых тромбоцитов позволили идентифицировать 4 морфологических типа клеток, характеризующих ту или иную степень их активации. Основой для дискриминации структурно измененных тромбоцитов служили различные варианты их формы, характера рельефа поверхности, наличие псевдоподий, их количество и величина.

Рис. 1 иллюстрирует различные формы тромбоцитов периферической крови, зарегистрированные с использованием протоколов анализа фазовых портретов живых клеток I информационного уровня.

Подавляющее большинство тромбоцитов представлено плоскими, округлыми клетками с гладкой или складчатой поверхностью – «гладкие» и «рифленые» дискоциты, соответствующие I морфологическому типу.

К II типу тромбоцитов были отнесены дискоидные клетки округлой, неправильной формы с гладкой или складчатой поверхностью и 1–3 короткими (меньше диаметра клетки) отростками-псевдоподиями, являющимися выростами поверхностной мембраны – «диск-эхиноциты» 1-го класса.

Клетки, имеющие около 2–5 длинных (больше диаметра клетки) отростков-«антенн», представляли

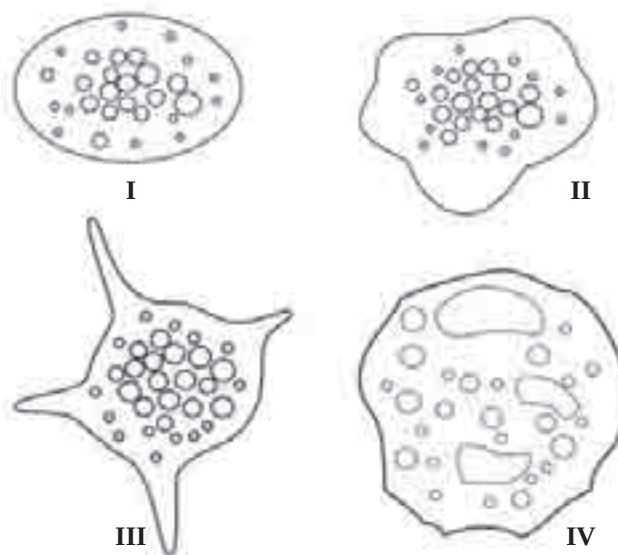


Рис. 1. Морфофункциональные типы живых тромбоцитов периферической крови: I – тромбоцит «покоя»; II – тромбоцит с низким уровнем активности; III – высокоактивированный тромбоцит; IV – дегенеративно измененный тромбоцит

III тип и отличались большим многообразием форм: от плоских дисков до клеток неправильной причудливой формы – «диск-эхиноциты» 2-го класса.

Тромбоциты неправильной формы с неровной бугристой поверхностью, большим количеством отростков различной длины и многочисленными вакуолями были отнесены к IV морфологическому типу – дегенеративно-измененным клеткам.

Следует отметить, что гладкие и рифленые дискоциты являются так называемыми формами «покоя». Тромбоциты II–III типов, отличающиеся появлением отростков (псевдоподий) различного числа и длины, а также изменением их формы, связанной с перестройкой цитоскелета и структуры гранулмера, проявляют внешние признаки функциональной активности.

Клетки IV типа являются дегенеративно измененными, функционально неполноценными тромбоцитами, практически исчерпавшими свои биологические функции.

На рис. 2 представлены диаграммы распределения тромбоцитов периферической крови в соответствии с принадлежностью к 4 выделенным морфологическим типам. У практически здоровых добровольцев 63% тромбоцитов были представлены клетками «покоя», 21% – тромбоцитами с низким уровнем активации (II тип). Количество высокоактивированных клеток с длинными отростками-«антеннами» составляло 12% (III тип), а дегенеративно-измененных (IV тип) – 4%.

У больных ХПН тромбоциты «покоя» составляли 51,3%. 33,2% клеток были представлены диск-эхиноцитами с низким уровнем активации (II тип);

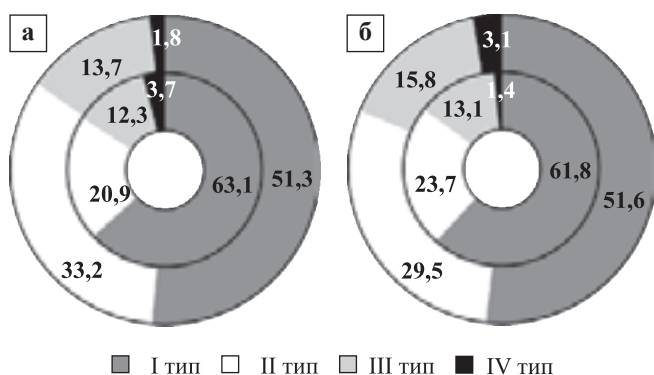


Рис. 2. Процентное соотношение морфофункциональных типов тромбоцитов периферической крови: а – практически здоровые добровольцы (внутренний круг) и больные хронической почечной недостаточностью в терминальной стадии (внешний круг); б – оптимальные (внутренний круг) и маргинальные (внешний круг) доноры трупной почки

13,7% относились к III типу, а к дегенеративно-измененным, исчерпавшим функциональный резерв клеткам – всего 1,4%.

В донорской группе оптимальных доноров соотношение различных типов тромбоцитов в циркулирующей популяции оказалось иным: 61,8; 23,7; 13,1 и 1,4% (I, II, III и IV тип соответственно). Морфологическая картина популяции тромбоцитов маргинальных доноров характеризовалась незначительным снижением в циркуляции тромбоцитов «покоя» (до 51,6%), увеличением активированных (29,5% – II тип; 15,8% – III тип) и дегенеративно измененных тромбоцитов (3,1% – IV морфологический тип).

Анализ размерных параметров тромбоцитов (диаметр, периметр, высота, объем и площадь) позволил количественно охарактеризовать структурно-объемные особенности каждой отдельной клетки и всей популяции в целом (табл. 1).

Установлено, что морфометрические характеристики тромбоцитов периферической крови больных с ХПН значительно превышали аналогичные показатели практически здоровых лиц. Так, величина среднего в популяции диаметра клеток была увеличена на 15%, периметра – на 10%, площади – на 11%, объема – на 11% ($p < 0,05$). Фазовая высота,

напротив, оказалась сниженной на 17% ($p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют, что для больных ХПН характерен повышенный уровень функциональной активности тромбоцитарного звена: присутствие в циркуляции крупных клеток преимущественно II и III типа. Такие изменения морфометрических показателей, скорее всего, являются результатом вполне определенных процессов, связанных с активацией тромбоцитов, формированием многочисленных псевдо- и ламеллоподий. При этом структурная перестройка клеток сопровождается интенсивным выбросом гранулярного пула накопления, что находит отражение в снижении величины фазовой высоты клеток.

В периферической крови потенциальных доноров также наблюдались изменения морфометрических показателей циркулирующих тромбоцитов. Мы зарегистрировали достоверное увеличение средне-популяционных значений диаметра (на 19,2 и 15,4% в группе оптимальных и маргинальных доноров соответственно), периметра (на 17,1 и 9,8%), площади (на 30,4 и 10,9%) и объема (на 16,7 и 11,1%) клеток по сравнению с показателями практически здоровых добровольцев. В обеих группах фазовая высота клеток была снижена на 25%. Такая морфометрическая картина отражает появление в кровеносном русле большего числа активированных тромбоцитов с характерным рельефом поверхности и наличием отростков-псевдоподий.

Полученные результаты убедительно свидетельствуют о выраженных изменениях морфофункционального состояния тромбоцитов периферической крови обследованных пациентов. Компьютерная морфометрия позволила выявить особенности различных клеточных форм по их структурно-объемным показателям и рельефу поверхности, представить количественную и качественную характеристику каждой группы клеток. Нами выявлен повышенный уровень активности тромбоцитарного звена у реципиентов и потенциальных доноров ПАТ: увеличенное содержание активированных и дегенеративных тромбоцитов, присутствие в циркуляции клеток более крупных размеров с низкой высотой и объемом. Несомнен-

Таблица 1

Средние в популяции размерные параметры тромбоцитов периферической крови ($M \pm \sigma$)

Группа	D, мкм	P, мкм	H, мкм	S, мкм ²	V, мкм ³
Практически здоровые лица (n = 20)	2,6 ± 0,8	8,2 ± 3,4	1,2 ± 0,3	4,6 ± 1,2	1,8 ± 0,6
Больные ХПН (n = 16)	3,0 ± 0,9*	9,0 ± 3,3*	1,0 ± 0,4*	5,1 ± 1,5	2,0 ± 0,7
Оптимальные доноры (n = 16)	3,1 ± 2,3*	9,6 ± 3,0*	0,9 ± 0,6*	6,0 ± 1,7*	2,1 ± 0,8*
Маргинальные доноры (n = 16)	3,0 ± 2,3*	9,0 ± 3,1*	0,9 ± 0,6*	5,1 ± 1,7	2,0 ± 0,8

Примечание. * – достоверно относительно контроля, $p < 0,05$

Таблица 2

**Ретроспективный анализ результатов трансплантаций почек,
полученных от оптимальных и маргинальных доноров (М ± м)**

Группа		Количество реципиентов, %	Восстановление функции почки, сут	Уровень креатинина, ммоль/л	Срок выписки, сут
Оптимальные доноры	Первичная функция почки	31,6	–	0,11 ± 0,01	27,1 ± 2,6
	Отсроченная функция почки	68,4	11,4 ± 1,3	0,16 ± 0,01	33,1 ± 2,3
Маргиналь- ные доноры	Первичная функция почки	33,3	–	0,11±0,01	29,2 ± 4,0
	Отсроченная функция почки	66,7	14,1 ± 2,8	0,19±0,02	41,4 ± 4,6

но, подобные изменения морфометрических показателей тромбоцитов могут негативно сказываться на микроциркуляции органа, вызывая нарушения капиллярного кровотока. В то же время достоверных различий между показателями тромбоцитарного звена гемостаза у оптимальных и маргинальных доноров органов не установлено.

В табл. 2 представлены исходы трансплантаций почек, полученных от обследованных нами оптимальных и маргинальных доноров. Не обнаружено разницы между числом реципиентов с первичной и отсроченной функциями трансплантированной почки в обеих анализируемых группах. Уровни креатинина при выписке реципиентов с ПАТ от маргинальных и оптимальных доноров также оказались практически равнозначными, что согласуется с мнением отечественных и зарубежных трансплантологов, полагающих, что изменения гемостаза у доноров со стандартными и расширенными критериями отбора в целом являются сопоставимыми [8, 11, 12, 14]. Приведенные результаты могут служить еще одним аргументом в пользу расширения пула донорского обеспечения за счет маргинальных доноров, являющегося, несомненно, перспективным и вполне оправданным способом обеспечения растущей потребности донорских органов.

Полученные данные не дают оснований для однозначных выводов о роли гемостазиологических факторов в патогенезе первично нефункционирующего нефротрансплантата. Однако не стоит исключать сам факт влияния нарушений гемостаза реципиента и донора в развитии ряда осложнений пересаженного органа: венозного тромбоза, ишемических повреждений и т. п.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, основываясь на полученных результатах, можно заключить, что как у доноров, так и у реципиентов ПАТ имеются нарушения

клеточного звена гемостаза, которые могут оказывать определенное влияние на функционирование пересаженного органа, провоцировать развитие тромботических осложнений и нарушение микроциркуляции в паренхиме почки. Решением данного вопроса, обеспечивающего успех трансплантации, может быть своевременное исследование состояния гемостаза реципиента и донора ПАТ, а также корректно проведенное кондиционирование потенциального донора в плане профилактики гемостазиологических и васкулярных нарушений. При этом считаем возможным отметить, что витальная компьютерная морфометрия тромбоцитов может служить одним из методов уточняющей диагностики патологии гемостаза на клеточном уровне и найти успешное применение в клинической практике при мониторинге гемостазиологических показателей в процессе кондиционирования потенциальных доноров нефротрансплантата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Доровских Н.В. Ультразвуковая доплеровская диагностика сосудистых осложнений пересаженной почки // Вестник трансплант. и искусств. органов. 2003. № 4. С. 41–45.
2. Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. Томск, 1980. 333 с.
3. Михеева Ю.С. Нарушения в системе гемостаза и проблема тромбозов на хроническом гемодиализе // Нефрология. 2003. Т. 7. № 2. С. 21–25.
4. Василенко И.А., Шабалин В.Н., Тычинский В.П. и др. Новая технология прижизненной компьютерной фазовой микроскопии: диагностические возможности и перспективы // Радиоэлектроника в медицинской диагностике (оценка функций и состояния организма). 1995. С. 164–169.
5. Беляев А.Ю., Мойсюк Я.Г., Ильинский И.М. и др. Роль различных методов исследования в прогнозировании и диагностике первично-нефункционирующего

- трансплантата // Вестник трансплант. и искусств. органов. 2000. № 3. С. 12–17.
6. *Беляев А.Ю., Мойсюк Я.Г., Ильинский И.М., Тырин В.В.* Современный взгляд на этиологию и патогенез первично нефункционирующего трансплантата почки // Вестник трансплант. и искусств. органов. 1999. № 4. С. 48–54.
 7. *Bühler L., Basker M., Alwayn I.P. et al.* Coagulation and thrombotic disorders associated with pig organ and hematopoietic cell transplantation in nonhuman primates // Transplantation. 2000. Vol. 70. № 9. P. 1323–1331.
 8. *Ugarte R., Kraus E., Montgomery R.A. et al.* Excellent outcomes after transplantation of deceased donor kidneys with high terminal creatinine and mild pathologic lesions // Transplantation. 2005. Vol. 80. № 6. P. 794–800.
 9. *Friedman A.L., Peters T.G., Jones K.W. et al.* Fatal and nonfatal hemorrhagic complications of living kidney donation // Ann. Surg. 2006. Vol. 244. № 4. P. 629.
 10. *Gjertson D.W.* A multi-factor analysis of kidney regrant outcomes // Clin. Transpl. 2002. P. 335–349.
 11. *Stratta R.J., Rohr M.S., Sundberg A.K. et al.* Increased kidney transplantation utilizing expanded criteria deceased organ donors with results comparable to standard criteria donor transplant // Ann. Surg. 2004. Vol. 239. № 5. P. 688–695.
 12. *Stratta R.J., Rohr M.S., Sundberg A.K. et al.* Intermediate-term outcomes with expanded criteria deceased donors in kidney transplantation: a spectrum or specter of quality? // Ann. Surg. 2006. Vol. 243. № 5. P. 594–601.
 13. *Ballow A., Gader A.M., Huraib S. et al.* Platelet surface receptor activation in patients with chronic renal failure on hemodialysis, peritoneal dialysis and those with successful kidney transplantation // Platelets. 2005. Vol. 16. № 1. P. 19–24.
 14. *McCall S.J., Tuttle-Newhall J.E., Howell D.N., Fields T.A.* Prognostic significance of microvascular thrombosis in donor kidney allograft biopsies // Transplantation. 2003. Vol. 75. № 11. P. 1847–1852.
 15. *Orlic P., Vukas D., Drescik I. et al.* Vascular complications after 725 kidney transplantations during 3 decades // Transplant. Proc. 2003. Vol. 35. № 4. P. 1381–1384.