

Интенсивность роста ламеллы как характеристика морфофункционального статуса тромбоцитов человека

М. С. Макаров, к.б.н., с.н.с.

ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н. В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы

Intensity of lamella growth as morphofunctional feature of human platelets

M. S. Makarov

Research Institute of Emergency Care n.a. N. V. Sklifosovsky, Moscow, Russia

Резюме

Цель работы. Исследовать морфофункциональные особенности образования ламеллы в тромбоцитах здоровых людей и пациентов с тромбоцитарными осложнениями. **Материалы и методы.** В работе исследовали тромбоциты доноров крови, пациентов с тромбозами вен нижних конечностей, пациентов с тромбоцитарными осложнениями на фоне глубокой термической травмы. Морфофункциональный анализ проводили с помощью оригинального метода, основанного на витальном окрашивании клеток. **Результаты.** В крови пациентов с тромбозами вен морфофункциональный статус тромбоцитов был повышен, у ожоговых пациентов – резко снижен. Через 10–15 минут адгезии на стекле среди тромбоцитов выявлялись три субпопуляции: тромбоциты без ламеллы, склонные к быстрой дегрануляции (первый тип); тромбоциты с ламеллоподиями (второй тип); тромбоциты с широкой ламеллой, охватывающей весь периметр клетки (третий тип). В крови доноров большинство адгезирующих тромбоцитов первого и второго типов формировали обширную ламеллу через 1–2 часа адгезии, у пациентов с тромбозами вен – через 30–35 минут. При тромбозах вен интенсивный рост ламеллы в адгезирующих тромбоцитах сопровождался быстрой дегрануляцией клеток без ламеллы и образованием агрегатов на стекле. У пациентов с глубокими ожогами тромбоциты очень медленно адгезировали, рост ламеллоподий отмечен менее чем у 20% адгезирующих тромбоцитов. Среди доноров крови выявлена неоднородность по уровню тромбоцитов, способных к быстрому выбросу гранул при контакте с адгезивным субстратом. **Выводы.** Отсутствие роста тромбоцитарной ламеллы может наблюдаться как при низком, так и высоком морфофункциональном статусе тромбоцитов. При тромбозах вен скорость роста ламеллы заметно увеличивается. Среди адгезивно активных тромбоцитов с гранулами существует субпопуляция клеток, способных к быстрому выбросу гранул как при патологии, так и в норме.

Ключевые слова: тромбоциты, гранулы, адгезия, ламелла, дегрануляция.

Summary

Aim. To study morphofunctional properties of platelet lamella's forming in donors and patients with thrombotic disorders. **Materials and methods.** We studied platelets of blood donors, patients with deep venous thrombosis, burned patients with thrombotic disorders. Morphofunctional analysis was performed, using original method, based on cell vital staining. **Results.** In patients with deep venous thrombosis morphofunctional platelet value was enhanced, in burned patients with thrombotic disorders platelet integrity was low. After 10–15 minutes of adhesion on glass spreading platelets maintained 3 subpopulations: cells without lamella, able to fluent granule efflux (1th type); cell with lamellipodias (2th type); cells with wide lamella, covering cell perimeter (3th type). In donors' blood most of spreading platelets formed lamella at 1–2 hours, in patients with deep venous thrombosis this process was noticeably accelerated, estimating 30–35 minutes, what is more, spreading platelets viewed both intensive lamella's growth and rapid degranulation of cells without lamella, followed by aggregation on the glass. Burned patients had significant decay of platelet adhesion, lamella formation was low-identified – less than 20% of spread platelets formed lamellipodias. Among blood donors one could notice heterogeneous level of platelets, capable to rapid granules' release during contact with adhesive substrate. **Conclusion.** The lack of lamella forming may occur both at low and high morphofunctional platelet rate. During deep venous thrombosis lamella's growth velocity was noticeably increased. Among spreading platelets with granules one could find subpopulation of cells, capable to rapid granules' release in norm and pathology.

Key words: platelets, granules, adhesion, lamella, degranulation.

При контакте с адгезивным субстратом в тромбоцитах человека происходит активная реорганизация элементов цитоскелета. В процессе адгезии тромбоциты способны формировать обширную ламеллу по всему периметру клетки [1, 2]. Ламелла значительно расширяет площадь контакта тромбоцитов с субстратом и с другими тромбоцитами, что ускоряет их активацию и образование агрегатов [3]. Таким образом, рост ламеллы влияет на интенсивность функционального ответа всей популяции тромбоцитов. Неспособность тромбоцитов к образованию ламеллы наблюдается как в результате их повреждения, так

и в случае их инактивации на фоне нормальной структурной целостности [9–11]. С другой стороны, гиперактивация тромбоцитов может происходить без активного роста ламеллы [4–7]. Есть данные, что интенсивный рост ламеллы препятствует дегрануляции тромбоцитов, то есть их переходу в необратимо активированное состояние [8]. Благодаря сканирующей электронной микроскопии можно отчетливо видеть, что тромбоциты из одной и той же крови по-разному контактируют с субстратом, имеют неодинаковое число псевдоподий и ламеллоподий через равные промежутки времени [8, 12]. Этот эффект

связывают со стимуляцией или подавлением внутриклеточных сигнальных путей, с типом субстрата, не учитывая морфофункциональные различия тромбоцитов. Стоит подчеркнуть, что в тромбоцитарной популяции неоднородность наблюдается даже среди клеток, имеющих интактную дискоидную форму (дискоциты). Дискоциты различаются не только по линейным размерам, но также по насыщенности гранулами, с разной интенсивностью участвуют в функциональном ответе [11–15]. Можно предположить, что интенсивность роста ламеллы также может отражать особенности морфофункционального статуса тромбоцитов.

Целью настоящей работы было исследовать морфофункциональные особенности образования тромбоцитарной ламеллы в норме и при патологии.

Материалы и методы

Исследовали тромбоциты 40 доноров крови, 15 пациентов с тромбозом вен нижних конечностей, 8 пациентов с тромботическими осложнениями на фоне ожогов II–III степени по МКБ-10 площадью 22–70%, индекс Франка более 30 единиц. Во всех случаях для исследования использовали образцы венозной крови, консервированной с цитратом или ЭДТА. Анализ тромбоцитов проводили с помощью оригинального метода, основанного на витальном окрашивании клеток с последующим их анализом во флуоресцентном микроскопе [10]. В процессе работы определяли следующие параметры: содержание тромбоцитов с гранулами, в процентах (в норме 35–75%); долю больших округлых тромбоцитов, в процентах (клетки ранней стадии активации); долю клеток с обширной ламеллой среди адгезирующих на стекле тромбоцитов, в процентах. Полученные статистические данные обрабатывали с помощью методов вариационной статистики с использованием программы MS Excel 2000. Вычисляли медиану, 1-й и 3-й квартили. Для оценки различий использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия значений считали достоверными при уровне значимости более 95% ($p < 0,05$).

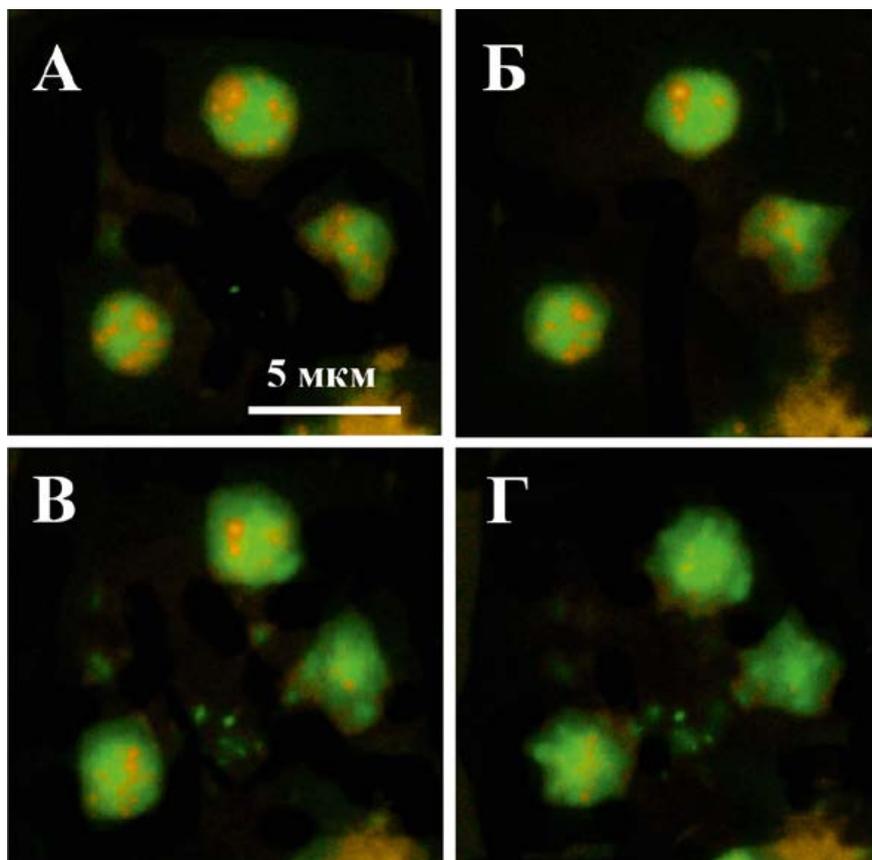


Рисунок 1. Адгезия тромбоцитов доноров на стекле при 37 °С. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым. А – через 5 минут контакта со стеклом (смещение гранул к периферии тромбоцита); Б – через 10 минут (начало дегрануляции); В – через 15 минут (формирование ламеллоподий); Г – через 30 минут (полная дегрануляция).

Результаты и обсуждение

В крови доноров доля тромбоцитов с гранулами составила 52% [43; 58], доля больших округлых тромбоцитов – 20% [18; 21]. У пациентов с венозными тромбозами значения этих параметров были увеличены ($p < 0,05$), составляя соответственно 86% [80; 90] и 28% [23; 30]. Напротив, у ожоговых пациентов тромбоциты имели очень низкий

морфофункциональный статус: доля тромбоцитов с гранулами составила 5% [3; 8], доля больших округлых тромбоцитов – 8% [7; 10]. Стоит особо отметить, что в крови ожоговых пациентов значительная часть больших округлых тромбоцитов (70–90%) не содержала гранул и не проявляла адгезивной активности. В литературе описана повышенная склонность больших округлых

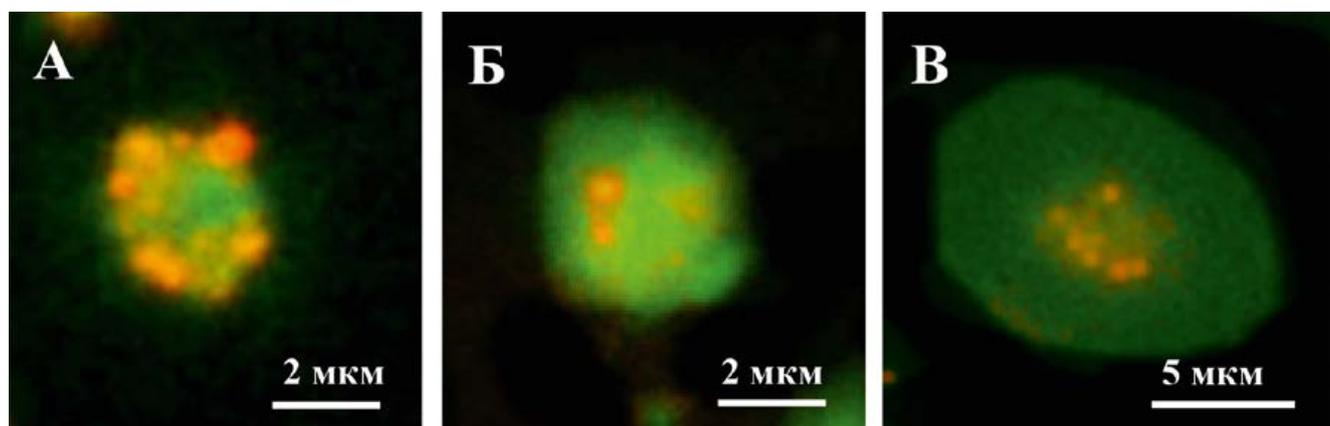


Рисунок 2. Разная интенсивность роста ламеллы в адгезирующих тромбоцитах человека после 10–15 минут контакта со стеклом. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым. А – тромбоцит без ламеллы; Б – тромбоцит с умеренным ростом ламеллы; В – тромбоцит с сильным ростом ламеллы.

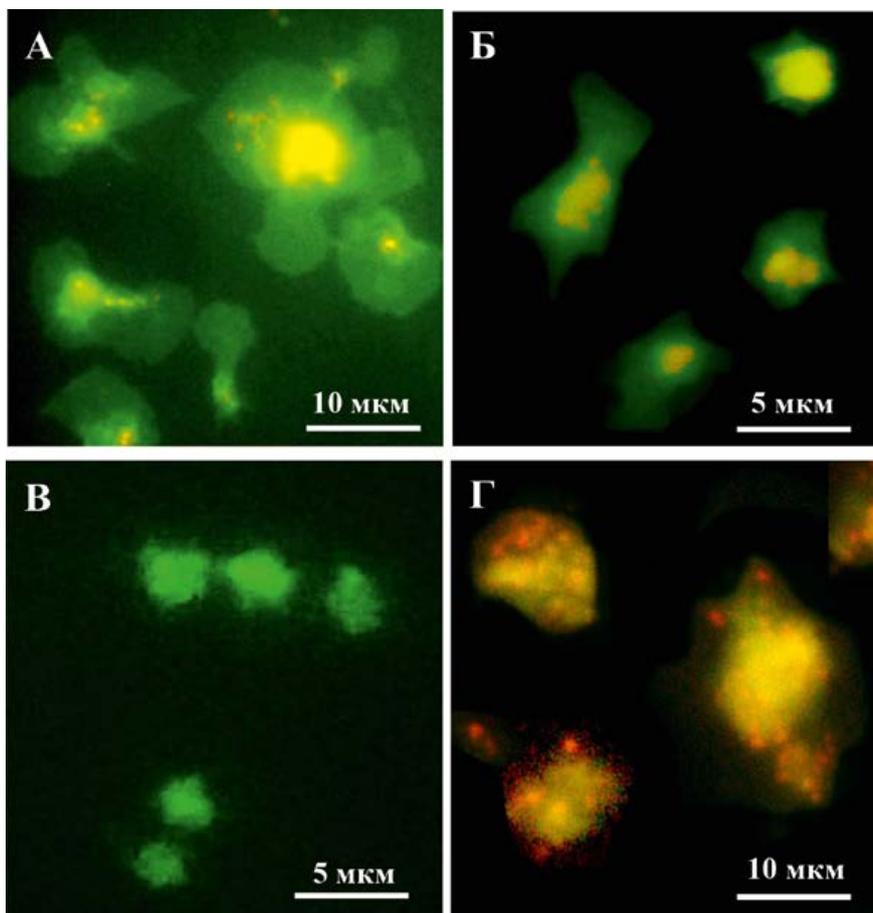


Рисунок 3. Адгезирующие тромбоциты доноров и пациентов с тромботическими осложнениями. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым. А – тромбоциты доноров крови через 1 час контакта со стеклом; Б – тромбоциты пациентов с тромбозами вен нижних конечностей через 10 минут контакта со стеклом; В – тромбоциты ожоговых пациентов с тромботическими осложнениями через 1 час контакта со стеклом; Г – образование мелких агрегатов в крови пациентов с тромбозами вен через 15 минут после нанесения на стекло.

тромбоцитов к спонтанной активации и быстрой адгезии [5, 6, 9]. Однако при исследовании адгезии тромбоцитов на стекле скорость роста ламеллы не зависела от исходных размеров тромбоцита. По нашим данным, смещение гранул и образование выростов цитоплазмы в нормальных тромбоцитах начинается через 5–10 минут с момента контакта с предметным стеклом при 37 °С (рис. 1 А, Б). При этом псевдоподии и ламеллоподии нередко формировались уже после выхода части гранул за пределы тромбоцитов (рис. 1 В). Через 30 минут адгезии тромбоциты доноров выбрасывали практически весь объем гранул, их псевдоподии и ламеллоподии были отчетливо видны при витальном окрашивании (рис. 1 Г). Размер и количество цитоплазматических выростов заметно отличались у разных клеток. Морфофункциональное исследование тромбоцитов, контактировавших со стеклом в течение 10–15 минут,

позволило выявить три субпопуляции: первый тип – тромбоциты без широких выростов цитоплазмы (ламеллоподий), которые имели лишь узкие псевдоподии, но при этом очень быстро смещали гранулы к клеточной границе (рис. 2 А); второй тип – тромбоциты, образующие ламеллу на определенном участке клетки, но не по всему периметру (рис. 2 Б); третий тип – тромбоциты с выраженной, очень широкой ламеллой, охватывающей весь периметр клетки (рис. 2 В). В адгезирующих тромбоцитах первого и второго типа основная часть выявляемых гранул расположена вдоль клеточной границы или даже частично выходит за ее пределы. Напротив, в тромбоцитах третьего типа основной объем гранул сосредоточен в центральной части клетки, в зоне так называемого грануломера. Через 10–15 минут адгезии на стекле доля тромбоцитов третьего типа была невысокой у всех доноров

и составляла 10% [9; 14]. Соотношение клеток первого и второго типа могло заметно варьировать у разных доноров, однако во всех случаях подавляющее большинство тромбоцитов с гранулами через 10–15 минут контакта со стеклом не формировали ламеллы по всему периметру клетки. С другой стороны, в процессе длительной экспозиции на стекле при 37 °С (30 минут и более) тромбоциты первого и второго типа постепенно формировали широкую ламеллу. У доноров крови через 1–2 часа контакта со стеклом практически все адгезирующие тромбоциты были клетками третьего типа (рис. 3 А), их доля составляла 92% [90; 94]. У пациентов с венозными тромбозами рост ламеллы происходил быстрее – уже через 15 минут контакта со стеклом 59% тромбоцитов имели выраженные ламеллоподии (рис. 3 Б), а через 30–35 минут практически все такие тромбоциты образовывали широкую ламеллу по всей клеточной границе. Напротив, у пациентов с ожогами рост ламеллы был выражен крайне слабо, через 1 час контакта со стеклом ламеллоподии формировали лишь 17% [15; 18] от всех адгезирующих клеток, подавляющее большинство тромбоцитов имели немногочисленные псевдоподии (рис. 3 В). Неспособность таких тромбоцитов к росту ламеллы может быть обусловлена проводимой антиагрегантной терапией. Стоит особо отметить, что адгезирующие тромбоциты первого типа (без ламеллоподий) через 10–15 минут с момента адгезии могли образовывать мелкие агрегаты, в составе которых клетки очень быстро дегранулировались. Этот эффект наблюдался у большинства пациентов с тромбозами вен (рис. 3 Г), однако аналогичную картину можно было видеть и у доноров крови. При этом быстро дегранулирующие клетки встречались как среди больших округлых тромбоцитов, так и среди дискоцитов. В крови доноров адгезирующие тромбоциты первого типа выделяли все гранулы в течение 12–18 минут с момента контакта со стеклом на фоне отсутствия роста ламеллы. У 70% обследованных доноров доля таких клеток среди всех адгезирующих тромбоцитов варьировала от 8 до 13%, у 20% – от 14 до 20%, у 5% – от 21 до 30%, и еще

у 5% – от 31 до 40%. Таким образом, среди доноров наблюдается явная неоднородность по уровню тромбоцитов, способных к быстрому выбросу гранул в процессе адгезии. Примечательно, что такие тромбоциты изначально не имели морфофункциональных отличий от других тромбоцитов с гранулами. Показано, что и у пациентов, и у здоровых людей чувствительность тромбоцитов к индукторам активации может сильно варьировать. Так, среди здоровых людей существуют субпопуляции с повышенной чувствительностью тромбоцитов к низким дозам АДФ и адреналина, с увеличенным числом рецепторов адгезии, с высокой склонностью к спонтанной активации *in vitro* [16–20]. Полиморфизмы рецепторных белков $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha 2\beta 3$ повышают риск тромбоза, развития инфаркта миокарда и острого коронарного синдрома [14, 20, 21]. При этом неизвестно, есть ли связь между повышенной чувствительностью тромбоцитов к индукторам активации и высокой скоростью роста ламеллы. У пациентов с тромботическими осложнениями часто увеличены линейные размеры циркулирующих тромбоцитов [4–6], однако стоит подчеркнуть, что большие округлые тромбоциты в циркулирующей крови изначально не имеют ламеллоподий и образуют их только в процессе контакта с адгезивным субстратом. С другой стороны, при адгезии в таких тромбоцитах нередко наблюдается быстрый выброс гранул даже без образования псевдоподий. Есть данные, что дегрануляция и рост ламеллы в тромбоцитах не могут быть инициированы одновременно [8, 12]. Это может объяснить эффект, при котором тромбоциты с большой ламеллой дегранулируют дольше, чем тромбоциты без ламеллы. У пациентов, принимающих препараты – блокаторы рецепторов активации, тромбоциты слабо адгезируют на стекле и рост ламеллы заметно снижен [11]. С другой стороны, подавление роста ламеллы не исключает вероятности быстрой дегрануляции тромбоцитов, с учетом того, что тромбоциты могут быть активированы многими способами [3, 4, 22]. Выявление рисков спонтанной

активации тромбоцитов в настоящее время стоит весьма остро [23]. Существуют инструментальные подходы к решению этой проблемы, при этом известные методики часто не позволяют охарактеризовать морфофункциональный статус тромбоцитов [7, 15, 23]. Мониторинг интенсивности роста ламеллы может дать дополнительную информацию о склонности тромбоцитов к спонтанной активации с учетом их морфофункциональных свойств.

Заключение

Среди тромбоцитов с гранулами выявлена неоднородность по интенсивности образования ламеллы в ходе адгезии на стекле. Тромбоциты, склонные к быстрой дегрануляции, имеют низкую активность ламеллообразования. У пациентов с тромбозами вен нижних конечностей при адгезии тромбоцитов наблюдается одновременно интенсивный рост ламеллы и быстрая дегрануляция клеток без образования агрегатов на стекле. У пациентов с глубокими ожогами образование тромбоцитарной ламеллы происходит очень медленно и лишь у незначительной части адгезирующих тромбоцитов. Содержание в крови тромбоцитов, способных к быстрому выбросу гранул в процессе адгезии, у разных людей может сильно варьировать.

Список литературы

1. Васильев С. А., Виноградов В. Л., Карабудагова З. К. Структура и функции тромбоцитов // *Гематология и трансфузиология.* – 2010. – Том 55, № 5. – С. 4–9.
2. Мазуров А. В. Физиология и патология тромбоцитов. – М.: Литерра, 2011. – 248 с.
3. Шиффман Ф. Дж. Патифизиология крови. Пер. с англ. Н. Б. Серебряная, В. И. Соловьев. – М.: Бином, 2016. – 448 с.
4. Feng Y., Yu M., Zhu F., Zhang S., Ding P., Wang M. IL-9 Promotes the development of deep venous thrombosis by facilitating platelet function // *Thromb Haemost.* – 2018. – Vol. 118, № 11. – P. 1885–1894.
5. Icli A., Aksoy F., Turker Y., Uysal B. A., Alpaly M. F., Dogan A., Nar G., Varol E. Relationship between mean platelet volume and pulmonary embolism in patients with deep vein thrombosis // *Heart Lung Circ.* – 2015. – Vol. 24, № 11. – P. 1081–1086.
6. Борисов В. С. Венозные тромбозмобилические осложнения при термической травме // *Неотложная медицинская помощь. Журнал им. Н. В. Склифосовского.* – 2016. – № 4. – С. 37–41.
7. Podoplelova N. A., Sveshnikova A. N., Kotova Y. N., Eckly A., Receveur N., Nechipurenko D. Y., Obyednyy S. I., Kireev I. I., Gachet C., Ataullakhanov F. I., Mangin P. H., Panteleev M. A. Coagulation factors bound to

procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting // *Blood.* – 2016. – Vol. 128, № 13. – P. 1745–1755.

8. Bye A. P., Unsworth A. J., Gibbins J. M. Screening and High-Throughput Platelet Assays // *Methods Mol Biol.* – 2018. – Vol. 1812. – P. 81–94.
9. Колосова Е. И., Василенко И. А., Ковалева Л. Г. Оценка морфофункционального состояния тромбоцитов у больных идиопатической тромбоцитопенической пурпурой методом компьютерной морфометрии // *Бюллетень СО РАМН.* – 2011. – Том 31, № 2. – С. 58–63.
10. Макаров М. С., Хватов В. Б., Кобзева Е. Н., Боровкова Н. В., Высочин И. В. Морфофункциональный анализ тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2013. – № 9. – С. 388–391.
11. Макаров М. С. Особенности морфофункционального статуса тромбоцитов человека в норме и патологии. Дис. ... канд. биол. наук: 14.01.21 – Гематология и переливание крови / НИИ СП им. Н. В. Склифосовского. – М. 2014. – 124 с.
12. Kuchay S. M., Wieschhaus A. J., Marinkovic M., Herman I. M., Chishiti A. H. Targeted gene inactivation reveals a functional role of calpain-1 in platelet spreading // *J Thromb Haemost.* – 2012. – Vol. 10, № 6. – P. 1120–1132.
13. Welsh JD, Poventud-Fuentes I, Sampietro S, Diamond SL, Stalker TJ, Brass LF. Hierarchical organization of the hemostatic response to penetrating injuries in the mouse macrovasculature // *J Thromb Haemost.* – 2017. – Vol. 15. – P. 526–537.
14. Gurbel PA, Tantry US. Do platelet function testing and genotyping improve outcomes in patients treated with anti-thrombotic agents? // *Circulation.* – 2012. – Vol. 125. – P. 1276–1287.
15. Vagdatli E., Gounari E., Lazaridou E., Katsibourlia E., Tsikopoulou F., Labrianou I. Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation // *Hipokratia.* – 2010. – Vol. 14, № 1. – P. 28–32.
16. Зайцева Г. А., Ковтунова М. Е., Исаева Н. В., Матрохина О. И., Ивашкина Е. П. Показатели гемостаза у различных категорий доноров // *Вестник службы крови России.* – 2013. – № 4. – С. 20–22.
17. Момот А. П., Баркаган З. С. Исследование системы гемостаза у лиц пожилого возраста: основные цели и методы // *Клиническая геронтология.* – 2007. – Том 13, № 4. – С. 44–49.
18. Варламова С. В., Калинин Н. Н., Егорова М. О., Грибкова И. В., Шурхина Е. С., Шмаров Д. А., Ватагина Е. А., Мигунов В. Н., Городецкий В. М. Дополнительные критерии оценки состояния здоровья доноров аппаратного тромбоцитафереза // *Гематология и трансфузиология.* – 2014. – Том 59, № 1. – С. 19–25.
19. Lindkvist M., Fernberg U., Ljungberg LU, Fåliker K, Fernström M, Hurtig-Wennlöf A, Grenegård M. Individual variations in platelet reactivity towards ADP, epinephrine, collagen and nitric oxide, and the association to arterial function in young, healthy adults // *Thromb Res.* 2019. – Vol. 174. – P. 5–12.
20. Хаспекова С. Г., Сироткина О. В., Шиманова Ю. В., Мазуров А. В. Вариации содержания гликопротеина IIb-IIIa ($\alpha 2\beta 3$ интегрина) у здоровых доноров. Влияние на агрегационную активность тромбоцитов и эффективность действия аспирина // *Биомедицинская химия.* – 2008. – Том 54, № 3. – С. 361–371.
21. Зотова Т. Ю., Мяндина Г. И., Фролов В. А., Комарова А. Г., Зотов А. К. Влияние полиморфизма гена ITGB3 на частоту развития артериальной гипертензии у больных с острым коронарным синдромом // *Клиническая медицина.* – 2013. – Том 91, № 8. – С. 22–24.
22. Макаров М. С. Неканонические способы активации тромбоцитов человека // *Медицинский алфавит. Современная лаборатория.* – 2015. – Том 3, № 11. – С. 30–35.
23. Рахматуллина Д. М. Методы определения спонтанной агрегации тромбоцитов // *Вестник современной медицины.* – 2017. – Том 10, № 3. – С. 60–65.