

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ  
им. Дмитрия Рогачева»  
Минздрава России  
Поступила 29.03.2024  
Принята к печати 08.05.2024



EDN: KOBSLM

#### 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: obydenyj@physics.msu.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-140-144

# Анализ морфометрических характеристик тромбоцитов методом электронной просвечивающей микроскопии

А.А. Кузнецова<sup>1</sup>, И.И. Киреев<sup>2</sup>, С.И. Обыденный<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Тромбоциты – вторые по распространенности клетки крови человека. Они выполняют важную функцию – формирование тромбов в местах повреждения сосудов для остановки кровотечений. Патологии строения тромбоцитов способны приводить к различным дисфункциям и угрожающим жизни ситуациям. При некоторых наследственных тромбоцитопатиях могут требоваться морфологические исследования тромбоцитов с применением электронной просвечивающей микроскопии. Эти исследования сложны технически, и их применение ограничено из-за высокой стоимости оборудования и необходимости привлечения обученного персонала. В данной работе с помощью электронной просвечивающей микроскопии мы выполнили анализ морфометрических показателей тромбоцитов, полученных от 20 здоровых доноров. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

**Ключевые слова:** морфология тромбоцитов, патологии строения тромбоцитов, электронная микроскопия, дефицит пула хранения тромбоцитов

Обыденный С.И. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 140–4. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-140-144

## A morphometric analysis of platelets using transmission electron microscopy

A.A. Kuznetsova<sup>1</sup>, I.I. Kireev<sup>2</sup>, S.I. Obydenyi<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, RAS, Moscow

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow

<sup>3</sup>Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Platelets are the second most abundant human blood cells. They have an important function to form blood clots at sites of vascular injury to prevent bleeding. Abnormalities of platelet structure can lead to various dysfunctions and life-threatening situations. In some hereditary platelet disorders, morphological examination of platelets with transmission electron microscopy (TEM) may be required. TEM is technically complex, and its use is limited due to the need for expensive equipment and trained personnel. In our study, we assessed the morphometric parameters of platelets obtained from 20 healthy donors using TEM. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology.

**Key words:** platelet morphology, abnormalities of platelet structure, electron microscopy, platelet storage pool deficiency

Obydenyi S.I., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 140–4.

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-140-144

Система гемостаза человека необходима для поддержания крови в жидком состоянии, остановки кровотечений, а также разрушения тромбов, которые уже выполнили свою функцию. Систему гемостаза образуют 2 звена – плазменное и тромбоцитарное. Тромбоцитарное звено составляют тромбоциты – циркулирующие в неактивном состоянии небольшие форменные элементы крови, под действием активатора приобретающие способность к адгезии и агрегации для последующего формирования тромба. Важными органеллами тромбоцитов являются альфа-гранулы, содержимое которых при активации секретируется во внеклеточное пространство, способствует свертыванию (образованию тромба) и стимулирует дальнейшую активацию тромбоцитов [1].

Отдельную группу наследственных и приобретенных заболеваний образуют болезни, связанные с нарушением морфологических особенностей тромбоцитов.

Одним из подобных заболеваний является синдром серых тромбоцитов, сопровождаемый кровотечениями и тромбоцитопенией, связанный с недостатком альфа-гранул в тромбоцитах и дефицитом белкового наполнения в них, а также с увеличенным размером тромбоцита. При синдроме Пари–Труссо у пациентов также наблюдаются тромбоцитопения, значительное увеличение размера альфа-гранул и нарушения в агрегации тромбоцитов [2–4].

Использование электронной микроскопии – эталон для исследования тромбоцитарных гранул в клинической диагностике [4]. Альтернативные методы анализа гранул, такие как CD62P в проточной цитометрии или использование флуоресцентной микроскопии, не позволяют получить полную информацию о наполнении гранул, а с помощью электронной микроскопии это можно сделать более подробно.

Главными причинами, определяющими сложность метода, являются дороговизна оборудования и трудоемкость процедур пробоподготовки [3, 4]. Совокупность этих факторов приводит к тому, что сейчас в России нет разработанной методики с соответствующим набором стандартных значений, позволяющих не только качественно выявлять, но и количественно оценивать отклонения морфометрических показателей тромбоцитов.

**Целью данного исследования** является разработка метода электронной микроскопии для анализа морфологии тромбоцитов крови.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании были задействованы 20 здоровых доноров крови случайного возраста и пола. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Цельная кровь набиралась в вакуумные пробирки 3 мл с 3,2% цитратом натрия, затем она отстаивалась в вертикальном штативе в течение 60 мин при 37°C для оседания эритроцитов и образования слоя богатой тромбоцитами плазмы.

Собранная богатая тромбоцитами плазма (0,5 мл) добавлялась к раствору глутарового альдегида (9,5 мл) (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) с конечной концентрацией 1,25% в натрий-фосфатном буфере (Sigma-Aldrich, St. Louis, США), фиксация проходила в течение 1 ч. После чего проводилось центрифугирование в течение 5 мин при 1000g для оседания тромбоцитов с последующим удалением плазмы. Затем тромбоциты фиксировались в 1% водном растворе тетраоксида осмия (SPI-Chem, West Chester, PA, США) в течение 1 ч. Далее следовала процедура дегидратации образца в ацетоне (Panreac, Испания), образец последовательно выдерживался по 10 мин в растворах с концентрацией ацетона 30, 50, 70 и 90%. Завершалась дегидратация в 100% ацетоне 3 раза, после чего образец пропитывался смолой Epon 812 (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) с ацетоном в соотношениях 1:2 и 2:1 по 30 мин. Затем образец пропитывался смолой без добавок на ночь при 37°C, далее смола заменялась и образец выдерживался для полимеризации не менее 36 ч при 60°C [5, 6].

После полимеризации блоки нарезались на ультрамикротоме (Leica EM UC7). Толщина срезов составляла порядка 100 нм. Срезы помещались на медные сеточки, покрытые пленкой из 0,5% раствора формвара (SPI-Chem, West Chester, PA, США) в 1,2-дихлорэтаноле (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США). Контрастирование срезов производилось 2% водным раствором ацетата уранила (SPI-Chem, West Chester, PA, США) 30 мин и 3 мин цитратом свинца (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) [7]. Для просмотра образца использовался просвечивающий электронный микроскоп JEM-1011 JEOL.

Измерение морфометрических характеристик проводилось в программе ImageJ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Подбор морфометрических показателей тромбоцитов

Первой задачей исследования было подобрать условия для воспроизводимого получения образцов неактивированных тромбоцитов. Морфология тромбоцитов оказалась очень чувствительна к методике выделения и фиксации клеток. Было установлено, что наилучшее сохранение формы тромбоцитов достигается при фиксации богатой тромбоцитами плазмы, полученной путем оседания эритроцитов в вертикально стоящей пробирке при 37°C за 60 мин. Попытки сконцентрировать живые тромбоциты путем их центрифугирования и осаждения на стенке пробирки часто приводили к серьезным нарушениям формы. Далее были подобраны оптимальные условия заключения образца в смолу, нарезки и контрастирования солями тяжелых металлов.

Были выбраны морфометрические параметры для количественной оценки тромбоцитов:

- 1) площадь тромбоцита в срезе;
- 2) периметр тромбоцита;
- 3) больший диаметр тромбоцита ( $D_{max}$ );
- 4) меньший диаметр тромбоцита ( $D_{min}$ );
- 5)  $D_{max}/D_{min}$ ;
- 6) количество альфа-гранул в тромбоците;
- 7) диаметр альфа-гранул;
- 8) количество альфа-гранул на единицу площади тромбоцита.

На *рисунке 1* показан пример определения альфа-гранул, митохондрий,  $D_{max}$  и  $D_{min}$ . При идентификации митохондрий и альфа-гранул могут быть сложности, так как эти органеллы очень схожи по размерам. Их отличия заключаются в том, что у митохондрий есть кристы, а у гранул внутреннее содержимое более однородно. Способом упростить определение является подбор условий толщины нарезки и времени контрастирования ультратонких срезов. Было установлено, что при толщине срезов 120 нм митохондрии легче отличить от гранул, чем при толщине срезов 100 нм.

Активация тромбоцитов влияет на их морфологию, у тромбоцитов появляются ложноножки, происходит расширение открытой канальцевой системы (ОКС), нарушаются дискообразная форма, централизация гранул. На *рисунке 2* показано сравнение состояний ОКС.

Для качественной оценки степени активации тромбоцитов рассматривались 2 критерия:

- 1) степень расширения ОКС тромбоцита: 0 – закрыта; 1 – каналы расширены;

2) наличие ложноножек: 0 – отсутствуют; 1 – присутствуют.

### Морфометрические характеристики тромбоцитов здоровых доноров

Далее нами были измерены морфометрические характеристики тромбоцитов 20 здоровых доноров (рисунк 3). Каждая точка на графике соответствует усредненному значению для 50–100 тромбоцитов от отдельного донора. Полученные усредненные значения визуализированы в виде «ящика с усами». Средние значения и стандартные отклонения приведены в таблице.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тромбоциты – сложные для экспериментальной работы клетки, так как имеют свойство активироваться от многих факторов, в том числе от механического и температурного воздействия. Важной частью данной работы было получение тромбоцитов с минимально возможными изменениями формы

и строения. Поэтому было отдано предпочтение фиксации богатой тромбоцитами плазмы, полученной с помощью отстаивания пробирки без каких-либо дополнительных манипуляций, которые часто приводят к подактизации тромбоцитов и, как следствие, к изменению их морфометрических характеристик. Полученные морфометрические значения хорошо соотносятся с опубликованными данными других авторов [8].

На основе данных о доле тромбоцитов с расширенной ОКС и наличием ложноножек при дальнейшем увеличении статистики будет выбран порог, при превышении которого потребуется проведение повторного исследования во избежание ошибок.

К другим сложностям описанной методики можно отнести различие митохондрий и альфа-гранул. В нашем исследовании мы оптимизировали методику подготовки образцов и получение изображений путем подбора толщины срезов и длительности контрастирования для улучшения качества дифференцировки. Собственно, различие митохондрий и альфа-гранул проводилось оператором визуально. Приме-

#### Рисунок 1

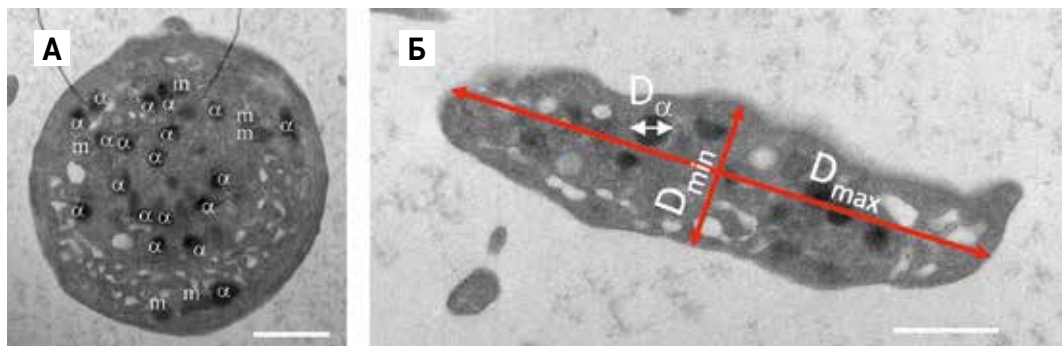
Фотографии тромбоцитов в разных сечениях

Пример измерения морфометрических параметров: А – определение альфа-гранул:  $\alpha$  – альфа-гранулы,  $m$  – митохондрии; Б – измерение  $D_{max}$  и  $D_{min}$ . Масштабный отрезок 1 мкм, электронная просвечивающая микроскопия

#### Figure 1

Microscope images of platelets in different sections

An example of assessing the morphometric parameters of platelets: A – identification of alpha granules:  $\alpha$  – alpha granules,  $m$  – mitochondria; B – measurement of the maximum ( $D_{max}$ ) and minimum ( $D_{min}$ ) diameters. Scale bar: 1  $\mu m$ , transmission electron microscopy



#### Рисунок 2

Иллюстрация нерасширенной (А) и расширенной (Б) ОКС

Тромбоцит с ложноножками (Б). Масштабный отрезок 1 мкм, электронная просвечивающая микроскопия

#### Figure 2

Images showing a non-dilated open canalicular system (OCS) (A) and a dilated OCS (B)

A platelet with pseudopods (B). Scale bar: 1  $\mu m$ , transmission electron microscopy

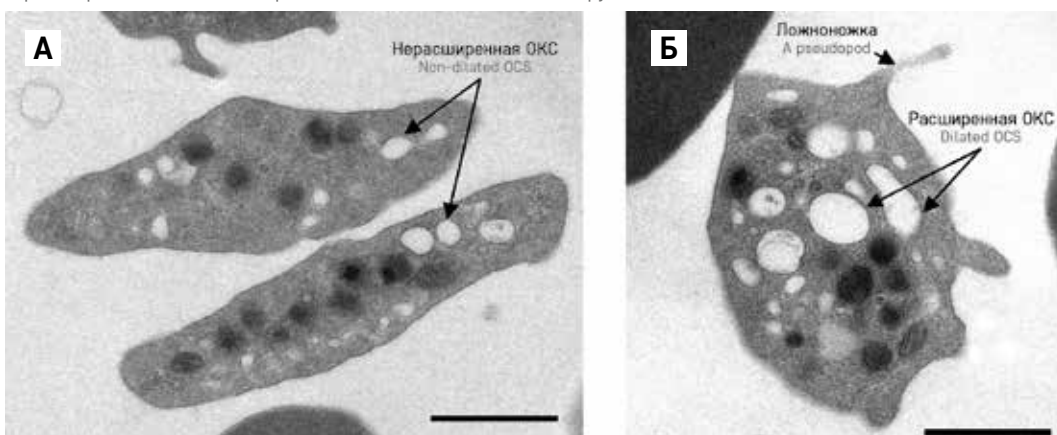


Рисунок 3

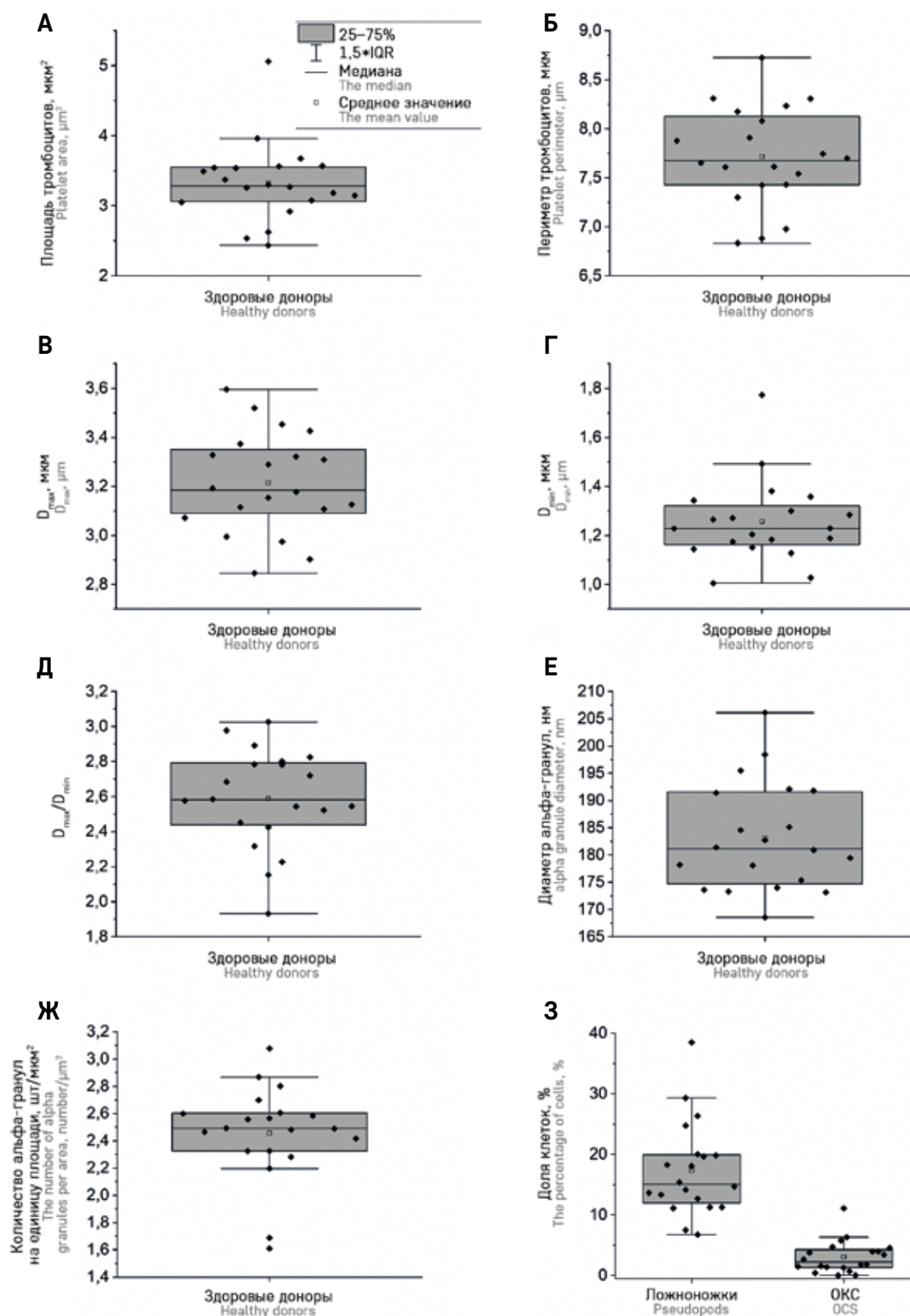
Морфометрические характеристики тромбоцитов 20 здоровых доноров

Каждая точка является средним значением 50–100 тромбоцитов 1 донора. Данные представлены в виде «ящиков с усами», «усы» характеризуют диапазон  $1,5 \cdot \text{IQR}$  (межквартильный размах). А – площадь тромбоцитов; Б – периметр тромбоцитов; В –  $D_{\text{max}}$ ; Г –  $D_{\text{min}}$ ; Д –  $D_{\text{max}}/D_{\text{min}}$ ; Е – диаметр альфа-гранул тромбоцитов; Ж – отношение количества альфа-гранул к площади тромбоцита; З – оценка доли тромбоцитов с образованными ложноножками и расширенной ОКС

Figure 3

The morphometric parameters of platelets obtained from 20 healthy donors

Each point represents a mean value of 50–100 platelets from 1 donor. The data are expressed as the box-and-whisker plots; the whiskers showing the range of the data extend to  $1,5 \cdot \text{IQR}$  (interquartile range). А – platelet area; Б – platelet perimeter; В –  $D_{\text{max}}$ ; Г –  $D_{\text{min}}$ ; Д –  $D_{\text{max}}/D_{\text{min}}$ ; Е – alpha granule diameter; Ж – the number of alpha granules per platelet area; З – the percentage of platelets with pseudopods and dilated OCS





Таблица

Морфометрические характеристики тромбоцитов 20 здоровых доноров

Tables

The size and morphology of platelets from 20 healthy donors

Морфометрический параметр Morphometric parameter	Среднее значение Mean value	Стандартное отклонение Standard deviation
Площадь тромбоцитов, мкм <sup>2</sup> Platelet area, μm <sup>2</sup>	3,6	0,6
Периметр тромбоцитов, мкм Platelet perimeter, μm	7,7	0,5
D <sub>max</sub> , мкм D <sub>max</sub> , μm	3,2	0,2
D <sub>min</sub> , мкм D <sub>min</sub> , μm	1,3	0,2
D <sub>max</sub> /D <sub>min</sub>	2,6	0,3
Диаметр альфа-гранул, нм Diameter of alpha granules, nm	183	10
Количество альфа-гранул на единицу площади, шт/мкм <sup>2</sup> The number of alpha granules per area, number/μm <sup>2</sup>	2,5	0,3

нение нейросетей для морфометрии тромбоцитов позволило бы в будущем автоматизировать этот тест.

Метод трансмиссионной электронной микроскопии позволяет получать информацию, прежде всего, об аномалиях строения тромбоцитов [9], состояния и количества гранул [4]. Стоит отметить, что разработанная методика оценивает только пул альфа-гранул и не может оценить количество плотных гранул из-за их значительно меньшей встречаемости в тромбоците и малой толщины срезов. Одним из вариантов расширения исследования на другие морфометрические показатели может стать изучение плотных гранул. Методика их оценки кардинально отличается от приведенной выше. Тромбоциты без фиксации помещаются под электронный микроскоп. Из-за отсутствия фиксации плотные гранулы быстро деградируют (в течение 1–2 сут) и могут изучаться только при наличии быстрого доступа на электронный микроскоп, что является существенным ограничением.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами был осуществлен выбор морфологических параметров для количественной оценки тромбоцитов и сформирован набор здоровых доноров с получением достоверных интервалов измененных показателей. Для продолжения данной работы планируется пополнение выборки здоровых доноров (в норме), исследование пациентов с нарушениями строения тромбоцитов, формирование соответствующей выборки показателей (в патологии), объединенных единой методикой пробоподготовки, и сравнение их между собой. Это важно как для получения новых научных данных, так и для улучшения качества диагностики редких наследственных заболеваний, связанных с патологиями морфологии тромбоцитов.

При большем количестве наблюдений имеется тенденция к расщеплению выборок по показателям: площадь тромбоцитов, отношение количества гранул к площади тромбоцита.

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность Программе развития МГУ (ПНР 5.13), ЦКП «Субдифракционная микроскопия и спектроскопия» НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и фонду «Наука – детям» за предоставление доступа к оборудованию.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского научного фонда №21-75-00109 и №23-75-10120 (руководитель С.И. Обыденный).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ORCID

Kuznetsova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-7209-945X>

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

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

## Литература / References

- van der Meijden P.E., Heemskerk J.W. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol* 2019; 16 (3):166–79.
- Дёмина И.А., Кумскова М.А., Пантелеев М.А. Тромбоцитопатии. Российский журнал детской гематологии и онкологии 2015; (1): 54–60. DOI: 10.17650/2311-1267-2015-1-54-60 [Demina I.A., Kumsikova M.A., Panteleev M.A. Thrombocytopathy. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2015; 2 (1): 54–60. (In Russ.)].
- Обыденный С.И., Киреев И.И., Пантелеев М.А. Вклад электронной микроскопии в исследование нарушений морфологии тромбоцитов. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2022; 21 (3): 142–6. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-3-142-146 [Obyednyy S.I., Kireev I.I., Panteleev M.A. The electron microscopy contribution to platelet structural pathology investigation. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2022; 21 (3): 142–6. (In Russ.)].
- Фёдорова Д.В., Жарков П.А., Плясунова С.А., Серёгина Е.А., Игнатова А.А. Диагностика врожденных нарушений функций тромбоцитов: современное состояние вопроса. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2017; 16 (1): 83–95. DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-1-83-95 [Fedorova D.V., Zharkov P.A., Plyasunova S.A., Seregina E.A., Ignatova A.A. Modern approach to diagnosis of inherited functional platelet disorders. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2017; 16 (1): 83–95. (In Russ.)].
- Luft J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9 (2): 409.
- Обыденный С.И. Динамика и механизмы образования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов: Дис. ... канд. биол. наук. М., 2019. 105 с. [Obyednyy S.I. Dynamics and the mechanisms of formation of procoagulant platelet subpopulation: Thesis ... Cand. Bio. Sci. M., 2019. 105 p. (In Russ.)].
- 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.
- Stahl K., Themann H., Dame W. R. Ultrastructural morphometric investigations on normal human platelets. *Haemostasis* 1978; 7 (4): 242–51.
- White J.G. Ultrastructural defects in congenital disorders of platelet function. *Ann N Y Acad Sci* 1972; 201 (1): 205–33.