

## **PRIMENA NOVIH TROMBOCITNIH PARAMETARA (CD61 I RETIKULOVANIH TROMBOCITA) U LABORATORIJSKOM PRAĆENJU TROMBOCITOPENIJA**

*Slavica KRSMANOVIĆ, Bratislav STANKOVIĆ*

**Visoka zdravstvena škola strukovnih studija u Beogradu, Cara Dušana 254;  
Zemun; Srbija**

### **SAŽETAK**

**UVOD.** Retikulovani trombociti su najmlađa forma cirkulišućih trombocita, koji sadrže rezidue informacione ribonukleinske kiseline (iRNK). Broj retikulovanih trombocita odražava stepen trombopoeze, povećavajući se kada se i produkcija trombocita poveća i obrnuto. CD61 je receptor za fibrinogen, fibronektin, protrombin, trombospondin, vitronektin i *Von Willebrandov faktor*. "Floy" ("Flow")-citometrijsko imunološko određivanje broja trombocita je predloženo od strane Internacionalnog saveta za standardizaciju u hematologiji (*International Council for Standardization in Haematology, ICSH*) za referentnu metodu brojanja trombocita (2000.). Metoda je razvijena upotrebom monoklonskih antitela prema membranskim antigenima trombocita, a najčešće korišćeno je antitelo je usmereno protiv receptora CD61.

**CILJ.** Utvrditi značaj novijih trombocitnih parametara (CD61 i retikulovanih trombocita) i njihovu primenu u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici bolesti trombocita.

**MATERIJAL I METODE.** Ispitivanje je grupa bolesnika sa trombocitopenijom u Kliničkom Centru Srbije. Eksperimentalna grupa 1 obuhvatala je 28 pacijenata (12 muškaraca i 16 žena) sa trombocitopenijom različitog uzroka, koji su bili podeljeni u dve podgrupe: sa hipoplastičnom trombocitopenijom i hiperdestruktivnom trombocitopenijom.

U eksperimentalnoj grupi 2 obrađeno je 30 pacijenata (18 muškaraca 12 žena), kod kojih je planirana terapija transfuzije trombocita (akutna faza bolesti sa brojem trombocita manjim od  $50 \times 10^9/L$ ).

Kontrolnu grupu činila je 20 dobrovoljaca (9 muškaraca i 11 žena), kod kojih su trombocitni parametri (broj i srednja zapremina trombocita-MPV), bili u granici referentnih vrednosti i nisu uzimali nikakvu terapiju.

Uzorci krvi uzimani su u alikvotima od 3 mililitra (ml), venepunkcijom u Becton Dickinson vakutejnerima sa K-2 EDTA antikoagulansom. Od hematoloških parametara su određivani: broj trombocita (određivan je optičkom metodom-brojanjem trombocita u

komori za brojanje trombocita) i srednji volumen trombocita - MPV, procenat retikulovanih trombocita, - (% rTr), određen metodom "flou"-citometrije ("flow"-citometrije). U drugom delu ispitivanja pridodato je i brojanje trombocita korišćenjem monoklonskog antitela usmerenog na receptor CD61 na analizatoru "Cell Dyn SAPHIRE" (Abbott Diagnostics, USA).

**REZULTATI.** Dobijeni rezultati pokazali su statistički značajnu razliku procenta retikulovanih trombocita između kontrolne grupe i eksperimentalne grupe-1 i eksperimentalne grupe-2 pacijenata sa trombocitopenijom (13,312 % prema 1,776 %). Poređenjem vrednosti retikulovanih trombocita između pacijenata sa hiperdestruktivnom i hipoplastičnom trombocitopenijom dobija se, takođe, statistički značajna razlika (18,780 % prema 6,022 %). Statistički su se značajno razlikovali i broj i srednja zapremina trombocita (MPV).

Između vrednosti trombocita određenih PLTo i CD61 metodom ne postoji statistički značajna razlika ( $p = 0,9431$ ). Vrednosti trombocita određene PLTi metodom su statistički značajno više od vrednost PLTo ( $p = 0,0071$ ) i od vrednosti CD61 ( $p = 0,0049$ ).

**ZAKLJUČAK.** Diferencijalne dijagnostičke metode su ograničene i biopsija koštane srži (*bone marrow needle biopsy*) se smatra "zlatnim standardom" dijagnoze trombocitopenije. "Flou"-citometrijska analiza retikulovanih trombocita je zato i našla svoje mesto kao dodatna, neinvazivna dijagnostička metoda, jer su brojne studije poslednjih 20 godina prikazale retikulovane trombocite u perifernoj krvi kao odraz stepena megakariopoeze u kostnoj srži. Zato je i zadatak biohemijskih laboratorija da podstaknu ovakvu vrstu ispitivanja, u cilju dobijanja kompletnijih informacija o dijagnozi, tretmanu i prognozi trombocitopenije.

**KLJUČE REČIK:** trombociti; trombocitopoeza; trombocitopenija; retikulovani trombociti; receptor CD61.

---

## **I. UVOD**

Retikulovani trombociti su najmlađa forma cirkulišućih trombocita, koji sadrže rezidue informacione ribonukleinske kiseline (iRNK). Broj retikulovanih trombocita odražava stepen trombocitopoeze. Postoji uzajamna veza između produkcije

trombocita i broja retikulovanih trombocita. Zato se trombocitopoeza ubrzava kada se uvećava broj retikulovanih trombocita i obrnuto. CD61 je receptor na membrani trombocita koji ima veoma bitnu ulogu u hemostazi jer se za njega vezuju mnogi činioci koagulacije: fibrinogen,

fibronektin, protrombin, trombospondin, vitronektin i *Von Willebrandov faktor*. Zato je kvantitativno određivanje broja receptora CD61 važan laboratorijski parametar za praćenje hematoloških bolesti (posebno trombocitopenije). "Floy" ("flow") - citometrijsko imunološko određivanje broja trombocita je predloženo od strane Internacionalnog saveta za standardizaciju u hematologiji („*International Council for Standardization in Haematology*“, *ICSH*) za referentnu metodu brojanja trombocita (2000. godine). Metoda je razvijena upotrebom monoklonskih antitela prema membranskim antigenima trombocita, a najčešće korišćeno je antitelo usmereno protiv antigena CD61 [1, 2].

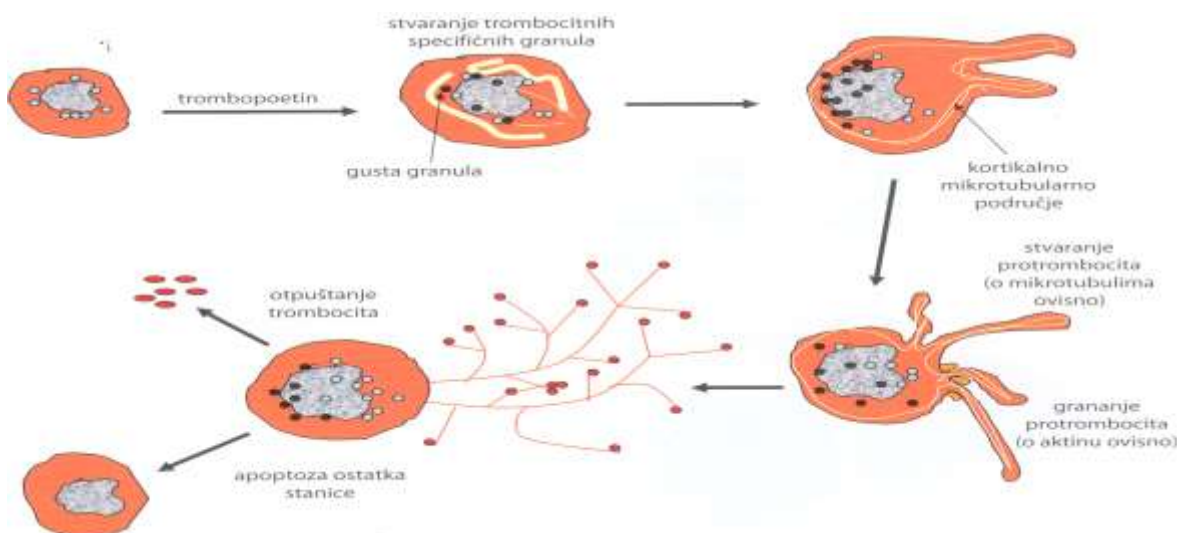
Još početkom dvadesetog veka (Wright, 1906. godine), bilo je poznato da trombociti nastaju fragmentacijom citoplazme najvećih ćelija u koštanoj srži, **zrelih megakariocita**, koji nastaju iz nezrelih hematopoeznih ćelija. Proces **megakariocitopoeze** predstavlja diferencijacije **nezrelih hematopoeznih "pluripotentnih" matičnih ćelija (CFU-S)**, koje normalno nisu u reproduktivnom ciklusu i diferenciraju se u **usmerene ćelije za trombocitnu lozu**, tj. "unipotentne" (usmerene) matične ćelije - **megakariocite** čijim sazrevanjem se stvaraju zreli **trombociti** [3-5]. Megakariociti se mogu uspešno kultivisati na agaru [6] i na koagulumu plazme na kome se iz ćelija koštane srži

čoveka stvaraju **kolonije megakariocita (BFU-Mk)** [7, 8].

U toku megakariocitopoeze, u stadijumu prethodnih nezrelih ćelija, dolazi do povećanja bria megakariocita i njihove proliferacije i diferencijacije kao odgovor na mitotičke faktore rasta. **Promegakarioblasti** prelazni su tip ćelija od prethodnih nezrelih do zrelih postmitotičkih ćelija. Zreli megakariociti su izgubili sposobnost proliferacije ali poseduju sposobnost povećane sinteze DNK (dezoksi ribonukleinske kiseline), bez deobe ćelija. Zreli megakariociti zbog toga imaju mnogo veći volumen nego druge ćelije koštane srži. Jedan megakariocit stvara 2.000 do 3.000 trombocita. Vrlo rane prekursorne ćelije megakariocitopoeze i njihov proliferacioni potencijal moguće je dokazati u **kulturi BFU-Mk (megakariocitne kolonije poput "praska")**. Kolonije BFU- Mk imaju vrlo veliki proliferacioni potencijal i zato stvaraju 100 do 500 megakariocita po ćeliji. Po morfološkom izgledu ove kolonije odgovaraju eritoidnim BFU-E kolonijama. Za rast kultura ćelija potrebni su proliferacioni faktori, i to: interleukini (posebno IL-3) i granulocito- -monocitni činioci rasta (GM-CSF). Ovi proliferacioni faktori znatno povećavaju proliferaciju u saradnji sa IL-3 (SCF, IL-11, IL-1 alfa, trombopoetin - - TPO). CFU-Mk (jedinice koje stvaraju kolonije megakariocita) utiču na diferenciranje ćelija megakariocitopoeze koje imaju manji proliferacioni

potencijal (jedna ćelija megakarioblasta stvara 4 do 32 megakariocita). Za rast i stvaranje kolnija potreban im je jedan od faktora rasta (IL-3, GM-CSF) uz potporno delovanje SCF, FLT3 liganda i TPO. Krajnji ishod razvoja megakariocita je otpuštanje trombocita u krvotok. Pored napretka medicinske tehnologije, tačan način nastanka trombocita još uvek nije u potpunosti rasvetljen. Tokom sazrevanja, membrana megakariocita proliferiše, pa nastaje

tubularna membranska mreža poznata pod nazivom demarkacioni membranski sistem (DMS). Smatra se da DMS deli citoplazmu megakariocite od trombocitnih područja. Trombociti nastaju iz citoplazme megakariocita stvaranjem izduženih tankih nastavaka nazvanih **protrombocitima** (slika 1), koje se obično nalaze na delu membrane megakariocita u blizini endotelnih ćelija koje oblažu sinusoide koštane sži [4, 8].



**Slika 1.** Proces megakariocitopoeze [4]

Trombociti su krvne ćelije koje sa faktorima koagulacije učesvuju u procesu hemostaze, tj. zaustavljanju krvarenja nakon povreda krvnih sudova [1]. Trombociti su male bikonveksne krvne ćelije bez jedra, nastale fragmentacijom prekursornih ćelijka - megakariocita [4, 5]. Prečnik trombocita je 2-3 mikrona ( $\mu\text{m}$ ), sa prosečnim životnim vekom u cirkulaciji 5—9 dana.

Ime trombocita potiče od grčkih reči: **θρόμβος**—ugrušak i **κύτος**—ćelija, što ukazuje na njihovu osnovnu funkciju - formiranje krvnog ugruška [2]. Trombociti su kao takvi prisutni jedino kod sisara, dok kod ostalih vrsta kičmenjaka (npr. ptice, vodozemci itd.) oni cirkulišu kao intaktne mononuklearne ćelije [9-16].



**Slika 2.** Aktivirani trombociti (izgled na elektronskom mikroskopu) [preuzeto sa sajta <http://www.fi.edu/learn/heart/blood/platelet.html>]

**CILJEVI** ovog stručnog rada su: upoznavanje sa značajem novijih trombocitnih parametara (CD61 i retikulovanih trombocita) u svakodnevnoj kliničkoj praksi i mogućnostima njihove primene u rutinskom laboratorijskom praćenju trombocitopenije.

## **II. DOSADAŠNJA SAZNANJA**

### **P. 1. Proces megakariocitopoeze**

Trombopoetin (TPO) je najvažniji faktor rasta megakariocitopoeze. Kontrolu sinteze TPO kontroliše gen THPO, koji je lokalizovan na hromozomu 3. Istraživanja genske inaktivacije, pokazala su TPO i njegov receptor Mpl (mijeloproliferativni receptor), primarni regulatori megakario-trombocitopoeze. Tokom normalne hemostaze broj trombocita se održava u uskim granicama, pri čemu je nivo cirkulišućeg TPO relativno nizak. Tokom trombocitopenije (broj trombocita niži od  $150 \times 10^9 /L$ ), zbog pada mase trombocita dolazi do redukcije vezivanja i razgradnje TPO od Mpl pozitivnih

trombocita. Zato raste koncentracija slobodnog TPO u serumu. TPO stvaraju četiri organa: jetra, bubreg, koštana srž i slezina. Prema dosadašnjim istraživanjima pretpostavlja se da se najveći deo TPO stvara u jetri i bubrezima. TPO deluje na ćelije koje poseduju Mpl receptore. U ćelije koje sadrže Mpl receptore. spadaju: megakariociti, trombociti i prethodne nezrele matične CD34+ ćelije. TPO stvara CD41+ megakariocite [4, 8]. Najnezrelija morfološki prepoznatljiva prethodna (prekursorna) ćelija trombocitne loze je **megakarioblast**. Ova ćelija podseća na mijeloblast i prethodnik je **promegakariocita** i **megakariocita**. Megakariociti se lako prepoznaju u razmazu koštane srži zbog svoje veličine i lobularnog jedra [4].

### **II. 2. Morfologija trombocita**

Od diferencijacije matične ćelije hematopoeze do stvaranja trombocita potrebno je prosečno da protekne 10 dana. Normalan broj trombocita je 250 h

$10^9/L$ . Srednji promer trombocita je 1-2 mikrometara ( $m\mu$ ), a srednji ćelijski volumen 5,8 femto litara (fl). Mladi trombociti (retikulovani trombociti) provode oko 36 sati u slezini nakon izlaska iz koštane srži. Od ukupne mase trombocita, oko trećine trombocita nalazi se u slezini. Staza krvi u slezini ne dovodi do oštećenja trombocita. Destrukcija trombocita primarno se dešava u koštanoj srži, jetri i slezini [1, 2, 4].

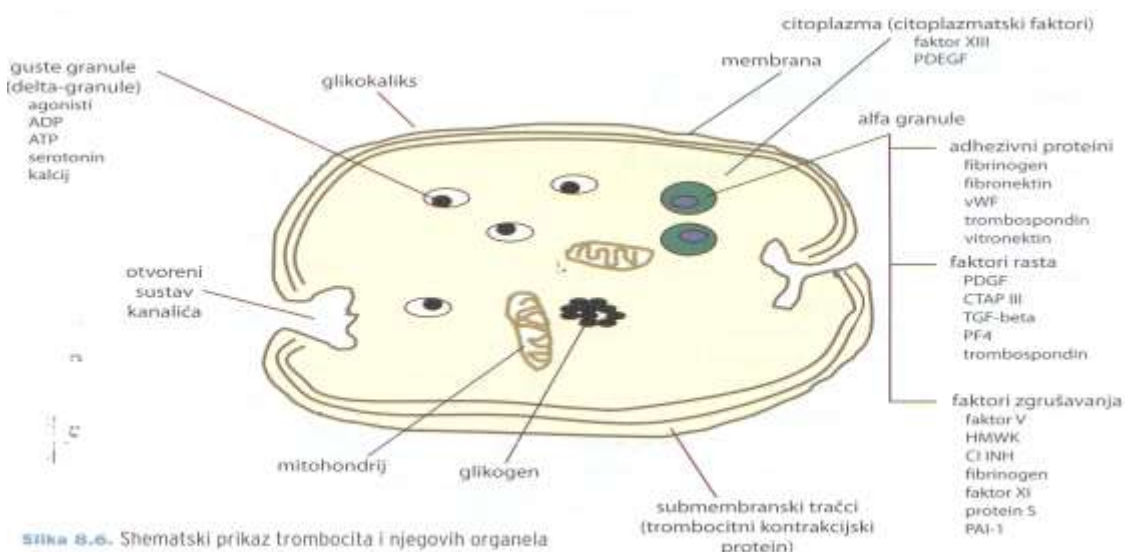
Ako se sagleda morfologija trombocita, može se zaključiti da su to krvne ćelije diskoidnog oblika, ne sadrže jedro, endoplazmatski retikulum niti Goldžijev (Golgijev) aparat. Periferna zona trombocita obavijena je omotačem trombocita nazvanim **glikokaliksom**. Ona sadrži plazmatske proteine (fosfolipide, holesterol, glikolipide i 9 glikoproteina od GpI do GpIX) i faktore koagulacije (posebno faktor I – fibrinogen, kao i faktore koagulacije V, VII, XII, XIII, receptore za Von Willebrandov faktor-vWF i fibrinogen), činioce fibrinolize i komponente komplementa. Ispod glikokaliksa nalazi se membrana trombocita koja ima negativan elektronski potencijal i sastavljena je od konglomerata lipidnih i proteinskih molekula, a naziva se **sol-gel**

**zonom**. Ispod membrane trombocita nalazi se sistem filamenata (koga čine aktin i miozin) i mikrotubula koji čine **skelet trombocita**. Ovaj skelet omogućava trombocitima kretanje i promenu oblika. Membranski fosfolipid (TF3) važan je u pretvaranju FX u aktivirani FX (Fxa) i pretvaranje protrombina u trombin [1, 2, 4].

U unutrašnjosti trombocita nalazi se u zoni organela **alfa-granule** (kojih ima najviše) i **guste granule** (uz ostale aktivne supstance i metabolite, sadrži adenozin-difosfat – ADP i serotonin). Druge važne organele su **lizozomi** koji sadrže hidrolitičke enzime i peroksizome koji su bogati katalaztom. Morfologija trombocita je prikazana je na slici 3 [4, 17-19].

Membranozna zona je sačinjena od membrana nastalih od glatkog endoplazmatskog retikuluma megakariocita, organizovanih u gusti tubularni sistem koji je odgovoran za sintezu i oslobađanje tromboksana A<sub>2</sub> [9].

Periferna zona je bogata glikoproteinima potrebnim za trombocitnu adheziju, aktivaciju i agregaciju (gpIb/IX/X; gpVI; gpIIb/IIIa) [17].



Slika 8.6. Šematski prikaz trombocita i njegovih organela

**Slika 3.** Šematski prikaz trombocita i njihovih granula [4].

### II. 3. Trombocitni antigena i antitela

Na površini trombocita nalaze se i specifična antigeni HPA 1-8, a svaki se sastoji od a ili b alela. Oni izražavaju antigene sistema AB0 krvnogrupnog sistema i antigene sistema HLA klase I [4].

**Antigen CD61** je deo glikoprote- inskog kompleksa IIIa/IIb, takođe obeležen i kao **integrin  $\beta 3$** . To je površinski

antigen membrane trombocita (slika 4) [20].

Slika 4. Integrin  $\beta 3$  [20]

**Antigen CD61** je receptor za fibrinogen, fibronektin, protrombin, trombospondin, vitronektin i vWF, i kao takav jedan je od ključnih činilaca primarne hemostaze [20]. "Floy"-citometrijsko imunološko određivanje broja trombocita (2000. godine) predloženo je od strane Internacionalnog saveta za

standardizaciju u hematologiji (*International Council for Standardization in Haematology, ICSH*) za referentnu metodu brojanja trombocita. Metoda je razvijena upotrebom monoklonskih antitela usmerenih prema membranskim antigenima trombocita, a najčešće





### II..3. Bolesti trombocita

Abnormalnosti ili bolesti trombocita se nazivaju **trombocitopatije**, koje mogu biti **kvantitativne** (snižen broj trombocita - **trombocitopenije** ili povišen broj trombocita - **trombocitoze**) i kvalitativne, kada dolazi do poremećene funkcije trombocita i nazivaju se **trombastenijama** [4, 5, 16, 19].

Često, nizak broj trombocita (trombocitopenija) nije klinički problem, otkriva se slučajno, testiranjem kompletne krvne slike. Međutim, pacijent može imati modrice ili purpuru na nadlakticama, petehije ili krvarenja iz nosa ili desni. Ponekad su te promene trombocitopenija, kongenitalna aplastična (Fanconyeva) anemija, Bernard-Soulierov sindrom, May-Hegglinova anomalija, sindrom sivih trombocita, Wiskot-Aldrichov sindrom... ] [4, 5, 16, 19].

Trombocitopenije mogu da nastane i zbog ubrzane razgradnje trombocita, koja može da se javi kod sledećih patoloških stanja: a) idiopatska trombocitopenijska purpura (ITP); b) trombotična trombocitopenijska purpura (TTP); v) hemolizno- uremijski sindrom (HUS); g) diseminovana intravaskularna koagulacija (DIK); d) paroksizmalna noćna hemoglobinurija (PNH); đ) antifosfolipidni sindrom e) sistemski lupus eritematodes (SLE); ž) posttransfuziona purpura z) neonatalna aloimuna trombocitopenija; i) splenomegalija; j) trombocitopenija

krupnije, pa se nazivaju ekhimozama. Osobe sa niskim trombocitima se često žale na slabost, umor, nevezano sa gubitkom krvi. Takođe je usporeno i zarastanje rana. Odrasli često imaju velike, krvlju ispunjene bule u ustima.

Trombocitopenije mogu nastati zbog smanjene produkcije trombocita. i to zbog: A) deficijencija vitamina B12 ili folne kiseline; B) leukemije ili mijelodisplastičnog sindroma; V) smanjene produkcija trombopoetina u jetri (zbog bolesti jetre); G) sepse; D) retkih bolesti (Denga groznica, direktnom infekcijom megakariocita i smanjenog preživljavanja trombocita); Đ) pojave naslednih bolesti [kongenitalna amegakariocitna

indukovana virusom humane imunodeficijencije (HIV) [4, 5, 16, 19].

Takođe, trombocitopenija može nastati zbog upotrebe lekova: valproična kiselina, metotreksat, karboplatina, rekombinantnog interferona, svi hemioterapeutici, H2 blokatori (direktna mijelosupresija), heparin ili abciksimab (imunološki indukovana trombocitopenija) [16, 19].

U opštoj hirurgiji, kao i na hematološkim odeljenjima, trombocitopenija je jedna od najvećih problema što preoperativne pripreme i postoperativnog toka bolesti, to i same terapije i prognoze hematoloških oboljenja. Definicija trombocitopenije je nizak broj trombocita, tj. niži od  $150 \times 10^9/L$ , mada neki autori tvrde da se trombocitopenijom smatra tek smanjenje broja trombocita ispod  $50 \times 10^9/L$  [4, 5, 16].

### III. MATERIJAL I METODOLOGIJA

Ispitivanje je sprovedeno u grupi bolesnika sa trombocitopenijom u Klinici za digestivnu hirurgiju, Klinici za hematologiju i Interno-opšte-intenzivnog odeljenja Urgentnog centra, Kliničkog Centra Srbije.

Eksperimentalna grupa-1 obuhvata 28 pacijenata (12 muškaraca i 16 žena). Starost pacijenata je od 21 do 91 godinu, sa trombocitopenijom različitog uzroka, koji su nakon postavljanja dijagnoze podeljeni u dve grupe, na osnovu patofiziološkog mehanizma smanjenja broja trombocita: hipoplastične trombocitopenije, HPT (broj pacijenata 12 - N=12) i hiperdestruktivne trombocitopenije, HDT (broj pacijenata 16 - N=16).

U eksperimentalnoj grupi-2 obrađeno je 30 pacijenata (18 muškaraca i 12 žena), starosne dobi od 28 do 76 godina. Kod njih je planirana terapija transfuzije trombocita gde su kriterijumi za prihvatanje ovih pacijenata bili broj trombocita niži od  $50 \times 10^9 / L$  i akutna faza bolesti, što je bila klinička procena ordinirajućeg lekara.

Kontrolnu grupu činilo je 20 dobrovoljaca (9 muškaraca i 11 žena), starosti od 30 do 74 godine, kod kojih su trombocitni parametri, broj i srednja zapremina trombocita (MPV), bili u granici referentnih vrednosti i nisu uzimali nikakvu terapiju.

Uzorci krvi uzimani su u vakutajner epruvetama od 3 ml venepunkcijom u "Becton Dickinson" vakutajnerima sa K-2 EDTA (kao antikoagulumom). Od laboratorijskih analiza kod svih ispitivanih pacijenata rađeni su: broj trombocita (određivan je optičkom metodom brojanja trombocita u komori za brojanje trombocita) i srednji volumen trombocita (MPV), procenat retikulovanih trombocita (% rTr) određivan je metodom "fluorocitometrije", dok je u drugom delu ispitivanja optičkoj i impedansnoj metodi pridodato i brojanje trombocita korišćenjem monoklonskog antitela usmerenog na receptor CD61 na analizatoru (*Cell Dyn SAPHIRE*, Abbott Diagnostics), uz korišćenje komercijalnih reagenasa (slika 6) Uzorci krvi su rađeni najkasnije 48 sati od momenta uzorkovanja i za to vreme su čuvani u namenskom frižideru na  $+4^{\circ}C$ .



**Slika 6.** Analizator (*Cell Dyn SAPPHIRE*, Abbott Diagnostics)

"

Floy"-citometrija koju smo koristili u našoj studiji je metoda koja određuje optičke i fluorescentne karakteristike pojedinačnih krvnih ćelija [22, 23]. Fluorescencija je fenomen gde je svetlost apsorbovana na jednoj, a zatim emitovana na drugoj, nešto višoj talasnoj dužini. Kod aparata *Cell Dyn SAPPHIRE* ćelijska fluorescencija je rezultat upotrebe specijalnih boja, koje se vezuju za određenu ćelijsku komponentu i u interakciji su sa laserom. Ribo- nukleinska kiselina (RNK) u retikulovanim trombocitima vezuje boju, koja biva pobuđena laserom talasne dužine 488 nanometara (nm) i fluorescira u uskoj oblasti sa centrom na 530 nm. Retikulovani trombociti su definisani u ovoj metodi kao frakcija trombocita sa pojačanim intenzitetom bojenja RNK od onog što je predviđeno na osnovu njihove zapremine [22, 24]. U imunološkoj metodi određivanja broja trombocita ključnu ulogu igra monoklonsko antitelo usmereno protiv

antigena CD61 i ono je obeleženo bojom FITC (*fluorescein izotiocijanat*). Ova boja se meša sa uzorkom cele krvi u vakutajner epruveti i inkubira u termostatu na 37 °C. Nakon toga se detektuju obeleženi trombociti i specifičnim algoritmima se izražavaju kao broj trombocita [25-27].

## IV. REZULTATI

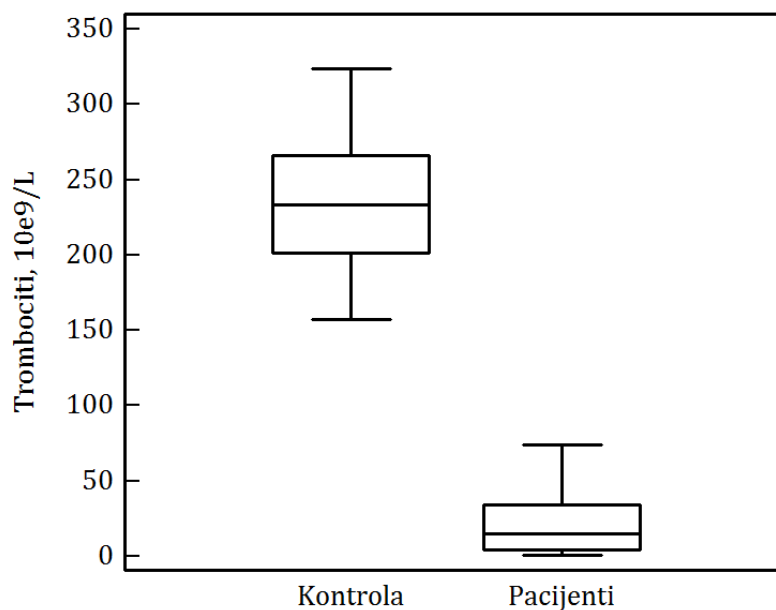
### IV.1. Laboratorijske vrednosti određivanja retikulovanih trombocita kod bolesnika sa trombocitopenijom

Radi procene kliničkog značaja retikulovanih trombocita upoređene su vrednosti laboratorijskih parametara kod kontrolne grupe i grupe pacijenata sa trombocitopenijama različitih uzroka. Izračunavan je i koeficijent korelacije ( $\rho$ ). Dobijene vrednosti prikazane su u Tabeli 1. i na grafikonu 1, 2 i 3.

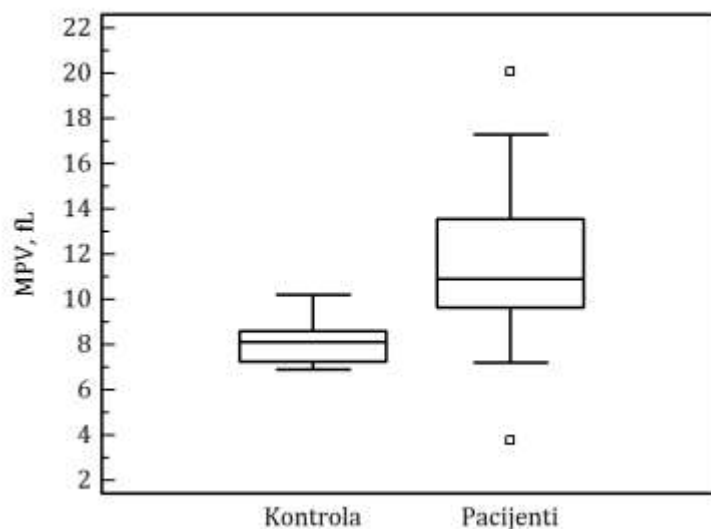
**Tabela 1.** Poređenje vrednosti parametara između pacijenata eksperimentalne grupe sa trombocitopenijom i kontrolne grupe [podaci su prikazani kao srednja vrednost – Xsr (Sd) i koeficijent korelacije (p)\*]

Parametar	Kontrola grupa (N = 20)	Eksperimentalna grupa pacijenata (N = 28)	p*
Broj trombociti, h 10 <sup>9</sup> /L	232,0 (46,26)	22,64 (22,55)	< 0,0001
MPV (fl)	8,06 (0,860)	11,56 (3,360)	< 0,0001
Retikulovani trombociti procentualni (%) odnos	1,776 (0,8414)	13,312 (9,0645)	< 0,0001

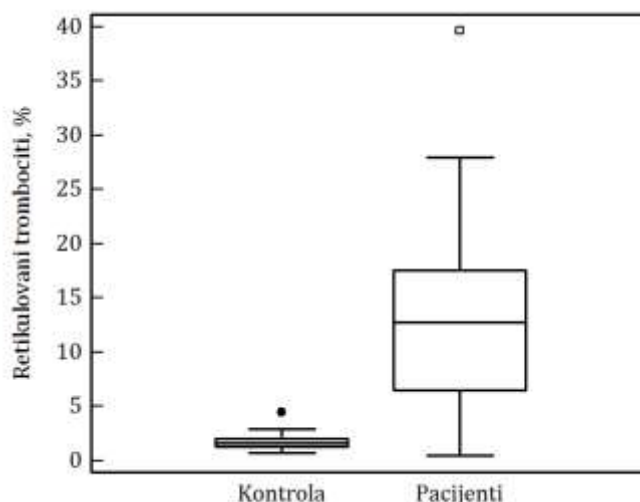
\* p < 0,05 – statistički značajna razlika



**Grafikon 1.** Vrednosti trombocita kod eksperimentalne grupe pacijenata sa trombocitopenijom i kontrolne grupe (podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafikon koji pokazuju 10, 25, 50, 75 i 90 percentila)



**Grafikon 2.** Vrednosti srednjeg volumena trombocita (MPV) kod pacijenata eksperimentalne grupe pacijenata sa trombocitopenijom i kontrolne grupe. (podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafikon koji pokazuju 10, 25, 50, 75 i 90 percentila)



**Grafikon 3.** Vrednosti retikulovanih trombocita kod eksperimentalne grupe pacijenata sa trombocitopenijom i kontrolne grupe (podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafikon koji pokazuju 10, 25, 50, 75 i 90 percentila) Takođe, upoređene su vrednosti hematoloških parametara kod kontrolne grupe i grupa pacijenata sa hipoplastičnom (HPT) i hiperdestruktivnom trombocitopenijom (HDT). Dobijene vrednosti prikazane su u Tabelama 2, 3 i 4 i na grafiko-nima 4, 5 i 6.

**Tabela 2.** Poređenje vrednosti parametara između pacijenata eksperimentalne grupe sa hipoplastičnom trombocitopenijom (HPT) i pacijenata sa hiperdestruktivnom trombocitopenijom (HDT). [podaci su prikazani kao srednja vrednost – Xsr (Sd) i koeficijent korelacije (p)\*]

Parametar	HPT (N = 12)	HDT (N = 16)	p*
Trombociti h 10 <sup>9</sup> /L	33,67 (27,404)	14,37 (13,952)	0,022
MPV (fl)	10,55 (2,278)	12,32 (3,884)	0,173
Retikulovani trombociti, procentual-ni (%) odnos	6,022 (4,2570)	18,780 (7,7586)	< 0,0001

- p < 0,05 – statistički značajna razlika

**Tabela 3.** Poređenje vrednosti parametara između pacijenata sa hipoplastičnom trombocitopenijom (HPT) i kontrolne grupe. [podaci su prikazani kao srednja vrednost – Xsr (Sd) i koeficijent korelacije (p)\*]

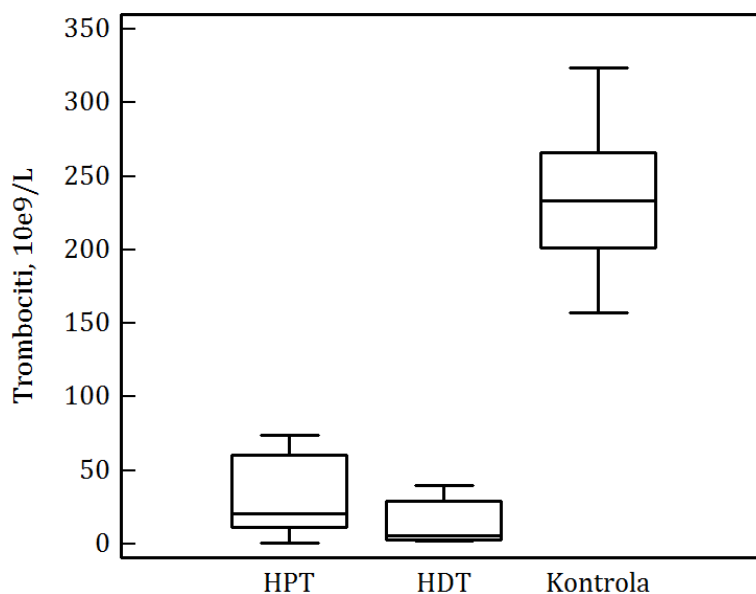
Parametar	Kontrola (N = 20)	HPT (N = 12)	p*
Trombociti, 10 <sup>9</sup> /L	232,0 (46,26)	33,67 (27,404)	< 0,0001
MPV, FL	8,06 (0,860)	10,55 (2,278)	0,0001
Retikulovani trombociti, (%) odnos	1,776 (0,8414)	6,022 (4,2570)	0,0001

\*p < 0,05 – statistički značajna razlika

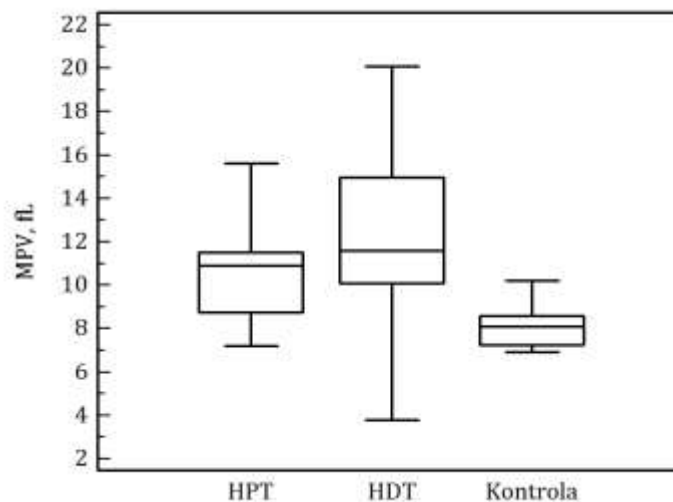
**Tabela 4.** Poređenje vrednosti parametara između pacijenata sa hiperdestruktivnom trombocitopenijom (HDT) i kontrolne grupe. [podaci su prikazani kao srednja vrednost – Xsr (Sd) i koeficijent korelacije (p)\*]

Parametar	Kontrola (N = 20)	HDT (N = 16)	p*
Trombociti, 10 <sup>9</sup> /L	232,0 (46,26)	14,37 (13,952)	< 0,0001
MPV, fl	8,06 (0,860)	12,32 (3,884)	< 0,0001
Retikulovani trombociti, %	1,776 (0,8414)	18,780 (7,7586)	< 0,0001

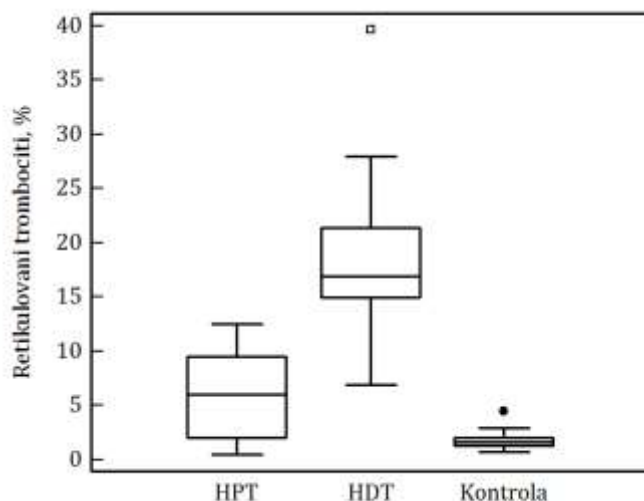
\* p < 0,05 – statistički značajna razlika



**Grafikon 4.** Vrednosti trombocita kod pacijenata eksperimentalne grupe sa hipoplastičnom trombocitopenijom (HPT), pacijenata sa hiperdestruktivnom trombocitopenijom (HDT) i kontrolne grupe. [podaci su predstavljani kao *box-plots* grafikon koji pokazuju 10, 25, 50, 75 i 90 percentila]



**Grafikon 5.** Vrednosti MPV kod pacijenata sa hipoplastičnom trombocitopenijom (HPT), pacijenata sa hiperdestruktivnom trombocitopenijom (HDT) i kontrolne grupe. (podaci su predstavljani kao *box-plots* grafikon koji pokazuju 10, 25, 50, 75 i 90 percentila)



**Grafikon 6.** Vrednosti retikulovani trombociti kod pacijenata sa hipoplastičnom trombocitopenijom (HPT), pacijenata sa hiperdestruktivnom trombocitopenijom (HDT) i kontrolne grupe. (podaci su predstavljeni kao *box-plots* grafikon koji pokazuju 10, 25, 50, 75 i 90 percentila)

#### IV.2. Laboratorijske vrednosti određivanja broja trombocita primenom tri metode kod bolesnika sa trombocitopenijom

Vršeno je merenje distribucije vrednosti broja trombocita primenom tri metoda: 1. impedance (PLTi); 2. optičke metode (PLTo) i 3. imuno-bojenjem (određivan je broj CD61 receptora). Na osnovu dobijenih rezultata izračunavan je koeficijent korelacije ( $p$ ) (tabela 5).

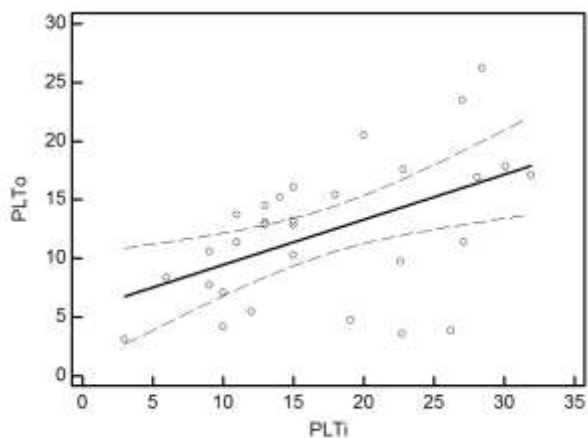
**Tabela 5.** Distibucija vrednosti trombocita određenih primenom 3 metode (impedanca - PLTi, optička metoda - PLTo i imuno-bojanjem - CD61)

Trombociti	N	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Medijana	Minimum	Maksimum	$p^*$
PLTi, h $10^9/L$	30	17,267	7,7820	15,000	3,000	31,900	0,2399
PLTo, h $10^9/L$	30	12,272	5,9025	12,900	3,120	26,200	0,7518
CD61, h $10^9/L$	30	12,167	5,4724	11,750	2,790	26,700	0,1618

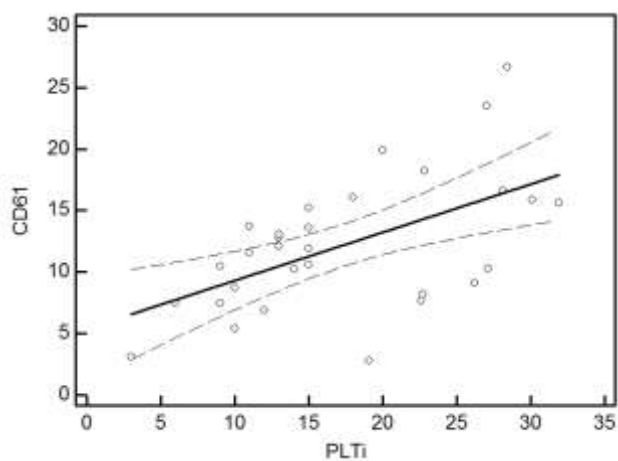
\* $p > 0,05$  – normalna distribucija

Pošto je distribucija vrednosti broja trombocita dobijena primenom ove tri metode približno ista, urađena je Pearsonova korelacija. Uz koeficijent korelacije izdaje se interval pouzdanosti (95% CI) i meren je koeficijent korelacije ( $p$ ). Ako je  $p < 0,05$  dve grupe podataka su u značajnoj korelaciji.

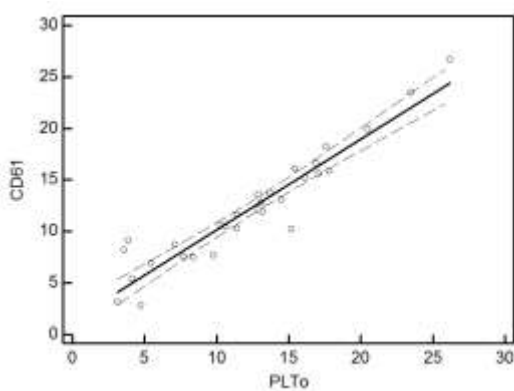




**Grafikon 7.** Korelacija vrednosti trombocita određenih PLTi i PLTo metodom.  
Koeficijent korelacije  $r = 0,5058$ ; 95% CI je 0,1780–0,7325;  $p = 0,0044$



**Grafikon 8.** Korelacija vrednosti trombocita određenih PLTi i CD61 metodom.  
Koeficijent korelacije  $r = 0,5597$ ; 95% CI je 0,2497–0,7656;  $p = 0,0013$

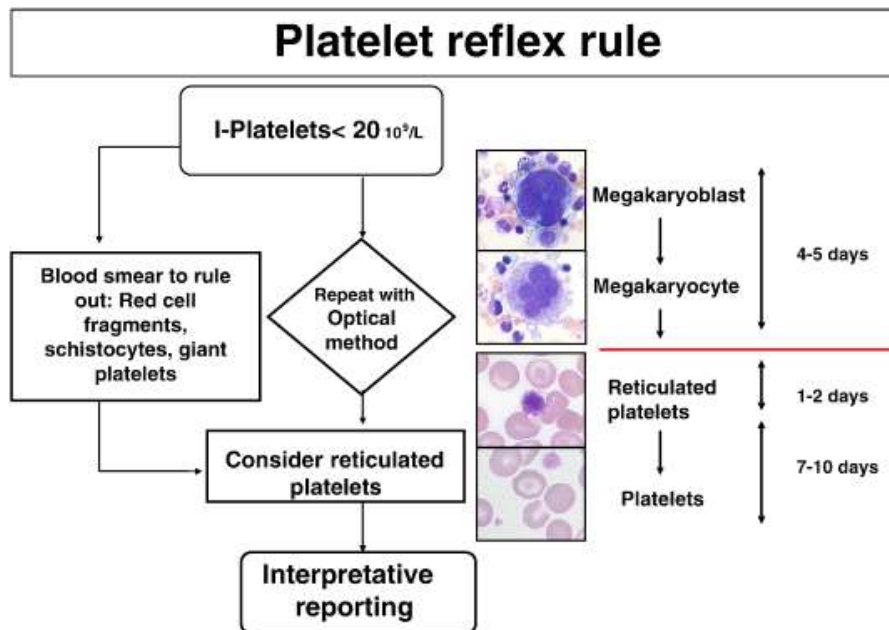


**Grafikon 9.** Korelacija vrednosti trombocita određenih PLTo i CD61 metodom.  
Koeficijent korelacije  $r = 0,9477$ ; 95% CI je 0,8920–0,9751;  $p = < 0,0001$

## V. DISKUSIJA

2009. godine predložen je jedan dijagnostički algoritam koji bi mogao da služi kao vodič za interpretaciju rezultata niskih vrednosti trombocita kod trombocitopenija. Kod pacijenata sa trombocitopenijom određivanje retikulovanih trombocita smatra se korisnim za procenu trombocitopoeze u koštanoj srži, za diferencijalnu dijagnostiku i za objašnjenje patofiziologije trombocitopenijskih poremećaja [28-33].

Takođe, kako su u našoj studiji dobijene statistički značajno više vrednosti broja trombocita primenom impedance kao metode određivanja broja trombocita, određivanje retikulovanih trombocita "flou"-citometrijskom metodom (koja je zasnovana na imuno-bojenju i uz upotrebu monoklonskih antitela usmerenih prema antigenu CD61), daju najtačnije rezultate kod trombocitopeničnih pacijenata i poboljšavaju procenu efikasnosti terapije. Ovo ukazuje na potrebu pridržavanja algoritma ispitivanja trombocitopenija (slika7).



**Slika 7.** Algoritam trombocitopenije

(preuzeto sa sajta: <http://en.wikipedia.org/wiki/Thrombocytopenia>)

Ovaj algoritam je opisan na sledeći način: ukoliko impedancijski analizator izbroji manje od  $20 \times 10^9/L$  trombocita, prvi korak u kontrolnom (refleks) testiranju je pregled perifernog krvnog

razmaza u cilju isključenja prisustva eritrocitnih fragmenata, šizocita (eritrociti promenjene morfologije i oblika, pri čemu eritrociti gube diskoidni oblik i dobijaju oblik šlema) i

džinovskih trombocita. U razmazu periferne krvi vrlo retko mogu da se nađu megakariociti ili delovi megakariocita. U perifernom razmazu krvi se obično nalaze nepravilni delovi jedra megakariocita, opkoljeni malim slojem citoplazme. Delovi megakariocita najčešće se nalaze u razmazima krvi osoba obolelih od hronične mijeloidne leukemije, sepse i nakon akutnih hemoragija [4, 20]. Drugi korak u ispitivanju (algoritmu) trombocitopenije je ponovno brojanje trombocita optičkom metodom u komori za brojanje trombocita i treći korak je određivanje procenta retikulovanih trombocita. Kako tehnologija u medicini napreduje, ova optička metoda brojanja trombocita u komori bi mogla biti zamenjena imuno-brojanjem (tj. određivanjem procenta retikulovanih trombocita), upotrebom monoklonalnih antitela usmernim prema površinskim antigenima na membrani trombocita CD61, što je početkom dvadeset prvog veka i prihvaćeno kao referentna metoda određivanja broja trombocita [24, 30]. Najčešće korišćena monoklonska antitela su usmerena prema glikoproteinskom kompleksu membrane trombocita gpIIIa/IIb, a deo kompleksa gpIIIa/IIb se u CD nomenklaturi obeležava kao receptor CD61 [28].

Dobijeni rezultati u našoj studiji pokazali su statistički značajnu razliku procenta retikulovanih trombocita između kontrolne grupe i eksperimentalne grupe pacijenata sa trombocitopenijom (13,312 % prema 1,776 %). Poređenjem vrednosti retikulovanih trombocita

između pacijenata sa hiperdestruktivnom i hipoplastičnom trombocitopenijom dobija se, takođe, statistički značajna razlika (18,780 % prema 6,022 %). Pronađena je i statistički značajna razlika u broju trombocita u ispitivanim grupama pacijenata sa trombocitopenijom i u srednjim vrednostima zapremina trombocita (MPV).

U našoj studiji, ne postoje statistički značajne razlike ( $p = 0,9431$ ). između vrednosti trombocita određenih optičkim metodom (PLTo) i imuno-bojenjem, tj. određivanjem CD61 receptora. Vrednosti trombocita određene metodom impedance (PLTi) su statistički značajno više ( $p = 0,0071$ ) od vrednosti broja trombocita određenim optičkom metodom, tj. brojanjem trombocita u komori za trombocite (PLTo) i od vrednosti broja retikulovanih trombocita dobijenih imuno-bojenjem, tj. određivanjem CD61 receptora ( $p = 0,0049$ ).

## VI. ZAKLJUČAK

Trombocitopenija može biti rezultat nedovoljne sinteze trombocita u koštanoj srži, povećane potrošnje na periferiji ili ubrzane razgradnje trombocita u retikuloendotelijalnom sistemu. Diferencijalne dijagnostičke metode su ograničene i biopsija koštane srži (*bone marrow needle biopsy*) se još uvek smatra "zlatnim standardom" dijagnoze trombocitopenije [30, 31]. "Flou"-

citometrijska analiza retikulovanih trombocita je zato i našla svoje mesto kao dodatna, neinvazivna dijagnostička metoda u ispitivanju trombocitopenija. Brojne studije su u poslednjih dvadesetak godina prikazale retikulovane trombocite u perifernoj krvi kao odraz stepena megakariopoeze u kostnoj srži [22]. Zato je i zadatak biohemijskih laboratorija da podstaknu ovakvu vrstu ispitivanja, u cilju dobijanja kompletnijih informacija o dijagnozi, tretmanu i prognozi trombocitopenija.

U sklopu neinvazivne dijagnostike poremećaja trombocitne loze, sve više primenu nalaze i biomarkeri, kao što su: TPO (trombopoetin) i anti – trombocitna antitela. Navedeni biomarkeri u sklopu algoritma dijagnostike trombocitopenije mogu dati kompletnu informaciju kliničaru o patofiziološkim poremećajima megakariocitopoeze, a posebno u postavljanju dijagnoze, tretmanu i prognozi trombocitopenija.

## LITERATURA:

1. Laki K . Our ancient heritage in blood clotting and some of its consequences. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1972; 202: 297–307.
2. Campbell NA, ED. *Biology* (8-th ed). London: Pearson Education. 2008, p. 912.
3. Stefanović S, Ristić M, Jančić MS, editors. *Hematološki atlas. II prerađeno i dopunjeno izdanje*. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga. 1983.pp. 71-74.
4. Labar B, Hauptmann E, editors. *Hematologija. 1-st ed*. Zagreb-Školska knjiga, d.d. 2007. p.p. 60-66.
5. Jakšić B, Labar B, Grgičević D. Editors. *Hematologija i transfuziologija*. Zagreb: Jumena. 1989. pp. 45-49.
6. Burstein S, et al. *Blood*; 1979, 54: 169.
7. Vainchenker W et al. *Blood Cells*, 1979. 5: 25.
8. Marisavljević D, Mihaljević B, Elezović I, Popović S, Suvajdžić-Vuković N, Vujić D, et al. (editors). *Klinička hematologija. 1-st ed*. Beograd: Zavod za udžbenike; 2012.
9. Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *British Journal of Haematology* 2006; 134: 453-466.
10. Grgičević D, . *Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi*. Zagreb: Medicinska naklada, 2006. pp. 361-371.
11. Balint B, Trkuljić M i sar. *Osnovi transfuziologije*. Beograd: Čigoja štampa, 2002.
12. Gligorović V, Balint B, et al. *Klinička transfuziologija*. Beograd:

Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 1988. pp. 225-246.

13. B. Balint i sar. Transfuziologija, Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 2004. pp. 169-175.

14. Stefanović S, Radović M i sar. Hematologija – drugo dopunjeno i prerađeno izdanje, Beograd – Zagreb: Medicinska knjiga, 1989; pp. 523-563.

15. Balint B, Trkuljić M, Todorović M, editors. Osnovni principi hemoterapije. 1-st ed. Beograd: Čigoja štampa; 2010; pp. 122-132.

16. Gross S, Roath S, editors. Hematology. A problem-oriented approach, 5-th ed. Baltimore: Williams-Wilkin, 1996. pp. 553-567.

17. Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. British Journal of Haematology 2006;134: 453-466.

18. Camacho A, Dimsdale JE. Platelet and psychiatry: lessons learned from old and new studies. Psychosomatic Medicine 2000; 62: 326-336.

19. Ware JA, Coller BS. Platelet morphology, biochemistry and function. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, editors. William's hematology. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 1995. p.1161-93.

20. Piva E, Plebani M. Interpretative reports and critical values. Clin Chim Acta 2009; 404(1): 52-8.

21. Maton, A, Hopkins J, McLaughlin CW, Johnson S, Quon Warner M, LaHart D, Wright JD. Human Biology and Health. Englewood Cliffs NJ: Prentice Hall 1993.

22. Jimenez MM, Guedan MJ, Martin LM, Campos JA, Martinez IR, Vilella CT. Measurement of reticulated platelets by simple flow cytometry: an indirect thrombocytopoietic marker. Eur J Intern Medicine 2006;17:541-4.

23. Thomas-Kaskel AK, Mattern D, Köhler G, Finke J, Behringer D. Reticulated platelets counts correlate with treatment response in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and help identify the complex causes of thrombocytopenia in patients after allogenic hematopoietic stem cell transplantation. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 2007; 728: 241-248.

24. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical application in hematology. Clinical Chemistry 2000;46:8(B):1221-1229.

25. Petrović M. Laboratorijska hematologija. Beograd; 2002.

26. Harrison P. et al. An Interlaboratory Study of a Candidate Reference Method for Platelet Counting. Am J Clin Pathol 2001; 115: 448-459.

27. Matic GB, Chapman SE, Zaiss M, et al. Whole blood analysis of reticulated platelets: improvements of detection and

assay stability. *Cytometry* 1998; 34: 229-234.

28. Ware JA, Collier BS. Platelet morphology, biochemistry and function. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, editors. *William's hematology*. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 1995.p.1161-93.

29. Maton, A, Hopkins J, McLaughlin CW, Johnson S, Quon Warner M, LaHart D, Wright JD. *Human Biology and Health*. Englewood Cliffs NJ: Prentice Hall 1993.

30. Pons I, Monteagudo M, Lucchetti G, Muñoz L, Perea G, Colomina I, Gulu J, Obiols J. Correlation between immature platelet fraction and reticulated platelets. Usefulness in the etiology diagnosis of thrombocytopenia. *European Journal of Haematology* 2010; 85: 158-163.

31. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assesment of an immature

platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *British Journal of Haematology* 2004; 126: 93-99.

32. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for investigation and mangement of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and pregnancy. *British Journal of Haematology* 2003; 120: 574-596.

33 Kienast J, Schmitz F. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* 1990; 75: 116-121.

***Adresa autora / Corresponding address***  
***Prof. dr Bratislav Stanković Visoka***  
***zdravstvena škola strukovnih studija***  
***u Beogradu Cara Dušana 254; 11 080***  
***Zemun; Srbija***  
***Tel:064-157-94-96;E-mail:***  
***dr.bratislavstankovic@gmail.com***

## **APPLICATION OF NEW PARAMETERS OF PLATELETS (CD61 AND RETICULATED PLATELETS) IN LABORATORY MONITORING TROMBOCYTOPENIA**

**Slavica KRSMANOVIC , Bratislav STANKOVIC**

**The High Educational School of Professional Health Studies, 11 080 Zemun; Serbia;  
254 Cara Dusana Street**

### **SUMMARY**

**INTRODUCTION.** Reticulated platelets are the youngest form of circulating platelets characterized by a residual amount of iRNA. It has been suggested that the reticulated platelet count, providing an estimate of thrombopoiesis. The platelet receptor CD61 is a receptor for fibrinogen, fibronectin, prothrombin, thrombospondin, vitronectin and von Willebrand factor. Flow-cytometric immunological determination of platelets number is proposed by the International Council for Standardization in Hematology (ICSH) as reference. The method is developed using monoclonal antibodies against platelets membrane antigens. The antibody directed against platelet receptor CD61 is the most used.

**OBJECTIVE.** To determine significance of reticular platelets and platelet receptor CD61 testing in laboratorial diagnosis of platelets diseases.

**MATERIALS AND METHODS.** A group of patients with thrombocytopenia in the Clinical Center of Serbia is examined. The experimental group 1 consisted of 28 patients (12 men and 16 women) with chronic thrombocytopenia, which are divided into two subgroups: with hypoplastic thrombocytopenia (12 patients) and destructive thrombocytopenia with hyperactive platelet lineage (16 patients).

The experimental group 2 consisted of 30 patients (18 men, 12 women) with acute thrombocytopenia with platelets less than  $50 \times 10^9/l$ , which are divided into two subgroups: with hypoplastic thrombocytopenia (18 patients) and destructive thrombocytopenia with hyperactive platelet lineage (12 patients).

The control group consisted of 20 volunteers (9 men and 11 women), in which the platelet parameters (the number and medium platelets volume - MPV) were within the normal limits and therefore they did not take any treatment.

The blood samples are collected in aliquots of 3 ml by venipuncture in Becton Dickinson's vacuum tubes with K-2 EDTA anticoagulant. The number of platelets (determined by the optical method-platelet count in the in the platelet counting chamber) and medium platelets' volume - MPV and the percentage of reticular platelets - rP% (is determined by flow-cytometric method) which are examined by hematological

parameters. In the second part of the test, platelets' counting using monoclonal antibodies is directed to platelet receptor CD61 analyzer "Cell Dyn Sapphire" (Abbott Diagnostics, USA) is added.

**RESULTS.** There was a statistically significant difference between the percentage of reticular platelets between the control group and the patients with thrombocytopenia (13,31% against 1,78%). There was also a statistically significant difference against between reticular platelets from the patients with destructive thrombocytopenia (18,78%) and hypoplastic thrombocytopenia (6,02%). There was no statistically significant difference ( $p = 0.9431$ ) between the number and and medium platelet volume (MPV) between levels of platelets and platelet receptor CD61, which is determined by PLTo method. The platelets values are determined by specific PLTi method which is statistically higher than the PLTo value ( $p = 0.0071$ ) and platelet receptor CD61 values ( $p = 0.0049$ ).

**CONCLUSION.** Differential diagnostic methods are limited and the biopsy of bone marrow is considered as the "gold standard" for diagnosis of thrombocytopenia. "Flow"-cytometric analysis of reticulated platelets are additional, non-invasive diagnostic method. The task of biochemical laboratory is to encourage this type of test, in order to obtain more complete information of the diagnosis, treatment and thrombocytopenia' prognosis.

**KEYWORDS:** platelets; thrombocytopoiesis; thrombocytopenia; reticulated platelets; receptor CD61.