

© 2022 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 12.05.2022
Принята к печати 27.06.2022

DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-3-142-146

Вклад электронной микроскопии в исследование нарушений морфологии тромбоцитов

С.И. Обыденный^{1, 2}, И.И. Киреев³, М.А. Пантелеев¹⁻³

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Контактная информация:

Обыденный Сергей Иванович,
научный сотрудник лаборатории
клеточного гемостаза и тромбоза
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия
Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: sergey.obydennyi@fccho-moscow.ru

В данной статье рассматривается роль электронной микроскопии в диагностике и изучении морфологических изменений при врожденных заболеваниях, вызывающих нарушения строения тромбоцитов. Морфологические нарушения могут быть разделены на патологии цитоскелета тромбоцитов, альфа- и плотных гранул, а также изменения мембраны. В обзоре описываются ультраструктурные дефекты тромбоцитов при синдроме Вискотта–Олдрича, MYH9-ассоциированных синдромах, синдроме серых тромбоцитов, синдроме Германского–Пудлака, синдроме Пари–Труссо и синдроме Чедиака–Хигаши.

Ключевые слова: морфология тромбоцитов, электронная микроскопия, синдром серых тромбоцитов, дефицит пула хранения тромбоцитов

Обыденный С.И. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2022; 21 (3): 142–146. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-3-142-146

© 2022 by «D. Rogachev NMRCPhOI»

Received 12.05.2022

Accepted 27.06.2022

The electron microscopy contribution to platelet structural pathology investigation

S.I. Obydenyi^{1, 2}, I.I. Kireev³, M.A. Panteleev¹⁻³

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, RAS, Moscow

³Lomonosov Moscow State University, Moscow

Correspondence:

Sergey I. Obydenyi,
a researcher at the Laboratory
of Cell Hemostasis and Thrombosis,
Dmitry Rogachev National Medical
Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology of Ministry
of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: sergey.obydenyi@fccho-moscow.ru

This article discusses the role of electron microscopy in the diagnosis and study of morphological changes that cause platelet structural abnormalities in a variety of congenital diseases. Morphological abnormalities can be divided into the abnormalities of the platelet cytoskeleton, of alpha and dense granules, and membrane abnormalities. Our paper describes ultrastructural platelet defects in Wiskott–Aldrich syndrome, MYH9-associated syndromes, gray platelet syndrome, Hermansky–Pudlak syndrome, Paris–Trousseau syndrome, Chediak–Higashi syndrome.

Key words: platelet morphology, electron microscopy, gray platelet syndrome, platelet storage pool deficiency

Obydenyi S.I., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2022; 21 (3): 142–146.
DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-3-142-146



Функция тромбоцитов – организация тромба в месте повреждения сосудистой стенки. Тромбоциты имеют форму диска диаметром 2,5 мкм и толщиной 0,5 мкм, не содержат ядра, являются самой маленькой клеткой крови, а точнее клеточным фрагментом мегакариоцита – клетки-предшественника. Циркулируют тромбоциты в неактивированном состоянии, и в ответ на взаимодействие с агонистами запускают выполнение своего предназначения, приступая к адгезии к месту повреждения и агрегации с соседними тромбоцитами, тем самым формируя тромб. Активаторы тромбоцитов делятся на сильные и слабые. К сильным относят коллаген, фибриллярный белок межклеточного матрикса, взаимодействующий с тромбоцитом через гликопротеин VI, и тромбин, действующий через рецепторы PAR1 и PAR4, находящийся в плазме в

неактивной форме протромбина. Также тромбоциты могут быть обратимо активированы слабыми активаторами, такими как аденозиндифосфат и тромбоксан A2.

Каждый тромбоцит обладает комплектом специализированных органелл, называемых альфа-гранулами, плотными гранулами и лизосомами, содержащих модуляторы и активные вещества, секретируемые во внеклеточное пространство при активации и помогающие плазменному звену свертывания и стимуляции соседних тромбоцитов.

При секреции гранул часть содержимого растворяется во внеклеточной среде, а часть встраивается в плазматическую мембрану тромбоцита. Средний размер плотных гранул составляет 150 нм, они формируются в зреющих мегакариоцитах и постепенно наполняются нуклеотидами и серото-

нином [1]. Их содержимое – низкомолекулярные небелковые соединения: аденозинтрифосфат, аденозиндифосфат, гуанозинтрифосфат, гуанозиндифосфат, серотонин, гистамин, ионы кальция и магния, а также некоторые мембранные молекулы, такие как Р-селектин и др. Альфа-гранулы и лизосомы тоже созревают в период созревания мегакариоцита. Средний размер альфа-гранул составляет 200–400 нм, лизосом – 175–250 нм. В альфа-гранулах содержатся крупные белки, играющие важную роль в плазменном звене свертывания (фибриноген, факторы V, VII, XI, XIII), воспалительных процессах, восстановлении тканей и взаимодействии между клетками и матриксом. Секрецию плотных и альфа-гранул можно отследить по появлению Р-селектина на поверхности активированных тромбоцитов [2, 3]. Остальное содержимое тромбоцита – несколько митохондрий, компоненты цитоскелета (микротрубочки и актиновые филаменты), распределенные и ассоциированные с гранулами, большое количество гликогена в качестве энергетического запаса клетки и сложная мембранная система. Последняя состоит из 2 структур: открытой канальцевой системы (ОКС), которая является посредником между цитозолем и внешней средой, и плотной трубчатой системы (ПТС), содержащей важные метаболические ферменты. Митохондрии и ПТС вовлечены в метаболические процессы. ПТС представляет собой эндомембранную систему, в которой хранится кальций и ряд важных для регуляции активации тромбоцита ферментов. Эта органелла сформирована из шероховатого эндоплазматического ретикула мегакариоцита, представляет собой продолговатую нерегулярную структуру с утолщенным центром. В отличие от гранул она находится на периферии клетки в окрестностях микротрубочек. ПТС на электронных микрофотографиях имеет специфическое окрашивание, сходное с цитоплазмой, в то время как каналы ОКС выглядят пустыми. ПТС в отличие от ОКС не имеет коммуникации с плазмой или мембранами гранул. В ПТС содержится аденилатциклаза и около 30% всего запаса ионов кальция – 2 важных регулятора активации тромбоцита.

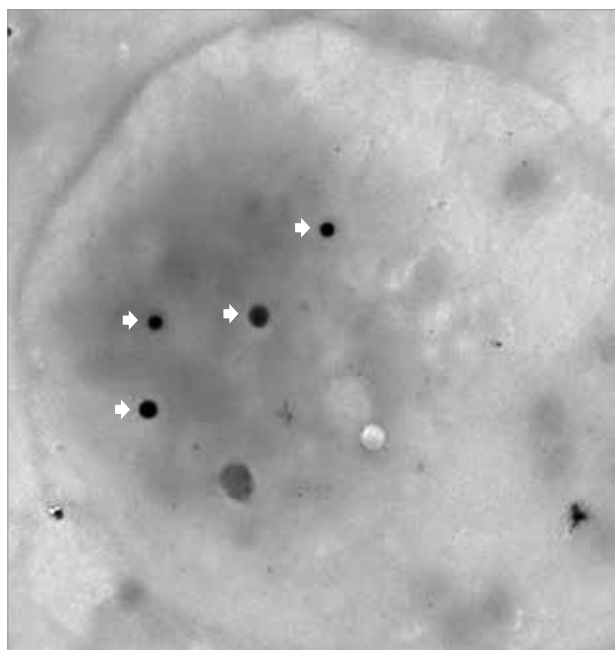
Методом, наиболее подходящим для исследования ультраструктуры внутриклеточных компонентов, является электронная микроскопия, благодаря разрешению до десятых долей нанометра. Электронная микроскопия зародилась в 1930-е годы и впервые была применена для исследования тромбоцитов в конце 1940-х годов. Электронная микроскопия разделяется на 2 основных типа: растровую (сканирующую), при которой происходит сканирование поверхности образца пучком электронов и собранный отраженный сигнал от каждой точки формирует изображение, и просвечивающую (транс-

миссионную), при которой нарезанный на ультратонкие срезы толщиной около 100 нм образец просвечивается пучком электронов насквозь, и по прошедшим/непрошедшим сквозь образец электронам получается фотография внутриклеточных структур.

Для исследования тромбоцитов важным этапом является аккуратная пробоподготовка, так как их активация может самопроизвольно произойти от понижения температуры или механического воздействия и привести к выбросу гранул. Для клинической оценки тромбоцитов в основном используют 2 вида пробоподготовки: для исследования только плотных гранул или полноценное исследование морфологии тромбоцита. В первом случае клетки в богатой тромбоцитами плазме на несколько минут наносят на сетку для электронной микроскопии без фиксации, заключения в смолу и контрастирования, а затем несут на электронный микроскоп. Съемка должна быть произведена в первые 2 дня, так как без фиксации наступает быстрое ухудшение качества образца. Такая методика позволяет посчитать только количество плотных гранул в тромбоците (рисунки 1), морфологические детали при данном тесте получить не удастся. Серьезным недостатком является необходимость быстрого доступа к электронному микроскопу. Современные рекомендации по определению и подсчету плотных гранул в тромбоците показывают, что на клетку приходится в среднем по 2–4 плотные гранулы [4].

Рисунок 1
Плотные гранулы в тромбоците (отмечены стрелками). Просвечивающая электронная микроскопия, × 5000

Figure 1
Dense granules in a platelet (arrows). Transmission electron microscopy, × 5000



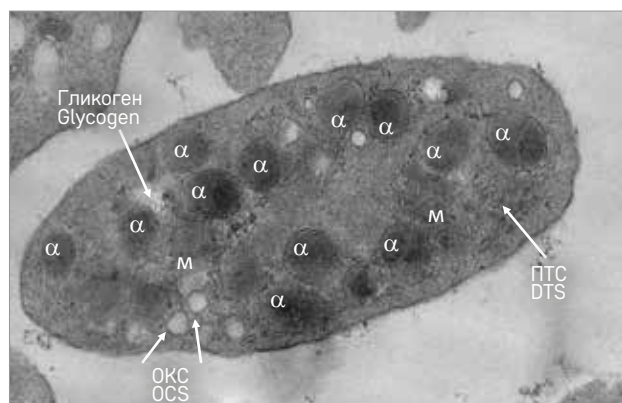
Полноценное исследование морфологии тромбоцита включает в себя предварительную фиксацию глутаровым альдегидом, постфиксацию тетраоксидом осмия, дегидратацию образца, заключение его в смолу с последующей полимеризацией. Далее образец нарезается на срезы толщиной 70–100 нм, контрастируется солями тяжелых металлов [5] и отправляется на электронную микроскопию (рисунк 2).

Рисунок 2

Срез тромбоцита. Просвечивающая электронная микроскопия, $\times 6000$
 α – альфа-гранулы; м – митохондрии

Figure 2

A thin section of a platelet. Transmission electron microscopy, $\times 6000$
 α – alpha granules; m – mitochondria; OCS – open canalicular system; DTS – dense tubular system



Морфологические нарушения могут быть разделены на патологии цитоскелета тромбоцитов, альфа- и плотных гранул и изменения мембраны. Далее рассматриваются описания наиболее часто встречающихся нарушений.

Синдром серых тромбоцитов

Впервые синдром серых тромбоцитов был описан в 1970 г. [6]. Для него характерен дефицит альфа-гранул в тромбоцитах. Общими симптомами являются кровотечения, петехии, тромбоцитопения. Кровотечения чаще умеренные и реже незначительные. Ответ на активаторы агрегации тромбоцитов у разных пациентов существенно различается, из-за чего общие признаки выделить не удастся. Патология клеток крови: количество тромбоцитов находится в диапазоне от 20 до 160 тыс в 1 мкл [7]. В окрашенном мазке крови тромбоциты имеют специфический сероватый цвет. Исследование морфологии показало увеличенный размер тромбоцитов и отсутствие альфа-гранул. При помощи антител с частицами золота было установлено, что мембранные белки в альфа-гранулах серых тромбоцитов содержат Р-селектин [8], но в них нет внутреннего белкового наполнения [9–12].

В таких же экспериментах с мегакариоцитами было показано, что синтез альфа-гранулярных

белков в них происходит, но белки не достигают альфа-гранул, а поступают наружу в костный мозг, что считается причиной возникновения миелофиброза у пациентов с этим синдромом [7]. Наличие Р-селектина в мембранах дефектных гранул, по которому традиционно измеряют степень выброса гранул тромбоцитов, осложняет диагностику этого заболевания методами проточной цитометрии. Электронную микроскопию часто используют для подтверждения данного синдрома, так как она позволяет непосредственно увидеть количество альфа-гранул и наличие/отсутствие их наполнения. Гранулы с дефектами выглядят, как вакуоли диаметром с нормальные гранулы. Количество плотных гранул не изменено.

Синдром Пари–Труссо

Первый случай синдрома Пари–Труссо описан в 1993 г. [13]. У пациентов наблюдались незначительные геморрагические осложнения и тромбоцитопения. Синдром связан с делецией в хромосоме 11q. Позже выяснилось, что синдром Труссо встречается у 94% пациентов с синдромом Якобсена [14].

Патология клеток крови: часть тромбоцитов были большего размера с гигантской гранулой красного цвета при окрашивании по Гимзе. Агрегация и сроки жизни были в норме, но в костном мозге было обнаружено увеличение числа мегакариоцитов в несколько раз. Исследование ультраструктуры на электронном микроскопе показало, что в тромбоцитах встречается до нескольких гигантских гранул с таким же наполнением, как у альфа-гранул, что было подтверждено антителами с частицами золота к Р-селектину, гликопротеину IIbIIIa, фибриногену и фактору фон Виллебранда. Гигантские гранулы формировались путем слияния нескольких альфа-гранул, тем самым образуя гигантскую органеллу. Активированные тромбоциты с гигантскими гранулами оказались не способны осуществлять секрецию их содержимого. При этом большинство тромбоцитов оставались нормальными, обеспечивая соответствующие результаты агрегации. В мегакариоцитах наблюдались нарушения созревания гранул, а также высокий уровень лизиса, предположительно вносящий вклад в тромбоцитопению [15].

Синдром Германского–Пудлака

Дефициты пула хранения тромбоцитов представляют собой целый ряд заболеваний, общими признаками которых являются удлиненное время кровотечения и нарушение выброса веществ из плотных гранул по причине их сниженного количества или отсутствия в них содержимого. Наиболее распространенными являются синдром Германского–Пудлака и синдром Чедиака–Хигаши, для обоих

характерны проявления альбинизма. Обе эти патологии вызваны мутациями в разных генах. Синдром Германского–Пудлака может быть вызван мутацией в генах белков HPS, составляющих белковый комплекс BLOC и участвующих в биогенезе лизосом и транспортёрке белков [16]. Для подтверждения синдрома Германского–Пудлака обязательным признаком является отсутствие плотных гранул в тромбоците.

Синдром Чедиака–Хигаши

Данный синдром вызван мутацией в гене *LYST*, регулирующем лизосомальный транспорт. Патология клеток крови: в результате мутации в тромбоцитах наблюдаются крупные лизосомы [17] и сниженное количество плотных гранул [18]. Альфа-гранулы остаются в нормальных количествах [19]. Для всех остальных содержащих гранулы клеток характерно наличие крупных гранул лизосомальной природы, что не является нормой [20].

Синдром Бернара–Сулье

Тромбоциты при синдроме Бернара–Сулье имеют гигантский размер, сопоставимый с эритроцитами, и дефект в функциональности или количестве рецептора адгезии к фактору фон Виллебранда GPIb/V/IX, в результате чего у тромбоцитов нарушена адгезия [21]. Патология клеток крови: тромбоциты помимо гигантского размера обладают расширенной ОКС, из-за чего на фотографиях тромбоциты имеют структуру швейцарского сыра [22].

MYH9-ассоциированные синдромы

MYH9-ассоциированные синдромы – это заболевания (синдром Фехтнера, синдром Эпштейна, аномалия Мэя–Хегглина, синдром Себастьяна), связанные с мутацией в гене миозина *MYH9* и вызывающие макротромбоцитопению [23]. В остальном тромбоциты описываются как нормальные, а у пациентов могут быть незначительные кровотечения. Помимо тромбоцитов у этого семейства заболеваний могут быть обнаружены нейтрофилы с включениями в цитоплазму, похожими на тельца Деле.

Синдром Вискотта–Олдрича

Другое заболевание, вызванное мутацией в гене белка WASP, участвующего в ветвлении актина, наоборот, вызывает микротромбоцитопению [24].

Патология клеток крови: тромбоцитов в крови может быть очень мало, они подвержены ускоренной клеточной гибели и значительно мельче нормальных клеток. По функциональным тестам тромбоциты несильно отличаются от нормы [25]. Главным риском для пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича является низкая концентрация тромбоцитов, способная привести к летальному исходу при кровотечениях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной статье приведены основные нарушения строения тромбоцитов, выявляемые при помощи электронной микроскопии. Электронная микроскопия в клинической диагностике тромбоцитов играет важную роль при нарушениях, связанных с плотными и альфа-гранулами, так как это единственный метод, позволяющий визуализировать и достоверно определять их состояние и количество. В меньшей степени электронная микроскопия применяется для подтверждения нарушений цитоскелета или мембран. Необходимость дорогостоящего оборудования для электронной микроскопии и сложность процедур пробоподготовки материала препятствуют широкому применению этих методик в медицине, но главное преимущество, которое нельзя недооценивать, – это простота и наглядность визуальной оценки.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра передового опыта Nikon НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и Центра коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ им. М.В. Ломоносова, программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова ПНР 5.13 и фонда «Наука – детям».

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда, проект №21-75-00109.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Obyednyy S.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2930-8768>

Kireev I.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9252-6808>

Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Литература

1. Youssefian T., Cramer E.M. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood* 2000; 95 (12): 4004–7.
2. Johnston G.I., Cook R.G., McEver R.P. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell* 1989; 56 (6): 1033–44.
3. Larsen E., Celi A., Gilbert G.E., Furie B.C., Erban J.K., Bonfanti R., et al. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 1989; 59 (2): 305–12.
4. Chen D., Uhl C.B., Bryant S.C., Krumwiede M., Barness R.L., Olson M.C., et al. Diagnostic laboratory standardization and validation of platelet transmission electron microscopy. *Platelets* 2018; 29 (6): 574–82.
5. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17 (1): 208.
6. Raccuglia G. Gray platelet syndrome: a variety of qualitative platelet disorder. *Am J Med* 1971; 51 (6): 818–28.
7. Nurden A.T., Nurden P. The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease. *Blood Rev* 2007; 21 (1): 21–36.
8. Rosa J., George J.N., Bainton D.F., Nurden A.T., Caen J.P., McEver R.P. Gray platelet syndrome. Demonstration of alpha granule membranes that can fuse with the cell surface. *J Clin Invest* 1987; 80 (4): 1138–46.
9. Gerrard J.M., Phillips D.R., Rao G.H., Plow E.F., Walz D.A., Ross R., et al. Biochemical studies of two patients with the gray platelet syndrome. Selective deficiency of platelet alpha granules. *J Clin Invest* 1980; 66 (1): 102–9.
10. Nurden A.T., Kunicki T.J., Dupuis D., Soria C., Caen J.P. Specific protein and glycoprotein deficiencies in platelets isolated from two patients with the gray platelet syndrome. *Blood* 1982; 59 (4): 709–18.
11. Srivastava P., Powling M.J., Nokes T.J., Patrick A.D., Dawes J., Hardisty R.M. Grey platelet syndrome: studies on platelet alpha-granules, lysosomes and defective response to thrombin. *Br J Haematol* 1987; 65 (4): 441–6.
12. Levy-Toledano S., Caen J.P., Breton-Gorius J., Rendu F., Cywiner-Golenz C., Dupuy E., et al. Gray platelet syndrome: α -granule deficiency: its influence on platelet function. *J Lab Clin Med* 1981; 98 (6): 831–48.
13. Favier R., Douay L., Esteva B., Portnoi M.F., Gaulard P., Lecompte T., et al. A novel genetic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with platelet inclusions, dysmegakaryopoiesis and chromosome deletion AT 11q23. *C R Acad Sci III* 1993; 316 (7): 698–701.
14. Grossfeld P.D., Mattina T., Lai Z., Favier R., Jones K.L., Cotter F., et al. The 11q terminal deletion disorder: a prospective study of 110 cases. *Am J Med Genet A* 2004; 129 (1): 51–61.
15. Breton-Gorius J., Favier R., Guichard J., Cherif D., Berger R., Debili N., et al. A new congenital dysmegakaryopoietic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with giant platelet alpha-granules and chromosome 11 deletion at 11q23. *Blood* 1995; 85 (7): 1805–14.
16. Di Pietro S.M., Falcón-Pérez J.M., Tenza D., Setty S.R.G., Marks M.S., Raposo G., et al. BLOC-1 interacts with BLOC-2 and the AP-3 complex to facilitate protein trafficking on endosomes. *Mol Biol Cell* 2006; 17 (9): 4027–38.
17. White J. Platelet microtubules and giant granules in the Chédiak-Higashi syndrome. *Am J Med Technol* 1978; 44 (4): 273–8.
18. Apitz-Castro R., Cruz M.R., Ledezma E., Merino F., Ramirez-Duque P., Dangelmeier C., et al. The storage pool deficiency in platelets from humans with the Chédiak-Higashi syndrome: study of six patients. *Br J Haematol* 1985; 59 (3): 471–3.
19. Rendu F., Breton-Gorius J., Lebreton M., Klebanoff C., Buriot D., Griscelli C., et al. Evidence that abnormal platelet functions in human Chédiak-Higashi syndrome are the result of a lack of dense bodies. *Am J Pathol* 1983; 111 (3): 307.
20. White J.G. The Chédiak-Higashi syndrome: a possible lysosomal disease. *Blood* 1966; 28 (2): 143–56.
21. López J.A., Andrews R.K., Afshar-Kharghan V., Berndt M.C. Bernard-soulier syndrome. *Blood* 1998; 91 (12): 4397–418.
22. Smith T.P., Dodds W.J., Tartaglia A.P. Thrombasthenic-thrombopathic thrombocytopenia with giant, "Swiss-cheese" platelets: a case report. *Ann Intern Med* 1973; 79 (6): 828–34.
23. Seri M., Pecci A., Di Bari F., Cusano R., Savino M., Panza E., et al. MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82 (3): 203–15.
24. Symons M., Derry J.M., Karlak B., Jiang S., Lemahieu V., McCormick F., et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 1996; 84 (5): 723–34.
25. Obyednyy S.I., Artemenko E.O., Sveshnikova A.N., Ignatova A.A., Varlamova T.V., Gambaryan S., et al. Mechanisms of increased mitochondria-dependent necrosis in Wiskott-Aldrich syndrome platelets. *Haematologica* 2020; 105 (4): 1095–106.