

Matevž Škerget¹, Luka Strniša²

Delež aktiviranih trombocitov pri bolnikih z idiopatično trombocitopenično purpuro brez zdravljenja in bolnikih, zdravljenih s splenektomijo

Proportion of Activated Platelets in Untreated and Splenectomized Patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: purpura trombocitopenična idiopatska-zdravljenje, splenektomija, trombocitna aktivacija

Izhodišča. Idiopatična trombocitopenična purpura (ITP) je avtoimuna bolezen s posledično majhnim številom trombocitov v periferni krvi. Krvavitve so kljub trombocitopeniji redkejše, kot bi pričakovali. Zanimal nas je delež aktiviranih trombocitov pri bolnikih z ITP brez zdravljenja in pri bolnikih z ITP v remisiji bolezni po odstranitvi vranice.

Metode. Opazovali smo dve skupini bolnikov. V prvo smo vključili nezdravljene bolnike z ITP, v drugo pa bolnike v remisiji bolezni po odstranitvi vranice. Določili smo delež aktiviranih trombocitov za vsako skupino in ga primerjali s kontrolno skupino.

Rezultati. Pri nezdravljenih bolnikih z ITP smo ugotovili večji delež aktiviranih trombocitov kot pri kontrolni skupini ($p = 0,0042$). Pri skupini bolnikov z ITP v remisiji po splenektomiji nismo našli statistično pomembne razlike v deležu aktiviranih trombocitov.

Zaključki. Bolniki z ITP, ki niso v remisiji in so brez zdravljenja, imajo v krvi v višjem odstotku prisotne aktivirane trombocite kot zdrava populacija, s čimer lahko pojasnimo manjšo pojavnost krvavitev kljub trombocitopeniji. Bolniki z ITP v remisiji po odstranitvi vranice imajo v krvnem obtoku prisotne aktivirane trombocite v istem deležu kot zdrava populacija, kar kaže na pomembno vlogo vranice v patogenezi ITP.

ABSTRACT

KEY WORDS: purpura thrombocytopenic idiopathic-therapy, splenectomy, platelet activation

Background. Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is an autoimmune disorder of blood haemostasis with thrombocytopenia. The incidence of bleeding in ITP patients is lower than may be predicted on the basis of the platelet count. The proportion of activated platelets in patients with untreated ITP and in splenectomized ITP patients in remission was evaluated. Methods. Two groups of ITP patients were chosen. The first included untreated ITP patients and the second consisted of splenectomized ITP patients in remission. The proportion of activated platelets was determined for each group and compared with the control group.

Results. The untreated group had a significantly higher ($p = 0.0042$) proportion of activated platelets than the control group. The group of splenectomized patients in remission showed no significant difference in the proportion of activated platelets compared to the control group.

¹ Matevž Škerget, dr. med., Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana.

² Luka Strniša, Ellerjeva 39, 1000 Ljubljana.

Conclusions. ITP patients in remission and without therapy have a higher proportion of activated platelets than the healthy population, which could explain their low bleeding tendency. On the other hand, splenectomized ITP patients in remission have the same proportion of activated platelets in their blood as the healthy population and this emphasizes the primary importance of the spleen in ITP patients.

UVOD

Idiopatična trombocitopenična purpura (ITP) je avtoimuna bolezen s posledično majhnim številom trombocitov v periferni krvi (manj kot $140 \times 10^9/L$) in pomnoženim številom megakariocitov v kostnem mozgu (1). Za bolezen so značilna avtoprotitelesa, usmerjena zoper antigene na površini trombocitov (1–3). Za potrditev diagnoze je treba izključiti bolezni, ki povzročajo trombocitopenijo. Pojavnost ITP je 1 na 100.000 prebivalcev in v večini primerov poteka blago (1–4). Zdravimo jo samo pri znakih krvavitve ali pri izredno majhnih vrednostih trombocitov (manj kot $20 \times 10^9/L$ do $30 \times 10^9/L$) (5).

Adhezija trombocita in številni drugi dejavniki povzročajo njegovo aktivacijo. Ob tem se spremeni oblika trombocita in oblika nekaterih na celični membrani ležečih receptorjev. Iz znotrajceličnih zrn trombocita se izločijo citokini (6–8). Aktivirani trombociti imajo zato zelo izraženo sposobnost adhezije in agregacije (4). Selektin P je glikoprotein, ki se ob trombocitni aktivaciji sprosti iz α -zrn trombocitov in Weibel-Paladovega telesca endotelne celice. Pomemben je za adhezijo med trombociti, endotelnimi in vnetnimi celicami (9). GP IIb-IIIa je receptor za fibrinogen, ki pri neaktiviranih trombocitih ni sposoben vezave fibrinogena. Ob aktivaciji trombocita se GP IIb-IIIa konformacijsko spremeni in pridobi vezavno mesto za fibrinogen. V nadaljnjem besedilu bomo konformacijsko spremenjeni GP IIb-IIIa imenovali aktivirani GP IIb-IIIa. Vezava fibrinogena na aktivirani GP IIb-IIIa spremeni tudi konformacijsko stanje fibrinogena, nastane aktivirani fibrinogen (10–12). Aktivirani trombociti imajo v nasprotju z neaktiviranimi na svoji membrani izražen selektin P in vezan aktivirani fibrinogen. Oba proteina lahko uporabljamo kot imunološka označevalca za aktivirane trombocite (13–16). Delež aktiviranih trombocitov tako predstavlja delež trombocitov

v krvnem obtoku, ki na svojih celičnih membranah izražajo selektin P ali aktivirani fibrinogen.

Pri ITP prihaja do tvorbe avtoprotiteles. Ob vezavi avtoprotiteles na membranske antigene trombocitov pride pri bolnikih z ITP do pospešenega odstranjevanja trombocitov iz krvnega obtoka (1–3). Avtoprotitelesa se lahko vežejo tudi na megakariocite in tako dodatno zmanjšajo tvorbo trombocitov (17, 18). Vzroki za pojavljanje avtoprotiteles še niso pojasnjeni. Možen je neprimeren in iztirjen odgovor T-limfocitov pomagalk (Th-limfociti) na antigene, ki so prisotni na telesu lastnih trombocitih (19–21). Opisana je tudi morebitna povezava med ITP in okužbo s *Helicobacter pylori* (22–25) ter humanim T-limfotropnim virusom tipa I (HTLV-1) (26). Pri 40 % bolnikov z laboratorijskimi metodami ni možno zaznati protiteles proti trombocitom. V odstranjevanje trombocitov pri teh bolnikih je morda vključena celična imunost (27).

Odstranjevanje z avtoprotitelesi označenih trombocitov poteka v vranici (1, 2). Vranica tudi omogoča stik med trombociti, makrofagi, avtoreaktivnimi Th-limfociti in B-celicami limfocitne vrste. S tem vzdržuje in uravnava imunsko reaktivnost zoper trombocite. Tako vranica predstavlja osrednje mesto aktivacije avtoreaktivnih limfocitov T in B in tvorbe protiteles (28, 29). S splenektomijo odstranimo mesto fagocitoze trombocitov in osrednje mesto imunske reaktivnosti proti trombocitom. Pri bolnikih v remisiji po odstranitvi vranice so ugotovili z zdravo populacijo primerljiv titer avtoprotiteles. Pri bolnikih, neodzivnih na splenektomijo, je titer avtoprotiteles statistično pomembno večji (30).

Bolnike z ITP zdravimo ob znakih krvavitve in ob nizkih vrednostih trombocitov (manj kot $20\text{--}30 \times 10^9/L$). Število trombocitov pri posamezniku niha, tako je odločitev o začetku zdravljenja ob stabilni bolezni in enkratnem številu pod $20 \times 10^9/L$ individualna. Zdravljenje začnemo s steroidi, ki jim ob

izredno nizkih vrednostih trombocitov s prisotnimi krvavitvami dodamo intravenske imunoglobuline (IVIG). Ob odsotnosti zadovoljivega odgovora in potrebi po visokih odmerkih steroidov se odločamo o splenektomiji. Če standardni načini zdravljenja niso uspešni, uporabljamo rituximab. Med redkeje uporabljena zdravila sodijo zaviralci imunskega odgovora (ciklosporin, azathioprin), endoxan, vinca alkaloidi, interferon-alfa, danazol in druga zdravila. Pogosto jih uporabljamo v kombinaciji (3, 5).

METODE

Iz literature in naših lastnih izkušenj je razvidno, da so krvavitve pri bolnikih z ITP glede na nizke vrednosti števila trombocitov redke (6, 31, 32). Z opravljeno raziskavo smo določili delež aktiviranih trombocitov pri bolnikih z ITP, ki niso v remisiji in se ne zdravijo, in pri bolnikih z remisijo ITP po odstranitvi vranice.

V raziskavo je bilo vključenih 94 oseb, 37 bolnikov z ITP in 57 zdravih kontrol. Bolnike smo razdelili v dve skupini. V skupino ITP-70 smo vključili 20 bolnikov z ITP, 15 žensk in 5 moških, ki zadnje 3 mesece niso prejemali nobenih zdravil in pri katerih je bila vrednost trombocitov ob zadnjih treh kontrolnih pregledih največ $70 \times 10^9/L$. V skupino ITP-Splen smo vključili 17 bolnikov z ITP, 11 žensk in 6 moških, v remisiji bolezni po odstranitvi vranice. Pri tej skupini nismo omejili spodnje in zgornje vrednosti števila trombocitov. V kontrolno skupino (Kontr) smo vključili 57 zdravih prostovoljcev, darovalcev krvi na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijo. Bolniki zadnje tri mesece niso smeli prejemati nobenih zdravil za ITP, zato bolniki z ITP, neodzivni na splenektomijo, ki pogosto potrebujejo zdravljenje, niso bili zajeti v vzorcu. Raziskava je bila opravljena v skladu s Helsinško deklaracijo in jo je odobrila komisija za medicinsko etiko dne 7. 10. 2003 (dopis št. 87/10/03).

Vsem preiskovancem smo odvzeli 5 ml venske krvi v epruveto s citratom (0,105 M) kot antikoagulantom. Čas od odvzema krvi do začetka laboratorijskega dela ni znašal več kot 30 minut. Vzorce smo analizirali v laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo. Uporabili smo uveljavljeno metodo določanja

izražanja selektina P in aktiviranega fibrinogena na membranah trombocitov (33).

Kot reagentne smo uporabili fiziološko raztopino z dodatkom pufra (PFR), enoodstotni goveji serumski albumin (BSA), piščančja protitelesa proti selektinu P (angl. *anti-human P-selectin-FITC* WAK-FA-PSFITC-2, WAK Chemie, Bad Soden, Nemčija), piščančja protitelesa proti aktiviranemu fibrinogenu (angl. *anti human fibrinogen* WAK-FA-AFFITC-2, WAK Chemie, Bad Soden, Nemčija), izotipsko kontrolo za protitelesa proti selektinu P – piščančji IgY-FITC (WAK Chemie, Bad Soden, Nemčija). Uporabili smo pretočni citometer Coulter Epics XL-MCL. Pretočni citometer omogoča prepoznavanje celičnih označevalcev na površini celic. V ta namen uporabljamo monoklonska protitelesa, označena s fluorokromi, ki po osvetlitvi z laserjem oddajajo svetlobo druge valovne dolžine, kar omogoča njihovo prepoznavo v pretočnem citometru. Monoklonska protitelesa so specifična za določen označevalec na površini celice. V naši raziskavi smo tako beležili prisotnost selektina P in aktiviranega fibrinogena.

Statistično oceno smo opravili z namenom ovrednotiti razlike v deležih izraženega selektina P in aktiviranega fibrinogena na membranah trombocitov pri različnih vzorcih. Izbrali smo dvosmerni parametrični preizkus domneve o razliki med povprečema dveh majhnih neodvisnih vzorcev. V ta namen smo uporabili Studentov t-test za primerjavo povprečij dveh neodvisnih vzorcev. Privzeli smo neenake variance. Statistične spremenljivke so bili deleži selektina P (P-sel) in deleži aktiviranega fibrinogena (A-fib) na trombocitnih membranah pri skupinah ITP-70, ITP-Splen in Kontr.

REZULTATI

Število trombocitov pri skupini ITP-70 se je gibalo v razponu od $4 \times 10^9/L$ do $66 \times 10^9/L$ z aritmetično sredino $37 \times 10^9/L$. Bolniki so bili brez znakov krvavitve. Pri skupini ITP-Splen je bil razpon števila trombocitov od $119 \times 10^9/L$ do $453 \times 10^9/L$ z aritmetično sredino $301 \times 10^9/L$, pri skupini Kontr pa od $141 \times 10^9/L$ do $333 \times 10^9/L$ z aritmetično sredino $225 \times 10^9/L$.

Primerjavo povprečnih vrednosti med različnimi skupinami in njihovo statistično

Tabela 1: Primerjave povprečnih vrednosti dveh neodvisnih kontinuiranih spremenljivk s *t*-testi. Enakost varianc med vzorci ni privzeta.

Spremenljivka	Primerjava vzorcev	p (dvosmerno)	Povprečna razlika	Standardna napaka razlike	95 % interval zaupanja razlike	
					Spodnji	Zgornji
P-selektin	ITP-70 in Kontr	0,6980	-0,2534	0,6454	-1,5853	1,0785
	ITP-Splen in Kontr	0,5737	-0,2914	0,5106	-1,3464	0,7637
	ITP-Splen in ITP-70	0,9606	0,0379	0,7624	-1,5117	1,5875
Aktivirani fibrinogen	ITP-70 in Kontr	0,0042	8,8459	2,7680	3,1028	14,5891
	ITP-Splen in Kontr	0,7371	-0,5987	1,7614	-4,2441	3,0468
	ITP-Splen in ITP-70	0,0050	9,4446	3,1187	3,0796	15,8096

pomembnost podaja tabela 1. Pri skupini ITP-70 smo ugotovili statistično pomemben višji delež trombocitov ($p = 0,0042$), ki na svoje membrane vežejo aktivirani fibrinogen, kot pri kontrolni populaciji (Kontr). Statistično pomembne razlike v izražanju selektina P med skupinama ITP-70 in Kontr nismo dokazali ($p = 0,6980$). Za skupino ITP-Splen ni statistično pomembne razlike v deležu aktiviranega fibrinogena ($p = 0,7371$) in selektina P ($p = 0,5737$) na membranah trombocitov glede na kontrolno populacijo (Kontr). Med skupino ITP-70 in ITP-Splen je statistična analiza odkrila statistično visoko pomembno razliko v izražanju aktiviranega fibrinogena ($p = 0,005$). Med tema vzorcema ni statistično pomembne razlike v izražanju selektina P ($p = 0,9606$).

RAZPRAVLJANJE

Aktivirani fibrinogen je prisoten na večjem deležu trombocitov skupine ITP-70 kot Kontr. Aktivirani fibrinogen nastane iz fibrinogena, ko se ta veže na aktivirani kompleks GP IIb-IIIa. Tako govorimo o trombocitih, ki imajo v večjem deležu izražen aktivirani GP IIb-IIIa (11, 12, 34, 35). Med ITP-70 in Kontr ni statistično pomembne razlike v izražanjem deležu selektina P. Glede na večji delež aktiviranega GP IIb-IIIa pri ITP-70 lahko sklepamo na večji delež aktiviranih trombocitov pri tej skupini. Dobljeni rezultati za selektin P tega sklepanja ne dopuščajo.

Na kratko se bomo dotaknili verjetnih razlogov za dobljeno razliko med označevalcema trombocitne aktivacije. Odvzem vzorcev krvi pri obeh skupinah ni popolnoma enak. Kri bolnikov je odvzeta s tanjšo iglo kot kri kon-

trolne skupine. V literaturi navajajo, da je za sprožitev maksimalne aktivacije GP IIb-IIIa potreben 7-krat manjši dražljaj kot za sprožitev maksimalnega izražanja selektina P (14). Tako bi lahko tanjša igla pri odvzemu krvi povzročila večje izražanje aktiviranega GP IIb-IIIa pri skupini ITP-70. V tem primeru pa bi morali tudi pri skupini ITP-Splen ugotoviti večje izražanje aktiviranega GP IIb-IIIa, kar pa ni bil slučaj. Raziskava namreč ni pokazala statistično pomembne razlike v izražanju aktiviranega GP IIb-IIIa med ITP-Splen in kontrolno populacijo. Dodatno obstaja statistično pomembna razlika v izražanju GP IIb-IIIa med skupinama bolnikov ITP-70 in ITP-Splen, zato menimo, da različen odvzem vzorcev krvi ni vplival na večje izražanje aktiviranega GP IIb-IIIa pri skupini ITP-70 glede na kontrolno populacijo.

Razlog za neznačilne rezultate, upoštevajoč selektin P, lahko iščemo v spontani degranulaciji trombocitov zaradi fizikalnih dejavnikov. Ti vplivajo na trombocite med odvzedom in pripravo vzorca. Tako bi lahko prišlo do navidezno večjega izražanja selektina P na površini trombocitov *in vitro* (13, 36). Trombociti kontrolne skupine bi se lahko aktivirali po odvzemu in tako statistična primerjava s trombociti bolnikov ITP-70 ne bi pokazala statistično pomembne razlike med vzorci. Nenavadno pa je, da bi se pri kontroli po odvzemu izrazil le selektin P in ne aktivirani GP IIb-IIIa, še posebej če upoštevamo že prej omenjeno večjo odzivnost GP IIb-IIIa na aktivacijske dražljaje (15). Nazadnje lahko razliko med označevalcema trombocitne aktivacije selektinom P in GP IIb-IIIa poskušamo razložiti z reinternalizacijo selektina P z membran aktiviranih trombocitov. Kmalu po akti-

vaciji se začne ponoven premik na membrane trombocitov vezanega selektina P v notranjost trombocita. Po dveh urah postane 95 % sprva selektin P pozitivnih trombocitov ponovno selektin P negativnih. Aktivirani GP IIb-IIIa ostane prisoten na površini trombocitov. Ti trombociti se kljub izgubi selektina P s svojih membran v krvnem obtoku obnašajo kot aktivirani trombociti (37). S to razlago lahko pojasnimo razliko v rezultatih, dobljenih z obema označevalcema trombocitne aktivacije, selektinom P in aktiviranim GP IIb-IIIa.

Glede na omenjeno izražanje označevalcev trombocitne aktivacije lahko zaključimo, da imajo bolniki z ITP, ki niso v remisiji bolezni, v krvnem obtoku statistično pomembno večji delež aktiviranih trombocitov kot kontrolna populacija. Večji delež aktiviranih trombocitov pri bolnikih z ITP razloži redkejšo krvavitve, kot bi pričakovali, upoštevajoč znižano število trombocitov. Ker imajo zdrava, uporabljana pri zdravljenju ITP, pogoste in neželene stranske učinke, jih ob odsotno-

sti krvavitvev uporabljamo z zadržkom. Naša raziskava z dobljenimi rezultati upravičuje konzervativni pristop k zdravljenju. Označevalec trombocitne aktivacije GP IIb-IIIa se je v naši raziskavi izkazal primernejši kot selektin P.

Dobljeni rezultati niso pokazali statistično pomembne razlike v izražanju aktiviranega GP IIb-IIIa in selektina P med bolniki z ITP v remisiji po odstranitvi vranice in kontrolno skupino. Pri bolnikih, odzivnih na splenektomijo, se ne normalizira le število trombocitov, temveč tudi delež aktiviranih trombocitov. Možno je, da predstavlja splenektomija tudi vzročno in ne samo simptomatsko zdravljenje. Prekine se namreč krog stika trombocitov, makrofagov, avtoaktivnih Th-limfocitov in B-celic limfocitne vrste, kar poganja avtoimuno dogajanje. Merjenje deleža aktiviranih trombocitov ne sodi v klinično prakso. Potrebne bodo dodatne raziskave, ki bodo pokazale pomen tovrstnih preiskav v celoviti obravnavi bolnikov z ITP in njihovo mesto pri izbiri zdravljenja.

LITERATURA

1. Karpatkin S. Autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Lancet* 1997; 349: 1531-6.
2. Cines DB, McMillan R. Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. *Curr Opin Hematol* 2007; 14: 511-4.
3. Psaila B, Bussel JB. Immune thrombocytopenic purpura. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007; 21: 743-59.
4. George JN. Platelets. *Lancet* 2000; 355: 1531-9.
5. Stasi R, Provan D. Management of immune thrombocytopenic purpura in adults. *Mayo Clin Proc* 2004; 79: 504-22.
6. Rand ML, Dean JA. Platelet function in autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr* 1998; 87 Suppl. 424: 57-60.
7. Chong BH, Murray B, Berndt MC, et al. Plasma P-Selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders. *Blood* 1994; 83: 1535-41.
8. Rinder HM, Snyder EL. Activation of platelet concentrate during preparation and storage. *Blood Cells* 1992; 18: 445-56.
9. Merten M, Thiagarajan P. P-Selectin Expression on Platelets Determines Size and Stability of Platelet Aggregates. *Circulation* 2000; 102: 1931.
10. Ginsberg MH, Frelinger AL, Lam SC, et al. Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies. *Blood* 1990; 76: 2017-23.
11. Zamarron C, Ginsberg MH, Plow EF. Monoclonal antibodies specific for a conformationally altered state of fibrinogen. *Thromb Haemost* 1990; 64: 41.
12. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87: 4925-36.
13. Rinder HM, Snyder EL. Activation of platelet concentrate during preparation and storage. *Blood Cells* 1992; 18: 445-56.
14. Devine DV. Novel markers for the detection of platelet activation. *Transfus Med Rev* 1990; 4: 115-20.
15. Ruf A, Patscheke H. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21: 146-51.
16. Griesshammer M, Beneke H, Nussbaumer B. Increased platelet surface expression of P-selectin and thrombospondin as markers of platelet activation in essential thrombocythaemia. *Thromb Res* 1999; 96: 191-6.
17. Chang M, Nakagawa PA, Williams SA, et al. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 2003; 102: 887-95.

18. McMillan R, Wang L, Tomer A, et al. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* 2004; 103: 1364–9.
19. Stasi R, Del Poeta G, Stipa E et al. Response to B-cell depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2007; 110: 2924–30.
20. Semple JW. Pathogenic T-cell responses in patients with autoimmune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25 Suppl 1: S11–3.
21. Andersson J. Cytokines in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Acta Paediatr* 1998; 87 Suppl 424: 61–4.
22. Veneri D, Franchini M, Gottardi M et al. Efficacy of *Helicobacter pylori* eradication in raising platelet count in adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 2002; 87: 1177–9.
23. Kurtoglu E, Kayacetin E, Ugur A. *Helicobacter pylori* infection in patients with autoimmune thrombocytopenic purpura. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2113–5.
24. Franchini M, Veneri D. *Helicobacter pylori* infection and immune thrombocytopenic purpura: an update. *Helicobacter* 2004; 9: 342–6.
25. Franchini M, Veneri D. *Helicobacter pylori*-associated immune thrombocytopenia. *Platelets* 2006; 17: 71–7.
26. Matsushita K, Ozaki A, Arima N, et al. Human T-lymphotropic virus type I infection and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Hematology* 2005; 10: 95–9.
27. Zhang F, Chu X, Wang L et al. Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2006; 76: 427–31.
28. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, et al. Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J Immunol* 2002; 168: 3675–82.
29. Kuwana M, Ikeda Y. The role of autoreactive T-cells in the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2005; 81: 106–12.
30. Mazzucconi MG, Arista MC, Peraino M, et al. Long-term follow-up of autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP) patients submitted to splenectomy. *Eur J Haematol* 1999; 62: 219–22.
31. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409: 145–7.
32. Haznedaroglu IC, Büyükascedilinođotk Y, Koscedilar A et al. Selectins and IL-6 during the Clinical Course of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Acta Haematol* 1999; 101: 16–20.
33. Zver S, Źontar D. Določitev števila aktiviranih trombocitov s protitelesi za aktivirani fibrinogen in selektin P pri bolnikih z esencionalno trombocitopenijo in vpliv antiagregacijskih zdravil. *Zdrav Vestn* 2004; 73 Suppl I: 127–34.
34. Faraday N, Goldschmidt-Clermont P, Dise K, et al. Quantitation of soluble fibrinogen binding to platelets by fluorescence-activated flow cytometry. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 728–40.
35. Heilmann E, Hynes LA, Burstein SA, et al. Fluorescein derivatization of fibrinogen for flow cytometric analysis of fibrinogen binding to platelets. *Cytometry* 1994; 17: 287–93.
36. Wang C, Mody M, Herst R, et al. Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates. *Transfus Sci* 1999; 20: 129–39.
37. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, et al. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11877–82.