

Artikelen

Flowcytometrische detectie van micropartikels

R. NIEUWLAND en A. STURK

Micropartikels zijn kleine membraanblaasjes, die worden afgesnoerd van cellen gedurende celactivatie of apoptose. Uit *in vitro* studies is bekend dat micropartikels gedurende celactivatie kunnen worden afgesnoerd van trombocyten, erythrocyten, monocyt en endotheelcellen. Het best bestudeerd zijn micropartikels die worden afgesnoerd van trombocyten en worden gekenmerkt door een hoge expressie van fosfatidylserine. Dit is een negatief geladen fosfolipide dat niet of nauwelijks aanwezig is op het oppervlak van rustende cellen. De expressie van fosfatidylserine is een voorwaarde voor het binden van stollingsfactoren en daarmee het katalyseren van de bloedstolling. Verhoogde concentraties van micropartikels, afkomstig van trombocyten, worden aangetroffen in de bloedsomloop van patiënten met diverse ziekten met een verhoogde kans op trombose, hetgeen suggereert dat ook *in vivo* gevormde micropartikels een rol spelen bij de bloedstolling. Het huidige artikel geeft een kort overzicht van de tot nu toe aanwezige kennis over micropartikels en demonstreert dat flowcytometrie, een techniek die nu veelal wordt toegepast bij onderzoek naar de expressie van oppervlakte antigenen op cellen, ook gebruikt kan worden om de aanwezigheid, de cellulaire herkomst en de antigene samenstelling van micropartikels in het bloed te onderzoeken. Tenslotte wordt aangetoond dat de stollingsbevorderende activiteit van *in vivo* gegeneerde micropartikels *in vitro* kan worden bestudeerd.

Trefwoorden: trombocyten; flowcytometrie; micropartikels; trombinegeneratietest

In vitro gegeneerde micropartikels

Algemeen

De celmembraan die eukaryote cellen omgeeft bestaat voor een belangrijk deel uit fosfolipiden. De in het membraan aanwezige fosfolipiden zijn asymme-

trisch verdeeld. Voor erythrocyten bijvoorbeeld geldt dat de buitenlaag van de fosfolipiden-bilaag vrijwel uitsluitend bestaat uit de neutrale fosfolipiden fosfatidylcholine (65-75% van het totaal in de celmembraan aanwezige fosfatidylcholine) en sfingomyeline (>85% van het totaal). De binnenlaag daarentegen bestaat voor een groot deel uit geladen fosfolipiden, zoals het fosfatidylserine ([PS] >96% van het totaal) en fosfatidylethanolamine ([PE] 80-85% van het totaal). Ook fosfatidylinositol en fosfatidezuur zijn (vrijwel) uitsluitend gelokaliseerd in deze 'inner leaflet'. Voor andere eukaryote cellen geldt waarschijnlijk eenzelfde verdeling (1). Erythrocyten en waarschijnlijk ook andere cellen beschikken over tenminste twee mechanismen om deze asymmetrische verdeling van fosfolipiden in stand te houden. Ten eerste is er een specifieke interactie tussen de zich in het 'inner leaflet' bevindende aminofosfolipiden en membraan- of cytoskelet eiwitten als het spectrine en het 'band 4.1' eiwit. Ten tweede beschikt de erythrocyt over een aminofosfolipide translocase, een eiwit dat specifiek aminofosfolipiden transporteert van het 'outer leaflet' naar het 'inner leaflet'. Dit transport is nodig omdat er continu een klein deel van de aminofosfolipiden spontaan naar het 'outer leaflet' verspringen. Dit aminofosfolipide translocase is stereo-specifiek en transporteert uitsluitend de L-isomeren van PS en PE, is ATP-afhankelijk en wordt geremd door hoge calcium concentraties in het cytosol (2). Voor trombocyten is het bestaan van een dergelijk aminofosfolipide translocase ook aangetoond (3). Diverse cellen, zoals trombocyten en erythrocyten, zijn in staat om kleine stukjes van de celmembraan af te snoeren tijdens of na stimulatie. Het verhogen van de cytosolaire concentratie calcium-ionen lijkt hierbij een voorwaarde te zijn, omdat dan het aminofosfolipide translocase wordt geremd en calpaïne (cytosolair calcium-afhankelijk protease) wordt gestimuleerd. Deze verbreken de verbinding tussen de aminofosfolipiden en de membraan- en cytoskelet eiwitten. In de volgende paragrafen zal hierop in meer detail worden ingegaan. Allereerst zullen micropartikels afkomstig van trombocyten uitgebreid worden besproken, omdat hieraan de laatste jaren relatief veel onderzoek is verricht.

Micropartikels van trombocyten

Trombocyten die *in vitro* worden gestimuleerd met de calcium ionofoor A23187, collageen en trombine, het

Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis Leiden

Correspondentie: Dr. R. Nieuwland, Academisch Ziekenhuis Leiden, Afdeling Klinische Chemie (CKCL), Postbus 9600, 2300 RC Leiden.

Januari 1997 gepresenteerd als projectvoorstel in het kader van de Werkgemeenschap Klinische Chemie.

complement C5b-9 complex of het *Staphylococcus aureus* α -toxine, snoeren micropartikels af. Ook door contact tussen bloed en (lichaamsvreemde) kunststoffen en onder hoge shear stress worden micropartikels afgesnoerd (4-6). Deze micropartikels zijn ongeveer 0,1-0,2 μm groot en worden omsloten door een membraan met de reguliere fosfolipide-bilaag structuur, afkomstig van de celmembraan gezien de aanwezigheid van de glycoproteïnen Ib, IIb, IIIa en eiwitten van het cytoskelet als filamine, taline en 'myosin heavy chain' (7,8). Het afsnoeren van micropartikels loopt parallel aan het op het membraanoppervlak verschijnen van PS en het verliezen van de membraan asymmetrie is dan ook een voorwaarde voor het afsnoeren van micropartikels (9). Ook de afgesnoerde micropartikels zelf exposeren PS (10). De eerder genoemde stimuli verhogen de cytosolaire calcium concentratie (8,10,11). Hierdoor wordt het aminofosfolipide translocase geremd en wordt het intracellulaire calpaïne gestimuleerd (9,12). Het remmen van het translocase leidt tot een verlies van membraan asymmetrie en dit is een voorwaarde voor het kunnen afsnoeren van micropartikels, alhoewel een verlies aan asymmetrie alleen onvoldoende is (12). Stimulatie van calpaïnes leidt tot proteolyse van membraan- en/of cytoskelet eiwitten, waardoor de membraan flexibiliteit wordt vergroot (12).

Het glycoproteïne (GP) IIb/IIIa-complex speelt een belangrijke rol bij het afsnoeren van micropartikels. Dit complex is een receptor voor diverse adhesieve eiwitten, zoals fibrinogeen en von Willebrand Factor, en is aanwezig in de celmembraan, het open canaliculaire systeem (instulpingen van de celmembraan die als een kanalensysteem door de trombocyt lopen) en de α -granula. Trombocyten die *in vitro* worden gestimuleerd met ADP, collageen of trombine, snoeren geen micropartikels af als het GPIIb/IIIa-complex wordt gebonden door liganden als het tetrapeptide Arg-Gly-Asp-Ser of monoclonale antistoffen (13). Trombocyten afkomstig van Glanzmann patiënten, die deficiënt zijn voor het GPIIb/IIIa, blijken niet in staat micropartikels af te snoeren na stimulatie *in vitro* (13). Dit impliceert dat binding van fibrinogeen aan het GPIIb/IIIa-complex mogelijk een voorwaarde is voor het afsnoeren van micropartikels.

Naast de betrokkenheid van intracellulaire enzymen als calpaïne bij het afsnoeringsproces zijn er aanwijzingen dat ook kinasen en fosfatasen hierbij een rol spelen. Voorbehandeling van trombocyten met vanaadaat, een remmer van fosfatasen, bevordert het ontstaan van micropartikels na stimulatie met het complement C5b-9-complex. Minder micropartikels worden daarentegen afgesnoerd als kinasen worden geremd door sfingosine, staurosporine of ML-7 (een remmer van het 'myosin light chain kinase') (14). Staurosporine, een remmer van proteïne kinase C, remt het ontstaan van micropartikels onder invloed van een relatief hoge shear stress (6). Onder hoge shear stress wordt de micropartikelvorming ook geremd door een anti-lichaam gericht tegen von Willebrand Factor, waardoor het binden van von Willebrand Factor aan glycoproteïne Ib wordt voorkomen, en door calpaïne-remmers.

Het zal duidelijk zijn uit dit overzicht dat zelfs de kennis omtrent het ontstaan van micropartikels *in vitro* fragmentarisch is. Desalniettemin lijkt de verhoging van de cytosolaire calciumconcentratie een centrale rol te spelen. Alle agonisten die in staat zijn micropartikelvorming te induceren, verhogen de cytosolaire calciumconcentratie. Het binden van von Willebrand Factor aan GPIb is een voorwaarde voor calcium influx (15) en het GPIIb/IIIa-complex wordt verondersteld o.a. een calcium kanaal te zijn dat influx van calcium mogelijk maakt (16). Tenslotte is de enzymatische activiteit van zowel calpaïnen als van diverse kinasen afhankelijk van de calcium concentratie.

Onderzoek naar structuur en functie van in vitro gegenereerde micropartikels van trombocyten

De samenstelling van de micropartikel membraan verschilt van die van de celmembraan. De afgesnoerde micropartikels hebben een 'random' verdeling van de fosfolipiden in de bilaag, terwijl het restant van de trombocyt nog steeds beschikt over een gedeeltelijk asymmetrische membraan (9). De micropartikels hebben dus een relatief hoge expressie van PS en PE.

Micropartikels hebben niet alleen eiwitten in hun membraan die ook voorkomen op het celmembraan van niet-geactiveerde trombocyten, zoals GPIb en het GPIIb/IIIa-complex, maar ook P-selectine (17). Het P-selectine komt voor als transmembraaneiwit van de intracellulaire α -granula. Dit eiwit is niet of nauwelijks aanwezig op niet-geactiveerde trombocyten. Als de trombocyten bij het activeringsproces de inhoud van de granula secreteren, dan versmelt de granulaire membraan met de celmembraan en komt P-selectine hierop tot expressie (18,19). Eenzelfde mechanisme geldt uiteraard ook voor andere transmembraan eiwitten van α -granula en lysosomen. Gezien de aanwezigheid van P-selectine op micropartikels moet de secretie dus hebben plaatsgevonden voordat de micropartikels worden afgesnoerd. Deze resultaten worden bevestigd door de waarneming dat trombocyten volledig secreteren en aggregeren binnen twee minuten, terwijl het tenminste 5 minuten duurt voordat de volledige procoagulante activiteit van de trombocyt, dus PS en PE expositie, tot expressie wordt gebracht (8). De aanwezigheid van P-selectine op de gestimuleerde trombocyten is van belang voor de binding aan endothelcellen en monocyten (20-22). Of hetzelfde geldt voor micropartikels is, voor zover ons bekend, nog niet onderzocht.

Bij de bloedstollingscascade worden twee belangrijke complexen van stollingsfactoren gevormd, het tenase- en het protrombinase-complex. Het tenase complex, bestaande uit de factoren VIIIa en IXa, zet factor X om in Xa. Factor Xa vormt samen met factor Va, in aanwezigheid van Ca^{2+} -ionen, het protrombinase complex, dat protrombine (factor II) omzet in trombine (factor IIa). Relatief veel is bekend over de procoagulante eigenschappen die *in vitro* gegenereerde micropartikels bezitten. Het ontstaan van tenase- en protrombinase complexen wordt gekatalyseerd in aanwezigheid van membranen die aminofosfolipiden bevatten, met name PS. Micropartikels bevorderen

dus het ontstaan van deze complexen. De micropartikels hebben een verhoogd aantal hoge affiniteitsreceptoren voor VIIIa (23) en IXa (24) en vormen een membraan-gebonden tenase activiteit (25,26). Micropartikels bezitten ook 1.000- tot 10.000 keer meer receptoren voor factor Va dan geactiveerde trombocyten (7) en bezitten protrombinase activiteit (7,26). Tenslotte is *in vitro* ook onderzoek verricht naar de mogelijke functie van micropartikels. Onder hoge shear stress worden micropartikels afgesnoerd die adhereren aan het subendotheel (6,27) en associëren met of aan fibrine, waarbij de micropartikels lokaal procoagulant zijn (19). Micropartikels hebben echter ook anticoagulante eigenschappen. De inactivatie van factor Va door geactiveerd proteïne C vindt versneld plaats in aanwezigheid van micropartikels (28).

Micropartikels van andere cellen

Na stimulatie *in vitro* met A23187 snoeren erythrocyten tenminste twee verschillende soorten partikels af: micropartikels en 'nanovesicles' (29). De micropartikels zijn 0.15-0.2 μm groot, terwijl de nanopartikels slechts 60 nm groot zijn. De laatstgenoemde partikels zijn niet alleen kleiner, maar verschillen ook in fosfolipiden- en eiwitsamenstelling van de micropartikels. De nanopartikels bevatten hoofdzakelijk de eiwitten 4.5 (60 kDa) en 8 (26 kDa), die beide nauwelijks voorkomen in de micropartikels. Op hun beurt bezitten de micropartikels géén spectrine en actine, twee eiwitten die gebonden voorkomen aan de celmembraan van intacte erythrocyten.

Zowel rustende als met endotoxine gestimuleerde monocytten snoeren micropartikels af *in vitro* (30). Deze partikels, die in grootte variëren tussen de 0.5 μm en 3.0 μm , worden versneld afgesnoerd onder invloed van endotoxine, terwijl tegelijkertijd de protrombinase activiteit toeneemt. Meer recent werd aangetoond dat de PS-afhankelijke protrombinase activiteit zich niet bevindt op de (gestimuleerde) monocytten, maar op de afgesnoerde micropartikels. Ook weefsel-factor bleek zich met name op de micropartikels te bevinden (31).

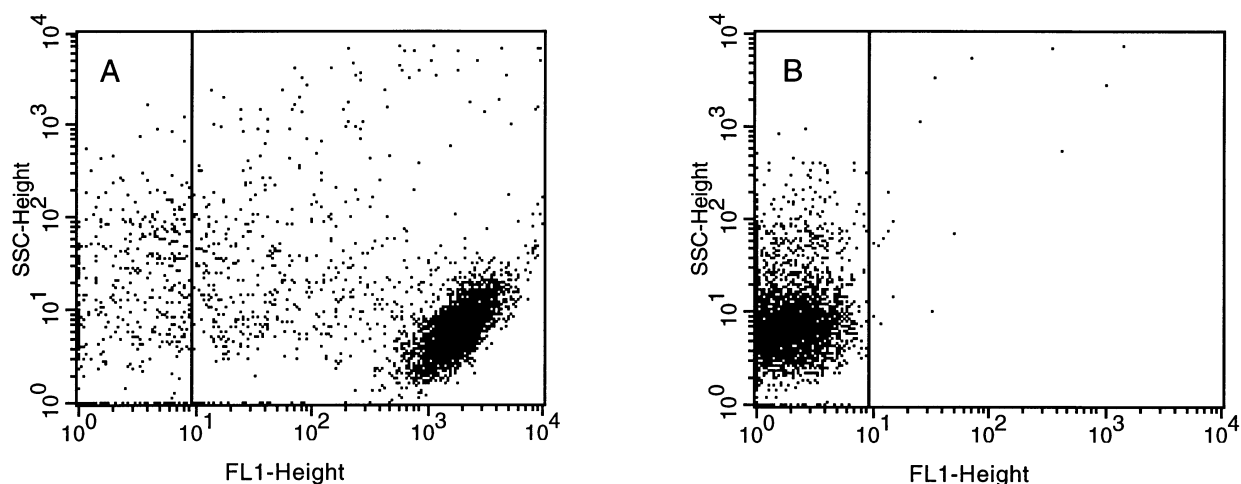
Stimulatie van *in vitro* gekweekte endotheelcellen met het C5b-9 complex leidt tot het afsnoeren van micropartikels (32). Deze zijn kleiner dan 0.1 μm , hebben bindingsplaatsen voor factor Va en bezitten protrombinase activiteit.

In vivo gegenereerde micropartikels

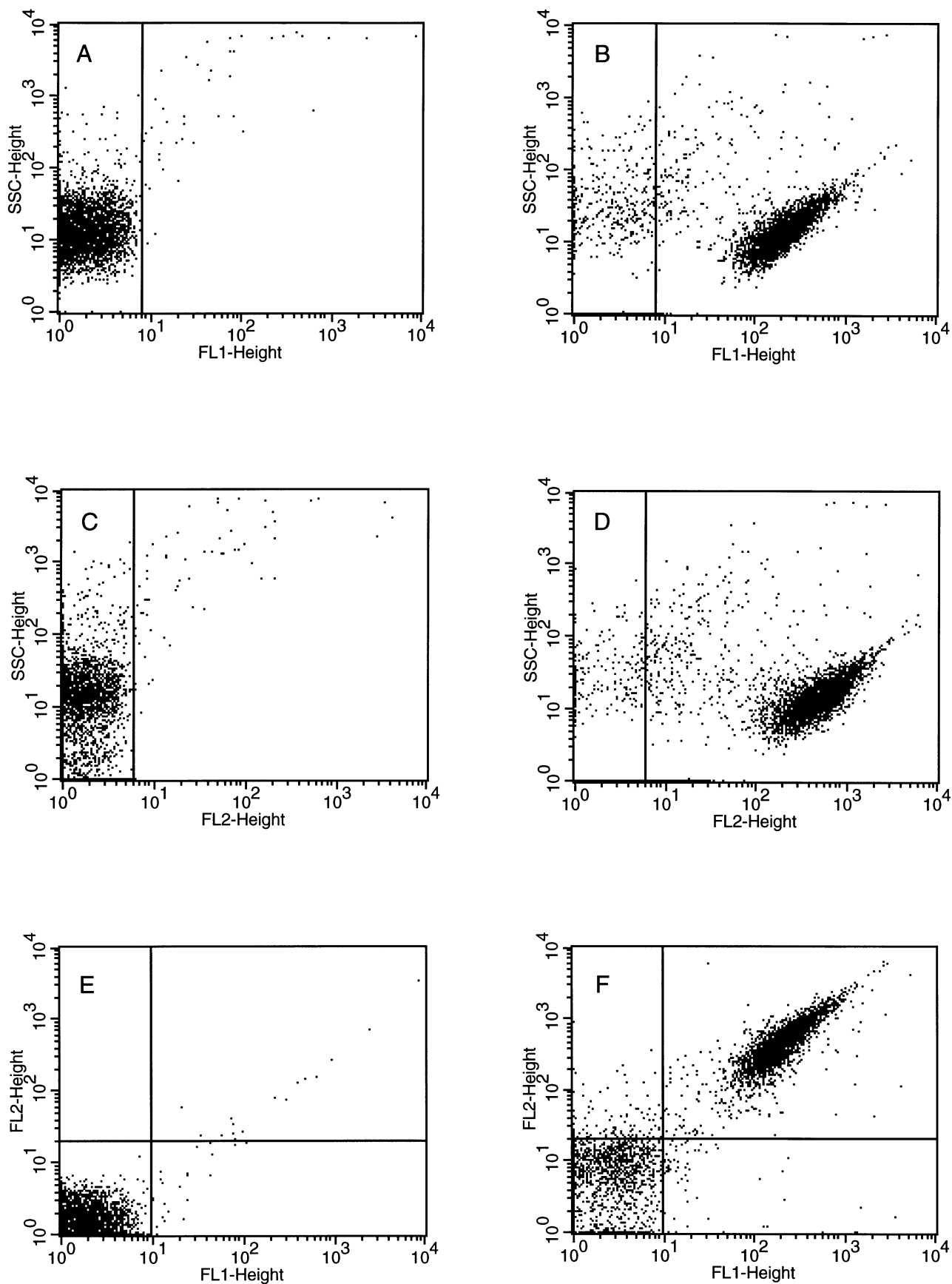
Uit tal van studies is inmiddels duidelijk geworden dat micropartikels, afkomstig van trombocyten, in verhoogde aantallen circuleren bij patiënten die lijden aan idiopathische trombocytopenie (33), diffuse intravasale stolling (34), verhoogde stollings- en fibrinolyse activiteit (35), angina pectoris, myocardinfarct of herseninfarct en 'transient ischemic attacks' (36-39), uremie (40), heparine-geïnduceerde trombocytopenie (41,42) en diabetes (43), maar ook na plasmaferese (44) en ballon katheterisatie (45). Bij al deze ziektebeelden worden trombocyten geactiveerd en is er een verhoogde kans op trombose. Er is dus een sterke correlatie tussen activatie van trombocyten, het in verhoogde mate voorkomen van micropartikels en de kans op trombose. Deze correlatie wordt bevestigd door patiënten die lijden aan het Scott syndroom en die een verhoogde bloedingsneiging hebben. Ten opzichte van trombocyten en erythrocyten van gezonde donoren zijn de cellen van deze patiënten verminderd in staat om na stimulatie PS te transloceren naar het 'outer leaflet' van de celmembraan, worden er minder micropartikels afgesnoerd en zijn de tenase- en protrombinase activiteit sterk gereduceerd (46-49).

Nadere studie aan *in vitro* en *ex vivo* gegenereerde micropartikels

In 1986 toonden George en medewerkers aan dat plasma, afkomstig van patiënten die een openhartoperatie ondergaan, verhoogde aantallen micropartikels bevat die afkomstig zijn van trombocyten (50). Bij deze techniek werd gebruik gemaakt van cel-specifieke monoclonale antistoffen, die met [^{125}I] waren gelabeld. Enige jaren later, in 1990, bevestigden Abrams en medewerkers deze bevinding met behulp van flowcytometrie (51). Ook bij deze techniek werd



Figuur 1. Expressie van fosfatidylserine op *in vitro* gegenereerde micropartikels. Micropartikels, geïsoleerd uit plasma afkomstig van met calcium ionofoor A23187-gestimuleerd bloed (2,5 μM fc) zijn geïncubeerd met (A) en zonder (B) FITC-gelabeld annexine V. Deze monsters zijn geanalyseerd met behulp van flowcytometrie. De FL1-fluorescentie is een maat voor de annexine V-FITC fluorescentie en daarmee de expressie van PS.



Figuur 2. Dubbelkleuring van in vitro gegenereerde micropartikels met annexine V-PE en anti-CD61-FITC. Micropartikels, afkomstig uit met A23187-gestimuleerd bloed ($2,5 \mu\text{M}$ fc), geïsoleerd uit plasma, werden geïncubeerd met een controle antistof (IgG1-FITC; figuur 2A), met anti-CD61-FITC (figuur 2B), zonder (figuur 2C) of met annexine V-PE (figuur 2D), zonder toevoegingen (figuur 2E) of met zowel anti-CD61-FITC als annexine V-PE (figuur 2F). De monsters zijn geanalyseerd met flowcytometrie. De micropartikels in het rechterboven kwadrant in figuur 2F zijn positief voor zowel CD61 als annexine V.

gebruik gemaakt van antistoffen, waaraan ditmaal geen radioactieve- maar een fluorescerende merker was bevestigd. Tegenwoordig wordt vrijwel uitsluitend gebruik gemaakt van flowcytometrie om de aanwezigheid van micropartikels vast te stellen. In alle eerder genoemde (*ex vivo*) studies (33-45) werd gebruik gemaakt van flowcytometrie.

Isolatie van in vitro ontstane micropartikels en aantonen van expressie van fosfatidylserine met behulp van flowcytometrie

Micropartikels kunnen *in vitro* worden gegenereerd door heel bloed te stimuleren met de calcium ionofoor A23187. Deze micropartikels zijn afkomstig van diverse celtypen, zoals trombocyten en erythrocyten en kunnen worden geïsoleerd door differentiële centrifugatie (52). Als de micropartikels worden opgenomen in een buffer die Ca^{2+} -ionen bevat, kan (FITC- of PE-gelabeld) annexine V binden aan PS. Annexine V is een eiwit dat met hoge specificiteit bindt aan negatief geladen aminofosfolipiden, met name PS (53,54). De binding van gelabeld annexine V aan micropartikels kan worden geanalyseerd met flowcytometrie. Figuur 1A laat zien dat micropartikels in aanwezigheid van annexine V-FITC een sterke FL-1 (FITC) fluorescentie laten zien, hetgeen een maat is voor de binding van annexine V aan de micropartikels en dus voor de expressie van PS. In afwezigheid van annexine V-FITC wordt nauwelijks fluorescentie waargenomen (figuur 1B). Het annexine V-FITC signaal verdwijnt als de Ca^{2+} -ionen worden weggevangen door EDTA, hetgeen bevestigt dat de binding van annexine V aan micropartikels inderdaad Ca^{2+} -afhankelijk is (niet getoond).

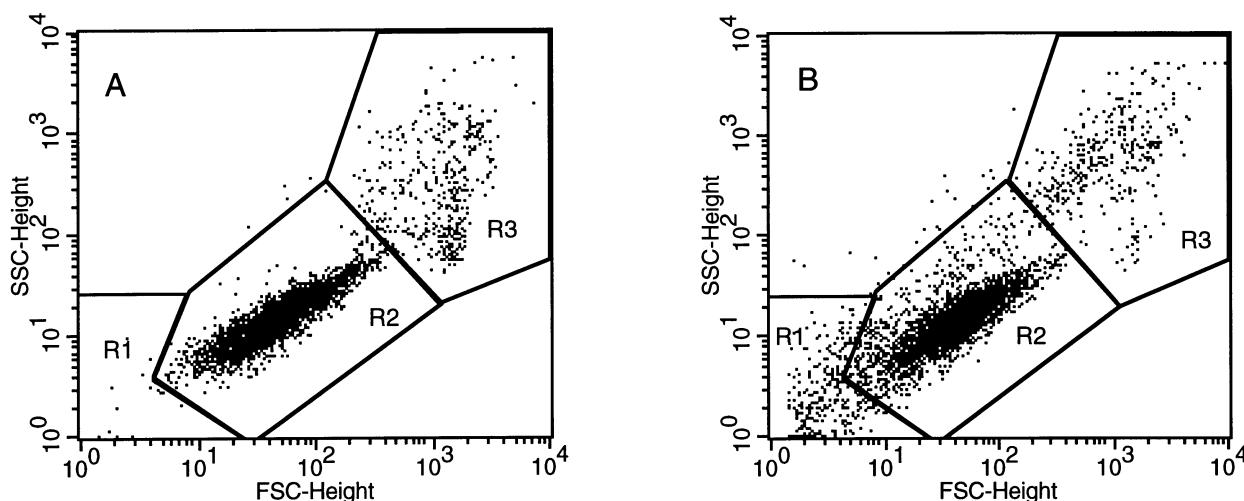
Identificatie van in vitro gegenereerde micropartikels met behulp van flowcytometrie

Flowcytometrie is een techniek die bij uitstek geschikt is om de cellulaire herkomst van de micropartikels vast te stellen, waarbij gebruik wordt gemaakt van

dubbellabeling. Een voorbeeld hiervan is weergegeven in figuur 2, waarin een representatieve dubbelkleuring wordt getoond van *in vitro* gegenereerde micropartikels. De figuren 2A en 2B laten een aankleuring zien van geïsoleerde micropartikels met een controle IgG1-FITC (2A) en FITC-gelabeld anti-CD61 (2B). CD61 is het GPIIIa, een onderdeel van het integrine complex GPIIb/IIIa dat uniek is voor trombocyten en megakaryocyten. De figuren 2C en 2D laten de fluorescentie zien van de micropartikels in afwezigheid (2C) en aanwezigheid (2D) van PE-gelabeld annexine V. Figuur 2E laat de controle zien zonder toevoegingen en figuur 2F tenslotte laat de aankleuring van micropartikels zien in aanwezigheid van zowel FITC-anti-CD61 als annexine V-PE. Hierbij kleurt ongeveer 80-90% van de micropartikels aan voor zowel annexine V als CD61, hetgeen impliceert dat deze micropartikels afkomstig zijn van trombocyten. In aanvullende experimenten bleek naar schatting 5% van de micropartikels afkomstig te zijn van erythrocyten.

Detectie van micropartikels in vol bloed

Eén van de klinische condities waarbij verhoogde aantallen van trombocyten afkomstige micropartikels zijn aangetoond, is tijdens openhartoperaties. Gedurende deze operaties wordt het bloed geactiveerd doordat het contact maakt met het extracorporele circuit, de hartlongmachine (55,56). Activatie treedt ook op doordat wondbloed in het operatieveld in contact komt met beschadigde weefsels en subendotheel (57,58). Dit bloed verzamelt zich tijdens de operatie in het hartzakje, ook wel pericard genoemd. Tijdens de operatie wordt dit bloed afgezogen, verzameld in een reservoir en teruggegeven aan de patiënt. Uit eerdere studies was reeds bekend dat tijdens hartoperaties een verhoogd aantal micropartikels kan worden aangetoond in de systemische circulatie (50,51). Om de aanwezigheid van trombocyten afkomstige micropartikels te bestuderen in systemisch en pericard



Figuur 3. Het voorkomen van micropartikels, afkomstig van trombocyten, tijdens hartoperaties. Representatieve dot plots van GPIIb-positieve micropartikels (R1), trombocyten (R2) en trombocyten aggregaten of complexen van trombocyten met leukocyten (R3). Voor dit voorbeeld werd bloed afgenomen bij een patiënt aan het eind van de openhartoperatie. De bloedmonsters werden tegelijkertijd afgenomen uit de bloedsomloop (A) en rechtstreeks uit het pericard (B). Uitgezet zijn de grootte (forward scatter; FSC) en dichtheid (sideward scatter; SSC). Het bloed werd met flowcytometrie geanalyseerd op de aanwezigheid van GPIIb-positieve deeltjes.

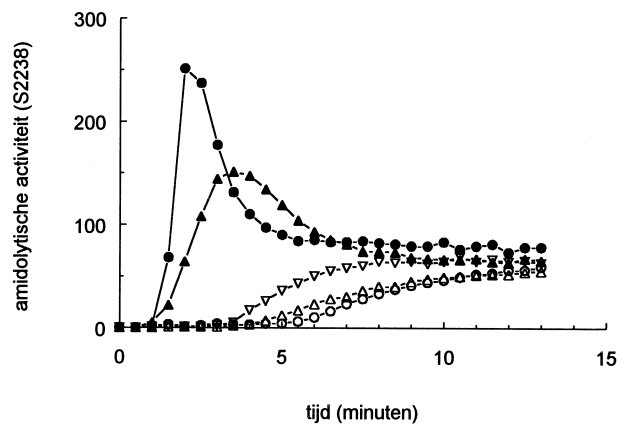
bloed, is bij 6 patiënten die een openhartoperatie ondergingen bloed afgenomen. Dit bloed werd opgewerkt zoals eerder beschreven (59). Bloedplaatjes en van bloedplaatjes afkomstige micropartikels werden aangekleurd met een PE-gelabelde antistof gericht tegen GPIb, een identificatie merker voor bloedplaatjes. Door te selecteren op PE-fluorescentie is het dus mogelijk om bloedplaatjes en van bloedplaatjes-afkomstige micropartikels te detecteren in vol bloed. Als vervolgens de 'side scatter' (SSC) wordt uitgezet tegen de 'forward scatter' (FSC), beide logaritmisch, dan kunnen 3 arbitrair ingestelde groepen (regio's) worden onderscheiden. Trombocyten bevinden zich in R2. Micropartikels, die aanzienlijk kleiner zijn, bevinden zich in R1. In R3 bevinden zich aggregaten van trombocyten en witte bloedcellen/trombocyten. Figuur 3 laat een tweetal representatieve dot plots zien van GPIb-positieve cellen en micropartikels in bloed dat werd afgenomen bij een patiënt aan het eind van de hartoperatie. Het bloed werd tegelijkertijd afgenomen uit een veneuze lijn (figuur 3A) en rechtstreeks uit het pericard (figuur 3B). Uit figuur 3 blijkt duidelijk dat het uit het pericard afkomstige bloed aanzienlijk meer GPIb-positieve micropartikels bevatte dan het systemische bloed. Deze *in vivo* ontstane micropartikels bonden in dezelfde mate annexine V als de *in vitro* ontstane micropartikels, maar de totale populatie ontstane micropartikels bleek niet alleen afkomstig te zijn van trombocyten, maar ook van erythrocyten en waarschijnlijk van monocytten.

Procoagulante eigenschappen van *in vivo* gegeneerde micropartikels

In een *in vitro* generatie test, waarbij het vermogen van (normaal) plasma wordt gemeten om trombine te genereren (60,61), bevorderden de *in vivo* micropartikels in sterke mate het ontstaan van trombine (figuur 4). Het ontstaan van trombine werd het sterkst gestimuleerd door pericard plasma en daaruit geïsoleerde micropartikels, hetgeen in overeenstemming is met de bevinding dat dit bloed de meeste micropartikels bevat. Onze resultaten tonen aan dat ook *in vivo* ontstane micropartikels waarschijnlijk een rol spelen bij de bloedstolling *in vivo*. Dit wordt bevestigd door recente experimenten van Taylor et al., die in een proefdiermodel lieten zien dat een lokale ontstekingsreactie kan leiden tot diffuse intravasale stolling na het infunderen van artificiële PS-bevattende vesikels (62). Overigens is de expressie van PS waarschijnlijk ook van belang voor de klaring van micropartikels. Uit *in vitro* studies is bekend dat erythrocyten die PS op hun oppervlak hebben, binden aan macrofagen en dat deze binding kan worden geremd door een overmaat PS-bevattende fosfolipide vesikels (2,63,64).

Conclusies

Het doel van dit artikel was tweeledig. In de eerste plaats is een beknopt overzicht gegeven omtrent de kennis van micropartikels. In de tweede plaats is aangetoond dat flowcytometrie kan worden gebruikt om micropartikels aan te tonen, om hun cellulair herkomst vast te stellen en om hun antigene samenstelling nader te onderzoeken. Ook hebben wij laten zien



Figuur 4. *In vivo* ontstane micropartikels hebben stollingsbevorderende activiteit *in vitro*. Deze figuur toont het vermogen van *in vivo* ontstane micropartikels om het ontstaan van trombine *in vitro* te bevorderen via de trombine generatie test. Hierbij werd gedefibrineerd normaal plasma gerecalcificeerd, waarbij na elke 30 seconden de hoeveelheid op dat moment aanwezige trombine activiteit werd gemeten door omzetting van het chromogene substraat S2238. Onder invloed van kaoline en artificiële PS-bevattende fosfolipide vesikels werd een maximale hoeveelheid trombine gevormd in normaal plasma (●). De controle (○) laat het ontstaan zien van trombine in gerecalcificeerd normaal plasma zonder verdere toevoegingen. In ditzelfde experiment werd een dertiende deel van het normaal plasma vervangen door gedehepariniseerd pericard plasma (▽). De micropartikels werden gepelleteerd door pericard plasma 1 uur bij kamertemperatuur te centrifugeren bij 13.000 x g. De pellet, bestaande uit micropartikels, werd geresuspendeerd in 1/8 deel van het oorspronkelijke plasma volume en hiervan werd een dertiende deel (=micropartikel rijk plasma) toegevoegd aan normaal plasma, hetgeen resulteerde in substantiële trombine generatie (▲). Als eenzelfde hoeveelheid van het 'supernatant' plasma (=micropartikel arm) werd toegevoegd aan normaal plasma, dan werd geen trombine gegeneerd (△).

dat micropartikels kunnen worden geïsoleerd en nader kunnen worden bestudeerd. De komende jaren zal aanvullend onderzoek worden verricht naar de farmacokinetiek, de structuur, de functie(s) *in vivo* en de klinische relevantie van het circuleren van verhoogde concentraties micropartikels.

Literatuur

- Zachowski A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* 1993; 294: 1-14.
- Schroitt AJ, Zwaal RFA. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1071: 313-329.
- Comfurius P, Williamson P, Smeets EF, Schlegel RA, Bevers EM, Zwaal RFA. Reconstitution of phospholipid scramblase activity from human blood platelets. *Biochemistry* 1996; 35: 7631-7634.
- Gemmell CH, Ramirez SM, Yeo EL, Sefton MV. Platelet activation in whole blood by artificial surfaces: Identification of platelet-derived microparticles and activated platelet binding to leukocytes as material-induced activation events. *J Lab Clin Med* 1995; 125: 276-287.
- Bode AP, Orton SM, Frye MJ, Udis BJ. Vesiculation of platelets during *in vitro* aging. *Blood* 1991; 77: 8887-8895.
- Miyazak Y, et al. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* 1996; 88: 3456-3464.

7. Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem* 1988; 263: 18205-18212.
8. Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM. Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1180: 1-8.
9. Comfurius P, Senden JMG, Tilly RHJ, Schroit AJ, Bevers EM, Zwaal RFA. Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelet and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1026: 153-160.
10. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RFA. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta* 1983; 736: 57-66.
11. Arvand M, Bhakdi S, Dahlback B, Preissner KT. Staphylococcus aureus alpha-toxin attack on human platelet promotes assembly of the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 1990; 265: 14377-14381.
12. Dachary-Prigent J, Pasquet JM, Freyssinet JM, Nurden AT. Calcium involvement in aminophospholipid exposure and microparticle formation during platelet activation: a study using Ca^{2+} -ATPase inhibitors. *Biochemistry* 1995; 34: 11625-11634.
13. Gemmell CH, Sefton MV, Yeo EL. Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect. *J Biol Chem* 1993; 268: 14586-14589.
14. Wiedmer T, Sims PJ. Participation of protein kinases in complement C5b-9-induced shedding of platelet plasma membrane vesicles. *Blood* 1991; 78: 2880-2886.
15. Ruggeri ZM. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb Haemostas* 1993; 70: 119-123.
16. Powling MJ, Hardisty RM. Glycoprotein IIb/IIIa complex and Ca^{2+} -influx into stimulated platelets. *Blood* 1985; 66: 731-734.
17. Gemmell CH, Yeo EC. Stability, lack of aggregability and non-adhesive nature of platelet-derived microparticles. [Abstract] *Thromb Haemostas* 1995; 73: 1356.
18. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, Valeri CR. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11877-11882.
19. Siljander P, Carpen O, Lassila R. Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis. *Blood* 1996; 87: 4651-4663.
20. Maugeri N, Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G, Martelli N, Piccardoni P, de Gaetano G, Cerletti C. Polymorphonuclear leukocyte-platelet interaction: role of P-selectin in thromboxane B2 and leukotriene C4 cooperative synthesis. *Thromb Haemostas* 1994; 72: 450-456.
21. Furie B, Furie BC. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemostas* 1995; 74: 224-227.
22. Cerletti C, Evangelista V, Molino M, de Gaetano G. Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes: role of cathepsin G and P-selectin. *Thromb Haemostas* 1995; 74: 218-223.
23. Gilbert GE, Sims PJ, Wiedmer T, Furie B, Furie BC, Shattil SJ. Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. *J Biol Chem* 1991; 266: 17261-17268.
24. Hoffman M, Monroe DM, Roberts HR. Coagulation factor IXa binding to activated platelets and platelet-derived microparticles: a flow cytometric study. *Thromb Haemostas* 1992; 68: 74-78.
25. Holme PA, Brosstad F, Solum NO. Platelet-derived microvesicles and activated platelets express factor Xa activity. *Blood Coag Fibrinol* 1995; 6: 302-310.
26. Rosing J, van Rijn JLML, Bevers EM, van Dieijen G, Comfurius P, Zwaal RFA. The role of activated human platelets in prothrombin and factor X activation. *Blood* 1985; 65: 319-332.
27. Owens MR, Holme S, Cardinali S. Platelet microvesicles adhere to subendothelium and promote adhesion of platelets. *Thromb Res* 1992; 66: 247-258.
28. Tans G, Rosing J, Christella M, Thomassen LGD, Reeb MJ, Zwaal RFA, Griffin JH. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. *Blood* 1991; 77: 2641-2648.
29. Allan D, Thomas P, Limbrick AR. The isolation and characterization of 60 nm vesicles ('nanovesicles') produced during ionophore A23187-induced budding of human erythrocytes. *Biochem J* 1980; 188: 881-887.
30. Robinson RA, Worfolk L, Tracy PB. Endotoxin enhances the expression of monocyte prothrombinase activity. *Blood* 1992; 79: 406-416.
31. Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwege V, Hedman H, Freyssinet JM. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharides. *J Immunol* 1994; 153: 3245-3255.
32. Hamilton KK, Hattori R, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 1990; 265: 3809-3814.
33. Jy W, Horsman LL, Arce M, Ahn YS. Platelet microparticles in ITP. *J Lab Clin Med* 1992; 119: 334-335.
34. Holme PA, Solum NO, Brosstad F. Clinical significance of platelet-derived microvesicles: demonstration of their presence in patients suffering from disseminated intravascular coagulation (DIC). [Abstract] *Thromb Haemostas* 1993; 69.
35. Holme PA, Solum NO, Brosstad F, Roger M, Abdelnoor M. Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting. *Thromb Haemostas* 1994; 62: 666-672.
36. Jy W, Horstman L, Wang F, et al. Platelet microparticle number and specific procoagulant activity are both elevated in thrombotic disorders. [Abstract] *Blood* 1994; 84: 10.
37. Katopodis JN, Kolodny L, Jy W, et al. Platelet microparticles in acute coronary ischemias. [Abstract] *Blood* 1994; 84: 10.
38. Lee YJ, Horstman LL, Janania J, Reyes Y, Kelley RE, Ahn YS. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thromb Res* 1996; 72: 295-304.
39. Yano Y, Kambayashi J, Kawasaki T, Sakon M. Quantitative determination of circulating platelet microparticles by flow cytometry. *Int J Cardiol* 1994; 47(Suppl.): S13-S19.
40. Nomura S, Shouzu A, Nishikawa M, Kokawa T, Yasunaga K. Significance of platelet-derived microparticles in uremia. *Nephron* 1993; 63: 485.
41. Warkentin ET, Hayward CPM, Boshkov LK, Santos AV, Sheppard JAI, Bode AP, Kelton JG. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 1994; 84: 3691-3699.
42. Warkentin ET. Heparin-induced thrombocytopenia: IgG-mediated platelet activation, platelet microparticle generation, and altered procoagulant/anticoagulant balance in the pathogenesis of thrombosis and venous limb gangrene complicating heparin-induced thrombocytopenia. *Transf Med Rev* 1996; X: 249-258.

43. Monura S, Komiyama Y, Miyake T, Miyazaki Y, Kido H, Suzuki M, Kagawa H, Yanabu M, Takahashi H, Fukuhara S. Amyloid- β protein precursor-rich platelet microparticles in thrombotic diseases. *Thromb Haemostas* 1994; 72: 519-522.
44. Wun T, Paglieroni T, Holland P. Prolonged circulation of activated platelets following plasmapheresis. *J Clin Apheresis* 1994; 91: 10-16.
45. Nasser TK, Wilensky RL, Mehdi K, March KL. Microparticle deposition in periarterial microvasculature and intramural dissections after porous balloon delivery into atherosclerotic vessels: quantitation and localization by confocal scanning laser microscopy. *Am Heart J* 1996; 131: 892-898.
46. Bevers EM, Wiedmer T, Comfurius P, Shattil SJ, Weiss HJ, Zwaal RFA, Sims PJ. Defective Ca^{2+} -induced microvesiculation and deficient expression of procoagulant activity in erythrocytes from a patient with a bleeding disorder: a study of the red blood cells of Scott syndrome. *Blood* 1992; 79: 380-388.
47. Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem* 1989; 264: 17049-17057.
48. Rosing J, Bevers EM, Comfurius P, Hemker HC, van Dieijen G, Weiss HJ, Zwaal RFA. Impaired factor X and prothrombin activation associated with decreased phospholipid exposure in platelets from a patient with a bleeding disorder. *Blood* 1985; 65: 1557-1561.
49. Toti F, Satta N, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM. Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood* 1996; 87: 1409-1415.
50. George JN, Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N, Newman PJ. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest* 1986; 78: 340-348.
51. Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood* 1990; 75: 128-138.
52. Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PGM, ten Have K, Eijnsman L, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation* 1997 (accepted).
53. Stuart MCA, Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RFA, Reutelingsperger CPM, Frederik PM. Ultrastructural detection of surface exposed phosphatidylserine on activated blood platelets. *Thromb Haemostas* 1994; 71: 1145-1151.
54. Klee CB. Ca^{2+} -dependent phospholipid- (and membrane-) binding proteins. *Biochemistry* 1988; 27: 6645-6652.
55. Edmunds LH Jr. Blood-surface interactions during cardiopulmonary bypass. *J Card Surg* 1993; 8: 404-410.
56. Woodman RC, Harker LA. Bleeding complications associated with cardiopulmonary bypass. *Blood* 1990; 76: 1680-1697.
57. Tabuchi N, Haan J de, Boonstra PW, Oeveren W van. Activation of fibrinolysis in the pericardial cavity during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106: 828-833.
58. Chung JH, Gikakis N, Rao K, Drak TA, Colman RW, Edmunds H Jr. Pericardial blood activates the extrinsic coagulation pathway during clinical cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1996; 93: 2014-2018.
59. Konijnenberg A, Stokkers EW, Post JAM van der, Schaap MCL, Boer K, Bleker OP, Sturk A. Extensive platelet activation in preeclampsia compared with normal pregnancy: enhanced expression of cell adhesion molecules. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 461-469.
60. Hemker HC, Beguin S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemostas* 1995; 74: 134-138.
61. Hemker HC, Willems GM, Beguin S. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *Thromb Haemostas* 1986; 56: 9-17.
62. Taylor RB, He SE Jr., Chang ACK, Box J, Ferrell G, Lee D, Lockhart M, Peer G, Esmon CT. Infusions of phospholipid vesicles amplifies the local thrombotic response to TNF and anti-protein C into a consumptive response. *Thromb Haemostas* 1996; 75: 578-584.
63. Connor J, Pak CC, Schroit AJ. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 2399-2404.
64. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Cambell PA, Henson PM. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992; 149: 4029-4035.

Summary

Flow cytometric detection of microparticles. Nieuwland R and Sturk A. Ned Tijdschr Klin Chem 1997; 22: 207-214.

Microparticles are small membrane vesicles which are budded from cells during stimulation or apoptosis. *In vitro*, trombocytes, erythrocytes, monocytes and endothelial cells release microparticles upon cell activation. Best known from these studies are the platelet-derived microparticles, which express high levels of phosphatidylserine on their surface. This is a negatively charged aminophospholipid, which is almost absent on the surface of resting cells. Its expression is a prerequisite for coagulation factors to bind to the membrane surface, thereby promoting blood coagulation. Elevated levels of microparticles from trombocytes are present in the circulation of patients suffering from a variety of diseases or illnesses with an increased risk for thrombosis, suggesting that also *in vivo* generated microparticles play a role in blood coagulation. The present article gives a brief overview of what is known about microparticles and shows in more detail that flow cytometry, a technique which is widely used to study the expression of surface antigens on cells, can also be employed to study the presence, origin and antigenic composition of microparticles in whole blood. Finally, it is demonstrated that the procoagulant activity of microparticles generated *in vivo* can be studied *in vitro*.

Key-words: platelets; flow cytometry; microparticles; procoagulant activity