

בדיקת תפקוד טסיות בטיפת דם - יישום טכנולוגית Flow cytometry לעומת בדיקת איגור טסיות

תקציר:

הקדמה: ליקוי בתפקוד טסיות הדם הוא גורם שכיח בהפרעות קרישה, המתבטא בנטייה לדימום מהעור ומהריריות. הבדיקה המקובלת היום היא איגור טסיות, המחייבת כמות גדולה של דם ולא ניתן לבצעה בחולים תרומבוציטופניים.

מטרות: השוואת שיטת איגור טסיות במכשיר האגרומטר בהשראת אגוניסטים שונים לטכנולוגיית flow cytometry (FC), באוכלוסייה הבריאה, באוכלוסייה המטופלת בתרופות מעכבות איגור טסיות ובדימום דם טבורי.

שיטות מחקר: דגימות דם נלקחו מאוכלוסייה בריאה, אוכלוסייה מטופלת בפלביקס (clopidogrel), לפני ואחרי מתן התרופה ומדם טבורי. מהדם הופקה פלסמה עשירה בטסיות שנבדקה לאיגור טסיות מרבי (maximal) באגרומטר ולשפעול טסיות ב-FC, תוך שימוש בסמנים לשחרור גרנולות או לשפעול הקולטן לפיברינוגן.

תוצאות: נמצא מיתאם חיובי מובהק וגבוה בהשוואת איגור טסיות ושימוש בסמן p-סלקטין לשחרור גרנולות בהשראת ADP. בשתי השיטות נמצאה תגובה לפלביקס (clopidogrel) 72 שעות לאחר מתן התרופה. טסיות מחבל הטבור של פגים הראו תגובה מופחתת בהשראת ADP לעומת ילודים שנולדו במועד בשני סמנים שונים: p-סלקטין לשחרור גרנולות ו-PAC1 לשפעול הקולטן לפיברינוגן. הוגדרו הסמנים האפשריים לבדיקת שפעול טסיות עם כל האגוניסטים המקובלים.

מסקנות ודיון: FC יכול להחליף את בדיקת איגור טסיות הן לאבחון מחלות דם והן לבדיקת תגובה לטיפול בתרופות מעכבות איגור טסיות. ישנם סמנים שונים לשפעול הטסיות ויש להתאים לכל אגוניסט את הסמן הרגיש לו. יתרונות FC הם: כמות מזערית של דם, ללא תלות בכמות הטסיות ואפשרות למדוד גם פעילות יתר של טסיות.

סיכום: שימוש ב-FC מאפשר בדיקת תפקוד טסיות בנפח קטן של דם ובספירה נמוכה. ולכן יאפשר ביצוע בדיקות גם ביילודים, פגים וחולים תרומבוציטופניים.

חגית האושנר^{2,1}
תמר כץ¹
רואי ביגל³
שלומי מטצקי^{3,2}
טל שדה⁴
ציפי שטראוס^{4,2}
גילי קנת^{2,1}
נורית רוזנברג^{2,1}

¹מרכז ארצי להמופיליה והמכון לקרישת הדם ומכון עמליה בירון לחקר קרישת הדם, מרכז רפואי שיבא, תל השומר, רמת גן
²הפקולטה לרפואה סאקלר, אוניברסיטת תל אביב, תל אביב
³מכון הלב, מרכז רפואי שיבא, תל השומר, רמת גן
⁴מחלקת ילודים ופגים, מרכז רפואי שיבא, תל השומר, רמת גן

מילות מפתח: טסיות דם; איגור טסיות; flow cytometry; p-סלקטין; תפקוד טסיות.

KEY WORDS: Platelet aggregation; Flow cytometry; Platelet function; Activation markers; P-selectin.

שנמדדת בשאלון BAT. השאלון נמצא כבעל ערך גבוה לשלילת בעיה בתפקוד טסיות אך בעל סגוליות (ספציפיות) נמוכה [2]. בדיקת המעבדה המקובלת לתפקוד טסיות היא בדיקת איגור הטסיות במכשיר הבדוק מעבר אור (light transmission agragometer - LTA). בדיקה זו טובה לאבחון מחלות דם מסוג כמו תרומבסטניה על שם גלנצמן (GT) או התסמונת על שם ברנרד-סוליי (BSS) ומתאימה גם לבדיקת תגובתיות לטיפול תרופתי מעכב איגור טסיות, אך היא אינה רגישה דיה לאבחון מחלות דם קלות יותר כמו פגיעה בשחרור הגרנולות (SPD) [3]. בנוסף, בדיקת האיגור טסיות היא בדיקה חצי ידנית המחייבת מיומנות עובד גבוהה, גוזלת זמן רב ומצריכה כמות גדולה יחסית של דם - כל אלה מקשים על אבחון פגם בתפקוד טסיות בקרב

הקדמה

כאשר יש פגיעה בתאי האנדותרל, טסיות הדם נצמדות למרקם החוץ תאי שנחשף ויוצרות תלכיד של טסיות החוסם את המקום הפגוע ומונע דם. פגיעה במספר או בתפקוד הטסיות מאופיינת בדימומים עצמוניים (ספונטניים) בתת עור ומריריות ובמחזורי וסת עם דימום נרחב בקרב נשים [1]. פגיעה בתפקוד טסיות עשויה לנבוע ממחלות גנטיות או נרכשות או עקב טיפול בתרופות. הפגיעה יכולה לנבוע מירידה במספר הטסיות (תרומבוציטופניה), בתפקוד שלהם או בשניהם. פגיעה קלה בתפקוד טסיות היא תופעה נפוצה יחסית וקשה לאבחון עקב השונות הגבוהה בחומרת תופעות הדם, כפי

סמני שפעול: P-סלקטין (CD62P) כסמן לשחרור α -גרנולות ו-PAC1 כסמן לשפעול הקולטן לפיברינינוגן, אינטגרין α IIb β 3.

תבחין איגור טסיות

דגימת דם ורידי נלקחה במבחנת PT המכילה 3.2% סודיום ציטראט והועברה מיד למעבדה. מבחנות הדם סורכזו 10 דקות ב-120g לקבלת פלסמה עשירה בטסיות PRP, וסרכוז שני של 10 דקות ב-1,900 גרם לקבלת פלסמה חסרת טסיות PPP. תבחין איגור טסיות בוצע במכשיר AggRAM (Helena Laboratories) למשך חמש דקות. מדידת שינוי במעבר האור מתורגמת לאחוזים. איגור הטסיות בוצע עם חמישה אגוניסטים כמפורט. 10 μ M ADP, אפינפריין (50 מיקרומולר), ריסטוציטין (1.5 מ"ג/מ"ל) חומצה ארכידונית (1.5 מילי-מולר) (היצרן mÖlab) או קולגן (10 מיקרוג'מ"ל) (Helena Laboratories). לכל אגוניסט נמדדה רמת איגור הטסיות המרבית (מקסימאלית) וחושבו הממוצעים, סטיית התקן וערך הסף לתוצאה נורמאלית על פי ממוצע נמוך משתי טסיות תקן.

תבחין שפעול טסיות באמצעות flow cytometry

מבחנות דם מאוכלוסיית הביקורת סורכזו כמתואר לעיל, ומדגימת ה-PRP נלקחו 100 מיקרול' לתבחין השפעול כדלהלן: שפעול עם 10 μ M ADP, מיהול $\times 10$ עם בופר פוספט PBS, הדגרה עם נוגדן חד-שבטי (monoclonal) כנגד CD62P מצומד לצבע פלורסצנטי PE (BioLegend, San Diego, CA) למשך 20 דקות בטמפרטורת החדר וקריאה במכשיר FC (Calibur, Becton Dickinson). הערכים הנמדדים: MFI median fluorescence intensity ואחוז התאים החיוביים מעבר לקריאת הרקע. נבדק המיתאם בין השפעול לאיגור טסיות של 40 דגימות (39 דגימות של 13 נבדקים לפני ואחרי טיפול בפליביקס (שלושה מועדים וקבוצת בקרה אחת). בדגימות מחבל הטבור, בנוסף לנוגדן חד-שבטי (מונוקלונלי) כנגד CD62P מצומד לצבע פלורסצנטי PE נבדק גם הסמן PAC1 (Becton Dickinson, San Jose, CA) מצומד לצבע FITC, הנקשר לקולטן לפיברינינוגן רק בצורתו הפעילה. בקרב 41 הדגימות מחבל הטבור נבדק המיתאם בין שני הסמנים ב-FC.

במספר דגימות דם מאוכלוסיית הבקרה, בנוסף ל-ADP, בדקנו את הפעלת הטסיות גם עם האגוניסטים האחרים: אפינפריין, קולגן וחומצה ארכידונית, בריכוזים זהים לאלה שבתבחין איגור הטסיות. הטסיות הודגרו עם הנוגדנים אנטי-CD62P ו-PAC1 או Anti CD63-FITC (Beckman coulter) וסמן לשחרור dense bodies. הפעלת הטסיות בהשפעת ריסטוציטין נבדקה על ידי קישור VWF לטסיות בנוכחות ריסטוציטין והדגרה עם נוגדן ל-VWF מצומד ל-FITC (Anti VWF - FITC) (abcam).

המחקר אושר על ידי ועדת הלסינקי מוסדית. הסטטיסטיקה נעשתה בתוכנת GraphPad Prism version 6.01.

תוצאות

תיקוף איגור טסיות:

אוכלוסיית הבקרה כללה 53 נבדקים (26 גברים ו-27 נשים) שבאו לבדיקת סקר במכון "שיבת", והיא נועדה לקביעת

ילודים ופגים. כמו כן, הבדיקה יעילה רק כאשר ספירת הטסיות נורמאלית ($10^9 \times 150-400$ ל'), אך היא אינה אפשרית בלוקים בתרומבוציטופניה, ובחולים עם תרומבוציטוזה נדרש מיהול, בבופר או בפלסמה. המיהול עלול להשפיע על תוצאות הבדיקה, ולכן הבדיקה אינה יעילה לאבחון פגיעה משולבת גם של מספר הטסיות וגם של תפקודן [4].

לכן הועלה הצורך בבדיקה לאבחון פגיעה בתפקוד טסיות שלא תהיה תלויה בכמותן. בדיקת מידת שפעול (אקטיבציה) של הטסיות במכשיר ה-flow cytometry יכולה לשמש כבדיקת תפקוד כזו [6,5]. בטכנולוגיה זו מספיקה כמות קטנה של דם (כ-100 מיקרול'), ומכיוון שהמכשיר בודק כל טסית בנפרד, היא איננה מושפעת ממספר הטסיות, וניתן לבצע גם בחולה הלוקה בתרומבוציטופניה קשה ובחולי תרומבוציטוזה ללא מיהול. ניתן למדוד את מידת שפעול הטסיות בעזרת סמנים לשחרור הגרנולות של הטסיות: P-סלקטין כסמן לשחרור תוכן α -גרנולות ו-CD 63 כסמן לשחרור dense-bodies; על ידי בצורתו הפעילה; או על ידי קישור חלבונים לקולטנים שלהם על גבי הטסיות - פיברינינוגן או פקטור פון-וילברנד (VWF) בנוכחות ריסטוציטין. בדיקות אלו מיושמות זמן רב במחקר של טסיות ואף הומלץ על עליהן לאבחון מחלות הקשורות בתפקוד טסיות בכנס הבין-לאומי לתרומבוזיס והמוסטאזיס (ISTH-SSC). אולם אין עדיין סטנדרטיזציה ליישום קליני [6].

מטרות: תיקוף של שיטת איגור טסיות במכשיר האגרומטר הקלאסי-LTA, בהשראת אגוניסטים שונים, תוך השוואה לטכנולוגית FC, באוכלוסיית בקרה (קבוצת בקרה) בוגרת המטופלת בתרופות מעכבות איגור טסיות, ובדם טבורי.

שיטות המחקר

אוכלוסיית הנבדקים

קבוצת בקרה בריאה: 53 נבדקים (26 זכרים ו-27 נקבות) שבאו לבדיקת סקר במכון "שיבת", ונתנו את הסכמתם, נשאלו האם הם נוטלים תרופות נוגדות קרישה או מעכבות טסיות. כל נבדק שנטל תרופות כאלה נפסל. כל הנבדקים נמצאו בצום. הקבוצה הייתה בטווח גילים של 27-73, וספירת הטסיות שלהן הייתה נורמאלית בטווח של 156-311 אלף למיקרול'. הדגימות נשלחו במערכת הפניאומאטית (מהירות 5 מ' לשנייה).

מטופלים בתרופות מעכבות איגור טסיות: 13-חולים שהגיעו עם תסמינים של אירוע לב Acute STEMI ולאחר העמסה של 300 מ"ג אספירין, נלקחה דגימת דם לפני ואחרי (24 שעות ו-72 שעות) מתן 600 מ"ג פליביקס (clopidogrel). המטופלים המשיכו בטיפול יומי של 75 מ"ג פליביקס ו-100 מ"ג אספירין. לכולם נעשה צנתור לאחר ההעמסה בפליביקס ולפני דגימת 24 שעות [7]. סך הכול נלקחו 39 דגימות כאלו ודגימת בקרה אחת, ללא טיפול בתרופות, שנועדו לתבחין איגור טסיות ושפעול (אקטיבציה) להשוואה בין השיטות, בהשראת ADP 01 מיקרומול בלבד.

דגימות דם טבורי: 41 דגימות דם מחבל הטבור נלקחו מיד לאחר הלידה, 30 דגימות של ילודים שנולדו במועד (מעל שבוע 37 של ההיריון) ו-11 דגימות של ילודים שנולדו בטרם עת (גיל היריון בטווח של 32+0 עד 36+1 שבועות) [8]. הדגימות שימשו למבחני שפעול בהשראת ADP 10 μ M והשוואה בין שני

הזמן מסרוכו לביצוע הבדיקה הוא כחצי שעה. הבדיקה הראשונה בוצעה בממוצע 3.3 ± 0.8 שעות לאחר הלקיחה; והבדיקה השנייה בוצעה 5.2 ± 0.9 שעות לאחר הלקיחה. בתבחין T הסתכלויות צמודות. לא נמצא הבדל מובהק בין התוצאות במועדים השונים באיגור טסיות עם $10 \mu\text{M ADP}$ $p=0.7855$; ובאיגור טסיות עם $50 \mu\text{M ADP}$ $p=0.6416$. השוואת אותו נבדק בשתי הדגימות מראה שההבדל הוא אקראי, ללא מגמה. לכן, למרות השאיפה להקפיד על ארבע שעות מלקיחה, כנדרש על פי המלצות בין-לאומיות [9]. ביצוע תבחין איגור הטסיות באותו יום עבודה לא ייתן תוצאות שונות באופן מובהק.

טבלה 1:

קביעת טווח תקין לאיגור טסיות בהשפעת אגוניסטים שונים. נמדדה רמת איגור הטסיות המרבית (המקסימאלית) (%) במשך 5 דקות מהוספת האגוניסט וחושבו טעיית התקן וערך הסף התחתון לתוצאה נורמאלית

אגוניסט וריכוז	ממוצע	טעיית תקן	ערך סף לנורמאלי
ADP $10 \mu\text{M}$	88.8	4.5	78.9
קולגן $10 \mu\text{g/ml}$	95.4	10.9	73.5
אפינפרין $50 \mu\text{M}$	85.3	3.6	77.8
ריסטוציטין 1.5mg/ml	91.5	3.1	85.3
ח' ארכידונית 1.5mM	89.7	8.4	72.9
בופר PBS	4.4	2.2	8.8

טבלה 2:

סמני שפעול טסיות בהשראת האגוניסטים השונים

אגוניסט וריכוז	סמן לשפעול טסיות	הערות
ADP $10 \mu\text{M}$	CD62P, PAC1	
אפינפרין $50 \mu\text{M}$ *	PAC1	
חומצה ארכידונית 1.5mM	CD63	
קולגן $10 \mu\text{g/ml}$ *	CD62P	טסיות שטופות** ובוכר עם סידן
TRAP $50 \mu\text{M}$ *	CD62P, PAC1	
ריסטוציטין 1.5mg/ml	anti VWF	
אנלוג של תרומבוקסאן $U46619$ $5 \mu\text{M}$	CD62P	מומס ב-DMSO

השוואה בין תבחין איגור טסיות למבחן אקטיבציה בעזרת flow cytometry בקרב מטופלי clopidogrel:

דגימות של 13 נבדקים לפני ואחרי טיפול בפליקס (clopidogrel) ודגימת בקרה נבדקו לאיגור טסיות בהשראת ADP $10 \mu\text{M}$ ולביטוי של p-סלקטין כמדד לשפעול הטסיות. נמדדה העלייה בעקבות תוספת ADP במדד של אחוזי התאים החיוביים ושל עוצמת הזהירה MFI במכשיר FC. נמצא מיתאם חיובי מובהק סטטיסטית בהשוואה בין רמת איגור טסיות מרבית לאחוזי התאים החיוביים בביטוי p-סלקטין $r = 0.86$ $p < 0.0001$. תוצאות דומות נמצאו גם עם מדד MFI, עלייה בעוצמת הזהירה $r = 0.79$ $p < 0.0001$.

בדיקות תגובת הטסיות לטיפול בפליקס (clopidogrel) מובאות בתרשים 1. מודגם, כי בשתי שיטות המדידה התגובה של התרופה על פעילות הטסיות בהשפעת ADP $10 \mu\text{M}$ מיקרומולר 72 שעות לאחר מתן התרופה היא טובה (מעל 30%) ומובהקת [12]. לאחר 24 שעות נצפתה ירידה נמוכה מאוד (6%–14%) שאינה מגיעה למובהקות סטטיסטית. בקרב שישה נבדקים מתוך ה-13 נצפתה תופעה של איגור טסיות הפיך: כלומר איגור הטסיות לאחר חמש דקות נמוך מאיגור הטסיות המרבי, בניגוד לאיגור הטסיות התקין שבו איגור הטסיות יציב ואיננו יורד לאחר שהגיע לערך המרבי (המקסימאלי). מידת איגור הטסיות בתום חמש דקות מדגימות שנלקחו לאחר 24 שעות הייתה $18 \pm 58\%$ נמוכה באופן מובהק ממידת איגור הטסיות המרבי $64 \pm 11\%$ $(p=0.019)$. כלומר, גם לאחר 24 שעות יש תגובה לתרופה בחלק מהמטופלים, אך עקב השונות הגדולה ומספר הנבדקים הנמוך ($n=13$) היא אינה מגיעה למובהקות סטטיסטית בשאר המדדים. במחקרים אחרים שבהם השתמשו בריכוזים נמוכים יותר של ADP (2–6 מיקרומולר), ואז ניתן לראות תגובה טובה בטווח של 4–24 שעות לאחר העמסה ברמה גבוהה של פליקס גם במדד של איגור טסיות מרבי [13].

השוואה בין שני מדדי שפעול של טסיות בטכנולוגיית flow cytometry בדגימות דם מחבל הטבור:

מידת שפעול הטסיות יכולה להימדד בעזרת p-סלקטין כסמן לשחרור תוכן ה- α גרנולות או על ידי PAC1 – נוגדן המזהה את הקולטן לפיברינוגן (אינטגרין $\alpha\text{IIb}\beta3$) בצורתו הפעילה בלבד. בדקנו את שני הסמנים הללו על טסיות מדגימות של חבל הטבור שנלקחו מיד לאחר הלידה של 30 ילודים שנולדו במועד ר-11 שנולדו לפני שבוע 37 של ההיריון (להלן פגים). רמת קישור p-סלקטין ו-PAC1 נמדדה לפני ואחרי תוספת של ADP $10 \mu\text{M}$ מיקרומולר. ניתן לראות בתרשים 2 שרמת הביטוי הבסיסית של p-סלקטין ו-PAC1

* לא הוצג במאמר תוצאות שפעול טסיות עם האגוניסטים הללו סמן נחשב כסמן טוב לשפעול טסיות אם ההבדל בערכי MFI ואחוז התאים החיוביים לפני ואחרי הדגרה עם האגוניסט הנבדק הוא מובהק סטטיסטית, ואם יש מיתאם חיובי גבוה בין ההפרש במדדים הללו לבין ההפרש באיגור הטסיות המרבי מאותן דגימות
**פרוטוקול לשיטת טסיות נמצא במאמר: Hauschner H, Rosenberg N, Seligsohn U et al, Blood. 2015;126:661-4

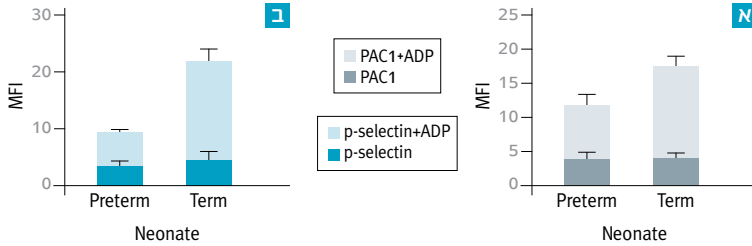
טווח נורמאלי והדירות הבדיקה. בטבלה 1 מתואר הממוצע וטעיית התקן של רמת איגור הטסיות המרבית (מקסימאלית) בהשראת כל אחד מהאגוניסטים והטווח התקין. ניתן לראות שכל ערכי הסף גבוהים מ-70% – הערך המקובל בספרות כגבול תחתון לאיגור טסיות תקין [9]. בנוסף, איגור הטסיות העצמוני ללא הוספת אגוניסט היה נמוך מ-10% – עובדה המעידה על תנאי לקיחה ושינוע תקינים.

תוצאות פתולוגיות נבדקו בדגימות של חולים ידועים של GT שהוגדרו על סמך אבחון מולקולארי. בעשרים חולי GT הודגמה רמת איגור טסיות מרבית נמוכה מ-10% עם ADP ואפינפרין נמוך מ-20% עם קולגן תקין וריסטוציטין [10]. בשתי חולות BSS שבהן נמצאה המוטציה הגורמת למחלה, הודגמה רמת איגור טסיות מרבית תקינה עם ADP אפינפרין וקולגן, ופתולוגיית עם ריסטוציטין [11]

הדירות הבדיקה חושבה על-ידי ביצוע איגור הטסיות של אותה דגימה ב-4 ערוצים שונים של המכשיר (10 דגימות שונות), והשונות שנמצאה הייתה עד 5% בטווח התקין (normal range) ועד 7% בתחום הפתולוגי (של מטופלים בתרופות). כדי לבדוק את השפעת זמן השהייה של הדגימה כדם מלא, מלקיחה ועד ביצוע הבדיקה, נלקחו 15 דגימות שבוצע בהן איגור טסיות עם ADP או אפינפרין פעמיים בהפרש של כשעתיים.

תרשים 2:

בדיקת תפקוד טסיות מדם טבורי של 30 ילודים במועד ושל 10 פגים בשיטת האקטיבציה ב-flow cytometry (A); נמדד מידת קישור הנוגדן PAC1 לפני (אפור כהה) ואחרי (אפור בהיר) הוספת ADP 10 μm (B) נמדדה רמת ביטוי P-סלקטין על גבי הטסיות לפני (כחול) ואחרי (תכלת) הוספת ADP 10 μm. מוצג ממוצע ± SEM



האגוניסטים הטבעיים בעזרת סמן אחד לפחות מתוך השלושה: CD63, CD62P ו-PAC1 כמפורט בטבלה 2. קישור VWF לטסיות בנוכחות ריסטוציטין אפשרי בעזרת נוגדן ל-VWF. סמן נחשב כמועיל לשפעול טסיות אם ההבדל בערכי MFI ואחוז התאים החיוביים לפני ואחרי הדגרה עם האגוניסט הנבדק הוא מובהק סטטיסטית, ואם יש מיתאם חיובי גבוה בין הפרש במדדים הללו לבין הפרש במדד איגור טסיות מרבי מאותן דגימות (הנתונים אינם מוצגים).

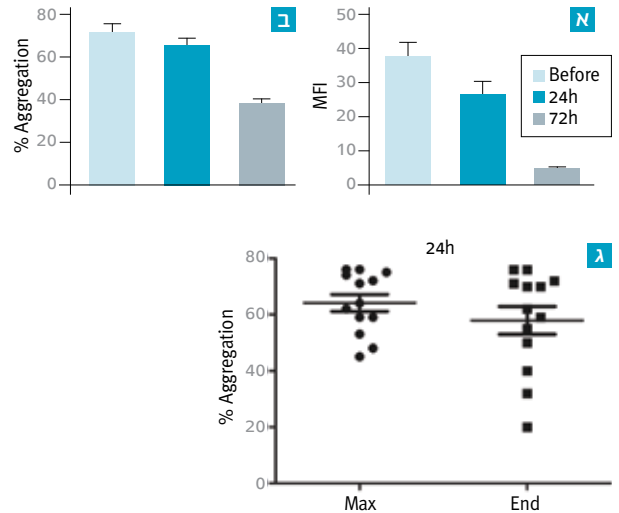
דיון ומסקנות

ליקוי בתפקוד טסיות הדם הוא גורם שכיח בהפרעות קרישה בקרב האוכלוסייה, המתבטא בנטייה לדימום מהעור ומהריריות [14,15]. הבדיקה לאבחון תפקוד טסיות לקוי ותגובה לתרופות מעכבות איגור טסיות, המקובלת היום, היא איגור טסיות. הבדיקה מחייבת כמות גדולה יחסית של דם ולא ניתן לבצע אותה על חולים תרומבוציטופניים. לכן קיים קושי בבדיקת תפקוד טסיות בפגים, בחולים בתרומבוציטופניה חיסונית (ITP) או לאחר כימותרפיה והשתלת לשד עצם. כדי להתגבר על מגבלות אלה הראינו שאפשר להסתייע בטכנולוגיית FC ולבדוק סמני שפעול כמו: CD62P - סמן לשחרור α-גרנולות; CD63 - סמן לשחרור dense bodies; PAC1 - סמן לשפעול הקולטן לפיברינוגן; וקישור ישיר של חלבונים כמו פיברינוגן או VWF בעזרת נוגדנים נגדם [16].

במחקר הנוכחי הראנו שניתן להשתמש בטכנולוגיית FC לבדיקת תגובה לפלביקס clopidogrel ברמת רגישות גבוהה יותר ממבחן איגור הטסיות, בדומה למחקרים אחרים [13]. הדגמנו הבדל בתגובת טסיות של ילודים שנולדו במועד לעומת פגים בדגימות דם מחבל הטבור. כך אפשר לבדוק תפקוד טסיות בקרב פגים בתגובה לטיפולים שונים העלולים לגרום לדימומים (כמו סורפקטאנט) בדגימת דם של 0.5 מ"ל בלבד - דבר שלא ניתן לבצעו בבדיקת איגור הטסיות ב-ITP. בטכנולוגיית FC ניתן לבדוק גם פעילות מוגברת של טסיות, שאינה אפשרית בשיטת איגור הטסיות [17]. שימוש כזה נעשה במחקר של חולי סוכרת, שבה בדקנו גם יצירת צברי טסיות דם עם ליקוציטים [18]. ניתן להסתייע בטכנולוגיית ה-FC בסמנים נוספים לשפעול כמו ביטוי פוספטידיל-סרין PS על גבי ממברנת הטסית בעזרת קישור annixin V או סמני

תרשים 1:

(A) בדיקת תגובה ל-clopidogrel בשיטת איגור הטסיות בהשראת ADP בארגומטר במדד של איגור טסיות מרבי (מקסימאלי) (A) ובשיטת האקטיבציה בהשראת ADP - רמת הביטוי של p-סלקטין על גבי ממברנת הטסיות ב-flow cytometry (B); פעילות הטסיות לפני מתן clopidogrel (תכלת) ולאחר 24 שעות (כחול) ו-72 שעות (אפור). מוצג איגור טסיות מרבי MFI, ממוצע של 13 נבדקים בכל מועד (SEM); (ג) מוצג איגור הטסיות בהשראת ADP לאחר 5 דקות (end) לעומת איגור הטסיות המרבי (max) בדגימות שנלקחו 24 שעות לאחר העמסה ב-clopidogrel. מוצגים בתרשים 13 הדגימות, ממוצע ו-SEM



על גבי הטסיות דומה בקרב ילודים שנולדו במועד ופגים. לעומת זאת, העלייה בהשראת ADP בפגים הייתה נמוכה לעומת ילודים במועד. במבחן סטטיסטי ANOVA דו-כיווני נמצא הבדל מובהק בתגובה ל-ADP בין פגים לבין ילודים במועד ($p=0.0016$), ולא נמצא הבדל מובהק בין מדד שפעול הקולטן לפיברינוגן-PAC1 לבין מדד שחרור ה-α גרנולות - p-סלקטין ($p=0.734$).

יחד עם זאת, בבדיקת כל מדד בנפרד, ההבדל בין פגים לילודים במועד נמצא מובהק ברמת ביטוי p - סלקטין ($p=0.004$), אך לא הגיע למובהקות סטטיסטית בקישור PAC1 ($p=0.078$), ממצא המעיד על כך ששני המדדים אינם זהים.

בדיקת שפעול טסיות בטכנולוגיית flow cytometry בהשראת אגוניסטים שונים:

בבדיקת תפקוד טסיות בשיטת איגור הטסיות יש שימוש במספר אגוניסטים פיסולוגיים, ולכל אגוניסט יש קולטן ייחודי משלו ומסלול להעברת הסיגנל עד לשפעול הקולטן לפיברינוגן, המאפשר קישור פיברינוגן מסיס ויצירת צברים (אגרגטים) של טסיות דם. כמו כן, תוספת של טיפול בריסטוציטין מאפשר בדיקת קישור VWF לקולטן שלו ואגלוטינציה של טסיות בתיווך הקולטן ל-VWF. כדי לבדוק את כל מכלול האפשרויות לשפעול טסיות בטכנולוגיית FC, בדקנו את סמני השפעול עם כל אחד מהאגוניסטים המקובלים על טסיות שעברו איגור טסיות תקין עם אותם אגוניסטים. מציאנו, שניתן לבדוק שפעול טסיות בהשראת

המושפעת הן ממספר הטסיות והן מתפקוד הטסיות הבודדת. טכנולוגיה זו מאפשרת לבדוק את תפקוד הטסיות באופן שלא התאפשר לנו בעבר, כמו בפגים או בחולים שעברו השתלת לשד עצם.

מחברת מכתבת: נורית רוזנברג

המרכז הארצי להמופיליה והמכון לקרישת הדם
מרכז רפואי שיבא, תל השומר, רמת גן
טלפון: 03-5302105, פקס: 03-5351568
דוא"ל: nuritros@sheba.health.gov.il

מוות תאי מתוכנת [20,19]. המכשיר מספק בנוסף מידע על גודל הטסיות, ונתון זה חשוב באבחון מחלות גנטיות של טסיות כמו BSS [11].

לסיכום

טכנולוגיית FC מאפשרת בדיקת תפקוד טסיות בכמות דם מזערית (מינימאלית) וללא תלות במספר הטסיות. כמו כן, היא מאפשרת אבחנה מبدלת בין השפעת מספר הטסיות לתפקוד של הטסיות הבודדת, בניגוד לבדיקת איגור הטסיות,

ביבליוגרפיה

- Cattaneo M, **Inherited platelet-based bleeding disorders.** *J Thromb Haemost.* 2003; 1:1628-36.
- Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T *et al*, on behalf of the isth/ssc joint vwf and perinatal/pediatric hemostasis subcommittee. **ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders.** *J Thromb Haemost.* 2010; 8:2063-5.
- Zhou L *et Schmaier AH*, Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Pathol.* 2005; 123:172-83.
- Harrison P *et Mumford A*, Screening tests of platelet function: update on their appropriate uses for diagnostic testing. *Semin. Thromb. Hemost.* 2009;35:150-7.
- Michelson, AD. **Flow cytometry: a clinical test of platelet function.** *Blood,* 1996; 87:4925-36.
- Van-Asten I, Schutgens REG, Baaij M *et al*, **Validation of flow cytometry analysis of platelet function in patients with a suspected platelet function defect.** *J Thromb Haemost.* 2018; 16:1-10.
- Beigel R, Fefer P, Rosenberg N *et al*, **Antiplatelet effect of thienopyridine (clopidogrel or prasugrel) pretreatment in patients undergoing primary percutaneous intervention for ST elevation myocardial infarction.** *Am J Cardiol.* 2013; 112:1551-6.
- Sadeh-Vered T, Rosenberg N, Strauss Z *et al*, **Assessment of the effect of pulmonary surfactant on platelets function in term and preterm infants.** Submitted for publication.
- Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P *et al*, **Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH.** *J Thromb Haemost.* 2013; 11:1183-9.
- Mansour W, Einav Y, Hauschner H *et al*, **An α IIb mutation in patients with Glanzmann thrombasthenia located in the N-terminus of blade 1 of the β -propeller [Asn2Asp] disrupts a calcium binding site in blade 6 .** *J Thromb Haemost.* 2011; 9:192-200.
- Rosenberg N, Lalezari S, Landau M *et al*, **Trp207Gly in platelet glycoprotein Iba is a novel mutation which disrupts the connection between the leucine- rich repeat domain and the disulfide loop structure and causes Bernard-Soulier syndrome.** *J Thromb Haemost.* 2007; 5:378-86.
- Bonello L, Tantry US, Marcucci R *et al*, **Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate.** *J Am Coll Cardiol.* 2010 14;56:919-33.
- Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E *et al*, **High clopidogrel loading dose during coronary stenting: effects on drug response and interindividual variability.** *Eur Heart J.* 2004, 25:1903-10.
- Gresele P, Harrison P, Bury L *et al*, **Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: Results of a worldwide survey.** *J Thromb Haemost.* 2015; 13:314-22.
- Rubak P, Nissen PF, Kristensen SD *et al*, **Investigation of platelet function and platelet disorders using flow cytometry.** *Platelets.* 2016; 27:66-74.
- Giannini S, Cecchetti L, Mezzasoma AM *et Gresele P*, **Diagnosis of platelet-type von Willebrand disease by flow cytometry.** *Haematologica* 2010, 95:1021-4.
- Tomer A, **Platelet activation as a marker for in vivo prothrombotic activity: Detection by flow cytometry.** *J Biol Regul Homeost Agents.* 2004; 18:172-7.
- Shlomai G, Haran-Appel T, Sella T *et al*, **High-risk type-2 diabetes mellitus patients, without prior ischemic events, have normal blood platelet functionality profiles: a cross-sectional study.** *Cardiovascular Diabetology.* 2015; 14:80-7.
- Tomer A, Bar-Lev S, Fleisher B *et al*, **Antiphospholipid antibody syndrome: the flow cytometric annexin A5 competition assay as a diagnostic tool.** *Brit J Haematol.* 2007; 139:113-20.
- Perrotta PL, Perrotta CL *et Snyder E*, **Apoptotic activity in stored human platelets.** *Transfusion,* 2003; 43:526-35.