

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

Л. В. КУХАРЕНКО, И. А. СТЕЛЬМАХ

**МЕТОД АТОМНО-СИЛОВОЙ
МИКРОСКОПИИ
В ИССЛЕДОВАНИИ
ПРОЦЕССОВ АДГЕЗИИ И
АГРЕГАЦИИ
ТРОМБОЦИТОВ В НОРМЕ**

Учебно-методическое пособие



Минск 2007

УДК 612.111.7–086 (075.8)
ББК 28.707.3 я 73
К 95

Утверждено Научно-методическим советом университета в качестве
учебно-методического пособия 27.06.2007 г., протокол № 10

Р е ц е н з е н т ы: проф. Б. А. Слука; доц. Г. К. Ильич

Кухаренко, Л. В.

К 95 Метод атомно-силовой микроскопии в исследовании процессов адгезии и агрегации тромбоцитов в норме : учеб.-метод. пособие / Л. В. Кухаренко, И. А. Стельмах. – Минск : БГМУ, 2007. – 15 с.

ISBN 978–985–462–721–2.

Рассматриваются общие характеристики и ультраструктура тромбоцитов. Представлены современные данные о механизмах агрегации тромбоцитов и тромбообразования. Приводятся результаты исследований с помощью атомно-силового микроскопа процессов адгезии и агрегации тромбоцитов в норме.

Предназначено для студентов всех факультетов, аспирантов и соискателей.

УДК 612.111.7–086 (075.8)
ББК 28.707.3 я 73

ISBN 978–985–462–721–2

© Оформление. Белорусский государственный
медицинский университет, 2007

ГИСТОФИЗИОЛОГИЯ ТРОМБОЦИТОВ

Тромбоциты (кровяные пластинки) представляют собой отщепившиеся безъядерные фрагменты цитоплазмы гигантских клеток мегакариоцитов, расположенных в красном костном мозге. Они играют первостепенную роль в осуществлении сложнейших функций управления свойствами крови, остановке кровотечения (гемостаз), свертывании крови, образовании тромба и прекращении кровотечения (тромбоз), а также в восстановлении стенки поврежденного кровеносного сосуда. Циркулирующие в кровотоке тромбоциты обычно поддерживаются в неактивном (интактном) состоянии благодаря простаглицлину и оксиду азота (NO), которые высвобождаются клетками эндотелия, покрывающими стенки сосуда, и практически не взаимодействуют друг с другом, с другими клетками крови и эндотелием сосудов. Интактные тромбоциты имеют вид бесцветных телец размерами 2–5 мкм дисковидной или овальной формы (рис. 1).

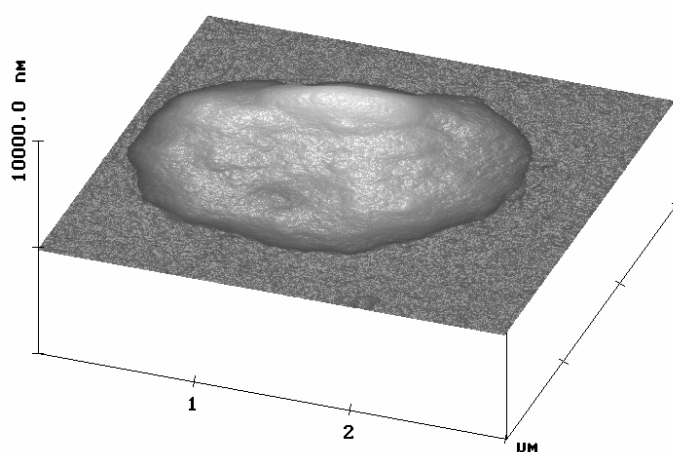


Рис. 1. Изображение интактного тромбоцита, полученное с помощью АСМ

Количество тромбоцитов составляет $190\text{--}400 \times 10^9/\text{л}$. Их уменьшение (тромбоцитопения) снижает устойчивость стенки гемокapилляров и в коже образуются точечные кровоизлияния (петехии). При увеличении количества тромбоцитов (тромбоцитоз) в организме возникает склонность к тромбообразованию. Дисфункция (тромбоцитопатия) может быть вызвана лекарственными препаратами (аспирин, индометацин и др.) Около $1/3$ всей массы тромбоцитов находится в селезенке (селезеночный пул): при спленомегалии этот пул возрастает, что может приводить к перераспределительной тромбоцитопении. При стимуляции адренорецепторов селезенки (физическая нагрузка, стресс) происходит выброс тромбоцитов в циркуляцию, что приводит к временному тромбоцитозу. Остальные $2/3$ кровяных пластинок циркулируют в крови. Продолжительность жизни тромбоцитов составляет 5–9 дней, причем 10–15 % из них ежедневно расходуется на поддержание трофики и нормального функционирования эндотелиальных клеток (ангиотрофическая функция тромбоцитов).

Поверхностная мембрана тромбоцита состоит из трехслойного белково-липидного комплекса. Гликопротеиды плазмалеммы выполняют функцию ре-

цепторов для связывания фактора Виллебранда и плазменных факторов свертывания крови, опосредуют адгезию (прилипание) и агрегацию (склеивание) тромбоцитов. Снаружи мембрана тромбоцита окружена гликокаликсом толщиной 1–2 нм, в котором концентрируются I, VIII, IX, XIII и др. факторы свертывания крови, фактор Виллебранда, некоторые иммуноглобулины, ионы кальция и АДФ. Эта цитоплазматическая «атмосфера» тромбоцитов, которой лишены другие клетки крови, имеет большое значение в осуществлении их первоочередной роли в локальных гемостатических реакциях, формируя главную «линию обороны» организма в борьбе с кровопотерей. Гликокаликс при этом образует фибриллярные мостики между тромбоцитами, запуская процесс тромбообразования.

Цитоплазма тромбоцита представлена сложным комплексом мембран, микротрубочек, микрофиламентов, органелл (митохондрий, рибосом, фрагментов комплекса Гольджи, включений гликогена, ферментов аэробного и анаэробного гликолиза) (рис. 2).

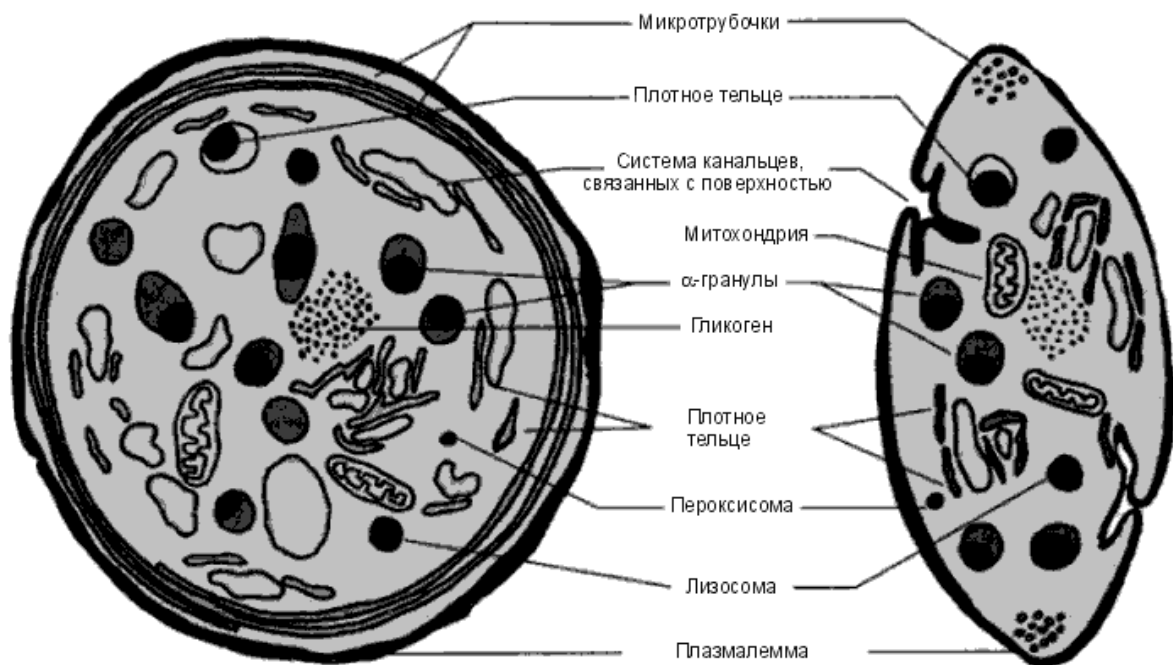


Рис. 2. Строение тромбоцита в двух проекциях (вид спереди, вид сбоку)

Периферическая часть (гиаломер) цитоплазмы содержит плазматические факторы свертывания крови, белки актин и миозин, участвующие в сокращении (ретракции) сформированного тромба. Периферические микротрубочки численностью 10–15 штук формируют кольцо, сохраняющее форму кровяной пластинки, и также являются частью их сократительного аппарата. Другая система микротрубочек образует плотную анастомозирующую систему, в которой находятся ионы кальция, энзимы пероксидаза и циклооксигеназа. В центре тромбоцита (грануломер) располагаются гранулы четырех типов:

1. α -Гранулы, размером 300–500 нм, содержат белки, выделяющиеся из активированных тромбоцитов: гликопротеины (фибриноген, фактор Виллебранда), белки для связывания гепарина, факторы роста и хемоаттрактанты для лейкоцитов и фибробластов при выполнении ангиотрофической функции тром-

боцитов и заживлении ран, плазменные факторы (тромбопластин, фактор V, тромбоспондин для адгезии и агрегации тромбоцитов), белок MP-140, выполняющий роль рецептора клеточной адгезии.

2. γ -Гранулы (плотные гранулы), диаметром 250–300 нм, содержат АДФ, АТФ, ионы кальция, пирофосфат, серотонин и гистамин (не синтезируются в тромбоцитах, а поступают из плазмы).

3. λ -Гранулы, диаметром 175–200 нм, являются лизосомами, содержат лизосомальные ферменты (прогидролазы), растворяющие образовавшиеся тромбы.

4. Микропероксисомы, небольшие гранулы диаметром ~90 нм, встречающиеся в кровяных пластинках в небольшом количестве, обладающие пероксидазной активностью.

Цитоскелет кровяных пластинок образован тремя системами белковых нитей: микрофиламентами, состоящими из белка актина, микротрубочками, состоящими из белка тубулина, и промежуточными филаментами, состоящими из разных белков. Все структуры цитоскелета взаимодействуют друг с другом. Промежуточные филаменты, система микротрубочек и микрофиламентов обеспечивают сохранение дисковидной формы неактивированных тромбоцитов, а при их активации — изменение формы, образование выростов, централизацию гранул. Всю цитоплазму пронизывает система плотных канальцев (плотная тубулярная система), содержащая большое количество ионов Ca^{2+} .

Классификация тромбоцитов:

1. Юные — с базофильным грануломером и единичными азурофильными гранулами.

2. Зрелые — с слабооксифильными гранулами и выраженной азурофильной зернистостью.

3. Старые — с базофильным грануломером и выраженной базофильной зернистостью.

4. Дегенеративные — с серовато-базофильным грануломером и серовато-базофильной зернистостью.

5. Гигантские (формы раздражения) — в 2–3 раза превышают размеры нормальных кровяных пластинок, с оксифильным грануломером и базофильной зернистостью.

В циркулирующей крови преобладают зрелые тромбоциты диаметром 2–3 мкм (80–95 %), «молодые» формы — макротромбоциты размером свыше 3 мкм составляют 1–10 %, а «старые» микротромбоциты менее 2 мкм — 3–15 %.

МЕХАНИЗМ ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ

В физиологических условиях тромбоциты не прикрепляются к эндотелию сосудистой стенки, т. к. в ней вырабатывается простаглицлин, угнетающий функции тромбоцитов. При повреждении кровеносного сосуда или при нарушении поверхности эндотелия (например, при атеросклерозе) в этом месте увеличивается количество тромбоцитов, происходит их **адгезия** (прилипание) и **агрегация** (склеивание) в виде сетки, образуется белый тромб (по цвету массы пластинок на первоначальном этапе тромбообразования).

Повреждение сосудистой стенки обнажает структурные элементы субэндотелия (коллаген, фактор Виллебранда, фибронектин, лиминин, витронектин и др.), которые активируют тромбоциты. При активации тромбоциты меняют дисковидную форму на сферическую с многочисленными выростами. Фактор Виллебранда является необходимым для адгезии тромбоцитов к коллагену как связующее звено между коллагеном и тромбоцитами. Он связывает коллаген субэндотелия и гликопротеидные (ГП) рецепторы (Ia, Ib), расположенные на мембране тромбоцитов. Тромбоциты прилипают (адгезируют) к поверхности поврежденного сосуда, образуя монослой, рыхло связанный с поврежденным эндотелием. Активированные тромбоциты послойно укладываются, соединяясь в агрегаты. Передача сигнала фактора Виллебранда внутрь клетки через ГП Ib повышает концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} , что ведет к освобождению АДФ и экспонированию второго мембранного рецептора тромбоцитов — гликопротеина IIb/IIIa, который служит рецептором как для фактора Виллебранда, так и для плазменного фактора гемостаза — фибриногена. Уникальной особенностью этого рецептора является то, что он приобретает способность к связыванию фибриногена только при активации тромбоцитов в зоне повреждения сосуда. Молекула фибриногена имеет симметричную структуру и, взаимодействуя одновременно с двумя молекулами гликопротеина IIb-IIIa, может образовывать молекулярные «мостики» между активированными тромбоцитами, обеспечивая таким образом прикрепление тромбоцитов друг к другу и их агрегацию.

Фаза высвобождения, во время которой происходит секреция содержимого α - и γ -гранул (АДФ, серотонин, фактор III и фактор IV тромбоцитов, тромбоксан, адреналин и др.), усиливает агрегацию, делая ее необратимой. Увеличивающаяся концентрация АДФ, тромбина, серотонина и других тромбоцитарных агрегантов вовлекает новые тромбоциты в образование первичного тромба. Одновременно активируется метаболизм арахидоновой кислоты, и при участии ферментов циклооксигеназы и тромбоксансинтетазы образуется тромбоксан A_2 , который обладает мощным агрегирующим, а также вазоконстрикторным действием. Количество серотонина в плазме крови увеличивается, и ограничивается поток крови в поврежденном участке кровеносного сосуда. Тромбоксан стимулирует дополнительную агрегацию тромбоцитов в этом месте до тех пор, пока не образуется первичная тромбоцитарная пробка (**белый тромб**), который существует в текущей крови. Он инициирует формирование **красного тромба**, образующегося при свертывании неподвижной крови. Эти механизмы запускают процессы внешней и внутренней коагуляции крови, в результате которых при повреждении кровеносного сосуда и окружающих его тканей высвобождается тканевой тромбопластин, который, в свою очередь, осуществляет превращение белка протромбина в тромбин.

Тромбин вызывает полимеризацию растворенного в плазме фибриногена в нерастворимые волокна фибрина. Тромбоциты выделяют фибриноген в дополнение к уже присутствующему в плазме в норме. Фибриноген с помощью факторов свертывания крови конвертируется в фибрин, волокна которого вплетаются в тромбоцитарный тромб и стабилизируют его. Образуется плотная

фибровая прокладка, к которой прикрепляется все больше тромбоцитов, эритроцитов и лейкоцитов (красный тромб).

Тканевой тромбопластин выделяется из поврежденной ткани, поэтому его считают внешним фактором, а факторы свертывания крови и тромбоциты — внутренним фактором тромбообразования. В процессе гемокоагуляции обычно роль триггеров выполняют и внутренние, и внешние факторы, т. к. нити фибрина обычно формируются в месте агрегации кровяных пластинок.

Образовавшийся красный тромб сразу же подвергается процессу **ретракции** (сокращения), при этом сгусток достигает 10 % своего первоначального объема. Ход ретракции зависит от присутствия тромбоцитов и нитей фибрина. Филоподии тромбоцитов содержат актиновые и миозиновые микрофиламенты. В процессе их контакта с нитями фибрина формируется акто-миозиновый комплекс, который при сокращении втягивает нити фибрина в центр тромба, уплотняя его и уменьшая в размерах. Затем тромб растворяется в норме фактором противосвертывающей системы плазмином и содержимым λ -гранул тромбоцитов, не участвующих в процессе тромбообразования.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ АДГЕЗИИ И АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Тромбоциты активируются при их соприкосновении с чужеродной поверхностью. С помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) можно изучать структурную модификацию поверхности тромбоцитов при их активации, которая является начальным этапом тромбообразования. При соприкосновении с чужеродным материалом на поверхности тромбоцита очень быстро, в течение нескольких минут или даже секунд, образуются выросты цитоплазмы — псевдоподии. Выросты могут иметь форму узкого цилиндра (филоподия) или форму плоской пластинки (ламеллоподия). Появление псевдоподий является результатом серии сложных молекулярных реакций: полимеризации актиновых нитей, присоединения к этим нитям других белков, связывающих их в сети и вызывающих их перемещение, а также связывания нитей с белками мембраны.

На начальной стадии адгезии тромбоцитов к чужеродной поверхности визуализируется изменение их дисковидной формы на сферическую с образованием коротких и длинных узких филоподий (рис. 3). В филоподиях под мембраной тромбоцита полимеризуются актиновые микрофиламенты, которые связываются с миозином и другими белками (рис. 4).

Длина филоподий тромбоцитов варьирует от 0,5 до 3,0 мкм, а толщина — от 0,05 до 0,30 мкм. Молекулярной основой образования псевдоподий у тромбоцитов является полимеризация актиновых микрофиламентов из растворимого актина. К микрофиламентам присоединяются миозин и другие молекулы. В результате псевдоподии становятся сократимыми и способны прикрепляться к различным поверхностям.

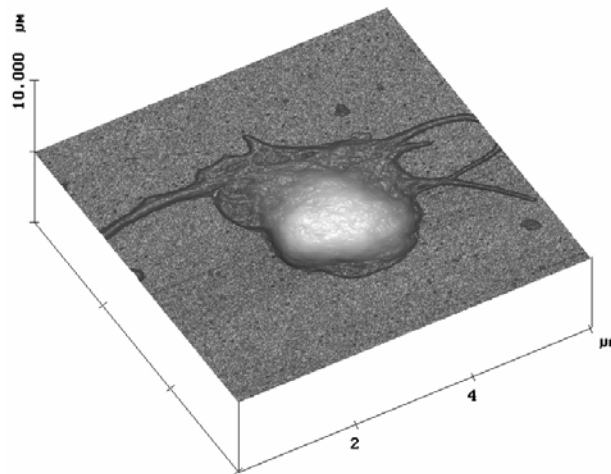


Рис. 3. Изображение тромбоцита на начальной стадии адгезии к слюде, полученное с помощью АСМ. Тромбоцит приобретает сферическую форму с образованием длинных и коротких филоподий

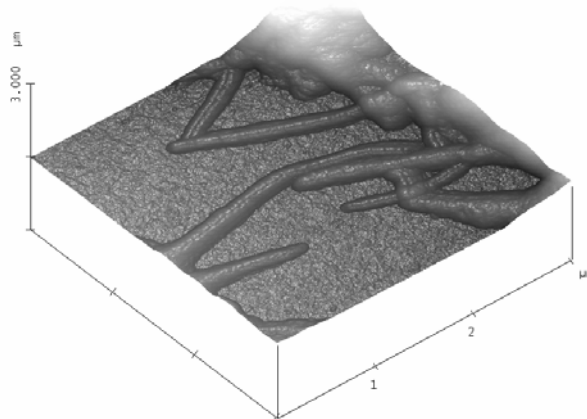


Рис. 4. Изображение филоподий тромбоцитов при их адгезии к чужеродной поверхности, полученное с помощью АСМ

На промежуточной стадии адгезии на разных краях мембраны тромбоцитов одновременно выбрасываются и прикрепляются к поверхности много филоподий. Последние стремятся сократиться, натягиваются и растягивают тромбоцит в разные стороны, уплощая его. Этот процесс называют распластыванием (рис. 5). При выходе ионов кальция из системы плотных канальцев тромбоцитов в гиаломер происходит их соединение с кальмодулином, а затем с белком миозином. Этот комплекс активирует сократительную систему тромбоцита благодаря формированию акто-миозинового комплекса. При этом филоподии тромбоцита расширяются и превращаются в ламеллоподии толщиной до 70 нм (рис. 6), в строме которых формируются густые сложные сети из микрофиламентов, усиливающие процессы адгезии и агрегации.

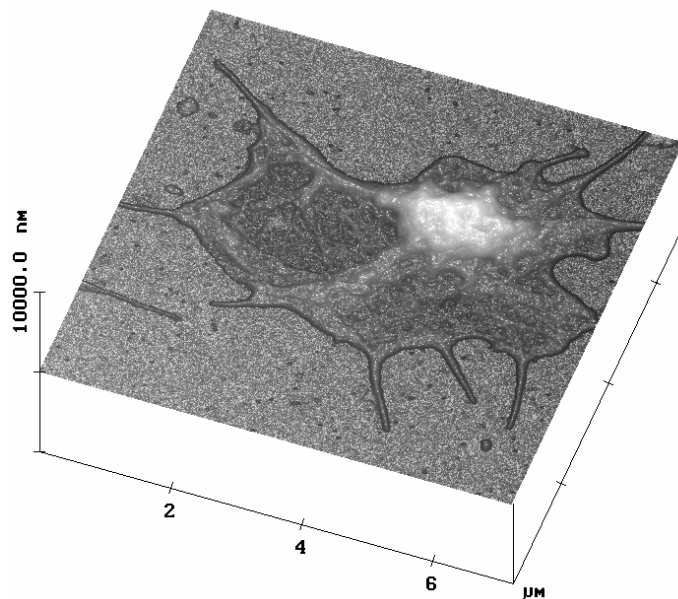


Рис. 5. Изображение тромбоцита на промежуточной стадии адгезии к слюде, полученное с помощью АСМ. Дальнейшая адгезия тромбоцита приводит к расширению филоподий и превращению их в ламеллоподии

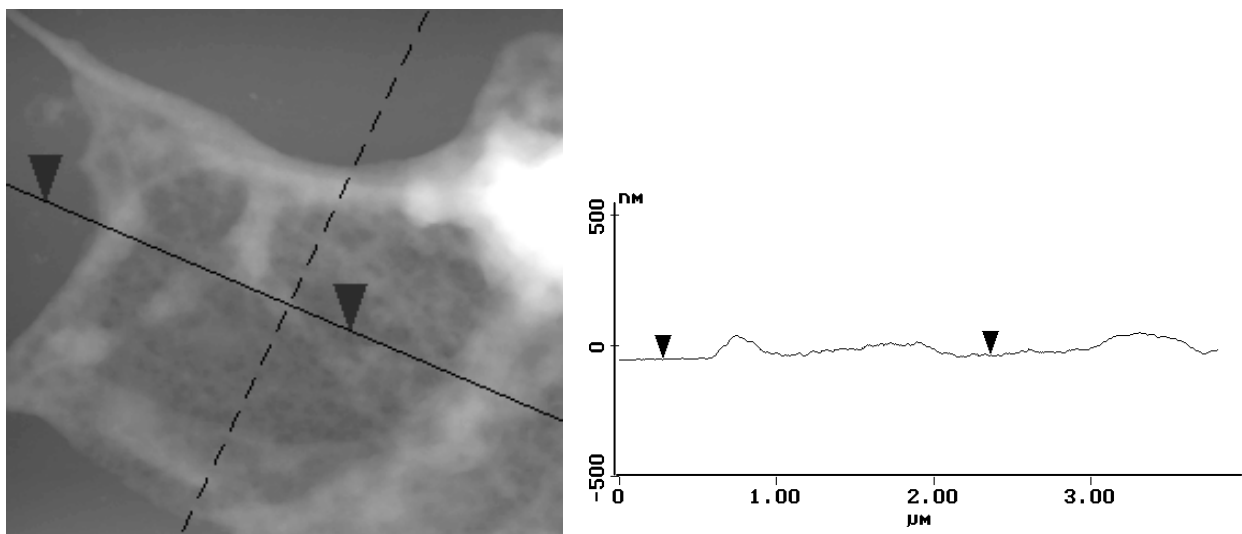


Рис. 6. Изображение длинных филоподий и ламеллоподия между ними; поперечное сечение ламеллоподия, полученное с помощью АСМ

При этом периферическое кольцо микротрубочек перемещается в центр тромбоцита, увлекая за собой крупные α -гранулы и концентрируя их в форме «псевдоядра» (рис. 7).

От 5 до 20 гранул размером от 250 до 400 нм визуализируется на изображениях тромбоцитов (полученных с помощью АСМ) на этой стадии адгезии к чужеродной поверхности.

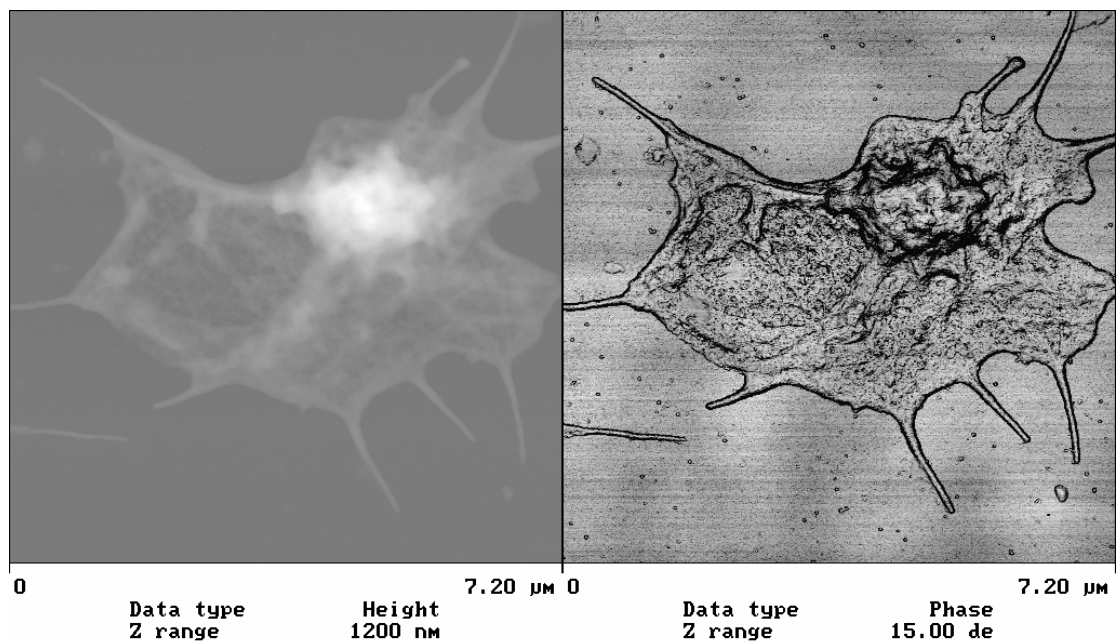


Рис. 7. Изображение тромбоцита с «псевдодром» на промежуточной стадии адгезии к слюде, полученное с помощью АСМ

На заключительном этапе адгезии тромбоцита происходит дегрануляция содержимого гранул под действием тромбоксана А2.

При этом гранулы сливаются с наружной мембраной тромбоцита, формируя «кратеры» на ламеллоподиях диаметром 290 нм и глубиной 16 нм (рис. 8, 9).

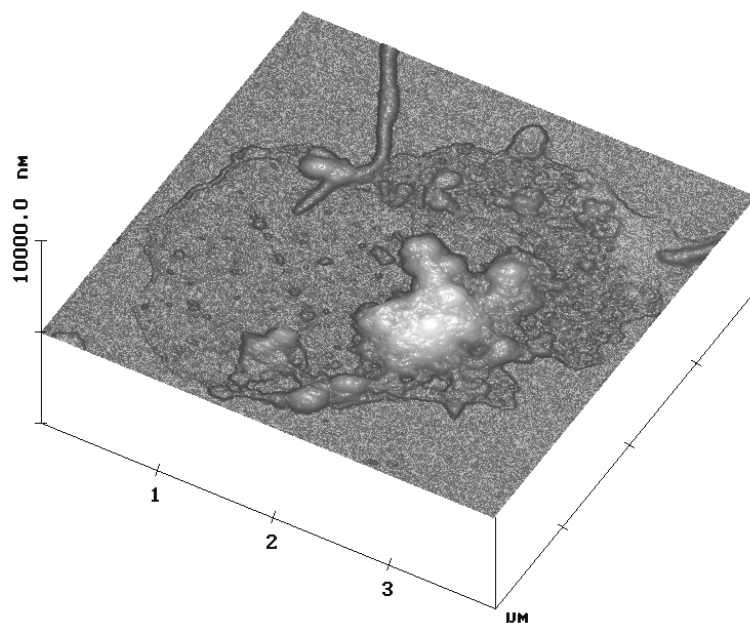


Рис. 8. Изображение тромбоцита на последней стадии адгезии к слюде, полученное с помощью АСМ. Тромбоцит уплощается, образуется «псевдодром» из гранул

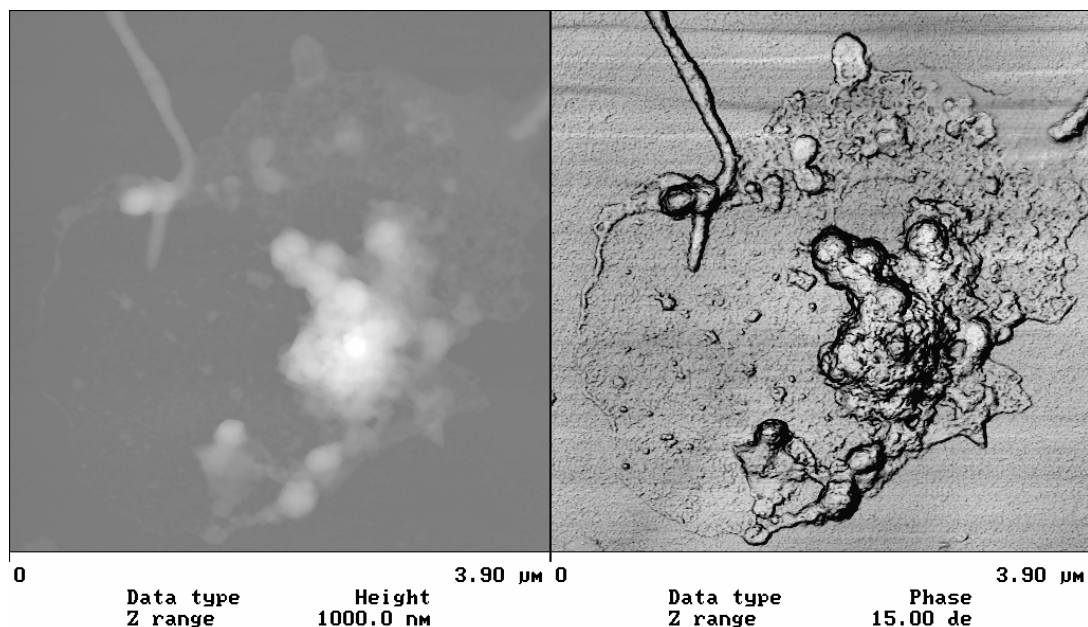


Рис. 9. Изображение тромбоцита на последней стадии адгезии к слоде, полученное с помощью АСМ. Гранулы сливаются с наружной мембраной и секретируют свое содержимое. Процесс высвобождения содержимого гранул оставляет кратеры на поверхности ламеллоподия

Дегрануляция содержимого грануломера пластинки в кровь или тканевую жидкость стимулирует дальнейший этап агрегации тромбоцитов и формирование пластинчатого конгломерата, временно блокирующего кровеносный сосуд и активирующего процессы формирования красного тромба (рис. 10, 11).

На изображениях, полученных с помощью АСМ, видно, что топографическая ориентация филоподий не хаотическая, а позволяющая оптимизировать процесс взаимодействия тромбоцитов между собой и с эритроцитом.

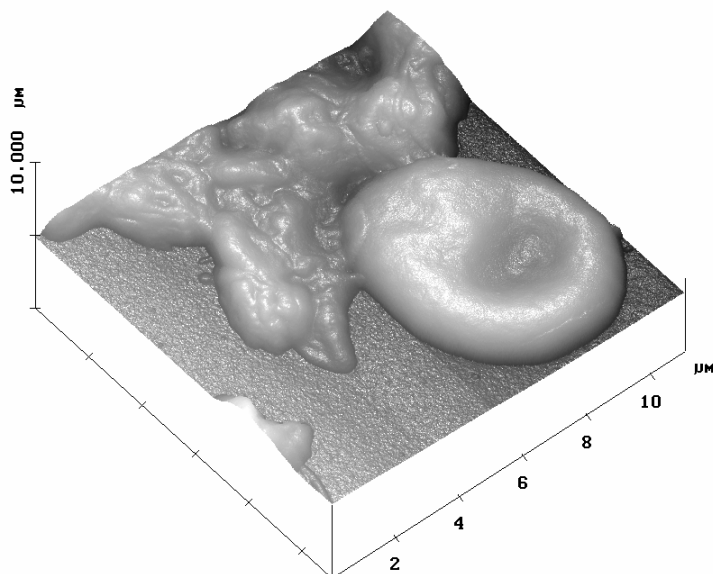


Рис. 10. Изображение активированных тромбоцитов, взаимодействующих с эритроцитом в процессе образования красного тромба, полученное с помощью АСМ

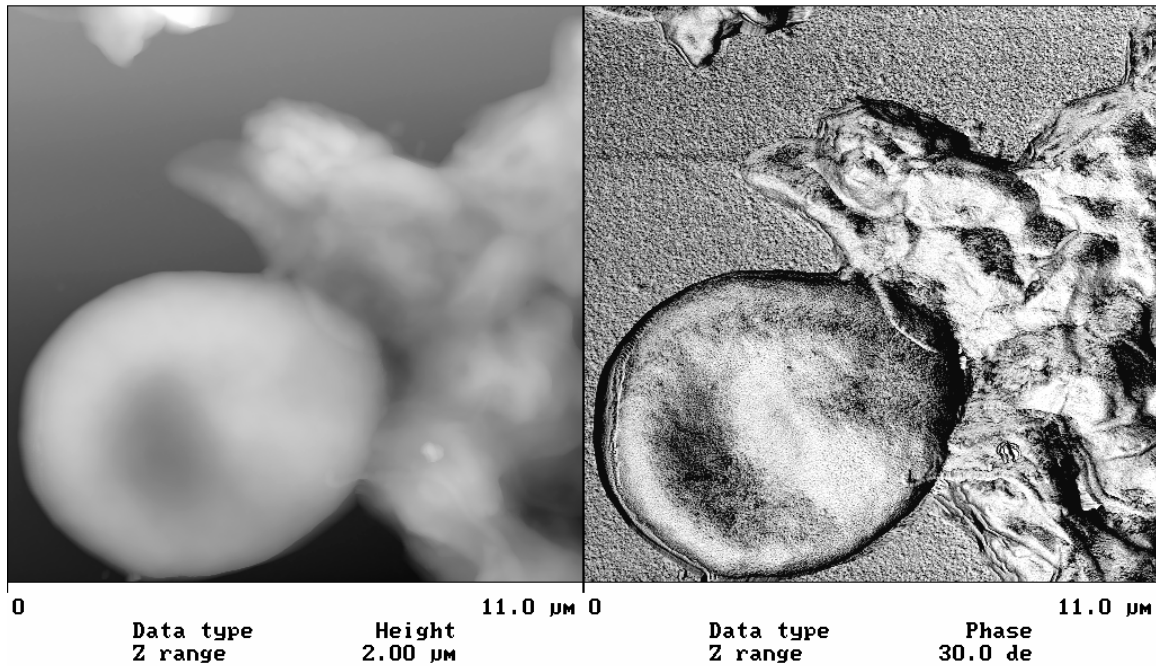


Рис. 11. Топографическое и фазовое изображение активированных тромбоцитов, полученное с помощью АСМ, взаимодействующих с эритроцитом в процессе образования красного тромба (АСМ)

Атомно-силовая микроскопия является перспективным методом, позволяющим исследовать морфофункциональные особенности тромбоцитов. Основными преимуществами метода АСМ, используемого для изучения поверхностной морфологии тромбоцитов по сравнению с традиционными способами — растровой и просвечивающей электронной микроскопии — являются:

- возможность изучения реальной поверхности тромбоцитов без применения специальных методов подготовки (напыления металлами, приготовления реплик и пр.);
- возможность проведения исследований в жидких средах, в условиях, приближенных к нативным;
- высокое пространственное разрешение (доли нанометра в плоскости образца).

Атомно-силовая микроскопия позволяет проследить за изменениями цитолеммы клетки на разных стадиях ее жизнедеятельности в реальном времени. Наибольшие перспективы использования этих возможностей АСМ открываются при исследовании лабильной поверхности клеток живого организма.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Расскажите о структуре и функциях тромбоцитов.
2. Каков механизм образования первичного (белого) тромбоцитарного сгустка?

3. Каков механизм образования вторичного (красного) тромбоцитарного сгустка?
4. Каковы биохимические пути агрегации тромбоцитов?
5. Каковы основные преимущества АСМ при исследовании тромбоцитов по сравнению с электронной микроскопией?

ЛИТЕРАТУРА

1. Хэм, А. Гистология / А. Хэм, Д. Кормак. М. : Медицина, 1999. Т 2. С. 117–125.
2. Гистология : введение в патологию / Э. Г. Улумбеков [и др.]. М. : ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1998. С. 190–195.
3. Мазуров А. В. Структура и функции мембранных гликопротеинов тромбоцитов / А. В. Мазуров, С. А. Васильев // Гематология и трансфузиология. 1994. № 1. С. 29–39.
4. Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров / под ред. И. В. Яминского. М., 1997.
5. *Procedures in Scanning Probe Microscopies* / Editors : R. J. Colton, A. Engel [et al.]. England, 1998.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Гистофизиология тромбоцитов (<i>И. А. Стельмах</i>)	3
Механизм тромбообразования (<i>И. А. Стельмах</i>).....	5
Визуализация процессов адгезии и агрегации тромбоцитов с помощью атомно-силовой микроскопии (<i>Л. В. Кухаренко</i>)	7
Контрольные вопросы.....	12
Литература	13

Учебное издание

Кухаренко Людмила Валентиновна
Стельмах Ирина Александровна

**МЕТОД АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ
В ИССЛЕДОВАНИИ
ПРОЦЕССОВ АДГЕЗИИ И АГРЕГАЦИИ
ТРОМБОЦИТОВ В НОРМЕ**

Учебно-методическое пособие

Ответственная за выпуск Л. В. Кухаренко
Редактор А. И. Кизик
Корректор Ю. В. Киселёва
Компьютерная вёрстка Н. В. Тишевич

Подписано в печать 28.06.07. Формат 60×84/16. Бумага писчая «КюмЛюкс».

Печать офсетная. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,66. Тираж 100 экз. Заказ 530.

Издатель и полиграфическое исполнение –

Белорусский государственный медицинский университет.

ЛИ № 02330/0133420 от 14.10.2004; ЛП № 02330/0131503 от 27.08.2004.

220030, г. Минск, Ленинградская, 6.