

# Thrombocyta és thrombocyta eredetű mikropartikulum vizsgálatok súlyos szepszisben

---

Szerző: Dr. Woth Gábor

Témavezető és iskolavezető: Prof. Dr. Kovács L. Gábor Ph.D.,  
Társ-témavezető: Dr. Mühl Diana Ph.D.

Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet,  
Laboratóriumi Medicina Intézet,  
Pécsi Tudományegyetem

2013 Június



# Rövidítések listája

**ADP:** Adenozin difoszfát, **ADR:** Adrenalin, **BUN:** Szérum urea nitrogén, **COL:** Kollagén, **CRP:** C-reaktív protein, **GP:** Glycoprotein, **IL:** Interleukin, **MP:** Mikropartikulum, **PCT:** Procalcitonin, **PMP:** Thrombocyta eredetű mikropartikulum, **PS:** Foszfatidilszerin, **SAL:** Fiziológias, 0.9%-os NaCl oldat, **SIRS:** Szisztémás Gyulladásos Válaszreakció, **SSC2008:** Surviving sepsis Campaign 2008, **TF:** Szöveti faktor, **TLR:** Toll like receptor, **TNF- $\alpha$ :** Tumor nekrozis faktor-alpha, **VWF:** von Willebrand factor

## Bevezető

A gyulladás és szepszis tünetei már történelmi feljegyzésekben is fellelhetők, a szisztémás gyulladásos válaszreakció (*ang.* Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) pontos definíciója mégis csak 1991 –ben született meg. A SIRS diagnosztikához legalább két diagnosztikus kritériumnak kell teljesülnie az alábbi feltételek közül: hypothermia vagy hyperthermia ( $<36^{\circ}\text{C}$ , vagy  $>38^{\circ}\text{C}$ ), szapora szívritmus ( $>90/\text{min}$ ), hyperventilatio (légzésszám:  $>20/\text{min}$ , vagy artériás parciális szén-dioxid nyomás:  $< 32 \text{ Hgmm}$ ), fehérvérsejt szám  $> 12000 \text{ sejt}/\mu\text{l}$ , vagy  $< 4000 \text{ sejt}/\mu\text{l}$ . A jelenleg érvényben lévő definíció szerint szepszisnek tekintjük az infekciós háttér mellett kialakult SIRS-et. Súlyos szepszisben legalább egy életfontos szervfunkciók zavar áll fenn gyulladásos eredettel, míg septicus sokkban a megfelelő folyadékterápia ellenére a hypotenzió perzisztál egyéb oki tényező nélkül.

A szepszist általában egy fertőzés megjelenésére adott komplex, de nem megfelelő reakcióként lehet definiálni. Annak ellenére, hogy jelenlegi modelljeink alapján a szervezet válaszreakcióit tekintjük fő felelősnek, egyértelműen bizonyított, hogy az egyes kórokozók virulencia faktorai (pl. bakteriális ligandok, adhézis és kolonizációs faktorok) is részt vesznek a kórkép kialakításában. A veleszületett immunrendszer felelős a "nem-saját" és a "sérült-saját" struktúrák mintázatfelismerő (toll-like receptorok, TLR-ek) receptorokon keresztül történő azonosításáért. A patogén-asszociált és sérüléssel összefüggő mintázatok normálisan nem jelennek meg a gazdaszervezetben, viszont mind Gram-pozitív, Gram-negatív, bakteriális, gomba és virális felszíneken megtalálhatóak, vagy sejtsérülés kapcsán képződő struktúrákon vannak jelen. Az aktivált leukocyták felszínén lévő TLR-ek pro-inflammatórikus citokinek, interleukin-1 $\beta$  (IL), IL-6 és tumor nekrozis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ) szekréciónak váltják ki, ezáltal aktiválják a veleszületett immunrendszer további sejtjeit, illetve a környező sejtcsoportokat és további citokin kiválasztást indítanak el. Az aktivált leukocyták képesek elhagyni a keringést és a gyulladásos szövetek irányába migrálni. A pro-inflammatórikus citokinek indukálják az eikozanoid szintézist és thrombocyta aktiváló faktor kibocsátását, ezáltal fokozzák az érfal permeabilitását és thrombocyta aktivációt. A hiszocytákból és bazophil granulocytákból felszabaduló komplement C3a

és C5a anafilatoxinok tovább fokozzák a vaszkuláris permeabilitást és simaizom összehúzódást válthatnak ki.

A megváltozott vaszkuláris funkció kiemelt szerepet játszik a szeptikus szervegtelenségek kialakulásában. Az endothel sejtek saját TLR receptoraikon keresztül és gyulladásos citokinek jelenléte miatt aktiválódnak, a helyi thrombomodulin koncentráció csökken, míg a szöveti faktor (*ang. tissue factor*, TF) és plazminogén aktivátor inhibitor-1 szintje emelkedik. Az aktivált endothel sejtek prokoaguláns felszínnel rendelkeznek, elősegítik a polimorfonukleáris sejtek kitapadását és diapedezisét. A fokozott TNF- $\alpha$  szint intravaszkuláris folyadékvesztést okoz, helyi ödémák kialakulását és a szöveti oxigenizáció romlását idézi elő.

A renális keringés autoregulációjának károsodása a fokozott katekolamin szintek, endothel sérülés, mikroaggregátumok képződése és leukocyta diapedesis miatt tubuláris dysfunkciót okoz. A vesefunkció a szeptikus betegek közel felében csökken, a korábban említett faktorok mellett a nitrogén monoxid direkt hatása, az angiotenzin és az endothelin szerepe feltételezett. A metabolikus acidózis kialakulása kreatinin és szérum nitrogén termékek (*ang. blood urea nitrogen*, BUN) felszaporodása mellett egyértelmű jele a veseérintettség kialakulásának. Az akut szepszissel összefüggő vesefunkciós zavart a RIFLE kritériumok alapján osztályozhatjuk.

Súlyos szepszisben a Virchow triász klasszikus elemei is jelen vannak (fokozott koaguláció, endothel funkciós zavar, károsodott keringés). A kibocsátott citokinek és aktivált sejtcsoportok jelentősen hozzájárulnak a hemostasis egyensúlyának prokoaguláns irányú eltolódásához. Az antikoaguláns proteinek és koagulum bontásáért felelős enzimek leköötődnek a környéki sejtekhez, befolyásolják azok funkcióját. Ezen faktorok elősegítik a gyulladást, hozzájárulnak a szöveti faktor eredetű thrombin generációhoz, antikoagulációs zavart okoznak és csökkentik a fibrinolízist.

**Thrombocyta aktiváció és aggregáció:** A glycoproteineknek (GP) nevezett speciális felszíni glycoalyx elemek több thrombocyta funkcióban is fontos szerepet töltenek be. A haemostasisban kiemelt fontosságúak a GPIb-V-IX és GPIIb-IIIa fehérjék. Míg az előbbieket a thrombocyták nyíróerő általi aktivációjáért, a von Willebrand faktor (VWF) és kollagén kötéséért felelősek, a második csoport a fibrinogén kötésben és aggregátum képződésben játszik szerepet. Klasszikusan a thrombocyta aggregáció 3 fő lépését különböztetik el: iniciációs, extenziós és fenntartó fázis. A kezdeti lépést kiválthatja a kollagénnel való találkozás, VWF kötés a sérült érfalon és a thrombocyta monolayer kialakulása az érintett szakaszokon. A kollagén az  $\alpha 2\beta 1$  és GPIV receptorokon keresztül, a VWF a GPI $\alpha$  és  $\alpha 2\beta 3$  receptorokon hat. A VWF kötés létfontosságú az adhézió és rolling kialakulásában a magas nyíróerővel járó keringési szakaszokon. A kezdeti kötődést egy kismértékű  $Ca^{2+}$  csúcs követi, mely adenosin-difoszfát (ADP) felszabadulással jár, mely a P2Y<sub>1</sub> receptorokon aktiválja a környező nyugvó thrombocytákat, fenntart egy G<sub>i</sub> mediált pozitív visszacsatolást és fokozza a

thrombocyták ciklikus adenosin-monofoszfát szinteket. Az adhézió kialakulását követően a fokozott  $Ca^{2+}$  szint beindítja a thrombocyták aggregációt.

**A mikropartikulumok (MP) keletkezése és szerepe:** A MP-t Wolf írta le először 1967-ben, a thrombocyták szegény plazmában felfedezte a "thrombocyták port", valamint bemutatta, hogy ultracentrifugációval ez a por eltávolítható, így a plazma prokoaguláns képessége megszűnik. A jelenleg elfogadott elmélet szerint a MP képződés a lipid kettősmembránok aszimmetria elvesztésével függ össze. Sejtaktiváció, apoptózis vagy fokozott nyíróerő hatására a külső membránban megjelenik a (ang. foszfatidylserine, PS). A „klasszikus” modell szerint az intracelluláris  $Ca^{2+}$  emelkedés szükséges a MP képződéshez. A cytoskeleton  $Ca^{2+}$  mediálta átrendeződését a kalpainok segítik elő. A lefűződött MP (elsősorban a thrombocyták eredetű, *ang.* platelet-derived MP, PMP) membránja közel 60% koleszterin, szfingomyelin, foszfatidiletanolamin, illetve PS.

Az elmúlt 20 évben a laboratóriumi eszközök fejlődése nagyban elősegítette a MP kutatást. Prokoaguláns szempontból a TF szállítása tekinthető egyik fő feladatuknak. Aktivációt és lefűzödést követően a PMP-k TF-t expresszálnak, felszíni receptoraik és ligandjaik segítségével képesek a keringő makrofágok, neutrophilek és nyugvó thrombocyták kötésére és aktivációjára. Del Conde és mtsai. szerint a monocyták/makrofág eredetű MP-k képesek aktivált thrombocytával fúzionálni PS és P-selectin glycoprotein ligand-1-en keresztül, így TF gazdag thrombocytát létrehozni, mely teoretikusan teljes hemostasis apparátussal rendelkezik. Koppler és Gasser megfigyelése szerint a korai gyulladási válaszban képződött MP-ok inkább anti-inflammatorikus (TGFB-1, IL-10), míg a késői válaszban pro-inflammatorikus tulajdonságokkal rendelkeznek (CCR3, CCR4, IL-6). Sejtvédő szerepükre Abid-Hussein és mtsai. hívták fel a figyelmet, kaszpáz-3 tartalmú MP lefűződés gátlása egyértelműen fokozott apoptózissal járt a kezelt endothel sejteken. Több betegségben fokozott MP mennyiségeket mutattak ki különféle testfolyadékokban, de pontos szerepük a fiziológiai és patológiai folyamatokban egyelőre nem tisztázott.

# Célkitűzések

## **Thrombocyta aggregáció súlyos szepszisben:**

- 1, Vizsgáltuk az indukálható aggregáció változását súlyos szepszisben.
- 2, Mértük a csökkent thrombocyta szám hatását az indukálható aggregációra.
- 3, Vizsgáltuk a spontán aggregáció szerepét és megjelenését súlyos szeptikus betegekben.

## **Mikropartikulum vizsgálatok súlyos szepszisben:**

- 1, Vizsgáltuk az infekciót kiváltó különböző kórokozók szerepét a MP profilra szepszisben.
- 2, További adatokat gyűjtöttünk a jelenlegi szepszis-MP modell támogatására.
- 3, Vizsgáltuk a kapcsolatot az egyes szervegtelenségek kialakulása és a MP megjelenése között.

# Betegek és módszer

Betegbevételi kritériumunk a korán felismert súlyos szepszis (24 órán belül), kettő vagy több szervegtelenséggel. Szepszis kritériumaink megegyeztek a bevezetőben említett kritériumokkal, kiegészítve a 10 mg/l -t meghaladó C-reaktív protein és 2 ng/ml (a gombás MP studyban 5 ng/ml) feletti procalcitonin (PCT) szintekkel. A végstádiumú betegeket, bármilyen hematológiai alapbetegségben szenvedő beteget, az elmúlt 30 napban citostatikus kezelésben részesülteket, nagy dóziszú, hosszú ideig tartó szteroid terápiát kapó betegeket, azokat akiknél a disszeminált intravaszkuláris koagulációs pont 5 felett volt, illetve thrombocyta funkciót módosító gyógyszeres kezelésben részesülteket kizártuk tanulmányainkból.

Thrombocyta aggregációhoz 3 × 2,7ml Na<sub>3</sub>-citrát alvadásgátolt vért gyűjtöttünk betegeinktől, míg a MP tanulmányokban 2 × 2,7 ml Na<sub>3</sub>-citrátos vért használtunk fel valamennyi mérési időpontban. Az aggregációs mérések Carat TX4 optikai aggregométerrel készültek adrenalin (ADR, 10 μmol), ADP (10 μmol), kollagén (COL, 2 μg/ml) és fiziológiás sóoldat (SAL) induktorokkal. Mikropartikulum izolációt többlépéses centrifugálással végeztünk, utolsó lépésként 10 percen át 18000 g energiával MP-t pelletáltunk, majd PS tartalmukat annexin V-el, specifikus antigénjeiket fluoreszcens jelölt monoklonális antitestekkel jelöltük. Az aktivált thrombocyták fibrinolitik konformációjú α<sub>2</sub>β<sub>3</sub> receptorát a PAC-1 antitesttel, a konstitutívan expresszált GPIIb-IIIa receptor a CD41 és CD61 antitestekkel vizsgáltuk. Az adhéziós receptor GPIb-V-IX az anti-IX (CD42a)-el jelöltük. Az áramlási citometriás vizsgálatok Cytomics FC500

eszközrel készültek, CXP szoftverrel értékeltük az adatokat. MP kaput definiáltunk, a mérési háttérzaj minimalizálása érdekében, méretkapuként ismert 0,3, 0,5 és 1,0  $\mu\text{m}$  átmérőjű polisztiirén mikrogöngyöket használtunk. A forward és side scatter mérések logaritmikus skálán történtek, MP méretkapuba a 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  tartományt vettük be. Az MP kapuba esett események közül csak az annexin V pozitív eseményeket értékeltük, pozitívnak tekintettük az izotípus feletti intenzitású jelölést. Thrombocytopenia kritériumaként a Surviving Sepsis Campaign 2008 (SSC2008) értékét fogadtuk el (100000 sejt/ $\mu\text{l}$ ). Mikrobiológiai eredményeink standard tenyésztéses vizsgálatokon alapultak. Az akut szepszis veseelégtelenség kialakulását a RIFLE kritériumok „Injury” állapota alapján definiáltuk (szérum kreatinin normál  $\times 2$ ,  $>50\%$  csökkent filtrációs ráta, vagy vizelet produkció  $<0,5$  ml/ttk/óra).

## Eredmények

**Thrombocyta aggregációs vizsgálat:** 45 beteget vettünk be vizsgálatunkba, eredményeinket 30 fős kontroll csoporttal vetettük össze. A szepszis csoportban szignifikánsan csökkent aggregációs eredményeket mértünk minden klasszikus induktorról ( $p < 0.05$ ), míg SAL esetében fokozott aggregáció volt szepszis betegekben ( $p < 0.001$ ). Felvételkor 19 beteg került az alacsony thrombocyta számú, 26 beteg a normál thrombocyta számú csoportba a SSC2008 definíciója alapján. A betegcsoportok között nem volt szignifikáns eltérés a demográfiai és klinikai adatokban. Az ADP indukált aggregáció minden mérési napon, az ADR aggregáció a 2-5. napokon, a COL aggregáció az 1., 2., 3. napokon volt szignifikánsan csökkent az alacsony thrombocyta számú csoportban. A SAL aggregációban nem mutatkozott érdemi különbség, a normál thrombocyta csoportban lassú emelkedés volt tapasztalható az indukálható aggregációban a vizsgálat ideje alatt. A kontroll csoporthoz viszonyítva a normál thrombocyta számú csoport eredményei csökkentek voltak, kivéve az ADR aggregáció a 3., 4., 5. napokon és az ADP aggregáció az 5. napon ( $p < 0.05$ ). Az alacsony thrombocyta csoport minden eredménye szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest ( $p < 0.001$ ). 14 beteg halt meg a vizsgálat alatt, 31 beteg alkotta a túlélő csoportot. Nem találtunk szignifikáns eltérést a thrombocyta szám, az indukált és SAL aggregáció vonatkozásában a elhunytak és a túlélők között. A spontán aggregációs csoport (14 beteg) thrombocyta mennyisége szignifikánsan nem különbözött a spontán nem aggregáló csoporttól, de szignifikánsan alacsonyabb PCT és laktát szinteket mértünk ezeknél e betegeknek. A kortikoszteroid terápia hatását az aggregációra nem tudtuk bizonyítani vizsgálatunk során. Az összes vizsgált betegből 36 esetben volt pozitív mikrobiológiai diagnózis, 7 betegnél kizárólag Gram-negatív fertőzés volt jelen. Vizsgálatunk alapján a Gram-negatív fertőzés szignifikánsan nem járult hozzá a spontán aggregáció kialakulásához.

**Mikropartikulumok súlyos szepszisben:** Első MP tanulmányunk során 57 beteget készültünk bevonni, majd a kizárási kritériumok (16 fő) és beleegyező elutasítása miatt (8 fő), végül 33 beteg adta beleegyezését. A vizsgálat időtartama alatt vett mikrobiológiai minták alapján betegeinket kevert gombás és bakteriális fertőzésben szenvedő csoportokba soroltuk. A betegek demográfiai és klinikai paraméterei, prognosztikus pontszámai nem mutattak szignifikáns különbséget. Adatainkat 20 fő korban és nemi megoszlásban illesztett kontroll csoport és a szепtikus betegek adatai között sem mutatkozott különbség. Hat beteg alkotta a kevert gombás csoportot, míg 27 beteg került a nem-gombás csoportba. Mikrobiológiai mintavétel bizonyította a *C. albicans* jelenlétét mind a hat esetben. Kettő beteg a gombás és 5 a nem-gombás csoportból elhunyt a vizsgálati idő alatt. Felvételnkor a teljes annexin V<sup>+</sup> MP és CD41<sup>+</sup> PMP mennyisége emelkedett volt mind a kevert gombás, mind a nem-gombás csoportokban a kontrollokhoz képest. A MP-ok jelentős része (közel 60%) pozitív volt CD41-re, ezért PMP-nek tekintettük őket. Míg a kevert gombás csoport emelkedett MP mennyisége kis mértékben csökkent a 3. napon, a nem-gombás csoport folyamatosan, lassan csökkenő tendenciát mutatott. A kevert gombás csoport MP emelkedése szignifikáns volt az 1. napon a nem-szeptikushoz képest ( $p < 0,05$ ). A CD41<sup>+</sup> PMP-k mennyisége csökkent az 5. vizsgálati napig a nem-gombás csoportban, de folyamatosan magas volt a kevert gombás betegeknél. Statisztikailag szignifikáns volt az emelkedés az 1. napon ( $p < 0,05$ ). A CD61 eredmények statisztikailag megegyeztek a CD41 eredményekkel. Míg a CD42a<sup>+</sup> PMP-k mennyisége elhanyagolható volt a nem-gombás csoportban és kontrollokban, míg szignifikánsan emelkedett volt minden mérési időpontban a kevert gombás csoportban ( $p < 0,05$ ). Annak ellenére, hogy a PAC1<sup>+</sup> PMP-k kismértékű csökkenését figyeltük meg kevert gombás betegeknél az 5. napig, ezen betegeknél szignifikánsan emelkedett PAC1<sup>+</sup> PMP-k voltak az 1. és 5. mérési napon ( $p < 0,05$ ). ROC analízis alapján a PAC1 és CD42a PMP mérések 0,857 és 0,897 görbe alatti területtel rendelkeztek a kevert gombás fertőzés jelenlétére. A különböző bakteriális kórokozók (Gram-pozitív vagy Gram-negatív felosztásban) a nem-gomba fertőzöttekben nem okoztak szignifikáns különbséget a MP profilokban, ahogy a különböző csoportok (Gram-pozitív, Gram-negatív, gombás) thrombocytá számában sem találtunk szignifikáns különbséget.

A citometriás eredmények és betegadatok újraértékelését követően 37 beteg adatát vizsgáltuk az összesen 65 követett esetből. Ezen tanulmányunkban a szepszis kimenetelére, egyes szervelégtelenségek kialakulására, valamint ezek MP profillal egyezésére koncentráltunk. A szепtikus betegek jelentős része veseelégtelenségben szenvedett, így főleg ezen elváltozás hatásaira fókuszáltunk. A szепtikus betegek MP mennyiség mérése a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan emelkedett eredményeket hozott az annexin V és CD41 pozitív partikulumok esetében ( $p < 0,001$ ). A CD42a<sup>+</sup> partikulumok mindvégig emelkedettek voltak a szепtikusokban ( $p < 0,001$ ). A PAC1 magas összmenyiségről indulva folyamatosan lassú emelkedést mutatott az 5.

napig ( $p < 0,05$ ). A CD41, CD42a, PAC1 partikulumok megjelenése nem korrelált a thrombocytá számmal.

Eredményeink alapján a túlélő és nem-túlélő betegek eredményei mind a 7 napos, mind a 28 napos mortalitás tekintetében nem mutattak szignifikáns MP mennyiségi különbséget. Az egyes szervelegtelenségek száma és a teljes MP, CD13 vagy CD14 pozitív mennyisége között sem volt összefüggés. Az egyes szervelegtelenség vizsgálata kimutatta, hogy a veselegtelenségben szenvedő betegek esetében szignifikáns különbség van a MP profilban a veselegtelenség nélkül felvettekkel szemben. A teljes annexin V pozitív, CD41<sup>+</sup> és CD13<sup>+</sup> MP-ok fokozott megjelenését találtuk akut veselegtelen septicus betegekben. Annak ellenére, hogy a betegek változó teljes MP mennyiséggel rendelkeztek, a veselegtelenek emelkedett mennyiségeket mutattak felvételnél és kismértékű csökkenést a 3. napig. A veselegtelenség nélkül felvettek eredményei fokozatosan emelkedtek a vizsgálat ideje alatt ( $p < 0,05$ ). A CD41<sup>+</sup> MP-ok mennyisége már emelkedett volt veselegtelenekben, míg a többi betegben inkább fokozatos emelkedést mutatott. A CD13<sup>+</sup> eredmények a CD41-hez hasonlóan mozogtak a vizsgálat ideje alatt.

Az összesített adatok alapján a CD42a<sup>+</sup> MP-ok mennyisége negatívan korrelált a szérumban kreatinin és BUN eredményekkel ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,835$ ,  $r = -0,569$ ). Egyéb szepszis-eredetű szervfunkciós zavar esetében (keringési elégtelenség, tudatzavar, légzési elégtelenség, thrombocytopenia/csontvelő elégtelenség, májelégtelenség) nem találtunk hasonló összefüggéseket.

## Megbeszélés

Első vizsgálatunk fő célja az indukálható aggregáció vizsgálata volt súlyos septicus betegekben és annak megítélése, hogy mindez felhasználható-e mortalitás prediktorként? Korábbi, áramlási citometriát alkalmazó thrombocytá vizsgálatok már bemutatták a thrombocytá aggregációs funkció sérülését többszervi elégtelenségben. Adataink alapján az ADR, ADP és COL indukálható aggregáció csökkent a kontroll csoporthoz képest, de szignifikánsan nem változott a megfigyelési idő alatt. Yaguchi és mtsai. hasonlóan csökkent aggregációt találtak szepszisben, míg más tanulmányok fokozott aggregációt traumát követő septicus esetekben. Yaguchi eredményeivel megegyezően mi is csökkent aggregációt találtunk súlyos septicus betegekben, meglepő módon Yaguchi tanulmányában habár a PAC1 és a fibrinogén kötő képesség csökkent, a CD62P jelenléte fokozott volt septicus betegekben. Lundahl teóriája alapján a könnyebben aktiválható, fiatalabb thrombocyták használnak fel korábban a keringésből, ezért feltételezhető, hogy az aggregációs funkció csökkenni fog. Tanulmányunkban a túlélő és nem-túlélő csoportok spontán aggregációjában nem találtunk különbséget. Mivel a thrombocytá sequestratio bekövetkezhet septicus



állapotban, úgy gondoljuk eredményünk sem alátámasztani, sem cáfolni nem képes Eisen teóriáját, de bizonyítja, hogy az aggregációs vizsgálat nem jó mortalitási prediktor. Eddig súlyos szeptikus betegek esetében nem vizsgálták a SAL hatását és a spontán aggregáció jelenlétét, annak ellenére, hogy korábbi tanulmányokban már használták. Szeptikus betegek esetében fokozott spontán aggregációt figyeltünk meg egészséges kontroll esetekhez képest. A fokozott PCT szintek a spontán nem aggregáló csoportban feltételezik, hogy ezen csoportba került betegek súlyosabb állapotúak voltak a spontán aggregációs csoporthoz képest. Annak ellenére hogy tisztában vagyunk a laktát szintek gyenge specificitására és szenzitivitására a mikrocirkuláció megítélésében, ezen paraméter alapján úgy tűnik a szöveti oxigenizációban nem volt lényegi különbség a két csoport között. A laktát szintek eltéréseiben jelentkező hiány lehetséges velejárója a megfelelő folyadék és szervtámogató kezelésnek.

A hemosztázisban és aggregációban betöltött szerepük mellett a thrombocyták korai immunválaszban és gyulladásos folyamatokban való részvétele régóta kutatott téma. Yeaman és mtsai. vizsgálták a thrombocyták reakcióit a sérült endothel és patogének jelenléte irányában. Egyes baktérium és gomba törzsek képesek a thrombocyták aktivációját kiváltani, majd az aktivált thrombocyták aggregátum képzéssel a kórokozót a sérült érfa környékén "lehorgonyozni". Ezzel egyidőben a thrombocyták antimikrobiális anyagokat, thrombocidineket szekretálnak környezetükbe, melyek bakteriosztatikus, vagy -cid hatással rendelkeznek bizonyos törzsekkel szemben, míg mások rezisztenciát fejlesztettek ki. A thrombocyta aktiváció fokozódása és adhéziós markerek megjelenése a PMP felszínén a thrombocyták immunológiai szerepére utalhat. Korábban ellentmondó adatok jelentek meg a MP mennyiségéről szepszisben. Joop és mtsai. csökkent MP mennyiségről számoltak be (thrombocyta, erythrocyta, endothel, granulocyta eredetű) többszervi elégtelen betegcsoportban, míg egy másik publikációban Nieuwland és mtsai. emelkedett mennyiséget találtak meningococcalis szepszisben. Jelen tanulmányainkban a kontroll eredményekhez képest emelkedett mennyiséget találtunk szepszisben. Igazoltuk, hogy kevert gombás fertőzés esetében fokozottabb a PMP megjelenése, mint bakteriális szepszisben. Úgy gondoljuk a PAC1, CD42a PMP mérése fontos kiegészítő információt adhat a gombafertőzésre hajlamos betegek azonosításában és a korai antimikotikus terápia megkezdésében.

Második MP tanulmányunk eredményei megfelelnek Mostefai és mtsai. korábban közölt eredményeinek fokozott MP mennyiségekről szeptikus betegekben kontroll személyekhez képest. Soriano és mtsai. hasonlóan emelkedett szinteket mértek, különösen túlélő betegekben, viszont ezt a megfigyelést adataink nem erősítették meg. Vizsgálatunkkal nem találtunk egyértelmű összefüggést a teljes MP mennyiség és a szervelégtelenségek száma között, de az akut szeptikus veseelégtelenség fokozott MP, PMP és myeloid MP mennyiség emelkedéssel jár. A veleszületett immunrendszer aktivációja és a vese infiltrációja monocyták és makrofágok által hozzájárul a szeptikus veseelégtelenség kialakulásához. A monocyta-eredetű MP-ok a keringő TF egyik fő forrása és nagy mennyiségű foszfadiliszert szállítanak. Ezen partikulumok mennyiségi

fokozódása prokoaguláns eltolódást és rögzépződést okozhat a vese kapillárisokban. A CD13 elősegíti az endothel/monocyta kötődést, így ezen partikulumok segíthetik a helyi monocyta kitapadást és vese infiltrációt. A helyi rögzépződés és infiltráció miatt a keringés csökken, fokozódik a helyi hypoxia, citokin felszabadulás jön létre. A fokozott CD42a PMP szinteket már leírták korábban akut vasculitis okozta veseelégtelenségben. Jelen kutatásunkban a BUN és szérum kreatinin koncentrációk negatívan korreláltak, így felvetődik az ilyen partikulumok kitapadása a sérült endothelhez, ezáltal endothelialis dyszfunkció kialakulása. A fenti eltérések a 3. vizsgálati napra eltűntek, melyet a kiterjesztett szervtámogató kezelések és folyadékterápia hatásának vélünk.

## Összefoglalás

### **A thrombocyta aggregációs vizsgálat új eredményei:**

- 1, Az indukálható thrombocyta aggregáció mérés nem ajánlható a súlyos szepszis mortalitás prediktoraként.
- 2, Ezen tanulmány az első, ami bizonyította a spontán aggregáció jelenlétét súlyos szepszisben.
- 3, Eredményeink további bizonyítékkal szolgáltak a thrombocyta szám és az indukálható aggregáció kapcsolatára.

### **A mikropartikulum tanulmányok új eredményei:**

- 1, További bizonyítékkal szolgáltunk a MP szám emelkedésére súlyos szepszisben.
- 2, Klinikai tanulmányunk elsőként jelezte a MP profil változását gomba fertőzéssel komplikált szepszis esetekben, ez elősegítheti egy korai diagnosztikai eszköz fejlesztését.
- 3, Nem találtunk direct összefüggést a szervelelelenségek mennyisége és a MP száma között.
- 4, Tanulmányunk felveti a MP-ok szerepét az szepszis állapotban kialakult akut veseelégtelenség patofiziológiájában

## Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak. Köszönöm Dr. Mühl Diana főorvosnő, Kovács L. Gábor Professor Úr, Bogár Lajos Professor Úr és Vermes István Professor Úr munkám során nyújtott segítségét. Köszönöm közvetlen munkatársaim, Dr. Tóké-Füzesi Margit, Ács Orsolya, Horváth Beáta és Döme

Zsuzsanna, valamint az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet és a Laboratóriumi Medicina Intézet minden dolgozójának a munkámban nyújtott segítségét.

# Publikációs és előadás lista

## A tézis a következő publikációkon alapul:

- 1, G Woth, A Varga, S Ghosh, M Krupp, T Kiss, L Bogár, D Mühl, Platelet aggregation in severe sepsis., J Thromb Thrombolysis. 2011;31(1):6-12. IF: 1.476.
- 2, G Woth, A Varga, M Krupp, K Jáksó, L Bogár, D Mühl., Thrombocyt-aggregációs vizsgálatok súlyos szepszisben. Aneszteziol Intenz Ter. 2011;41(3):126-131. (article in hungarian) IF: -.
- 3, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaki, GL Kovács, I Vermes, D Mühl., Activated platelet-derived microparticle numbers are elevated in patients with severe fungal (Candida albicans) sepsis., Ann Clin Biochem. 2012;49:554-560. IF: 2.170.
- 4, M Tőkés-Füzesi, G Woth, T Magyarlaki, GL Kovács, I Vermes, D Mühl., Microparticles and acute renal dysfunction in septic patients., J Crit Care. 2012. IF: 2.134.

Összesített impakt faktor a szerzői hozzájárulások alapján: 3.628

Releváns közlemények teljes impakt faktora: 5.780

Citációk száma: 2

## Publikációk, melyek nem szerepelnek a tézisben:

- 1, D Mühl, G Woth, L Drenkovic, A Varga, S Ghosh, C Csontos, L Bogár, G Wéber, J Lantos., Comparison of oxidative stress & leukocyte activation in patients with severe sepsis & burn injury., Indian J Med Res. 2011;134:69-78. IF: 1.837.
- 2, D Mühl, B Nagy, G Woth, B Falusi, L Bogár, G Wéber, J Lantos., Dynamic changes of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in severe sepsis., J Crit Care. 2011;26(6):550-555. IF: 2.134.
- 3, D Mühl, G Woth, T Kiss, S Ghosh, JE Tanus-Santos., Pathophysiology, Diagnosis and Treatment of Pulmonary Embolism Focusing on Thrombolysis – New approaches. Book chapter, in: Pulmonary Embolism, ISBN:978-953-51-0233-5, 2012.

Összesített impakt faktor: 3.971

Citációk száma: 2

## A tézis részét képező előadások és poszterek

- 1, A Varga, G Woth., Súlyos szepszis és a thrombocyt-aggregáció (Prospektív analízis), University of Pécs, Annual Student Researchers Conference, 2009.
- 2, A Varga, G Woth, L Bogár, D Mühl., Súlyos sepsis és a thrombocyt-aggregáció (prospektív analízis). Aneszteziol Intenz Ter. 2009;39:(Suppl. 1.):18.
- 3, G Woth., Mikropartikulumok és a súlyos szepszis, University of Pécs, Annual Student Researchers Conference, 2010.
- 4, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaki, D Mühl., Microparticles in severe sepsis, Annual congress of the Hungarian Medical Association of America, 2010.
- 5, M Krupp, G Woth, D Mühl., Thrombocyte aggregation in septic patients, Annual congress of the Hungarian Medical Association of America, 2010.

- 6, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaci, D Mühl., Mikropartikulumok súlyos szepszisben. *Aneszteziol Intenz Ter.* 2010;40:(Suppl. 1.):9.
- 7, L Bogár, D Mühl, G Woth, M Tőkés-Füzesi., A keringő mikropartikulumok koncentrációváltozása súlyos szepszisben. *Érbetegségek* 2011;18:(Suppl. 1.):8.
- 8, D Mühl, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaci, M Krupp, GL Kovács, L Bogár., Severe sepsis and the amount of blood microparticles *Acta Physiol.* 2011; 202:(Suppl. 684.):84.
- 9, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaci, M Krupp, B Ernyey, E Pető, GL Kovács, L Bogár, D Mühl., The possible benefit of blood microparticle measurements in fungal sepsis. *Acta Physiol.* 2011;202:(Suppl. 684.):129-130.
- 10, D Mühl, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaci, M Krupp, GL Kovács, L Bogár., A trombociták mikropartikulumok mennyiségi változása súlyos szepszis során. In: *Farmakológiai, anatómus, mikrocirkulációs és élettani (FAMÉ) társaságok 2011. évi közös tudományos konferenciája.* Pécs, Magyarország, 2011.06.08-2011.06.11. (Magyar Élettani Társaság) Pécs: p. 221. E12-04.
- 11, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaci, M Krupp, B Ernyey, E Pető, GL Kovács, L Bogár, D Mühl., A mikropartikulum vizsgálatok használata a szepszis diagnosztikájában. In: *Farmakológiai, anatómus, mikrocirkulációs és élettani (FAMÉ) társaságok 2011. évi közös tudományos konferenciája.* Pécs, Magyarország, 2011.06.08-2011.06.11. (Magyar Élettani Társaság) Pécs: p. 221. E12-04.
- 12, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaci, L Bogár, D Mühl., Microparticles in septic shock. In: *ESCHM 2011 : 16th Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation. 30th Annual Conference of the German Society for Clinical Microcirculation and Hemorheology.* p. 142.
- 13, M Krupp, B Ernyey, G Woth, L Bogár, D Mühl., Indukált és spontán thrombocyták aggregáció súlyos szepszisben. *Aneszteziol Intenz Ter.* 2011;41:(Suppl. 1.):27.
- 14, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaci, S Ghosh, M Krupp, GL Kovács, I Vermes, D Mühl, Platelet and endothelial receptor density changes in severe septic patients. *Clin Chem.* 2011;49:(Suppl. 1):S357.

#### **Tézis részét nem képező előadások és poszterek**

- 1, Zs Tucek, B Radnai, B Veres, T Dolowschiák, G Woth, J Pribér, M Schoenberg, F Gallyas jr., A ferulaldehid hatása LPS-indukálta gyulladási folyamatokra egérben. 37. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2007.
- 2, G Woth, A Varga, L Drenkovic, J Lantos, D Mühl., Oxidatív stressz súlyos szepszisben, 4th Annual CROatian Student Summit (CROSS4), 2008.
- 3, G Woth, A Varga, L Drenkovic., Oxidatív stressz súlyos szepszisben, prospektív analízis, University of Pécs, Annual Student Researchers Conference, 2009.
- 4, G Woth, A Varga, L Drenkovic, J Lantos, L Bogár, D Mühl., Oxidatív stressz vizsgálata súlyos szepszisben (pilot study). *Aneszteziol Intenz Ter.* 2009;39:(Suppl.1.):18.
- 5, T Kőszegi, P Kustán, A Ludány, E Györgyi, G Woth, D Mühl, GL Kovács. Urinary orosomucoid in sepsis. 56th annual congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine, 2012, Budapest.
- 6, T Kőszegi, Z Horváth-Szalai, A Ludány, E Györgyi, G Woth, D Mühl, GL Kovács. Serum actin/gelsolin ratio: new biomarker in sepsis? 56th annual congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine, 2012, Budapest.

# Platelet and platelet-derived microparticle studies in severe sepsis

---

Author: Gábor Woth M.D.,

Supervisors: Prof. Gábor L. Kovács M.D. Ph.D.,  
Diana Mühl M.D. Ph.D.

Department of Anaesthesiology and Intensive Care,  
Department of Laboratory Medicine,  
University of Pécs

June, 2013



# List of abbreviations

**ADP:** Adenosine-diphosphate, **ADR:** Adrenaline, **BUN:** Blood urea nitrogen, **COL:** Collagen, **GP:** Glycoprotein, **IL:** Interleukin, **MP:** Microparticle, **PCT:** Procalcitonin, **PMP:** Platelet-derived microparticle, **PS:** Phosphatidylserine, **SAL:** Saline, 0.9% NaCl solution, **SIRS:** Systemic Inflammatory Response Syndrome, **SSC2008:** Surviving sepsis Campaign 2008, **TF:** Tissue factor, **TLR:** Toll-like receptor, **TNF- $\alpha$ :** Tumor necrosis factor-alpha, **VWF:** von Willebrand factor

## Introduction

Although the signs and symptoms of inflammation and sepsis are widely available in historical records, the exact definition of Systemic Inflammatory Response (SIRS) and sepsis were only created in 1991. At least two of the following diagnostic criteria are necessary for the diagnosis of SIRS: hypothermia or hyperthermia (<36°C or >38°C), increased heart rate (>90/min), hyperventilation (respiratory rate >20/min, arterial carbon dioxide pressure < 32 mmHg), white blood cell count > 12000 cell/ul or < 4000 cell/ul. According to the most recent definition, sepsis is the development of SIRS as a result of proved or suspected microbiological infection. The term severe sepsis is used for sepsis complicated with the development of at least one organ dysfunction. Septic shock is defined as hypotension regardless of appropriate fluid challenge and without any different known cause.

Sepsis is usually characterised as a result of a complex, but inappropriate response to pathogen-associated stress. Although our current view emphasise this inappropriate host defence, pathogens also clearly contribute to the development of sepsis through virulence factors. Bacteria harbour cellular elements and ligands to adhere to and colonise epithelial surfaces. The highly conserved innate immune system is responsible for the recognition of the "non-self" and "damaged-self" via pattern recognition receptors. Recognised pathogen-associated molecular patterns and damage-associated molecular patterns are conserved and normally not expressed in healthy hosts. These patterns are present on both Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi and viral limiting membranes or walls, or may develop as new compounds during cellular damage. Leukocytes activated through toll like receptors (TLRs) release pro-inflammatory cytokines, including interleukin-1 $\beta$  (IL), IL-6 and tumour

necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) which activates the innate immune system and surrounding cells leading to further cytokine release (cytokine storm, as referred earlier). Activated leukocytes may leave the circulation and migrate towards damaged tissues, while released pro-inflammatory cytokines induce the production of eicosanoids and platelet-activating factor, further increasing vascular permeability and platelet activation. Also, complement system proteins C3a and C5a anaphylatoxin release from mast cells and basophils increase vascular permeability and smooth muscle contraction.

Altered vascular function is a key contributor to the development of sepsis-related organ failures. Own TLR receptors of the endothelial lining, as well as the presence of inflammatory cytokines activate endothelial cells, decreasing thrombomodulin concentration and increasing TF and plasminogen activator inhibitor-1 presence. Activated endothelial cells provide procoagulant surface and support the sequestration of polymorphonuclear cells. Increased TNF- $\alpha$  concentration supports swelling through endothelial cells, causing local oedema, deterioration of oxygen diffusion and loss of intravascular fluid.

Loss of renal function affects about 50% of severe septic patients. Besides formerly discussed factors, the direct effect of nitric oxide, angiotensin and endothelin on renal tissue is hypothesised. Autoregulated renal circulation is impaired because of increased catecholamine levels, while endothelial damage of renal vessels support microaggregate formation and leukocyte diapedesis towards renal parenchyma, causing tubular cell dysfunction. The development of metabolic acidosis, increasing creatinine and blood urea nitrogen (BUN) levels, finally potassium level increase are the best clinical signs of deteriorating renal function. Acute sepsis-related renal function impairment is assessed by the RIFLE criteria.

In severe sepsis, the classical components of Virchow's triad (increased coagulability, endothelial injury and impaired blood flow) for altered haemostasis are all present (Remick 2007). Released cytokines and activated immune cells vastly contribute to altered coagulation state and shift towards procoagulation in sepsis. Coagulation proteases and anticoagulant proteins may bind to their cellular receptors, modulating cytokine release and cell activation. Endothelial cells may respond to and also release cytokines, while increasing expression of adhesion molecules and growth factors. These factors promote inflammatory response and contribute to tissue factor mediated thrombin generation, dysfunctional anticoagulation and deteriorated inhibition of fibrinolysis.

**Platelet activation and aggregation:** Specific glycoalyx elements of platelet outer surface, called glycoproteins (GP) contribute to various



platelet functions. Principle GPs involved in the main platelet function, haemostasis are GPIb-V-IX and GPIIb-IIIa. While former is involved in platelet shear-stress based activation and in the binding of von Willebrand factor (VWF) and collagen, the latter is responsible for fibrinogen binding of activated platelets and in the formation of platelet aggregates. Classically, platelet aggregation is discussed in 3 consecutive steps: initiation, extension and perpetuation. The initiative activation may rise from exposure of collagen and VWF following vascular wall injury, gathering a monolayer of activated platelets lining the injury site. Collagen acts through  $\alpha 2\beta 1$  and GPVI, increasing platelet  $Ca^{2+}$  through a phospholipase  $Cy2$  mediated way, while VWF activates through GPIb $\alpha$  and  $\alpha 2b\beta 3$  receptors. The initial binding cause a smaller  $Ca^{2+}$  peak in platelets, resulting in the release of adenosine diphosphate (ADP). ADP can act on the  $P2Y_1$  receptors of resting platelets, activating platelets locally in a positive loop in a Gi-protein coupled manner, decreasing intraplatelet cyclic-AMP levels. Following firm adhesion to VWF through  $\alpha 2b\beta 3$ , an increased  $Ca^{2+}$  surge precedes platelet aggregation.

**The formation and role of microparticles (MPs):** The first description of microparticles came from Wolf, in 1967, who first noted them as platelet-dust in platelet free plasma. He proved their procoagulant activity and that this feature is removable by ultracentrifugation. During cell activation, apoptosis or increased shear stress the presence of phosphatidylserine (PS) in the outer leaflet is one of the first signs of this process. According to the "classical" view of MPs production, intracellular  $Ca^{2+}$  increase is the main determinant of MP formation. Calcium-induced degradation of cytoskeleton by calpains and the transient mass difference between membrane leaflets support the formation of MPs and  $Ca^{2+}$  influx following cell activation may inhibit flippase and activate floppase enzymatic activity. Outer membrane composition of MPs in the circulation of mainly platelet origin consists of cholesterol (about 60%), sphingomyelin, phosphatidylethanolamine and PS. In the last more than 20 years MPs were more and more extensively researched in the field of coagulation following the observation of Wolf. Key aspects of this effect are the distribution of TF in the circulation via small vesicles, cell activation and presentation of extensive negative PS surface for the haemostatic system. Following activation and shedding, platelet derived MPs (PMPs) (possibly following TF exchange with monocytes or monocyte-derived vesicles) express TF, surface receptors and ligands able to bind to various cells, including: macrophages, neutrophils and other resting platelets. As reported by del Conde et al., monocyte/macrophage derived vesicles, are able to fuse with activated platelets, through a PS and P-selectin glycoprotein ligand-1

derived pathway. This fusion delivers TF, from TF-rich monocyte-derived particles into TF-sparse platelets, resulting in TF-harboring platelets. These activated platelets are hypothetically capable to provide all factors of haemostasis. According to the observation of Koppler and Gasser, MPs released in early phases of inflammation express inhibitory effects through transforming growth factor beta-1, IL-10 and attenuation of IL-8 and tumor TNF- $\alpha$  release, but have pro-inflammatory function later. This pro-inflammatory state is maintained by CCR3, CCR4 delivery and IL-6 release stimulation. Protective role of MPs and their possible role in cellular "waste-management" was demonstrated by Abid-Hussein et al. They found caspase-3 in vesicles released from viable endothelial cells, while the inhibition of caspase-3 containing vesicle release resulted in subsequent cellular apoptosis. This finding suggests the pivotal role of vesicles in cell survival following stress. Increased microparticle levels from different bodily fluids were reported in a large variety of diseases, but the exact role of vesicle formation and presence is still not completely elucidated.

## Aims

### **Platelet aggregation in severe sepsis:**

- 1, We aimed to evaluate the platelet aggregation alteration characteristics in severe sepsis.
- 2, We tried to assess the connection between reduced platelet count and measurable platelet function in severe sepsis.
- 3, We also aimed to assess the role of spontaneous platelet aggregation in severe septic patients.

### **Microparticle studies in severe sepsis:**

- 1, We assessed the effect of different infectious agents on microparticle characteristics.
- 2, We aimed to provide further data regarding elevated microparticle levels in septic patients.
- 3, We evaluated the connection between developed sepsis-related organ failures and microparticle levels.

## Methods

Our patient inclusion criteria were recently discovered severe sepsis (within 24 hours) with two or more sepsis-related organ dysfunctions. Criteria for sepsis included the abovementioned sepsis criteria and C-reactive protein levels above 10mg/l and procalcitonin (PCT) levels above 2 ng/ml, and 5 ng/ml in the fungal MP study. In our studies patients in moribund state or with any kind of haematological baseline disease such as myeloproliferative disorders like lymphoma or leukaemia, cytostatic treatment in the last 30 days, high dose prolonged steroid medication, patients with disseminated intravascular coagulation score >5, drugs known to alter platelet functions (i.e. acetylsalicylic acid), platelet transfusion during the study period were excluded. For the platelet aggregation study 3 × 2.7 ml Na<sub>3</sub>-citrate anticoagulated blood was gathered from our patients, for the MP studies 2 × 2.7 ml Na<sub>3</sub>-citrated blood was gathered. Platelet tests were carried out using the Carat TX4 light transmission aggregometer using adrenaline (ADR, 10 µmol), ADP (10 µmol), collagen (COL, 2 µg/ml) and normal saline (SAL) as inducers. Microparticles were isolated by multiple centrifugation steps, including a 10 minutes 18000 g step to pellet microparticles from platelet-free plasma. Particles surface PS was labelled by annexin V, cell-line specific antigens were labelled by fluorescent monoclonal antibodies. Constitutively expressed platelet fibrinogen receptor subunits, GPIIb-IIIa were measured by the CD41 and CD61 antibodies respectively. Activated platelet marker, fibrinogen binding form of α2bβ3 was assessed by the PAC1 antibody. Platelet adhesion receptor GPIb- V-IX has been tested with anti-IX (CD42a) labelling. Flow cytometry measurements and data analysis were performed on our FC 500 flow cytometer with CXP software. The MP gate was defined in order to distinguish the true events from electronic noise and background, using 0.3 µm, 0.5 µm and 1.0 µm FITC labelled microbeads (a kind gift of SoftFlow Ltd., Pécs, Hungary). Side scatter, forward scatter and fluorescence channels were set in logarithmic scale. MP size gate was determined between 0.5 µm and 1.0 µm size range. Events in the MP gate were further discriminated by labelling with annexin V. MPs were defined as annexin V positive events in the MP gate with fluorescence intensity above the isotype control. For thrombocytopenia we utilised the criteria of the Surviving Sepsis Campaign 2008 (SSC2008) of 100000 cells/µl. For microbiological assessment we used standard blood cultures. Acute sepsis-related kidney injury was defined by the Injury category of the RIFLE criteria (serum creatinine normal × 2, >50% deteriorated filtration rate, or urine production <0.5ml/bwkg/h).

## Results

**Platelet aggregation study:** Forty-five patients were included in our platelet aggregation study. The evaluation of platelet aggregation in septic patients compared to healthy controls (n=30) revealed a significant deterioration in the inducible aggregation among septic patients ( $p<0.05$ ), while SAL based aggregation showed a significant increase in the platelet function of septic patients ( $p<0.001$ ). On admission 19 patients were in the low platelet count range and 26 patients formed the normal platelet count group according to the thrombocytopenia criteria of SSC2008. We did not find significant difference in clinical and demographical data of these patient groups. ADP induced platelet aggregation was significantly deteriorated in patients with low platelet count in all 5 days ( $p<0.05$ ). ADR caused aggregations were lower in the 2nd, 3rd, 4th and 5th consecutive day ( $p<0.05$ ) in the low platelet count group. COL induced aggregation was significantly lower on the 1st, 2nd, 3rd days following admission ( $p<0.05$ ). There was no difference between the two groups based on the SAL aggregation. Compared to our control group most aggregations measured in the normal platelet group were significantly lower than the control results with the exception of the adrenaline inducible aggregation on the 3rd, 4th, 5th days and ADP induced aggregation on the 5th day ( $p<0.05$ ). The low platelet group had significantly deteriorated aggregation levels with all inducers in all cases ( $p<0.001$ ) compared to controls. Fourteen patients deceased during our study and 31 patients built up the survival group. Non-survivors showed no significant deterioration in platelet count ( $p>0.05$ ). All induced and saline aggregation measurement results, when compared to survivors were not significantly different in non-survivors (Figure 4.3). The spontaneous aggregation group (14 patients) revealed a non-significant difference in platelet counts compared to the non-spontaneous aggregation group. The non-spontaneous aggregation group showed a significantly higher, but constantly decreasing PCT levels on the 1st, 3rd, 4th consecutive days. Lactate levels were also non-significantly lower in the spontaneous aggregative patients during our study (Figure 4.4). Also, we assessed if the presence of corticosteroids in patient therapy has any effect on platelet aggregation, but did not find significant difference in inducible or spontaneous aggregation results. Of all 36 patients with proven infections, only 7 patients presented Gram-negative bacteria only. According to our analysis, the presence of Gram-negative bacteria did not contribute to spontaneous aggregation significantly.

**Microparticles in sepsis:** During our first microparticle study 57 patients were eligible according to our inclusion criteria, but only 33 patients gave an informed consent. Eight patients refused participation following detailed information about our study. 16 patients were excluded based on our criteria, after the reassessment of patient history (mainly because of platelet inhibitor use or prolonged steroid therapy). Age, survival data, laboratory markers on admission and calculated clinical scores did not differ significantly between the mixed fungal and non-fungal septic patient groups. Also, age and gender characteristics of the volunteer group showed non-significant difference compared to the septic, mixed fungal and non-fungal groups. Clinical data did not differ in mixed fungal and non-fungal septic patients. Also, clinical scores did not show significant change during our study period. Six patients comprised the mixed fungal septic group and 27 patients were in the non-fungal septic group. Microbiological identification proved *C. albicans* species in all six fungal septic patients. Two patients of the mixed fungal septic group and 5 from the non-fungal septic group died during the study period. Upon admission total annexin V<sup>+</sup> MPs and CD41<sup>+</sup> PMPs were elevated in both the mixed fungal and in the non-fungal septic group compared to our volunteer group. Most MPs (above 60% average) were positive for constitutive platelet antigen CD41, therefore recognised as PMPs. While mixed fungal septic patients showed elevated annexin V<sup>+</sup> MP number throughout our study with a slight decrease on the 3rd day, the non-fungal septic patients showed constantly decreasing MP numbers during our study period. The elevation was significant in mixed fungal compared to non-fungal septic patients on the 1st study day ( $p < 0.05$ ). The CD41 positive PMP numbers were decreasing until day 5 in non-fungal septic patients and were constantly elevated in the mixed fungal septic group. The elevation was statistically significant on the 1st day ( $p < 0.05$ ). CD61 results were statistically identical to CD41 results in all measurements. While CD42a<sup>+</sup> PMP numbers were negligible in the non-fungal group and in controls, mixed fungal septic patients showed significantly elevated numbers in all measurements with a steep elevation until day 5 ( $p < 0.05$ ). Mixed fungal septic patients presented a wide range of CD42a<sup>+</sup> particles. Although PAC1<sup>+</sup> PMPs numbers showed a slight decrease and marked variety until day 5 in fungal septic patients, this group of patients had significantly elevated numbers of PAC1 positive PMPs in the 1st and 5th study days compared to non-fungal septic patients. Non-fungal patients had low numbers of PAC1 positive PMPs ( $p < 0.05$ ). Receiver operator characteristic curves calculated on the presence of mixed fungal sepsis in patients using all data of PAC1 and CD42a MP measurements, revealed an area under the curve of 0.857 and 0.897 respectively. The

evaluation of different bacterial sources (Gram-negative or Gram-positive bacteria) in the non-fungal septic group resulted in no significant differences of PMPs from various bacterial infection origins. Also, platelet counts in different groups (fungal, non-fungal or Gram-negative and Gram-positive) did not differ significantly throughout our study period.

After patient data and flow cytometry result reassessment, we included data from 37 severe septic patients from the 65 known cases in our next study. In this study we focused on sepsis outcome, the presence of various organ dysfunctions and the connection with microparticle profile. Most patients suffered from renal disorder besides haemodynamic impairment on inclusion; therefore we focused our data assessment on this organ dysfunction. The control groups age and gender did not differ significantly from the septic patient group. The measurement of microparticle numbers in severe septic patients compared to controls revealed a significant increase of annexin V and CD41 positive microparticles in severe septic patients during the whole study period ( $p < 0.001$ ). CD42a positive particles showed a constant elevation in severe septic patients ( $p < 0.001$ ). We also found elevated PAC1 positive particle numbers in severe sepsis, but a steady decrease is notable from day 1 towards day 5 ( $p < 0.05$ ). The presence of CD41, CD42a, and PAC1 positive particles showed no correlation with actual platelet numbers.

According to our results, survivor and non-survivor patient results, assessing 7 days and 28 days mortality showed no significant difference in annexin V, or specific marker positive MP results ( $p > 0.05$ ).

Our results showed, that actual number of organ failures do not have a direct effect on total annexin V<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup> or CD14<sup>+</sup> microparticle count. The assessment of the effect of sepsis-related organ failures on microparticle numbers revealed, that patients with acute sepsis-related renal injury on admission have significantly different MP numbers compared to patients without renal impairment. To concentrate our assessment on the new onset renal injury in septic patients, we excluded 4 patients from the assessment of sepsis-related renal injury; as according to patients' history, they suffered from chronic, renal function altering illnesses. Total annexin V positive, as well as CD41<sup>+</sup> and CD13<sup>+</sup> particle numbers were significantly elevated in patients with renal injury on inclusion. Although patients presented a wide variety of total MP numbers, patients with renal injury showed significantly increased MP numbers on inclusion and a slight decrease of MP numbers on day 3. Patients without renal injury had a continuous elevation of MP numbers during our study period ( $p < 0.05$ ). Patients without renal injury showed a steady non-significant increase of CD41<sup>+</sup> particles, while sepsis-related renal injury patients had elevated

CD41<sup>+</sup> MP numbers on admission already. Also, CD13 harbouring particles were significantly elevated on admission in patients with renal impairment ( $p < 0.05$ ) and patients without renal failure showed elevating MP numbers. Summarised data from our study measurements showed, that the presence of CD42a<sup>+</sup> particles in patients with acute renal injury correlated negatively with measured blood urea nitrogen and creatinine concentrations (respectively:  $p < 0.05$ ,  $r = -0.835$ ,  $r = -0.569$ ). We carried out the same detailed assessment of other severe sepsis-related organ dysfunctions (arterial hypotension despite of fluid therapy, consciousness disorder, respiratory insufficiency, thrombocytopenia/blood marrow insufficiency, liver function), based on clinical assessment and laboratory data. Statistical analysis of these groups revealed that MP, particularly PMP numbers do not show significant difference in these severe sepsis-related organ dysfunctions in our study setting.

## Discussion

The primary objective of our first study was to evaluate the alterations of inducible aggregation in severely septic patients and determine its usefulness as a predictor of overall mortality. Former platelet function tests utilising flow cytometry presented the loss of platelet function in patients developing multiple organ dysfunction syndrome. Our data shows a significant deterioration in ADR, ADP, and COL inducible aggregation compared to the control group but no change was observed during the 5-day period. Yaguchi et al. showed a loss of inducible platelet aggregation in patients with severe sepsis in contrast with other studies suggesting increased platelet function in trauma based septic shock patients. In concordance with Yaguchi's findings, our study found a similar decrease in aggregation among severe septic patients. According to Lundhal et al. more "active" platelets are activated and consumed in the early stage of sepsis therefore platelet function should decrease during critical illness.

In our data survivor and non-survivor patient groups did not show significantly different inducible or spontaneous aggregation. As platelet sequestration may develop in the circulation of severe septic patients, we think that this result cannot disprove or support the theory of Eisen, but prove that this platelet aggregation measurement could not be recommended for mortality prediction.

Until now, studies have not reflected the use of saline as an alternative to inductors used for the measurement of spontaneous aggregation in

severely septic patients, although saline was used to assess spontaneous aggregation in former studies. Using saline as "inducer" in Born's optical method showed significant aggregate formation in a group of severely septic patients compared to healthy controls. Increased PCT levels in the non-spontaneous group hypothesise that members of this group may had a more severe state compared to the spontaneous group. Lactate levels did not differ significantly in the spontaneous groups. Although we are aware of the low sensitivity and specificity of lactate levels, we hypothesise that microcirculation and tissue oxygenisation was not significantly different in both groups. The lack of lactate difference and steady decrease in both groups may rise from appropriate fluid and supportive therapy.

Besides haemostasis and particularly aggregation, the role of platelets in early host defence and inflammation is long debated. Yeaman et al. discussed platelet reactions to endothelial injury and for the presence of microbial agents extensively (Yeaman 2010). Bacteria and fungi are known to activate platelets, following activation platelets can act directly by adhering to the endothelial wall or to the pathogen, forming aggregates. Also, antimicrobial proteins are released from platelets. These proteins, like thrombocidins are highly effective against certain bacterial and fungal strains while others successfully developed resistance against them. The increase of platelet activation markers and adhesive platelet markers on PMP surfaces may indicate platelets' contribution in early host defence.

Formerly, there was a notable inconsistency in MP data from severe septic patients. Joop et al. reported the decrease of MPs from various origins (platelet, erythrocyte, endothelial cells, granulocytes) in multiple organ dysfunction and sepsis, compared to healthy controls, while in another paper Nieuwland et al., found increased vesicle numbers in meningococcal sepsis. Our data support the model of increased numbers of PMPs compared to volunteers in sepsis. We have shown, that compared to severe bacterial sepsis, severe sepsis with mixed fungal infection contributes to more increased PMP levels in our multidisciplinary ICU setting. We think our MP measurement based PAC1<sup>+</sup> and CD42a<sup>+</sup> PMP measurements can provide valuable additional information on mixed fungal sepsis prone patients following the admission to the intensive care unit.

The results of our results are in concordance with Mostefai et al. who also reported increased MP numbers from septic patients compared to controls. Soriano also found elevated MP numbers in survivor septic patients, but no difference in PMP between patients and controls. As stated before, a main goal in this study was to determine MP numbers in the presence of organ dysfunctions. We provide evidence that the overall number of organ failures have no measurable effect, neither on the total MP numbers, nor



on amounts of various MP subgroups. After the assessment on the effect of various organ failures on MPs, patients with renal dysfunction on study inclusion showed overall MP, PMP and myeloid MP increase. The activation of the innate immune system and infiltration of the kidney by monocytes and macrophages contributes to sepsis-related renal failure. Monocyte-derived microparticles are a main source of blood-born TF and carry high amounts of phosphatidylserine. Elevation of these microparticles can cause increased clot formation and obstructions in kidney vessels. CD13 supports monocyte/endothelial adhesion, therefore increased number of CD13<sup>+</sup> particles may aid the trafficking of monocytes, infiltration of the kidneys and local TF concentration increase. Blood flow may deteriorate in infiltrated tissue, increasing tissue hypoxia through local coagulation and cytokine release. Elevated CD42a PMPs are described in active vasculitis based acute kidney failure. Negative correlation between BUN and creatinine concentrations and low levels of circulating CD42a PMPs may indicate attachment of platelets to the damaged renal endothelial surface, promoting vascular dysfunction resulting elevated BUN and creatinine concentrations. In our study most pronounced differences regarding renal dysfunction were observed on inclusion. Patients admitted to the intensive care unit receive extensive fluid therapy and a large variety of medications, which may explain the loss of the on-admission significant differences of various microparticle groups.

## Novel findings

### **Novel findings of the platelet aggregation study:**

- 1, Inducible platelet aggregation measurements cannot be recommended for severe sepsis mortality prediction.
- 2, This study was the first to provide evidence on the presence of increased spontaneous platelet aggregation in severe septic patients.
- 3, Our results provided further evidence on the direct proportion of platelet count and inducible platelet aggregation results.

### **Novel findings of the microparticle studies:**

- 1, We provided further evidence on increased MP levels in severe sepsis.
- 2, Our clinical study was the first which showed the MP profile difference in patients with severe sepsis complicated with fungal (*C. albicans*) infection. This finding could help the development of a future early diagnostic test based on MPs.

3, Our novel approach revealed that there is no direct connection between the number of organ failures and MP numbers.

4, Data from our second study support the contribution of MPs in the development of sepsis-related acute kidney injury.