

PROCENA STEPENA AKTIVACIJE KONCENTROVANIH TROMBOCITA TOKOM SKLADIŠTENJA NA OSNOVU EKSPRESIJE MEMBRANSKIH GLIKOPROTEINA

Dušan Vučetić¹, Bela Balint^{1,2}, Danilo Vojvodić³, Vesna Ilić², Vesna Subota⁴

¹Institut za transfuziologiju Vojnomedicinska akademija, Beograd;

²Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Beograd;

³Institut za medicinska istraživanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd,

⁴Institut za medicinsku biohemiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd

SAŽETAK

Ispitivanje činilaca odgovornih za lezije koncentrovanih trombocita dobijenih iz „buffy coat“-a (KT-BC) tokom skladištenja su još uvek predmet velikog interesa.

Na osnovu vrednosti ekspresije specifičnih trombocitnih markera (membranskih antigena) na ukupnoj populaciji KT, odrediti stepen njihove aktivacije i/ili oštećenja tokom skladištenja u tečnom stanju, do pet dana, na 20±2°C.

KT-BC su skladišteni pod standardnim uslovima. Aktivacija KT je praćena na osnovu rezultata merenja procenta trombocita koji ekspimiraju površinske glikoproteine i prosečnog intenziteta fluorescencije (MFI) tj. gustine ekspresije ovih antigena. Merenja ekspresije površinskih antigena na KT-BC su rađena prvog, trećeg i petog dana skladištenja, korišćenjem protočnog citometra i monoklonskih antitela, obeleženih fluorohromima, na CD41, CD42a, CD42b, CD62p, CD63 i CD36 molekul, i Aneksina V.

U odnosu na prvi dan, trećeg dana skladištenja utvrđeno je smanjenje procenta trombocita koji ekspimiraju CD42b, CD42a, i povećanje procenta trombocita koji ekspimiraju CD36. Petog dana skladištenja, procenat trombocita koji ekspimiraju CD41 je bio, u odnosu na prvi dan, smanjen, dok je procenat trombocita koji ekspimiraju CD62p i CD36 bio povećan. Razlika između trećeg i petog dana postojala je samo u procentu trombocita koji ekspimiraju CD62p.

Vrednost MFI je porastao za CD42a i CD36 antigene od prvog do trećeg, kao i do petog dana skladištenja. Vrednost MFI za CD41 antigen je u ovom periodu značajno opala.

Utvrđen je minimalno povišen procenat ekspresije pojedinih aktivacionih trombocitnih markera, koji nije izlazio izvan opsega referentnih vrednosti, što odražava dobro očuvanu funkciju trombocita skladištenih u tečnom stanju.

Ključne reči: koncentrovani trombociti, protočna citometrija, trombocitni markeri, MFI

Uvod

Terapijska upotreba koncentrovanih trombocita (KT) kod hematoloških bolesnika sa trombocitopenijom smanjila je smrtnost izazvanu krvarenjem sa 60% na manje od 10% (1–4). Koncentrovani trombociti su korisni i u tretmanu drugih trombocitopenijskih stanja (dilucijska trombocitopenija tokom opera-

Kontakt osoba:

Doc. dr sc. med. Dušan Vučetić

naučni saradnik

Institut za transfuziologiju

Vojnomedicinska akademija, Beograd

e-mail: dusanvucetic@gmail.com

cija na otvorenom srcu), kao i prilikom primene većih radio i hemioterapijskih doza u lečenju malignih hemopatija i solidnih tumora.

Trombociti dobijeni procesiranjem iz jedinica sveže cele krvi ili prikupljeni aferezom mogu se transfundovati neposredno po pripremanju ili nakon skladištenja u suspenziji u tečnom stanju, najduže od 5 do 7 dana na temperaturi od 20 ± 2 °C (4, 5). Prikupljanje i priprema trombocita za skladištenje *in vitro* izaziva mikrotraume koje će uticati na hemostatske funkcije *in vivo*. Tokom skladištenja, s obzirom da trombociti nisu stvoreni za dugotrajno preživljavanje *ex vivo*, smanjuje se broj trombocita u jedinicama KT za 50–70% (4, 5), menja se morfologija, tj snižava vrednost tzv. morfološkog skora trombocita – MST i slabi njihova funkcija (5).

Tehnikom protočne citometrije mogu se utvrditi promene u ekspresiji proteina trombocita koje se opisuju kao redistribucije, relokacije, sekvencije, internalizacije, translokacije i slično. Ova tehnika se pokazala kao veoma korisna u našim ispitivanjima promena površinskih antigena nastalih tokom kriokonzervacije trombocita (5–10). Glikoproteini na membrani trombocita regulišu adhezivne i kohezivne funkcije trombocita. Inicijalno vezivanje trombocita za subendotelni matriks je posredovano interakcijom von Willebrandovog faktora (vWF), vezanog za subendotel, sa trombocitnim glikoproteinom GPIIb (11). Interakcije trombocitnog GPIIb-IIIa sa fibrinogenom iz plazme i vWF igraju glavnu ulogu u međusobnim reakcijama trombocita neophodnim za agregaciju. Oslobođanje sadržaja trombocitnih granula indukovano aktivacijom ispituje se na osnovu prisustva oslobođenih proteina u ekstracelularnu tečnost, kao i pojavom antigena granula trombocita na spoljašnjoj površini membrane koji su inače u "mirujućim" trombocitima sekvencirani intracelularno. Strukturni i adhezivni proteini prisutni u alfa-granulama oslobađaju se kroz kanale otvorenog kanalikularnog sistema i vezuju za spoljašnje membrane aktivisanih trombocita (P-selektin, fibrinogen, vWF). Protočnom citometrijom se pomoću specifičnih monoklonskih antitela analiziraju kvantitativne i kvalitativne promene ekspresije glavnih glikoproteina, da bi se ustanovila povezanost ovih promena sa kontrolom funkcije trombocita, kao i konformacione promene tokom aktivacije i ekspresije antigena sadržanih u alfa-granulama i lizozomalnim membranama (11).

Cilj ovog istraživanja je da se na osnovu vrednosti ekspresije specifičnih površinskih markera (membranskih antigena), odredi stepen aktivacije i/ili oštećenja trombocita, tokom skladištenja u tečnom stanju do pet dana.

Materijal i metode

Jedinice koncentrovanih trombocita

Ispitivanjem je obuhvaćeno 24 uzorka KT dobijenih iz *buffy-coat*-a (KT-BC), pripremljen-

ih iz jedinica krvi od nasumično izabranih dobrovoljnih davalaca, koji tokom poslednjih 7 dana nisu uzimali preparate acetilsalicilne kiseline i kod kojih je vreme ekshuzije bilo kraće od šest minuta. Krv u volumenu od 450 ± 45 ml je prikupljena u osnovnu kesu četvorodelnog sistema plastičnih kesa (Terumo, Tokio, Japan), u kojoj se nalazi 63 ml antikoagulaciono-konzervišećeg rastvora CPD (citrat-fosfat-dekstroza). Za centrifugovanje jedinica cele krvi i BC-I (*buffy-coat* primarni) korišćena je centrifuga Hettich-Roto Silenta RP (Hettich, Tuttlingen, Nemačka), a za razdvajanje produkata krvi automatski aparat za obradu krvi EX-30 (Terumo, Tokio, Japan). Jedinice KT-BC su čuvane do 5 dana u termostatu "Cooled Orbital Incubator" (Gallenkamp, leics, Engleska) pri temperaturi od 22 ± 2 °C uz stalno horizontalno protresanje.

Određivanje ekspresije trombocitnih markera (CD)

Uzorci KT-BC koji su korišćeni za ispitivanje ekspresije trombocitnih markera prvog dana izdvažani su nakon 2 sata stajanja na tresilici. Ostali uzorci su uzimani trećeg i petog dana sterilnom brizgalicom iz jedinica KT, prenošeni u plastične suve epruvete (5ml), nakon čega su brojani na automatskom brojaču krvnih ćelija Technicon H-3 System (Technicon Corporation, New York, SAD).

Nakon brojanja, iz uzorka KT je uzimana zapremina u kojoj se nalazilo 25×10^6 trombocita. U tu suspenziju je dodavano po 200 μ L 1% rastora paraformaldehida kojim su fiksirane ćelije, a zatim je do ukupne zapremine od 1 ml, dodavan fosfatni pufer (PBS). U po 100 μ L ove suspenzije, u kojoj se nalazilo $2,5 \times 10^5$ fiksiranih trombocita, dodavana su fluorescentnim markerima obeležena monoklonska antitela. Ćelije su sa antitelima inkubirane 30 min. u mraku, na sobnoj temperaturi. Korišćena su sledeća monoklonska antitela konjugovana FITC-om ili fikoeitritinom: BD Pharmingen CD42a (anti-GPIX/CD42a), (Becton Dickinson, San Jose, SAD), PM6/248 (anti-GPIIb-IIIa/CD41) (Serotec, Oxford, Velika Britanija), CLB-MB45 (anti-GPIIb/CD42b), CLB-AK-6 (anti-P selectin/CD62), CLB-gran/12 (anti-GP53/CD63) i CLB-IVC7 (anti-GPIV/CD36), (CLB, Amsterdam, Holandija).

Po završenom inkubiranju, višak nevezanog antitela uklonjen je ispiranjem uzorka centrifugiranjem. Trombociti su zatim resuspendovani u PBS sa 0.3 mM EDTA i 0.1% BSA i analizirani na protočnom citometru (Epics XL flow cytometer, Coulter Corporation, Miami, FL, SAD). Trombociti su identifikovani na osnovu njihove karakteristične veličine (linear forward scatter) i granularnosti (log side scatter). Određivan je prosečni intenzitet fluorescence (engl. „mean fluorescence intensity“ MFI) na trombocitima kao i procenat trombocita koji su bili obeleženi, tj. koji su vezivali monoklonsko antitelo.

Ispoljavanje anjonskog fosfatidil serina (PS) analizirano je na osnovu vezivanja Aneksina V za ovaj fosfolipid. Trombociti su neposredno pre analize resuspendovani u odnosu 1:10, u svežem 10 mM HEPES puferu koji sadrži 2,5 mM Ca^{2+} , a potom su lagano izmešani sa Ca-HBS (0.14M NaCl, 2.5 mM CaCl_2 , 10mM HEPES, pH 7.4) u koji je dodat Aneksin V-FITC (Annexin V-Fluos, Roche Diag. Mannheim, Nemačka) i inkubirani 5 min. na ambijentalnoj temperaturi, u mraku. Nakon inkubacije u ćeljsku suspenziju je dodavan Ca-HBS i ćelije su odmah analizirane na protočnom citometru.

Statistička obrada rezultata

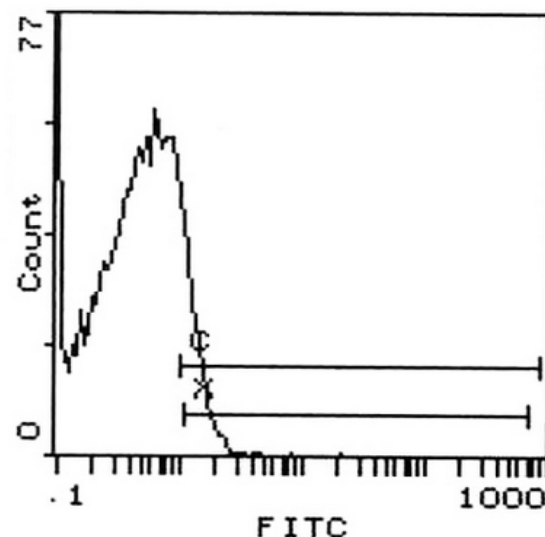
Statističku obradu rezultata činili su prikupljanje i grupisanje podataka i analiza značajnosti razlika utvrđenih vrednosti. Dobijeni podaci su izraženi u obliku srednje vrednosti (\bar{x}), uz uzimanje u obzir vrednosti standardne devijacije (SD). Statistička značajnost između parametrijskih vrednosti ispitivanih uzoraka prvog, trećeg i petog dana je izračunata Studentovim t-testom (nezavisnim i zavisnim), upotrebom statističkog programa Origin. Kao statistički značajne uzete su vrednosti za $p < 0,05$.

Rezultati

Uticaj vremena skladištenja na ekspresiju antigena trombocita u uzorcima KT-BC

Uticaj vremena skladištenja na ekspresiju antigena na ukupnim trombocitima u uzorcima KT-BC analiziran je metodama protočne citometrije. Rezultati izraženi kao procenat trombocita koji ekspresiraju određeni antigen i prosečni intenzitet fluorescence (MFI) na trombocitima za dati antigen, prvog, trećeg i petog dana skladištenja prikazani su u Tabeli 1.

U odnosu na prvi dan, u uzorcima KT-BC istog davaoca, trećeg dana skladištenja utvrđene su statistički značajne promene u procentu trombocita koji ekspresiraju CD42b ($p=0,0068$), CD42a ($p=0,0247$), kao i CD36 ($p=0,0310$). Procenat ćelija koje ekspresiraju CD42b i CD42a molekula je bio niži, a procenat ćelija koje ekspresiraju CD36 je bio viši trećeg, u odnosu na prvi dan. U odnosu na prvi dan, petog dana skladištenja detektovano je statistički značajno povećanje procenta trombocita koji ekspresiraju CD62p ($p=0,0053$) i CD36 ($p=0,0089$) glikoproteine, dok je procenat ekspresije CD41 molekula bio slabo, ali ipak statistički značajno ($p=0,0237$) niži. Značajna promena u procentu pozitivnih trombocita petog u odnosu na treći dan, detektovana je samo za CD62p antigen. Procenat CD62p pozitivnih ćelija trećeg dana je iznosio $7,5 \pm 2,4$, da bi petog dana dostigao vrednost od $15,1 \pm 5,2$ ($p=0,0023$) (Slika 1). Procenat trombocita koji ekspresiraju CD63 i PS nije se značajno menjao u ispitivanom periodu.



Slika 1. Fluocitometrijsko ispitivanje CD62p trombocita

Tabela 1. Ekspresija trombocitnih antigena tokom petodnevno skladištenja KT-BC

CD markeri	1. dan	3. dan	5. dan
GPIb/CD42b	96,2 ± 3,0	95,2 ± 2,8‡	95,7 ± 0,9
GPIIb-IIIa/CD41	98,7 ± 0,4	97,0 ± 2,1	98,2 ± 0,6‡
GP140/CD62p	7,3 ± 1,64	7,5 ± 2,4	15,1 ± 5,2‡*
GP53/CD63	1,1 ± 0,4	1,8 ± 1,7	1,4 ± 0,3
PS [%]	4,4 ± 0,9	6,7 ± 3,6	5,4 ± 2,0
GPIX/CD42a	98,6 ± 0,6	96,1 ± 2,7‡	97,2 ± 1,4
GPIV/CD36	90,6 ± 3,9	93,9 ± 2,5‡	94,2 ± 1,2‡
GPIX/CD42a	6,2 ± 0,6	7,9 ± 1,1‡	8,0 ± 0,7‡
GPIIb-IIIa/CD41 MFI	26,8 ± 3,3	22,9 ± 2,8‡	20,7 ± 1,9‡*
GPIV/CD36	9,3 ± 2,1	13,0 ± 3,6‡	18,6 ± 4,8‡*

Podaci su izraženi kao prosečna vrednost ± SD;

PS = fosfatidil serin;

[%] = procenat trombocita sa ekspresijom antigena;

MFI = prosečan intenzitet fluorescencije;

‡ 1. dan vs. 3. dan skladištenja, odnosno 1. dan vs. 5. dan skladištenja ($p < 0,05$);

* intergrupno (3. dan vs. 5. dan skladištenja) ($p < 0,05$).

Promene u vrednosti MFI, tj. u broju molekula po ćeliji, do kojih dolazi tokom skladištenja analizirane su za CD42a, CD41 i CD36 glikoproteine. U odnosu na prvi dan, vrednosti MFI za sva tri ispitivana antigena bile su statistički značajno promenjene i trećeg, i petog dana. Vrednost MFI za CD42a je prvog dana iznosila $6,2 \pm 0,6$, da bi trećeg dana statistički značajno porasla na vrednost od $8,0 \pm 1,1$ ($p=0,0015$). U odnosu na treći dan, petog dana skladištenja nije detektovan dalji porast u MFI vrednosti za CD42a molekul. Vrednost MFI za CD36 antigen je statistički značajno porasla trećeg u odnosu na prvi dan ($p=0,0001$). Međutim, za razliku od CD42a, MFI vrednost je za CD36 antigen rasla i posle trećeg dana, tako da je promena u broju molekula CD36 po trombocitu statistički značajno porasla od trećeg do petog dana ($p=0,00008$). Za razliku od CD42a i CD36 MFI vrednost za CD41 antigen je, u odnosu na prvi dan, bio statistički značajno niži i trećeg ($p=0,0001$) i petog dana skladištenja ($p=0,0007$). MFI vrednost za CD41 antigen prvog dana je iznosila $26,8 \pm 3,3$, da bi trećeg dana pala na vrednost od $22,9 \pm 2,8$, i nastavila da pada na vrednost od $20,8 \pm 1,9$ koliko je izmereno petog dana. Razlika u MFI vrednosti za CD41 antigen između trećeg i petog dana je bila statistički značajna ($p=0,0105$).

Diskusija

Metodologija pripremanja KT se razlikuje od države do države, a čak i u samim državama. U Severnoj Americi KT se uglavnom pripremaju centrifugovanjem cele krvi izdvajanjem iz plazme bogate trombocitima (PRP-platelet rich plasma), dok se u većini evropskih zemalja KT dobijaju iz *buffy-coat*-a. KT se mogu dobiti i različitim afereznim tehnikama. U Institutu za transfuziologiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu koriste se KT dobijeni diferencijalnim centrifugovanjem iz *buffy-coat*-a. Ovaj način pripremanja je mnogo prihvatljiviji jer trombociti nisu u direktnom dodiru sa površinom kese, a eritrociti služe kao vrsta jastuka koji ublažava pritisak i oštećenja koja nastaju tokom centrifugovanja (12). Produkcija trombocita iz *buffy-coat*-a je u porastu poslednjih godina (13) uglavnom zbog smanjenog stepena aktivacije trombocita (12), redukovano broja leukocita (13) kao i bolje očuvane funkcije u odnosu na trombocite dobijene iz PRP (14). Ovi trombociti se čuvaju na sobnoj temperaturi ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) tokom pet dana, mada se taj rok u nekim državama u Evropi produžava na sedam dana, uz bakterijsku kontrolu (15). Ovako ograničen vremenski rok rezultuje visokim procentom jedinica sa isteklim rokom koje se ne mogu upotrebiti u terapijske svrhe. Tokom skladištenja dolazi i do pada životnog veka trombocita, tako da se nakon pet dana skladištenja izgubi i do 30% od početnog broja (16). Međutim, bez obzira na sve navedeno, ovakvi trombociti kod aktivno

krvarećih trombocitopeničnih bolesnika efikasno zaustavljaju krvarenje, iako se ne detektuje porast njihovog broja u perifernoj krvi.

Postoji studija u kojoj je pokazano da su lezije trombocita povezane sa aktivacijom/stimulacijom/oštećenjem tokom kolekcije i skladištenja (17). Aktivacija se ogleda kroz porast nivoa intraćelijskog kalcijuma, koji stimuliše proteaze koje utiču na strukturu membrane/citoskeleta, što rezultuje gubitkom diskoidnog oblika, ekspresijom P-selektina, gubitkom GPIb i funkcije mitohondrija, koje su u vezi sa lezijama koje nastaju tokom skladištenja (18, 19).

Protočna citometrija je najznačajniji metod za ispitivanje ekspresije antigena, a samim tim i funkcije trombocita. Ovom metodom je omogućena izolacija i analiza trombocita u mešanoj ćelijskoj populaciji ili u celoj krvi. Metoda protočne citometrije se primenjuje za detekciju proteina vezanih za trombocite, antigena i antitela u serumu, aktivacije i interrekcije sa drugim ćelijama, ispitivanje intraćelijskog kalcijuma i merenje retikularnih trombocita. Tehnički, mnogo je teže izvesti ispitivanja trombocita nego granulocita, odnosno eritrocita, jer se naročita pažnja mora posvetiti sprečavanju agregacije, da bi se obezbedila ćelijska suspenzija pojedinačnih ćelija, kao i sprečavanju *in vitro* aktivacije. Prisustvo trombocitnih fragmenata ili mikropartikula i debris, takođe može dovesti do pogrešnog tumačenja dobijenih rezultata. Kako su trombociti mali, čak i velika zastupljenost antigena na površini ćelije obično daje manji fluorescentni signal u odnosu na isti antigen eksprimiran u istoj količini npr. na granulocitima. Brzina, reproducibilnost i preciznost ovog metoda, kao i potpuna automatizacija, garantuje dobijanje najpouzdanijih podataka nakon analize. Trombociti imaju mnoštvo površinskih glikoproteina, a funkcije nekih od njih još uvek nisu detaljno proučene. Dostupnost monoklonskih antitela koja prepoznaju ove molekule i njihove neoepitope koji su eksprimirani nakon aktivacije, omogućili su široku upotrebu protočne citometrije u ispitivanju fiziologije trombocita, funkcije i interrekcije sa leukocitima i endotelnim ćelijama. Na ovaj način se detektuje spektrum specifičnih aktivacijom zavisnih modifikacija na površini membrane trombocita koje određuju aktivacioni status i reaktivnost cirkulišućih trombocita. Precizno se može utvrditi: a) procenat trombocita koji eksprimiraju određeni antigen (procenat trombocita koji se boje pozitivno za određeno antitelo, i b) prosečni intenzitet fluorescence (MFI) koji je odraz gustine ekspresije antigena, i koristi se kao semikvantitativni test za procenu količine vezanog antitela, na osnovu koje se definiše broj molekula antigena po trombocitu. U zavisnosti od eksperimentalnih okolnosti i fiziološke prirode antigena koji se meri, nekad veću značajnost za procenu funkcionalnog stanja trombocita može imati vrednost MFI, a nekad vrednost procenta trombocita koji ispoljavaju određeni antigen (tzv. pozi-

tivnih trombocita). Za razliku od metoda MFI, metod određivanja procenta pozitivnih trombocita je nezavistan od varijacija u amplifikaciji signala.

Hemostatska efikasnost trombocita zavisi od sposobnosti membranskog glikoproteinskog kompleksa Ib/IX i IIb/IIIa da reaguje sa njihovim odgovarajućim fiziološkim ligandima (20). Ispitivanje funkcionalnog integriteta ovih receptora, kod trombocita skladištenih *in vitro*, ima veliki značaj. Aktivisani trombociti mogu ispoljavati promene u ekspresiji GPIb i GPIIb/IIIa, kao i povišenu ekspresiju specifičnih aktivacionih markera kao što su CD62p ili lizosomalni protein CD63 (21). U literaturi su prisutna protivrečna saznanja koja se odnose na ispitivanja ekspresije antigena na trombocitima (22–24). Takve razlike mogu nastati kao posledica korišćenja različitih antikoagulanasa, metoda pripremanja, uslova skladištenja, ograničenja procedure koja su u mnogim slučajevima zasnovana isključivo na upotrebi specifičnih monoklonskih antitela, bez procenivanja funkcionalnog statusa receptora.

Poređenjem vrednosti procenata ćelija koje ispoljavaju određeni antigen u uzorcima KT-BC istog davaoca, prvog i trećeg dana skladištenja, pokazano je da postoje statistički značajne razlike u ekspresiji CD42a, CD42b i CD36 antigena (Tabela 1). Smanjenje broja trombocita koji ekspresiraju CD42b (GPIb) detektovano je trećeg dana, nakon čega je procenat pozitivnih trombocita ostao nepromenjen do petog dana. Postoje saopštenja u kojima je smanjenje ekspresije GPIb pokazano već nakon prvog dana (22, 25), kao i suprotnih nalaza (21, 24, 26, 27) koji pokazuju da se ekspresija ovog antigena ne menja (28). Smatra se da je progresivni gubitak GPIb molekula tokom skladištenja posledica aktivacije proteolitičkih enzima u plazmi (20). Kompleks GPIb/IX se razgrađuje ili modulira brojnim proteazama, kao što su katepsin G, elastaza, kalpain ili plazmin (20), a nedavno je dokazana i aktivacija hidrolitičkih enzima tokom skladištenja trombocita *in vitro*. Proteolitičko cepanje GPIb uglavnom prikazuje glikokalicin, ekstraćelijski fragment koji sadrži vWF vezujuće mesto. Sledstveno tome, merenje nivoa glikokalicina u plazmi se koristi kao pokazatelj razgradnje GPIb. Drugi smatraju da objašnjenje nepromenjene ekspresije GPIb leži u činjenici da postoji veliki intraćelijski pul GPIb, iz koga se tokom skladištenja GPIb redistribuira na površinu (29).

U rezultatima ove studije pokazano je da postoje statistički značajne razlike u procentu trombocita koji ekspresiraju CD41, CD62p i CD36 u uzorcima KT-BC istog davaoca prvog i petog dana. Sumirajući izneto, može se zaključiti da tek petog dana postoji značajan pad procenta trombocita pozitivnih za CD41 antigen, pa se može očekivati smanjena agregacija trombocita skladištenih pet dana. U nekim saopštenjima (20, 22, 24) GPIIb/IIIa kompleks pokazuje stabilnost, odnosno ne dolazi do značajnijih

imunoreaktivnih ni funkcionalnih izmena ekspresije, tokom skladištenja (20). Međutim, neki istraživači (30) su publikovali da petodnevno skladištenje slabi ekspresiju receptora za fibrinogen na trombocitima, u odgovoru na slabe agoniste (ADP ili epinefrin) bez kvantitativnog uticaja na GPIIb/IIIa kompleks. Takođe, može se spekulirati da navedene promene ekspresije membranskih glikoproteina trombocita tokom dugotrajnog skladištenja mogu biti posledica snižavanja pH vrednosti, s obzirom na činjenicu da pad pH ispod 6.0 izaziva ireverzibilni nastanak sferičnih i nabubrelih trombocita, te progresivni gubitak funkcije (31). Pored toga, treba uzeti u obzir da neodgovarajuća ravnoteža između gasne permeabilnosti plastičnih kesa, zapremine i kapaciteta pufera supernatantne plazme, kao i gustine ćelija u KT-BC, može doprineti relativnoj hipoksiji. To izaziva povećanje stvaranja laktata i pad pH nakon skladištenja dužeg od pet dana. Osim navedenog, sadržaj leukocita takođe igra značajnu ulogu. Leukociti troše kiseonik i stvaraju mlečnu kiselinu i na taj način ubrzavaju sniženje pH i lezije trombocita koje nastaju pri skladištenju. Dokazano je da postoji korelacija između broja leukocita u KT-BC, opadanja pH vrednosti, porasta elastaze i spontane proteolitičke aktivnosti (32). Ovo sugerira da kontaminirajući leukociti imaju štetne efekte na površinske glikoproteine i funkciju trombocita.

Neutrofili za razliku od limfocita izazivaju promene u trombocitima i utiču na njihovu funkciju odnosno posttransfuzijski oporavak. Neutrofili se raspadaju tokom prva dva dana skladištenja oslobađajući sadržaj granula, dok limfociti zadržavaju svoju vijabilnost i funkciju (33). Serin proteaza iz granula izaziva mobilizaciju kalcijuma iz trombocita, sekreciju i agregaciju (33). Elastaza dovodi do proteolize GPIb, glikoproteina IIb/IIIa i promene na receptoru za fibrinogen (33). Plazma sadrži visoke koncentracije inhibitora elastaze (inhibitor proteinaze i makroglobulin), ali je elastaza rezistentna na njihovo dejstvo. Pored direktnih efekata enzima, degranulacija neutrofila potpomaže lizu i oslobađanje kalcijum zavisne proteaze iz trombocita, koja je snažan proteolitički enzim koji degradira GPIb. Tokom skladištenja dolazi do proteolize membranskog GPIb, što je praćeno mobilizacijom GPIb iz intraćelijskog pula i reekspresijom na membrani (29). Na taj način membranski GPIb ostaje relativno konstantan uprkos značajnom premeštanju, odnosno promeni ukupnog GPIb.

Klinički značaj ovih oštećenja trombocita nije poznat. Trombociti koji su izgubili GPIb sa svojih membrana ne adheriraju normalno za oštećeni endotel i ne vezuju se ni za trombin ni za vWF na uobičajeni način. Smanjenje ekspresije sijalinske kiseline koje se detektuje na membranskim glikoproteinima tokom skladištenja trombocita može dovesti do smanjenog preživljavanja trombocita, s obzirom da je gubitak sijalinske kiseline sa membranskim gli-

koproteina udružen sa padom preživljavanja trombocita u eksperimentalnim modelima (34).

Tokom petodnevnog skladištenja, dolazi do porasta procenta trombocita koji ekspimiraju CD36 antigen. CD36 je receptor za kolagen (posreduje u prvoj fazi adhezije trombocita i kolagena) i trombospondin (posreduje u agregaciji trombocita i adheziji sa monocitima koje zavise od trombospondina), a i marker je aktivacije trombocita. Zapaža se da postoji statistički značajna razlika u porastu procenta trombocita koji ekspimiraju CD36 trećeg i petog dana u odnosu na prvi dan. Međutim, razlika u procentu trombocita koji ekspimiraju CD36 petog u odnosu na treći dan nije detektovana. Sve ovo ukazuje na postojanje aktivacije trombocita tokom skladištenja koja je u odnosu na ovaj marker vidljiva već nakon trećeg dana. U dostupnoj literaturi nema sličnih ispitivanja trombocita dobijenih iz *buffy coat*-a, ali podaci dobijeni u ovoj studiji potvrđuju da ima opravdanja za masovnije korišćenje ovog markera kao merila rane aktivacije trombocita. Postoji saopštenje u kome se iznosi da je CD36 mnogo osetljiviji klinički marker aktivacije trombocita nego aktivacijom indukovana ekspresija P-selektina i GPIIb/IIIa kompleksa (35). Michelson je dokazao da aktivacija trombocita rezultuje povišenom ekspresijom GPIV na površini trombocita (36). On tvrdi da porast ekspresije nije rezultat promene u strukturi i/ili mikrookruženju GPIV, već je rezultat redistribucije GPIV iz unutrašnjeg depoa. Ovim eksperimentima je dokazano da postoji unutrašnji depo CD36 koji se nakon snažne stimulacije trombinom redistribuira na površinu trombocita (36). Berger je potvrdio da je GPIV prisutan u α -granulama kao i u membranama otvorenog kanalikularnog sistema, a stimulacija trombinom rezultuje redistribucijom GPIV do trombocitne membrane (35). Sledstveno lokaciji α -granula za deo unutrašnjeg depoa GPIV, agonisti koji su jaki "degranulatori" (kakav je trombin) značajno povećavaju GPIV na površini trombocita, dok agonisti koji su slabi "degranulatori" (kao što su kolagen i epinefrin) imaju malo efekata na ekspresiju ovog molekula.

Aktivacija trombocita je praćena povećanom ekspresijom P-selektina i GP53 (CD63) na membrani trombocita. Ekspresija ovih antigena progresivno raste tokom skladištenja, a korelira sa stepenom aktivacije trombocita u jedinicama KT, te može iznositi od 20–30% petog dana, do 30–50% sedmog dana (37, 38). Pored ove forme P-selektina postoji i solubilni oblik koji se oslobađa u medijum sa površine trombocita nakon proteolize i predstavlja indirektni marker aktivacije trombocita. Vrednosti ovog proteina kao i PF4 odnosno β -tromboglobulina se udvostručuju nakon petog dana skladištenja (39, 40). U našoj studiji pokazano je da jedino u slučaju CD62p antigena postoji statistički značajna razlika u procentu pozitivnih trombocita u KT-BC uzorcima istih davalaca petog u odnosu na treći dan. Ovi

rezultati govore da značajnija aktivacija trombocita, reflektovana kroz porast ekspresije CD62p, počinje nakon trećeg dana skladištenja i raste dvostruko do kraja skladištenja na ambijentalnoj temperaturi. Procenat trombocita koji ekspimiraju CD62p antigen, koji predstavlja merilo aktivacije trombocita, nije visok (15,1%) i nalazi se u okviru vrednosti (<40%) propisanih kontrolom kvaliteta (41). Viša ekspresija CD62p (>40%) za posledicu ima *in vivo* oporavak trombocita manji od 50% (42). Dok neke grupe autora otkrivaju da se procenat ekspresije CD62p antigena na trombocitima tokom skladištenja povećava dva puta (12, 14, 21, 43), drugi autori opisuju povećanje procenta ekspresije od čak 15 puta (44, 45).

U studiji Holme i sar. (46), više od 50% trombocita (PRP), skladištenih tokom 5 dana ekspimiraju CD62p, što ukazuje da naši KT-BC pokazuju bolju očuvanost intaktnih granula koja korelira sa *in vivo* vijabilnošću i oporavkom.

U našoj studiji nije utvrđena značajna aktivacija CD63 antigena tokom skladištenja, mada postoje saopštenja koja pokazuju da postoji dvostruki porast procenta ćelija koje ispoljavaju ovaj antigen nakon petodnevnog skladištenja (12). Rezultati slični našim su dobijeni i u drugim studijama (47, 48, 49). Sudeći po ovim rezultatima, ovako skladišteni trombociti imaju odličan kvalitet i terapijsku efikasnost.

Opisano je i da drugi marker aktivacije trombocita, kao što je vezivanje aneksina V za anjonski fosfolipid, fosfatidilserin (PS), takođe raste tokom skladištenja (37). U našoj studiji je pokazano da se ekspresija ovog aktivacionog markera nije statistički značajno menjala tokom pet dana skladištenja. Međutim, s obzirom da je neophodan znatno veći stepen aktivacije trombocita kao i veći stepen lezija koje nastaju tokom skladištenja za utvrđivanje promene ekspresije ovog markera, dobijeni podaci ukazuju na relativno mali stepen aktivacije, odnosno izuzetan kvalitet ovako pripremljenih i skladištenih trombocita.

Vrednosti prosečnog intenziteta fluorescence (MFI) su veoma značajne u istraživanju promena na glikoproteinima trombocita, jer prikazuju realni broj epitopa po pojedinačnoj ćeliji.

Rezultati naše studije pokazali su da postoje statistički značajne razlike u vrednostima MFI za CD42a, CD36 i CD41 ekspimiranih na ukupnim trombocitima KT-BC istog davaoca prvog i trećeg dana. U ovom periodu detektovan je porast vrednosti MFI za CD42a i CD36, i sniženje vrednosti MFI za CD41. Isti tip promena u ekspresiji navedenih antigena uočen je i između uzoraka KT-BC istih davalaca prvog i petog dana skladištenja. Ovakvi rezultati pokazuju da se promene u broju ovih molekula po trombocitu detektuju već trećeg dana, i da se taj trend nastavlja do kraja skladištenja. Međutim, petog u odnosu na treći dan, detektovana je značajna

promena u vrednostima MFI za CD41 i CD36, dok značajna promena u vrednosti MFI za CD42a antigen nije detektovana. Veoma je značajno da nisu detektovane promene u vrednostima MFI za aktivacione antigene CD62p, CD63 i PS, kao i da je adhezijska funkcija trombocita bila očuvana (naši nepublikovani rezultati). Postoje radovi koji govore da je gustina CD42b na trombocitima tokom skladištenja imala silaznu putanju (20, 21, 50). Ovakva promena nije detektovana u našem istraživanju, kao i u sličnom radu drugih autora (51).

U literaturi postoje različiti podaci o ekspresiji CD41. Rezultati nekih studija pokazuju da ekspresija ovog antigena ostaje nepromenjena ili čak raste tokom skladištenja (22, 37), dok druge studije pokazuju da postoji lagani, ali statistički značajan pad do 10% u vrednosti MFI za ovaj antigen (38). Kluter i sar., slično našim rezultatima, detektuju pad gustine CD41 na trombocitima nakon 24 satnog skladištenja na ambijentalnoj temperaturi (50). Nasuprot našim rezultatima, postoji saopštenje u kome se iznosi da MFI odnosno gustina CD41 na trombocitima lagano raste tokom prvih četiri dana skladištenja na ambijentalnoj temperaturi, a petog dana dolazi do pada (47). Isti autori nisu našli značajnije promene glikoproteina tokom skladištenja, iako su promene koje su ukazivale na aktivaciju trombocita bile evidentne (47). Drugi autori takođe detektuju povećano vezivanje monoklonskih antitela za GPIIb/IIIa kompleks (12). Porast vezivanja za ovaj antigen može da ukazuje na kontinuiranu aktivaciju i eventualno pogoršanje stanja trombocita (12, 20). Mada, Rinder nalazi da je količina GPIIb/IIIa na površini trombocita kod P-selektin pozitivnih trombocita viša nego kod P-selektin negativnih trombocita, verovatno zahvaljujući oslobađanju iz α -granula kao i drugih intraćelijskih pulova. On kao i drugi ne detektuje da tokom skladištenja dolazi do značajnijeg porasta gustine GPIIb/IIIa na trombocitima (21, 51, 52).

Glikoprotein GPIV ubrzava reakciju trombocita sa kolagenom, a igra ulogu i u ranoj fazi adhezije trombocita. Ekspresija ovog antigena raste nakon stimulacije trombocita aktivirajućim agensom (53), iako postoje radovi u kojima ovakvo povećanje ekspresije CD36 nije potvrđeno (54). Prema našim saznanjima do sada nisu publikovani rezultati koji bi se mogli uporediti sa našim, a odnose se na ekspresiju CD36 antigena na trombocitima skladištenim tokom pet dana. Generalno, povećana ekspresija CD36 antigena bila bi samo još jedna potvrda povišene aktivacije trombocita i prisutnih lezija koje nastaju tokom skladištenja.

Uopšteno uzevši, promene ekspresije membranskih glikoproteina tokom skladištenja su povezane sa povećanom aktivacijom trombocita i smanjenim posttransfuzijskim oporavkom i preživljavanjem (42, 49).

Zaključak

U ovom radu, tehnikom protočne citometrije, na osnovu promene ekspresije površinskih antigena, ispitivali smo da li tokom petodnevnog skladištenja dolazi do aktivacije koncentrovanih trombocita.

Činjenica da je ekspresija CD62p u našoj studiji bila u okviru vrednosti propisanih kontrolom kvaliteta nakon petodnevnog skladištenja, ukazuje da naši KT-BC pokazuju odličnu očuvanost intaktnih granula, koja korelira sa *in vivo* vijabilnošću i oporavkom. Takođe nije utvrđena ni značajna aktivacija CD63 antigena, koja je prisutna kod snažno aktiviranih KT, što garantuje da će ovako pripremani KT imati zavidan funkcionalni kvalitet i terapijsku efikasnost. Iako postoji porast procenta vezivanja aneksina V za fosfatidilserin, procenat trombocita koji ispoljavaju ovaj aktivacioni marker nije se značajno menjao tokom skladištenja, što takođe ukazuje na relativno mali stepen aktivacije trombocita odnosno mali broj lezija koje nastaju tokom skladištenja.

Smatramo da ovakve savremene *in vitro* studije predstavljaju dobru osnovu za nastavak istraživanja kliničkih efekata odnosno terapijske efikasnosti pripremljenih i skladištenih KT.

Rad je urađen u okviru projekta: VMA/06-10B.20

Summary

EVALUATION OF CONCENTRATED PLATELETS ACTIVATION LEVEL DURING STORAGE BASED ON THE EXPRESSION OF MEMBRANE GLYCOPROTEINS

Evaluation of factors responsible for storage lesions of platelets derived from buffy-coat (PC-BC) during storage are still matter of large interest.

To determine, on the basis of expression of specific platelet markers (membrane antigen) in the total population of PC-BC, the extent of their activation and/or damage during storage up to five days at $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

PC-BC were stored under standard blood bank conditions. Activation of platelets was monitored by measuring percent of expression and MFI of surface glycoproteins. Measure was performed on day 1, 3, 5, using flow cytometer and fluorochrome labeled monoclonal antibodies against CD41, CD42a, CD42b, CD62p, CD63, and CD36, molecules and Annexin V.

There were significant differences in the percent of expression of CD42b, CD42a, and CD36 on whole platelets, detected first and third day of storage. Also, there was significant increase of the percent of expression of CD62p between first and fifth day, and also between third and fifth days. Significant differences were detected in the percent of expression between first and fifth day for CD41 and CD36 antigens. In addition, MFI increased for CD42a and CD36 at third and fifth day, but significantly decreased for CD41.

Elevation of expression of platelet activation antigens on PC-BC stored for five days in liquid form were minimal (within norms). This result reflects well-preserved and highly conserved function of stored platelets.

Key words: Concentrated platelets, flow cytometry, platelet antigens, MFI

Literatura

- Pisciotta PT, Benson K, Hume H, Glassman AB, Oberman H, Popovsky M, et al. Prophylactic versus therapeutic platelet transfusion practices in hematology and/or oncology patients. *Transfusion* 1995;35(6):498–502.
- Vaickus L, Breitmeyer JB, Schlossman R, Anderson KE. Platelet transfusion and alternatives to transfusion in patients with malignancy. *Stem Cells* 1995;13: 588–96.
- Murphy MF. State of the art in platelet transfusion therapy. *Transfus Sci* 1996; 17: 575–584.
- Balint B, Petakov M, Radović M, Stojanović N, Taseski J, Balint L i sar. Profilaksne transfuzije trombocita i mogućnost njihove zamene. *Bilten Transfuziol* 1995; 24: 39–45.
- B. Balint, D. Paunović, D. Vučetić, D. Vojvodić, M. Petakov, M. Trkuljić. Controlled-rate versus uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy. *Transfusion* 2006; 46: 230–5.
- Balint B, Vučetić D, Vojvodić D, Petakov M, Brajušković G, Ivanović Z, Trkuljić M, Stojanović N. Cell recovery, cryothermal micro-damages and surface antigen expression as predictors for cold-induced GPIIb/CD42b-cluster mediated platelet clearance after controlled-rate vs. uncontrolled-rate cryopreservation. *Blood Banking and Transfusion Medicine* 2004; 2 (1): 31–35.
- Balint B, Vučetić D, Drašković B, Vojvodić D, Brajušković G, Čolić M, Trkuljić M. Microprocessor-controlled vs. "dump-freezing" platelet and lymphocyte cryopreservation: a quantitative and qualitative comparative study. *Vojnosanit Pregl* 2006; 63(3): 261–70.
- Vučetić D, Balint B, Vojvodić D, Trajković–Lakić Z, Mandić–Radić S, Subota V, Trkuljić M. Cryopreserved vs. liquid stored platelets: a quantitative and functional analysis. *Mak med pregled* 2004, 58 (Suppl 63): 136.
- Vučetić D, Balint B, Vojvodić D, Mandić–Radić S, Subota V, Trkuljić M. Flow cytometric and functional investigations of cryopreserved and liquid stored platelets. Abstract book of the 15th International Meeting Danubian League against thrombosis and haemorrhagic disorders, May 14–16, 2009: 27.
- Vučetić D, Balint B, Vojvodić D, Mandić–Radić S, Subota V, Trkuljić M. Cryopreserved vs. liquid stored platelets – from the basic to the up to date findings. Abstracts of the 17th Regional Congress of the ISBT, Europe, June 23–27, 2007, Madrid, Spain. *Vox Sang* 2007; 93(Suppl. 1): 111.
- Escolar G, White JG. Changes in glikoprotein expression after platelet activation: difference between in vitro and in vivo studies. *Thromb Haemost* 2000; 83: 371–86.
- Fijnheer R, Pietersz RN, de Korte D, Gouwerok CW, Dekker WJ, Reesink HW, et al. Platelet activation during preparation of platelet concentrates: a comparison of the platelet-rich plasma and the buffy-coat methods. *Transfusion* 1990; 30: 634–8.
- Pietersz RNI, Loos JA, Reesink HW. Platelet concentrates stored in plasma for 72 hours at 22°C prepared from buffycoats of citrate-phosphate-dextrose blood collection in a quadruple-bag saline-adenine-glucose-mannitol system. *Vox Sang* 1985; 49: 81–5.
- Mrowiec ZR, Oleksowicz L, Zuckerman D, De Leon-Fernandez M, Khorshidi M, Dutcher JP, et al. Buffy coat platelets stored in aprotinase, aprotinin, and ascorbic acid in a suspended bag: combined strategies for reducing platelet activation during storage. *Transfusion*. 1996; 36: 5–10.
- Council of Europe—European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 14th ed. Recommendation No. R(95)15. Strasbourg: Council of Europe Publishing; 2008.
- Holme S, Heaton A. In vitro platelet aging at 22°C is reduced to in vivo aging at 37°C. *Br J Haematol* 1993; 91: 212–8.
- Holme S, Heaton W A, Smith KT, Buchholz OH. Evaluation of apheresis platelet concentrates collected with a reduced (30 mL) collection chamber with resuspension and storage in a synthetic medium. *Vox Sanguinis* 1994; 67: 149–53.
- Vučetić D. Procena kvaliteta kriokonzerviranih trombocita u odnosu na trombocite skladištene u tečnom stanju. Doktorska teza 2007. god. Vojnomedicinska akademija, Beograd.
- Seghatchian J, Krailadsiri P. The platelet storage lesion. *Trans. Med. Rev.* 1997; 11: 130–144.
- Rivera J, Sanchez-Roig MJ, Rosillo MC, Moraleda JM, Vicente V. Stability of glikoproteins Ib/IX and IIb/IIIa during preparation and storage of platelet concentrates: detection by binding assays with epitope-defined monoclonal antibodies and physiological ligands. *Vox sang* 1994; 67: 166–71.
- Dittmann J, Riggert J, Wieding JU, Simson G, Kohler M. Platelet membrane glycoproteins in thrombocytapheresis and platelet concentrates. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed* 1994; 32: 422–7.
- Ribeiro A, Swann JC, Berndt MC. Alterations of the levels of glycoproteins Ib-IX and IIb-IIIa in platelets stored at 22 degreesC. *Thromb Res.* 1992 ; 66: 619–27.
- Dhar A, Ganguly P. Altered expression of platelet surface glycoproteins during storage. *Br J Haematol.* 1988; 70: 71–5.
- George JN, Pickett EB, Heinz R. Platelet membrane glycoprotein changes during the preparation and storage of platelet concentrates. *Transfusion.* 1988; 28: 123–6.
- Bessos H, Murphy WG. A new competitive binding enzyme-linked immunosorbent assay for glyco-calicin in plasma and platelet concentrate supernatants. *Thromb Res.* 1990; 59: 497–507.
- Keegan T, Heaton A, Holme S, Owens M, Nelson E, Carmen R. Paired comparison of platelet concentrates prepared from platelet-rich plasma and buffy coats using a new technique with ¹¹¹In and ⁵¹Cr. *Transfusion.* 1992; 32: 113–20.
- Taylor MA. Cryopreservation of platelets: an in-vitro comparison of four methods. *J Clin Pathol* 1981;34:71–75.
- Garcia GI, Fitzpatrick JE, Hoering LA, Stewart CC, Sweeney JD. Effects of prestorage white-cell reduction of apheresis platelets on platelet glycoprotein Ib and von-Willebrand factor. *Transfusion* 1992; 32: 148–51.
- Michelson A, Adelman B, Barnard M, Carroll E, Handin R. Platelet storage results in a redistribution of glycoprotein Ib molecules: Evidence for a large intraplatelet pool of glycoprotein Ib. *J Clin Invest* 1988; 81: 1734–40.
- Di Minno G, Capitanio AM, Thiagarajan P, Martinez J, Murphy S. Exposure of fibrinogen receptors on fresh and stored platelets by ADP and epinephrine as single agents and as a pair. *Blood.* 1983; 61: 1054–9.
- Murphy S. Platelet storage for transfusion. *Semin Hematol.* 1985; 22: 165–77.
- Walvik J, Suontaka AM, Blomback M. Proteolytic activity during storage of platelets in plasma. *Transfus Med.* 1992; 2: 135–42.
- Sloand EM, Klein HG. Effect of white cells on platelets during storage. *Transfusion* 1990; 30: 333–8.
- Greenberg J, Packham MA, Cazenave JP, Reimers HJ, Mustard JF. Effects on platelet function of removal of platelet sialic acid by neuraminidase. *Lab Invest* 1975; 32: 476–84.
- Berger G, Caen JP, Berndt MC, Cramer EM. Ultrastructural demonstration of CD36 in the alpha-granule membrane of human platelets and megakaryocytes. *Blood* 1993; 82: 3034–44.
- Michelson AD, Benoit SE, Kroll MH, Li JM, Rohrer MJ, Kestin AS, Barnard MR. The activation-induced decrease in the platelet surface expression of the glycoprotein Ib-IX complex is reversible. *Blood* 1994; 83: 3562–73.
- Metcalfe P, Williamson LM, Reutelingsperger CP, Swann I, Ouwehand WH, Goodall AH. Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage: a comparative flow cytometric study of different production methods. *Br J Haemat* 1997; 98: 86–95.
- Bock M, Gawaz MP, Dietzler A, Heim MU, Mempel W. Single-donor platelet concentrates: changes of surface glycoproteins during storage. *Haemostasis* 1994; 24: 230–5.
- Divers SG, Kannan K, Stewart RM, Betzing KW, Dempsey D, Fukuda M, et al. Quantitation of CD62, soluble CD62, and lysosome associated membrane proteins 1 and 2 for evaluation of the quality of stored platelet concentrates. *Transfusion* 1995; 35: 292–7.
- Bock M, Rahrig S, Kunz D, Lutze G, Heim MU. Platelet concentrates derived from buffy coat and apheresis. biochemical and functional differences. *Transfusion Medicine* 2002; 12: 317–24.
- Dijkstra-Tiekstra MJ, de Korte D, Pietersz RN, Reesink HW, van der Meer PF, Verhoeven AJ. Comparison of various dimethylsulphoxide-containing solutions for cryopreservation of leucoreduced platelet concentrates. *Vox Sang.* 2003; 85: 276–82.
- Rinder HM, Murphy M, Mitchell JG, Stocks J, Ault KA, Hillman RS. Progressive platelet activation with storage: evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. *Transfusion.* 1991; 31: 409–14.
- Wagner T, Vetter A, Dimovic N, Guber SE, Helmsberg W, Kroll W, et al. Ultrastructural changes and activation differences in platelet concentrates stored in plasma and additive solution. *Transfusion.* 2002; 42: 719–27.

44. Berman CL, Yeo EL, Wencel-Drake JD, Furie BC, Ginsberg MH, Furie B. A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. *J Clin Invest.* 1986; 78: 130–7.
45. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol.* 1985; 101: 880–6.
46. Holme S, Sawyer S, Heaton A, Sweeney JD. Studies on platelets exposed to or stored at temperatures below 20 degrees C or above 24 degrees C. *Transfusion.* 1997; 37: 5–11.
47. Boomgaard MN, Gouwerok CW, Homburg CH, de Groot G, IJsseldijk MJ, de Korte D. The platelet adhesion capacity to subendothelial matrix and collagen in a flow model during storage of platelet concentrates for 7 days. *Thrombosis and Haemostasis* 1994; 72: 611–16.
48. Kosteljik EH, Folman CC, Gouwerok CW, Kramer CM, Verhoeven AJ, de Korte D. Increase in glycofocalin levels in platelet concentrates stored in plasma or synthetic medium for 8 days: comparison with other platelet activation markers. *Vox Sanguinis* 2000; 79: 21–6.
49. Fijnheer R, Modderman PW, Veldman H, Ouwehand WH, Nieuwenhuis HK, Roos D, et al. Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry. Changes during platelet storage. *Transfusion* 1990; 30: 20–5.
50. Kluter H, Schlenke P, Muller-Steinhardt M, Paulsen M, Kirchner H. Impact of buffy coat storage on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation. *Transfusion* 1997; 37: 362–7.
51. Sarraj-Reguieg A, Tissot JD, Hochstrasser DF, von Fliedner V, Bachmann F, Schneider P. Effect of prestorage leukocyte reduction on proteins of platelets obtained by apheresis. *Vox Sanguinis* 1993; 65: 279–85.
52. Rinder HM, Snyder EL, Bonan JL, Napychank PA, Malkus H, Smith BR. Activation in stored platelet concentrates: correlation between membrane expression of P-selectin, glycoprotein IIb/IIIa, and beta-thromboglobulin release. *Transfusion* 1993; 33: 25–9.
53. Michelson AD, Wencel-Drake JD, Kestin AS, Barnard MR. Platelet activation results in a redistribution of glycoprotein IV (CD36). *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1193–201.
54. Aiken ML, Ginsberg MH, Byers-Ward V, Plow EF. Effects of OKM5, a monoclonal antibody to glycoprotein IV, on platelet aggregation and thrombospondin surface expression. *Blood* 1990; 76: 2501–9.