Praca oryginalna *Original paper*

Wpływ wersenianu potasowego i cytrynianu sodowego na aktywację płytek krwi psów

MAGDALENA MATUSZKIEWICZ, ANNA WINNICKA

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Klinicznej Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-766 Warszawa

Matuszkiewicz M., Winnicka A.

Influence of EDTA-3K and trisodium citrate on dog platelets activation

Summary

The aim of this study was to determine the influence of anticoagulants on dog platelet activation. The investigation was carried out by evaluating the expression CD61 and fosfatydyloserin as a marker of activation. In vitro data platelet activation was obtained by PMA and for the stabilization of the cell membrane procaine was used. Thrombopoesis was evaluated by reticulated platelets. It was shown that the platelets number was dependant on anticoagulants, and was greater in EDTA-3K blood, and the expression of CD61 was the largest on normal platelets in EDTA-3K platelet-rich plasma (PRP). The number of activated platelets was the highest among aggregates and the highest percentage of CD61+AnV+ did not depend on the use of anticoagulants. The percentage of platelets and microparticles with the expression of those antigens influenced by procaine, microparticles and aggregates influenced by PMA was higher in citrate PRP than EDTA-3K PRP. It was observed that anticoagulants did not have any influence on the percentage of reticulated platelets and the highest number of them can be found in among aggregates.

Keywords: blood platelets, anticoagulants, dog

W ostatnich latach wielu autorów zwraca uwagę na fałszywą trombocytopenię, będącą następstwem braku standaryzacji postępowania przedanalitycznego oraz niskiej dokładności i precyzji oznaczeń, nazywając ją chorobą laboratoryjną (9, 16). Wśród przyczyn obniżenia liczby płytek wymieniane są błędy przy pobieraniu krwi, w tym zbyt silne uciśnięcie naczynia żylnego, używanie igieł o za małej średnicy lub pobieranie materiału do probówki bez odrzucenia pierwszych kropli wypływających z igły. Jednak najważniejszą przyczyną powstania pseudotrombocytopenii jest zastosowanie niewłaściwego antykoagulantu.

W badaniach morfologicznych krwi powszechnie stosowanym antykoagulantem jest wersenian potasowy (EDTA-2K/3K). Mechanizm jego działania polega na hamowaniu krzepnięcia przez tworzenie kompleksów z wolnymi jonami wapniowymi (1). Zastosowanie wersenianu, w proporcjach zapobiegających krzepnięciu, w temperaturze pokojowej powoduje w krwi człowieka aktywację płytek, której następstwem jest zwiększona ich zdolność do adhezji i agregacji (1, 9). Aktywacja komórek spowodowana może być zmianą konformacji glikoprotein powierzchniowych pod wpływem Ca^{2+}, nie związanych przez antykoagulant (3). Po upływie trzech godzin od pobrania w krwi ludzkiej stwierdzono zwiększenie średniej objętości płytki (mean platelet volume, MPV) oraz hematokrytu płytkowego (platelet haematocrit, PCT) (2). U psów w krwi werseniановej liczba płytek jest stabilna w temperaturze 20°C przez 5 godzin, a w 4°C przez 24 godziny, obserwowany jest natomiast wzrost MPV (2). Zastosowanie wersenianu w stężeniach powyżej 1,5 mg/ml powoduje zwiększenie ciśnienia osmotycznego krwi, a tym samym obniżenie MPV. Antykoagulantem, który słabiej aktywuje płytki jest cytrynian sodowy, choć mechanizm jego działania przeciwzakrzepowego jest taki sam (16). Powoduje on jednak zmiany w obrazie morfometrycznym płytek, zmniejszając MPV człowieka (1, 9). U psów nie powoduje on zmian tego parametru podczas przechowywania próbki krwi przez 2 godz. w temp. 37°C (3, 4).

Obserwowana jest zależność między MPV a liczbą płytek. Zarówno w krwi ludzkiej, jak i psów zmniejszeniu liczby płytek towarzyszy zwiększenie ich objętości (9, niepublikowane wyniki badań własnych). Podwyższenie MPV może świadczyć o odpowiedzi szpiku kostnego (wzmożona trombopoeza) na uszkodzenie płytek krwi w przebiegu niektórych chorób mieloproliferacyjnych czy nadczynności tarczycy. Obniżone wartości MPV obserwowano u psów w przebiegu uszkodzenia szpiku oraz jako wczesny objaw rozwijającej się trombocytopenii tła immunologicznego (2, 3). Prawidłowo w krwi obwodowej dominują płytki dojrzałe, ale występują także ich formy młodo-

ciane z resztkowym RNA (obecnym około jednej doby), nazywane płytkami retikulocytarnymi (11). Określenie liczby tych komórek w krwi pozwala na oszacowanie sprawności trombopoetycznej megakariocytów i umożliwia rozpoznanie trombocytopenii regeneratywnej (4, 10).

Jeżeli liczba płytek, badana w analizatorze hematologicznym, jest bardzo mała, co wskazuje, że pomiar dokonywany jest na granicy zakresu pomiaru tego analizatora, należy powtórzyć badanie metodą manualną w kamerze Bürkera oraz obejrzeć rozmaz krwi, barwiony odczynnikami May-Grünwald i Giemsa (MGG), pod mikroskopem. Ocenie poddawana jest gęstość rozmieszczenia płytek w standardowym polu widzenia i ich budowa oraz obecność zlepów płytkowych. W krwi człowieka, np. na skutek zmiany epitopów na powierzchni leukocytów i płytek krwi w obecności EDTA-2K/3K obserwowane jest gromadzenie płytek, w postaci wianuszka, wokół leukocytów, co nazywane jest satelityzmem płytkowym (5, 16).

Celem badań było określenie wpływu dwóch antykoagulantów – wersenianu potasowego i cytrynianu sodowego na aktywację płytek krwi psów, w wyniku której oprócz normopłytek powstają subpopulacje: mikropłytek i agregatów płytkowych.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono u 15 klinicznie zdrowych psów, bez rozpoznanych zaburzeń krzepnięcia, w wieku od 7 miesięcy do 11 lat, nie leczonych i nie szczepionych w ciągu 3 tygodni poprzedzających badanie. Krew żylną pobierano do probówek z wersenianem potasowym (EDTA-3K; Medlab, Polska) i cytrynianem sodowym (3,8%; Medlab, Polska). Badanie liczby płytek krwi wykonywano w analizatorze hematologicznym (Abacus, Francja) i metodą mikroskopową (w kamerze Bürkera), a ich budowę i rozmieszczenie oceniano w standardowym polu w rozmazie krwi barwionym MGG.

Immunofenotypowanie antygenów powierzchniowych płytek przeprowadzano w osoczu bogatopłytkowym (platelet-rich plasma, PRP) wersenianowym i cytrynianowym, które oddzielano po odwirowaniu krwi pełnej, wersenianowej i cytrynianowej, przez 10 min. przy 300 × g (5). Liczbę płytek w PRP badano metodą mikroskopową w kamerze Bürkera.

W badaniach *in vitro* czynnikiem wywołującym aktywację płytek były estry forbolu (phorbol myristrate acetate, PMA) w stężeniu 10 ng/ml (Sigma, Polska), a stabilizację błony komórkowej wywołano 10 mg/ml prokainy (Polfa Tarchomin, Polska) (5, 7, 12). Próbki inkubowano przez 20 min. w temperaturze pokojowej.

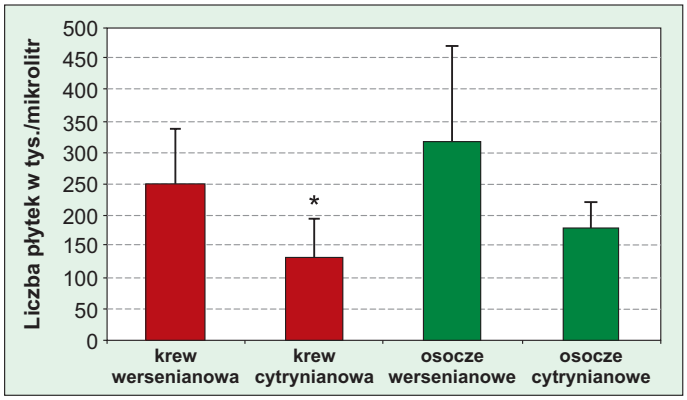
Przedmiotem badania była: 1. ekspresja specyficznej dla płytek glikoproteiny powierzchniowej – GPIIIa/IIb (cluster of differentiation 61, CD61), fenotypowanej przy pomocy przeciwciała monoklonalnego – Mouse anti-CD61 human conjugated FITC (tioizocyjanian fluoresceiny), o udokumentowanych wiązaniach krzyżowych; 2. ekspresja fosfatydyloseryny, jako wskaźnika aktywacji płytek – wykrywanej przy użyciu aneksyny V znakowanej cytochromem 5 (Cy5); 3. intensywność fluorescencji oranżu tiazolowego (orange tiazole, OT), znakującego płytki retikulocytarne. Inkubacja komórek z ww. znacznikami (Pharmingen, Becton Dickinson – BD, USA) trwała 20 min., w temperaturze pokojowej. Ustalenia objętości przeciwciał i fluorochromów dokonano drogą wstępnego miareczkowania. Próbki zawieszano w 200 µl PBS z 0,5% formaliną, a następnie analizowano w cytometrze FACScalibur (BD), z oprogramowaniem CellQuest (BD).

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica 6.0. Istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami badano testem Wilcoxona dla par wiązanych.

Wyniki i omówienie

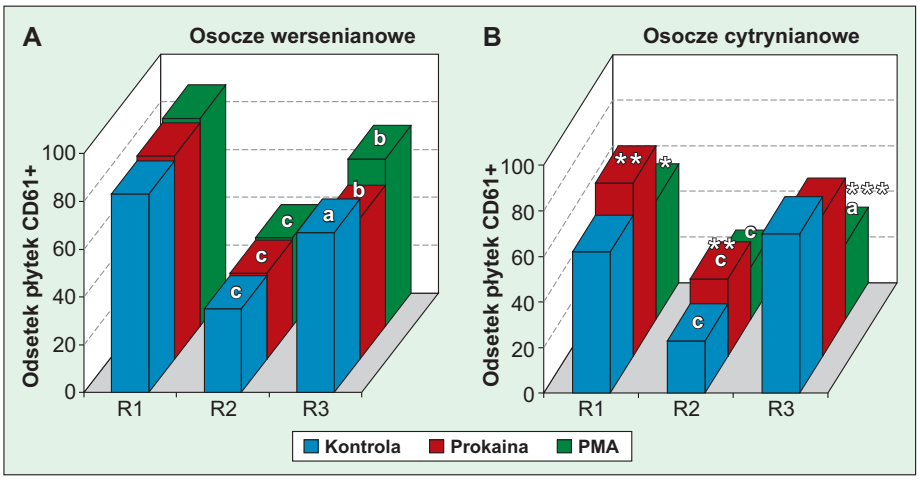
Liczba płytek we krwi pełnej cytrynianowej była istotnie mniejsza ($p < 0,01$) w porównaniu do liczby płytek we krwi pełnej wersenianowej, natomiast liczba płytek w osoczu cytrynianowym była mniejsza, ale nie różniąca się statystycznie od liczby płytek w osoczu wersenianowym (ryc. 1). Wyniki liczby płytek w osoczu wersenianowym i w osoczu cytrynianowym nie różniły się istotnie od liczby płytek we krwi pełnej z odpowiednimi antykoagulantami. McShine i wsp. (6) także zaobserwowali różnice między liczbą płytek oznaczoną w ludzkiej krwi wersenianowej i cytrynianowej, natomiast Feldman i wsp. (2) uważają, że liczba płytek u zwierząt nie zależy od użytego antykoagulantu.

W analizie cytometrycznej płytki identyfikowano przy pomocy antygenu powierzchniowego CD61. Wyznakowane komórki podzielono, pod względem ich wielkości i ziarnistości, na populacje: normopłytek (R1), mikropłytek (R2) i agregatów płytkowych (R3). Odsetek komórek CD61+ w kontroli był istotnie większy w osoczu wersenianowym w porównaniu do cytrynianowego w R1 ($p < 0,01$) i R2 ($p < 0,05$) (ryc. 2A, B). Wpływ prokainy i PMA na odsetek komórek CD61+ w osoczu cytrynianowym był najmniejszy w R1, a największy w R3, ale istotny statystycznie tylko w odniesieniu do PMA i wynosił odpowiednio: $p < 0,001$ dla



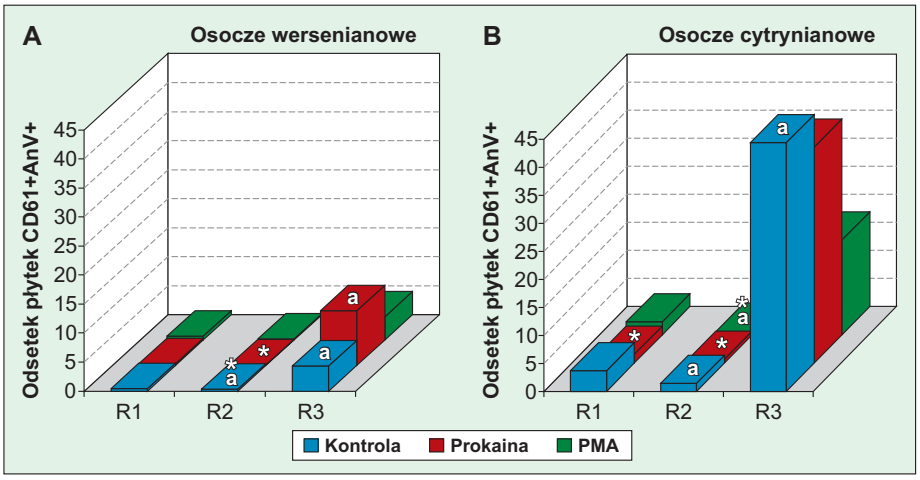
Ryc. 1. Liczba płytek w krwi pełnej i osoczu bogatopłytkowym, wersenianowym i cytrynianowym zdrowych psów (średnia ± SD)

Objaśnienie: * – różnice statystycznie istotne w porównaniu do materiału z wersenianem przy $p < 0,01$



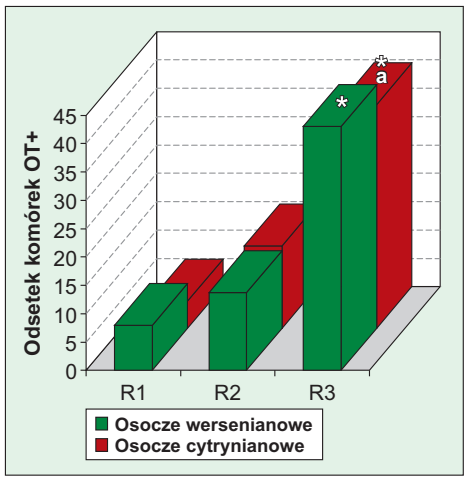
Ryc. 2. Średni odsetek komórek CD61+ w regionach R1 (normopłytki), R2 (mikropłytki) i R3 (agregaty płytkowe) w osoczu bogatopłytkowym wersenianowym (A) i cytrynianowym (B) zdrowych psów

Objaśnienia: różnice statystycznie istotne w porównaniu do kontroli przy: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ oraz do R1 prób: kontrolnej, z prokainą (stabilizacja błon komórkowych), z PMA (aktywacja komórek) przy: a – $p < 0,05$; b – $p < 0,01$; c – $p < 0,001$



Ryc. 3. Średni odsetek komórek CD61+ AnV+ w regionach R1 (normopłytki), R2 (mikropłytki) i R3 (agregaty płytkowe) w osoczu bogatopłytkowym wersenianowym (A) i cytrynianowym (B) zdrowych psów

Objaśnienia: * – różnice statystycznie istotne w porównaniu do kontroli przy $p < 0,05$; a – do R1 dla prób: kontrolnej, z prokainą (stabilizacja błon komórkowych), z PMA (aktywacja komórek) przy $p < 0,05$



Ryc. 4. Średni odsetek komórek niedojrzałych, z resztkowym RNA – znakowanym oranżem tiazolowym (OT+) w regionach R1 (normopłytki), R2 (mikropłytki) i R3 (agregaty płytkowe) w osoczu bogatopłytkowym wersenianowym i cytrynianowym zdrowych psów

Objaśnienia: * – różnice statystycznie istotne w porównaniu do R1 dla danego osocza przy $p < 0,05$; a – do osocza wersenianowego przy $p < 0,05$

R1, $p < 0,05$ dla R2 i $p < 0,01$ dla R3, w porównaniu do osocza wersenianowego (ryc. 2A, B). W osoczu wersenianowym ekspresja CD61 była istotnie mniejsza ($p < 0,001$) w R2 w próbach: kontrolnej i badanych (prokaina, PMA) oraz w R3 w kontroli ($p < 0,05$), a w próbach badanych przy $p < 0,01$, w porównaniu do odpowiednich prób R1 (ryc. 2A). W R1 osocza cytrynianowego zarówno odsetek komórek CD61+ stabilizowanych prokainą, jak i aktywowanych PMA był istotnie większy (odpowiednio $p < 0,01$; $p < 0,05$) w porównaniu do kontroli (ryc. 2B). Wśród mikropłytek najwyższą ekspresję CD61 ($p < 0,01$) spowodowało działanie prokainy, a w regionie agregatów – PMA ($p < 0,001$). W regionie mikropłytek we wszystkich próbach odsetek komórek CD61+ był istotnie mniejszy ($p < 0,001$), a w regionie agregatów wśród komórek traktowanych PMA ($p < 0,05$) w porównaniu do R1. Moritz i wsp. (7) twierdzą, iż działanie PMA polega na aktywowaniu kinazy C21, która według Olas i Wachowicz (8), odpowiedzialna jest za degranulację ziarnistości komórkowych. Stymulator ten jednak nie nasila agregacji płytek (7). Degranulacji ziarnistości towarzyszy wzrost ekspresji CD61 znajdującej się także we wnętrzu ziarnistości alfa płytek (13). Wyniki przedstawionych badań własnych potwierdziły i uzupełniły te spostrzeżenia.

W przebiegu aktywacji dochodzi do oddzielenia od normopłytek mikropęcherzyków płytkowych – mikropłytek. Powoduje to powstanie nowych receptorów dla czynników krzepnięcia VIIIa i Va, oraz nasilenie przekształcenia czynnika X w jego formę aktywną i powstanie trombiny. Mikropłytki posiadają na swojej powierzchni receptory powierzchniowe specyficzne dla płytek, w tym CD61 (12). Podczas procesu aktywacji, na skutek pojawienia się nowych receptorów adhezji i agregacji, dochodzi do powstawania agregatów płytkowych. W procesie aktywacji płytki zachodzi wiele zmian w obrębie cytoszkieletu komórki, jej ziarnistości i błony komórkowej, w której następuje przemieszczenie fosfatydyloseryny do warstwy zewnętrznej. Według Wilkerson i wsp., fosfatydyloseryna znakowana aneksyną V uważana jest za dobry marker aktywacji płytek (14). Odsetek komórek CD61+AnV+,

traktowanych prokainą, był istotnie większy ($p < 0,05$) w osoczu cytrynianowym, w porównaniu do osocza wersenianowego w R1 i R2, a pod wpływem PMA w regionie R2 i R3 (ryc. 3A, B). W osoczu wersenianowym w R2 odsetek komórek podwójnie pozytywnych, pod wpływem prokainy i PMA, był istotnie większy ($p < 0,05$) w porównaniu do kontroli (ryc. 3A). Stwierdzono istotnie wyższy ($p < 0,05$) odsetek agregatów w kontroli oraz mikropłytek i agregatów w próbie z prokainą, w porównaniu do ich odpowiedników w R1. W osoczu cytrynianowym ekspresja komórek podwójnie pozytywnych w próbie z prokainą była istotnie mniejsza ($p < 0,05$) w R1 i R2 a w próbie z PMA w R2, w porównaniu do odpowiednich regionów w kontroli (ryc. 3B). W próbie kontrolnej i stymulowanej PMA w R2 zaobserwowano istotne zmniejszenie ($p < 0,05$) odsetka komórek CD61+AnV+, a zwiększenie pod wpływem PMA w R3, w porównaniu do odpowiednich prób w R1. Działanie użytej w doświadczeniu prokainy polega na ograniczeniu przemieszczania się białek w obrębie błony komórkowej, przez co uzyskiwany jest efekt stabilizacji (3).

Odsetek komórek wyznakowanych OT był istotny większy ($p < 0,05$) w R3 osocza wersenianowego w porównaniu z osoczem cytrynianowym (ryc. 4). Stwierdzono ponadto istotnie wyższy odsetek tych komórek w R2 i R3 w porównaniu do R1 w osoczu cytrynianowym.

Wnioski

1. Liczba płytek zależy od użytego antykoagulantu i jest większa we krwi wersenianowej.

2. Najwyższa ekspresja CD61 w osoczu wersenianowym jest na normopłytkach.

3. Najwięcej komórek aktywowanych jest wśród agregatów. Odsetek komórek kontrolnych CD61+AnV+ nie zależy od antykoagulantu. Odsetek płytek i mikropłytek z ekspresją tych antygenów pod wpływem prokainy, oraz mikropłytek i agregatów pod wpływem PMA jest wyższy w osoczu cytrynianowym w porównaniu do wersenianowego.

4. Antykoagulanty nie mają wpływu na odsetek młodocianych postaci płytek. Najwięcej płytek retikulocytarnych występuje wśród agregatów.

Piśmiennictwo

1. *Bomski H.*: Hematologia. PZWL, Warszawa 1995, 21-24.
2. *Feldman B., Zinkl J. G., Jain C. N.*: Schalm's Veterinary Hematology. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia 2000, 2-476.
3. *Golański J., Watała C.*: Znaczenie procesu aktywacji płytek krwi in vitro oraz in vivo. Diagn. Lab. 1999, 35, 511-527.
4. *Handagma P., Feldman B., Kono C., Fanerv T.*: Mean platelet volume artifacts: The effect of anticoagulants and temperature on canine platelets. Vet. Clin. Pathol. 1986, 15, 13-17.
5. *Matuszkiewicz M., Winnicka A.*: Trombocytopenia tła immunologicznego u psów. Życie Wet. 2006, 81, 450-454.
6. *McShine R. L., Sibinga S., Brozovic B.*: Differences between the effects of EDTA and citrate anticoagulants on platelet count and mean platelet volume. Clin. Lab. Haematol. 1990, 12, 277-285.
7. *Moritz A., Walcheck B. K., Weiss D. J.*: Flow Cytometric Detection of Activated Platelets in the Dog. Vet. Clin. Pathol. 2003, 32, 6-12.
8. *Olas B., Wachowicz B.*: Aktywacja płytek krwi; Mechanizm przekazywania sygnału. Post. Biol. Komórki 1995, 4, 359-378.
9. *Pińkowski R.*: Płytki krwi. Aktualne wskaźniki oraz wybrane zagadnienia związane ze stosowaniem analizatorów hematologicznych. Artdruk, Łódź 1997, 5-70.
10. *Tarrant J. M.*: The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. Veterinary J. 2005, 170, 278-288.
11. *Watała C.*: Metody instrumentalne w biofizyce i naukach biomedycznych. a-Medica Press, Łódź 2002, 61-85.
12. *Watała C., Boncler M., Golański J., Koziołkiewicz W., Walkowiak B., Cierniewski C. S.*: Release of Calcium and P-Selectin from Intraplatelet Granules Is Hampered by Procaine. Thrombosis Research 1999, 94, 1-11.
13. *Więcławska B., Boncler M., Różalski M., Golański J., Chrul S., Watała C.*: Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny aktywacji i reaktywności płytek krwi w stanach patologicznych i układach modelowych. Diagn. Lab. 1999, 35, 117-126.
14. *Wilkerson M. J., Shuman W.*: Alterations in Normal Canine Platelets During Storage in EDTA Anticoagulated Blood. Vet. Clin. Pathol. 2001, 30, 107--113.
15. *Ważna E.*: Płytki krwi jako regulatory procesów odpornościowych. Post. Hig. Med. Dośw. 2006, 60, 265-277.
16. *Żak J., Kasprzycka E., Ratomski K., Wysocka J.*: Pseudotrombocytopenia – „choroba laboratoryjna". Diagn. Lab. 2006, 42, 235-242.

Adres autora: dr hab. Anna Winnicka prof. nadzw. SGGW, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa; e-mail: anna_winnicka@sggw.pl