

## Porovnanie analýzy doštičkových glykoproteínov v celej krvi a v plazme bohatej na doštičky.

Ingrid Škorňová<sup>1</sup>, Ján Staško<sup>1</sup>, Jiří Šinkora<sup>2</sup>, Peter Kubisz<sup>1</sup>, Ľubica Agricolová<sup>1</sup>, Monika Brunclíková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfúziológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Univerzitná nemocnica Martin, Slovensko

<sup>2</sup>Becton Dickinson Czechia, s. r. o., Praha, Česká republika

Na povrchu membrány krvnej doštičky sa nachádza veľké množstvo receptorov, ktoré slúžia na zachytenie signálu, zabezpečujú jeho prenos a podieľajú sa na prestupe látok cez membránu. Pomocou prietokovej cytometrie môžeme merať cirkulujúce neaktivované, ale aj aktivované krvné doštičky. Naším cieľom bolo zistiť, či metóda stanovenia doštičkových glykoproteínov v plazme bohatej na doštičky (platelet rich plasma, PRP), ktorá je považovaná za zlatý štandard analýzy trombocytov, spôsobuje zvýšenie povrchovej expície antigénu CD62P. V článku uvádzame vlastné skúsenosti získané porovnaním analýzy doštičkových glykoproteínov vo vzorkách celej krvi a v PRP.

**Kľúčové slová:** doštičkové glykoproteíny, prietoková cytometria

### *Comparison of platelet glycoprotein analysis in the whole blood and plasma rich in platelets*

The membrane of a platelet is rich in receptors mediating signal sensing and transmission and participating in substance transport across the membrane. Flow cytometry can measure the circulation of non-activated as well as activated platelets by qualitative and/or quantitative analysis of surface markers expressed at a certain level during the life cycle of platelets. We aimed to determine whether the method of measurement of the platelet glycoproteins expression in the platelet-rich plasma (PRP) results in altered expression of the CD62P activation antigen on the platelet surface. In this article, we present our own experience. We compare platelet glycoprotein analysis in whole blood and PRP.

**Keywords:** platelet glycoproteins, flow cytometry

**NewsLab, 2021; roč. 12 (1): 5 – 7**

### Úvod

Krvné doštičky sú bezjadrové úlomky cytoplazmy vznikajúce z megakaryocytov v kostnej dreni. Denná produkcia krvných doštičiek je  $1,2 - 1,5 \times 10^{11}$ , v periférnej krvi sa nachádzajú v priemernom počte  $150 - 400 \times 10^9/l$  a majú objem  $6 - 12 \text{ fl}^{(1)}$ . V panoptickom krvnom nátere sa zobrazujú doštičky ako oválne alebo okrúhle objekty s priemernou veľkosťou  $1,5 - 3 \mu\text{m}$ . V ich strede sa nachádzajú červenofialové granuly (granuloméry) obklopené jemne bazofilnou cytoplazmou (hyaloméra), ktorá je ohraničená plazmatickou membránou<sup>(2)</sup>.

Na povrchu membrány krvnej doštičky sa nachádza veľké množstvo receptorov, ktoré slúžia na zachytenie signálu, zabezpečujú jeho prenos a podieľajú sa na prestupe látok cez membránu. Popri bežných membránových receptoroch majú na povrchu doštičiek dôležitú úlohu glykoproteíny. Zmeny štruktúry a funkcie glykoproteínov krvných doštičiek môžu spôsobovať poruchy zrážania krvi<sup>(3)</sup>. Biologické procesy regulované doštičkami sú tiež sprostredkované membránovými glykoproteínmi (GP), ktoré sa označujú rímskymi číslicami, a ich podskupiny malými arabskými písmenami. V súčasnosti je známych viac ako 50 membránových glykoproteínov, pričom každý glykoproteín po obsadení svojho väzbového miesta zabezpečuje priebeh určitého deja. Na

membráne sa nachádzajú aj receptory slúžiace na naviazanie aktivačných a stimulačných látok koagulácie<sup>(4,5)</sup>.

P-selektín, GMP-140 (CD62P) je membránový glykoproteín granúl krvných doštičiek, patrí k adhezívnym molekulám. V pokojovom stave sa nachádza v membránach  $\alpha$ -granúl a v endoteli vo Weibelových-Paladeho telieskach. Po aktivácii je P-selektín uvoľnený z granúl. Pokojové doštičky exprimujú asi 1 000 molekúl P-selektínu, aktivovaných je viac ako 10 000 molekúl. Exponovaný P-selektín sa zúčastňuje na eliminácii aktivovaných krvných doštičiek z cirkulácie a sprostredkuje adhéziu neutrofilov a monocytov na tromby a endotelové bunky<sup>(6,7)</sup>.

Prietoková cytometria je proces, ktorý umožňuje kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu optických a fluorescenčných vlastností jednotlivých buniek alebo iných častíc v suspenzii. Prietokový cytometer sa skladá z fluidného, optického a počítačového systému. Výsledkom analýzy je v našom prípade graficky znázornená (ko)expresia povrchovej glykoproteínov v populácii krvných doštičiek a dostupná súhrnná štatistika. S cieľom posúdiť aktiváciu krvných doštičiek môžeme použiť testovanie povrchovej expície aktivačného znaku CD62P pomocou väzby fluorescenčne značenej monoklonálnej protilátky namierenej proti tomuto antigénu, vizualizovanej prietokovou cytometriou.

Le Minh a kolektív sledovali prvé príznaky aktivácie trombocytov po indukcii ADP a porovnali dve metódy založené na morfológických a biochemických markeroch<sup>(8)</sup>. Skenovacia elektrónová mikroskopia krvných doštičiek sa uskutočňovala paralelne s prietokovou cytometriou, aby sa kvantifikovala povrchová expresia P-selektínu, aktívneho  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -integrínu a fosfatidylserínu. Na základe získaných výsledkov boli sledované zmeny tvaru najcitlivejšie na nízku koncentráciu ADP v porovnaní s biochemickými markermi v nasledujúcom poradí citlivosti: morfológické zmeny > väzbová kapacita fibrinogénu > expresia P-selektínu > expozícia fosfatidylserínu. Tieto výsledky poukazujú na vyššiu citlivosť krvnej doštičky a výhody využitia prietokovej cytometrie na detekciu povrchovej exprese P-selektínu ako markera aktivácie krvných doštičiek.

Využitie prietokovej cytometrie zamerané na štúdium prokoagulačných krvných doštičiek v pokojových a agonistom stimulovaných podmienkach v celej krvi a premytých krvných doštičiek ľudských a myších vzoriek opisuje vo svojej práci Than a kol.<sup>(9)</sup>

Výšetrenia glykoproteínov trombocytov majú význam v posudzovaní stavov s trombocytovou hypo- a hyperreaktivitou a pri diferenciálnej diagnostike trombocytopenií. Znížená expresia GPIIb/IIIa, t. j. CD41/CD61, svedčí o Glanzmannovej trombasténii, pri zníženej expresii GPIb/V/IX, t. j. CD42b/CD42a, ide o Bernardov-Soulierov syndróm. V uvedených prípadoch ide o hereditárne trombocytopenie, ale výšetrenie glykoproteínov trombocytov sa odporúča aj pri stavoch s ich hyperreaktivitou (aterosklerotické cievne ochorenia, diabetes mellitus, arteriálne a venózne trombózy, umelé chlopne, chronické zápalové črevné ochorenia, systémové ochorenia) alebo hyporeaktivitou (vrodené defekty receptorov trombocytov, renálne a hepatálne insuficiencie, esenciálne trombocytémie. Väčšinou sa hodnotia zmeny adhezívnych receptorov ako GPIb, t. j. CD42b/CD42a, GPIIb/GPIIIa, t. j. CD41/CD61, a aktivačných markerov GMP 140, t. j. CD62P, GP53, t. j. CD63, trombospondínový receptor CD36<sup>(10)</sup>.

## Materiál a metodika

### Príprava vzorky

Vzorku krvi na analýzu doštičkových glykoproteínov sme pacientom odobrali do jednorazovej vakutajnerovej skúmavky s antikoagulantom 3,2 % (0,109 mol/l) citrónanom sodným.

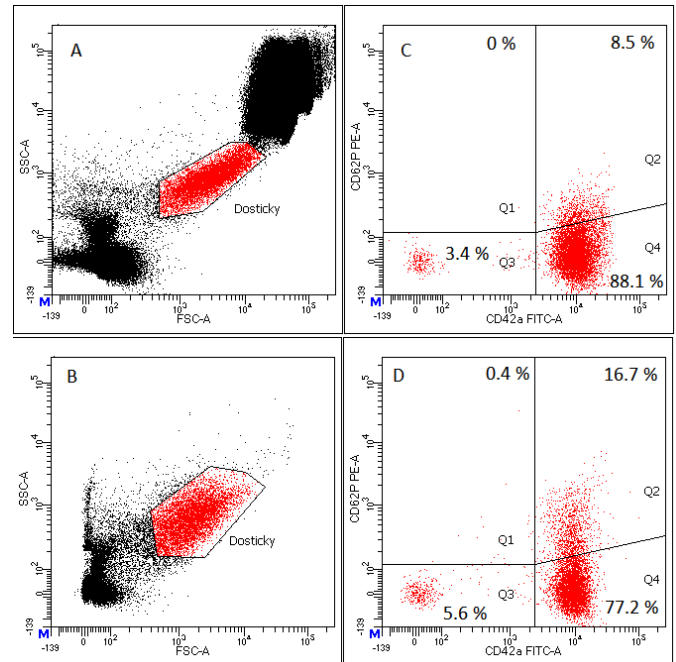
Skúmavku s krvou sme centrifúgovali pri 200 g 10 minút. PRP sme oddelili od krviniek do inej skúmavky.

### Metóda

Doštičkové glykoproteíny sme analyzovali na prietokovom cytometri FACSVerse (Becton Dickinson and company, San Jose, USA). Pre povrchovú imunofenotypizáciu sme použili techniku dvojitého priameho značenia fluorinovanými monoklonálnymi protilátkami: anti-CD42a/FITC (clone SZ1, Beckman Coulter, San Diego, USA), anti-CD62P/PE (clone AC1.2, Becton Dickinson).

Naším cieľom bolo zistiť, či metóda stanovenia doštičkových glykoproteínov v PRP, ktorá je považovaná za zlatý štandard, ovplyvňuje expresiu CD62P na doštičkách. Vychádzali sme z predpokladu, že plazmu bohatú na doštičky pripravujeme centrifugáciou celej krvi, čím môžeme spôsobiť čiastoč-

**Obrázok 1.** Porovnanie koexpresie CD42a a CD62P na krvných elementoch veľkosti doštičiek v celej krvi (A, C) a v PRP (B, D). Bodové diagramy C a D ukazujú (ko)expresiu glykoproteínov CD42a a CD62P na udalostiach z oblasti „doštičky“ v diagramoch A a B.



nú aktiváciu doštičiek. Každému z 50 zdravých darcov krvi bola stanovená expresia CD62P v celej krvi a súčasne v PRP.

Ako pozitívnu kontrolu sme použili aktivované krvné doštičky, ktoré sme aktivovali ADP s finálnou koncentráciou 10  $\mu\text{M}$  (CD42b-FITC/CD62P-PE). Ako negatívnu kontrolu sme použili izotypovú kontrolu IgG1/IgG2 (FITC/PE).

## Výsledky

**Obrázok 1** ukazuje spôsob analýzy a rozdiel medzi expresiou CD62P na doštičkách charakterizovaných pomocou rozptylových parametrov (FSC a SSC, oblasť „doštičky“) a expresiou antigénu CD42a v celej krvi (A, C) a v PRP (B, D). Čísla v jednotlivých kvadrantoch štatisticky v C a D vyjadrujú percentuálne zastúpenie jednotlivých populácií objektov z oblasti „doštičky“, zastúpenie CD62P – pozitívnych doštičiek bolo určené ako  $100\% \times (\%Q2)/(\%Q2 + \%Q4)$ . V prípade uvedenom na obrázku č. 1 spôsobila príprava PRP zdvojnásobenie zastúpenia CD42+CD62P+ doštičiek v PRP vzorke (16,7 %) v porovnaní so vzorkou celej krvi (8,5 %).

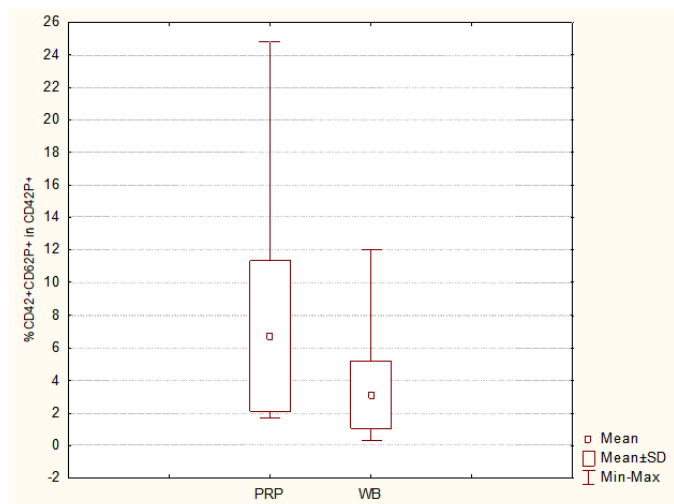
## Diskusia

Jedným z cieľov práce bolo porovnať dve metódy analýzy krvných doštičiek, a to stanovenie exprese doštičkových glykoproteínov v celej krvi a v PRP u zdravých darcov (v kontrolnej skupine).

Porovnaním oboch metód na základe stanovenia koexpresie CD42a/CD62P znázornené **na obrázku 1** sme zistili štatistickú významnosť CD42a/CD62P v PRP oproti celej krvi ( $P < 0,0005$ ; **graf 1**).

Na základe získaných štatistických výsledkov sa javí metóda stanovenia doštičkových glykoproteínov v celej krvi praktickejšia a šetrnejšia pre krvné doštičky než metóda stanovenia v PRP. Porovnaním analýz exprese CD42a-FITC/CD62P-PE v celej krvi a v PRP v kontrolnej skupine sme zistili,

**Graf 1.** Porovnanie koexpresie CD42a/CD62P v PRP a v WB;  
PRP – plazma bohatá na doštičky, WB (whole blood) – celá krv



	n	d	Sd	Median	min	max
PRP_% CD42+CD62P+ in CD42P+	50	6,7	4,6	5,5	1,7	24,8
WB_% CD42+CD62P+ in CD42P+	50	3,1	2,1	2,5	0,3	12,0

Wilcoxon test	Z	P
PRP vs WB	5,777	0,000

že izolácia PRP vplyva na aktiváciu doštičiek do takej miery, že rozdiel je oproti metóde v celej krvi štatisticky významný s hodnotou  $P \ll 0,0005$ . Expresia CD62P na doštičkách v PRP je v porovnaní s expresiou CD62P na doštičkách v celej krvi štatisticky významne zvýšená.

### Záver

Porovnaním analýz expresie CD42a-FITC/CD62P-PE v celej krvi a v PRP v kontrolnej skupine sme zistili, že izolácia PRP vplyva na aktiváciu doštičiek do takej miery, že rozdiel je oproti metóde v celej krvi štatisticky významný s hodnotou  $P \ll 0,0005$ . Expresia CD62P na doštičkách v PRP je v porovnaní s expresiou CD62P na doštičkách v celej krvi štatisticky významne zvýšená.

Použitím metódy analýzy doštičkových glykoproteínov v celej krvi sa priblížime podmienkam in vivo a minimalizujeme aktiváciu doštičiek.

### PodĎakovanie

Táto práca bola podporená projektami APVV – 16-0020, Vega 1/0168/16, Vega 1/0187/17 a Centra excelentnosti pre perinatologický výskum (CEPV II, ITMS 26220120036) a Centra excelentnosti pre výskum v personalizovanej terapii (CEVYPET).

### LITERATÚRA

1. Penka M a kol. Hematologie a transfúzní lékařství I. Grada Publishing, a. s., 2011, 33.
2. Sakalová A a kol. Hematológia a transfúziológia, Vydavateľstvo Osveťa, 1995, 102-103.
3. Nosál R, Jančinová V. Krvné doštičky v biológii a medicíne. Veda, Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava, 1990, 15-16.
4. Evans WH, Graham JM. Membrane structure and function. Oxford, England: Oxford IRL Press, Oxford University Press, 1988, 11-29.
5. Staško J, Bartošová L, Mýtnik M, Kubisz P. Are the platelets activated in sticky platelet syndrome? Thromb Res, 2011, 128: 96-97.
6. Curvers J, de Wildt-Eggen J, Heeremans J, et al. Flow cytometric measurement of CD62P (P-selectin) expression on platelets: a multicenter optimization and standardization effort. Transfusion. 2008 Jul;48(7):1439-46.

7. Vučetić D, Ilić V, Vojvodić D, et al. Flow cytometry analysis of platelet populations: usefulness for monitoring the storage lesion in pooled buffy-coat platelet concentrates. Blood Transfus. 2018 Jan;16(1):83-92.
8. Le Minh G, Peshkova AD, Andrianova IA, et al. Differential sensitivity of various markers of platelet activation with adenosine diphosphate. Bionanoscience. 2019 marec; 9 (1): 53-58. Epub 2018, 10. decembra.
9. Tan CW, Bourcy M, Pasalic L, Chen VM. Flow Cytometry Assessment of Procoagulant Platelets Using a Dithiol-Reactive Probe. Methods Mol Biol. 2019;1967:305-321.
10. Kubisz P a kol. Hematológia a transfúziológia, Grada Publishing, a. s., 2006, 257-260.



**Ing. Ingrid Škorňová, PhD.**

Národné centrum hemostázy a trombózy  
Klinika hematológie a transfúziológie JLF UK a UNM, Martin  
Kollárova 2, 036 01 Martin  
e-mail: ingrid.skornova@uniba.sk