

Analisi citofluorimetrica delle piastrine reticolate: un test rapido e sensibile per valutare il turnover piastrinico

Gian Luca Salvagno¹, Maurizio Degan², Martina Montagnana¹, Paola Riolfi², Pier Luigi Marradi, Germana Montesi², Giovanni Poli², Clara Lechi¹, Pietro Minuz², Gian Cesare Guidi¹

¹Dipartimenti di Scienze Morfologico-Biomediche

²Scienze Biomediche e Chirurgiche

ABSTRACT

Flow cytometry analysis of reticulated platelets: a rapid- sensitive test to evaluate thrombocytopenic disorders and thrombocytopoiesis

Reticulated platelets (RP) stained with Thiazole Orange (TO), a fluorescent indicator with high affinity to intracellular RNA, are markers of thrombopoiesis and platelet turnover. Blood was drawn in K₂EDTA and incubated for 15 min at 22° in the dark with monoclonal antibody anti-GPIIIa (CD61PE), and with TO (0.6 µg/mL, final concentration). The cells were then fixed with 1% paraformaldehyde and analysed with Beckman Coulter Elite flow cytometer. RP% in controls (n=23) was 6,13±3,09% (Mean±SD), in patients with haematologic malignancy was 10,41±9,02% during aplasia, followed by a significant increase after 10-15 days. Also in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), hepatic cirrhosis with thrombocytopenia and LES we observed a significant increase of % RP (p<0.0001 vs controls). Measurement of % RP is useful in the diagnosis of ITP and other thrombocytopenic conditions and could predict the spontaneous rise of blood platelets after chemotherapy .

RIASSUNTO

Le piastrine reticolate evidenziabili con Tiazolo Orange, indicatore fluorescente ad alta affinità per RNA (piastrine TO-positive) sono cellule neosintetizzate analoghe ai reticolociti, utili per valutare trombocitopoiesi e turnover piastrinico. Abbiamo valutato piastrine TO-positive in pazienti trombocitopenici con diversa patogenesi. Il sangue prelevato in K₂-EDTA viene incubato al buio per 15' a 22° con un anticorpo monoclonale anti-GP IIIa (CD61PE) e TO (concentrazione finale 0.6 µg/L), successivamente fissato (paraformaldeide 1%) e letto al citofluorimetro (Beckman Coulter Elite). La % di piastrine reticolate in 23 controlli è 6.13±3.09 % (Media±D.S), nei pazienti ematologici (leucemie e linfomi) in fase aplastica 10.41±9.02%, seguita da un aumento significativo 15 giorni dopo. In 7 bambini con porpora trombocitopenica idiopatica, 64.9±19.4% (p<0.0001). Le piastrine TO-positive aumentano anche nella cirrosi epatica con trombocitopenia e nel LES. La loro misura è utile nella diagnosi delle trombocitopenie e fornisce indicazioni sul loro meccanismo patogenetico.

INTRODUZIONE

La distinzione tra piastrinopenie iporigenerative e da distruzione periferica spesso richiede la valutazione del numero dei megacariociti nel midollo osseo per saggiare la trombopoiesi. Tale metodo è invasivo e comporta disagio per il paziente. Un test rapido e sensibile adatto a valutare la capacità rigenerativa del midollo, come quello delle piastrine reticolate potrebbe essere di grande utilità. Le piastrine reticolate sono liberate nel sangue periferico dopo frammentazione dei megacariociti. Queste piastrine neosintetizzate, benché prive di nucleo, contengono ancora acido nucleico, prevalentemente mRNA, e sono in grado di sintetizzare modeste quantità di proteine; esse hanno significato analogo a quello dei reticolociti circolanti. L' mRNA non è stabile, viene degradato entro 24 ore dall'immissione in circolo delle piastrine giovani (1) con contemporanea riduzione del volume cellulare.

Per primo Kienast nel 1990 (2) sottolineò il valore

diagnostico delle piastrine reticolate analizzate con metodo citofluorimetrico nelle trombocitopenie, accompagnate o meno da aumento dei megacariociti nel midollo. Questa misura sembrerebbe avere una notevole utilità clinica per distinguere le trombocitopenie con alto turnover piastrinico (2,3) da quelle arigenerative, sia da insufficienza midollare sia dopo chemioterapia (4,5). Inoltre la misura delle piastrine reticolate potrebbe essere utile per valutare il rischio trombotico nelle trombocitosi (6)

Recentemente per la misura citofluorimetrica delle piastrine reticolate è stato proposto un colorante fluorescente, thiazole orange (TO) (2), che presenta molti vantaggi. Il TO, in quanto lipofilo, attraversa le membrane delle piastrine senza bisogno di permeabilizzazione, è eccitabile a 488 nm e legandosi agli acidi nucleici intracellulari aumenta la sua fluorescenza di circa 3000 volte manifestando un significativo spostamento della banda di emissione (7,8). I principali problemi di questa metodica sono: la definizione della soglia di positività e la variabilità del

range di normalità, legata sia a problemi metodologici sia al fatto che il TO può marcare altri compartimenti piastrinici (granuli densi e DNA nei mitocondri). A dispetto di questi problemi, la gran parte delle piastrine marcate con thiazolo-orange è specifica per mRNA poiché la fluorescenza TO - dipendente è sensibile all'azione della ribonucleasi (8).

Ci siamo proposti di valutare le piastrine reticolate in una serie di pazienti nei quali le rispettive patologie comportavano diversi meccanismi di trombocitopenia e di valutare la reale importanza di questo dato in rapporto al meccanismo patogenetico. Si tratta di uno studio ancora preliminare.

MATERIALI E METODI

Sono stati studiati 7 pazienti con trombocitopenia essenziale, 12 pazienti con grave epatopatia, 14 pazienti ematologici di cui 10 studiati in condizioni di quasi totale aplasia midollare dopo chemioterapia e in fase di ripresa e 23 controlli pareggiati per età e sesso. I controlli avevano una normale conta piastrinica e non avevano assunto farmaci da almeno 2 settimane. Le piastrine reticolate inoltre sono state studiate in un caso di coagulazione intravascolare disseminata, in 2 pazienti con lupus eritematoso sistemico e in un caso di porpora trombotica trombocitopenica.

Preparazione dei campioni

Il metodo di riferimento da noi adottato per la misura delle piastrine reticolate su sangue intero è quello di Matic modificato (9).

Il prelievo di sangue venoso è stato eseguito in un vacutainer contenente come anticoagulante K_2EDTA . Successivamente 5 μL di sangue intero venivano incubati al buio per 15' a temperatura ambiente con 5 μL di anticorpo CD61 PE, clone SZ21 (Immunotech) e con 50 μL di TO (Sigma-Aldrich) alla concentrazione finale di 0,6 $\mu g/mL$. 1 mg di TO è stato sciolto in 1 mL di metanolo e diluito 1:1000 in PBS a una concentrazione finale pari a 1 $\mu g/mL$. Tempo e concentrazione sono stati scelti in base a prove sperimentali (dati non mostrati).

Alla fine del periodo di incubazione le cellule venivano fissate con paraformaldeide all'1% in PBS.

Analisi citofluorimetrica

E' stato utilizzato un "gate" morfologico in base alle dimensioni (log forward scatter) ed alla granularità intracellulare (log side scatter) della popolazione piastrinica. Allo scopo di caratterizzare specificamente la popolazione piastrinica, abbiamo anche utilizzato un gate immunologico per mezzo di un anticorpo monoclonale fluorescente, coniugato con la ficoeritrina (PE), diretto contro la glicoproteina IIIa. Tale glicoproteina è un recettore di superficie della membrana piastrinica, componente della GPIIb/IIIa. Le piastrine vengono così riconosciute in base ad un

duplice sistema: dimensioni e granularità da una parte e caratteristiche antigeniche di membrana dall'altra.

Il principale problema nel saggio delle piastrine reticolate è la mancanza di un metodo di riferimento, di uno standard e di materiale di controllo. Si è proceduto ad una corretta compensazione in ogni prova al fine di ovviare al problema della sovrapposizione delle bande di emissione relative al TO e alla ficoeritrina. Tutti i campioni sono stati sempre letti con doppia marcatura. Per questo motivo abbiamo scelto di valutare in parallelo per ogni campione uno standard interno con piastrine identificate con CD 61 senza thiazolo orange.

I campioni marcati con TO sono stati analizzati con un citofluorimetro Epics Coulter dotato di un Argon Laser utilizzando una λ di eccitazione a 488 nm e una λ di emissione a 525 nm. Il controllo qualità dello strumento è stato eseguito con fluorosfere Beckman Coulter all'inizio di ogni seduta di lavoro. In ogni determinazione sono state acquisiti mediamente 10.000 eventi (piastrine). L'analisi e l'elaborazione dei dati è stata effettuata mediante l'impiego del software Expo 32 della Beckman Coulter.

Analisi statistica

I dati sono presentati come $M \pm DS$. Il confronto tra gruppi per stabilire la significatività è stato fatto con test non parametrici: test di Mann-Whitney e test di Kruskal-Wallis. Sono stati inoltre utilizzati il coefficiente di correlazione di Pearson e l'analisi della regressione lineare. Si è ritenuta come significativa una $p < 0.05$. Come programma di statistica è stato usato GraphPad.

RISULTATI

La percentuale di piastrine reticolate nei 23 soggetti di controllo da noi studiata è risultata pari a $6.13 \pm 3.09\%$, la media della conta piastrinica $266.1 \pm 47.5 \times 10^9/L^{-1}$, il volume piastrinico medio (MPV): 7.43 ± 0.83 fL.

Le piastrine reticolate sono risultate significativamente più elevate nei pazienti affetti da trombocitopenia idiopatica (ITP) e da epatopatia cirrotica ($p < 0.001$) mentre la conta piastrinica è significativamente maggiore nei controlli rispetto ai pazienti (Fig 1a e 1b).

Nel caso di ITP non si osserva alcuna sovrapposizione di dati, mentre i pazienti epatopatici sembrano presentare un comportamento meno omogeneo. Sono stati studiati anche 2 pazienti con LES che hanno presentato valori molto elevati (67 e 48%), un caso di CID e un caso di porpora trombotica trombocitopenica con valori pure elevati (rispettivamente 43% e 33%). La percentuale di piastrine reticolate è inversamente proporzionale alla conta piastrinica, come è confermato dalla retta di regressione (Fig 2).

Anche il volume piastrinico medio (MPV) è risultato significativamente maggiore ($p < 0.0001$) nei pazienti con ITP e con cirrosi epatica rispetto al MPV delle piastrine dei controlli (ITP: 10.89 ± 1.99 fL; epatopatie: 9.75 ± 1.22 fL). Nessuna differenza invece è presente tra controlli e pa-

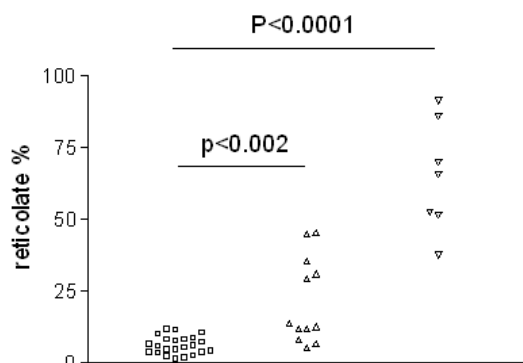


Figura 1a
Percentuale di piastrine reticolate in controlli, epatopatie e trombocitopenia idiopatica (ITP)

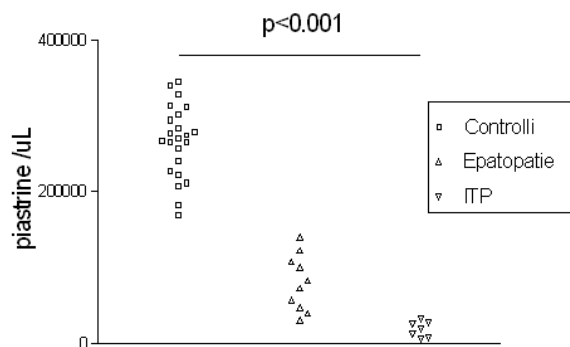


Figura 1b
Conta piastrinica in controlli, epatopatie e trombocitopenia idiopatica (ITP)

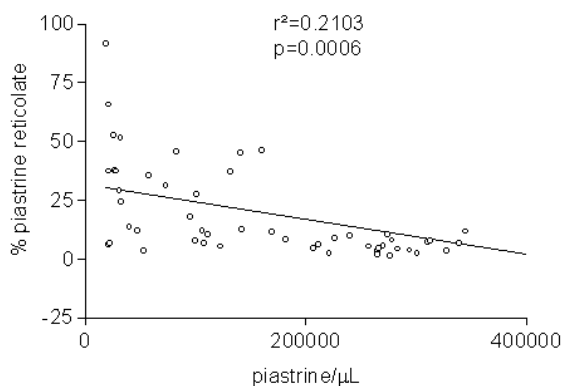


Figura 2
Correlazione tra percentuale di piastrine reticolate e numero totale di piastrine circolanti

zienti nella conta reticolocitaria sia in valore assoluto che in valore percentuale.

E' stata anche osservata una correlazione statisticamente significativa tra MPV e percentuale di piastrine reticolate ($p < 0.0001$) nel gruppo totale dei soggetti studiati (Fig 3).

I pazienti in aplasia midollare a seguito di chemioterapia presentano un valore di piastrine reticolate simile a quello dei controlli normali; tuttavia i dati non sono omogenei, è possibile che alcuni pazienti fossero già in fase di ripresa. Dopo circa 10 giorni è presente un significativo aumento delle piastrine reticolate, concomitante a una risalita della conta piastrinica e dei leucociti neutrofili (Fig. 4).

DISCUSSIONE

La misura delle piastrine reticolate è un metodo relativamente semplice e non invasivo che può essere impiegato per valutare il turnover piastrinico e la trombopoiesi. Le condizioni cliniche nelle quali può essere applicato sono quelle caratterizzate da aumentata distruzione o ridotta produzione midollare nei vari tipi di piastrinopenia. Analogamente ai reticolociti, le piastrine reticolate sono le più giovani piastrine in circolo e riflettono l'attività trombopoietica midollare. I meccanismi patogenetici delle trombocitopenie, com'è noto, sono legati alla presenza di un midollo arigenerativo o sostituito oppure ad un meccanismo periferico su base autoimmune o di consumo. In quest'ultimo caso il midollo è attivamente rigenerante, come appare documentato da un midollo ricco di megacariociti. Questo principio trova una conferma nei nostri dati, dove i pazienti affetti da ITP, con trombocitopenia da distruzione periferica, mostrano un elevato valore di piastrine reticolate, dato al quale corrisponde un'abbondante quantità di megacariociti nello striscio midollare. Aumento delle piastrine reticolate si osserva sia in due pazienti con LES, nei quali la trombocitopenia riconosce un meccanismo su base autoimmune, sia in altri due pazienti nei quali vi è un consumo periferico di piastrine con meccanismi non immunitari; uno di questi con coagulazione intravascolare disseminata e l'altro con porpora trombotica trombocitopenica.

Un'ulteriore conferma del significato del test è stata l'osservazione di pazienti ematologici in cui la chemioterapia ha indotto un'aplasia midollare, con conseguente piastrinopenia arigenerativa. Essi sono stati studiati in due fasi: durante la massima trombocitopenia e in fase di rigenerazione midollare. Nel primo caso, come prevedibile, la percentuale delle piastrine reticolate rimane bassa con valori praticamente sovrapponibili ai controlli, mentre nella seconda fase essa aumenta significativamente.

Significativo è anche il confronto tra la percentuale delle piastrine reticolate ed il volume corpuscolare piastrinico medio (MPV), considerato un indice indiretto di rigenerazione midollare. E' infatti noto che le piastrine giovani appena immesse in circolo dal midollo (che dovrebbero corrispondere quindi alle piastrine reticolate) sono più grandi della media e tendono a ridursi di volume nel corso

della loro vita. Fra i due indici abbiamo osservato una correlazione statisticamente significativa. Secondo alcuni la valutazione di MPV potrebbe essere un semplice parametro per predire il recupero della trombopoiesi (10). Tuttavia in base ad altri dati (11) la percentuale di piastrine reticolate appare essere un indice più affidabile dell'MPV per predire la rigenerazione del midollo osseo. La variazione di fluorescenza potrebbe essere difficile da interpretare in patologie con modifiche del volume piastrinico (es. macrotrombocitopenia ereditaria o sindrome mielodisplastica) (9).

Il metodo richiede sempre un'attenta valutazione e una certa cautela: il TO può marcare anche i granuli densi e il DNA mitocondriale (8,11), e questo implica importanti problemi di standardizzazione che possono essere controllati con tappe di degranulazione TRAP-indotta e con significativa riduzione del segnale fluorescente dopo ribonucleasi (8,9).

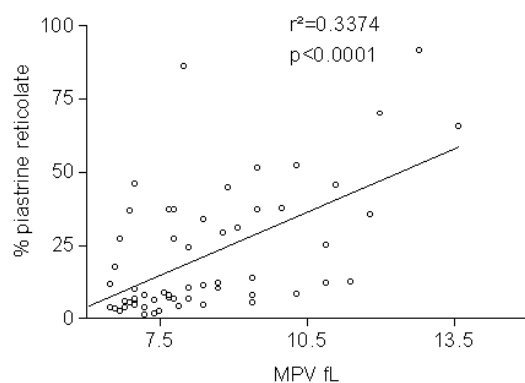


Figura 3
Correlazione tra percentuale di piastrine reticolate e volume piastrinico medio (MPV)

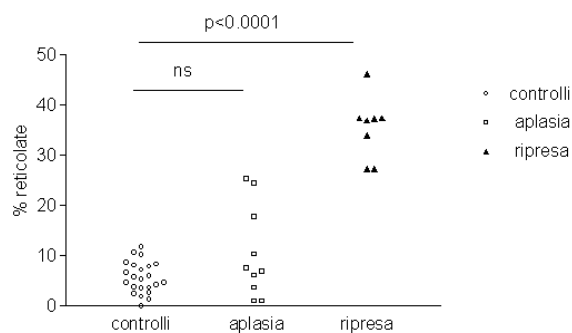


Figura 4
Aumento della percentuale di piastrine reticolate nei pazienti in ripresa dopo chemioterapia

La metodica delle piastrine reticolate, in base ai nostri risultati ha dato valori in sostanziale accordo con la diagnosi clinica e con il meccanismo patogenetico della piastrinopenia. Infatti, i pazienti con ITP, come già segnalato da altri, hanno dimostrato valori elevatissimi di piastrine reticolate; in pazienti epatopatici, dove è ipotizzabile un meccanismo periferico di distruzione legato all'ipersplenismo, la percentuale di piastrine reticolate è stata significativamente più elevata ma con un notevole grado di disomogeneità. In questo caso quindi i risultati ottenuti sono più incerti e sarebbe necessaria una migliore selezione della casistica. Nei pazienti ematologici infine abbiamo potuto monitorare la fase aplastica e la ripresa midollare.

In definitiva ci sembra di poter concludere che nonostante i limiti metodologici questa valutazione meriti di essere utilizzata nelle piastrinopenie, e che si possa ipotizzare che in futuro tale indice diventi parte del referto ematologico routinario.

BIBLIOGRAFIA

1. Ault KA, Knowles C. In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. *Exp Hematol* 1995;23:996-1001
2. Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* 1990; 75:116-21.
3. Rinder HM, Munz UJ, Ault KA, Bonan JL, Smith BR. Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:606-10.
4. Richards EM, Baglin TP. Quantitation of reticulated platelets: methodology and clinical application. *Br J Haematol* 1995;91:445-51.
5. Watanabe K, Takeuchi K, Kawai Y, Ikeda Y, Kubota F et al. Automated measurement of reticulated platelets in estimating thrombopoiesis. *Eur J Haematol* 1995;54:163-71.
6. Rinder MH, Schuster JE, Rinder CS, Wang C, Schweider HJ, et al. Correlation of thrombosis with increased platelet turnover in thrombocytosis. *Blood* 1998; 91:1298-1294
7. Lee LG, Chen CH, Chiu LA. Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry* 1986;7:508-17.
8. Robinson MSC, Mackie J, Khair K, Liesner R, Goodall AH et al. Flow cytometric analysis of reticulated platelets: evidence for a large proportion of non-specific labelling of dense granules by fluorescent dyes. *Br J Haematol* 1998;100: 351-357
9. Matic GB, Chapman ES, Zaiss M, Rothe G, Schmitz G. Whole blood analysis of reticulated platelets: improvements of detection and assay stability. *Cytometry*. 1998;34 :229-34.
10. Balduini CL, Noris P, Spedini P, Belletti S, Zambelli A et al. Relationship between size and thiazole orange fluorescence of platelets in patients undergoing high-dose chemotherapy. *Br J Haematol* 1999; 106 : 202-207
11. Macchi I, Chamlian V, Sadoun A, La Dirach A, Giulhot J et al. Comparison of reticulated platelet count and mean platelet volume determination in the evaluation of bone marrow recovery after aplastic chemotherapy. *Eur J Haematol* 2002; 69: 152-157
12. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87: 4925-4936.