

©Borgis

*Joanna Bienias, Krystyna Jagoda, Mirosław Markiewicz, Agata Wieczorkiewicz-Kabut, Sławomira Kyrz-Krzemień

Standaryzacja metody oznaczenia ekspresji P-selektyny na płytkach krwi przy pomocy cytometru przepływowego oraz analiza porównawcza z metodą agregometrii impedancyjnej u chorych na ostrą białaczkę szpikową

Standardization of the method to determine the expression of P-selectin on platelets by means of the flow cytometer and comparison with impedance aggregometry method in acute myeloid leukemia patients

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Sławomira Kyrz-Krzemień

Słowa kluczowe

aktywacja płytek krwi, P-selektyna, cytometria przepływowa, ostra białaczka szpikowa

Key words

platelet activation, P-selectin, flow cytometry, acute myeloid leukemia

Streszczenie

Wstęp. Uszkodzenie śródbłonna naczyniowego, stan zapalny lub zaburzenia zakrzepowe powodują aktywację płytek krwi. Aktywowane płytki krwi wykazują ekspresję P-selektyny na swojej powierzchni. Badanie ekspresji P-selektyny na płytkach krwi przy użyciu cytometru przepływowego pozwala na jednoczesną ocenę aktywacji płytek krwi (stanu pobudzenia) i ich reaktywności (czynności).

Cel pracy. Opracowanie optymalnych warunków reakcji aktywacji płytek krwi agonistą ADP oraz czasu przechowywania próbek po wyznakowaniu i utwaleniu. Analiza porównawcza funkcji płytek krwi badanych metodą cytometrii przepływowej i agregometrii impedancyjnej.

Materiał i metody. Badaniem objęto 33 pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML) oraz 26 zdrowych dawców. Próbkę krwi pobrane od zdrowych dawców inkubowano z 10 $\mu\text{M/l}$ i 20 $\mu\text{M/l}$ ADP przez 2, 5, 10 i 15 min. Płytki znakowano przeciwciałami CD61-FITC, CD45-PerCP i CD62P-PE. Zbadano stabilność próbki po 2, 3, 4, 5 i 6 godzinach przechowywania. Oceniono czynność płytek krwi u pacjentów z AML metodą cytometryczną i agregometrii impedancyjnej oraz porównano otrzymane wyniki.

Wyniki. Po zastosowaniu 20 $\mu\text{M/l}$ ADP przez 2 i 5 minut uzyskano ekspresję P-selektyny: $67,7 \pm 3,0\%$ i $67,6 \pm 2,3\%$. Wydłużenie czasu aktywacji powodowało obniżenie udziału komórek CD62P dodatnich: $60,5 \pm 3,8\%$ i $56,4 \pm 4,1\%$ ($p < 0,05$). Płytki krwi aktywowane 10 $\mu\text{M/l}$ ADP wykazywały niższy odsetek CD62P ($p < 0,05$). Wraz ze wzrostem czasu inkubacji wzrastała liczba agregatów ($p < 0,05$). Oznaczenia ekspresji P-selektyny w 5 punktach czasowych były porównywalne $V = 2,21\%$ ($p < 0,01$). Ekspresja P-selektyny u pacjentów z AML wyniosła $42,6 \pm 13,2\%$ (grupa kontrolna $64,0 \pm 7,4\%$) ($p < 0,01$). Stwierdzono korelację pomiędzy wynikami badań czynności płytek otrzymanymi dwiema metodami $R = 0,66$ ($p < 0,01$).

Wnioski. Najbardziej efektywne warunki aktywacji uzyskano inkubując płytki z 20 $\mu\text{M/l}$ ADP przez 2 minuty. Wykazano, że po utwaleniu paraformaldehydem próbki zachowują stabilność do 6 godzin. Stwierdzono obniżenie czynności płytek krwi u pacjentów z AML w stosunku do grupy kontrolnej metodą cytometrii przepływowej oraz agregometrii impedancyjnej.

S u m m a r y

Introduction. Damage to vascular endothelium, inflammation or thrombotic disorders result in platelet activation. P-selectin is expressed on the surface of the activated platelets. Examination of P-selectin expression on platelets using the flow cytometer allows for simultaneous determination of platelet activation as well as their reactivity (function).

Aim. Determining both optimal reaction conditions for ADP-induced platelet activation and maximum storage time of the samples after labeling and fixation. Comparative analysis of the platelet function using flow cytometry and impedance aggregometry.

Material and methods. 33 patients with acute myeloid leukemia (AML) together with 26 healthy blood donors were studied. Blood samples collected from healthy blood donors

Adres/address:

*Joanna Bienias
Katedra i Klinika Hematologii
i Transplantacji Szpiku SUM
ul. Reymonta 8, 40-029 Katowice
tel. +48 (32) 259-12-81
joanna.bienias@op.pl

were incubated with 10 $\mu\text{M}/\text{l}$ and 20 $\mu\text{M}/\text{l}$ ADP for 2, 5, 10 and 15 minutes. Platelets were labeled using CD61-FITC, CD45-PerCP, and CD62P-PE antibodies. Stability of the samples was determined after 2, 3, 4, 5 and 6 hours of storage. Platelet function in patients with AML was determined using the cytometric method and the impedance aggregometry. The results were then compared.

Results. Expression of P-selectin after application of 20 $\mu\text{M}/\text{l}$ ADP for 2 and 5 minutes was at $67.7 \pm 3.0\%$ and $67.6 \pm 2.3\%$. Longer activation was connected with reduction in the number of CD62P cells: $60.5 \pm 3\%$ and $56.4 \pm 4.1\%$ ($p < 0.05$). Platelets activated with 10 $\mu\text{M}/\text{l}$ ADP showed the lowest amount of CD62P ($p < 0.05$). Longer incubation time entailed growth in the number of aggregates ($p < 0.05$). Expression of P-selectin at the five points in time was compared $V = 2.21\%$ ($p < 0.01$). In patients with AML, expression of P-selectin was at $42.6 \pm 13.2\%$ (compared with the control group $64.0 \pm 7.4\%$) ($p < 0.01$). Correlation between the results of the platelet function examination conducted by means of the two methods was $R = 0.66$ ($p < 0.01$).

Conclusions. The most effective conditions for platelet activation were obtained by incubating the platelets with 20 $\mu\text{M}/\text{l}$ ADP for 2 minutes. It was proved that after fixation with paraformaldehyde, the samples remain stable for up to 6 hours. The flow cytometry method as well as the impedance aggregometry proved the platelet function in patients with AML to be lower in comparison with the control group.

WSTĘP

Prawidłowe funkcjonowanie płytek krwi jest konieczne do zapewnienia sprawnej hemostazy. Te bezjądrzaste komórki o dyskooidalnym kształcie biorą udział w tworzeniu czopu pierwotnego, regulacji pierwotnej i wtórnej hemostazy, a także w procesie fibrynolizy. Przez wytwarzanie czynników oddziałujących na leukocyty i inne komórki, płytki krwi uczestniczą w rozwoju stanu zapalnego oraz w angiogenezie (1).

Uszkodzenie śródbłonna naczyniowego, stan zapalny czy też zaburzenia zakrzepowe powodują aktywację płytek krwi i uwolnienie zawartości ich ziarnistości. Uwolnione czynniki chemotaktyczne i czynniki wzrostu decydują o interakcji płytek z innymi komórkami, głównie z neutrofilami, monocytami, makrofagami i fibroblastami (2). Aktywowane płytki krwi wykazują ekspresję P-selektyny na swojej powierzchni – została ona uznana za główny marker aktywacji (3). Wzrost ekspresji P-selektyny na płytkach i przyłączenie jej do ligandu PSGL-1 występującego na neutrofilach i monocytach powoduje uwalnianie cytokin i tworzenie kompleksów leukocytarno-płytkowych (2, 3). Zauważono, że liczba kompleksów leukocytarno-płytkowych wzrasta w chorobach mieloproliferacyjnych, w stanach zapalnych, zespołach wieńcowych oraz podczas operacji kardiologicznych (4). Aktywowane płytki krwi uwalniają mikrocząstki zwane również mikropecherzykami (MP), będące fragmentami błon komórkowych. Na swojej powierzchni MP zawierają liczne białka uwolnione z zawartości ziarnistości, między innymi P-selektynę i receptory błonowe. MP odgrywają dużą rolę w progresji choroby nowotworowej, powodując wzrost guza, angiogenezę i rozwój przerzutów odległych (5). Aktywację płytek krwi wykazano między innymi w: chorobach układu krwiotwórczego, zakrzepicach, ostrych zespołach wieńcowych, cukrzycy, ostrym udarze niedokrwinnym, a także w chorobach nerek oraz u pacjentów hemodializowanych (6-8).

Prawidłowa funkcja płytek krwi może być zaburzona w wyniku wrodzonych lub nabytych defektów. Wrodzone zaburzenia czynności płytek należą do rzadkich przyczyn skazy krwotocznej (9). Nabyte trombocytopatie są najczęściej związane z przyjmowaniem leków przeciwplatek, z marskością wątroby, mocznicą lub chorobami układu krwiotwórczego. Płytkowe skazy krwotoczne skutkują czasem przemijającą lub utrwaloną skłonnością do krwawień, a także stanowią czynnik ryzyka przed zabiegami inwazyjnymi (1, 6, 10).

Badanie ekspresji P-selektyny na płytkach krwi przy użyciu cytometru przepływowego pozwala na jednoczesną ocenę aktywacji płytek krwi (stanu pobudzenia) i ich reaktywności (odpowiedzi na czynnik aktywujący) zarówno w próbkach o małej objętości, jak i niskiej komórkowości (8, 11). Możliwość stosowania metody cytometrii przepływowej do badania płytek we krwi pełnej, bez potrzeby ich izolowania, istotnie ogranicza ryzyko artefaktów pomiarowych. Przy nieobecności zewnętrznych czynników pobudzających (agonistów), pomiar techniką cytometryczną określa aktualny stan aktywacji płytek w krwioobiegu. Przez stosowanie egzogennych czynników aktywujących można analizować reaktywność, czyli specyficzną odpowiedź funkcjonalną, przejawiającą się w zmianach ekspresji receptorów błonowych. Wyniki badania reaktywności płytek krwi dają obraz epizodów aktywacji w niedalekiej przeszłości, a także pozwalają wnioskować, na ile krwinki są zdolne do pełnienia określonej funkcji. Obniżona reaktywność oznacza obniżoną funkcjonalność związaną z zaburzeniami czynności płytek krwi, większe zużycie oraz krótszy czas przeżycia komórek (11).

CEL PRACY

Celem pracy było określenie optymalnych warunków reakcji aktywacji płytek krwi agonistą (ADP) oraz czasu przechowywania próbek po wyznakowaniu i utrwaleniu. Metodę cytometrii przepływowej zastosowano do badania czynności płytek pod wpływem ADP u pacjentów

z AML będących w remisji choroby. Czynność płytek krwi zbadano metodą agregometrii impedancyjnej i cytometrii przepływowej pod wpływem ADP u pacjentów z AML oraz u zdrowych dawców, a następnie porównano wyniki otrzymane obiema metodami.

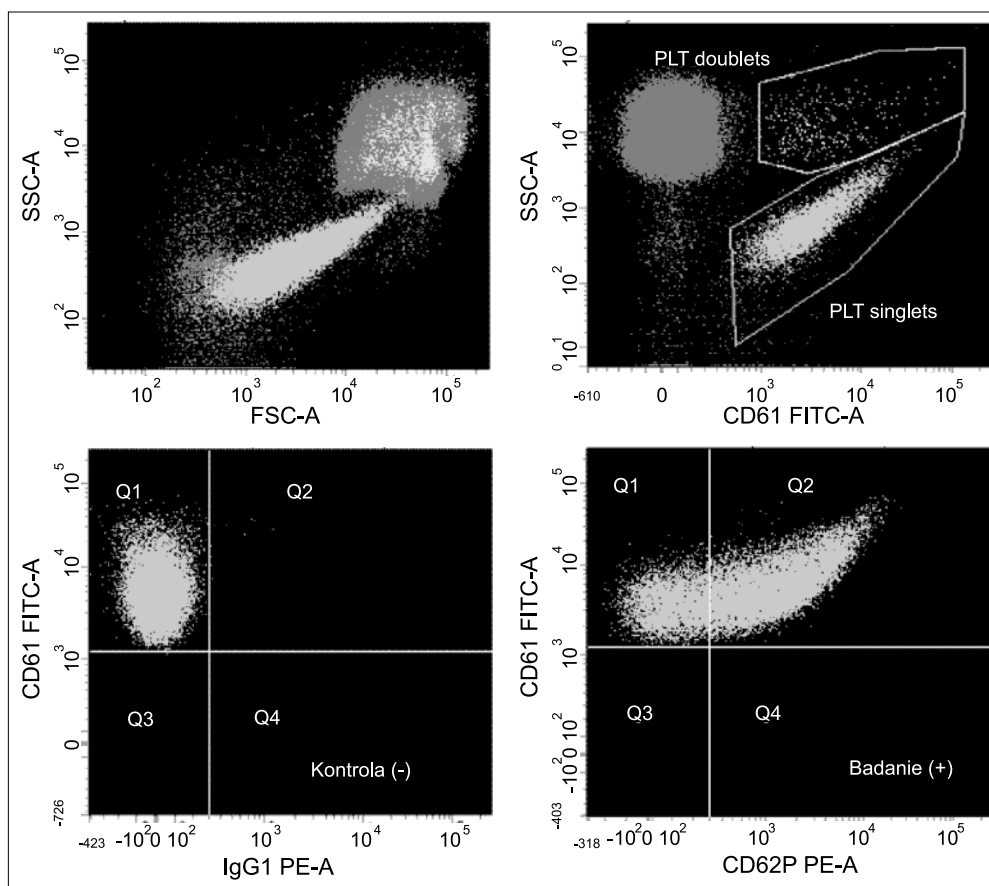
MATERIAŁ I METODY

Do badania użyto próbek krwi pochodzących od 26 zdrowych dawców oraz od 33 pacjentów z ostrą białaczką szpikową, przebywających na oddziale w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku SUM w Katowicach. Zdrowi dawcy i pacjenci przez okres 14 dni poprzedzający badanie nie przyjmowali leków mogących mieć wpływ na czynność płytek krwi oraz wyrazili zgodę na udział w badaniu. Krew była pobrana na buforowany roztwór cytrynianu sodu w stosunku 1:9. Aby zapobiec spontanicznej aktywacji płytek krwi w próbce, pierwsze pobrane 2 mililitry krwi przeznaczono do innych analiz, a badanie rozpoczęto w czasie do 10 minut od pobrania.

Badania przeprowadzono według procedury opracowanej przez firmę Becton Dickinson w modyfikacji własnej (12). Do aktywacji płytek krwi zastosowano ADP 1 μ M (Biogenet). Markerem powierzchniowym, który został użyty do wyznaczenia płytek krwi, był antygen CD61 (Beckman Coulter). Do wykrycia ekspresji P-selektyny na powierzchni płytek zastosowano przeciwciało CD62P-PE (Beckman Coulter). Aby określić udział

kompleksów leukocyarno-płytkowych, komórki znakowano przeciwciałem CD45 PerCP-Cy5.5 (12). Jako kontrolę izotypową zastosowano przeciwciało IgG1-PE. Do jednej serii prób dodano czteropeptyd RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser firmy Sigma, 10 mg/ml PBS), który blokuje aktywne miejsca przyłączenia dla fibrynogenu.

Próbki pobrane od zdrowych dawców inkubowano z ADP o końcowym stężeniu 10 μ M i 20 μ M przez 2, 5, 10 i 15 minut w temperaturze pokojowej. Do jednej serii prób przed aktywacją ADP dodatkowo dodano czteropeptyd RGDS w ilości: 10 μ l RGDS na 25 μ l krwi. Po inkubacji z ADP, do 12,5 μ l krwi dodano po 5 μ l Pc monoclonalnych CD61-FITC i CD62P-PE oraz 10 μ l CD45-PerCP. Kontrolę izotypową sporządzono przez wyznaczenie komórek IgG1-PE. Próbki inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej, w ciemności, a następnie utrwalono 500 μ l 1% roztworu paraformaldehydu (PFA) w temperaturze 4°C przez co najmniej 30 minut. Przeprowadzono badanie immunofenotypowe przy pomocy cytometru przepływowego FACSCanto II. Oceniano odsetek płytek CD62P dodatnich wśród CD61 dodatnich (ryc. 1). Dodatkowo zbadano stabilność próbki po wyznakowaniu i utrwaleniu roztworem PFA przez przeprowadzenie szeregu pomiarów po 2, 3, 4, 5 i 6 godzinach przechowywania w temperaturze +4°C.



Ryc. 1. Badanie ekspresji P-selektyny na płytkach krwi po aktywacji ADP.

Metodę badania ekspresji P-selektyny na płytkach krwi po aktywacji porównano z metodą agregometrii impedancyjnej z zastosowaniem aparatu Multiplate. W obydwu metodach jako agonistę płytek krwi zastosowano ADP. Wyniki uznano za istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

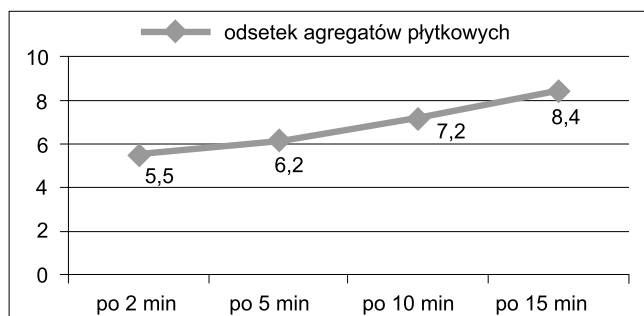
W opracowaniu statystycznym wyników korzystano z pakietu statystycznego Statistica wersja 10. Dane przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe. W celu sprawdzenia normalności rozkładu zmiennej losowej zastosowano test Shapiro-Wilka. Dla oceny istotności różnic wykonano test Manna-Whitney'a dla prób niezależnych, natomiast w analizie zależności pomiędzy wynikami korzystano z rachunku korelacji rang Spearmana.

WYNIKI

Wyższe wartości ekspresji P-selektyny na płytkach krwi uzyskano po inkubacji próbek z $20 \mu\text{M}$ ADP przez 2 i 5 minut (odpowiednio $67,7 \pm 3,0\%$ i $67,6 \pm 2,3\%$) (tab. 1). Wydłużenie czasu aktywacji powodowało obniżenie procentowego udziału komórek CD62P dodatnich (do $60,5 \pm 3\%$ i $56,4 \pm 4,1\%$) ($p < 0,05$). Płytki krwi aktywowane $10 \mu\text{M/l}$ ADP wykazywały niższy odsetek CD62P dodatnich niż po aktywacji $20 \mu\text{M/l}$ ADP (od $52,5 \pm 2,6\%$ do $65,9 \pm 1,4\%$) ($p < 0,05$). Po ocenie udziału agregatów płytkowych wśród wszystkich płytek krwi (CD61+) wykazano, że wraz ze wzrostem czasu inkubacji z agonistą wzrasta liczba agregatów ($p < 0,05$) (ryc. 2). Zauważono także niezależny wzrost liczby kompleksów CD61+CD45+ wśród płytek CD61+CD62P+ wraz z upływem czasu inkubacji, jednakże nie był on istotny statystycznie. Nie stwierdzono różnic statystycznych w udziale agregatów płytkowych i leukocytarно-płytkowych pomiędzy serią prób inkubowanych z RGDS a serią bez RGDS ($p > 0,05$).

Tabela 1. Ekspresja P-selektyny na płytkach krwi aktywowanych $20 \mu\text{M}$ i $10 \mu\text{M}$ ADP przez 2, 5, 10 i 15 minut (% komórek CD 62P+ wśród komórek CD61+).

Inkubacja PLT	Przez 2 min	Przez 5 min	Przez 10 min	Przez 15 min
$20 \mu\text{M}$ ADP	$67,7 \pm 3,0$	$67,6 \pm 2,3$	$60,5 \pm 3,8$	$56,4 \pm 4,1$
$10 \mu\text{M}$ ADP	$52,5 \pm 2,6$	$58,7 \pm 1,5$	$65,9 \pm 1,4$	$56,0 \pm 3,5$



Ryc. 2. Odsetek agregatów płytkowych po inkubacji płytek krwi z ADP przez 2, 5, 10 i 15 minut.

Zbadano wpływ czasu przechowania próbki w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ przez 2, 3, 4, 5 i 6 godzin po jej wyznakowaniu u utrwaleniu w PFA. Stwierdzono porównywalność wyników ekspresji P-selektyny badanej w 5 punktach czasowych (współczynnik zmienności wyniósł $2,21\%$, przy kryterium akceptacji $< 3\%$) ($p < 0,01$) (13).

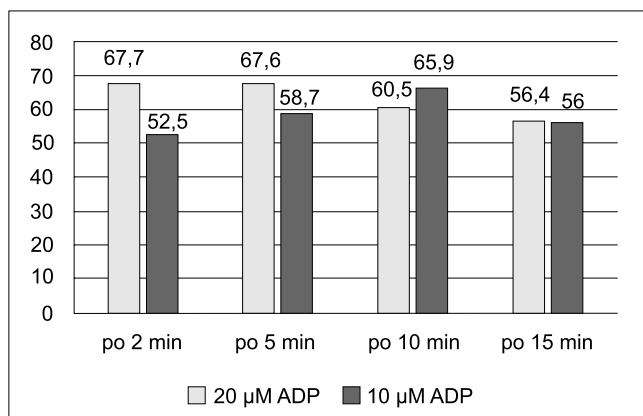
Metodą cytometrii przepływowej zbadano czynność płytek krwi u 33 pacjentów z ostrą białaczką szpikową, będących w remisji choroby. Średnia ekspresja P-selektyny (po aktywacji $20 \mu\text{M/l}$ ADP przez 2 min) u pacjentów wyniosła $42,6 \pm 13,2\%$ i była obniżona w porównaniu do zdrowych dawców, u których wyniosła $64,0 \pm 7,4\%$, $p < 0,01$. Równolegle przeprowadzono badanie czynności płytek krwi metodą agregometrii impedancyjnej, w grupie pacjentów otrzymano wynik $41,8 \pm 20,5$ [U], natomiast w grupie kontrolnej $86,4 \pm 26,3$ [U], $p < 0,01$. Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy wynikami badań czynności płytek krwi obiema metodami, zarówno w grupie pacjentów ($R = 0,66$; $p < 0,01$), jak i zdrowych dawców ($R = 0,75$; $p < 0,01$).

DYSKUSJA

W pracy przedstawiono wyniki badań płytek krwi metodą cytometrii przepływowej z zastosowaniem różnych warunków aktywacji (stężeń i czasu inkubacji z ADP), stosując próbki krwi pobrane od zdrowych dawców. Starano się określić optymalne warunki aktywacji płytek krwi w celu sprawdzenia ich czynności. Jako czynnik aktywujący płytki zastosowano ADP o różnych stężeniach: 10 i $20 \mu\text{M/l}$. Silniejszą ekspresję P-selektyny zauważono w próbkach poddanych aktywacji wyższym stężeniem agonisty. Van Bladel i wsp. do oceny reaktywności płytek krwi u pacjentów w chorobach nerek zastosowali szereg rozcieńczeń ADP od $0,008$ do $125 \mu\text{M/l}$. W swoim badaniu autorzy dowiedli, że wraz ze zwiększeniem stężenia ADP do $50 \mu\text{M/l}$ następuje wzrost ekspresji P-selektyny na płytkach krwi, jednak wyższe stężenie agonisty nie powoduje dalszego wzrostu ekspresji markera (14). Podobne wyniki w swojej pracy otrzymali Nkambule i wsp. Do aktywacji płytek krwi użyli oni ADP o stężeniu 200 i $40 \mu\text{M/l}$. W publikacji (u zdrowych dawców) autorzy wykazali, że użycie do aktywacji płytek wyższego stężenia ADP wywołuje wyższą ekspresję P-selektyny na ich powierzchni (15). Do aktywacji płytek krwi, w celu oceny ekspresji P-selektyny, autorzy różnych prac stosują stężenia ADP od $0,5$ do $50 \mu\text{M/l}$, jednak najczęściej używane jest $20 \mu\text{M/l}$ ADP (16-20). Prezentowane wyniki badań oraz doświadczenia cytowanych autorów sugerują, że zastosowanie do aktywacji płytek krwi ADP o stężeniu $20 \mu\text{M/l}$ zwiększa efektywność analizy w porównaniu ze stosowaniem ADP o niższym stężeniu.

Jednym z najważniejszych parametrów mających wpływ na aktywację płytek krwi jest czas inkubacji z agonistą. W prowadzonym badaniu zastosowano

cztery różne czasy aktywacji płytek krwi, mianowicie: 2, 5, 10 i 15 minut. Najwyższą ekspresję P-selektyny uzyskano podczas aktywacji 20 $\mu\text{M/L}$ ADP przez 2 minuty, wydłużanie czasu inkubacji powodowało spadek ekspresji antygenu (ryc. 3). Podobną zależność pomiędzy czasem inkubacji a ekspresją P-selektyny w swojej pracy opisali Mutlu i wsp. Badając apoptozę i markery aktywacji płytek krwi przy użyciu cytometru przepływowego, autorzy inkubowali próbki z agonistą przez 15, 30 i 90 minut. Najwyższą ekspresję P-selektyny badacze uzyskali po inkubacji przez 15 minut, po 30 minutach ekspresja antygenu obniżyła się (o od 0,7 do 1,2%), natomiast po 90 minutach osiągnęła jeszcze niższą wartość (o od 2,6 do 2,8%) (21). Zjawisko powstawania agregatów płytkowych oraz kompleksów leukocyarno-płytkowych podczas aktywacji płytek krwi *in vitro* zostało opisane między innymi przez Bernarda i wsp. (2).



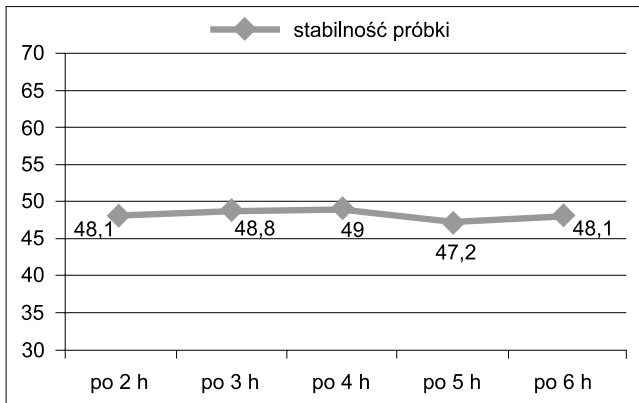
Ryc. 3. Ekspresja P-selektyny po aktywacji 20 i 10 μM ADP przez 2, 5, 10 i 15 minut.

W naszej pracy oceniano zależność pomiędzy czasem inkubacji a odsetkiem agregatów płytkowych. Okazało się, że wraz z wydłużaniem czasu inkubacji z ADP wzrastał też odsetek agregatów (wśród wszystkich obiektów CD61 dodatnich) (ryc. 2). Zbadano także udział kompleksów leukocyarno-płytkowych w puli obiektów CD61 dodatnich po wyznakowaniu próbki przeciwciałem CD45. Zauważono niewielki wzrost liczby kompleksów leukocyarno-płytkowych wraz ze wzrostem czasu inkubacji próbki, lecz nie był on istotny statystycznie. Rondina i wsp. badali zależność poziomu agregatów leukocyarno-płytkowych w próbkach poddanych aktywacji od czasu upływającego od pobrania krwi do zakończenia procesu przygotowywania komórek do pomiaru. Wykazali oni wzrost odsetka agregatów leukocyarno-płytkowych o 30% wraz z wydłużeniem czasu przygotowywania płytek krwi do pomiaru (od 15 do ponad 45 minut) (22). Również Harding i wsp. wykazali, że wydłużenie czasu pomiędzy pobraniem próbki a przygotowywaniem do badania o każde 10 minut powoduje wzrost poziomu agregatów leukocyarno-płytkowych o 2,8%. Autorzy zalecili minimalizowanie czasu przygotowywania pró-

bek zawierających płytki krwi do badań cytometrycznych (23). Próbuąc zminimalizować liczbę agregatów płytkowych w badanym materiale, do jednej serii prób dodano czteropeptyd Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), który blokuje aktywne miejsca przyłączenia dla fibrynogenu (24). Po analizie wyników nie stwierdzono jednak znamiennych różnic pomiędzy ekspresją P-selektyny w próbkach niezawierających i zawierających RGDS. Podobnie, liczba agregatów płytkowych oraz leukocyarno-płytkowych nie różniła się statystycznie w próbkach z czteropeptydem i bez niego. Na podstawie przedstawionych powyżej wyników, jak i prac Rondina i wsp. i Hardinga i wsp. można wywnioskować, że zastosowanie krótszego czasu inkubacji płytek z agonistą ogranicza liczbę powstających *in vitro* agregatów leukocyarno-płytkowych. Z uwagi na to, że cytometr analizuje jeden agregat jako jeden obiekt (a w jednym agregacie może być uwięzionych nawet do kilkudziesięciu płytek) ograniczenie tworzenia się agregatów *in vitro* (podczas przygotowania materiału do badania) znacznie poprawia dokładność metody.

Procedura utrwalenia płytek zabezpiecza je przed samoistną aktywacją, co jest istotne podczas badania markerów aktywacji. Przechowywanie komórek w roztworze PFA zmienia ich zdolności refrakcyjne (od 1,35 w komórkach żywych do 1,5 w utrwalonych) i tym samym wpływa na wartość parametru rozproszenia bocznego światła SSC. Utrwalone komórki charakteryzują się podwyższonymi wartościami SSC, jednakże może się to przyczynić do ich lepszej dyskryminacji w obrazie cytometrycznym (11). Badając wpływ czasu przechowywania (w $+4^{\circ}\text{C}$) na stabilność próbki po jej utrwaleniu 1% PFA, przeprowadzono 5 pomiarów cytometrycznych w odstępach godzinnych. Ekspresja P-selektyny na płytkach krwi oznaczana w czasie od półtorej do 6 i pół godziny po utrwaleniu była porównywalna, co świadczy o trwałości próbki w tym przedziale czasowym (ryc. 4). Schmidt i wsp. badali wpływ 0,5% paraformaldehydu na ekspresję różnych receptorów płytkowych. W badaniu autorzy dowiedli, że utrwalenie komórek po inkubacji z przeciwciałami nie zmienia ekspresji P-selektyny na ich powierzchni w ciągu 24 godzin, w stosunku do płytek nieutrwalonych i analizowanych natychmiast po wyznakowaniu (25). Ten sam autor w późniejszej pracy (2006 r.) porównywał ekspresję P-selektyny w próbkach przechowywanych przez 7 dni w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$, nieutrwalonych i utrwalonych 1% PFA lub stabilizatorem ThromboFix. Autor stwierdził, że płytki krwi (aktywowane słabym agonistą, np. ADP) i utrwalone PFA, w ciągu 4 godzin przechowywania wykazywały znikome obniżenie ekspresji P-selektyny na swojej powierzchni (26). Analizy przeprowadzone przez cytowanych autorów potwierdzają otrzymane przez nas wyniki, a mianowicie to, że przechowywanie w odpowiednich warunkach wyznakowanych i utrwalonych płytek krwi do 6 godzin nie wpływa na wynik badania cytometrycznego.

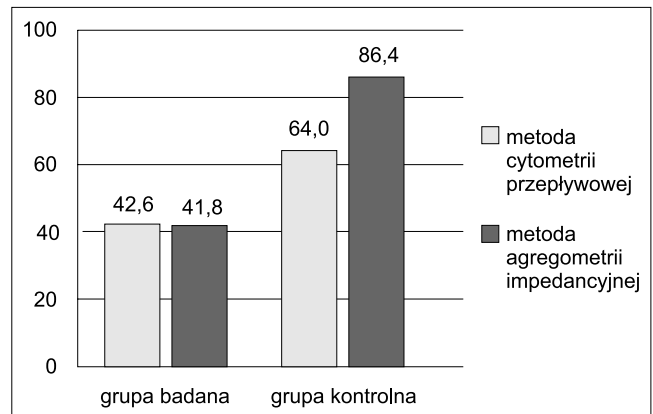
Funkcja płytek krwi u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML) może być upośledzona w wyniku



Ryc. 4. Ekspresja P-selektyny na płytkach krwi mierzona w 5 punktach czasowych po wyznakowaniu i utrwaleniu.

przebiegu choroby nowotworowej, chemioterapii lub przyjmowania innych leków, a także z powodu współistniejącego zakażenia (27). Złośliwy rozrost komórek białaczkowych może przyczynić się do uszkodzenia megakariopoezy w szpiku i powodować defekty funkcji płytek krwi: zaburzenia adhezji, agregacji lub sekrecji (28). Badanie cytometryczne umożliwia określenie czynności płytek krwi nawet u pacjentów z głęboką małopłytkowością (27). W naszym badaniu określono reaktywność płytek krwi u pacjentów z AML będących w remisji choroby i porównano ją z wynikami u zdrowych dawców. Średnia ekspresja P-selektyny na płytkach krwi aktywowanych ADP w grupie badanej wyniosła 42,6% i była niższa w porównaniu z grupą kontrolną: 64,0% (ryc. 5). Podobne wyniki badań, wskazujące na obniżenie ekspresji P-selektyny na płytkach po aktywacji ADP u pacjentów z AML w stosunku do zdrowych dawców przedstawili w swojej pracy Leinoe i wsp. (28). W kolejnej publikacji (z 2005 r.), ten sam autor opisał badanie przeprowadzone w grupie 50 pacjentów z AML będących we wczesnej fazie choroby. Po analizie wielowariantowej badacz wywnioskował, że obniżona ekspresja P-selektyny oraz małopłytkowość poniżej 40 G/L są istotnymi czynnikami prognostycznymi występowania krwawień (29). Connor i wsp. badając reaktywność płytek krwi pod wpływem ADP w grupie pacjentów z zespołem mielodysplastycznym (MDS) oraz przewlekłą białaczką mielomonocytową, wskazali na obniżenie ekspresji P-selektyny w stosunku do zdrowych dawców. Autorzy zaobserwowali obniżoną reaktywność płytek krwi szczególnie u pacjentów ze skłonnością do krwawień i wysnuli przypuszczenie, że badanie cytometryczne mogłoby prognozować u chorych tendencje do krwawień lub zakrzepicy (30). Podobnie, obniżoną reaktywność płytek krwi pod wpływem ADP badaną metodą cytometrii przepływowej u pacjentów z AML/MDS stwierdzili Psaila i wsp. Autorzy badali, czy istnieje zależność pomiędzy wystąpieniem krwawień a obniżoną reaktywnością płytek krwi w tej grupie pacjentów. Zaobserwowali oni, że krwawienia wystąpiły u tych pacjentów z AML/MDS, u których zdiagnozowano wyższą ekspresję P-selektyny na płytkach krwi. Jednakże autorzy zaznaczyli, że krwawienia zaob-

serwowano u niewielu chorych oraz że nie były brane pod uwagę inne czynniki mogące mieć wpływ na ich wystąpienie, takie jak: gorączka, poziom hemoglobiny, integralność naczyń czy posocznica (27). W swojej publikacji Luo i wsp. przedstawili wyniki badań reaktywności płytek krwi u pacjentów z AML, których podzielili na trzy grupy: nowo zdiagnozowanych, będących w remisji choroby oraz w stałej pełnej remisji. Obniżoną funkcjonalność płytek krwi autorzy stwierdzili jedynie w grupie pacjentów nowo zdiagnozowanych (31).



Ryc. 5. Badanie czynności płytek krwi metodą cytometrii przepływowej i agregometrii impedancyjnej u pacjentów z ostrą białaczką szpikową.

Badanie czynności płytek krwi u pacjentów można wykorzystać w celu przewidywania skłonności do krwawień lub zakrzepicy, a także dla oceny efektywności przetoczeń składników krwi (8, 31). Lim i wsp. w swojej pracy stwierdzili, że ekspresja P-selektyny oznaczona na aktywowanych płytkach krwi metodą cytometrii przepływowej może być przydatna do oceny ich funkcjonalności po transfuzjach koncentratów krwinek płytkowych (8).

WNIOSKI

1. Najwyższą ekspresję P-selektyny na płytkach krwi, świadczącą o całkowitej ich aktywacji, i jednocześnie najniższy odsetek agregatów płytkowych i leukocyarno-płytkowych, mogących zafałszować wynik (wpłynąć na obniżenie liczby komórek CD61+CD62P+) uzyskano inkubując próbki z 20 μ M/l ADP przez 2 minuty.
2. Czteropeptyd RGDS nie wpływa istotnie na ograniczenie formowania agregatów płytkowych lub leukocyarno-płytkowych.
3. Płytki krwi po wyznakowaniu i utrwaleniu 1% PFA, przechowywane w temperaturze +4°C, zachowują swoją stabilność do 6 godzin.
4. Wykazano obniżenie czynności płytek krwi u chorych z ostrą białaczką szpikową zarówno metodą cytometrii przepływowej, jak i agregometrii impedancyjnej oraz potwierdzono ich dodatnią korelację.

PIŚMIENNICTWO

1. Chojnowski K: Zaburzenia czynności płytek krwi (trombocytopatie). Acta Haematol Pol Supplement 2009; 40: 15-18.
2. Bernard MR, Linden MD, Frelinger AL et al.: Effects of platelet binding on whole blood flow cytometry 2005; 3: 2563-2570.
3. Trummer A, De Rop C, Stadler M et al.: P-selectin glycoprotein ligand-1 positive microparticles in allogeneic stem cell transplantation of hematologic malignancies. Exp Hemtol 2011; 39: 1047-1055.
4. Ludwig RJ, Schon MP, Boehncke WH: P-selectin: a common therapeutic target for cardiovascular disorders, inflammation and tumour metastasis. Expert Opin Ther Targets 2007; 11: 1103-1117.
5. Ważna E: Płytki krwi jako regulatory procesów odpornościowych. Postępy Hig Med Dosw 2006; 60: 265-277.
6. Polek A, Sobczewski W, Matowicka-Karna J: P-selektyna i jej rola w niektórych chorobach. Postępy Hig Med Dosw 2009; 63: 465-470.
7. Mądro E, Małyszko J: Zaburzenia krzepnięcia krwi w chorobach nerek. Hematologia 2011; 2(4): 332-338.
8. Lim YA, Cho SR, Lee WG et al.: Change of platelet activation markers using flow cytometry in patients with hematology/onkology disorders after transfusion. Platelets 2008; 19: 328-334.
9. Chojnowski K, Klukowska A, Łętowska M et al.: Zasady postępowania we wrodzonych zaburzeniach czynności płytek krwi. Acta Haematol Pol 2009; 40: 731-752.
10. Robak M, Treliński J, Urbańska-Ryś H et al.: Ocena aktywacji płytek krwi i wybranych parametrów hemostaz u chorych na szpiczaka mnogiego. Acta Haematol Pol 2011; 42: 703-708.
11. Watała C, Rywaniak J, Siewiera K et al.: O niektórych niediagnostycznych zastosowaniach cytometrii przepływowej. Cytometria Polska 2012; 1: 1-55.
12. BD Biosciences. Support protocols. Platelet activation, staining and analysis. 2014. http://www.bdbiosciences.com/eu/resources/protocols/platelet_activation.jsp#search=protocols%20platelets.
13. Jakubowska M: Walidacja metod analitycznych. Raport z walidacji. 2014. <http://home.agh.edu.pl/~kca/Walidacja%20-%20raport%20z%20walidacji.pdf>.
14. Van Bladel ER, de Jager RL, Walter D: Platelets of patients with chronic kidney disease demonstrate deficient platelet reactivity *in vitro*. BMC Nephrol 2012; 13: 127.
15. Nkambule BB, Davison G, Ipp H: The value of flow cytometry in the measurement of platelet activation and aggregation in human immunodeficiency virus infection. Platelets 2014; 15: 1-8.
16. Silvain J, Pena A, Cayla G et al.: Impact of red blood cell transfusion on platelet activation and aggregation in healthy volunteers: results of the transfusion study. Eur Heart J 2010; 31: 2816-2821.
17. Silvain J, Abtan J, Kerneis M et al.: Impact of red blood cell transfusion on platelet aggregation and inflammatory response in anemic coronary and noncoronary patients. J Am Coll Cardiol 2014; 63: 1289-1296.
18. Krajewski S, Kurz J, Wendel HP et al.: Flow cytometry analysis of porcine platelets: optimized methods for best results. Platelets 2012; 23: 386-394.
19. Van Velzen JF, Laros-van Gorkom BA, Pop GA et al.: Multicolor flow cytometry for evaluation of platelet surface antigens and activation markers. Thromb Res 2012; 130: 92-98.
20. Syska K, Kosiorek A, Podśędek A et al.: Propozycja procedury oceny przeciwpłytkowych właściwości preparatów polifenolowych pochodzenia roślinnego w badaniach *in vitro*. Postępy Fitoterapii 2012; 1: 11-14.
21. Mutlu A, Gyulkhanyan AV, Freedman J et al.: Concurrent and separate inside-out transition of platelet apoptosis and activation markers to the platelet surface. Br J Haematol 2013; 163: 377-384.
22. Rondina MT, Grissom CK, Men S et al.: Whole blood flow cytometry measurement of *in vivo* platelet activation in critically-ill patients are influenced by variability in blood sampling techniques. Thromb Res 2012; 129: 729-735.
23. Harding SA, Din JN, Sarma J et al.: Flow cytometry analysis of circulating platelet-monocyte aggregates in whole blood: methodological consideration. Thromb Haemost 2007; 98: 451-456.
24. Barre DE: Arginyl-glycyl-aspartyl (RGD) epitope of human apolipoprotein (a) inhibits platelet aggregation by antagonizing the IIb subunit of the fibrinogen (GPIIb/IIIa) receptor. Thromb Res 2007; 119: 601-607.
25. Schmidt V, Hilberg T, Franke G et al.: Paraformaldehyde fixation induces a systematic activation of platelets. Platelets 2003; 14: 287-294.
26. Schmidt V, Hilberg T: ThromboFix platelet stabilizer: advances in clinical platelet analyses by flow cytometry? Platelets 2006; 17: 266-273.
27. Psaila B, Bussel JB, Frelinger AL et al.: Differences in platelet function in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia compared to equally thrombocytopenic patients with immune thrombocytopenia. J Thromb Haemost 2011; 9: 2302-2310.
28. Leinow EB, Hoffmann MH, Kjaersgaard E et al.: Multiple platelet defects identified by flow cytometry at diagnosis in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2004; 127: 76-84.
29. Leinow EB, Hoffmann MH, Kjaersgaard E et al.: Prediction of haemorrhage in the early stage of acute myeloid leukaemia by flow cytometric analysis of platelet function. Br J Haematol 2005; 128: 526-532.
30. Connor DE, Ma DD, Joseph JE: Flow cytometry demonstrates differences in platelet reactivity and microparticle formation in subjects with thrombocytopenia or thrombocytosis due to primary haematological disorders. Thromb Res 2013; 132: 572-577.
31. Luo WD, Chen BG, Men ZF et al.: Study on platelet activated state and platelet activated function in adults with acute leukemia. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2005; 13: 452-455.

otrzymano/received: 07.04.2015
zaakceptowano/accepted: 30.04.2015