

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-1-133-137

Селективное обогащение популяции редких клеток костного мозга для электронной микроскопии

С.И. Обыденный^{1,2}, С.А. Кузнецова^{1,2}, О.С. Федянина^{1,2}, М.А. Завьялов³, А.А. Кузнецова², М.А. Пантелеев¹⁻³, И.И. Киреев³, А.В. Пшонкин¹, Н.С. Сметанина¹

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

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

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

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) – уникальный метод, в силу своего высокого разрешения позволяющий исследовать ультраструктуру клеток, а также изменения, происходящие в ней в норме и патологии. Одним из препятствий к более широкому использованию ПЭМ в диагностических целях является сложность получения образца, обогащенного исследуемыми клетками, пригодного для применения данного метода. Цель исследования – разработка способа выделения мегакариоцитов из пунктата костного мозга с помощью иммобилизованных на подложке антител к их поверхностным антигенам и протокола пробоподготовки выделенных таким образом клеток для исследования методом ПЭМ. Работа одобрена независимым этическим комитетом и утверждена решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Для выделения мегакариоцитов использовался монафрам (F(ab')₂ – фрагмент мышиного моноклонального антитела к гликопротеину IIb-IIIa), адсорбированный на предметном стекле, модифицированном диметилдихлорсиланом. Суспензия мононуклеаров, выделенных из пунктата костного мозга в градиенте Histopaque 1077, инкубировалась с иммобилизованными антителами в течение 2 ч при температуре 4°C с перемешиванием 1 раз в 20 мин. Затем образец промывали для удаления неспецифически связанных клеток, фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом, постфиксировали 1% водным раствором тетраоксида осмия, дегидратировали в ацетоне с концентрацией 30, 50, 70, 90 и 100% и пропитывали смолой Epon 812 с ацетоном в соотношениях 1:2 и 2:1 слоем не толще 0,3–0,5 мм. После застывания первого слоя смолы над областью со связанными клетками приклеивали цилиндр из смолы диаметром 8 мм и высотой 10 мм и снова полимеризовали. После застывания полимеризованную смолу отделяли от стекла с помощью скальпеля, нарезали на ультрамикротоме и исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе. С помощью описанного протокола были исследованы пунктаты костного мозга 3 пациентов с эссенциальной тромбоцитемией. Было получено согласие доноров и пациентов и/или их законных представителей на забор костного мозга и будущие биомедицинские исследования. Полученные электронные микрофотографии содержат характерные признаки мегакариоцитов: рыхлое ядро, гранулы и пузырьки демаркационной мембранной системы и соответствуют литературным данным. Описанный в работе протокол позволяет получить образцы для ПЭМ, обогащенные редкими клетками крови или костного мозга, существенно экономя временные и финансовые затраты на пробоподготовку и съемку образцов. Предложенный подход является универсальным и может быть использован не только для мегакариоцитов, но и для других клеток, в том числе при исследовании эритроидных предшественников.

Ключевые слова: мегакариоцит, ультраструктура клеток костного мозга, просвечивающая электронная микроскопия, биочип

Обыденный С.И. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (1): 133–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-1-133-137

Selective enrichment of rare bone marrow cell populations for electron microscopy

S.I. Obyedennyi^{1,2}, S.A. Kuznetsova^{1,2}, O.S. Fedyanina^{1,2}, M.A. Zavyalov³, A.A. Kuznetsova², M.A. Panteleev¹⁻³, I.I. Kireev³, A.V. Pshonkin¹, N.S. Smetanina¹

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

²Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences, Moscow

³Lomonosov Moscow State University, Moscow

Transmission electron microscopy (TEM) is a unique high-resolution method allowing to study the cell ultrastructure of normal and abnormal cells. One of the factors hindering wider application of TEM for diagnosis is the challenges associated with the collection of a sample that would be both enriched in cells of interest and suitable for TEM. The aim of this study was to develop a method for the purification of megakaryocytes from a bone marrow aspirate using antibodies to megakaryocyte surface antigens immobilized on slides as well as to describe a protocol for preparing such isolated cells for a TEM analysis. 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 of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. For megakaryocyte purification, monofram (F(ab')₂ – a fragment of a murine monoclonal antibody to glycoprotein IIb-IIIa) was adsorbed on a glass slide modified with dimethyldichlorosilane. A suspension of mononuclear cells purified from the bone marrow aspirate using the Histopaque 1077 gradient was incubated with the immobilized antibodies for 2 hours at 4°C with mixing every 20 min. The sample was then washed to remove nonspecifically bound cells, fixed with 2.5% glutaraldehyde, postfixed with 1% osmium tetroxide in water, consecutively dehydrated in 30, 50, 70, 90 and 100% acetone and embedded in a thin 0.3–0.5 mm layer of Epon 812 mixed with acetone at 1:2 and 2:1 ratios. After the polymerization of the first thin Epon 812 layer, a cylinder 8 mm in diameter and 10 mm in height was glued on top of the region with bound cells and was left to

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 24.05.2024

Принята к печати 03.02.2025



EDN: NLPTNQ

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: obyedennyi@physics.msu.ru

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPOI»

Received 24.05.2024

Accepted 03.02.2025

Correspondence:

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

polymerize. The polymerized resin was then detached from the glass slide using a scalpel, cut using an ultramicrotome and analyzed using TEM. Using this protocol, we studied bone marrow aspirates of 3 patients with essential thrombocythemia. The donors, patients and/or their legal representatives gave consent to bone marrow aspiration and further biomedical research. The obtained electron photomicrographs show all the characteristic features of megakaryocytes including loose nucleus, granules and cisternae of the demarcation membrane system and are in agreement with corresponding images in the existing literature. The suggested protocol allows to obtain TEM samples enriched in rare blood or bone marrow cells using significantly less time and money on sample preparation and photomicrography. This approach is universal and can be used not only for megakaryocytes but for other cells as well, including erythroid precursors.

Key words: megakaryocyte, bone marrow cell ultrastructure, transmission electron microscopy, biochip

Obydenyi S.I., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (1): 133–7.

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-1-133-137

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) – один из немногих методов исследования биологических объектов, позволяющих изучить их структуру на субклеточном уровне. Исследование ультраструктуры нормальных и патологических клеток методом ПЭМ позволило впервые визуализировать органеллы и другие цитоплазматические структуры клеток, а также изменения, происходящие в них в ходе дифференцировки в норме и патологии.

Среди клеток крови и кроветворной ткани наиболее сложными и чаще всего исследуемыми с точки зрения ультраструктуры являются мегакариоциты (МК) [1]. Созревание МК сопровождается появлением большого количества внутренних структур, необходимых для конечной стадии созревания – образования протромбоцитов. Электронная микроскопия позволила исследовать образование α - и плотных гранул, появление сложной системы внутриклеточных мембран, обеспечивающей образование будущих протромбоцитов (демаркационной мембранной системы) на различных стадиях созревания МК [2, 3], а также определить роль актинового и тубулинового цитоскелетов в образовании протромбоцитов [4].

Основной проблемой при исследовании ультраструктуры МК является их малочисленность (< 0,05% всех ядерных клеток костного мозга). Поэтому большинство исследований МК человека методами оптической и электронной микроскопии, как в норме [5], так и при патологии [6], проводится на культурах МК, полученных из CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток, выделенных из периферической [5, 6] или пуповинной [7] крови, либо напрямую из пунктатов костного мозга [8]. Тем не менее все большее количество экспериментальных данных свидетельствует о том, что взаимодействие МК с его микроокружением в костном мозге оказывает большое влияние на его созревание, и культивированные МК существенно отличаются от нативных, как структурно, так и функционально [9, 10]. Поэтому разработка методов получения обогащенных суспензий МК из пунктатов костного мозга для электронной микроскопии имеет

большое практическое значение. В работе R.F. Levine [11] описано выделение нативных МК из биоматериала, полученного при торакотомии, включающее последовательное центрифугирование в двух градиентах бычьего сывороточного альбумина. Однако этот протокол требует большого количества биоматериала и не применим к пунктатам костного мозга.

Ранее было показано, что для исследования малочисленных подгрупп лейкоцитов крови и костного мозга может быть использован клеточный биочип – прозрачная подложка с иммобилизованными на ней антителами к поверхностным дифференцировочным антигенам лейкоцитов [12]. При инкубации суспензии лейкоцитов с биочипом клетки специфически связываются с иммобилизованными на поверхности антителами к линейноспецифичным антигенам. После отмывки на биочипе остаются области, обогащенные клетками определенного типа, которые затем могут быть исследованы методами световой микроскопии. Такой подход был ранее применен для выделения эритроидных предшественников при диагностике дизэритропоэтической анемии [13] и для исследования МК пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича [14].

В данной работе описан способ выделения и концентрирования МК с помощью иммобилизованных на силанизованном стекле фрагментов антител к поверхностным антигенам МК, а также протокол пробоподготовки связавшихся с иммобилизованными антителами клеток для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Силанизация стекол

Предметные стекла (75 × 25 мм, Heinz Herenz, Германия) очищали соникацией в изопропиловом спирте в течение 15 мин в бытовой ультразвуковой ванне, высушивали на воздухе и обрабатывали кислородной плазмой (Harrick Plasma, США) в течение

5 мин в режиме High. Обработанные стекла погружали по одному в 2% раствор диметилдихлорсилана (Sigma, США) в толуоле и инкубировали 30 мин, затем промывали толуолом, соникировали в изопропиловом спирте в ультразвуковой ванне и высушивали. Модифицированные стекла хранили в чашках Петри с осушителем при 4°C до использования.

Иммобилизация антител на силанизованных стеклах и поливинилхлоридных подложках

В центре силанизованного стекла алмазным карандашом (Bochem, Германия) с лицевой и обратной сторон наносили контуры области иммобилизации антител 2–3 мм в диаметре. Раствор антител в фосфатно-соляном буфере (pH 7,2–7,4) наносили на отмеченную область, стекла с антителами помещали в чашки Петри и инкубировали 12–14 ч при 4°C до полного высыхания. После этого стекла заливали раствором 5% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США) на фосфатно-соляном буфере и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем стекла споласкивали дистиллированной водой, высушивали и хранили в чашках Петри с осушителем при 4°C до использования. Иммобилизация антител на подложках из поливинилхлорида проводилась в соответствии с ранее описанным протоколом [14]. Для связывания МК в работе использовали моноклональный антител к гликопротеину IIb–IIIa, предоставлен лабораторией А.В. Мазурова). В экспериментах по инкубации с перемешиванием применяли мышинные моноклональные антитела к CD19 (клон LT19, ООО «Сорбент», Россия).

Концентрирование клеток с помощью иммобилизованных антител

Мононуклеарную фракцию из 10 мл периферической крови или 2,6 мл пунктата костного мозга, взятого на К₂ЭДТА, выделяли методом центрифугирования в градиенте Histopaque 1077 в соответствии с рекомендациями производителя. Выделенную мононуклеарную фракцию клеток переводили в 500 мкл фетальной телячьей сыворотки (Sigma, США). На стеклах с иммобилизованными антителами собирали самодельные цилиндрические камеры с диаметром дна 1 см. Суспензию клеток заливали в камеры и инкубировали при 4°C в течение 2 ч без перемешивания или с перемешиванием каждые 20 мин с помощью ручного дозатора. После этого камеры разбирали, несвязавшиеся клетки отмывали в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина на фосфатно-соляном буфере. Стекла со связавшимися клетками заливали 2,5% глутаровым альдегидом и хранили в нем при 4°C до начала пробоподготовки к электронной микроскопии.

Электронная микроскопия

Стекла со связавшимися клетками отмывались от фиксирующего раствора и постфиксировались 1% водным раствором тетраоксида осмия (Sigma, США) в течение 1 ч с последующей дегидратацией образца в ацетоне с концентрацией 30, 50, 70, 90 и 100% в течение 15 мин с трехразовым повторением для 100% ацетона. После образец пропитывался смолой Epon 812 (Sigma, США) с ацетоном в соотношениях 1:2 и 2:1 по 30 мин. Затем образец пропитывался смолой без добавок 12 ч при 37°C, далее смола заменялась и образец для полимеризации выдерживался 36 ч при 60°C. Толщина слоя смолы при пропитке иммобилизованных клеток не превышала 0,3–0,5 мм. После застывания первого слоя смолы над областью со связанными клетками приклеивали цилиндр из смолы диаметром 8 мм и высотой 10 мм и снова полимеризовали при 60°C не менее суток.

После застывания полимеризованную смолу отделяли от стекла с помощью скальпеля и нарезали на ультрамикротоме (Leica EM UC7). Толщина срезов составляла порядка 100 нм. Срезы помещались на медные сетки, покрытые пленкой из 0,2% раствора формвара в 1,2-дихлорэтаноле. Контрастирование срезов производилось 2% водным раствором ацетата уранила (SPI-Chem) 30 мин и 5 мин цитратом свинца (SPI-Chem). Готовые срезы исследовались на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL).

Пациенты

Для исследования возможности концентрации клеток при инкубации с перемешиванием была использована кровь 3 здоровых доноров. Электронно-микроскопическое исследование МК костного мозга было проведено для 3 пациентов с эссенциальной тромбоцитемией (2 мальчика и 1 девочка в возрасте 5–14 лет, медиана возраста 9 лет). Согласие доноров и пациентов и/или их законных представителей на забор костного мозга и будущие биомедицинские исследования было получено.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрирование мегакариоцитов на силанизованном стекле с иммобилизованными антителами

Основной проблемой при пробоподготовке монослоя клеток к трансмиссионной электронной микроскопии являются заливка образца смолой и нарезка. При этом в литературе используется два подхода: «соскабливание» клеток с подложки в суспензию и применение стандартного протокола пробоподготовки к ПЭМ, разработанного для суспензий, или заливка клеток смолой на подложке, отделение от нее слоя смолы с клетками и повторная

заливка или приклеивание этого слоя с помощью той же смолы к пустому блоку для последующей нарезки [15]. Первый вариант не мог быть использован из-за крайне малого количества клеток. Предварительные эксперименты с использовавшимися в предыдущих работах [12–14] подложками из поливинилхлорида показали, что при отделении смолы от подложки с применением всех описанных в литературе процедур (механическое отделение, нагревание, охлаждение) ее слой изгибается, делая невозможной нарезку слоя смолы с клетками. Поэтому в качестве подложки было решено использовать предметное стекло.

Для дополнительного увеличения плотности связавшихся с иммобилизованными антителами клеток был предложен протокол инкубации с перемешиванием. При инкубации одной и той же суспензии мононуклеарных клеток периферической крови здорового донора с силанизованным стеклом с иммобилизованными моноклональными мышиными антителами к CD19 отношение плотности связавшихся клеток при инкубации с перемешиванием к плотности клеток при инкубации без перемешивания, использовавшейся ранее [12–14], составило $5,2 \pm 0,4$ (среднее по 3 экспериментам). Таким образом, использование перемешивания позволяет существенно увеличить плотность связавшихся с иммобилизованными антителами клеток.

Электронная микроскопия

Для заливки и нарезки монослоя связавшихся с иммобилизованными на стекле антителами клеток использовался протокол, описанный в разделе «Материалы и методы исследования», основанный на предложенных L.R. Trusal и соавт. [15] и Н.Н. Hanson и соавт. [16] протоколах с небольшими модификациями. Отделение смолы от стекла проводилось механически, без нагревания и охлаждения.

Результаты ПЭМ мононуклеарных клеток пунктата костного мозга 14-летнего пациента с эссенциальной тромбоцитемией, связавшихся с монафраном, иммобилизованном на стекле, модифицированном диметилдихлорсиланом, представлены на рисунке.

Полученные результаты хорошо соответствуют опубликованным в литературе фотографиям МК человека, полученным методом электронной микроскопии. На них хорошо видны характерные признаки МК: рыхлое ядро, гранулы и пузырьки демаркационной мембранной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанный протокол позволяет проводить исследование нативных МК, выделенных из костного мозга. Использование стекол с иммо-

Рисунок

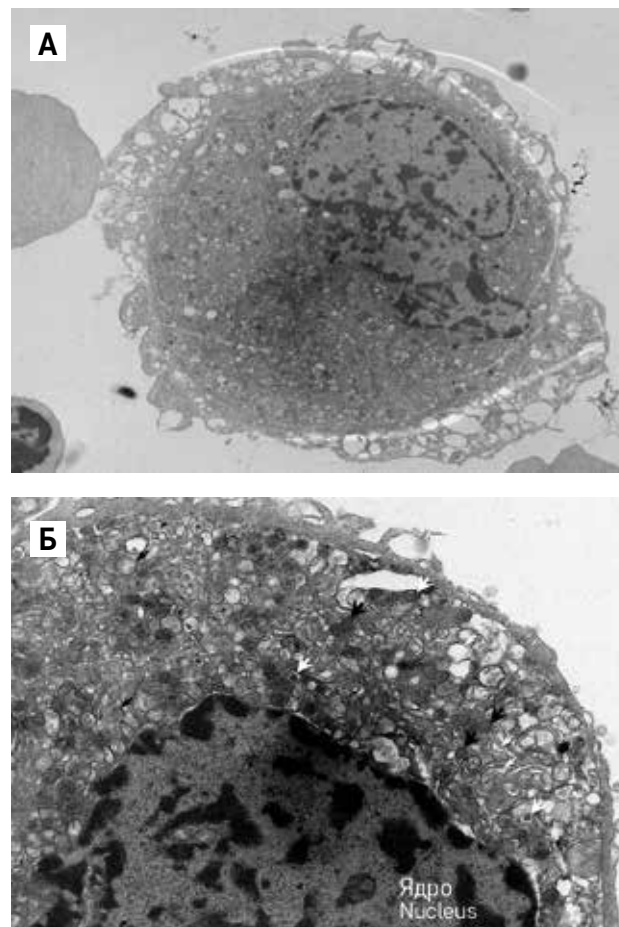
Изображения МК пациента с эссенциальной тромбоцитемией, полученные с помощью электронной микроскопии: А – $\times 2000$; Б – $\times 5000$

Толстые черные стрелки – α -гранулы; толстые белые стрелки – плотные гранулы; тонкие черные стрелки – митохондрии; тонкие белые стрелки – пузырьки и каналы демаркационной мембранной системы

Figure

Images showing megakaryocytes of the patient with essential thrombocythemia obtained by electron microscopy: А – $\times 2000$; Б – $\times 5000$

Bold black arrows indicate alpha granules; bold white arrows – dense granules; fine black arrows – mitochondria; fine white arrows – cisternae and tubules of the demarcation membrane system



билизованными антителами к поверхностным антигенам МК и инкубацией с перемешиванием позволило получить изображения ПЭМ 10 МК из 2,6 мл пунктата костного мозга, в то время как при исследовании мононуклеарной фракции того же количества пунктата получить изображения МК, как правило, не удастся. Данный подход может быть использован для исследования ультраструктурных изменений МК в норме и патологии. Кроме того, описанный метод применим и к другим редким диагностически важным клеткам костного мозга, например к эритроидным предшественникам, ультраструктура которых играет решающую роль при диагностике дизэритропоэтической анемии [17].

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №23-75-10120.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Obydenyi S.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2930-8768>
Kuznetsova S.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5946-0026>
Fedyanina O.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7131-8006>
Kuznetsova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-7209-945X>
Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>
Kireev I.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9252-6808>
Pshonkin A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2057-2036>
Smetanina N.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2756-7325>

Литература / References

- Scandola C., Erhardt M., Rinckel J.Y., Proamer F., Gachet C., Eckly A. Use of electron microscopy to study megakaryocytes. *Platelets* 2020; 31 (5): 589–98.
- Zucker-Franklin D., Stahl C., Hyde P. Megakaryocyte Ultrastructure: Its Relationship to Normal and Pathologic Thrombocytopoiesis. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 509 (1): 25–33.
- Ru Y.X., Zhao S.X., Dong S.X., Yang Y.Q., Eyden B. On the maturation of megakaryocytes: a review with original observations on human *in vivo* cells emphasizing morphology and ultrastructure. *Ultrastruct Pathol* 2015; 39 (2): 79–87.
- Patel S.R., Richardson J.L., Schulze H., Kahle E., Galjart N., Drabek K., et al. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* 2005; 106 (13): 4076–85.
- Falcieri E., Bassini A., Pierpaoli S., Luchetti F., Zamai L., Vitale M., et al. Ultrastructural characterization of maturation, platelet release, and senescence of human cultured megakaryocytes. *Anat Rec* 2000; 258 (1): 90–9.
- Haddad E., Cramer E., Rivière C., Rameau P., Louache F., Guichard J., et al. The thrombocytopenia of Wiskott Aldrich syndrome is not related to a defect in proplatelet formation. *Blood* 1999; 94 (2): 509–18.
- Cuenca-Zamora E.J., Ferrer-Marín F., Rivera J., Teruel-Montoya R. Tubulin in platelets: when the shape matters. *Int J Mol Sci* 2019; 20 (14): 3484.
- Butov K.R., Osipova E.Y., Mikhailkin N.B., Trubina N.M., Panteleev M.A., Machlus K.R. *In vitro* megakaryocyte culture from human bone marrow aspirates as a research and diagnostic tool. *Platelets* 2021; 32 (7): 928–35.
- Bornert A., Boscher J., Pertuy F., Eckly A., Stegner D., Strassel C., et al. Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate *in vivo* and *in vitro* proplatelet formation. *Haematologica* 2021; 106 (5): 1368.
- Eckly A., Scandola C., Oprescu A., Michel D., Rinckel J.Y., Proamer F., et al. Megakaryocytes use *in vivo* podosome-like structures working collectively to penetrate the endothelial barrier of bone marrow sinusoids. *J Thromb Haemost* 2020; 18 (11): 2987–3001.
- Levine R.F. Isolation and characterization of normal human megakaryocytes. *Br J Haematol* 1980; 45 (3): 487–97.
- Khvastunova A.N., Kuznetsova S.A., Al-Radi L.S., Vylegzhanina A.V., Zakirova A.O., Fedyanina O.S., et al. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. *Sci Rep* 2015; 5 (1): 12573.
- Обыденный С.И., Федянина О.С., Хвастунова А.Н., Закирова А.О., Пантелеев М.А., Киреев И.И. и др. Морфологическое исследование костного мозга при врожденной дизэритропоэтической анемии: селективное обогащение популяций клеток для световой и электронной микроскопии с помощью биочипа и центрифугирования в градиенте плотности. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2018; 17 (1): 104–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-104-107 [Obydenyi S.I., Fedyanina O.S., Khvastunova A.N., Zakirova A.O., Panteleev M.A., Kireev I.I., et al. Bone marrow cell morphology in congenital dyserythropoietic anemia: selective enrichment of the studied cell population for light and electron microscopy using a microarray and centrifugation in a density gradient. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2018; 17 (1): 104–7. (In Russ.)].
- Obydenyi S.I., Kuznetsova S.A., Fedyanina O.S., Khoreva A., Voronin K., Mazurov A.V., et al. Accelerated death of megakaryocytes from Wiskott–Aldrich syndrome patients. *Br J Haematol* 2023; 202 (3): 645–56.
- Trusal L.R., Baker C.J., Guzman A.W. Transmission and scanning electron microscopy of cell monolayers grown on polymethylpentene coverslips. *Stain Technol* 1979; 54 (2): 77–83.
- Hanson H.H., Reilly J.E., Lee R., Janssen W.G., Phillips G.R. Streamlined embedding of cell monolayers on gridded glass-bottom imaging dishes for correlative light and electron microscopy. *Microsc Microanal* 2010; 16 (6): 747–54.
- Ru Y.X. Diagnosis of Congenital Dyserythropoietic Anaemia Types I and II by Transmission Electron Microscopy. In: *Diagnostic Electron Microscopy: A Practical Guide to Interpretation and Technique*. Stirling J., Curry A., Eyden B. (eds.). Wiley; 2012. Pp. 293–308.