

СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРОМБОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТАРНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ

© А. А. Пономарева,^{1,2} Т. А. Невзорова,² Э. Р. Мордаханова,²
И. А. Андрианова,² Р. И. Литвинов²

¹ Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, 420111,
и ² Институт фундаментальной медицины и биологии
Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань, 420012;
¹ электронный адрес: na.ponomareva@mail.ru

Тромбоциты представляют собой безъядерные клетки крови, обеспечивающие вместе с фибрином остановку кровотечения (гемостаз). Клеточные микровезикулы — это микроскопические частицы, выделяемые во внеклеточное пространство при активации и (или) апоптозе клеток разных типов. Тромбоцитарные микровезикулы образуют основную популяцию циркулирующих микровезикул крови и играют важную роль в реакциях гемостаза, тромбоза и многих других (пато)физиологических процессах. Несмотря на большое число работ, посвященных функции тромбоцитарных микровезикул, механизмы их образования и детали строения остаются малоизученными. В настоящей работе исследована ультраструктура исходных тромбоцитов и микровезикул, образующихся *in vitro* из покоящихся клеток и тромбоцитов, активированных арахидоновой кислотой, АДФ, тромбином и кальциевым ионофором А23187. По результатам трансмиссионной электронной микроскопии тромбоцитов человека и изолированных микровезикул проведен анализ внутриклеточного происхождения, этапов формирования, структурного разнообразия и размеров микровезикул. Показано, что тромбин в отличие от других активаторов не только стимулирует микровезикуляцию плазматической мембраны, но и вызывает распад клеток с образованием субклеточных частиц, размеры которых сопоставимы с размерами микровезикул из наружной мембраны клеток. Часть таких микрочастиц содержит клеточные органеллы, окруженные тонкой оболочкой. Размеры выделенных микровезикул варьируют от 30 до 500 нм, однако их распределение по размерам зависит от природы активирующего стимула. Полученные результаты содержат новую информацию о формировании тромбоцитарных микровезикул и их структурном разнообразии, что важно для понимания их многочисленных функций в норме и при патологии.

Ключевые слова: тромбоциты, микровезикулы, активация тромбоцитов, ультраструктура клеток, электронная микроскопия.

Принятые сокращения: МВ — микровезикулы, ОСК — открытая система канальцев, ПКС — программируемая клеточная смерть.

Активация или апоптоз клеток разных типов, включая тромбоциты, какими бы (пато)физиологическими стимулами они ни вызывались, сопровождаются образованием микроскопических внеклеточных структур, называемых микровезикулами (МВ) или микрочастицами (Burnouf et al., 2014). Наиболее очевидным свойством тромбоцитарных МВ является их прокоагулянтный эффект, т. е. способность ускорять свертывание крови благодаря сборке теназного и протромбиназного комплексов на их поверхности (Zwicker, 2008). Способность МВ ускорять образование тромбина объясняет их важную роль при патологических состояниях, сопровождающихся гемостатическими и тромбоцитарными нарушениями (Nomura, Shimizu, 2015). Кроме того, тромбоцитарные МВ участвуют в реакциях иммунитета, воспаления, ангиогенеза, регенерации, метастазирования и др. (Thushara et al., 2015; Varon, Shai, 2015). В связи с патогенетическим значением тромбоцитарные МВ привлекают внима-

ние врачей как биологические маркеры (Owens, Mackman, 2011; Ayers et al., 2014). Несмотря на растущее число публикаций по МВ, в том числе тромбоцитарным, информация о механизмах их образования, молекулярном составе, строении и биологических свойствах остается неполной.

В настоящей работе изучены морфологические основы формирования тромбоцитарных МВ и их структурная характеристика.

Материал и методика

Тромбоциты выделяли из крови здоровых доноров, которые не принимали лекарственных препаратов в течение 2 нед до взятия крови (с разрешением этической комиссии Казанской государственной медицинской академии № 2/2012). Плазму, богатую тромбоцитами, по-

лучали центрифугированием цельной цитратной крови при 200 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Тромбоциты из плазмы выделяли гель-фильтрацией на Сефарозе 2В (GE Healthcare, Швеция), уравновешенной буфером Тироде (4 mM HEPES, 135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2.4 mM KCl, 2.4 mM MgCl₂, 5.6 mM D-глюкозы, 3.3 mM NaH₂PO₄ и 0.35 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, pH 7.4).

Подсчет тромбоцитов проводили в камере Горяева под микроскопом PrimoStar (Zeiss, Германия) при увеличении объектива 40×. Тромбоциты использовали в течение 3 ч после взятия крови. Жизнеспособность клеток, определяемая по сохранению митохондриального потенциала с помощью проточной цитометрии и флуоресцентного красителя MitoTracker DeepRed FM (Invitrogen, США), составляла ~97 %.

Контрольные тромбоциты (45 млн клеток в 560 мкл буфера Тироде) инкубировали при 37 °С в течение 60 мин (покоящиеся тромбоциты). Для активации к тромбоцитам добавляли 50 мкМ арахидоновой кислоты, 5 мкМ АДФ или 1 ед./мл тромбина с последующей инкубацией при 37 °С в течение 60 мин. Конечный объем каждого образца составлял 560 мкл с концентрацией клеток ~80 млн/мл.

Трансмиссионная электронная микроскопия тромбоцитарных препаратов. Сразу после инкубации к суспензии тромбоцитов добавляли глутаровый альдегид до конечной концентрации 2 %, инкубировали 30 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 1500 g в течение 5 мин. Осадок промывали буфером Тироде с pH 7.4. Постфиксировали образцы 1%-ным раствором тетроксид осмия на том же буфере, содержащем сахарозу (25 мг/мл), в течение 2 ч. Далее образцы дегидратировали в этиловом спирте с восходящей концентрацией (30, 40, 50, 60, 70 и 96 % по объему), затем в ацетоне и окиси пропилене. Заливочной средой служил Эпон-812. Полимеризовали образцы в течение 3 сут, увеличивая температуру от 37 до 60 °С. Срезы получали на ультрамикротоме LKB-III (Швеция). Контрастировали срезы насыщенным раствором водного уранил-ацетата 10 мин при 60 °С, а затем 10 мин водным раствором цитрата свинца. Препараты исследовали на электронном микроскопе Jem-1200 EX (Jeol, Япония).

Получение и электронная микроскопия изолированных тромбоцитарных МВ. Для стимуляции образования МВ к тромбоцитам, свежесыведенным методом гель-фильтрации и находящимся в буфере Тироде при комнатной температуре, добавляли 15 мкМ кальциевого ионофора А23187 или 1 ед./мл тромбина с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 15 мин. Конечный объем каждого образца составлял 300 мкл и содержал 1.5 млн тромбоцитов. Сразу после инкубации клетки отделяли центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин. Для удаления клеточного дегриза надосадок дополнительно центрифугировали 10 мин при 7000 g. 20 мкл надосадочной фракции, содержащей суспензию МВ, наносили на сеточки для электронной микроскопии с подложкой 2%-ного Collodion (EMS, США) и подсушивали на воздухе. Контрастировали препарат насыщенным водным раствором уранилацетата 15—20 с с последующим высушиванием. Препараты изучали на электронном микроскопе Jem-1200 EX (Jeol, Япония).

Результаты

Ультраструктурная характеристика покоящихся тромбоцитов. Покоящиеся (неактивированные) тромбоциты в зависимости от проекции имели дисковидную или округлую форму. Средние линейные размеры округлых клеток составляли 2—3 мкм, вытянутых дисковидных клеток — 3 мкм по длинной оси и 0.8—1.2 мкм по короткой оси (рис. 1, а, б).

Центральная часть покоящихся тромбоцитов содержала несколько видов гранул — α-гранулы, плотные тела (δ-гранулы), лизосомы (λ-гранулы) и микропероксисомы. Самыми многочисленными были электронно-плотные α-гранулы округлой формы. Их диаметр варьировал в пределах 300—500 нм. Плотные гранулы имели меньший диаметр — 200—300 нм. Для них была характерна более темная центральная область, которая окружена светлым ореолом. В покоящихся тромбоцитах в небольшом количестве встречались лизосомы в виде пузырьков диаметром 175—200 нм и микропероксисомы в виде гранул диаметром примерно 90 нм. Гранулы гликогена были или хаотично расположены в цитоплазме, или образовывали скопления в виде мелкозернистых участков тела тромбоцита. Открытая система канальцев (ОСК) была представлена небольшими многочисленными вакуолями и извилистыми каналами. Канальцы образовывали разветвленную систему, пронизывающую тело тромбоцита, и могли непосредственно открываться на поверхности цитоплазматической мембраны (рис. 2, в). Тромбоциты имели мелкие митохондрии округлой формы с электронно-плотным матриксом и единичными кристами (рис. 1, б).

Ультраструктурная характеристика активированных тромбоцитов. Активация тромбоцитов сопровождалась значительными морфологическими изменениями, характер которых зависел от природы стимула. Под воздействием арахидоновой кислоты (рис. 1, в) поверхность тромбоцитов становилась извилистой за счет инвагинаций плазматической мембраны и образования тонких выростов — псевдоподий. Размеры тела тромбоцитов не изменялись. Происходила вакуолизация клеток за счет увеличения просвета каналов ОСК с образованием вакуолей разных размеров. Большинство вакуолей содержало различные включения — α-гранулы, δ-гранулы, мембранные компоненты и рыхлые мелкозернистые включения. Образование вакуолей извилистой формы, вероятно, происходило в результате укрупнения и слияния канальцев.

Аналогичные морфологические признаки активации тромбоцитов наблюдали при действии АДФ (рис. 1, г). Тромбоциты образовывали псевдоподии разной длины, увеличивалось число вакуолей, которые также могли содержать различные включения. В клетках четко определялась зона скопления гранул гликогена, площадь которой могла занимать до половины всей клетки.

Самые значительные изменения в ультраструктуре тромбоцитов происходили при инкубации с тромбином. Плазматическая мембрана тромбоцитов образовывала глубокие инвагинации и складки, что приводило к появлению «амебоподобных» тромбоцитов и дальнейшему распаду тела тромбоцита на фрагменты (рис. 1, д). Цитоплазма клеток становилась более электронно-плотной по сравнению с контрольными, неактивированными, клетками и почти не содержала секреторных гранул. Все тело тромбоцитов было пронизано извилистыми и узкими каналами открытой системы с выходом на поверхность клетки.

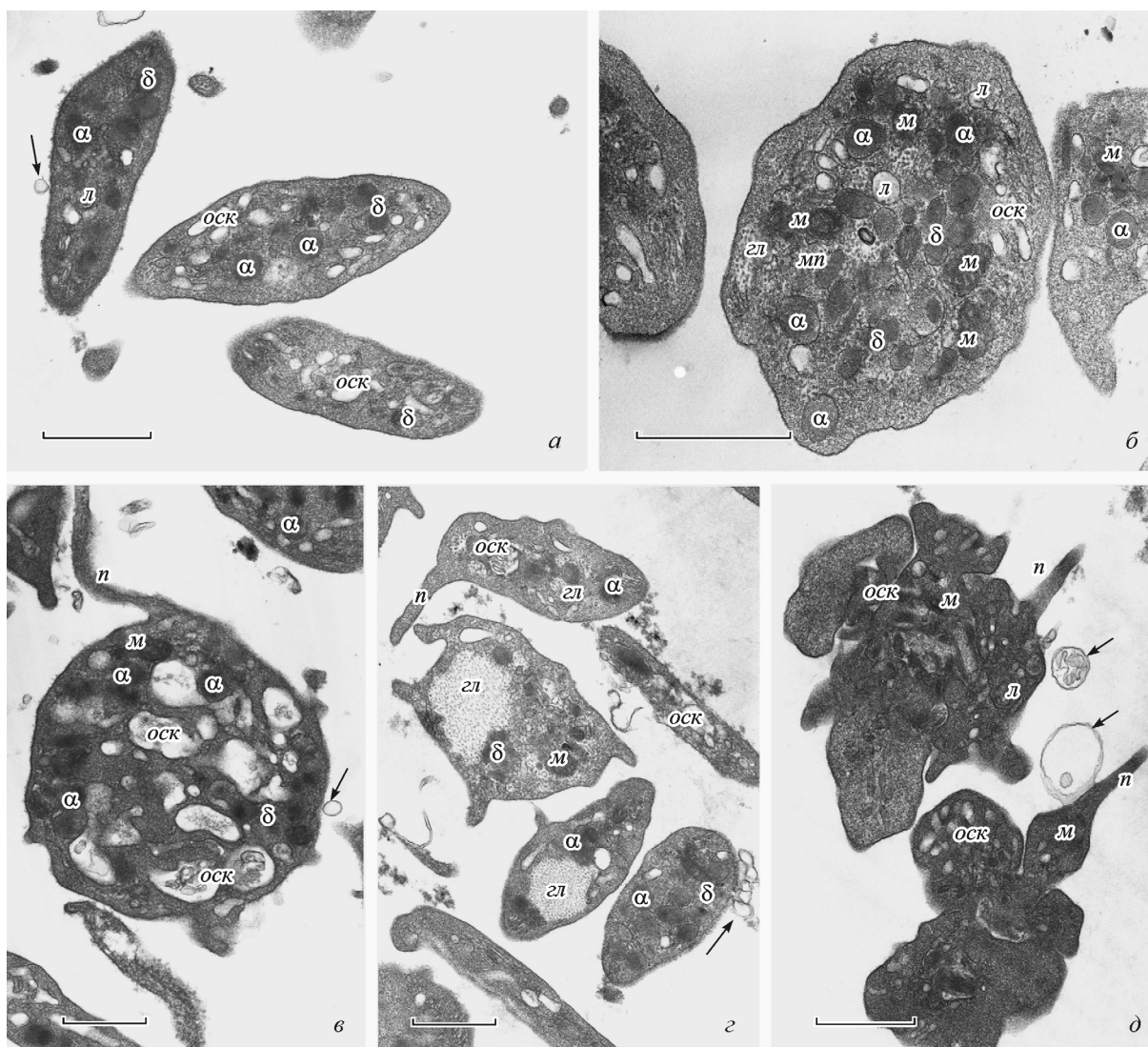


Рис. 1. Ультраструктура покоящихся тромбоцитов (а, б), а также активированных арахидоновой кислотой (в), АДФ (г) или тромбином (д).

α — α -гранулы, δ — δ -гранулы, $гл$ — гранулы гликогена, $л$ — лизосома, $м$ — митохондрия, $мп$ — микропероксисома, $оск$ — открытая система канальцев, $п$ — псевдоподия. Стрелками указаны микровезикулы. Масштабные отрезки — 1 мкм.

Фрагменты распавшегося тромбоцита имели очень разные размеры и форму и содержали внутриклеточные компоненты, включая органеллы (рис. 2, г).

Формирование тромбоцитарных МВ. При микроскопировании тромбоцитов мы обнаружили большое количество МВ, образуемых клетками, как в состоянии покоя, так и при активации. В большинстве случаев МВ образовывались за счет выпячивания плазматической мембраны с последующим отпочкованием и высвобождением в окружающую среду. МВ отделялись от поверхности тела тромбоцита, от псевдоподий, а также формировались с участием открытой системы канальцев (рис. 2, а–в).

Стадии формирования и отделения МВ от тела тромбоцита представлены на рис. 2, а-1—а-4. Хорошо видно, что сначала происходит выпячивание плазматической мембраны, затем зона контакта с телом тромбоцита уменьшается, края выпуклой мембраны смыкаются, образуются перетяжка и шаровидный пузырек. В результате новообразованная МВ отделяется от тела тромбоцита. Образование МВ может происходить и на конце псевдо-

подии и также за счет выпячивания плазматической мембраны. Структура новообразующейся МВ может быть как простой, т. е. представлять собой пузырек, ограниченный одинарной мембраной, так и более сложной, когда внутри крупной везикулы располагаются более мелкие везикулы (рис. 2, б; 3, г).

Другие механизмы формирования МВ возможны при участии открытой системы канальцев тромбоцитов. На рис. 2, в, г показано выделение в окружающую среду внутриклеточных гранул и образование МВ из каналов ОСК. Просвет канала непосредственно открывается на поверхность клетки, что позволяет выводить наружу содержимое цитоплазмы (рис. 2, в, увеличенный фрагмент). Во втором случае, при активации тромбином, взаимодействие каналов ОСК с плазмалеммой приводит к глубоким инвагинациям и обособлению части цитоплазмы в отдельные фрагменты, что приводит к фрагментации тела тромбоцита (рис. 2, г-1, г-2).

Структурная гетерогенность тромбоцитарных МВ. МВ тромбоцитарного происхождения ока-

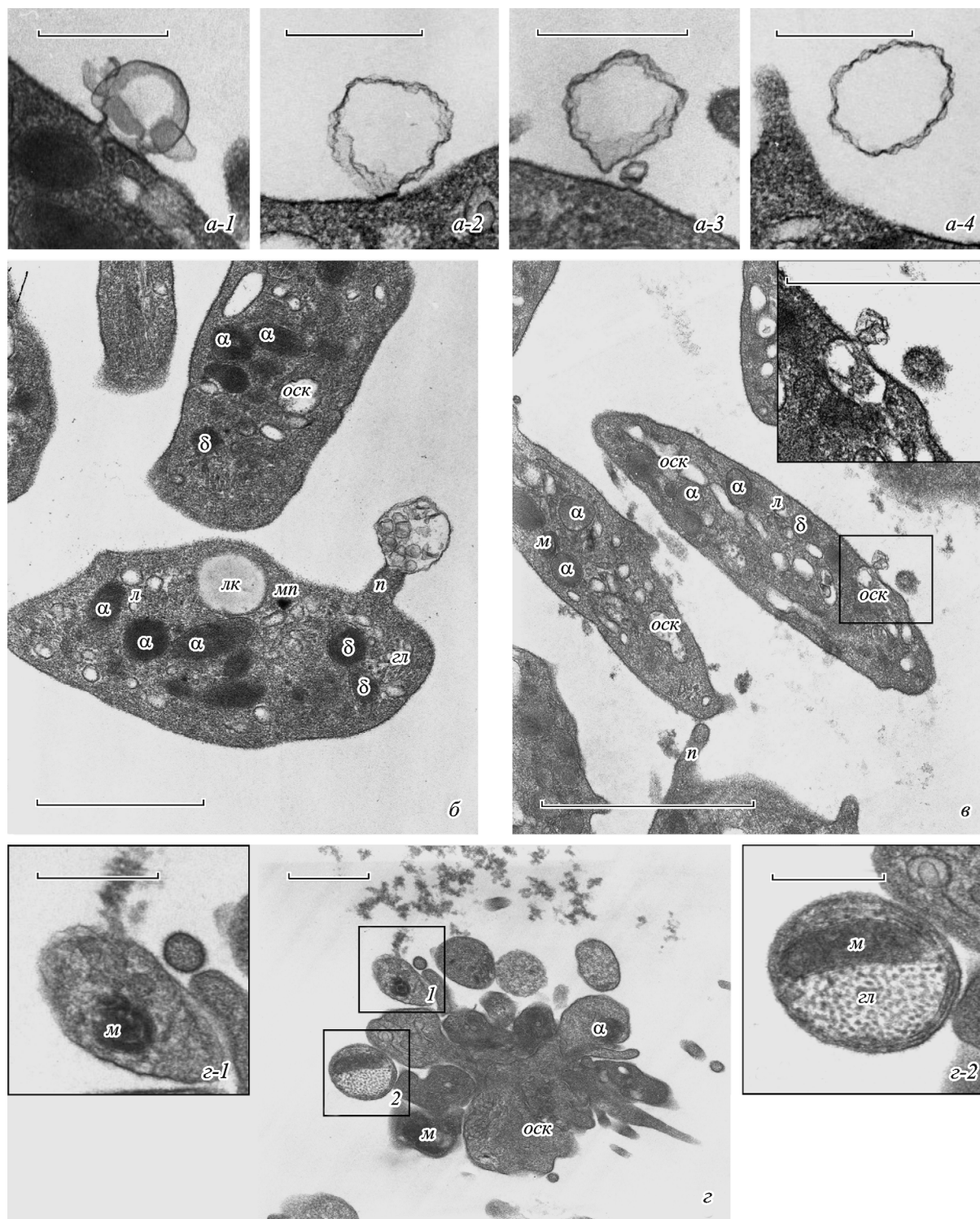


Рис. 2. Происхождение тромбоцитарных микровезикул (МВ).

a-1—a-4 — последовательные стадии формирования МВ путем отделения от плазматической мембраны тела тромбоцита; *б* — образование МВ на конце псевдоподии; *в* — высвобождение МВ из открытой системы канальцев; *г* — распад тромбоцита после активации тромбином на везикулы, содержащие митохондрию (*г-1*) или гранулы гликогена и митохондрию (*г-2*). лк — липидная капля; остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Масштабные отрезки — 500 (*a*, все вставки) и 1000 (*б—г*) нм.

зались весьма разнородными по структуре. По строению их можно разделить на следующие группы: 1) МВ, ограниченные одинарной мембраной; 2) МВ, состоящие из нескольких мембранных слоев (многослойные МВ); 3) мультивезикулярные частицы; 4) микрочастицы, образовавшиеся вследствие фрагментации тромбоцита

(рис. 3). Мы наблюдали образование всех перечисленных типов МВ из активированных тромбоцитов и только первых трех типов из покоящихся клеток. Наиболее часто встречались МВ, ограниченные одинарной мембраной и имеющие электронно-прозрачное содержимое. Такие МВ образовывались из плазматической мембраны и имели

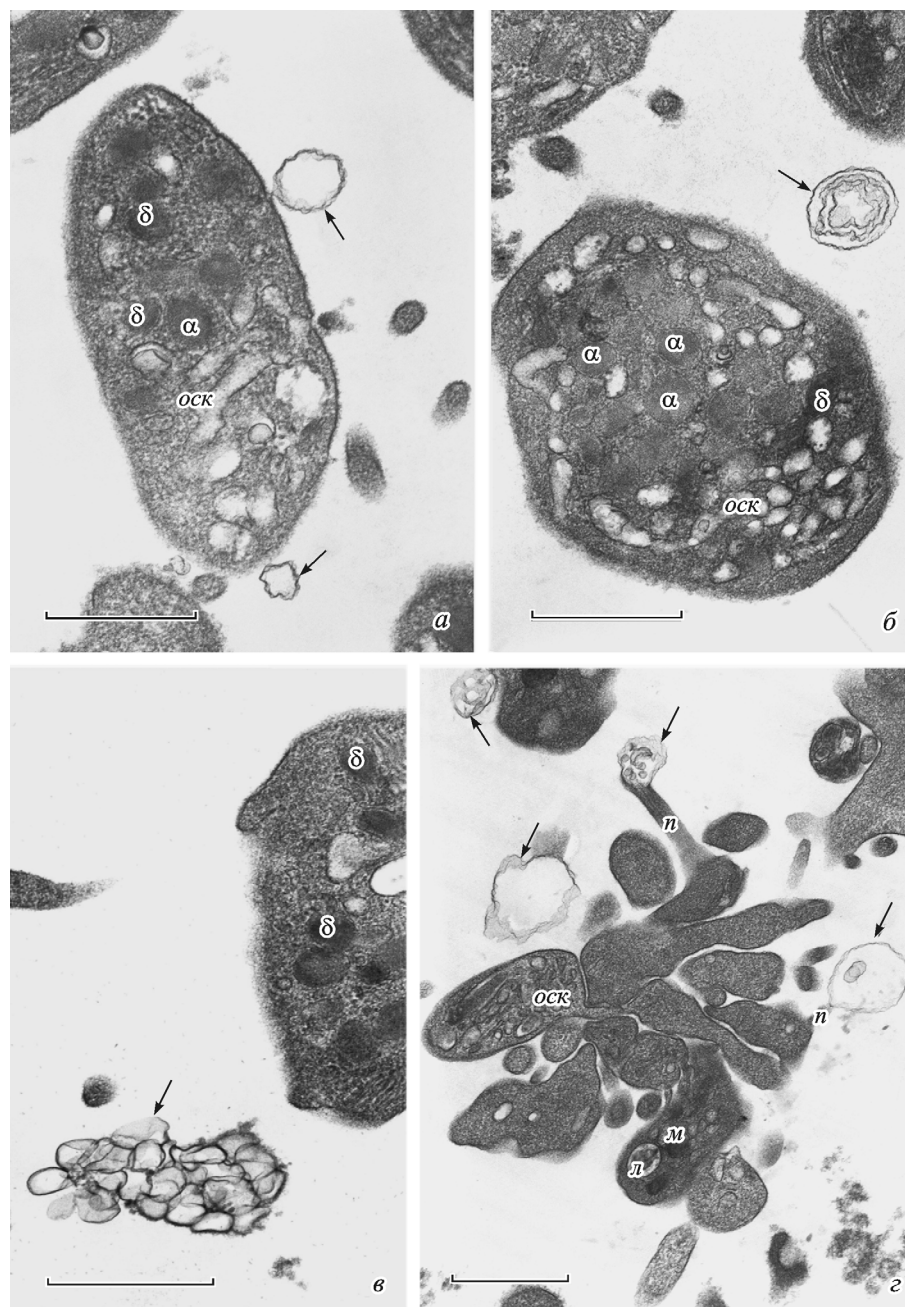


Рис. 3. Структурное разнообразие тромбоцитарных МВ.

a — МВ с одинарной мембраной; *б* — МВ с многослойной мембраной; *в* — мультивезикулярная частица; *г* — образование МВ разного строения после фрагментации тромбоцита, вызванного инкубацией с тромбином. Обозначения структур те же, что и на рис. 1. Стрелками указаны микровезикулы. Масштабные отрезки — 1000 нм.

наибольший разброс по размерам (рис. 2, *a*; 3, *a*). На рис. 2, *a-3* показаны две МВ — большая размером 400 нм и малая размером 80 нм. Многослойные МВ были образованы из нескольких замкнутых мембран, при этом МВ различного диаметра были как бы вложены одна в другую и могли иметь 3—5 мембранных колец (рис. 3, *б*). Мультивезикулярные частицы состояли из нескольких мелких везикул, которые могли быть ограничены одной общей мембраной или не иметь ее. Мелкие везикулы были расположены рыхло и индивидуально, если находились внутри одной большой МВ (рис. 2, *б*; 3, *з*), и наоборот, прилегали друг к другу, образуя плотные контакты между собой, если не имели общей ограничивающей

мембраны (рис. 1, *г*; 3, *в*). Такие агрегаты могли объединять 10—15 индивидуальных МВ.

При активации тромбоцитов тромбином наблюдали образование всех вышеперечисленных типов МВ, а также микрочастиц с электронно-плотным содержимым (рис. 3, *г*). Фрагменты распавшегося тромбоцита были ограничены плазматической мембраной и содержали цитоплазму, различные клеточные компоненты и органеллы. На рис. 2 показаны фрагменты, содержащие изолированную митохондрию (*г-1*) или гранулы гликогена и митохондрию (*г-2*).

Размеры тромбоцитарных МВ, выявляемых в препаратах тромбоцитов, варьировали в широком диа-

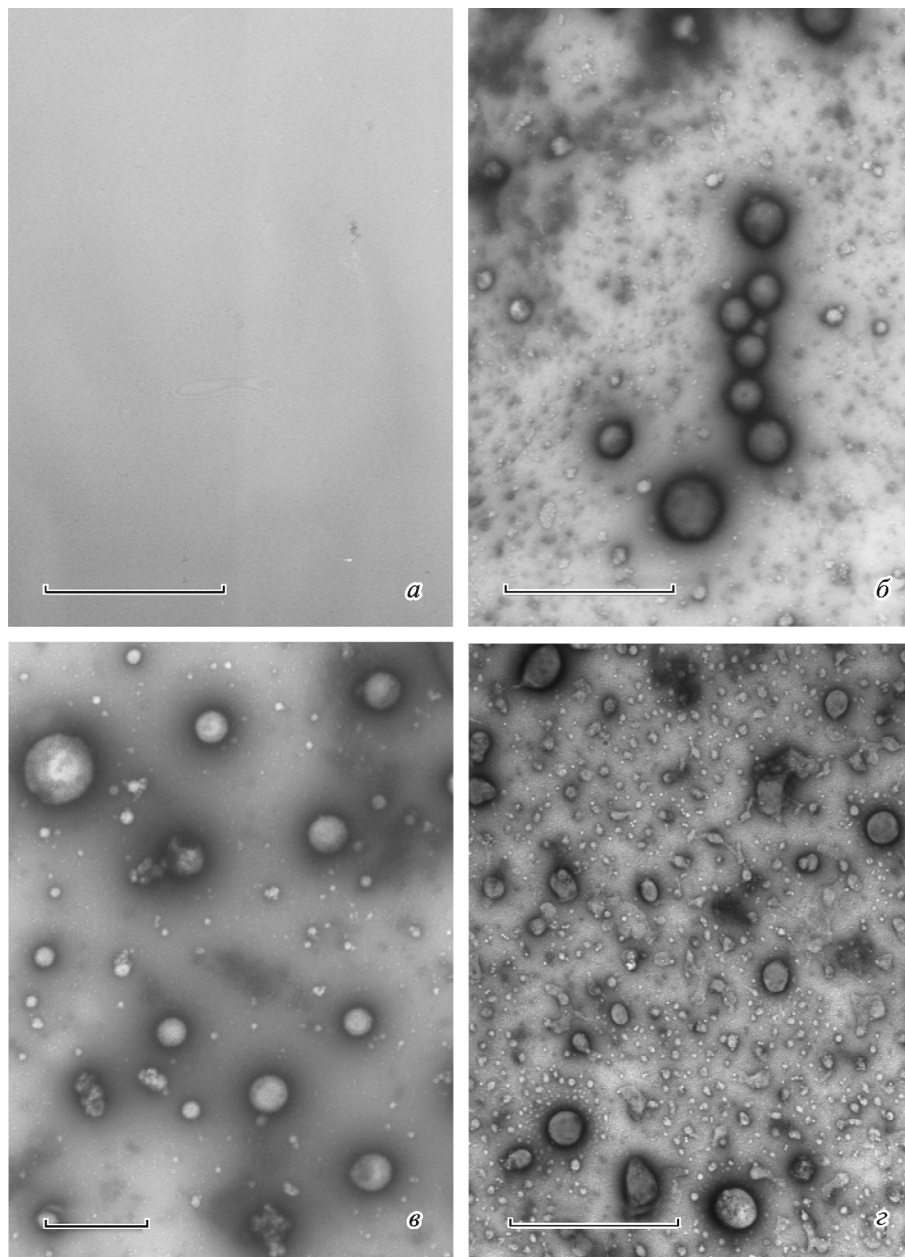


Рис. 4. Негативное контрастирование изолированных тромбоцитарных МВ.

a — материал подложки (отрицательный контроль); *б* — МВ, выделенные из препарата покоящихся тромбоцитов; *в, з* — МВ, выделенные из препаратов тромбоцитов, активированных кальциевым ионофором А23187 и тромбином соответственно. Масштабные отрезки — 1000 нм.

пазоне — от 50 до 2000 нм с преобладанием частиц с размером в диапазоне 50—130 нм (рис. 3, *з*). Размер МВ не зависел от их строения и происхождения (наружная мембрана или внутриклеточные структуры). МВ, ограниченные одинарной мембраной, могли достигать величины 1500—2000 нм, а могли быть значительно меньше (70—100 нм). Наблюдали мелкие везикулярные частицы (50—70 нм), которые были или заключены внутрь общей везикулы размером 600—1000 нм (рис. 3, *з*), или не имели ограничивающей мембраны, но были плотно сгруппированы и образовывали агрегаты размером 1000—1500 нм (рис. 3, *в*). При распаде тромбоцита на фрагменты образовывались частицы размером до 1000 нм, которые рассматривались нами как один из вариантов микровезикулярных структур тромбоцитарного происхождения.

Для дополнительной оценки размеров большого числа МВ мы использовали метод негативного контрастирования изолированных микрочастиц тромбоцитарного происхождения (рис. 4). МВ, выделенные из покоящихся тромбоцитов, имели округлую форму с четкими ровными краями. МВ, выделенные из тромбоцитов, активированных тромбином или кальциевым ионофором, были гетерогенными. Среди них визуально можно выделить две главные популяции: 1) сравнительно крупные МВ (более 200 нм) правильной шаровидной формы и 2) более мелкие везикулы (50—100 нм), часто имеющие шероховатую поверхность и тонкие выросты (рис. 4). Распределение тромбоцитарных МВ по размерам показано на рис. 5. В препарате покоящихся тромбоцитов размер МВ колебался от 30 до 500 нм с отчетливым пиком 50—100 нм

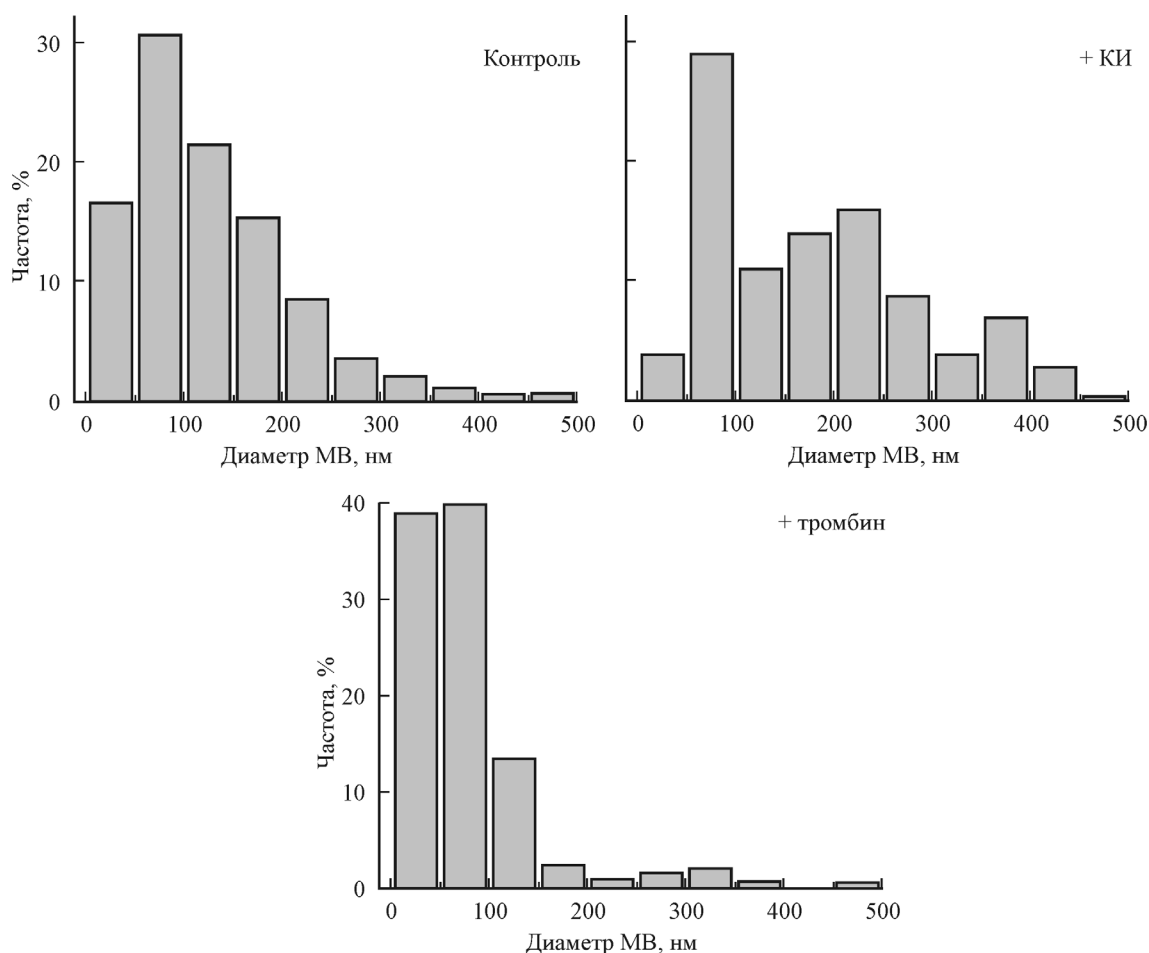


Рис. 5. Распределение МВ, выделенных из препаратов покоящихся тромбоцитов, по размеру в контроле ($n = 200$) и после активации кальциевым ионофором (КИ, $n = 100$) или тромбином ($n = 200$).

Размеры МВ определены с использованием программы ImageJ по данным электронной микроскопии с негативным контрастированием. Общее число МВ в каждой группе принято за 100 %.

(рис. 5, а). Асимметрия пика со сдвигом в сторону больших значений указывает на наличие фракции МВ, имеющих размеры 150—200 нм и больше. После активации тромбоцитов кальциевым ионофором МВ становятся очень разными по размеру с появлением дополнительных пиков на 200—250 и 350—400 нм, отражающих увеличение доли сравнительно крупных частиц (рис. 5, б), которых почти не было в покоящихся клетках. Активация тромбоцитов тромбином, напротив, сопровождалась значительным приростом фракции мелких частиц размером менее 75 нм, предположительно имеющих внутриклеточное происхождение (рис. 5, в).

Следует отметить, что на гистограммах (рис. 5) отсутствуют МВ размером более 500 нм, хотя, по нашим данным, тромбоцитарные МВ могут достигать 1000—1500 нм (рис. 3). Это скорее всего связано с методической особенностью выделения МВ, а именно: более крупные МВ могли оседать на втором этапе центрифугирования при 7000 g, который необходим для удаления клеточного детрита.

Обсуждение

Способность клеток образовывать и выделять мембранные микрочастицы является важным механизмом ре-

гуляции физиологических реакций, способом межклеточных коммуникаций и патогенетическим фактором при многих заболеваниях (Kelton, 2005; Nomura et al., 2008; Varon, Shai, 2015). Тромбоциты выполняют множественные функции, включая решающее участие в реакциях гемостаза и тромбоза, поэтому МВ тромбоцитарного происхождения также обладают разнообразными и важными биологическими свойствами (Зубаиров, Зубаирова, 2009; Aatonen et al., 2012). Тромбоцитарные МВ составляют основную фракцию клеточных микрочастиц, циркулирующих в крови здоровых людей, а при разных видах патологии их концентрация в крови многократно возрастает, что имеет большое клиническое значение (Thushara et al., 2015). Настоящая работа призвана частично восполнить пробел в знании структуры тромбоцитарных МВ, которое отстает от многочисленных исследований их функций в норме и при патологии.

Структура дочерних МВ неотделима от строения клеток, из которых они происходят, поэтому мы начали с описания ультраструктуры покоящихся и активированных тромбоцитов, учитывая, что те и другие могут образовывать МВ (Burnouf et al., 2014). В полном соответствии с данными литературы (James, White, 1972; Zucker et al., 1974; Neumüller et al., 2013) мы наблюдали субклеточную организацию нормальных покоящихся тромбоцитов и типичные морфологические признаки их актива-

ции, которые включали в себя изменение формы клеток за счет образования псевдоподий, разрастание канальцев ОСК и выделение в окружающую среду секреторных гранул (рис. 1). Не вполне ясно, насколько интактны «покоящиеся» тромбоциты, поскольку при выделении из крови клетки неизбежно подвергаются разнообразным воздействиям, которые могут их активировать. Возможно, этой неспецифической активацией объясняется наблюдаемое нами образование МВ из тромбоцитов даже без добавления специфических стимуляторов, хотя, с другой стороны, микровезикуляция может быть нормальной функцией любой клетки в состоянии физиологического покоя (Thushara et al., 2014).

Ультраструктурные изменения активированных тромбоцитов зависели от природы стимула. Так, эффекты арахидоновой кислоты и АДФ, физиологических активаторов тромбоцитов, оказались сравнительно умеренными и сходными между собой (рис. 1, в, з), тогда как тромбин вызывал глубокую перестройку структуры клетки вплоть до распада (рис. 1, д; 2, з; 3, з). Фрагментация тромбоцитов при активации тромбином может отражать поздние стадии апоптоза клеток (Gyulhandanyan et al., 2012; Akers et al., 2013). Показано, что тромбин помимо высвобождения секреторных гранул и лизосомальных ферментов индуцирует апоптоз, определяемый по экспрессии проапоптотических белков Вах и Вак, активации каспазы-3, снижению трансмембранного потенциала митохондрий и появлению фосфатидилсерина на плазматической мембране (Leytin et al., 2006). В наших экспериментах тромбин вызывал уплотнение и сжатие цитоплазмы тромбоцитов, исчезновение секреторных везикул в гиалоплазме, глубокие инвагинации плазматической мембраны и распад клетки на разнородные мелкие фрагменты (апоптотические тельца), что соответствует морфологическим признакам позднего апоптоза.

По происхождению клеточные МВ условно подразделяются на две группы — экзосомы, образующиеся из наружной клеточной мембраны (Stein, Luzio, 1991), и экзосомы, образующиеся из внутренних мембранных структур (Johnstone et al., 1987; Akers et al., 2013). Наши исследования подтверждают правомочность такого деления применительно к тромбоцитарным МВ. Мы выявили последовательные этапы образования МВ на теле тромбоцита и показали, что мембрана МВ происходит из плазмалеммы (рис. 2, а). Как альтернативный вариант мы наблюдали образование МВ за счет внутриклеточных структур (рис. 2, в). Первоначально экзосомы тромбоцитарного происхождения были обнаружены *in vitro*, и только недавно показано их существование *in vivo* (Nieuwland et al., 2013). Различить экзосомы и экзосомы другими методами, кроме электронной микроскопии, довольно трудно, хотя экзосомы меньше по размеру (40—100 против 100—1000 нм). К сожалению, метод проточной цитометрии, который широко используется для определения МВ в биологических жидкостях, как правило, не выявляет частиц меньше 300—400 нм (Nieuwland et al., 2013; Ayers et al., 2014). Кроме того, проточная цитометрия не дает представления о морфологическом разнообразии клеточных микрочастиц (Heijnen et al., 1999; Leytin et al., 2006; Lacroix et al., 2010), откуда следует важность ультраструктурных исследований клеточных МВ.

Нами выявлены следующие морфологические варианты тромбоцитарных МВ — одинарные однослойные, одинарные многослойные, мультивезикулярные (в виде агрегатов из нескольких везикул) и мембранные фраг-

менты клетки с органеллами внутри. Такие фрагменты помимо цитоплазмы могли включать в себя митохондрии, элементы цитоскелета, гранулы гликогена, небольшие вакуоли и компоненты ОСК. Следует отметить, что существуют единичные работы, в которых наряду с классическими одностенными «пузырьками» описаны мультимеллярные структуры (т.е. многослойные МВ) (George et al., 1982), мультивезикулярные образования (Polasek, 1982) и тромбоцитарные МВ, содержащие митохондрии (Boudreau et al., 2014). Таким образом, наши результаты согласуются с данными из литературы о гетерогенности тромбоцитарных МВ. Однако в отличие от предшествующих публикаций в нашей работе определены условия одновременного образования разных типов МВ, прослежен структурный механизм их формирования, расширен и детально охарактеризован морфологический спектр возможных вариантов МВ тромбоцитарного происхождения.

Дополнительная информация о морфологии и размерах тромбоцитарных МВ была получена нами с использованием метода негативного контрастирования изолированных микрочастиц. Если МВ, выделенные из препаратов покоящихся тромбоцитов, укладываются в классическое представление о МВ по форме и размерам (Heijnen et al., 1999; Van der Pol et al., 2012; Arraud et al., 2014), то активация тромбоцитов кальциевым ионофором, известным индуктором апоптоза тромбоцитов, приводила к появлению фракции более крупных МВ (экзосом), а тромбин, наоборот, вызывал увеличение числа мелких и очень мелких везикул (экзосом). Полученные результаты подтверждает зависимость природы МВ от биохимического стимула и подтверждают связь микровезикуляции как с активацией, так и с апоптозом тромбоцитов, что требует дальнейших углубленных исследований.

Таким образом, на основании ультраструктурных исследований показана морфологическая гетерогенность МВ тромбоцитарного происхождения и определены клеточные структуры, являющиеся источником их формирования. Приведена классификация тромбоцитарных МВ, основанная на их размерах и способе образования, детальном строении, наличии включений и органелл внутри микрочастиц. Эти данные важны для понимания происхождения клеточных МВ, их состава, свойств и разнообразной роли в физиологических и патологических процессах.

Работа выполнена за счет субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Привожского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Список литературы

- Зубаиров Д. М., Зубаирова Л. Д. 2009. Микровезикулы в крови. Функции и их роль в тромбообразовании. М.: ГЭОТАР-Медиа. 167 с. (Zubairov D. V., Zubairova L. D. 2009. Microvesicles in the blood. The functions and their role in thrombus formation. Moscow: GEOTAR-Media. 167 p.)
- Aatonen M., Grönholm M., Silfjander P. R.-M. 2012. Platelet-derived microvesicles: multitasking participants in intercellular communication. *Semin. Thromb. Hemost.* 38 : 102—113.
- Akers J. C., Gonda D., Kim R., Carter B. S., Chen C. C. 2013. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* 113 : 1—11.

- Arraud N., Linares R., Tan S., Gounou C., Pasquet J.-M., Morinet S., Brisson A. R. 2014. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J. Thromb. Haemos.* 12 : 614—627.
- Ayers L., Harrison P., Kohler M., Ferry B. 2014. Procoagulant and platelet-derived microvesicle absolute counts determined by flow cytometry correlates with a measurement of their functional capacity. *J. Extracell. Vesicles.* 3 : 25348.
- Boudreau L. H., Duchez A.-C., Cloutier N., Soulet D., Martin N., Bollinger J., Par'e A., Rousseau M., Naika G. S., L'evesque T., Laflamme C., Marcoux G., Lambeau G., Farndale R. W., Pouliot M., Hamzeh-Cognasse H., Cognasse F., Garraud O., Nigrovic P. A., Guderley H., Lacroix S., Thibault L., Semple J. W., Gelb M. H., Boilard E. 2014. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood.* 124 : 2173—2183.
- Burnouf T., Goubran H. A., Chou M. L., Devos D., Radosevic M. 2014. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev.* 28 : 155—166.
- George J. N., Thoi L. L., McManus L. M., Reimann T. A. 1982. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood.* 60 : 834—840.
- Gyulkhandanyan A. V., Mutlu A., Freedman J., Leytin V. 2012. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J. Thromb. Thrombolysis.* 33 : 397—411.
- Heijnen H. F. G., Schiel A. E., Fijnheer R., Geuze H. J., Sixma J. J. 1999. Exocytosis of multivesicular bodies and α -granules microvesicles by surface shedding and exosomes derived from activated platelets release two types of membrane vesicles. *Blood.* 94 : 3791—3799.
- James G., White M. D. 1972. Exocytosis of secretory organelles from blood platelets incubated with cationic polypeptides. *Amer. J. Pathol.* 69 : 41—54.
- Johnstone R. M., Adam M., Hammond J. R., Orr L., Turbide C. 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262 : 9412—9420.
- Kelton J. G. 2005. The pathophysiology of hepa-induced thrombocytopenia. *Biological basis for treatment.* *Chest.* 127 : 9—20.
- Lacroix R., Robert S., Poncelet P., Kasthuri R. S., Key N. S., Dignat-George F. 2010. Standardization of platelet-derived micro-particle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International society on thrombosis and haemostasis SSC collaborative workshop. *J. Thromb. Haemos.* 8 : 2571—2574.
- Leytin V., Allen D. J., Mykhaylov S., Lyubimov E., Freedman J. 2006. Thrombin-triggered platelet apoptosis. *J. Thromb. Haemos.* 4 : 2656—2663.
- Neumüller J., Meisslitzer-Ruppitscha C., Ellinger A., Pavelkaa M., Jungbauer C., Renzb R., Leitner G., Wagner T. 2013. Monitoring of platelet activation in platelet concentrates using transmission electron microscopy. *Transfus. Med. Hemother.* 40 : 101—107.
- Nieuwland R., van der Pol E., Gardiner C., Sturk A. 2013. Platelet-derived microparticles. In: *Platelets.* 3rd edition. Amsterdam; Boston; Heidelberg et al.: Acad. Press Elsevier. 453—467.
- Nomura S., Ozaki Y., Ikeda Y. 2008. Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thromb. Res.* 123 : 8—23.
- Nomura S., Shimizu M. 2015. Clinical significance of procoagulant microparticles. *J. Intensive Care.* 3 : 1—11.
- Owens A. P., Mackman N. 2011. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ. Res.* 108 : 1284—1297.
- Polasek J. 1982. The appearance of multivesicular structures during platelet activation as observed by scanning electron microscopy. *Thromb. Res.* 28 : 433—437.
- Stein J. M., Luzio J. P. 1991. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochem. J.* 274 : 381—386.
- Thushara R. M., Hemshekhar M., Basappa A., Kemparaju K., Rangappa K. S., Girish K. S. 2015. Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: an outlook. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 93 : 149—158.
- Thushara R. M., Hemshekhar M., Kemparaju K., Rangappa K. S., Devaraja S., Girish K.S. 2014. Therapeutic drug-induced platelet apoptosis: an overlooked issue in pharmacotoxicology. *Arch. Toxicol.* 88 : 185—198.
- Van der Pol E., Hoekstra A. G., Sturk A., Otto C., Van Leeuwen T.G., Nieuwland R. 2012. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J. Thromb. Haemos.* 8 : 2596—2607.
- Varon D., Shai E. 2015. Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses. *J. Thromb. Haemos.* 13 : 40—46.
- Zucker W. H., Shermer R. W., Mason R. G. 1974. Ultrastructural comparison of human platelets separated from blood by various means. *Amer. J. Pathol.* 77 : 255—268.
- Zwicker J. I. 2008. Tissue factor-bearing microparticles and cancer. *Semin. Thromb. Hemos.* 34 : 195—8.

Поступила 5 X 2015

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF PLATELETS AND PLATELET-DERIVED MICROVESICLES

A. A. Ponomareva,^{1,2} T. A. Nevzorova,² E. R. Mordakhanova,²
I. A. Andrianova,² R. I. Litvinov²

¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics RAS, Kazan, 420111, and

² Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420012;

¹ e-mail: na.ponomareva@mail.ru

Platelets are the anucleated blood cells, which together with the fibrin stop bleeding (hemostasis). Cellular microvesicles are membrane-surrounded microparticles released into extracellular space upon activation and/or apoptosis of various cells. Platelet-derived macrovesicles from the major population of circulating blood microparticles that play an important role in hemostasis and thrombosis. Despite numerous studies on the pathophysiology of platelet-derived macrovesicles, mechanisms of their formation and structural details remain poorly understood. Here we investigated the ultrastructure of parental platelets and platelet-derived microvesicles formed *in vitro* by quiescent cells as well as by cells stimulated with one of the following activators: arachidonic acid, ADP, thrombin, calcium ionophore A23187. Using transmission electron microscopy of human platelets and isolated microvesicles, we analyzed the intracellular origin, steps of formation, structural diversity, and size distributions of the subcellular particles. We have revealed that thrombin, unlike other stimuli, not only induced

vesiculation of the plasma membrane but also caused break-up of the cells followed by formation of microparticles that are comparable with microvesicles by size. A fraction of these microparticles contained cellular organelles surrounded by a thin membrane. The size of platelet-derived macrovesicles varied from 30 nm to 500 nm, however, the size distributions depended on the nature of a cell-activating stimulus. The results obtained provide new information about the formation of platelet-derived macrovesicles and their structural diversity, which is important to understand their multiple functions in normal and disease states.

Key words: platelets, cellular macrovesicles, blood microparticles, platelet activation, cell ultrastructure, electron microscopy.
