

## MARKERI DE ACTIVARE PLACHETARĂ ÎN FLOW-CITOMETRIE LA PACIENȚII CU SINDROM ANTIFOSFOLIPIDIC PRIMAR

dr. *Claudia Gavriș*<sup>1</sup>, prof. dr. *Mariana Rădoi*<sup>1</sup>, dr. *Emanuil Gheorghiu*<sup>2</sup>,  
dr. *Maria Anghel*<sup>2</sup>, dr. *Roxana Bârsășteanu*<sup>2</sup>, dr. *Petru Gorgon*<sup>2</sup>,  
dr. *Liliana Duca*<sup>2</sup>, dr. *G. Pamfil*<sup>1</sup>, dr. *G.I. Pandele*<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universitatea "Transilvania" din Brașov, Facultatea de Medicină

<sup>2</sup>Spitalul Clinic Județean de Urgență Brașov

<sup>3</sup>Universitatea de Medicină și Farmacie Gr T Popa, Iași

### Abstract:

The present paper describes a flow cytometric method for assay of platelet activation and provides information important in identifying and differentiating thrombogenic states in patients with primary antiphospholipid syndrome (SAFP).

Objectives: to evaluate the significance of platelet activation markers for the evolution with venous and arterial recurrent thrombosis in patients (pts) with SAFP.

Methods: 14 pts. with SAFP diagnosed according to revised Sapporo classification for APS criteria, mean age .47.87(18-74) years, 7 women and 7 men, were followed 24 month for the evolution with recurrent thrombosis. The expression of platelet activation markers CD62P (Pselectin) and CD40L were assessed using standardised flow cytometric method (Becton Dickinson) at baseline and after 12 months. Statistics: The results are shown as mean  $\pm$  SD. Paired t tests were used for statistical comparisons.

Results: No significant correlation was observed between expression of platelet activation markers CD62P (Pselectin) and CD40L in patients with history of recurrent thrombosis and SAFP patients without recurrent thrombosis. One single patient from six pts. had a acute trombotic event during follow-up expressed markers of platelet activation.

Conclusions: Platelet activation markers in flow-citometry did not correlated with recurrent thrombosis and acute thrombosis in pts. with SAFP.

**Key-words:** platelet activation, flow-citometry, antiphospholipid syndrome

### Introducere:

Studiile experimentale sugerează că trombocitele au un rol important [2,4,5,6] în patogenia sindromului lui antifosfolipidic, iar CD62P (Pselectina) și sCD40L sunt markeri independenți ai activării plachetare [8,9,10,22].

Determinarea activării plachetare prin determinarea expresiei de suprafață a P-selectinei poate fi realizată folosind tehnica flow-citometriei cu fluorocromi în combinație cu anticorpi monoclonali. Chiar dacă diferiți markeri sunt considerați ca markeri ai activării plachetare și sunt utili în aprecierea participării plachetare în procesul patogenic al bolii, ei nu corelează absolut necesar cu severitatea și evoluția bolii. Deși rămâne parțial inexplicabil, nu este surprinzător faptul că o creștere în severitate a evoluției bolii nu determină în mod necesar o creștere corespunzătoare a activității plachetare [11, 13, 14].

Flow-citometria este un test care poate fi efectuat indiferent de numărul plachetelor și permite urmărirea sub tratament antiplachetar. Acest test poate fi efectuat cu colorări multiple în fluorescență a plachetelor în combinație cu

anticorpi monoclonali, pentru a măsura plachetele activate circulante, agregatele leuco-plachetare și microparticulele procoagulante derivate din plachete.

Plachetele trebuie să fie diferențiate de celelalte celule sanguine și acest lucru poate fi făcut folosind anticorpi împotriva proteinelor specifice membranare (CD41). Metoda este foarte sensibilă și poate detecta activarea în procent de 0,8% [12].

Este descrisă o metodă flow-citometrică de determinare a gradului de activare plachetară care furnizează informații despre interacțiunile plachetelor și are un rol potențial în identificarea și diferențierea statusului trombogenic din sindromul antifosfolipidic.

**Obiectiv:** evaluarea semnificației exprimării plachetare a markerilor de activare pentru evoluția cu tromboze acute recurente arteriale sau venoase la pacienții cu sindrom antifosfolipidic primar, precum și stabilirea corelației între prezența acestor markeri de activare și existența și tipul evenimentelor trombotice

recurente (unice sau multiple, arteriale sau venoase) în antecedentele acestor bolnavi.

**Metodă:**

Paisprezece pacienți cu SAFP diagnosticați conform criteriilor Sapporo revizuite pentru AFS, cu vârsta medie 46,5 (18-74) ani, 7 femei și 7 bărbați au fost urmăriți 24 de luni pentru evoluția cu evenimente trombotice recurente

Evaluarea markerilor de activare plachetară s-a efectuat în citometrie de flux cu un flow-citometru FACS Calibur Becton-Dickinson. Tehnica de lucru în citometrie a fost conform protocolului elaborat de firma Becton-Dickinson, tehnică care permite examinarea plachetelor proaspete sau fixate, nestimulate sau activate in vitro din sângele necoagulat și necentrifugat. Este necesară setarea flow-citometrului BD FACS pentru a permite achiziția plachetelor. În studiul nostru au fost pregătite plachete proaspete, nefixate și nestimulate urmărindu-se gradul lor de activare in vivo. Colectarea probelor s-a făcut folosind citrat de sodiu ca anticoagulant. Au fost excluși pacienții care urmau tratament cu heparină, aceasta putând determina activare plachetară in vivo. Pentru a avea o activare artefactuală plachetară minimă s-au folosit tuburi de recoltare acoperite cu polistiren. Deoarece fixarea plachetelor cu formaldehidă ar fi afectat activarea plachetelor și ar fi redus în același timp legarea C62P pe plachetele fixate s-a folosit colorarea directă cu fluorocrom.

S-a folosit colorarea cu mai mulți fluorocromi la o aceeași determinare. Un anticorp conjugat cu fluorocrom a fost folosit pentru separarea plachetelor și achiziția lor prin legarea de un anticorp specific plachetar independent de activare-CD41. Alți doi anticorpi (anti-CD62P și anti-CD40L) conjugați cu doi fluorocromi diferiți au fost folosiți simultan pentru a evalua activarea plachetară realizată prin exprimarea CD62P și CD40L. Această dublă colorare a evaluat două aspecte ale activării plachetare. Separarea plachetelor în fluorescență a fost făcută folosind markerul plachetar independent de activarea plachetară (CD41). Profilul populației celulare care a fost pozitivă pentru acest marker a fost apoi analizat independent existând trei subpopulații de particule pentru probele pregătite din sângele venos: plachete singure, agregate leuco-plachetare și a treia populație

reprezentată de microparticule cu diametrul de 0,1 μ, care sunt mai puțin luminoase.

**Rezultate:**

Caracteristicile clinice la includere, evenimentele trombotice existente în antecedente și rezultatele urmărite la lotul de studiu sunt prezentate în tabelul 1. Nu au existat diferențe semnificative statistic între nivelul markerilor de activare plachetară CD40L și Pselectina la pacienții cu SAFP care au prezentat istoric de recurență arterială, recurență trombotică venoasă, recurență multiplă și pacienții cu SAFP fără istoric de recurență trombotică. Recurența multiplă a fost definită prin cel puțin trei episoade de tromboză arterială și/sau venoasă la un pacient cu sindrom antifosfolipidic.

Vârsta, ani	45,5±27
Bărbați / femei, n	7/7
Duration of APS (ani)	3,5
Hipertensiune, n (%)	5 (45%)
Diabet zaharat, n (%)	1 (10%)
Fumători	2 (45%)
Hipercolesterolemie	7 (50%)
Hipertrigliceridemie	17 (42,5%)
HDL scăzut	4 (10%)
LDL crescut	25 (64%)
BMI ≥ 25, n(%)	16 (39%)
Acenocumarol, n (%)	3 (7,31)
aCL (-) LA (+), n (%)	1 (2,4%)
aCL (+) LA (-), n (%)	30 (73,11%)
ACL (+) LA (+), n (%)	10 (24,39%)
Evenimente trombotic, n (%)	14 (100%)
Tromboze venoase	5 (45%)
Tromboze arteriale	6 (42,85)
Avorturi	2 (14,28%)
Tromboze recurente, n (%)	12 (85,71%)
Tromboze recurente multiple, n (%)	7 (14%)
Evenimente trombotice acute pe perioada urmăririi, n (%)	6 (42,85%)
L anticoagulant, procent (%)	6 (42,85%)
Atc. anticardiolipinici tip IgG	
Percent peste normal	6 (42,85%)
Titru mediu (GPL/ml)	41,22 (GPL)
Trombocitopenia, n (%)	0 (0%)
Livedo reticularis, n (%)	1 (7,14)

Tabel 1 Caracteristicile clinice la includere, evenimentele trombotice existente în antecedente și rezultatele urmărite la lotul de studiu

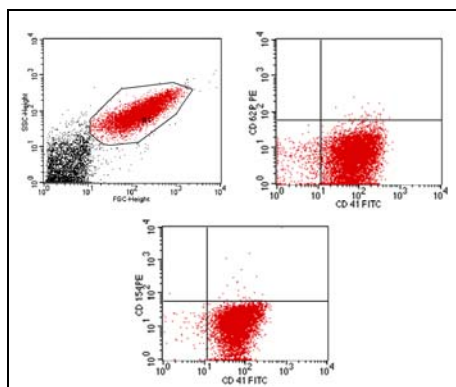


Fig 1. Histograma plachetelor: intensitatea fluorescenței pe FITC pe axa x și a ficoeritrinei (PE) pe axa y. Particulele CD41+ sunt împărțite în trei populații pe baza LFS (forward-scattered light) pe axa y și LLS (side-scattered light) pe axa x: plachetele libere (aria delimitată), agregatele plachetare și agregatele micropalachetare. FITC este fixat pe markerul specific plachetar CD41 și PE este fixată pe markerul de activare CD62P și respectiv CD40L.

Un singur pacient a prezentat markeri de activare în flow-citometrie (Fig 1) dintre cei șase la care a survenit un eveniment trombotic acut pe perioada de urmărire.

### Discuții

Deși există numeroase studii care au raportat riscul trombozei arteriale sau venoase determinat de prezența aFL, există importante limite metodologice și diferențe între designul studiilor care explică rezultatele contradictorii raportate [15, 18, 19].

Anomaliile ale hemostazei, fibrinolizei, endoteliului și trombocitelor, toate au fost descrise în sindromul antifosfolipidic. Activarea anormală din SAF poate reprezenta un status „pre-embolic”. Continua activare plachetară și endotelială [16, 17, 20] prezintă în SAF determinând un status procoagulant, poate fi detectată prin creșterea nivelelor serice ale moleculelor de adeziune.

În studiul nostru, pacienții cu SAF cu episoade trombotice recurente în antecedente, au avut nivele comparabile față de cei fără evenimente trombotice recurente. Determinarea acestor markeri de activare plachetară poate reprezenta o modalitate de identificare a pacienților cu risc crescut tromboembolic. De asemenea, P selectina poate reprezenta o țintă pentru demonstrarea unor noi agenți terapeutici antitrombotici.

Faneli și colaboratorii [3] au găsit valori crescute ale CD62P (Pselectinei) și CD63 (amândoi markeri ai activării plachetare) pe plachete la pacienții cu sindrom antifosfolipidic primar. Emmi [1] și colab. au confirmat aceste nivele crescute plachetelor CD62 pozitive la 16 pacienți cu sindrom antifosfolipidic primar. De asemenea, au găsit nivele crescute ale CD62 la pacienții cu complicații neurologice față de pacienții cu sindrom antifosfolipidic primar fără complicații neurologice. De asemenea, au găsit o relație lineară între nivelul anticorpilor anticardiolipinici tip IgG și procentul trombocitelor CD62 pozitive. Nivelul trombocitopeniei este moderat, rareori fiind sub  $80 \times 10^9/L$  și, de obicei, nu are semnificație clinică.

Limitele acestui studiu sunt reprezentate de existența unui lot mic de pacienți; de asemenea populația de studiu a avut o rată scăzută de evenimente trombotice acute, deși pacienții au prezentat un risc tromboembolic crescut.

### Bibliografie:

1. Emmi L., Bergamini C., Spinelli A., et al. - Possible pathogenic role of activated platelets in primary antiphospholipid syndrome involving the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*, 1997, 823: 188-200.
2. Espinosa G., Cervera R. - Antiphospholipid syndrome. *Arthritis Research and Therapy*, 2008, 10: 230 (doi:10.1186-2536).
3. Fanelli A., Bergamini C., Rapi S., et al. - Flow cytometric detection of circulating activated platelets in primary antiphospholipid syndrome. Correlation with thrombocytopenia and anticardiolipin antibodies. *Lupus*, 1997, 6: 261-267.
4. García E., Rodríguez C., Rodríguez-Martorell J., et al. - Platelet and endothelial activation are requisites for the development of antiphospholipid syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2004, 63: 600-601.
5. Giannakopoulos B., Passam F., Rahgozar S., Krilis S.A. - Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood*, 15 Jan 2007, 109(2): 422-430.
6. Groot P.G., Lutters B., Derksen R.H.W.M., Lismann T., et al. - LA and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *Thromb Haemost.*, 2005 Sep 3, (9): 1993-1997.
7. Horstman Lawrence L., Wenche Jy, Bidot C.J. et al. - Antiphospholipid antibodies:

- Paradigm in transition. *Journal of Neuro-inflammation*, 2009, 6(3): 742-751.
8. Hughes G.R.V., Harris E.N., Gharavi A.E. - The anti-cardiolipin syndrome. *J Rheumatol*, 1986, 13: 486-489.
  9. Jacob H. - *Rand.Molecular Pathogenesis of the Antiphospholipid Syndrome*. *Circ Res.*, 2002, 90: 29-37.
  10. Jankowski M., Vreys I., Wittevrongel C. - Thrombogenicity of  $\beta_2$  -glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in hamster. *Blood*, January 2003, vol 101; 1: 157-161.
  11. Joseph J.E., Donohoe S., Harrison P., et al. - Platelet activation and turnover in the primary antiphospholipid syndrome. *Lupus*, 1998, 7: 333-340.
  12. Joseph J.E., Harrison P., Mackie I.J., Isenberg D.A., Machin S.J. - Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patient with antiphospholipid síndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol*, 2001, 115: 451-459.
  13. Joseph J., Harrison P., Mackie I., Machin S.J. - Review: Platelet activation markers and the primary antiphospholipid syndrome (PAPS), *Lupus*, January 1, 1998, 7(2suppl): S48 - S51.
  14. Kamath S., Blann A.D. and Lip G. H. - Platelet activation: assessment and quantification. *European Heart Journal*, 2001, 22: 1561-1571.
  15. Kaplanski G., Cacoub P., Farnarier C., Marin V., Gregoire R., Gatel A., et al. - Increased soluble vascular cell adhesion molecule 1 concentrations in patients with primary or systemic lupus erythematosus-related antiphospholipid syndrome: correlations with the severity of thrombosis. *Arthritis Rheum*, 2000, 43: 55-64.
  16. Levine J.S., Branch W., Rauch J. - The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*, 2002, 346: 752-763.
  17. Patrick A., Nannizzi-Alaimo L., Srinivasa K. et al. - Platelet-derived CD40L, the Switch-Hitting Player of cardiovascular disease. *Circulation*, 2002, 106: 902-906.
  18. Perry S.L., Ortel T.L. - Clinical and laboratory evaluation of thrombophilia *Clin. Chest. Med*, 2003, 24:153-170.
  19. Shechter Y., Tal Y., Greenberg A., et al. - Platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome. *Blood Coag Fibrinol*, 1998, 9: 653-657.
  20. Tănăsescu C. - *Sindromul antifosfolipidic*, Editura Academiei Române, București, 2007, 363-368.
  21. Urbanus R.T., Derksen R.H., de Groot P.G. - Current insight into diagnostics and pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Blood Rev*, 2008, 22: 93-105.
  22. Urbanus R.T., Derksen R.H.W.M., de Groot P.G. - Platelet and the antiphospholipid syndrome, *Lupus*, 2008, 17: 888-894.