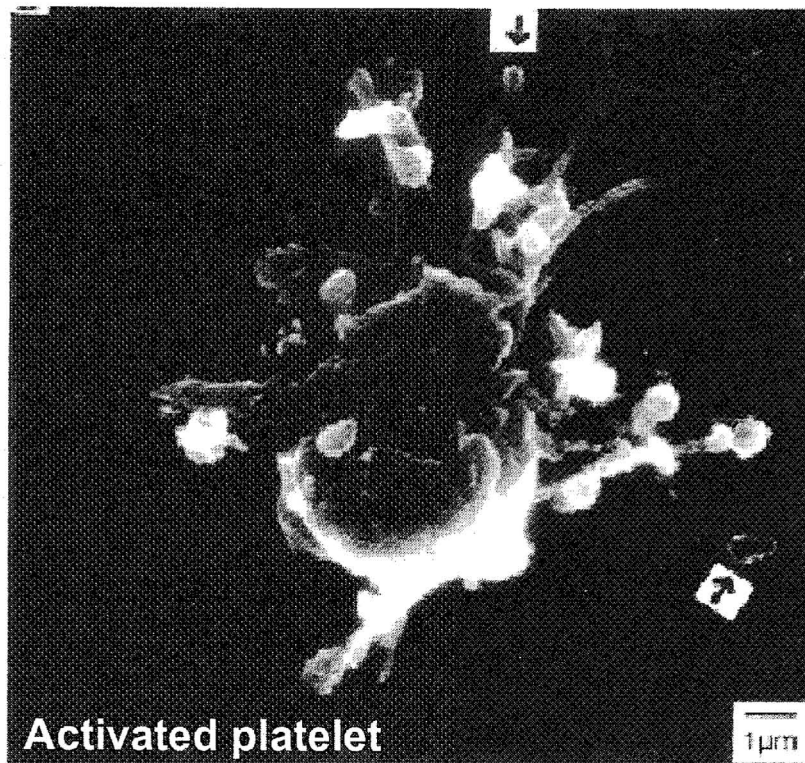


3793077

Scrip die Bm 2004-40

**Het effect van invriezen en centrifugeren op de expositie van  
negatief geladen fosfolipiden, het aantal, en de pro-  
coagulante eigenschappen van micropartikels**

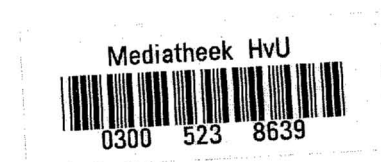


Naam: Sue Ellen Verbrugge  
Quellijnstraat 56 I  
1072XT Amsterdam

Begeleiders: É. Biró, R. Nieuwland en W. van Koningsbruggen

Laboratorium Experimentele Klinische Chemie, Academisch Medisch Centrum,  
Universiteit van Amsterdam

28 mei 2004 te Amsterdam



## Voorwoord

Ter afronding van mijn opleiding Medische Biologie aan de Hogeschool van Utrecht heb ik mijn afstudeeropdracht uitgevoerd bij de Laboratorium Experimentele Klinische Chemie van het Academisch Medisch Centrum in Amsterdam. De periode liep van begin januari 2004 tot eind mei 2004.

Aangezien ik mijn klinische stage nog niet heb gedaan, was dit voor mij de eerste kennismaking met het werken op een echt laboratorium.

Ik heb tijdens deze periode veel nieuwe en interessante dingen geleerd, waar ik in mijn toekomstige carrière nog veel aan zal hebben.

Bij dezen wil ik nog een aantal mensen bedanken voor de prettige samenwerking en de hulp die ze hebben geboden tijdens mijn werk. Voornamelijk Marianne Schaap, René Berckmans, Dennis Snoeck, Loes Pronk, Anita Böing, Chi Hau, Yung Ko, en Guus Sturk.

Verder wil ik ook mijn stagebegeleiders Rienk Nieuwland en Éva Biró bedanken voor de goede begeleiding.



## Samenvatting

Doel van dit onderzoek is het bestuderen van het effect van invriezen en/of centrifugeren op de expositie van negatief geladen fosfolipiden, het aantal, en de stollingsbevorderende eigenschappen van micropartikels.

Er is gekeken naar micropartikels van zes vrijwilligers en vier cardiochirurgische patiënten. Met de flowcytometrische analyse is er gekeken naar de cellulaire herkomst, het aantal micropartikels en hun grootte en expositie van negatief geladen fosfolipiden. De bepalingen zijn gedaan op vers materiaal waarbij de micropartikels wel of niet zijn afgedraaid en/of gewassen, en ingevroren materiaal met en zonder afdraaien van de micropartikels, of gewassen. De stollingsactiviteit van de micropartikels is onder dezelfde omstandigheden met de fibrine generatie test bepaald.

De resultaten wijzen erop dat zowel het invriezen als het centrifugeren de expositie van negatief geladen fosfolipiden van alle geteste soorten micropartikels doet toenemen. Er is fragmentatie en verlies van plaatjes micropartikels. Er is geen effect op de stollingsactiviteit *in vitro*.

Er kan uit dit onderzoek geconcludeerd worden dat men vanwege de getoonde effecten van invriezen en afdraaien, rekening moet houden bij de interpretatie bij dit soort studies.

## Summary

The aim of this study was to determine the effect of freezing and pelleting microparticles on their numbers and size and their exposure of negatively charged phospholipids. The effect on their procoagulant property was also analysed. Microparticles of six healthy individuals and four patients undergoing cardiac surgery were studied.

The flow cytometric analysis was used to determine the cellular origin, the number of microparticles and their size and exposition of negatively charged phospholipids. They were tested under different conditions. Fresh plasma, not pelleted; fresh plasma pelleted; fresh plasma, washed (microparticles) and frozen/thawed plasma not pelleted; frozen/thawed plasma pelleted; frozen/thawed plasma washed. With the fibrin generation test the procoagulant activity of the microparticles was determined under the same conditions.

Both freezing and pelleting increase the exposure of negatively charged phospholipids and platelet derived microparticles are fragmented and lost. There is no effect on their *in vitro* procoagulant activity.

We conclude that these effects should be considered in interpretations of results in these types of studies.

# Inhoudsopgave

|                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Voorwoord.....</b>                                                                                                 | <b>3</b>  |
| <b>Samenvatting .....</b>                                                                                             | <b>4</b>  |
| Summary .....                                                                                                         | 4         |
| <b>Inhoudsopgave .....</b>                                                                                            | <b>5</b>  |
| <b>Lijst van afkortingen .....</b>                                                                                    | <b>6</b>  |
| <b>Inleiding .....</b>                                                                                                | <b>7</b>  |
| Vorming en samenstelling van micropartikels.....                                                                      | 8         |
| <i>Activatie.....</i>                                                                                                 | <i>9</i>  |
| <i>Apoptose.....</i>                                                                                                  | <i>9</i>  |
| De pro-coagulante eigenschappen van micropartikels .....                                                              | 10        |
| <i>Mechanisme van bloedstolling.....</i>                                                                              | <i>10</i> |
| <i>Hemostase en trombose: micropartikels en hun pro-coagulante eigenschappen .....</i>                                | <i>10</i> |
| Detectie van micropartikels en analyse van hun stollingsbevorderende eigenschappen .....                              | 12        |
| <i>Flowcytometrie.....</i>                                                                                            | <i>12</i> |
| <i>Fibrine generatie test (FGT) .....</i>                                                                             | <i>12</i> |
| Doel van deze studie .....                                                                                            | 13        |
| <b>Materiaal en methoden .....</b>                                                                                    | <b>14</b> |
| Titratie antistoffen en annexine V voor de fibrine generatie test.....                                                | 14        |
| Bloedafname en monsterbereiding.....                                                                                  | 24        |
| Flowcytometrische analyse.....                                                                                        | 25        |
| Fibrine generatie test .....                                                                                          | 28        |
| <b>Resultaten .....</b>                                                                                               | <b>32</b> |
| Titratie antistoffen en annexine V voor de fibrine generatie test.....                                                | 32        |
| De cellulaire herkomst van de micropartikels, hun aantal, en expositie van negatief geladen fosfolipiden .....        | 35        |
| <i>Vergelijken van de aantallen en annexine V positiviteit van de micropartikels in de verschillende buffers.....</i> | <i>35</i> |
| <i>Micropartikels van gezonde vrijwilligers .....</i>                                                                 | <i>37</i> |
| <i>Micropartikels van cardiochirurgische patiënten .....</i>                                                          | <i>39</i> |
| Procoagulante eigenschappen van de micropartikels .....                                                               | 41        |
| <b>Discussie .....</b>                                                                                                | <b>43</b> |
| <b>Conclusie(s) .....</b>                                                                                             | <b>44</b> |
| <b>Literatuurlijst .....</b>                                                                                          | <b>45</b> |
| <b>BIIJLAGEN.....</b>                                                                                                 | <b>47</b> |

## Lijst van afkortingen

|         |                                                                                                                                                                                                     |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Afgedr. | Afgedraaid                                                                                                                                                                                          |
| AnV     | Annexine V                                                                                                                                                                                          |
| APC     | Allophycocyanin                                                                                                                                                                                     |
| aTF     | Anti Tissue Factor                                                                                                                                                                                  |
| aVII    | Anti factor VII                                                                                                                                                                                     |
| aXI     | Anti factor XI                                                                                                                                                                                      |
| aXII    | Anti factor XII                                                                                                                                                                                     |
| aIX     | Anti factor IX                                                                                                                                                                                      |
| Ca      | Calcium                                                                                                                                                                                             |
| CD      | "Cluster of differentiation": Een antigeen herkend door een bepaalde groep monoclonale antistoffen. Zowel het antigeen als de antistoffen ertegen worden met "CD" gevolgd door een getal aangeduid. |
| CD14    | Receptor for lipopolysaccharide (monocyten merker)                                                                                                                                                  |
| CD61    | Glycoprotein IIIa (bloedplaatjes merker)                                                                                                                                                            |
| CD66e   | Carcinoembryonic antigen (granulocyten merker)                                                                                                                                                      |
| FGT     | Fibrine generatie test                                                                                                                                                                              |
| FITC    | Fluorescein Isothiocyanate                                                                                                                                                                          |
| Gepel.  | Gepelleteerd                                                                                                                                                                                        |
| GPA     | Glycoforine A (erythrocyten merker)                                                                                                                                                                 |
| PC      | Fosfatidylcholine                                                                                                                                                                                   |
| -PE     | Phycoerythrin                                                                                                                                                                                       |
| PE      | Fosfatidylethanolamine                                                                                                                                                                              |
| K       | Kaoline                                                                                                                                                                                             |
| KT      | Kamertemperatuur                                                                                                                                                                                    |
| MP      | Micropartikel(s)                                                                                                                                                                                    |
| MW      | Molecular Weight                                                                                                                                                                                    |
| onv.    | Onverdund                                                                                                                                                                                           |
| PS      | Fosfatidylserine                                                                                                                                                                                    |
| ROCK I  | Rho-associated coiled coil-forming protein kinase I                                                                                                                                                 |
| Throm   | Thromborel                                                                                                                                                                                          |
| TGT     | Trombine generatie test                                                                                                                                                                             |
| TF      | Tissue factor (weefselfactor)                                                                                                                                                                       |
| Vrijw.  | Vrijwilliger                                                                                                                                                                                        |

## Inleiding

Micropartikels werden voor het eerst beschreven in 1967 door P. Wolf<sup>1</sup>. Hij deed toen verslag van pro-coagulante fragmenten van bloedplaatjes in plasma, en heeft ze "plaatjesstof" genoemd. Sindsdien is het bekend geworden dat ook andere typen cellen, zoals erythrocyten, leukocyten, en endotheelcellen, micropartikels kunnen afsnoeren. Dit gebeurt zowel bij activatie van de cellen, als bij celdood.

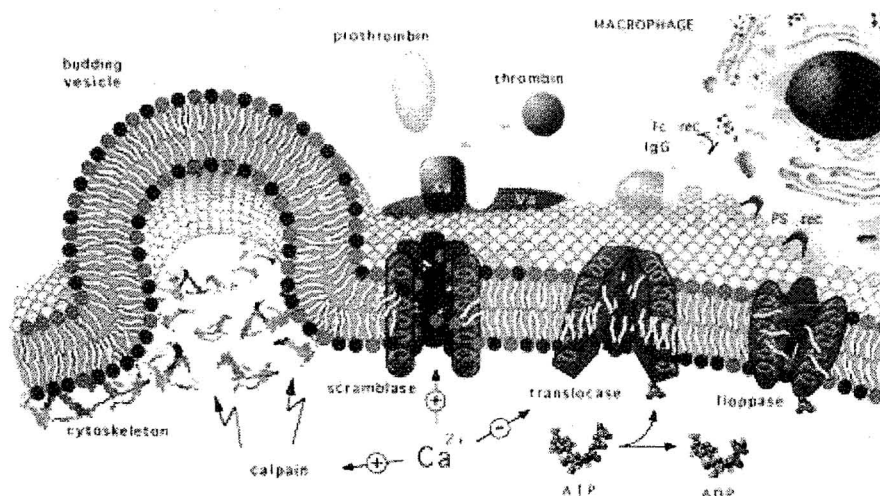
Micropartikels zijn kleine membraan vesicles (100 – 1000 nm) omgeven door een dubbele laag lipiden. Ze bevatten ook diverse eiwitten. Ze spelen o.a. een rol in bloedstolling, ontsteking, en endotheel dysfunctie, processen die allemaal betrokken zijn bij de pathogenese van hart en vaatziekte<sup>2</sup>. Een diepere kennis van de rol van micropartikels in bloedstolling, ontsteking en bij endotheel dysfunctie zou uiteindelijk kunnen leiden tot nieuwe preventieve en therapeutische mogelijkheden bij hart- en vaatziekten.

Er zijn uiteraard verschillende technieken die worden gebruikt bij het onderzoek naar micropartikels, zoals flowcytometrie, ELISAs, diverse functionele assays, enz. Onderzoek naar het aantal circulerende micropartikels en hun eigenschappen wordt echter bijna altijd gedaan op micropartikels die vooraf ingevroren zijn geweest en/of geïsoleerd door een aantal centrifugatiestappen. Het invriezen en het centrifugeren van micropartikels zijn beide processen die flip-flop kunnen veroorzaken in het membraan van de micropartikels, d.w.z. verplaatsing van negatief geladen fosfolipiden van de binnenkant van het membraan naar de buitenkant. Geëxposeerde negatief geladen fosfolipiden spelen een belangrijke rol in de bloedstolling, het is dus mogelijk dat micropartikels die vooraf ingevroren of afgedraaid zijn geweest een artificieel verhoogde stollingsactiviteit vertonen. Ook kan het zo zijn dat er door het invriezen of afdraaien fragmentatie optreedt van de micropartikels. Invriezen of afdraaien kan dus de resultaten van studies naar de samenstelling of functie van micropartikels degelijk beïnvloeden, maar het effect van deze experimentele handelingen is tot nu toe nooit onderzocht.

Doel van deze studie was derhalve het bestuderen van het effect van invriezen en/of afdraaien van micropartikels op hun expositie van negatief geladen fosfolipiden, aantallen, en pro-coagulante eigenschappen.

## Vorming en samenstelling van micropartikels

Micropartikels worden gevormd uit het celmembraan van de moedercel. Het celmembraan van eukaryote cellen bestaat uit een dubbele laag lipiden waarin glycoproteïnen liggen ingebed. De samenstelling van de binnenlaag en buitenlaag is verschillend. Er is een asymmetrische verdeling van de fosfolipiden waarbij in de buitenlaag merendeels neutrale fosfolipiden (fosfatidylcholine en sfingomyeline) te vinden zijn, en de negatief geladen fosfolipiden (fosfatidylserine en fosfatidylethanolamine) voornamelijk in de binnenlaag zitten. Deze asymmetrie wordt in stand gehouden door twee eiwitten: het ATP-afhankelijke aminofosfolipide translocase, dat zorgt voor het transport van fosfatidylserine en fosfatidylethanolamine van de buitenlaag naar de binnenlaag, en het eiwit floppase, dat zorgt voor het (veel langzamere) ATP-afhankelijke transport van neutrale en negatief geladen lipiden van de binnen- naar de buitenlaag<sup>3</sup>.



**Figuur 1 : Celmembraan**

Bij verhoging van de intracellulaire calcium concentratie (als gevolg van stimulatie van de cel) wordt het aminofosfolipide translocase geremd en het calcium-afhankelijke eiwit scramblase geactiveerd. Het eiwit scramblase transporteert alle fosfolipiden snel in beide richtingen, met als gevolg het verlies van de asymmetrische verdeling van fosfolipiden. Dit proces is bekend als de flip-flop van de lipiden<sup>3</sup>.

Tegelijkertijd met de flip-flop van het membraan van de moedercel worden de micropartikels afgesnoerd, maar het is in de literatuur nog omstreven of deze micropartikels een symmetrische of asymmetrische verdeling van fosfolipiden hebben.

Micropartikels bevatten ook diverse eiwitten. Deze eiwitten zijn deels van de moedercel afkomstig en bevatten ook celspecifieke merkers (antigenen), waardoor de cellulaire herkomst van de micropartikels kan worden bepaald.

## **Activatie**

Activatie van cellen met diverse agonisten kan tot het afsnoeren van micropartikels leiden. Bekende agonisten bij bloedplaatjes zijn o.a. trombine, de calcium ionophore A23187, ADP en collageen, het complement complex C5b-9, of hoge shear stress; bij monocyten, endotheelcellen en gladde spiercellen bacteriële lipopolysaccharides, cytokines en het C5b-9 complex; en bij erythrocyten A23187 en het C5b-9 complex<sup>4</sup>.

Bij het afsnoeren van micropartikels lijkt het verhogen van de cytosolaire concentratie calcium ionen een voorwaarde te zijn evenals het (deels) afbreken van het membraanskelet van de cel. Door de verhoogde calcium concentratie worden diverse kinases en calpaïne, een cytosolair calcium-afhankelijk protease, geactiveerd, en mede door calpaïne worden de eiwitten van het membraanskelet afgebroken<sup>2</sup>.

## **Apoptose**

Apoptose wordt gekarakteriseerd door morfologische veranderingen, DNA fragmentatie, expositie van PS in de buitenlaag van het celmembraan en afsnoering van membraan "blebs" oftewel micropartikels. Dit laatste is afhankelijk van de activatie van de kinase ROCK I<sup>2</sup>, die tijdens apoptose door caspases wordt geactiveerd. ROCK I speelt een rol bij het genereren van kracht (via actine en myosine) die nodig is voor het afsnoeren van de partikels.

Micropartikels gevormd tijdens apoptose hebben mogelijk een andere grootte en fosfolipiden- en/of eiwitsamenstelling, vergeleken met micropartikels die tijdens celactivatie worden gevormd.

## **De pro-coagulante eigenschappen van micropartikels**

Micropartikels spelen een rol bij diverse fysiologische en pathofysiologische processen zoals bloedstolling, ontsteking, activatie van diverse cellen, en transport en overdracht van diverse moleculen<sup>5</sup>. Deze studie is gericht op hun pro-coagulante eigenschappen.

### ***Mechanisme van bloedstolling***

De stolling wordt in vivo geïnitieerd door weefsel factor (TF). Het complex van TF en geactiveerde factor VII (VIIa) activeert een deel van de factor X en factor IX. Factor Xa draagt bij aan het activeren van factor IX door het TF-factor VIIa complex, en zet een klein deel van de protrombine om in trombine. Trombine activeert vervolgens factor V en factor VIII, die nodig zijn voor het vormen van het intrinsic tenase complex (complex van factor IXa, VIIa en calcium ionen op een oppervlak van negatief geladen fosfolipiden) dat factor X naar Xa activeert, en het protrombinase complex (complex van factor Xa, Va en calcium ionen op een oppervlak van negatief geladen fosfolipiden) dat protrombine naar trombine omzet. Door de activiteit van de intrinsic tenase en protrombinase complex wordt de omzetting van protrombine tot trombine vele malen versneld. Trombine zet vervolgens fibrinogeen om in fibrine + factor XIII: cross-linking. Trombine kan ook factor XI naar factor XIa activeren, die vervolgens factor IX activeert. In vivo lijkt factor XII geen rol te spelen in de stolling<sup>6</sup>.

In vitro kan de stolling via de intrinsieke en de extrinsieke stollingsweg verlopen. De extrinsieke stollingsweg wordt geïnitieerd door TF, en wordt ook naar verwezen als de TF-afhankelijke stollingsweg. De intrinsieke stollingsweg komt op gang bij contact met een negatief geladen oppervlak. Factor XII wordt omgezet in XIIa wat versneld wordt door een complex van kallikreïne en hoog-moleculair kininogeen. Factor XII activeert factor XI.

### ***Hemostase en trombose: micropartikels en hun pro-coagulante eigenschappen***

Zoals hierboven beschreven, zijn er drie essentiële componenten voor de bloedstolling: stollingsfactoren, een oppervlak waaraan ze complexen kunnen vormen en calcium ionen. Micropartikels kunnen de bloedstolling bevorderen door expositie van negatief geladen fosfolipiden en onder bepaalde condities ook TF exposeren. Er zijn meerdere aanwijzingen dat ze de bloedstolling inderdaad kunnen bevorderen.

Er zijn meerdere aanwijzingen dat micropartikels inderdaad stollingsbevorderend kunnen zijn:

Er zijn verhoogde aantallen micropartikels gevonden bij verschillende ziektebeelden die gepaard gaan met een trombo-embolische tendens, bijvoorbeeld heparine-



geïnduceerde trombocytopenie<sup>7</sup>, patiënten met lupus anticoagulans<sup>8</sup>, cerebrovasculaire aandoeningen<sup>9</sup>, acuut coronaire syndroom<sup>10,11</sup>, en cardiochirurgie patiënten<sup>12</sup>. Ook zijn er verlaagde aantallen micropartikels gevonden bij bepaalde ziektebeelden met een bloedingsneiging, zoals Scott syndroom<sup>13</sup> en Glanzmann's thrombasthenia<sup>14</sup>.

Micropartikels geïsoleerd uit plasma van gezonde vrijwilligers of plasma van diverse patiëntengroepen zijn stollingsbevorderend in vitro, of via de intrinsieke (bijvoorbeeld micropartikels van gezonde vrijwilligers<sup>15</sup>, of via de extrinsieke route (bijvoorbeeld micropartikels vanuit pericardiaal bloed van cardiochirurgie patiënten<sup>16</sup>, of vanuit synoviaalvocht van patiënten met reumatoïde artritis<sup>17</sup>.

Micropartikels geïsoleerd uit pericardiaal bloed van cardiochirurgie patiënten zijn stollingsbevorderend in vivo in een rat veneus stase trombose model<sup>18</sup>.



## **Detectie van micropartikels en analyse van hun stollingsbevorderende eigenschappen**

### ***Flowcytometrie***

Met de flowcytometer is het meten van de grootte (forward scatter), de dichtheid (side scatter) en de fluorescentie van micropartikels mogelijk. Ook de concentratie micropartikels in de monsters kan worden geschat<sup>4,18</sup>.

Eiwitten die voorkomen op het oppervlak van de micropartikels kunnen gedetecteerd worden met behulp van specifieke antistoffen waaraan fluorescerende merkers zijn gekoppeld. Met antistoffen gericht tegen eiwitten die uitsluitend op een bepaald type cel/ micropartikel voorkomen (identificatie merkers), kan de cellulaire herkomst van de micropartikels worden bepaald.

Negatief geladen fosfolipiden kunnen gedetecteerd worden met behulp van annexine V die ook gelabeld is met een fluorescerende merker. Annexine V is een eiwit die via calcium ionen bindt aan negatief geladen fosfolipiden.

Bijlage I is het bepalingvoorschrift van de flowcytometrie van micropartikels dat op het LEKC wordt gebruikt.

### ***Fibrine generatie test (FGT)***

Met de fibrine generatie test worden de stollingsbevorderende eigenschappen van de micropartikels bepaald. Hierbij wordt de snelheid van fibrinevorming gemeten in plasma met micropartikels, na het toevoegen van calcium. Deze snelheid is afhankelijk van het aantal micropartikels, hun expositie van negatief geladen fosfolipiden, en de aanwezige stollingsfactoren.

Er kunnen verschillende antistoffen worden toegevoegd om te kunnen bepalen via welke stollingsweg de stolling optreedt. Bij het toevoegen van antistoffen tegen de factoren die verantwoordelijk zijn voor de stolling wordt de stolling geremd, d.w.z. de tijd nodig om fibrine te vormen wordt verlengd, of er treedt helemaal geen stolling op.

Analoog aan de remming met antistoffen, kan annexine V worden toegevoegd om de negatief geladen fosfolipiden af te schermen zodat ze niet beschikbaar zijn voor de bloedstolling. Hiermee kan de bijdrage van negatief geladen fosfolipiden aan de stolling worden bepaald.

Bijlage II is een bepalingvoorschrift van de FGT die op het LEKC wordt gebruikt.

## Doel van deze studie

Doel van dit onderzoek is het bestuderen van het effect van invriezen en/of centrifugeren op de expositie van negatief geladen fosfolipiden, het aantal, en de stollingsbevorderende eigenschappen van micropartikels.

Voor deze doeleinden zijn micropartikels van gezonde vrijwilligers en van cardiochirurgie patiënten gebruikt, voor de volgende redenen: Micropartikels van gezonde vrijwilligers bestaan voornamelijk uit micropartikels afkomstig van bloedplaatjes, en in vitro zijn ze stollingsbevorderend via een TF-onafhankelijke route, terwijl micropartikels van cardiochirurgie patiënten voor een groot deel uit micropartikels afkomstig van erythrocyten bestaan, en ze zijn in vitro stollingsbevorderend via TF. Het zijn dus twee zeer verschillende populaties micropartikels, waarop het effect van invriezen en afdraaien wordt bestudeerd.

Micropartikels van de gezonde vrijwilligers en patiënten worden bepaald

- vers, zonder centrifugeren
- vers, na centrifugeren en resuspenderen
- vers, na centrifugeren en wassen
- na invriezen en ontdooien, zonder centrifugeren
- na invriezen en ontdooien, en centrifugeren en resuspenderen.
- na invriezen en ontdooien, na centrifugeren en wassen.

Onder deze verschillende experimentele condities wordt de cellulaire herkomst en het aantal micropartikels, evenals hun grootte en expositie van negatief geladen fosfolipiden flowcytometrisch bepaald, en de stollingsbevorderende eigenschappen van de micropartikels worden met de fibrine generatie test geanalyseerd. De resultaten onder de verschillende condities worden met elkaar vergeleken.

Voor het realiseren van deze doelen moest de fibrine generatie test geoptimaliseerd worden door het bepalen van de beste antistof- en annexine V verdunningen.

## Materiaal en methoden

### Titratie antistoffen en annexine V voor de fibrine generatie test

Om de optimale concentratie remmende antistoffen en annexine V te bepalen in de FGT, zijn er:

- A. verschillende verdunningen antistoffen toegevoegd aan pool plasma waarin de stolling vervolgens via de intrinsieke (kaoline + PS/PC vesicles) of via de extrinsieke weg (Thromborel ® S) op gang is gebracht, en
- B. verschillende verdunningen annexine V toegevoegd aan micropartikel bevattende plasma van een gezonde vrijwilliger.

Bij de antistoffen is er een concentratie gezocht die goed remt en specifiek is. Bij annexine V is er een reeks verdunningen gezocht die van de maximale remming naar geen remming gaat.

### Apparatuur en hulpmiddelen

| Omschrijving        | Firma        | serienummer  |
|---------------------|--------------|--------------|
| Koelkast            | Liebherr     | 19.361.079.6 |
| Reader spectramax   | Softmax      | MN 2813      |
| Micromix            | DPC          | 0730         |
| Verwarmingsplaatjes | Chromogenix  | DMH 60008    |
| Diepvries - 80°C    | Thermo Forma | 45305-3737   |
| Multichannel pipet  | Brand        | 10A7233      |

*Tabel 1: Omschrijving apparatuur*

## Reagentia, standaarden en controles

| Artikel                              | Firma                     | Lotnummer                         | Concentratie/<br>MW/activiteit<br>volume/gewicht |
|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------|
| Anti- Tissue Factor                  | American Diagnostica inc. | 4502                              | 1mg/mL                                           |
| Anti FVII <sub>a</sub>               | Abcam                     | 38363                             | polyclonal 250 µg                                |
| aFXI                                 | Yvon                      | 09-3-04                           | 880 µg/mL                                        |
| aFXII                                | CLB                       | 31-10-02                          | 1,5 mg/mL                                        |
| aIX                                  | Dako                      | 093(601)                          | 12 mg/mL                                         |
| Purified Recombinant Annexine V      | BD Biosciences Pharmingen | 0000044425<br>art. nr.: 51-65871A | 0,5 µg/µL                                        |
| Poolplasma 2003 micropartikel vrij   | n.v.t.                    | 28102003                          | n.v.t.                                           |
| Vrijwilligers plasma                 | n.v.t.                    | n.v.t.                            | n.v.t.                                           |
| Thromborel S                         | Behring                   | OUHP-35                           | 0,6 U/mL                                         |
| PS/PC vesicles                       |                           |                                   |                                                  |
| NaCl                                 | Merck                     | 106404                            | 58,44                                            |
| BSA                                  | Sigma                     | A-9647/120K1218                   | 100 g                                            |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | Merck                     | 102382                            | 147,02                                           |
| Kaoline                              | Sigma                     | K 7375                            |                                                  |
| 96 well's platen                     | Greiner Bio-one           | 655101                            | n.v.t.                                           |
| 1,5 mL epjes                         | EPPD                      | 0030.125.150                      | n.v.t.                                           |
| Aqua dest (sterile)                  | Baxter                    | 03K26509                          | 1000 mL                                          |
| PBS Leiden                           | LUMC                      | 0313052                           | 500 mL                                           |
| 2 mL invriescupje                    | Sarstedt                  | 72,609                            | n.v.t.                                           |
| 1,5 mL puntcupje zonder rand         | Sarstedt                  | 72,607                            | n.v.t.                                           |
| 96 wells platen                      | Greiner Bio-one           | 655191                            | n.v.t.                                           |

Tabel 2: Materialen

## Oplossingen

1. Kaoline suspensie 0,5 mg/mL: Weeg 2,0 mg kaoline af. Voeg 4,0 mL NaCl 0,9 % toe. Kaoline lost niet op en zakt snel uit. Meng voor iedere stap.
2. Thromborel® S: Los de inhoud van het potje Thromborel® S op in 10 mL aqua dest. Verdeel het in porties van 50 µL. Bewaar bij -80 °C. Gebruik altijd een nieuw niet eerder ontdooid cupje uit de vriezer.
3. PS/PC vesicles (zie Bijlage III voor voorschrift).

4. 3,2 % tri-natriumcitraat.2H<sub>2</sub>O oplossing: Weeg 1,6 g tri-natriumcitraat af. Los op in 50 mL steriel aqua dest. Houdbaar 2 maanden bij 2-8 °C in de koelkast.
5. 0,32% tri-natriumcitraat in PBS Leiden: Voeg bij elkaar 9 mL PBS Leiden (1,4 mmol/L, pH 7,5) en 1 mL tri-natriumcitraat 3,2% en stel op pH 7,4. Maak dit vlak voor gebruik. Filtreer door een filter van 0,2 µm.

#### **Werkwijze:**

- a. Laat het ingevroren micropartikel vrije pool plasma op tafel op KT komen en vortex 5 seconden.
- b. Ontdooi het ingevroren vrijwilligersplasma 1 uur op smeltend ijs. Meng kort.
- c. Klaarzetten van alle benodigdheden:

Maak een pipetteerschema (tabel 3) inclusief een schema van de microtiterplaat (figuur 3).

Zet de spectrofotometer aan op 37 °C minimaal 30 minuten voor het aflezen van de plaat.

| Uitvoering                                     | Poolplasma/<br>Vrijw. MP<br>75 µL | Antistof<br>/<br>PBS<br>15 µL | Kaoline<br>250x<br>10 µL | PS/PC<br>250x<br>10 µL | Thromborel<br>250x<br>10 µL | 0,9%<br>NaCl<br>(µL) |
|------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Negatieve<br>controle                          | Poolplasma                        | PBS                           | -                        | -                      | -                           | 25                   |
| Intrinsieke<br>controle:<br>Kaoline +<br>PS/PC | Poolplasma                        | PBS                           | +                        | +                      | -                           | 5                    |
| aIX                                            | Poolplasma                        | Antistof                      | +                        | +                      | -                           | 5                    |
| aXI                                            | Poolplasma                        | Antistof                      | +                        | +                      | -                           | 5                    |
| aXII onv                                       | Poolplasma                        | Antistof                      | +                        | +                      | -                           | 5                    |
| aXII 2x                                        | Poolplasma                        | Antistof                      | +                        | +                      | -                           | 5                    |
| Extrinsieke<br>controle:<br>Thromborel         | Poolplasma                        | PBS                           | -                        | -                      | +                           | 15                   |
| aVIIa onv                                      | Poolplasma                        | Antistof                      | -                        | -                      | +                           | 15                   |
| aVIIa 5x                                       | Poolplasma                        | Antistof                      | -                        | -                      | +                           | 15                   |
| aVIIa 10x                                      | Poolplasma                        | Antistof                      | -                        | -                      | +                           | 15                   |
| aTF onv                                        | Poolplasma                        | Antistof                      | -                        | -                      | +                           | 15                   |
| aTF 2x                                         | Poolplasma                        | Antistof                      | -                        | -                      | +                           | 15                   |
| aTF 5x                                         | Poolplasma                        | Antistof                      | -                        | -                      | +                           | 15                   |
| Blanco                                         | Vrijw plasma                      | PBS                           | -                        | -                      | -                           | 25                   |
| AnV 5x                                         | Vrijw. plasma                     | AnV                           | -                        | -                      | -                           | 25                   |
| AnV 10x                                        | Vrijw. plasma                     | AnV                           | -                        | -                      | -                           | 25                   |
| AnV 25x                                        | Vrijw. plasma                     | AnV                           | -                        | -                      | -                           | 25                   |
| AnV 50x                                        | Vrijw. plasma                     | AnV                           | -                        | -                      | -                           | 25                   |
| AnV 100x                                       | Vrijw. plasma                     | AnV                           | -                        | -                      | -                           | 25                   |
| AnV 200x                                       | Vrijw. plasma                     | AnV                           | -                        | -                      | -                           | 25                   |
| AnV 300x                                       | Vrijw. plasma                     | AnV                           | -                        | -                      | -                           | 25                   |

Tabel 3: Pipetteerschema FGT

|   | 1                            | 2                         | 3                                | 4 | 5                 | 6 | 7 | 8     | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------------------------------|---------------------------|----------------------------------|---|-------------------|---|---|-------|---|----|----|----|
| A | K +<br>PS/Pc<br>+NaCl        | Throm<br>+<br>+NaCl       | Vrijw<br>plasma<br>+ PBS         |   | CaCl <sub>2</sub> |   |   | Throm |   |    |    |    |
| B | K +<br>PS/PC<br>+ aIX        | Throm<br>+<br>aVII 5x     | Vrijw<br>plasma<br>+ AnV<br>5x   |   | CaCl <sub>2</sub> |   |   | Throm |   |    |    |    |
| C | K +<br>PS/PC<br>+aXI         | Throm<br>+<br>aVII<br>10x | Vrijw<br>plasma<br>+ AnV<br>10x  |   | CaCl <sub>2</sub> |   |   | Throm |   |    |    |    |
| D | K +<br>PS/PC<br>+aXII<br>onv | Throm<br>+<br>aTF<br>onv  | Vrijw<br>plasma<br>+ AnV<br>25x  |   | CaCl <sub>2</sub> |   |   | Throm |   |    |    |    |
| E | K +<br>PS/PC<br>+a XII<br>2x | Throm<br>+<br>aTF 2x      | Vrijw<br>plasma<br>+ AnV<br>50x  |   | CaCl <sub>2</sub> |   |   | Throm |   |    |    |    |
| F | Negatieve<br>contr           |                           | Vrijw<br>plasma<br>+ AnV<br>100x |   | CaCl <sub>2</sub> |   |   |       |   |    |    |    |
| G |                              |                           | Vrijw<br>plasma<br>+ AnV<br>200x |   | CaCl <sub>2</sub> |   |   |       |   |    |    |    |
| H |                              |                           | Vrijw<br>plasma<br>+ AnV<br>300x |   | CaCl <sub>2</sub> |   |   |       |   |    |    |    |

**Figuur 2 : Layout microtiterplaat voor de FGT**



- d. Maak de verdunningen van de antistoffen en annexine V in PBS:

|                   | Verdunning | minimaal nodig ( $\mu\text{L}$ ) | AS ( $\mu\text{L}$ ) | PBS Leiden ( $\mu\text{L}$ ) |
|-------------------|------------|----------------------------------|----------------------|------------------------------|
| Annexine V        | 5x         | 20                               | 4                    | 20                           |
| Annexine V        | 10x        | 20                               | 2                    | 18                           |
| Annexine V        | 25x        | 20                               | 1                    | 24                           |
| Annexine V        | 50x        | 20                               | 1                    | 49                           |
| Annexine V        | 100x       | 20                               | 1                    | 99                           |
| Annexine V        | 200x       | 20                               | 1                    | 199                          |
| Annexine V        | 300x       | 20                               | 1                    | 299                          |
| aTF               | onv        | 20                               | 20                   | -                            |
| aTF               | 2x         | 20                               | 10                   | 10                           |
| aTF               | 5x         | 20                               | 4                    | 20                           |
| aVII <sub>a</sub> | onv        | 20                               | 20                   | -                            |
| aVII <sub>a</sub> | 5x         | 20                               | 4                    | 20                           |
| aVII <sub>a</sub> | 10x        | 20                               | 2                    | 18                           |
| AXI               | 5x         | 20                               | 4                    | 20                           |
| AXII              | onv        | 20                               | 20                   | -                            |
| AXII              | 2x         | 20                               | 10                   | 10                           |
| aIX               | 10x        | 20                               | 2                    | 18                           |

*Tabel 4: Gebruikte antistof- en annexine V verdunningen. Zowel aIX 2x als aXI 5x worden regelmatig gebruikt. Er was geen reden om ze opnieuw uit te titreren maar ze zijn ter controle toch meegenomen.*

- e. Verdun de kaoline (250x), PS/PC(250x), Thromborel (250x) met NaCl 0,9 %.
- f. Neem een 96 wells microtiterplaat. Pipetteer volgens het pipetteerschema( zie tabel....) het micropartikel-vrij poolplasma en de antistoffen, en het vrijwilligersplasma en annexine V bij elkaar.
- g. Meng op het schudapparaat (5 seconden op stand 3)
- h. Dek de plaat af met plastic folie. Preïncubeer 30 minuten op KT
- i. Voeg de kaoline en PS/PC vesicles toe aan de intrinsieke controle.
- j. Pipetteer 18  $\mu\text{L}$  Thromborel in acht aparte welletjes (zie tabel 4).  
Pipetteer 60  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  in 8 welletjes in een aparte rij. (zie figuur 3).
- k. Preïncubeer 10 minuten bij 37 °C.
- l. Maak het FGT computerprogramma open voor het aflezen van de plaat.
- m. Start reactie door 13  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  toe te voegen met een 12-kanaalspipet aan de plasma mengsels. Voeg aan de extrinsieke controle, tegelijk met de  $\text{CaCl}_2$ , 10 $\mu\text{L}$  Thromborel toe. PAS OP voor luchtballen!
- n. Plaats het plaatje snel in de reader en lees gedurende 60 minuten, elke 30seconden af bij 37 °C bij 405 nm op de spectrofotometer.

Herhaal dezelfde werkwijze voor het bepalen van de specificiteit van de antistofverduunningen die gekozen zijn bij de titratie van de antistoffen.  
Hier volgen de wijzigingen:

Herhaal punt b. niet.

Bij c. : *Klaarzetten van alle benodigdheden:*

Gebruik i.p.v. tabel 3, tabel 5 als pipetteerschema.

Gebruik i.p.v. figuur 2, figuur 3 voor de layout van de microtiterplaat.

Bij d.:           Maak de verdunningen volgens tabel 6 i.p.v. tabel 4

| Uitvoering                                    | Poolplasma/<br>Vrijw. MP<br>75 µL | Antistof/<br>PBS<br>15 µL | Kaoline<br>250x<br>10 µL | PS/PC<br>250x<br>10 µL | Thromborel<br>250x<br>10 µL | 0,9%<br>NaCl<br>(µL) |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Intrinsieke<br>controle<br>Kaoline +<br>PS/PC | Poolplasma                        | PBS                       | +                        | +                      | -                           | 5                    |
| aTF 2x                                        | Poolplasma                        | Antistof                  | +                        | +                      | -                           | 5                    |
| aVII 10x                                      | Poolplasma                        | Antistof                  | +                        | +                      | -                           | 5                    |
| Extrinsieke<br>controle<br>Thromborel         | Poolplasma                        | PBS                       | -                        | -                      | +                           | 15                   |
| aIX 10x                                       | Poolplasma                        | Antistof                  | -                        | -                      | +                           | 15                   |
| aXI 5x                                        | Poolplasma                        | Antistof                  | -                        | -                      | +                           | 15                   |
| aXII 2x                                       | Poolplasma                        | Antistof                  | -                        | -                      | +                           | 15                   |

*Tabel 5: Pipetteerschema*

|   | 1                      | 2                     | 3 | 4 | 5                 | 6 | 7 | 8     | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------------------------|-----------------------|---|---|-------------------|---|---|-------|---|----|----|----|
| A | K +<br>PS/Pc<br>+NaCl  | Throm<br>+<br>+NaCl   |   |   | CaCl <sub>2</sub> |   |   | Throm |   |    |    |    |
| B | K +<br>PS/PC<br>+ aVII | Throm<br>+<br>aIX 10x |   |   | CaCl <sub>2</sub> |   |   | Throm |   |    |    |    |
| C | K +<br>PS/PC<br>+aTF   | Throm<br>+<br>aXI 5x  |   |   | CaCl <sub>2</sub> |   |   | Throm |   |    |    |    |
| D |                        | Throm<br>+<br>aXII 2x |   |   | CaCl <sub>2</sub> |   |   | Throm |   |    |    |    |
| E |                        |                       |   |   |                   |   |   |       |   |    |    |    |
| F |                        |                       |   |   |                   |   |   |       |   |    |    |    |
| G |                        |                       |   |   |                   |   |   |       |   |    |    |    |
| H |                        |                       |   |   |                   |   |   |       |   |    |    |    |

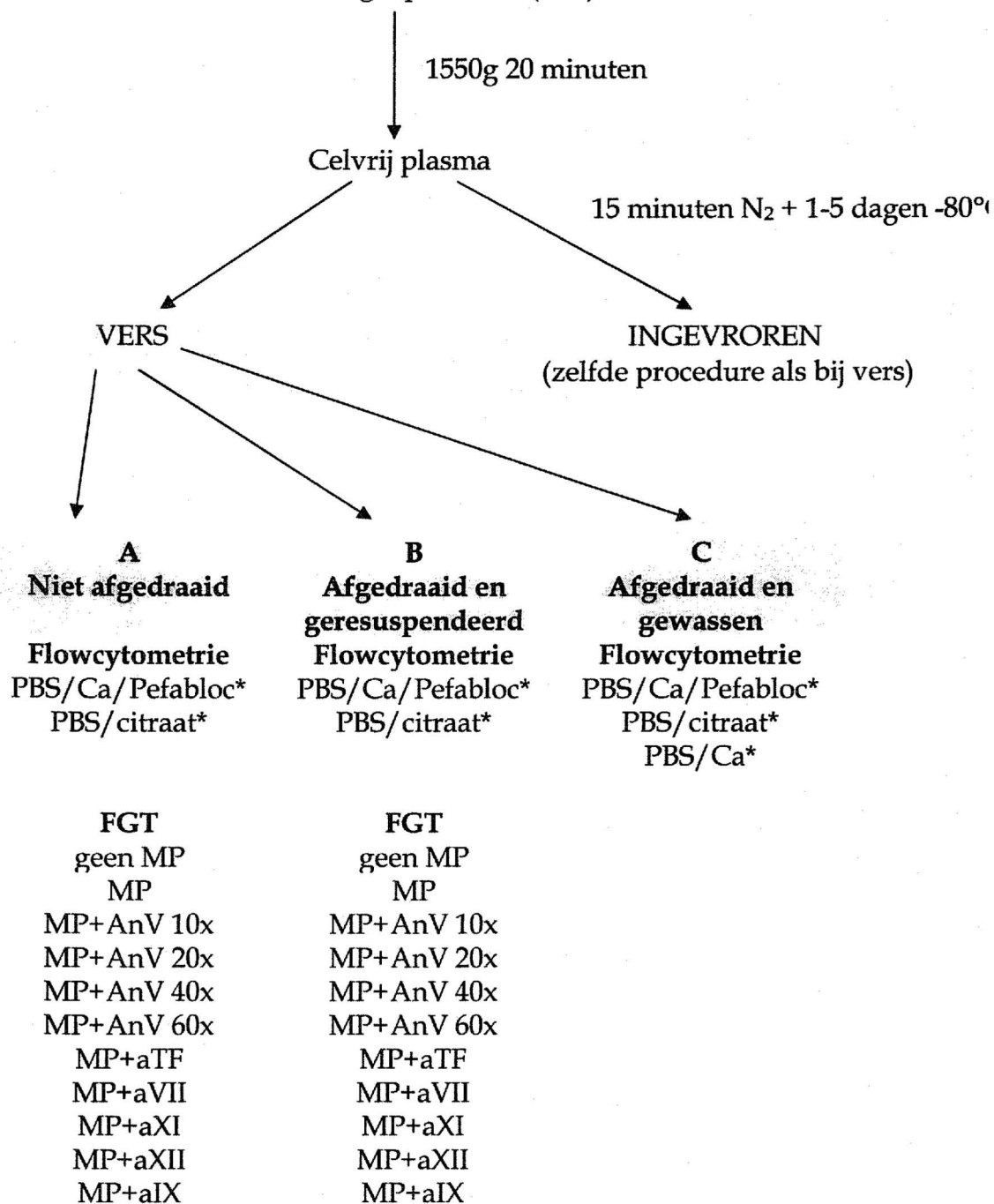
**Figuur 3 : Layout microtiterplaat voor de FGT**

|                   | Verdunning | Minimaal<br>nodig | AS | PBS Leiden |
|-------------------|------------|-------------------|----|------------|
| aTF               | 2x         | 20                | 10 | 10         |
| aVII <sub>a</sub> | 10x        | 20                | 2  | 18         |
| aXI               | 5x         | 20                | 4  | 20         |
| aXII              | 2x         | 20                | 10 | 10         |
| aIX               | 10x        | 20                | 2  | 18         |

**Tabel 6: Gebruikte antistofverduunningen. Zowel aIX 2x als aXI 5x worden regelmatig gebruikt.**

## Overzicht proefopzet

- 1) Veneus bloed van gezonde vrijwilligers (n=6) + 0.32% citraat
- 2) Pericardiaal bloed van cardiochirurgie patiënten (n=4) + 0.32% citraat



**Tabel 7: De bepalingen uitgevoerd op micropartikels opgewerkt op verschillende manieren. Bij de flowcytometrie zijn de gebruikte buffers vermeld.**

*\*Voor het panel van uitgevoerde labellingen (dat bij elke buffer dezelfde was) zie tabel 8.*

Aankleuren met annexine V is alleen mogelijk in aanwezigheid van calcium. Calcium in de buffer die voor de labelling wordt gebruikt veroorzaakt echter stolling in de monsters waar nog plasma aanwezig is (waar de micropartikels niet gewassen zijn). Om dit te voorkomen wordt er Pefabloc, een remmer van fibrine polymerisatie, aan de PBS/Ca buffer toegevoegd (er wordt dus PBS/Ca/Pefabloc buffer gebruikt).

Bij de gewassen micropartikels wordt er ook PBS/Ca als buffer meegenomen, om onverwachte effecten van Pefabloc uit te sluiten. De PBS/citraat buffer fungeert als negatieve controle bij alle monsters voor de annexine V aankleuring, en als een extra controle voor de aantallen micropartikels gemeten in de PBS/Ca/Pefabloc buffer.

|   |                                | Celspecifieke antistoffen of isotype controles |                      | Labelling van negatief geladen fosfolipiden |
|---|--------------------------------|------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------|
| 1 | Isotype controles:             | IgG <sub>1</sub> -FITC                         | IgG <sub>1</sub> -PE | annexine V-APC                              |
| 2 | Plaatjes-MP:                   | -                                              | CD61-PE              | annexine V-APC                              |
| 3 | Erythrocyten-MP:               | -                                              | aGPA-PE              | annexine V-APC                              |
| 4 | Monocyten- en granulocyten-MP: | CD14-FITC                                      | CD66e-PE             | annexine V-APC                              |

*Tabel 8: Het panel van labellingen.*

## Bloedafname en monsterbereiding

### Materialen:

Citraatbuis 3,2 %, Becton Dickinson lotnummer: 367714

Dade Hepzyme (heparinase), Dade Behring lotnummer: B4240-10

### Werkwijze

- a. *Bloedafname:*  
Gezonde vrijwilligers (6) : Neem 4 à 5 buizen van 5 mL citraatbloed (veneuze punctie) af.  
Cardiochirurgie patiënten (4) : Neem 4 à 5 buizen van 5 mL citraatbloed af tijdens de operatie uit het pericard zakje.
- b. Draai het bloed af op 1550g 20 minuten.
- c. Pipetteer het plasma af, verdeel in porties van 250µl.
- d. Behandel het bloed van de patiënten met heparinase:  
Los het potje heparinase op in 100µl PBS. Voeg 2,5µl heparinase toe aan 250µL plasma.  
Incubeer 15 minuten bij KT.
- e. Gebruik 3 epjes voor de flowcytometrische bepaling en 12 epjes voor de FGT bepaling uit vers plasma.  
Vries de rest in in vloeibare stikstof en bewaar in de vriezer bij -80 °C.  
Dit plasma is, binnen 5 dagen, te gebruiken voor de bepalingen na invriezen.

De flowcytometrische analyse en de FGT worden op dezelfde dag gedaan door 2 analisten op dezelfde monster(s).

## Flowcytometrische analyse

### Apparatuur en hulpmiddelen

| Omschrijving          | Firma            | serienummer   |
|-----------------------|------------------|---------------|
| Centrifuge            | Hettich          | 0002606       |
| Centrifuge micro      | Hettich          | 0001811-05-00 |
| Vibrofix VF1 vortex   | IKA              | divers        |
| Calibur               | Becton Dickinson | 01-020-1786   |
| Vloeibare stikstofvat | MVE              | DDD01L139     |
| pHmeter               | Radiometer       | 657R038 N019  |

Tabel 9: Omschrijving apparatuur.

### Reagentia, standaarden en controles

| Artikel                           | Firma                | Lotnummer    | MW     |
|-----------------------------------|----------------------|--------------|--------|
| Aqua dest (sterile)               | Baxter               | 03K26509     | n.v.t. |
| Calciumchloride.2H <sub>2</sub> O | Merck                | 2382         | 147,02 |
| Facs buis                         | Falcon               | 2052         | n.v.t. |
| Falcon buis 50mL                  | Greiner Bio-one      | 227261       | n.v.t. |
| Filter 0,2 µm                     | Schleicher & Schuell | FP030/3      | n.v.t. |
| 2 mL invriescupje                 | Sarstedt             | 72.609       | n.v.t. |
| PBS Leiden                        | LUMC                 | 0313052      | n.v.t. |
| Plastic 10 mL centrifugebuis      | Sarstedt             | 57.469       | n.v.t. |
| 1,5 mL puntcupje                  | Eppendorf            | 0030.102.002 | n.v.t. |
| 1,5 mL puntcupje zonder rand      | Sarstedt             | 72,607       | n.v.t. |
| Spuut 20 mL                       | Becton Dickinson     | 300613       | n.v.t. |
| Tri-natriumcitraat                | Merck                | 106447       | 294,10 |
| IgG1-PE                           | Becton Dickinson     | 61882        | n.v.t. |
| IgG1-FITC                         | Becton Dickinson     | 35911        | n.v.t. |
| CD 61-PE                          | Pharmingen           | 43196        | n.v.t. |
| aGPA-PE                           | Dako                 | 072(201)     | n.v.t. |
| CD14-FITC                         | Bioscience           | 0301         | n.v.t. |
| CD66e-PE                          | CLB                  | 8000030484   | n.v.t. |
| AnV-APC                           | Caltag               | 06070105     | n.v.t. |

Tabel 10: Materialen.

## Oplossingen

1. 2,5 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  in PBS: Voeg bij elkaar 39 mL PBS (1,4 mmol/L) en 1 mL 0,1 mol/L  $\text{CaCl}_2$  en stel pH op 7,4. Filtreer door filter 0,2  $\mu\text{m}$ .
2. 0,32% citraat in PBS: Voeg bij elkaar 9 mL PBS (1,4 mmol/L) en 1 mL citraat 3,2% en stel op pH 7,4. Filtreer door filter 0,2  $\mu\text{m}$ .
3. Pefabloc 2,5 mg/ml: Voeg 205  $\mu\text{l}$  Pefastock oplossing en 3895  $\mu\text{l}$  PBS/Ca. Meng goed en neem 1 mL voor het maken van de Pefabloc afstop buffer.
4. PBS/Ca/Pefabloc 0,25mg/ml: Voeg 1 mL Pefabloc incubatie en 9 mL PBS/Ca bij elkaar.

## Werkwijze

- a. Bereid de verse samples als volgt voor:

A. MP niet afgedraaid:

Vortex 250  $\mu\text{l}$  plasma voor 5 seconden. Bruikbaar voor proeven.

B. MP afgedraaid en geresuspendeerd:

Vortex 250  $\mu\text{l}$  plasma voor 5 seconden. Draai voor 30 minuten af bij 18000 g. Resuspendeer hierna door 10 seconden te vortexen, tik er 3x tegen, en vortex vervolgens weer 10 seconden.

C. MP wel afgedraaid en gewassen

Vortex 250  $\mu\text{l}$  plasma voor 5 seconden. Draai 30 minuten af bij 18000 g.

Pipetteer 2x 100  $\mu\text{l}$  en 1x 25  $\mu\text{l}$  af en voeg 225  $\mu\text{l}$  PBS/citraat toe.

Vortex voor 10 seconden, tik er 3x tegen, en vortex vervolgens weer 10 seconden

Draai 30 minuten af bij 18.000 g .

Pipetteer 2x 100  $\mu\text{l}$  en 1x 25  $\mu\text{l}$  af en voeg 75  $\mu\text{l}$  PBS/citraat toe.

Vortex voor 10 seconden, tik er 3x tegen, en vortex vervolgens weer 10 seconden.

Bij A en B : Alleen bepaling in PBS/citraat en in PBS/Ca/Pefabloc.

- b. Bereid de ingevroren samples als volgt voor:

Ontdooi het plasma 1 uur op smeltend ijs.

Vortex 5 seconden en behandel verder zoals bij de verse samples.

- c. Maak tijdens de centrifugatie de benodigde antistofverduunningen in PBS (tabel 11).

Maak altijd 15  $\mu\text{l}$  extra en 1  $\mu\text{l}$  extra per pipetteerstap dan dat er werkelijk nodig is.



|           | verdunning | min<br>nodig | nodig | antistof | buffer | afpipetteren | aantal<br>monsters |
|-----------|------------|--------------|-------|----------|--------|--------------|--------------------|
| IgG1-PE   | 10         | 84           | 100   | 10       | 90     | 85           | 14                 |
| IgG1-FITC | 10         | 84           | 100   | 10       | 90     | 85           | 14                 |
| CD61-PE   | 10         | 84           | 100   | 10       | 90     | 85           | 14                 |
| aGPA-PE   | 60         | 84           | 120   | 2        | 118    | 105          | 14                 |
| CD14-FITC | 20         | 84           | 40    | 5        | 95     | 85           | 14                 |
| CD66e-PE  | 20         | 84           | 40    | 5        | 95     | 85           | 14                 |
| AnV-APC   | 40         | 336          | 350   | 9        | 351    |              | 56                 |

**Tabel 11: Pipetteerschema antistofverdunningen**

- d. Centrifugeer de antistofverdunningen, behalve de annexine V verdunning, 5 minuten bij 18000g.
- e. Pipetteer de antistofverdunningen, minus de onderste 15 µl voorzichtig over in een schoon cupje.
- f. Label de micropartikels in A, B en C met antistoffen volgens bijlage IV
- g. Vortex kort en incubeer 15 minuten in het donker bij KT.
- h. Stop de incubatie met 900 µl PBS/citraat, PBS/Ca of PBS/Ca/Pefabloc.
- i. Vortex kort
- j. Start de FACSCalibur volgens het apparaatvoorschrift
- k. Meet op de Calibur onder de layout: MIPA, Instrumentsettings: MIPAsen  
nieuw

## Fibrine generatie test

### Apparatuur en hulpmiddelen

| Omschrijving        | Firma        | serienummer  |
|---------------------|--------------|--------------|
| Koelkast            | Liebherr     | 19.361.079.6 |
| Reader spectramax   | Softmax      | MN 2813      |
| Micromix            | DPC          | 0730         |
| Verwarmingsplaatjes | Chromogenix  | DMH 60008    |
| Diepvries - 80°C    | Thermo Forma | 45305-3737   |
| Multichannel pipet  | Brand        | 10A7233      |

Tabel 12 :Omschrijving apparatuur

### Reagentia, standaarden en controles

| Artikel                            | Firma                        | Lot nummer                        | Concentratie/<br>MW/ gewicht<br>volume |
|------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------|
| Calciumchloride.2H <sub>2</sub> O  | Merck                        | 102382                            | 147,02                                 |
| Aqua dest (sterile)                | Baxter                       | 03K26509                          | 1000 mL                                |
| PBS Leiden                         | LUMC                         | 0313052                           | 500 mL                                 |
| 2 mL invriescupje                  | Sarstedt                     | 72,609                            | n.v.t.                                 |
| 1,5 mL puntcupje<br>zonder rand    | Sarstedt                     | 72,607                            | n.v.t.                                 |
| 96 wells platen                    | Greiner Bio-one              | 655191                            | n.v.t.                                 |
| Purified Recombinant<br>Annexine V | BD Biosciences<br>Pharmingen | 0000044425<br>art. Nr.: 51-65871A | 0,5 µg/µL                              |
| aTF                                | American<br>Diagnostica inc. | 4502                              | 1 mg/mL                                |
| aFVII <sub>a</sub>                 | Abcam                        | 38363                             | polyclonal 250 µg                      |
| aFXI                               | Yvon                         | 9-3-04                            | 880 µg/mL                              |
| aFXII                              | CLB                          | 31-10-02                          | 1,5 mg/mL                              |
| aIX                                | DaKo                         | 093(601)                          | 12 mg/mL                               |

Tabel 13 : Materialen

## Werkwijze

- a. Bereid de verse samples als volgt voor:

A. MP niet afgedraaid:

Vortex 250 µl plasma voor 5 seconden. Bruikbaar voor proeven.

B. MP afgedraaid en geresuspendeerd:

Vortex 250 µl plasma voor 5 seconden. Draai voor 30 minuten af bij 18.000g.

Resuspendeer hierna door 10 seconden te vortexen, tik er 3x tegen, en vortex vervolgens weer 10 seconden.

- b. Bereid de ingevroren samples als volgt voor:

Ontdooi het plasma 1 uur op smeltend ijs.

Vortex 5 seconden en behandel verder zoals bij de verse samples.

- c. Klaarzetten alle benodigdheden:.

Maak een pipeteerschema (tabel 14) inclusief een schema van de microtiterplaat(figuur 4).

| Uitvoering | Vrijw. MP<br>75 µL | Antistof/<br>PBS<br>15 µL |
|------------|--------------------|---------------------------|
| Blanco     | Vrijw<br>plasma    | PBS                       |
| AnV 10x    | Vrijw.<br>plasma   | AnV                       |
| AnV 20x    | Vrijw.<br>plasma   | AnV                       |
| AnV 40x    | Vrijw.<br>plasma   | AnV                       |
| AnV 60x    | Vrijw.<br>plasma   | AnV                       |
| aTF 2x     | Vrijw<br>plasma    | +                         |
| aVII 10x   | Vrijw.<br>plasma   | +                         |
| aXI 5x     | Vrijw.<br>plasma   | +                         |
| aXII 2x    | Vrijw.<br>plasma   | +                         |
| aIX 10x    | Vrijw.<br>plasma   | +                         |

Tabel 14: Pipeteerschema FGT

|   | 1                  | 2                  | 3                  | 4                  | 5              | 6              | 7              | 8              | 9 | 10 | 11 | 1 |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---|----|----|---|
| A | *geen<br>MP<br>A   | *geen<br>MP<br>B   | *geen<br>MP<br>A   | *geen<br>MP<br>B   | aTF<br>2x<br>A | aTF<br>2x<br>B | aTF<br>2x<br>A | aTF<br>2x<br>B |   |    |    |   |
| B | MP +<br>AnV<br>10x | MP +<br>AnV<br>10x | MP +<br>AnV<br>10x | MP +<br>AnV<br>10x | aVII<br>10x    | aVII<br>10x    | aVII<br>10x    | aVII<br>10x    |   |    |    |   |
| C | MP +<br>AnV<br>20x | MP +<br>AnV<br>20x | MP +<br>AnV<br>20x | MP +<br>AnV<br>20x | aXI<br>5x      | aXI<br>5x      | aXI<br>5x      | aXI<br>5x      |   |    |    |   |
| D | MP +<br>AnV<br>40x | MP +<br>AnV<br>40x | MP +<br>AnV<br>40x | MP +<br>AnV<br>40x | aXII<br>2x     | aXII<br>2x     | aXII<br>2x     | aXII<br>2x     |   |    |    |   |
| E | MP +<br>AnV<br>60x | MP +<br>AnV<br>60x | MP +<br>AnV<br>60x | MP +<br>AnV<br>60x | aIX<br>10x     | aIX<br>10x     | aIX<br>10x     | aIX<br>10x     |   |    |    |   |
| F | MP<br>z.<br>rem.   | MP<br>z.<br>rem.   | MP z.<br>rem.      | MP z.<br>rem.      |                |                |                |                |   |    |    |   |
| G |                    |                    |                    |                    |                |                |                |                |   |    |    |   |
| H |                    |                    |                    |                    |                |                |                |                |   |    |    |   |

**Figuur 4: Layout microtiterplaat voor de FGT.**

A Vers zonder afdraaien

B Vers met afdraaien

A Ingevroren zonder afdraaien

B Ingevroren met afdraaien

Zet de spectrofotometer aan op 37°C minimaal 30 minuten voor het aflezen van de plaat.

- d. Maak tijdens de centrifugatie de benodigde antistofverduunningen in PBS Leiden.

|                   | Verduunning | minimaal nodig (vers/ingevroren) | AS          | PBS Leiden |
|-------------------|-------------|----------------------------------|-------------|------------|
| Annexine V        | 10x         | 60                               | 24 µL       | 216 µL     |
| Annexine V        | 20x         | 60                               | 120 µL (dd) | 120 µL     |
| Annexine V        | 40x         | 60                               | 120 µL (dd) | 120 µL     |
| Annexine V        | 60x         | 60                               | 3 µL        | 177 µL     |
| A TF              | 2x          | 60                               | 50 µL       | 50 µL      |
| aVII <sub>a</sub> | 10x         | 60                               | 10 µL       | 90 µL      |
| aXI               | 5x          | 60                               | 20 µL       | 80 µL      |
| aXII              | 2x          | 60                               | 55 µL       | 55 µL      |
| aIX               | 10x         | 60                               | 10 µL       | 90 µL      |

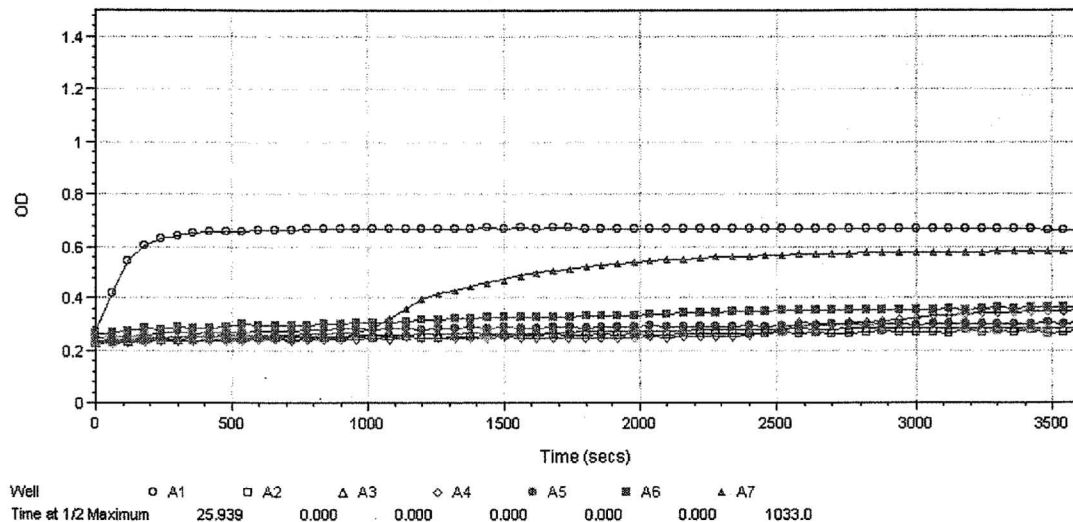
Tabel 15: Pipetteerschema antistofverduunningen

- e. Neem een 96 wells microtiterplaat.
- f. Pipetteer na de behandeling van de monsters, volgens het pipetteerschema (zie figuur 4), het plasma en de antistoffen/ Annexine V verduunningen bij elkaar.
- g. Meng op het schudapparaat (5 seconden op stand 3)
- h. Dek de plaat met plastic folie af en preïncubeer voor 30 minuten bij KT.
- i. Pipetteer 200 µL CaCl<sub>2</sub> in twee aparte rijen.
- j. Incubeer alles voor 10 minuten bij 37°C.
- k. Maak het FGT computerprogramma open voor het aflezen van de plaat.
- l. Start reactie door 13 µL CaCl<sub>2</sub> toe te voegen met een 12-kanaalspipet aan de plasma mengsels. Voeg aan de extrinsieke controle, tegelijk met de CaCl<sub>2</sub>, 10µL Thromborel toe. PAS OP voor luchtballen!
- m. Plaats het plaatje snel in de reader en lees gedurende 60 minuten, elke 30seconden af bij 37 °C bij 405 nm op de spectrofotometer.

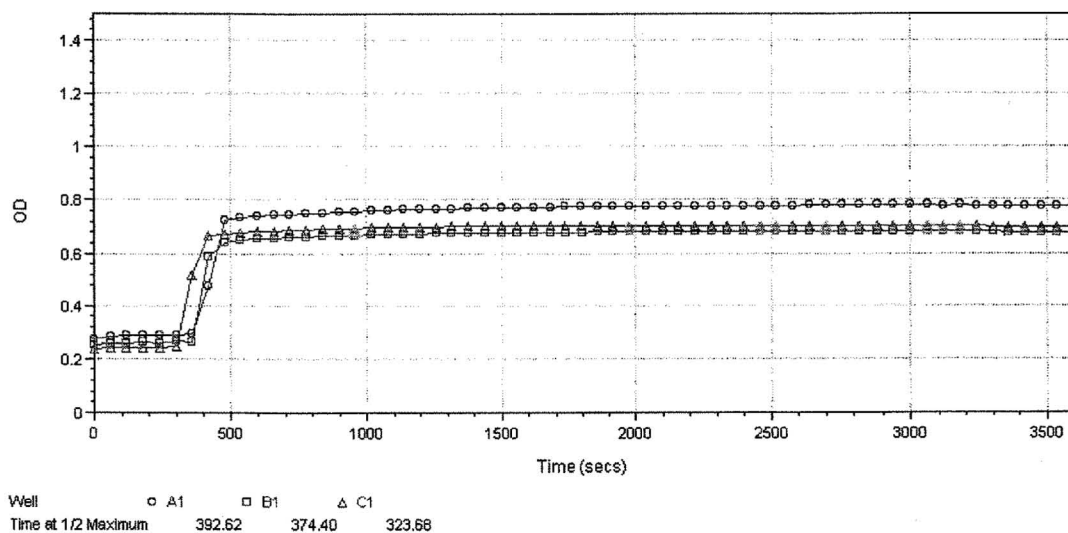
## Resultaten

### Titratie antistoffen en annexine V voor de fibrine generatie test

In een systeem waarbij de stolling via de extrinsieke route op gang werd gebracht zijn aVII en aTF uitgetitreerd (figuur 5). De hoogste verdunning die volledige remming geeft is gekozen voor verdere proeven: aVII 10x en aTF 2x verdund. Om de specificiteit van deze verdunningen te testen zijn ze ook toegepast in een systeem waarbij de stolling via de intrinsieke route verloopt. In figuur 6 is te zien dat ze geen invloed hebben op de stollingssnelheid.

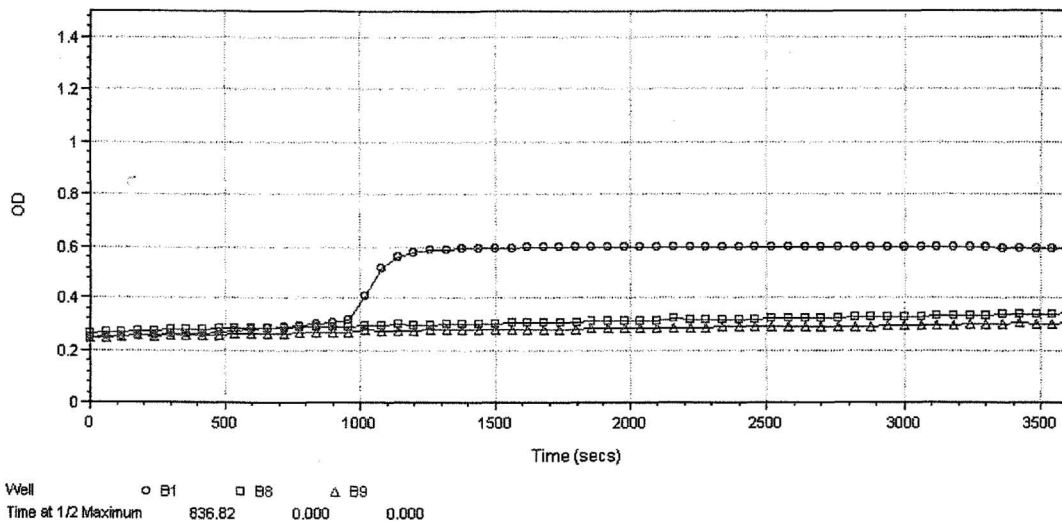


Figuur 5 : FGT: A1 Thromborel zonder remmer A5 Thromborel + aTF onverdund  
 A2 Thromborel + aVII onv A6 Thromborel + aTF 2x  
 A3 Thromborel + aVII 5x A7 Thromborel + aTF 5x  
 A4 Thromborel + aVII 10x



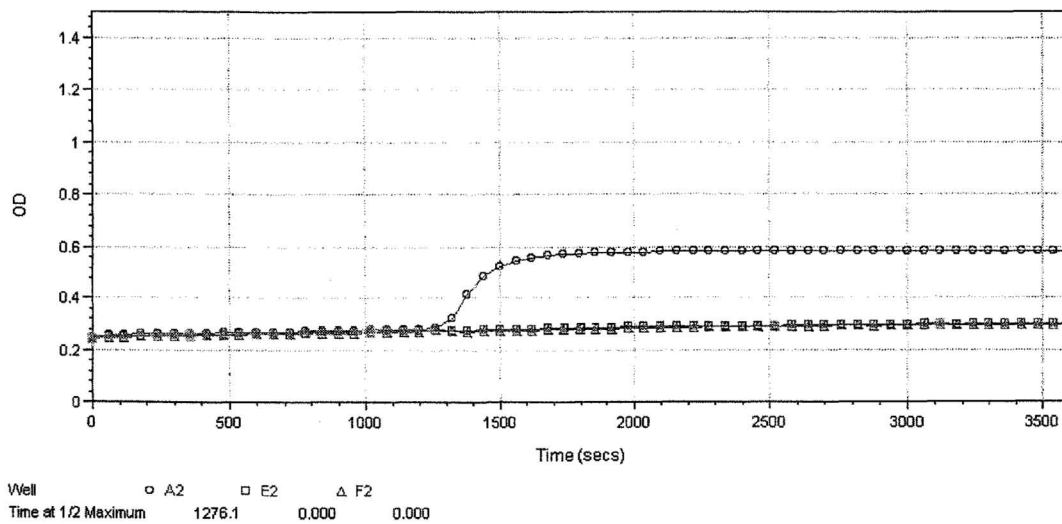
Figuur 6 : FGT: A1 Kaoline + Ps/Pc zonder remmer E2 Kaoline + Ps/Pc + aVII 10x  
 B1 Kaoline + Ps/Pc + aTF 2x

In een systeem waarbij de stolling via de intrinsieke route op gang werd gebracht is aXII uitgetitreerd (figuur 7). Beide verdunningen gaven volledige remming. De hogere van de twee, aXII 2x is gekozen voor verdere proeven.



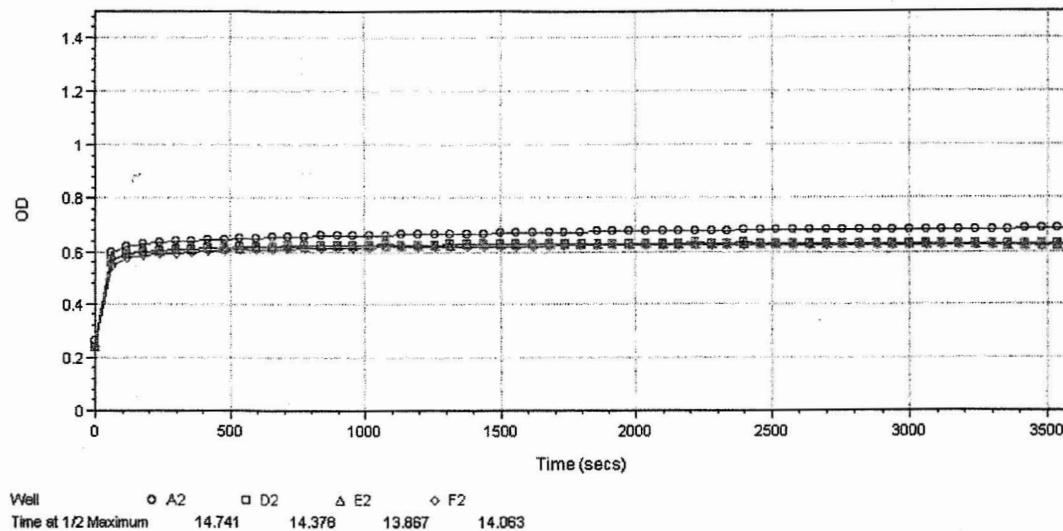
**Figuur 7:** FGT:B1 Kaoline + Ps/Pc zonder remmer      B9 Kaoline + Ps/Pc + aXII 2x  
B8 Kaoline + Ps/Pc + aXII onverdund

Zowel aIX 10x als aXI 5x worden regelmatig gebruikt. Er was geen reden om ze opnieuw uit te titreren maar ze zijn ter controle toch meegenomen. Ze remmen de stolling die via de intrinsieke route wordt geïnitieerd, volledig (figuur 8).



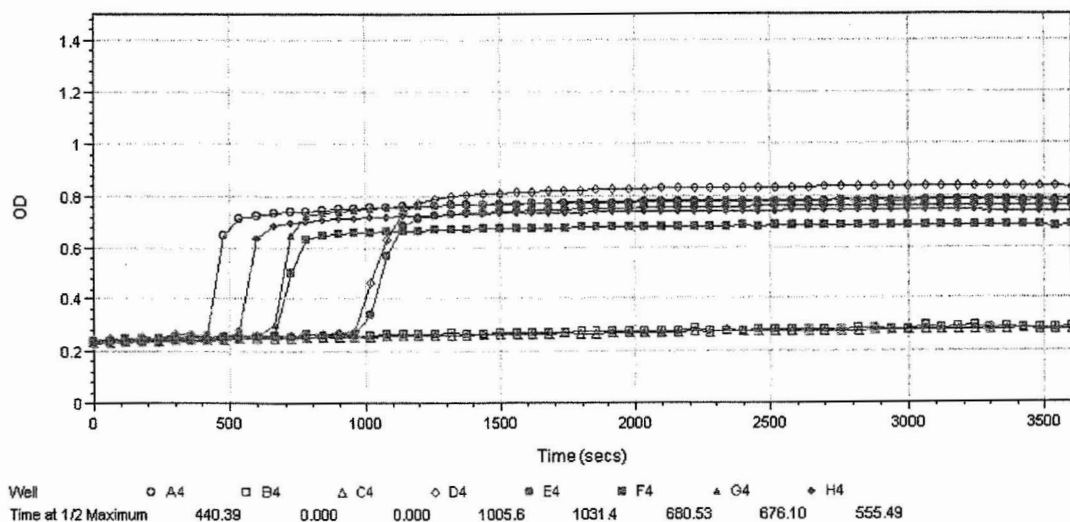
**Figuur 8:** A2: Kaoline + PS/PC zonder remmer  
E2: Kaoline + PS/PC aIX 10x  
F2: Kaoline + PS/PC aXI 5x

In een systeem waarbij de stolling via de extrinsieke route op gang werd gebracht is gekeken naar de specificiteit van aIX en aXI en aXII (figuur 9). Geen van de verdunningen had invloed op dit systeem.



**Figuur 9 : FGT:** A2 Thromborel zonder remmer E2 Thromborel + aXI 5x  
D2 Thromborel + aIX 10x F2 Thromborel + aXII 2x

De fibrine generatie test is een aantal keer gedaan bij verschillende Annexine V verdunningen. Het blijkt uit deze metingen dat het resultaat per vrijwilliger sterk varieert. Er is voor gekozen om 4 verschillende verdunningen mee te nemen: annexine V 10x en 20x die bij alle bepalingen bij de vrijwilligers remming gaven, en annexine V 40x en 60x die variabele resultaten gaven bij de vrijwilligers. Een voorbeeld van een fibrine generatie test met verschillende verdunningen annexine V is te zien in figuur 10.



**Figuur 10 : FGT:** A4 MP + zonder remmer E4 MP + Ann 50x  
B4 MP + Ann 5x F4 MP + Ann 100x  
C4 MP + Ann 10x G4 MP + Ann 200x  
D4 MP + Ann 25x H4 MP + Ann 300x

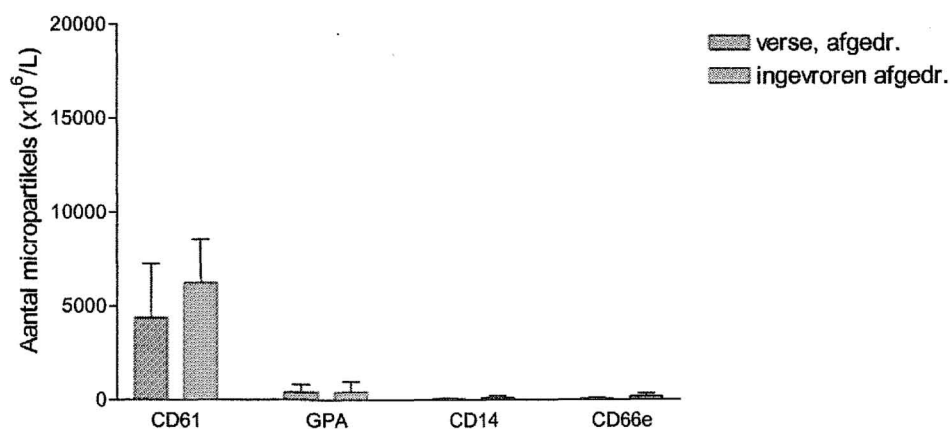


## De cellulaire herkomst van de micropartikels, hun aantal, en expositie van negatief geladen fosfolipiden

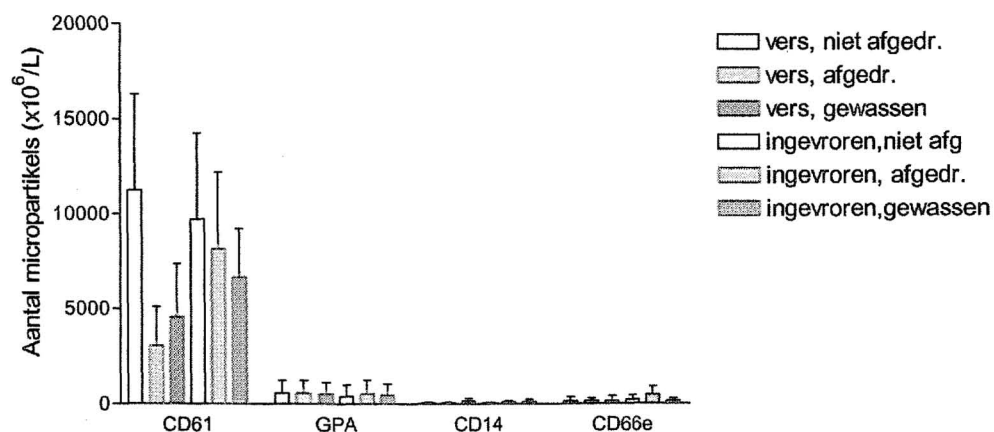
### *Vergelijken van de aantallen en annexine V positiviteit van de micropartikels in de verschillende buffers*

De flowcytomètrische analyse van micropartikels in deze studie werd in PBS/Ca/Pefabloc buffer uitgevoerd, om aankleuren met annexine V mogelijk te maken ook in monsters waar nog plasma aanwezig is (waar de micropartikels niet gewassen zijn). Ter controle, om onverwachte effecten van Pefabloc uit te sluiten is er bij de gewassen micropartikels ook PBS/Ca als buffer meegenomen. De PBS/citraat buffer fungeert als negatieve controle bij alle monsters voor de annexine V aankleuring, en als een extra controle voor de aantallen micropartikels gemeten in de PBS/Ca/Pefabloc buffer.

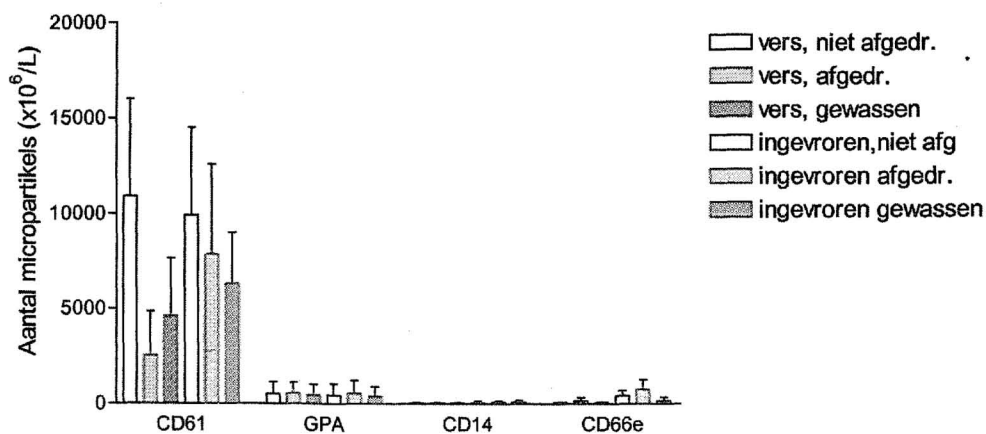
In figuur 11, 12 en 13 is te zien dat de aantallen micropartikels in alle buffers met elkaar overeenkomen.



Figuur 11: Gemiddelde  $\pm$  SD aantallen micropartikels in vrijwilligers plasma, vers en ingevroren, gewassen in PBS/Ca buffer.

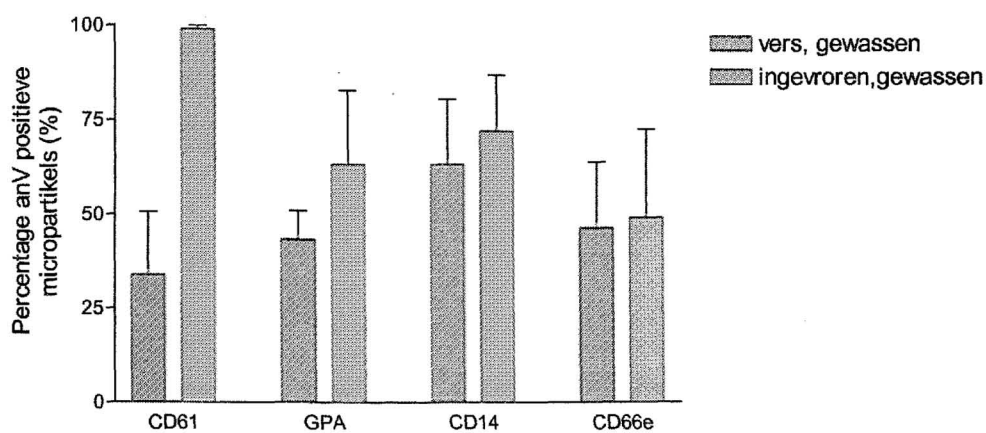


Figuur 12: Gemiddelde  $\pm$  SD aantallen micropartikels in vrijwilligersplasma, vers en ingevroren, wel/niet afgedraaid en gewassen in PBS/citraat buffer.

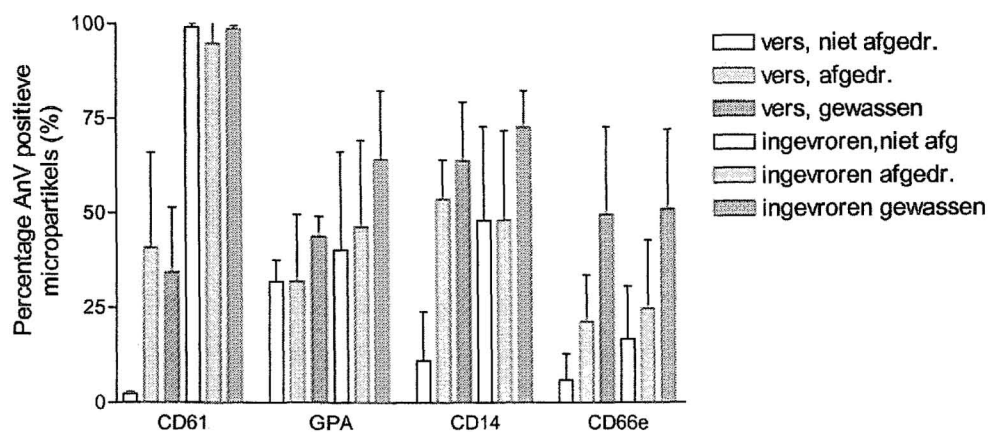


Figuur 13: Gemiddelde  $\pm$  SD aantallen micropartikels in vrijwilligersplasma, vers en ingevroren, wel/niet afgedraaid en gewassen in PBS/Ca/Pefabloc buffer.

In figuur 14 en 15 zijn de percentages annexine V positieve micropartikels te zien in PBS/Ca en PBS/Ca/Pefabloc. Deze percentages komen ook goed met elkaar overeen. De PBS/Ca/Pefabloc buffer lijkt dus geen artefacten te veroorzaken.



Figuur 14 Gemiddelde  $\pm$  SD percentages Annexine V positieve micropartikels in vrijwilligersplasma, vers en ingevroren, gewassen in PBS/Ca buffer.



Figuur 15: Gemiddelde  $\pm$  SD percentages Annexine V positieve micropartikels in vrijwilligersplasma, vers en ingevroren, wel/ niet afgedraaid of gewassen in PBS/Ca/Pefabloc buffer.

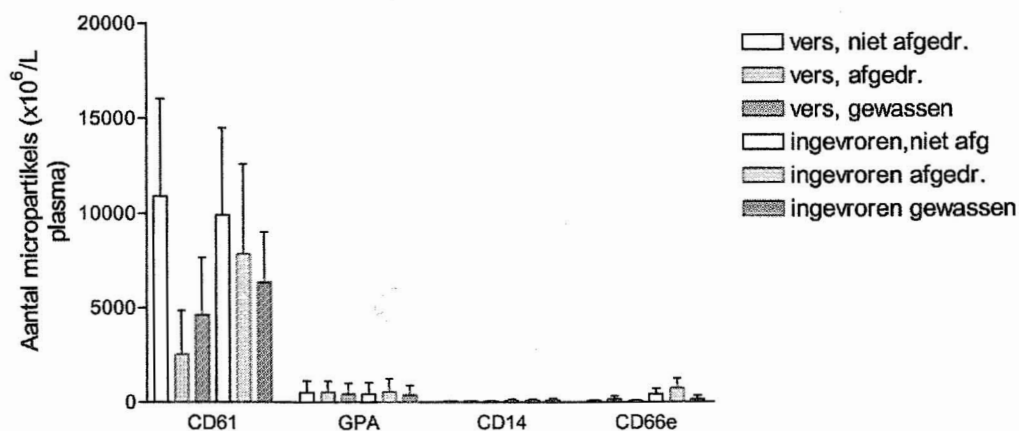
## Micropartikels van gezonde vrijwilligers

In figuur 16, 17 en 18 zijn de resultaten te zien van de bepalingen op micropartikels van de gezonde vrijwilligers.

Figuur 16 geeft een voorstelling van de cellulaire herkomst van de micropartikels. De meeste zijn CD61 positief, dus afkomstig van bloedplaatjes. Het aantal glycophorine A positieve micropartikels (afkomstig van erythrocyten) is veel minder, en er zijn ook weinig CD14 (afkomstig van monocyten) en CD66e positieve micropartikels (afkomstig van granulocyten).

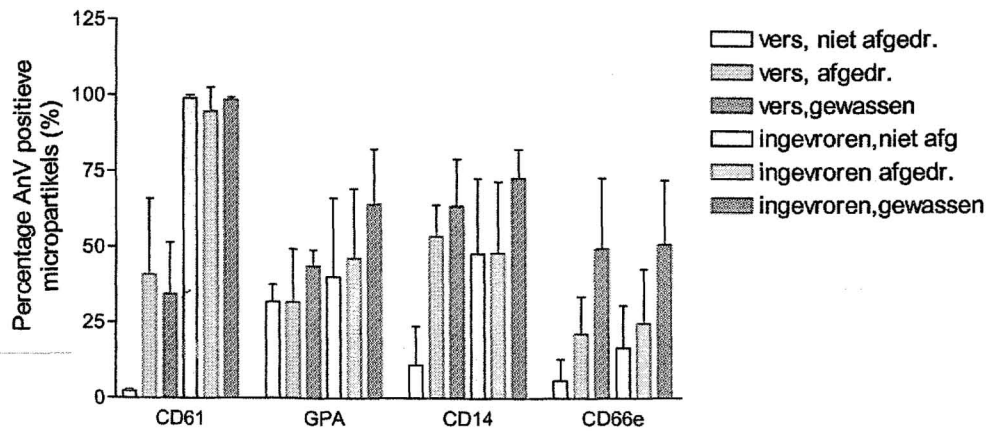
Er is geen verschil te zien tussen de aantallen vers niet afgedraaide, en ingevroren niet afgedraaide micropartikels.

Een deel van deze micropartikels gaat dus of kapot, of is niet meer te resuspenderen. Als er ook een wasstap wordt uitgevoerd, gaat er bij vers materiaal het aantal plaatjesmicropartikels omhoog, bij ingevroren omlaag. Dit is waarschijnlijk het resultaat van een ietsjes andere balans tussen verlies en fragmentatie van de micropartikels (zie hieronder), waarbij in verse monsters de fragmentatie groter is, en in ingevroren monsters het verlies. In de aantallen erythrocyten en leukocyten micropartikels is er weinig verandering te zien bij invriezen of afdraaien.



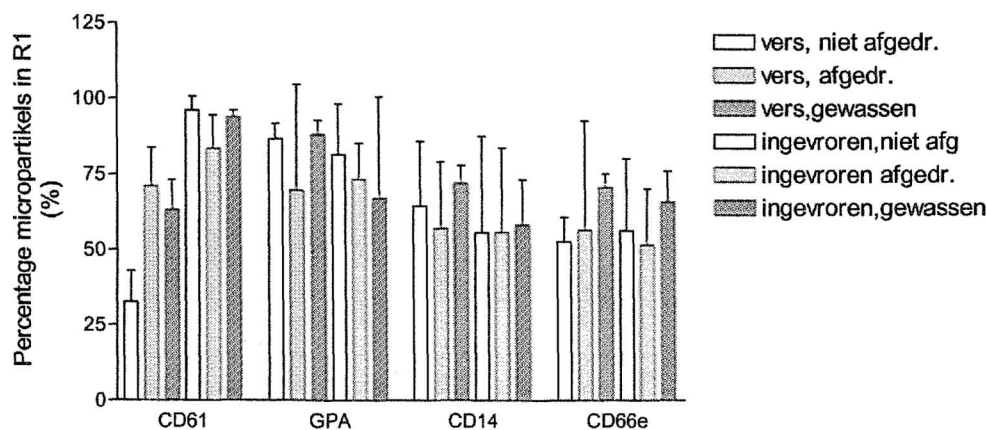
Figuur 16: Gemiddelde  $\pm$  SD aantallen micropartikels in gezonde vrijwilligers in PBS/Ca/Pefabloc buffer

In figuur 17 is het percentage annexine V positieve micropartikels te zien bij de gezonde vrijwilligers. Bij de CD61 positieve micropartikels is de annexine V positiviteit onder verse, niet afgedraaide condities maar 2-3%. Bij erythrocyten micropartikels is deze 25-39%, bij monocyten micropartikels 5-33%, en bij granulocyten micropartikels 0-18%. Bij de CD61 positieve micropartikels is er bij de verse monsters een duidelijke stijging van annexine V positieve micropartikels te zien na pelletteren (met of zonder wassen). Na invriezen zijn praktisch alle CD61 micropartikels positief voor annexine V, en dit kan door centrifugeren natuurlijk niet meer toenemen. Bij de erythrocyten en leukocyten micropartikels is er een minder sterke maar vergelijkbare tendens te zien: bij invriezen of afdraaien neemt het percentage annexine V positieve micropartikels toe.



Figuur 17: Gemiddelde  $\pm$  SD percentages annexine V positieve micropartikels in vrijwilligersplasma in PBS/Ca/Pefabloc buffer.

In figuur 18 is te zien welk percentage van de micropartikels bij de gezonde vrijwilligers in regio 1 (R1) valt op een forward scatter-side scatter dot plot. In R1 zitten de kleinere micropartikels, terwijl in regio 2 de grotere micropartikels te vinden zijn, zie bijlage V. Bij de CD61 positieve micropartikels neemt het percentage kleinere micropartikels bij verse monsters na centrifugeren toe. In materiaal dat ingevroren is geweest, zitten bijna alle micropartikels in R1. Bij erythrocyten en leukocyten micropartikels is er geen significante verandering te zien in het percentage kleinere deeltjes na afdraaien of invriezen.

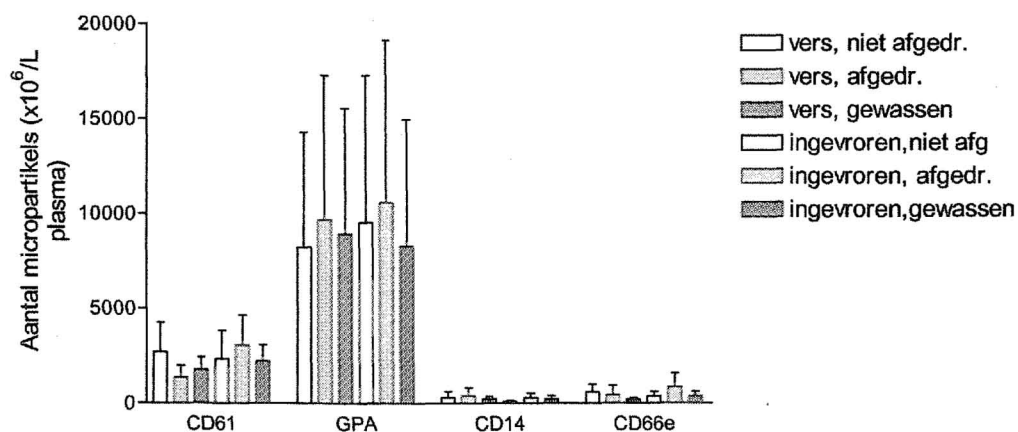


Figuur 18: Gemiddelde  $\pm$  SD percentages micropartikels in R1 bij gezonde vrijwilligers in PBS/Ca/Pefabloc buffer.

## Micropartikels van cardiochirurgische patiënten

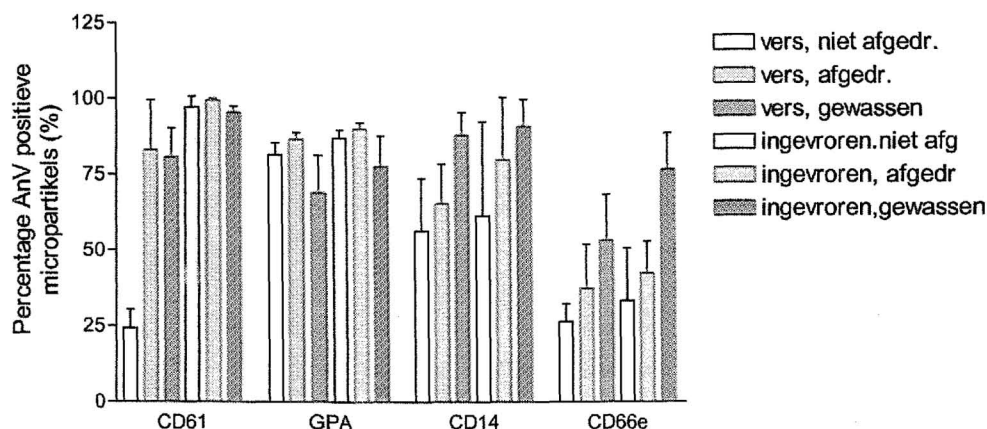
In figuren 19, 20 en 21 zijn de resultaten verwerkt van de cardiochirurgische patiënten.

In figuur 19 is het aantal micropartikels en de positiviteit met de gebruikte markers te zien. De micropartikels zijn hier overwegend van erythrocyten afkomstig. Het aantal CD61 micropartikels is veel lager, en het aantal leukocyten micropartikels is, zoals bij de gezonde vrijwilligers, zeer klein. Het aantal CD61 positieve micropartikels in de verse monsters neemt ietsjes af na afdraaien, wat niet terug te zien is in ingevroren monsters misschien vanwege de relatief lage aantallen en relatief grote variatie. Het aantal erythrocyten of leukocyten micropartikels verandert niet onder de verschillende condities.



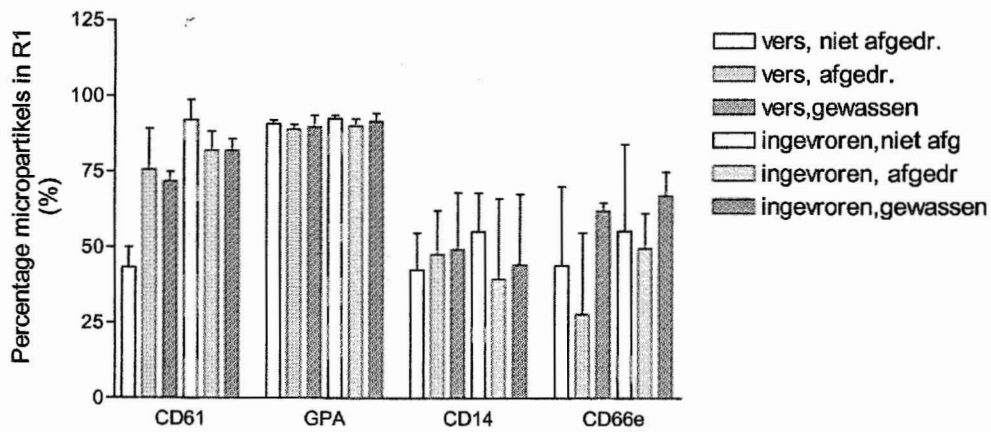
Figuur 19: Gemiddelde  $\pm$  SD aantallen micropartikels in cardiochirurgische patiënten in PBS/Ca/Pefabloc buffer.

Het percentage annexine V positieve micropartikels is bij cardiochirurgische patiënten hoger dan bij gezonde vrijwilligers bij zowel plaatjesmicropartikels als erythrocyten en leukocyten micropartikels. Bij de erythrocyten micropartikels, waar dit percentage in de verse, niet afgedraaide monsters het hoogst is, is er geen verandering te zien na invriezen of afdraaien. Bij de andere soorten micropartikels is er een toename onder deze condities.



Figuur 20: Gemiddelde  $\pm$  SD percentages annexine V positieve micropartikels bij Cardiochirurgische patiënten in PBS/Ca/Pefabloc buffer.

In figuur 21 zijn de percentages van de micropartikels in R1 te zien. Vergeleken met de gezonde vrijwilligers zijn er meer CD61 micropartikels in R1 te vinden in verse niet afgedraaide monsters. Wat het effect van invriezen en afdraaien betreft, zijn de resultaten ongeveer hetzelfde.



Figuur 21: Gemiddelde  $\pm$  SD percentages micropartikels in R1 in Cardiochirurgische patiënten in PBS/Ca/Pefabloc buffer

## Procoagulante eigenschappen van de micropartikels

In figuren 22 en 23 zijn de fibrine generatie tijden van de gezonde vrijwilligers uitgezet met en zonder invloed van de verschillende antistoffen en annexine V verdunningen.

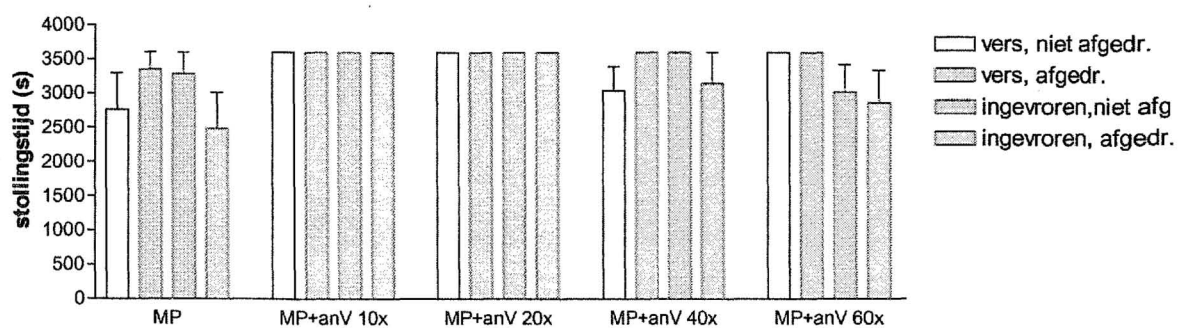
In de eerste reeks van figuur 23 (en 24) is de stollingsactiviteit van de micropartikels te zien zonder enig invloed van remmers.

Dit is een voorstelling van hoe de stolling normaal verloopt. Er is geen significant verschil tussen de stolling van MP die gepelleteerd zijn en MP die ingevroren zijn.

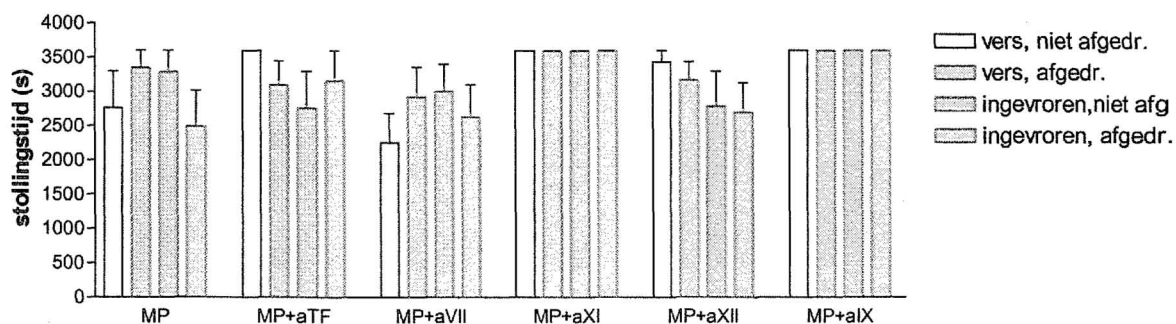
Bij het toevoegen van de verdunningen van annexine V is er een remming te zien bij de 10x en 20x verdunning. Bij annexine V 40x en annexine V 60x verdunt, wordt de stolling minder beïnvloed.

In figuur 24 zijn er verschillende antistoffen toegevoegd. Zowel aVII en aTF hebben geen invloed op de stolling.

aIX en aXI aXII remmen de stolling wel.



Figuur 22: Stollingsactiviteit MP gezonde vrijwilligers + Annexine V verdunningen



Figuur 23: Stollingsactiviteit MP gezonde vrijwilligers + antistofverdunningen

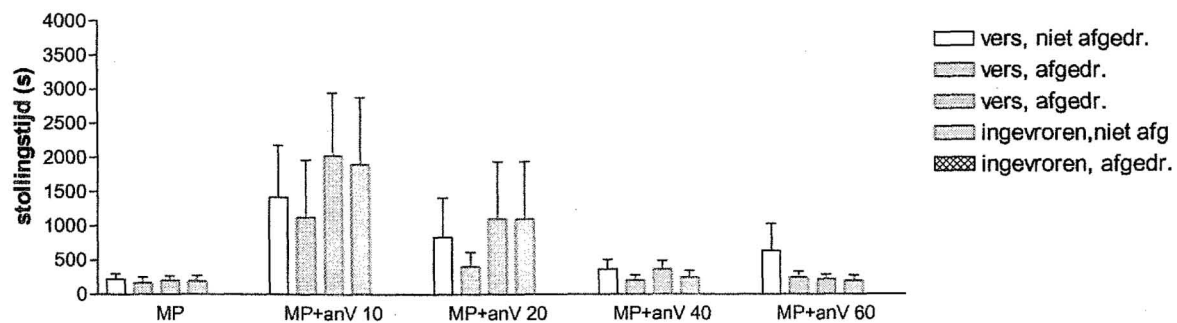
Figuur 24 en 25 geeft de fibrine generatie snelheid van de micropartikels van de cardiochirurgische patiënten.

In de eerste reeks valt het al op dat de deze micropartikels in staat zijn om veel sneller voor fibrine vorming te zorgen dan de micropartikels van de gezonde vrijwilligers.

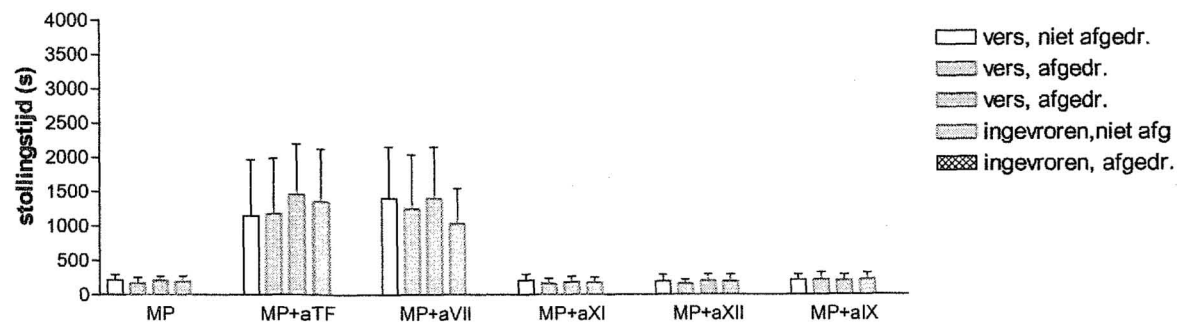
Er zijn geen significante verschillen bij vers en ingevroren, wel en niet gepelleteerd, zijn niet erg duidelijk. De partikels van de cardiochirurgische patiënten zijn erg reactief. Het afdraaien doet de stolling iets sneller verlopen maar het verschil is niet significant.

Bij toevoeging van de annexine V verdunningen is zelfs de kleinste verdunning (10x) niet in staat om de stolling volledig te remmen.

De remming in figuur 25 is te zien bij het toevoegen van aTF en aVII. De antistoffen die de intrinsieke stolweg beïnvloeden hebben geen invloed op de stollingsactiviteit.



Figuur 24: Stollingsactiviteit MP cardiochirurgische patiënten + Annexine V verdunningen



Figuur 25: Stollingsactiviteit MP cardiochirurgische patiënten + antistofverdundingen



## Discussie

*Het effect van invriezen en/of centrifugeren op het aantal en de grootte van de micropartikels.*

Bij het vergelijken van de verschillende manieren van opwerken, is er zowel bij vrijwilligers als bij patiënten ongeveer dezelfde resultaten te zien.

Bij cardiochirurgische patiënten zijn er veel minder plaatjes micropartikels en de veranderingen in aantallen zijn minder uitgesproken/niet detecteerbaar.

Er zijn alleen veranderingen te zien bij plaatjes micropartikels.

*Na afdraaien* vers materiaal is er een veel grotere percentage te zien in R1, terwijl aantallen omlaag gaan. Dit komt waarschijnlijk door fragmentatie en verlies van deeltjes. De plaatjes micropartikels gaan helemaal kapot of zijn niet meer te resuspenden.

*Na wassen* gaan de aantallen iets omhoog. Het percentage in R1 verandert niet: Misschien treedt er hier verdere fragmentatie op. Als het al in R1 zit kan het nog kleiner worden maar dan zit het nog steeds in R1 en er is dus geen verschil te zien.

*Bij invriezen* veranderen de aantallen niet maar het percentage in R1 is hoog. Dit komt waarschijnlijk weer door fragmentatie plus verlies.

*Bij afdraaien en wassen* van het ingevroren materiaal neemt het aantal micropartikels verder af.

De reden voor veranderingen in uitsluitend plaatjes micropartikels is onduidelijk. Het kan zijn omdat ze kwetsbaarder zijn of omdat ze plakkeriger zijn.

*Het effect van invriezen en/of centrifugeren op de expositie van negatief geladen fosfolipiden*

Bij het vergelijken van de verschillende manieren van opwerken, zijn zowel bij de vrijwilligers als bij de patiënten ongeveer dezelfde resultaten waarneembaar.

Het verschil is dat er hier niet alleen bij plaatjes micropartikels een effect te zien is.

Ook bij de andere soorten micropartikels is er een effect door het invriezen en afdraaien. Het percentage annexine V positieve micropartikels neemt bij alle soorten micropartikels toe.

Het percentage annexine V positiviteit in de monsters van de cardiochirurgische patiënten is bij alle soorten micropartikels veel hoger dan bij de gezonde vrijwilligers. Bij de erythrocyten micropartikels is dit zelfs 80%. Dit percentage stijgt significant niet meer door het invriezen of afdraaien.

*Het effect van invriezen en/of centrifugeren op de stollingsbevorderende eigenschappen van micropartikels.*

Ook al zien we een degelijk effect op de aantallen, grootte en annexine V expositie van de micropartikels door het invriezen en afdraaien is er geen effect te zien in de fibrine generatie test. De expositie van negatief geladen fosfolipiden is dus blijkbaar geen beperkende factor in dit assay.

## **Conclusie(s)**

Doel van dit onderzoek was het bestuderen van het effect van invriezen en/of centrifugeren op de expositie van negatief geladen fosfolipiden, het aantal, en de stollingsbevorderende eigenschappen van micropartikels.

De conclusies zijn dat door het invriezen en/of centrifugeren alleen bij plaatjes micropartikels het aantal verlaagd wordt. Het percentage annexine V positiviteit neemt bij alle soorten micropartikels toe.

De micropartikels van verschillende cellulaire herkomst, worden stollingsactiever door deze beide processen.

Tot nu toe worden er, in micropartikel onderzoek, nog altijd bepalingen gedaan op materiaal wat ingevoren is geweest en afgedraaid.

Men moet dus met de hier getoonde effecten van invriezen en afdraaien rekening houden bij de interpretatie van dit soort studies.

## Literatuurlijst

- (1) Wolf, P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br. J. Haematol.* 1967, 13, 269-288.
- (2) VanWijk, M. J.; VanBavel, E.; Sturk, A.; Nieuwland, R. Microparticles in Cardiovascular Diseases. *Cardiovascular Research* 2003, 59, 277-287.
- (3) Zwaal, R. F. A.; Schroit, A. J. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood* 1997, 89, 1121-1132.
- (4) Nieuwland, R.; Sturk, A. Flowcytometrische detectie van micropartikels. *Nederlands Tijdschrift Klinische Chemie* 22, 207-214. 1997.
- (5) Nieuwland, R. Micropartikels: Bloedstollend! *Tromnibus* 2003, 31, 16-18.
- (6) Mann, K. G. Biochemistry and Physiology of Blood Coagulation. *Thromb Haemost* 1999, 82, 165-174.
- (7) Warkentin, T. E.; Hayward, C. P.; Boshkov, L. K.; Santos, A. V.; Sheppard, J. A.; Bode, A. P.; Kelton, J. G. 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.
- (8) Combes, V.; Simon, A. C.; Grau, G. E.; Arnoux, D.; Camoin, L.; Sabatier, F.; Mutin, M.; Sanmarco, M.; Sampol, J.; Dignat-George, F. In Vitro Generation of Endothelial Microparticles and Possible Prothrombotic Activity in Patients With Lupus Anticoagulant. *J. Clin. Invest* 1999, 104, 93-102.
- (9) Lee, Y. J.; Jy, W.; Horstman, L. L.; Janania, J.; Reyes, Y.; Kelley, R. E.; Ahn, Y. S. Elevated Platelet Microparticles in Transient Ischemic Attacks, Lacunar Infarcts, and Multiinfarct Dementias. *Thromb. Res.* 1993, 72, 295-304.
- (10) Katopodis, J. N.; Kolodny, L.; Jy, W.; Horstman, L. L.; De Marchena, E. J.; Tao, J. G.; Haynes, D. H.; Ahn, Y. S. Platelet Microparticles and Calcium Homeostasis in Acute Coronary Ischemias. *Am. J. Hematol.* 1997, 54, 95-101.
- (11) Mallat, Z.; Benamer, H.; Hugel, B.; Benessiano, J.; Steg, P. G.; Freyssinet, J. M.; Tedgui, A. Elevated Levels of Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in the Peripheral Circulating Blood of Patients With Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2000, 101, 841-843.

- (12) George, J. N.; Pickett, E. B.; Saucerman, S.; McEver, R. P.; Kunicki, T. J.; Kieffer, N.; Newman, P. J. 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.
- (13) Sims, P. J.; Wiedmer, T.; Esmon, C. T.; Weiss, H. J.; Shattil, S. J. 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.
- (14) Gemmell, C. H.; Sefton, M. V.; Yeo, E. L. Platelet-Derived Microparticle Formation Involves Glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's Thrombasthenia Defect. *J Biol. Chem.* 1993, 268, 14586-14589.
- (15) Berckmans, R. J.; Nieuwland, R.; Böing, A. N.; Romijn, F. P.; Hack, C. E.; Sturk, A. Cell-Derived Microparticles Circulate in Healthy Humans and Support Low Grade Thrombin Generation. *Thromb. Haemost.* 2001, 85, 639-646.
- (16) Nieuwland, R.; Berckmans, R. J.; Rotteveel Eijkman, R. C.; Maquelin, K. N.; Roozendaal, K. J.; Jansen, P. G. M.; tenHave, K.; Eijssman, L.; Hack, C. E.; Sturk, A. "Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant." *Circulation* 96.10 (1997): 3534-41.
- (17) Berckmans, R. J.; Nieuwland, R.; Tak, P. P.; Böing, A. N.; Romijn, F. P.; Kraan, M. C.; Breedveld, F. C.; Hack, C. E.; Sturk, A. Cell-Derived Microparticles in Synovial Fluid From Inflamed Arthritic Joints Support Coagulation Exclusively Via a Factor VII-Dependent Mechanism. *Arthritis Rheum.* 2002, 46, 2857-2866.
- (18) Nieuwland, R.; Sturk, A. Gebruik Van Flowcytometrie Om De Activatiestatus Van Bloedplaatjes Te Evalueren. *Tijdschrift van de belgische vereniging van laboratorium technologen* 1997, 24.

## **Bijlage I: Voorschrift flowcytometrische analyse**

### **LABZISCODE**

N.v.t

### **TITEL/ DOEL**

Dit voorschrift beschrijft de bepaling van micropartikels in o.a. synoviaalvocht en plasma met behulp van de Calibur van de firma Becton Dickinson

### **PRINCIPE**

**Principe:** Micropartikels zijn kleine membraanblaasjes, die worden afgesnoerd van cellen gedurende celactivatie. Uit in vitro studies is bekend dat micropartikels gedurende celactivatie kunnen worden afgesnoerd van trombocyten, erythrocyten, monocyt en endotheelcellen. Door middel van centrifugatie worden de bloedcellen verwijderd. In een tweede centrifugatie stap worden de micropartikels uit het plasma of synoviaalvocht geïsoleerd. De micropartikels in de pellet worden vervolgens gewassen in een buffer. Vervolgens worden de micropartikels aangekleurd en op de Calibur gemeten. Zo kunnen verschillende labels tegelijk gemeten worden bij verschillende golflengten (zie bijlage 2) b.v. FITC excitatie 488 nm en emissie 517 nm, PE excitatie 546 nm en emissie 575 nm, APC excitatie 634 nm en emissie 660 nm en PerCP excitatie 488 nm en emissie 675 nm.

**Methode:**

**Lineariteit :**

**Detectiegrenzen:**

**Referentiewaarden:**

**Interpretatie:**

### **TOEPASSINGSGEBIED/ APPLICATIEBEHEER**

**Volume:** 250 µL plasma of synoviaalvocht. Indien het plasma bevroren is, ontdooien op smeltend ijs.

**Aard materiaal:**

**Voorbehandeling:** Neem 5 mL citraatbloed af (vacuüm systeem). Indien er meerdere buizen moeten worden afgenomen, neem de citraatbuis dan als eerste af. Meng rustig en meng hierna niet meer. Vervoer de buis rechtop en centrifugeer,

indien mogelijk binnen 15 min na afname, 20 minuten bij 1550 g bij KT zonder rem. Pipetteer het supernatant/ plasma voorzichtig af tot 1 cm boven de cellen, en verzamel dit in een 10 mL plastic puntbuis. Meng.

Afname synoviaalvocht: Laat dit met een spuit afnemen. Vul direct uit in een 5 mL citraatbuis en voeg extra 0,5 mL citraat 3.2 % toe. Meng. Verwerk het monster verder zoals beschreven bij citraatbloed.

Verdelen: Vul het plasma of ander materiaal uit in porties van 250 µL in puntcupjes zonder sta rand. Vries in vloeibare stikstof in gedurende 15 minuten.

Bewaren: Het plasma kan gedurende een lange tijd worden bewaard bij -80 °C.

## DEFINITIES EN TERMEN

|       |   |                             |
|-------|---|-----------------------------|
| MIPA  | : | Micropartikels              |
| FITC  | : | Fluoresceïne-isothiocyanaat |
| PE    | : | Phycoerythrine              |
| APC   | : | Allophycocyanine            |
| PerCP | : | Peridin Chlorophyll Protein |

## VEILIGHEID

Werk conform de algemeen geldende veiligheidsvoorschriften beschreven in boek "Veiligheid op het laboratorium", welke is uitgegeven door de divisie "laboratorium specialismen".

Voor het afvoeren en verwijderen van chemisch afval en specifiek ziekenhuis afval zie de intranetsite van het AMC (door nevenstaande koppeling aan te klikken via "Ctrl + klikken linkermuisknop") (<http://www-intern/users/milieu/Frame/start.htm>).

Afvalverwerking:

Voor verwerking biologisch materiaal. Zie AMC intranetsite.

Ruimte eisen:

N.v.t.

Eisen Personeel:

N.v.t.

## REAGENTIA, STANDAARDEN EN CONTROLES

| Artikel                           | MW     | AMC<br>inkoop nr. | Firma | Art nr. | Ruimte nr. | Plaats    | N |
|-----------------------------------|--------|-------------------|-------|---------|------------|-----------|---|
| Tri-natriumcitraat                | 294,10 |                   | Merc  | 106447  | F1-221     |           |   |
| Calciumchloride.2H <sub>2</sub> O | 147,02 | 1002179           | Merc  | 2382    | F1-205     | excicator |   |
| Aqua dest. (steriel)              | n.v.t  | 979918490         | Fres  | B23067  | F1-205     |           |   |

| Artikel                          | MW    | AMC<br>inkoop nr. | Firma | Art nr.                | Ruimte nr. | Plaats        | Nr. |
|----------------------------------|-------|-------------------|-------|------------------------|------------|---------------|-----|
| PBS 1.4 mmol/L 10 L              |       | 1036083           | LUM C | 932213                 | F1-221     | kast          |     |
| PBS 1.4 mmol/L 500 mL            |       | 1036084           | LUM C | 902632                 | F1-205     | onder ZK      |     |
| Facs buis                        | n.v.t | 5800765           | Falc  | 2052                   | F1-205     | onder<br>facs |     |
| 2 mL invriescupje                | n.v.t | 5887044           | Sars  | 72.609                 | F1-205     | gang          |     |
| Falcon buis 50 mL                | n.v.t | 5800633           | Grei  | 227261                 | F1-205     | gang          |     |
| Plastic 10 mL centrifuge<br>buis | n.v.t | 00100514          | Sars  | 57.469                 | F1-205     | gang          |     |
| 1,5 mL puntcupje zonder<br>rand  | n.v.t | 5883337           | Sars  | 72.607                 | F1-205     | gang          |     |
| Citraatbuis 3,2 %                | n.v.t |                   | BenD  | 367714                 | F1-225     | kast          |     |
| Filter 0,2 µm                    | n.v.t | 5802064           | Schl  | FP030/3                | F1-205     | gang          |     |
| Spuut 20 mL                      | n.v.t | 1103213           | BenD  | 300613                 | F1-205     | kast          |     |
| 1,5 mL puntcupje                 | n.v.t |                   | Eppd  | 0030.102.0F1-205<br>02 |            | gang          |     |

- 0,1 mol/L  $\text{CaCl}_2$  oplossing:  
Los 1,47 g  $\text{CaCl}_2$  op in 100 mL steriel aqua dest. Houdbaarheid 12 maanden bij 2-8 °C in de koelkast.
- 3,2 % tri-natriumcitraat oplossing:  
Los 1,6 g citraat op in 50 mL steriel aqua dest. Houdbaar 2 maanden bij 2-8 °C in de koelkast.
- 2,5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  in PBS:  
Voeg bij elkaar 39 mL PBS (1,4 mmol/L) en 1 mL 0,1 mol/L  $\text{CaCl}_2$  en stel op pH 7,4. Maak deze oplossing vlak voor gebruik. Filtreer door een filter van 0,2 µm.
- 0,32% citraat in PBS:  
Voeg bij elkaar 9 mL PBS (1,4 mmol/L) en 1 mL citraat 3,2% en stel op pH 7,4. Maak deze oplossing vlak voor gebruik. Filtreer door een filter van 0,2 µm.

## APPARATUUR EN HULPMIDDELEN

| Omschrijving        | Firma | Inventaris nr. | Ruimte nr. |
|---------------------|-------|----------------|------------|
| Centrifuge          | Hett  | 01-020-1627    | F1-205     |
| Centrifuge micro    | Hett  | 01-020-1626    | F1-205     |
| Vibrofix VF1 vortex | IKA   | divers         | F1-205     |
| Calibur             | BenD  | 01-020-1786    | F1-205     |



## WERKWIJZE

### ISOLATIE MICROPARTIKELS UIT DIVERSE VLOESTOFFEN, B.V. PLASMA OF SYNOVIAALVOCHT

- Pipetteer 250  $\mu$ L monster, b.v. citraatplasma of synoviaalvocht, in een 1,5 mL cupje zonder sta rand, of neem een monster uit de vriezer en ontdooi dit op smeltend ijs gedurende 1 uur.
- Meng het ontdooide monster en controleer op stolsels.
- Markeer het cupje met viltstift zodat bekend is waar de pellet zich zal bevinden.
- Centrifugeer 30 min. bij 13.000 RPM (18.890 g), start op stand 9 en rem op stand 1, bij 20 °C, in de microcentrifuge.
- Maak tijdens centrifugatie:
  - 2,5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  in PBS. (zie 6.2)
  - 0,32% citraat in PBS. (zie 6.2)
- Pipetteer 225  $\mu$ L (2 \* 100  $\mu$ L en 1 \* 25  $\mu$ L, met een geel puntje) supernatant voorzichtig af (zorg dat de pellet aan onderkant zit).
- Voeg toe 225  $\mu$ L PBS + citraat en vortex op maximale stand 2 \* 10 seconden. Controleer door middel van tegen de buis aan te tikken of de pellet is opgelost. (er dwarrelt niets meer op en er is niets meer te zien in de hoek waar de pellet)
- Centrifugeer gedurende 30 minuten bij 13.000 RPM (18.890 g), start op stand 9 en rem op stand 1, bij 20 °C, in de microcentrifuge.
- Maak tijdens centrifugatie de benodigde antistofverduunningen in PBS +  $\text{CaCl}_2$ , zie het protocol van desbetreffende studie of bijlage 1. Maak altijd ongeveer 15  $\mu$ L extra en 1  $\mu$ L extra per pipetteer stap dan dat je daadwerkelijk nodig hebt.
- Centrifugeer de antistofverduunningen, behalve de annexine V verduunning, 5 minuten bij 13000 RPM.
- Pipetteer de antistofverduunningen, minus 15  $\mu$ L, voorzichtig over in een schoon cupje.
- Start met het pipetteren van buffer in de facsbuisjes, zie labels van micropartikels met antistoffen.
- Pipetteer na centrifugatie 225  $\mu$ L supernatant af (2 \* 100  $\mu$ L en 1 \* 25  $\mu$ L met een geel puntje).
- Voeg toe 75  $\mu$ L PBS + citraat en vortex 2 \* 10 seconden. Controleer door middel van tegen de buis aan te tikken of de pellet is opgelost (er dwarrelt niets meer op en er is niets meer te zien in de hoek waar de pellet zat).
- Indien dit niet het geval is, resuspendeer de pellet met een geel pipetpuntje, controleer of er niets in het puntje achterblijft.

### LABELEN VAN MICROPARTIKELS MET ANTISTOFFEN

- In de meeste gevallen wordt een 'triple' label (drie verschillende antistoffen, elk voorzien van een ander fluorochroom, b.v. FITC, PE en APC) gebruikt. Deze procedure wordt in dit voorschrift beschreven. Indien van een enkel of dubbellabel wordt uitgegaan pas dan het volume PBS +  $\text{CaCl}_2$  aan. Het volume van de buffer voor de blanco en de annexine-V controle blijven gelijk.
- Zet voor elk monster, voor de afzonderlijke merkers facsbuisjes met dop klaar volgens het betreffende protocol, zie ook Bijlage 2.
- Pipetteer de onderstaande volumina in de facsbuisjes:

|                                         |                                                                |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Monster (voor de afzonderlijke merkers) | : Pipetteer 35 $\mu$ L PBS + $\text{CaCl}_2$ in elke facsbuis. |
| Blanco (ongelabeld) monster             | : Pipetteer 50 $\mu$ L PBS + $\text{CaCl}_2$ in de facsbuis.   |
| Annexine-V controle monster             | : Pipetteer 45 $\mu$ L PBS + citraat in de facsbuis.           |
- Pipetteer in elke facsbuis, behalve bij de blanco (ongelabeld) en de annexine V controle 5  $\mu$ L van het 1e, 2e en 3e label (antistoffen of annexine V eventueel voorverdunnen in PBS +  $\text{CaCl}_2$ , zie protocol van de studie of bijlage 1)



- Pipetteer in de facsbuis van de annexine V controle 5  $\mu$ L annexine V verdunning.
- Vortex kort (2 à 3 sec.).
- Pipetteer in alle facsbuizen 5  $\mu$ L micropartikel suspensie (patiënt, vrijwilliger, synoviaalvocht of van andere origine).
- Vortex kort
- Incubeer gedurende 15 minuten in het donker bij KT.
- Voeg aan de annexine V controle 900  $\mu$ L PBS + citraat toe.
- Voeg 900  $\mu$ L PBS + CaCl<sub>2</sub> aan alle andere facsbuizen toe.
- Vortex kort.
- Start de Calibur op volgens AVCalibur.
- Meet op de Calibur onder de layout: MIPA. Instrumentsettings: MIPAsat
- Meet met de grote naald en de vloeistofstroom op HI.
- Zet onder >acquisitie en storage< alle mogelijkheden voor het opslaan op All, de resolutie op 1024 en meet precies 60 seconden (LET OP: het aantal cells moet op 2.500.000 staan anders wordt dit de beperkende factor).

## KWALITEITSCONTROLE

N.v.t.

## VERWERKING RESULTATEN

Verwerk de resultaten m.b.v. het computerprogramma Cellquest op de Mac.

## JUISTHEID EN PRECISIE

N.v.t.

## OPMERKINGEN

N.v.t.

## BIJBEHORENDE DOCUMENTEN

|                  |                                             |
|------------------|---------------------------------------------|
| Hoofdstuk.....   | van het kwaliteitshandboek voor afkortingen |
| LEKC-AP012       | : ApparatenSOP Calibreren pipetten          |
| LEKC-AP011       | : ApparatenSOP pH-meter                     |
| LEKC-AP014b      | : ApparatenSOP Afwegen                      |
| LEKC-AP014a      | : ApparatenSOP Analytische balans           |
| LEKC-AP004       | : ApparatenSOP FACSCalibur                  |
| Intranet Millieu | : Afvalstromen                              |

## BIJBEHORENDE FORMULIEREN

N.v.t.

## **LITERATUUR**

N.v.t.

## **BIJLAGEN**

N.v.t.

## Bijlage II: voorschrift FGT

### LABZISCODE

N.v.t.

### TITEL/ DOEL

Dit voorschrift beschrijft de fibrine generatie test in diverse materialen.

### PRINCIPE

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Principe:          | Methode: De FGT is een methode die de hoeveelheid gevormde fibrine in de tijd kan meten. De mate van fibrinevorming kan beïnvloedt worden door toevoeging van PS/PC vesicles, tissue factor maar ook door micropartikels. Met de FGT is het dus mogelijk om de mate van stollingsbevorderende activiteit van micropartikels in vitro/ ex vivo te meten.<br>Aan micropartikel-vrij normaalplasma wordt een hoeveelheid micropartikels toegevoegd. Dit wordt op 37 °C gebracht en de fibrinevorming (indien aanwezig) wordt gestart door toevoeging van calciumchloride. Vervolgens wordt op de spectrofotometer op 405 nm afgelezen. |
| Methode:           | N.v.t.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Lineariteit :      | N.v.t.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Detectiegrenzen:   | N.v.t.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Referentiewaarden: | N.v.t.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Interpretatie:     | N.v.t.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

### TOEPASSINGSGEBIED/ APPLICATIEBEHEER

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Volume:         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Aard materiaal: | 5.0 mL citraatbloed<br>Plasma: Neem 5 mL citraatbloed af (vacuüm systeem). Indien er meerdere buizen moeten worden afgenomen, neem deze buis dan als eerste af. Meng rustig en meng hierna niet meer.<br>Vervoer de buis rechtop en centrifugeer, indien mogelijk, binnen 15 min na afname 20 min. bij 1550xg op KT, zonder rem.<br>Pipetteer het supernatant voorzichtig af en verzamel dit in een 10 mL plastic puntbuis. Meng. Vul plasma uit in porties van 250 |

µL in punt cupjes zonder sta rand. Invriezen in vloeibare stikstof (15 min.). Bewaar het plasma bij -80 °C.

Voorbehandeling : Ontdooi monsters op smeltend ijs. Meng kort. Centrifugeer 30 min. bij 13000 rpm, 20 °C. Pipetteer 225 µL micropartikel vrij plasma af en gebruik dit indien nodig als pool bij FGT. Neem pellet op in 225 µL PBS/0,32 % tri-natriumcitraat opl. (zie 6.1) en centrifugeer 30 min. bij 13000 rpm, 20 °C. Pipetteer 225 µL supernatant af. Meng de pellet (25 µL) kort op vortex of resuspendeer met een pipetpuntje. Zie voor details LEKC-AN012

## DEFINITIES EN TERMEN

|                                      |   |                                  |
|--------------------------------------|---|----------------------------------|
| MP                                   | : | Micropartikel                    |
| FGT                                  | : | Fibrine generatie test           |
| PC                                   | : | L- $\alpha$ -phosphatidylcholine |
| PS                                   | : | L- $\alpha$ -phosphatidyl-serine |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | : | Calciumchloride                  |
| Nal                                  | : | Natriumchloride                  |
| PBS                                  | : | Phosphate Buffered Saline        |

## VEILIGHEID

Werk conform de algemeen geldende veiligheidsvoorschriften beschreven in boek "Veiligheid op I laboratorium", welke is uitgegeven door de divisie "laboratorium specialismen".  
Voor het afvoeren en verwijderen van chemisch afval en specifiek ziekenhuis afval zie de intranetsite van het AMC (door nevenstaande koppeling aan te klikken via "Ctrl + klikken linkermuisknop") (<http://www-intern/users/milieu/Frame/start.htm>).

Afvalverwerking:

Voor verwerking biologisch materiaal en chemisch afval, zie de AMC intranetsite.

Ruimte eisen:

n.v.t.

Eisen Personeel:

n.v.t.

## REAGENTIA, STANDAARDEN EN CONTROLES

### Benodigdheden

| Artikel       | MW | AMC<br>inkoop nr. | Firma | Cat. nr. | Ruimte<br>nr. | Plaats nr |
|---------------|----|-------------------|-------|----------|---------------|-----------|
| Tromborel ® S |    |                   | Behr  | OUHP-35  | F1-205        | KK        |

| Artikel                                  | MW            | AMC<br>inkoop nr. | Firma Cat. nr.    | Ruimte<br>nr. | Plaats nr |
|------------------------------------------|---------------|-------------------|-------------------|---------------|-----------|
| Kaoline                                  |               | 1036372           | Sigm K 7375       | F1-221        |           |
| PS/PC vesicles                           |               |                   |                   | F1-205        | KK        |
| Tris-HCl                                 | 157,6         | 1032259           | Merc 108219       | F1-221        |           |
| NaCl 0.9 %                               |               |                   | Baxt              | F1-221        |           |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O     | 147,02        | 1002179           | Merc 102382       | F1-205        | EX        |
| Aqua test. (steriel)                     |               | 97918490          | Fres B23067       | F1-205        |           |
| 96 wells platen                          |               | 5880613           | Grei 655191       | F1-205        |           |
| tri-natriumcitraat<br>.2H <sub>2</sub> O | 294,10        |                   | Merc 106447       | F1-205        |           |
| PBS                                      |               | 13763806          | Apot              | F1-205        |           |
| 1,5 mL epjes                             |               |                   | EPPD 0030.125.150 | F1-205        |           |
| 50 mL buizen                             |               | 5800633           | Grei 227261       | F1-205        |           |
| Diverse antistoffen                      | zie bijlage 2 |                   |                   |               |           |

## Oplossingen

- Kaoline-suspensie 0.5 mg/mL  
Weeg 2.0 mg kaoline af. Voeg 4.0 mL NaCl 0.9 % toe. Kaoline lost niet op en zakt snel uit.  
Meng voor iedere stap.
- Tromborel® S  
Los de inhoud van het potje tromborel® S op in 10 mL aqua dest. Verdeel het in portie van 50 µL. Bewaar bij -80 °C. Gebruik altijd een nieuw niet eerder ontdooid cupje uit de vriezer.
- PS/PC vesicles (zie Bijlage III).
- 3,2 % tri-natriumcitraat.2H<sub>2</sub>O oplossing:  
Weeg 1,6 g tri-natriumcitraat af. Los op in 50 mL steriel aqua dest. Houdbaar 2 maanden bij 2-8 °C in de koelkast.
- 0,32% tri-natriumcitraat in PBS Leiden:  
Voeg bij elkaar 9 mL PBS Leiden (1,4 mmol/L, pH 7,5) en 1 mL tri-natriumcitraat 3,2% en stel op pH 7,4. Maak dit vlak voor gebruik. Filtreer door een filter van 0,2 µm.

## APPARATUUR EN HULPMIDDELEN

| Omschrijving        | Firma | Inventaris nr. | Ruimte nr. |
|---------------------|-------|----------------|------------|
| Koelkast            | Lieb  | 01-020-2364    | F1-205     |
| Reader Spectramax   | MoDe  | 01-020-1801    | F1-205     |
| Micromix            | DPC   | 01-020-1432    | F1-205     |
| Verwarmingsplaatjes | Chro  | 99-000-0534    | F1-205     |
| Diepvries -80 °C    | ThFo  | 01-020-1595    | F1-228     |

| Omschrijving       | Firma | Inventaris nr. | Ruimte nr. |
|--------------------|-------|----------------|------------|
| Multichannel pipet | Bran  | N.v.t.         | F1-205     |

## WERKWIJZE

### *MP opwerken:*

- Als men een FGT met micropartikels inzet, start dan met het bereiden hiervan, zie ook LEKC-AN012 bij werkwijze bij 8.1, maar stop daar waar men overgaat tot het toevoeg van 75  $\mu$ L PBS/citraat opl het volume is nu 25  $\mu$ L en bevat 10x geconcentreerde micropartikels.

### *Klaarzetten van alle benodigdheden:*

- Maak werklijst en een pipetteerschema. Pas pipetteerschema aan voor eigen experimenten indien men remmers of MP toevoegen. Pas indien nodig het volume aan met NaCL 0.9%. wat hieraan moet worden toegevoegd.
- Indien patiëntenplasma heparine bevat behandel dit dan eerst met heparinase (zie 6.2)
- Zet de Spectramax aan op 37 °C. Minimaal 30 min voor de aanvang aflezing van experiment.

### *Inzetten van het reactiemengsel:*

- Neem een lege 96 wells microtiterplaat.
- Pipetteer volgens het pipetteerschema als volgt bij elkaar: micropartikel-vrij plasma, de antistoffen, de micropartikelsuspensie.
- Meng op de schudapparaat (5 sec. op stand 3)
- Dek de plaat af met plastic folie.
- Preïncubeer 30 min. op KT
- Verdun ondertussen de antistoffen (zie bijlage 2), kaoline (250x), PS/PC(250x), tromboc (250x) met NaCL 0.9 %.
- Voeg vervolgens aan plasma mengsel de benodigde NaCL 0.9% toe.
- Voeg de kaoline en PS/PC vesicles toe indien men de intrinsieke controle meenemen.
- Pipetteer voor extrinsieke controle 100  $\mu$ L tromborel in een aparte well.
- Pipetteer voldoende  $\text{CaCl}_2$  in een aparte rij.
- Preïncubeer 10 min. bij 37 °C
- Start reactie door 13  $\mu$ L  $\text{CaCl}_2$  toe te voegen met een 12-kanaalspipet aan plasma mengsel.
- Indien extrinsieke controle wordt meegenomen, voeg dan tegelijk met de  $\text{CaCl}_2$ , tromborel toe aan plasmamengsel.

### Pipetteerschema:

| Plaats bij 37 °C            | Blanco ( $\mu$ L) | Monster ( $\mu$ L) | Intrinsieke controle ( $\mu$ L) | Extrinsieke controle ( $\mu$ L) |
|-----------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Plasma (MP vrij)            | 75                | 67.5               | 75                              | 75                              |
| Antistof                    | -                 | 15                 | -                               | -                               |
| Micopartikelpellet          | -                 | 7.5                | -                               | -                               |
| 30 min. preïncuberen bij KT |                   |                    |                                 |                                 |
| PS/PC vesicles              | -                 | -                  | 10                              | -                               |
| Kaoline                     | -                 | -                  | 10                              | -                               |

|                                                     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Tromborel                                           | -   |     |     | 10  |
| Buffer (NaCL 0.9%)                                  | 30  | 15  | 10  | 20  |
| Eindvolume                                          | 105 | 105 | 105 | 105 |
| Start de reactie na 10 min. preïncubatie bij °C met |     |     |     |     |
| CaCl <sub>2</sub> (0.1 M) (37 °C)                   | 13  | 13  | 13  | 13  |

### ***Start en vervolg van de reactie:***

- Controleer of programma FGT op spectrama geopend is
- Start reactie door 13 µL CaCl<sub>2</sub> toe te voegen met een 12-kanaalspipet aan plasma mengsel. Indien extrinsieke controle wordt meegenomen, voeg dan tegelijk met de CaCl<sub>2</sub>, 10 µL tromborel toe aan plasmamengsel.
- PAS OP voor luchtballen
- Plaats plaatje snel in de reader en lees gedurende 60 min. bij 37 °C af bij 405 nm op de Spectramax . Roep in het softmax programma onder assay's in de menubalk het protocol voor de FGT op. Sla de uitslagen op onder data in de FGT map onder het juiste jaartal, vervolgens onder de juiste maand (maak desnoods de mappen aan). De opslag code is als volgt: jjjjmmdd01, 02 of 03 (voorbeeld 2003102101). De laatste 2 cijfers geven aan welk afleesnummer je hebt bij meerdere aflezingen van dezelfde bepaling op een dag.

## **KWALITEITSCONTROLE**

Voor intrinsieke controle wordt kaoline meegenomen en voor extrinsiek controle tromborel. Als negatieve controle wordt buffer gebruikt

## **VERWERKING RESULTATEN**

Noteer gebruikte aanmaakdata van reagentia en lotnummers in je labjournaal.

## **JUISTHEID EN PRECISIE**

N.v.t.

## **OPMERKINGEN**

Voorkom luchtballen tijdens het pipetteren beïnvloeden de meetresultaten.

## **BIJBEHORENDE DOCUMENTEN**

Hoofdstuk..... van het kwaliteitshandboek voor afkortingen  
 LEKC-AP..... : ApparatenSOP Pipetten  
 LEKC-AP..... : ApparatenSop pH-meter

|                 |   |                                 |
|-----------------|---|---------------------------------|
| LEKC-AP.....    | : | ApparatenSop Afwegen            |
| LEKC-AP.....    | : | ApparatenSop Analytische balans |
| LEKC-AP004      | : | ApparatenSOP Spectramax         |
| LEKC-AN024      | : | AnalyseSOP Vesicles             |
| LEKC-AN012      | : | AnalyseSOP Micropartikels AMC   |
| Intranet Milieu | : | Afvalstromen                    |

## **BIJBEHORENDE FORMULIEREN**

N.v.t.

## **LITERATUUR**

N.v.t.

## **BIJLAGEN**

|            |                                                              |
|------------|--------------------------------------------------------------|
| Bijlage 1: | Voorbeeld werkindeling microtiterplaten                      |
| Bijlage 2: | Antistoffen in gebruik met de daarbij gebruikte verdunningen |



**Bijlage 1:****Voorbeeld Werkindeling microtiterplaat**

Plaat I

|   | 1     | 2              | 3              | 4              | 5              | 6               | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|---|---|---|----|----|----|
| A | blan, | mons.<br>1.... | mons.<br>2.... | mons.<br>etc.. | intr.<br>contr | extr.<br>contr. |   |   |   |    |    |    |
| B |       |                |                |                |                | tromb           |   |   |   |    |    |    |
| C | Ca    | Ca             | Ca             | Ca             | Ca             | Ca              |   |   |   |    |    |    |
| D |       |                |                |                |                |                 |   |   |   |    |    |    |
| E |       |                |                |                |                |                 |   |   |   |    |    |    |
| F |       |                |                |                |                |                 |   |   |   |    |    |    |
| G |       |                |                |                |                |                 |   |   |   |    |    |    |
| H |       |                |                |                |                |                 |   |   |   |    |    |    |

blan.

= Blanco

mons.

= monster

intr. Contr.

= intrinsieke controle

extr. Contr.

= extrinsieke controle

tromb.

= tromborel

Ca

= CaCl (0.1 M)

**Bijlage 2: Antistoffen in gebruik met de daarbij gebruikte verdunningen**

| Antistof       | Firma   | Bestelnr. | Eiwitconc. | Gebruikte verdunning | lotnummer       |
|----------------|---------|-----------|------------|----------------------|-----------------|
| OT2 (anti-XII) | CLB     | gift      | 1.5 mg/mL  | onverdund (10 µL)    | 31-10-02        |
| Anti-XI        | CLB     | gift      | 0.92 mg/mL | 5x                   | 09-03-99 Yvonne |
| Anti-IX        | Dako    | A0300     | 1.2 mg/mL  | 10x                  | 093(381)        |
| Anti VII       | CLB     | gift      | 1.46 mg/mL | 5x                   | 290101 FR       |
| Anti VIII      | CLB     | gift      | 2.35 mg/mL | 10x                  |                 |
| aTF            | Am.Diag | 4502      | 1.0 mg/mL  | onverdund            |                 |

### Bijlage III: Ps/Pc vesicles

#### LABZISCODE

N.v.t.

#### TITEL/ DOEL

Dit voorschrift beschrijft het maken van artificiële fosfolipiden vesicles. De vesicles worden gebruikt als stollingsbevorderend oppervlak in de trombinegeneratie test of fibrinegeneratie test

#### PRINCIPE

Principe: Maken van fosfatidylserine (PS) en fosfatidylcholine (PC) vesicles. Zowel de PS als PC zijn opgelost in chloroform. Na het mengen van PS en PC drogen met stikstof om de  $\text{CHCl}_3$  te verwijderen. De PS/PC vervolgens oplossen in een buffer en sonificeren. Door sonificeren (ultrasone geluidsgolven) ontstaan kleine vesicles van gelijke grootte, waardoor een optimaal oppervlak voor de stolling ontstaat.

Methode: N.v.t.

Lineariteit : N.v.t.

Detectiegrenzen: N.v.t.

Referentiewaarden: N.v.t.

Interpretatie: N.v.t.

#### TOEPASSINGSGEBIED/ APPLICATIEBEHEER

Volume: N.v.t.

Aard materiaal: PS en PC opgelost in  $\text{CHCl}_3$

Voorbehandeling : N.v.t.

Verdelen: N.v.t.

Bewaren: Bij 2 - 8 °C.

#### DEFINITIES EN TERMEN

$\text{CHCl}_3$  : Chloroform

|                |   |                                                            |
|----------------|---|------------------------------------------------------------|
| NaCl           | : | Natriumchloride                                            |
| N <sub>2</sub> | : | Stikstof                                                   |
| PS             | : | fosfatidylserine (1,2 -dioleoy-sn-glycerol-3-fosfoserine ) |
| PC             | : | fosfatidycholine (1,2 -dioleoy-sn-glycerol-3-fosfocholine) |

## VEILIGHEID

Werk conform de algemeen geldende veiligheidsvoorschriften beschreven in boek "Veiligheid op het laboratorium", welke is uitgegeven door de divisie "laboratorium specialismen".

Voor het afvoeren en verwijderen van chemisch afval en specifiek ziekenhuis afval zie de intranetsite van het AMC (door nevenstaande koppeling aan te klikken via "Ctrl + klikken linkermuisknop") (<http://www-intern/users/milieu/Frame/start.htm>).

Afvalverwerking:

Voor verwerking chemisch afval, zie de AMC intranetsite.

Ruimte eisen:

Werk in een zuurkast

Eisen Personeel:

CHCl<sub>3</sub> is schadelijk bij inademing.

CHCl<sub>3</sub> beschadigt alle materialen die gemaakt zijn van plastic, dus werk uitsluitend met glaswerk.

## REAGENTIA, STANDAARDEN EN CONTROLES

Benodigdheden:

| Artikel                    | MW     | AMC<br>inkoop<br>nr. | Firma | Art nr.   | Ruimte<br>nr. | Plaats       | Nr. |
|----------------------------|--------|----------------------|-------|-----------|---------------|--------------|-----|
| PS                         | 810.03 | 1021664              | Avpo  | AI 840035 | F1-205        | DV -<br>20°C |     |
| PC                         | 786.11 | 1021666              | Avpo  | AI 850375 | F1-205        | DV -<br>20°C |     |
| CHCl <sub>3</sub>          | 119.38 | 1000460              | Merc  | 102445    | F1-205        | PK           |     |
| NaCl 0.9 %                 |        | 97900931             | Apot  | divers    | F1-205        |              |     |
| Glazen buis RB<br>75x12 mm |        | 0100403              | AMC   |           | F1-205        |              |     |

Oplossingen:

NaCl 0,9 %:

Klaar voor gebruik

PC:

10 mg/mL in 2,5 mL oplossing in  $\text{CHCl}_3$

PS:

10 mg/mL in 2,5 mL oplossing in  $\text{CHCl}_3$

## APPARATUUR EN HULPMIDDELEN

| Omschrijving    | Firma | Inventaris nr. | Ruimte nr. |
|-----------------|-------|----------------|------------|
| Droogdampblok   | Tech  | 01-020-1792    | F1-205     |
| Digital Sonifer | Bras  | 99-020-0852    | G1-126     |

## WERKWIJZE

Voer het maken van de PS/PC vesicles uit in de zuurkast.

Werk snel,  $\text{CHCl}_3$  verdampt.

Maken van PS/PC vesicles (20:80)

Breek de ampullen voorzichtig open met een tissue of een doekje.

Breng de PC (2.5 mL) over in een glazen buis.

Breng vervolgens de PS (2.5 mL) in een andere glazen buis, pipetter uit deze buis 0.625 mL en voeg toe aan de PC.

Vortex de oplossing.

Pipetteer 100  $\mu\text{L}$  van dit mengsel over in glazen buizen (van 5 mL).

Damp de inhoud droog onder  $\text{N}_2$  stroom, bij 40  $^\circ\text{C}$ , in een droogdampblok)

Sluit de buis af met een plastic dopje.

Houdbaarheid een jaar bij -20  $^\circ\text{C}$ .

Oplossen van PS/PC vesicles

Ontdooi één buis PS/PC.

Los op in 2.0 mL 0.9 % NaCl door de vloeistof boven aan de buis langzaam langs de rand laten lopen.

Dopje op de buis, vortex 2x 30 seconden. De suspensie is troepel. De concentratie is 640  $\mu\text{mol/L}$  (berekening zie bijlage)

Sonificeren van PS/PC vesicles

Plaats de staaf van de sonicator in de PC/PS oplossing.

Zorg dat de staaf zich in het midden van de buis bevindt, omdat deze anders kapot kan gaan.

Zet de buis in een bekertje met ijswater.

Sonificeer de oplossing gedurende 10 minuten met een amplitude van 27 %.

Na sonificeren is de oplossing helder.

Houdbaarheid minimaal 3 maanden 2 - 8  $^\circ\text{C}$ .

## KWALITEITSCONTROLE

N.v.t.

## VERWERKING RESULTATEN

N.v.t.

## JUISTHEID EN PRECISIE

N.v.t.

## OPMERKINGEN

De resterende PS kan bewaard worden bij -20 °C, mits in afgesloten glazen buis.  
Of damp de resterende PS droog onder stikstofstroom en bewaar bij -20 °C.

## BIJBEHORENDE DOCUMENTEN

Instructiehandleiding van Digitale Sonifier

|             |   |                            |
|-------------|---|----------------------------|
| G1-Lab AMC. | : | ApparatenSOP Sonicator     |
| LEKC-AP     | : | ApparatenSOP Droogdampblok |

## BIJBEHORENDE FORMULIEREN

N.v.t.

## LITERATUUR

P.S. Chen, T.Y. Toribara and H. Warner et l. Anal. Chem. 1956, 28, pag.1756 - 58  
B.N. James and D.T. Dubin: J. Biol. Chem. 1960, 235, pag 769

## BIJLAGEN

Bijlage 1: Berekening concentratie PS/PC vesicles.

Bijlage 1:

Berekening concentratie PS/PC vesicles

| MW van                | gebruikte gewicht | volume in mL |
|-----------------------|-------------------|--------------|
| PC 786.11             | 25 mg             | 2.5 ml       |
| PS 810.03             | 6.25 mg           | 0.625 ml     |
| Totaal volume in buis |                   | 3.125 ml     |

definitie molgewicht:

aantal mg / mmol = aantal g / mol

Berekening mmol gebruikt in de opl.

|    |   |                  |          |      |
|----|---|------------------|----------|------|
| PC | : | 25 mg / 786.11   | = 0.032  | mmol |
| PS | : | 6.25 mg / 810.03 | = 0.0077 | mmol |

Het mengsel (3.125 mL) is verdeeld in porties van 100 µl uitgevuld in glazenbuizen. Na droogdampen is het residu opgenomen in 2.0 ml 0.9 % NaCl.

Een buis bevat nu  $(100 / 3125) \times 0.032$  mmol PC en  $(100 / 3125) \times 0.0077$  mmol PS in 2.0 ml NaCl 0,9%. De getallen worden met 500 vermenigvuldigd om het aantal mmol/L weer te geven. De concentratie PC is 0.512 mmol/L en PS is 0.123 mmol/L

Bijlage IV: Pipetteerschema voor labelling micropartikels in de verschillende buffers.

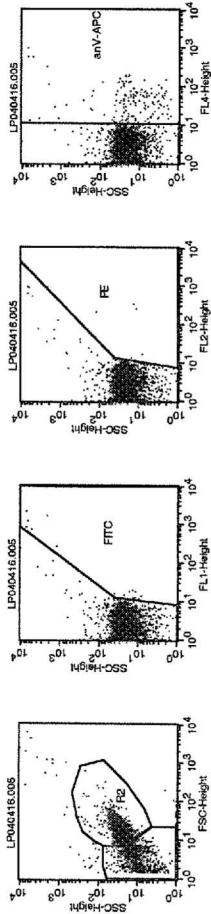
|                                                 |                                |    |    | k inc |   |   |   | Glyco A-<br>PE | CD14-<br>FITC | CD66e-PE | Annexine<br>V- APC | Afstoppen         |
|-------------------------------------------------|--------------------------------|----|----|-------|---|---|---|----------------|---------------|----------|--------------------|-------------------|
| <b>A. MP, niet afgedraaid</b>                   |                                |    |    |       |   |   |   |                |               |          |                    |                   |
| 1                                               | IgG1PE/IgG1<br>FITC/Ann        |    | 35 |       | 5 | 5 |   |                |               |          | 5                  | Citraat PBS       |
| 2                                               | CD61/Ann                       |    | 35 |       |   |   | 5 |                |               |          | 5                  | Citraat PBS       |
| 3                                               | Glyco A/Ann                    |    | 35 |       |   |   |   | 5              |               |          | 5                  | Citraat PBS       |
| 4                                               | CD14-<br>FITC/CD66e-<br>PE/Ann |    | 30 |       |   |   |   |                | 5             | 5        | 5                  | Citraat PBS       |
| 5                                               | IgG1PE/IgG1<br>FITC/Ann        | 30 |    | 5     | 5 | 5 |   |                |               |          | 5                  | PFblock<br>afstop |
| 6                                               | CD61/Ann                       | 30 |    | 5     |   |   | 5 |                |               |          | 5                  | PFblock           |
| 7                                               | Glyco A/Ann                    | 30 |    | 5     |   |   |   | 5              |               |          | 5                  | PFblock           |
| 8                                               | CD14-<br>FITC/CD66e-<br>PE/Ann | 25 |    | 5     |   |   |   |                | 5             | 5        | 5                  |                   |
| <b>B. MP, wel afgedraaid en geresuspendeerd</b> |                                |    |    |       |   |   |   |                |               |          |                    |                   |
| 9                                               | IgG1PE/IgG1<br>FITC/Ann        |    | 35 |       | 5 | 5 |   |                |               |          | 5                  | Citraat PBS       |
| 10                                              | CD61/Ann                       |    | 35 |       |   |   | 5 |                |               |          | 5                  | Citraat PBS       |
| 11                                              | Glyco A/Ann                    |    | 35 |       |   |   |   | 5              |               |          | 5                  | Citraat PBS       |
| 12                                              | CD14-<br>FITC/CD66e-<br>PE/Ann |    | 30 |       |   |   |   |                | 5             | 5        | 5                  | Citraat PBS       |
| 13                                              | IgG1PE/IgG1<br>FITC/Ann        | 30 |    | 5     | 5 | 5 |   |                |               |          | 5                  | PFblock<br>afstop |
| 14                                              | CD61/Ann                       | 30 |    | 5     |   |   | 5 |                |               |          | 5                  | PFblock           |
| 15                                              | Glyco A/Ann                    | 30 |    | 5     |   |   |   | 5              |               |          | 5                  | PFblock           |
| 16                                              | CD14-<br>FITC/CD66e-<br>PE/Ann | 25 |    | 5     |   |   |   |                | 5             | 5        | 5                  |                   |

**Bijlage IV: Pipetteerschema voor labelling micropartikels in de verschillende buffers.**

| <b>C. MP, wel afgedraaid, gewassen en geresuspendeerd</b> |                                |    |    |   |   |   |   |   |   |  |                            |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------|----|----|---|---|---|---|---|---|--|----------------------------|
| 17                                                        | IgG1PE/IgG1<br>FITC/Ann        |    | 35 |   |   |   | 5 | 5 |   |  | Citraat PBS                |
| 18                                                        | CD61/Ann                       |    | 35 |   |   | 5 |   |   |   |  | Citraat PBS                |
| 19                                                        | Glyco A/Ann                    |    | 35 |   |   |   | 5 |   |   |  | Citraat PBS                |
| 20                                                        | CD14-<br>FITC/CD66e-<br>PE/Ann |    | 30 |   |   |   |   | 5 | 5 |  | Citraat PBS                |
| 21                                                        | IgG1PE/IgG1<br>FITC/Ann        | 35 |    |   | 5 | 5 |   |   |   |  | CaCL <sub>2</sub> /PB<br>S |
| 22                                                        | CD61/Ann                       | 35 |    |   |   | 5 |   |   |   |  | CaCL <sub>2</sub> /PB      |
| 23                                                        | Glyco A/Ann                    | 35 |    |   |   |   | 5 |   |   |  | CaCL <sub>2</sub> /PB      |
| 24                                                        | CD14-<br>FITC/CD66e-<br>PE/Ann | 30 |    |   |   |   |   | 5 | 5 |  | CaCL <sub>2</sub> /PB<br>S |
| 25                                                        | IgG1PE/IgG1<br>FITC/Ann        | 30 |    | 5 | 5 |   |   |   |   |  | PFblock<br>afstop          |
| 26                                                        | CD61/Ann                       | 30 |    | 5 |   | 5 |   |   |   |  | PFblock                    |
| 27                                                        | Glyco A/Ann                    | 30 |    | 5 |   |   | 5 |   |   |  | PFblock                    |
| 28                                                        | CD14-<br>FITC/CD66e-<br>PE/Ann | 25 |    | 5 |   |   |   | 5 | 5 |  | PFblock<br>afstop          |



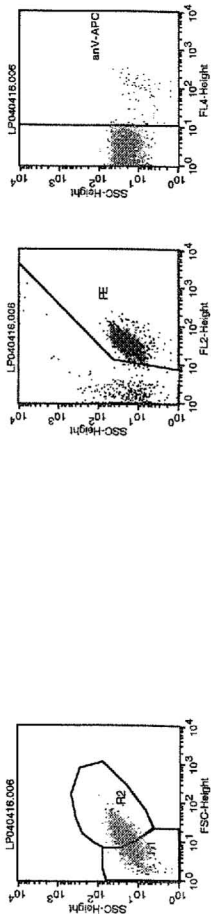
**Bijlage V:** Voorbeeld resultaten van de flowcytometrische analyse van een vrijwilliger.  
Zie m.n. R1 en R2.



IgG1-FITC  
IgG1-PE  
anV-APC

File: LP040416.005  
Gate: No Gate  
Total Events: 3705  
X Parameter: SSC-High (Log)  
Y Parameter: FL2-High (Log)

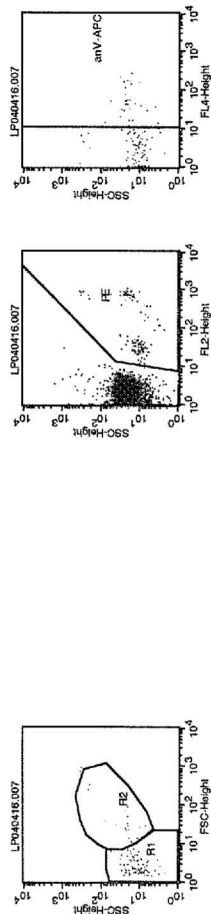
| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean  | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|---------|------------|-----|-----|
| R1      | 1400   | 37.79   | 37.79   | 3.10   | 2.05       | 11.99   | 9.05       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 2282   | 61.59   | 61.59   | 3.24   | 2.43       | 28.62   | 25.98      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 17     | 0.46    | 0.46    | 264.36 | 25.96      | 1960.27 | 86.96      | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 16     | 0.43    | 0.43    | 122.49 | 25.93      | 140.06  | 7.76       | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 159    | 4.29    | 4.29    | 50.47  | 3.22       | 260.37  | 16.15      | 7.2 | 7.2 |



CD61-FITC  
CD61-PE  
anV-APC

File: LP040416.006  
Gate: No Gate  
Total Events: 2885  
X Parameter: FL2-High (Log)  
Y Parameter: SSC-High (Log)

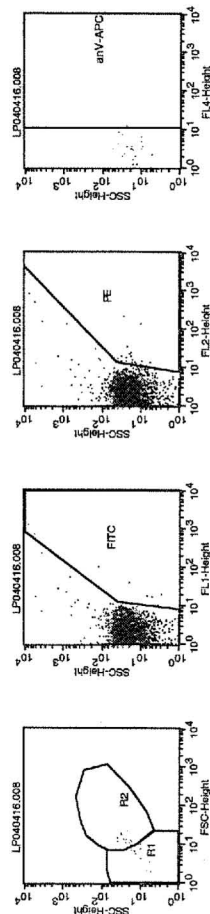
| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean  | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|---------|------------|-----|-----|
| R1      | 1137   | 39.69   | 39.69   | 17.70  | 8.12       | 11.46   | 8.66       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 1702   | 59.41   | 59.41   | 46.28  | 39.70      | 27.48   | 24.97      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 7      | 0.24    | 0.24    | 932.11 | 166.12     | 5538.15 | 2241.02    | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 2291   | 79.97   | 79.97   | 42.64  | 38.47      | 22.09   | 19.68      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 129    | 4.50    | 4.50    | 101.02 | 19.88      | 523.63  | 16.81      | 7.2 | 7.2 |



GPA-FITC  
GPA-PE  
anV-APC

File: LP040416.007  
Gate: No Gate  
Total Events: 3795  
X Parameter: FL2-High (Log)  
Y Parameter: SSC-High (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 1470   | 39.36   | 39.36   | 16.55  | 2.05       | 12.21  | 9.34       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 2254   | 60.35   | 60.35   | 8.79   | 1.78       | 29.41  | 26.78      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 1      | 0.03    | 0.03    | 10.65  | 10.65      | 77.04  | 77.04      | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 126    | 3.37    | 3.37    | 313.56 | 114.28     | 27.21  | 14.18      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 132    | 3.53    | 3.53    | 191.64 | 5.92       | 23.03  | 10.04      | 7.2 | 7.2 |



CD14-FITC  
CD14-PE  
anV-APC

File: LP040416.008  
Gate: No Gate  
Total Events: 3795  
X Parameter: FL2-High (Log)  
Y Parameter: SSC-High (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean  | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|---------|------------|-----|-----|
| R1      | 1621   | 42.71   | 42.71   | 2.22   | 1.72       | 12.32   | 9.28       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 2156   | 56.81   | 56.81   | 2.46   | 1.91       | 30.84   | 26.38      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 9      | 0.24    | 0.24    | 480.70 | 18.77      | 2871.92 | 87.64      | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 25     | 0.66    | 0.66    | 29.07  | 18.55      | 18.84   | 14.76      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 175    | 4.61    | 4.61    | 27.01  | 2.08       | 217.64  | 10.91      | 7.2 | 7.2 |



anV-APC

File: LP040416.009  
Gate: OS  
Total Events: 3795  
X Parameter: SSC-High (Log)  
Y Parameter: FL4-High (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean  | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|---------|------------|-----|-----|
| R1      | 5      | 0.13    | 0.13    | 3.89   | 3.69       | 7.25    | 5.69       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 1      | 0.03    | 0.03    | 5.09   | 5.09       | 118.64  | 118.64     | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 9      | 100.00  | 0.34    | 147.46 | 18.73      | 2671.92 | 87.64      | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 0      | 0.00    | 0.00    | 0.00   | 0.00       | 0.00    | 0.00       | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 3      | 33.33   | 0.06    | 434.20 | 433.23     | 7964.12 | 7773.65    | 7.2 | 7.2 |

File: LP040416.009  
Gate: PE  
Total Events: 2293  
X Parameter: FL4-High (Log)  
Y Parameter: SSC-High (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 667    | 29.11   | 23.28   | 7.77   | 2.79       | 12.73  | 11.61      | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 1634   | 71.32   | 57.03   | 4.93   | 2.43       | 28.86  | 24.35      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 0      | 0.00    | 0.00    | 0.00   | 0.00       | 0.00   | 0.00       | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 2291   | 100.00  | 79.57   | 5.77   | 2.63       | 22.09  | 19.86      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 75     | 3.27    | 2.62    | 92.14  | 86.86      | 12.62  | 9.28       | 7.2 | 7.2 |

File: LP040416.007  
Gate: PE  
Total Events: 3795  
X Parameter: FL4-High (Log)  
Y Parameter: SSC-High (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 103    | 10.76   | 2.78    | 22.82  | 5.23       | 13.07  | 11.26      | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 21     | 16.67   | 29.06   | 10.16  | 67.22      | 32.59  | 32.59      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 0      | 0.00    | 0.00    | 0.00   | 0.00       | 0.00   | 0.00       | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 128    | 100.00  | 3.37    | 23.55  | 5.78       | 27.21  | 14.18      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 31     | 24.60   | 0.83    | 84.35  | 53.48      | 21.59  | 18.06      | 7.2 | 7.2 |

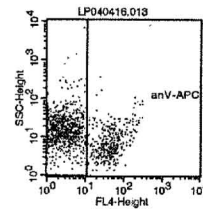
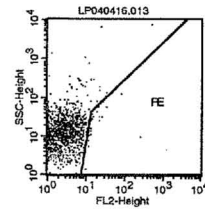
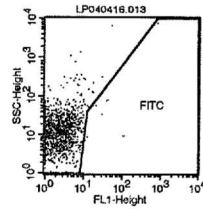
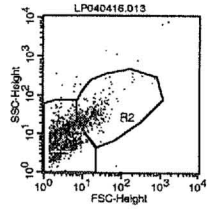
File: LP040416.008  
Gate: PE  
Total Events: 3795  
X Parameter: FL4-High (Log)  
Y Parameter: SSC-High (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 12     | 48.00   | 0.32    | 3.21   | 2.49       | 9.78   | 6.16       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 13     | 52.00   | 0.34    | 4.13   | 3.34       | 27.20  | 25.54      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 0      | 0.00    | 0.00    | 0.00   | 0.00       | 0.00   | 0.00       | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 25     | 100.00  | 0.66    | 3.89   | 2.30       | 18.64  | 14.76      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 1      | 4.00    | 0.03    | 11.86  | 11.86      | 22.47  | 22.47      | 7.2 | 7.2 |

File: LP040416.009  
Gate: OS  
Total Events: 3795  
X Parameter: FL4-High (Log)  
Y Parameter: SSC-High (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean  | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|---------|------------|-----|-----|
| R1      | 5      | 55.56   | 0.13    | 3.89   | 3.69       | 7.25    | 5.69       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 1      | 11.11   | 0.03    | 5.09   | 5.09       | 118.64  | 118.64     | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 9      | 100.00  | 0.34    | 147.46 | 18.73      | 2671.92 | 87.64      | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 0      | 0.00    | 0.00    | 0.00   | 0.00       | 0.00    | 0.00       | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 3      | 33.33   | 0.06    | 434.20 | 433.23     | 7964.12 | 7773.65    | 7.2 | 7.2 |

IgG1-FITC  
IgG1-PE  
anV-APC

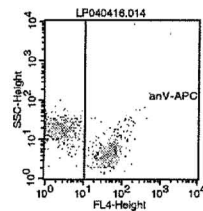
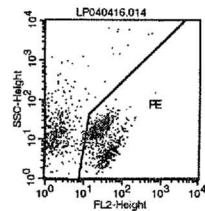
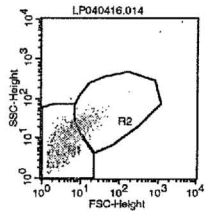


File: LP040416.013  
Gate: No Gate  
Total Events: 1455  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

Acquisition Date: 16-Apr-04  
Gated Events: 1455  
X Parameter: FL2-Height (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-------|
| R1      | 1119   | 76.91   | 76.91   | 3.09   | 2.12       | 10.00  | 6.75       | 1, 2  |
| R2      | 319    | 21.92   | 21.92   | 4.49   | 2.89       | 39.72  | 30.22      | 1, 2  |
| FITC    | 11     | 0.78    | 0.78    | 81.02  | 11.78      | 691.83 | 24.54      | 3, 2  |
| PE      | 30     | 2.08    | 2.06    | 25.97  | 16.83      | 23.14  | 11.68      | 4, 2  |
| anV-APC | 403    | 27.70   | 27.70   | 4.30   | 2.18       | 29.34  | 6.77       | 7, 2  |

CD61-PE  
anV-APC



File: LP040416.014  
Gate: No Gate  
Total Events: 1500  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

Acquisition Date: 16-Apr-04  
Gated Events: 1500  
X Parameter: FL2-Height (Log)

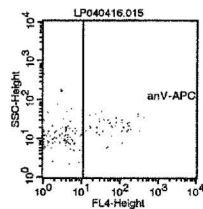
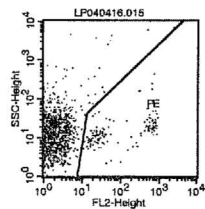
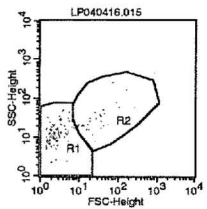
| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean  | X Geo Mean | Y Mean  | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|---------|------------|---------|------------|-------|
| R1      | 1132   | 75.47   | 75.47   | 17.68   | 6.36       | 9.69    | 6.69       | 1, 2  |
| R2      | 323    | 21.53   | 21.53   | 35.88   | 15.24      | 44.59   | 32.45      | 1, 2  |
| FITC    | 8      | 0.53    | 0.53    | 1417.79 | 616.96     | 6584.49 | 3897.81    | 3, 2  |
| PE      | 731    | 48.73   | 48.73   | 48.50   | 34.77      | 32.71   | 10.13      | 4, 2  |
| anV-APC | 419    | 27.93   | 27.93   | 72.76   | 29.10      | 239.53  | 8.36       | 7, 2  |

File: LP040416.014  
Gate: -PE  
Total Events: 1500  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

Acquisition Date: 16-Apr-04  
Gated Events: 731  
X Parameter: FL4-Height (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean  | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|---------|------------|-------|
| R1      | 526    | 71.96   | 35.07   | 28.68  | 11.89      | 9.06    | 6.96       | 1, 2  |
| R2      | 205    | 28.04   | 13.67   | 31.61  | 5.04       | 26.95   | 24.75      | 1, 2  |
| FITC    | 2      | 0.27    | 0.13    | 952.72 | 590.86     | 6786.66 | 6523.09    | 3, 2  |
| PE      | 731    | 100.00  | 48.73   | 31.99  | 9.43       | 32.71   | 10.13      | 4, 2  |
| anV-APC | 332    | 45.42   | 22.13   | 69.89  | 49.59      | 48.70   | 5.57       | 7, 2  |

GPA-PE  
anV-APC



File: LP040416.015  
Gate: No Gate  
Total Events: 1530  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

Acquisition Date: 16-Apr-04  
Gated Events: 1530  
X Parameter: FL2-Height (Log)

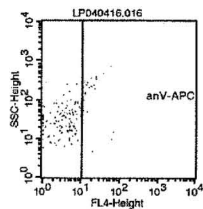
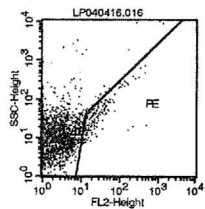
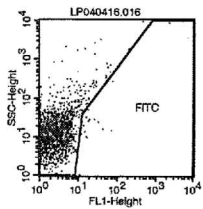
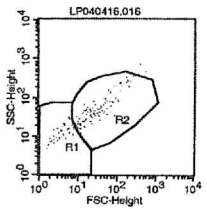
| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean  | X Geo Mean | Y Mean  | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|---------|------------|---------|------------|-------|
| R1      | 1172   | 76.60   | 76.60   | 20.85   | 2.24       | 9.50    | 6.54       | 1, 2  |
| R2      | 326    | 21.31   | 21.31   | 56.98   | 3.62       | 40.82   | 31.35      | 1, 2  |
| FITC    | 3      | 0.20    | 0.20    | 1259.44 | 474.00     | 5717.23 | 2407.19    | 3, 2  |
| PE      | 151    | 9.87    | 9.87    | 275.94  | 94.16      | 23.25   | 14.52      | 4, 2  |
| anV-APC | 415    | 27.12   | 27.12   | 65.27   | 3.13       | 89.24   | 7.36       | 7, 2  |

File: LP040416.015  
Gate: -PE  
Total Events: 1530  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

Acquisition Date: 16-Apr-04  
Gated Events: 151  
X Parameter: FL4-Height (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-------|
| R1      | 116    | 76.82   | 7.58    | 24.34  | 5.06       | 13.20  | 11.36      | 1, 2  |
| R2      | 33     | 21.85   | 2.16    | 45.84  | 14.06      | 41.50  | 28.86      | 1, 2  |
| FITC    | 0      | 0.00    | 0.00    | ***    | ***        | ***    | ***        | 3, 2  |
| PE      | 151    | 100.00  | 9.87    | 28.74  | 6.23       | 23.25  | 14.52      | 4, 2  |
| anV-APC | 43     | 28.48   | 2.81    | 92.84  | 59.17      | 27.16  | 21.27      | 7, 2  |

CD14-FITC  
CD66e-PE  
anV-APC



File: LP040416.016  
Gate: No Gate  
Total Events: 2205  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

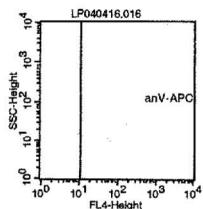
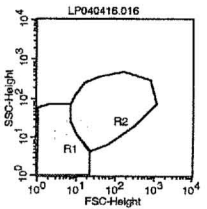
Acquisition Date: 16-Apr-04  
Gated Events: 2205  
X Parameter: FL2-Height (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-------|
| R1      | 1849   | 74.78   | 74.78   | 3.02   | 2.11       | 8.99   | 6.36       | 1, 2  |
| R2      | 490    | 22.22   | 22.22   | 15.80  | 5.15       | 46.91  | 33.51      | 1, 2  |
| FITC    | 20     | 0.91    | 0.91    | 140.45 | 7.91       | 951.06 | 34.57      | 3, 2  |
| PE      | 164    | 7.44    | 7.44    | 50.29  | 29.77      | 68.62  | 35.90      | 4, 2  |
| anV-APC | 486    | 22.04   | 22.04   | 17.01  | 2.44       | 85.35  | 8.21       | 7, 2  |

File: LP040416.016  
Gate: -PE  
Total Events: 2205  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

Acquisition Date: 16-Apr-04  
Gated Events: 184  
X Parameter: FL4-Height (Log)

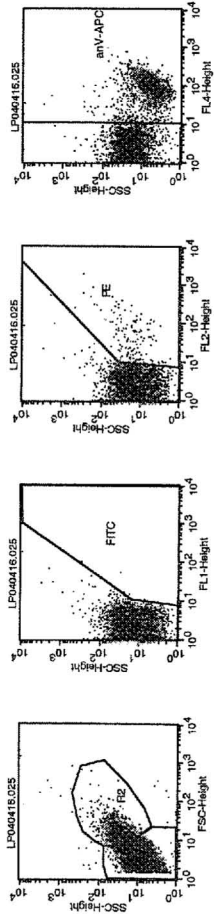
| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-------|
| R1      | 44     | 26.83   | 2.00    | 6.52   | 3.26       | 13.30  | 12.06      | 1, 2  |
| R2      | 117    | 71.34   | 5.31    | 6.77   | 4.97       | 76.15  | 52.37      | 1, 2  |
| FITC    | 5      | 3.05    | 0.23    | 14.07  | 3.27       | 75.29  | 36.27      | 3, 2  |
| PE      | 164    | 100.00  | 7.44    | 7.34   | 4.61       | 68.62  | 36.50      | 4, 2  |
| anV-APC | 28     | 17.07   | 1.27    | 22.21  | 18.93      | 208.12 | 132.20     | 7, 2  |



File: LP040416.016  
Gate: G5  
Total Events: 2205  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

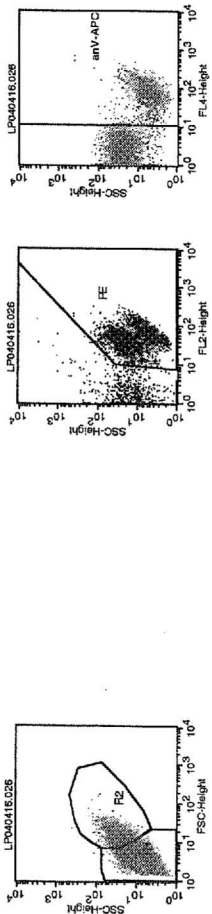
Acquisition Date: 16-Apr-04  
Gated Events: 20  
X Parameter: FL4-Height (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean  | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|---------|------------|-------|
| R1      | 9      | 45.00   | 0.41    | 29.35  | 13.67      | 14.61   | 10.98      | 1, 2  |
| R2      | 9      | 45.00   | 0.41    | 111.35 | 35.65      | 52.67   | 31.47      | 1, 2  |
| FITC    | 20     | 100.00  | 0.91    | 159.36 | 28.72      | 961.06  | 34.57      | 3, 2  |
| PE      | 5      | 25.00   | 0.23    | 14.07  | 3.27       | 75.29   | 36.27      | 3, 2  |
| anV-APC | 13     | 65.00   | 0.59    | 243.16 | 105.98     | 1432.64 | 46.16      | 7, 2  |



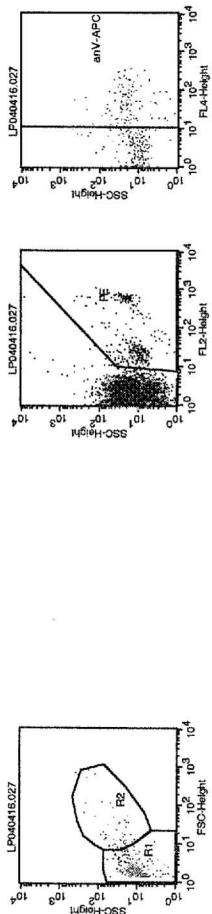
File: LP040416.025  
Gate: No Gate  
Total Events: 4455  
X Parameter: FL2-High (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 2915   | 65.43   | 65.43   | 4.22   | 2.22       | 10.46  | 7.65       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 1590   | 34.34   | 34.34   | 9.83   | 2.62       | 39.96  | 28.90      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 14     | 0.31    | 0.31    | 186.48 | 6.61       | 29.46  | 6.66       | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 172    | 3.86    | 3.86    | 64.16  | 39.60      | 20.15  | 15.94      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 1482   | 33.27   | 33.27   | 9.86   | 2.39       | 26.51  | 6.81       | 7.2 | 7.2 |



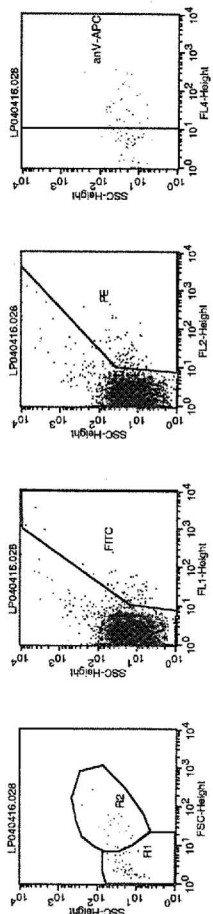
File: LP040416.026  
Gate: No Gate  
Total Events: 4920  
X Parameter: FL2-High (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 3108   | 63.17   | 63.17   | 39.79  | 19.49      | 10.73  | 7.84       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 1800   | 36.59   | 36.59   | 53.91  | 43.14      | 35.66  | 30.06      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 0      | 0.00    | 0.00    | ...    | ...        | ...    | ...        | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 4021   | 81.73   | 81.73   | 54.16  | 46.57      | 22.01  | 13.70      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 1500   | 30.62   | 30.62   | 67.79  | 46.04      | 22.10  | 6.74       | 7.2 | 7.2 |



File: LP040416.027  
Gate: No Gate  
Total Events: 4995  
X Parameter: FL2-High (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 3051   | 61.06   | 61.06   | 15.70  | 2.17       | 10.20  | 7.31       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 1601   | 31.10   | 31.10   | 17.76  | 2.05       | 38.98  | 28.37      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 0      | 0.00    | 0.00    | ...    | ...        | ...    | ...        | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 346    | 7.37    | 7.37    | 20.97  | 65.40      | 22.39  | 13.62      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 1991   | 39.25   | 39.25   | 34.83  | 2.50       | 36.90  | 6.88       | 7.2 | 7.2 |



File: LP040416.028  
Gate: No Gate  
Total Events: 5295  
X Parameter: FL2-High (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 3350   | 63.46   | 63.46   | 2.35   | 1.89       | 10.81  | 7.96       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 1503   | 28.94   | 28.94   | 3.35   | 1.93       | 35.77  | 30.23      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 64     | 1.21    | 1.21    | 80.02  | 10.43      | 244.29 | 18.36      | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 79     | 1.49    | 1.49    | 46.83  | 27.32      | 28.62  | 21.05      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 1838   | 34.71   | 34.71   | 5.32   | 1.84       | 46.95  | 7.05       | 7.2 | 7.2 |



File: LP040416.029  
Gate: No Gate  
Total Events: 6295  
X Parameter: FL2-High (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 42     | 0.67    | 0.67    | 39.77  | 14.01      | 11.84  | 9.37       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 19     | 0.30    | 0.30    | 36.50  | 20.13      | 244.29 | 18.36      | 3.2 | 3.2 |
| FITC    | 24     | 0.38    | 0.38    | 121.46 | 10.43      | 244.29 | 18.36      | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 26     | 0.41    | 0.41    | 54.85  | 10.43      | 244.29 | 18.36      | 3.2 | 3.2 |
| anV-APC | 37     | 0.59    | 0.59    | 72.36  | 40.72      | 26.99  | 22.51      | 4.2 | 4.2 |

File: LP040416.026  
Gate: PE  
Total Events: 4920  
X Parameter: FL4-High (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px   | Py   |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|------|------|
| R1      | 2344   | 47.64   | 47.64   | 14.81  | 10.31      | 7.95   | 7.95       | 1.2  | 1.2  |
| R2      | 1592   | 32.36   | 32.36   | 14.42  | 10.31      | 28.93  | 28.93      | 1.2  | 1.2  |
| FITC    | 0      | 0.00    | 0.00    | ...    | ...        | ...    | ...        | 3.2  | 3.2  |
| PE      | 4021   | 100.00  | 100.00  | 81.73  | 7.63       | 20.01  | 13.70      | 4.2  | 4.2  |
| anV-APC | 1421   | 35.34   | 35.34   | 28.88  | 91.49      | 71.44  | 8.14       | 5.67 | 5.67 |

File: LP040416.027  
Gate: PE  
Total Events: 4995  
X Parameter: FL4-High (Log)

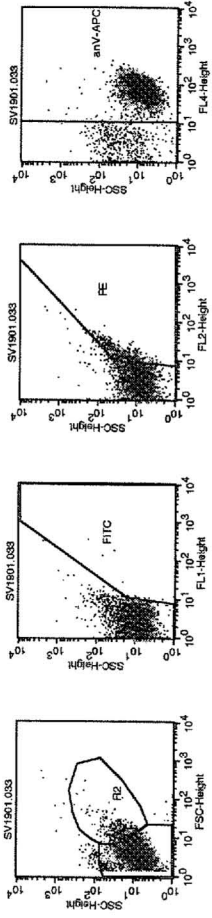
| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 284    | 5.68    | 5.68    | 27.44  | 8.27       | 13.01  | 10.76      | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 58     | 1.16    | 1.16    | 49.95  | 21.27      | 50.12  | 35.88      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 0      | 0.00    | 0.00    | ...    | ...        | ...    | ...        | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 346    | 6.92    | 6.92    | 31.23  | 7.77       | 22.39  | 13.62      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 123    | 2.46    | 2.46    | 81.40  | 52.15      | 30.40  | 18.95      | 7.2 | 7.2 |

File: LP040416.028  
Gate: PE  
Total Events: 5295  
X Parameter: FL4-High (Log)

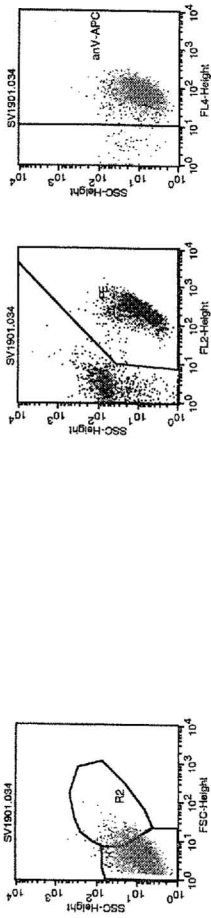
| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 53     | 0.94    | 0.94    | 20.91  | 7.54       | 19.38  | 16.25      | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 25     | 0.47    | 0.47    | 81.25  | 22.84      | 47.51  | 35.68      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 25     | 0.47    | 0.47    | 54.83  | 18.40      | 37.59  | 23.98      | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 79     | 1.49    | 1.49    | 40.77  | 10.86      | 28.62  | 21.05      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 32     | 0.60    | 0.60    | 53.77  | 53.32      | 37.48  | 25.99      | 7.2 | 7.2 |

File: LP040416.029  
Gate: PE  
Total Events: 6295  
X Parameter: FL4-High (Log)

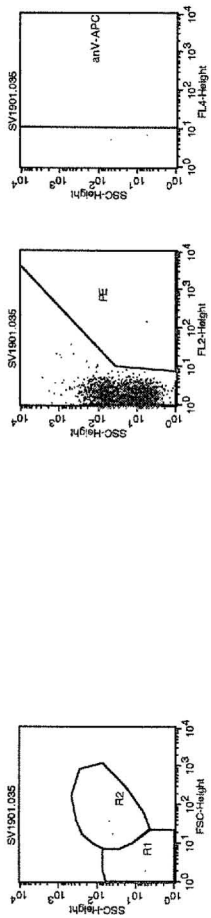
| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 42     | 0.67    | 0.67    | 39.77  | 14.01      | 11.84  | 9.37       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 19     | 0.30    | 0.30    | 36.50  | 20.13      | 244.29 | 18.36      | 3.2 | 3.2 |
| FITC    | 24     | 0.38    | 0.38    | 121.46 | 10.43      | 244.29 | 18.36      | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 26     | 0.41    | 0.41    | 54.85  | 10.43      | 244.29 | 18.36      | 3.2 | 3.2 |
| anV-APC | 37     | 0.59    | 0.59    | 72.36  | 40.72      | 26.99  | 22.51      | 4.2 | 4.2 |



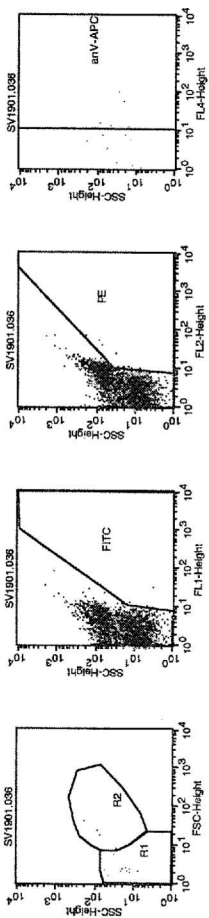
IgG1-FITC  
IgG1-PE  
anV-APC



CD61-PE  
anV-APC



GrpA-PE  
anV-APC



CD14-FITC  
CD86b-PE  
anV-APC



File: SV1901.033  
Gate: No Gate  
Total Events: 3300  
X Parameter: FL2-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gated Events: 3300  
X Parameter: FL2-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 2913   | 88.53   | 85.53   | 4.60   | 2.97       | 10.46  | 7.65       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 388    | 11.74   | 11.74   | 6.48   | 4.23       | 29.45  | 22.37      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 24     | 0.71    | 0.71    | 6.72   | 2.35       | 18.50  | 9.31       | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 474    | 13.98   | 13.98   | 19.01  | 16.54      | 31.65  | 21.39      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 2717   | 80.15   | 80.15   | 4.74   | 2.92       | 13.83  | 8.45       | 7.2 | 7.2 |

File: SV1901.034  
Gate: No Gate  
Total Events: 3915  
X Parameter: FL2-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gated Events: 3915  
X Parameter: FL2-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 3058   | 78.11   | 78.11   | 179.53 | 57.55      | 17.00  | 10.05      | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 432    | 11.03   | 11.03   | 333.75 | 130.31     | 40.77  | 27.20      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 5      | 0.13    | 0.13    | 173.92 | 45.40      | 27.54  | 16.85      | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 2517   | 64.29   | 64.29   | 274.69 | 242.85     | 12.94  | 9.12       | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 2550   | 65.13   | 65.13   | 269.98 | 210.28     | 19.33  | 9.46       | 7.2 | 7.2 |

File: SV1901.035  
Gate: No Gate  
Total Events: 4110  
X Parameter: FL2-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gated Events: 4110  
X Parameter: FL2-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 3146   | 76.55   | 76.55   | 1.55   | 1.39       | 18.19  | 10.59      | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 388    | 9.44    | 9.44    | 2.04   | 1.89       | 37.71  | 27.25      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 4      | 0.10    | 0.10    | 6.14   | 5.55       | 11.40  | 10.59      | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 2      | 0.05    | 0.05    | 82.54  | 45.73      | 26.49  | 16.25      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 2489   | 60.54   | 60.54   | 1.65   | 1.41       | 23.36  | 9.50       | 7.2 | 7.2 |

File: SV1901.036  
Gate: No Gate  
Total Events: 4140  
X Parameter: FL2-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gated Events: 4140  
X Parameter: FL2-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 3190   | 77.05   | 77.05   | 2.59   | 2.22       | 18.08  | 10.51      | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 321    | 9.44    | 9.44    | 3.92   | 2.73       | 34.66  | 25.47      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 6      | 0.14    | 0.14    | 1.80   | 1.65       | 5.54   | 4.85       | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 14     | 0.34    | 0.34    | 21.64  | 16.57      | 42.84  | 28.04      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 2512   | 63.09   | 63.09   | 2.72   | 2.02       | 17.59  | 9.60       | 7.2 | 7.2 |

File: SV1901.034  
Gate: -PE  
Total Events: 3915  
X Parameter: FL4-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gated Events: 2517  
X Parameter: FL4-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 2176   | 86.53   | 55.63   | 73.04  | 62.97      | 9.90   | 7.83       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 333    | 13.23   | 8.51    | 112.19 | 78.99      | 27.83  | 22.28      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 3      | 0.12    | 0.08    | 64.89  | 84.41      | 33.89  | 16.20      | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 2517   | 100.00  | 64.29   | 78.20  | 84.84      | 12.94  | 9.12       | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 2451   | 97.38   | 62.61   | 80.20  | 70.41      | 12.62  | 8.96       | 7.2 | 7.2 |

File: SV1901.035  
Gate: -PE  
Total Events: 4110  
X Parameter: FL4-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gated Events: 2  
X Parameter: FL4-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 1      | 50.00   | 0.02    | 8.55   | 6.55       | 5.57   | 5.57       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 1      | 50.00   | 0.02    | 4.87   | 4.87       | 47.40  | 47.40      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 0      | 0.00    | 0.00    | ***    | ***        | ***    | ***        | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 2      | 100.00  | 0.05    | 5.71   | 5.65       | 26.49  | 16.25      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 0      | 0.00    | 0.00    | ***    | ***        | ***    | ***        | 7.2 | 7.2 |

File: SV1901.036  
Gate: -PE  
Total Events: 4140  
X Parameter: FL4-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gated Events: 14  
X Parameter: FL4-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

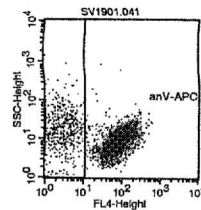
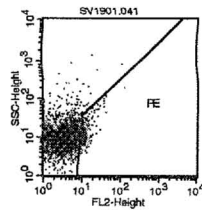
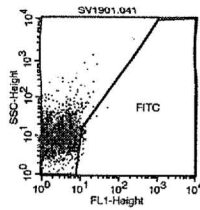
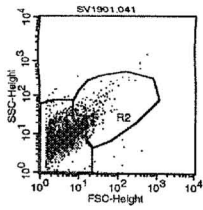
| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 10     | 71.43   | 0.24    | 17.00  | 6.42       | 22.76  | 16.94      | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 4      | 28.57   | 0.10    | 31.46  | 15.16      | 92.35  | 74.22      | 1.2 | 1.2 |
| FITC    | 0      | 0.00    | 0.00    | ***    | ***        | ***    | ***        | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 14     | 100.00  | 0.34    | 21.19  | 8.20       | 43.84  | 28.04      | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 6      | 42.86   | 0.14    | 44.02  | 30.60      | 33.79  | 26.62      | 7.2 | 7.2 |

File: SV1901.036  
Gate: G6  
Total Events: 4140  
X Parameter: FL4-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gated Events: 6  
X Parameter: FL4-H (Log)  
Y Parameter: SSC-H (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px  | Py  |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-----|-----|
| R1      | 6      | 100.00  | 0.14    | 41.84  | 12.88      | 5.54   | 4.85       | 1.2 | 1.2 |
| R2      | 0      | 0.00    | 0.00    | ***    | ***        | ***    | ***        | 3.2 | 3.2 |
| FITC    | 6      | 100.00  | 0.14    | 41.84  | 12.88      | 5.54   | 4.85       | 3.2 | 3.2 |
| PE      | 0      | 0.00    | 0.00    | ***    | ***        | ***    | ***        | 4.2 | 4.2 |
| anV-APC | 4      | 66.67   | 0.10    | 61.97  | 46.24      | 4.33   | 4.28       | 7.2 | 7.2 |

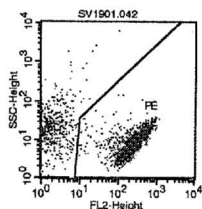
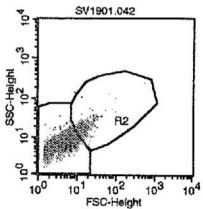
IgG1- FITC  
IgG1-PE  
anV-APC



File: SV1901.041 Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gate: No Gate Gated Events: 3120  
Total Events: 3120 X Parameter: FL2-Height (Log)  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-------|
| R1      | 2590   | 83.01   | 83.01   | 3.81   | 2.53       | 8.73   | 6.74       | 1,2   |
| R2      | 514    | 16.47   | 16.47   | 5.28   | 3.59       | 31.34  | 22.96      | 1,2   |
| FITC    | 33     | 1.06    | 1.06    | 4.03   | 2.71       | 11.13  | 8.82       | 3,2   |
| PE      | 226    | 7.24    | 7.24    | 14.42  | 13.16      | 19.94  | 14.06      | 4,2   |
| anV-APC | 2376   | 76.15   | 76.15   | 3.84   | 2.66       | 10.37  | 8.15       | 7,2   |

CD61-PE  
anV-APC



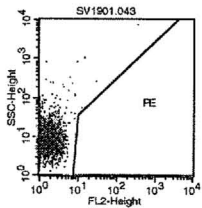
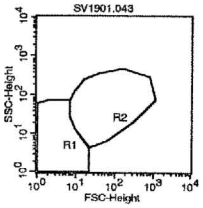
File: SV1901.042 Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gate: No Gate Gated Events: 3105  
Total Events: 3105 X Parameter: FL2-Height (Log)  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-------|
| R1      | 2569   | 82.74   | 82.74   | 183.34 | 69.03      | 8.62   | 6.63       | 1,2   |
| R2      | 503    | 16.20   | 16.20   | 396.25 | 138.71     | 28.55  | 21.24      | 1,2   |
| FITC    | 9      | 0.29    | 0.29    | 34.16  | 9.78       | 18.51  | 14.99      | 3,2   |
| PE      | 2366   | 76.20   | 76.20   | 280.98 | 238.33     | 9.16   | 7.67       | 4,2   |
| anV-APC | 2385   | 76.81   | 76.81   | 277.99 | 218.99     | 13.75  | 7.82       | 7,2   |

File: SV1901.042 Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gate: -PE Gated Events: 2366  
Total Events: 3105 X Parameter: FL4-Height (Log)  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-------|
| R1      | 1583   | 63.81   | 63.86   | 88.27  | 73.64      | 7.27   | 6.69       | 1,2   |
| R2      | 393    | 15.61   | 12.86   | 183.90 | 134.71     | 18.59  | 17.02      | 1,2   |
| FITC    | 3      | 0.13    | 0.10    | 32.02  | 6.94       | 23.46  | 16.95      | 3,2   |
| PE      | 2365   | 100.00  | 76.20   | 100.75 | 81.30      | 9.18   | 7.67       | 4,2   |
| anV-APC | 2331   | 98.52   | 75.07   | 102.20 | 85.17      | 9.13   | 7.84       | 7,2   |

GPA-PE  
anV-APC



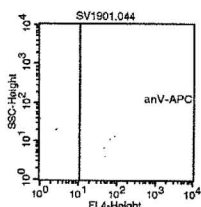
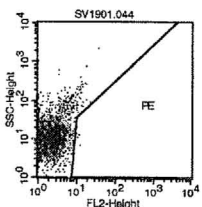
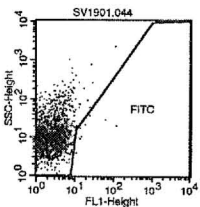
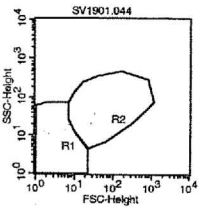
File: SV1901.043 Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gate: No Gate Gated Events: 2955  
Total Events: 2955 X Parameter: FL2-Height (Log)  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-------|
| R1      | 2628   | 88.55   | 85.55   | 1.54   | 1.39       | 7.81   | 6.24       | 1,2   |
| R2      | 421    | 14.25   | 14.25   | 1.95   | 1.62       | 28.33  | 21.10      | 1,2   |
| FITC    | 2      | 0.07    | 0.07    | 5.44   | 4.85       | 19.84  | 17.78      | 3,2   |
| PE      | 0      | 0.00    | 0.00    | ***    | ***        | ***    | ***        | 4,2   |
| anV-APC | 2351   | 79.56   | 79.56   | 1.72   | 1.41       | 12.10  | 7.26       | 7,2   |

File: SV1901.043 Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gate: -PE Gated Events: 0  
Total Events: 2955 X Parameter: FL4-Height (Log)  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-------|
| R1      | 0      | ***     | 0.00    | ***    | ***        | ***    | ***        | 1,2   |
| R2      | 0      | ***     | 0.00    | ***    | ***        | ***    | ***        | 1,2   |
| FITC    | 0      | ***     | 0.00    | ***    | ***        | ***    | ***        | 3,2   |
| PE      | 0      | ***     | 0.00    | ***    | ***        | ***    | ***        | 4,2   |
| anV-APC | 0      | ***     | 0.00    | ***    | ***        | ***    | ***        | 7,2   |

CD14- FITC  
CD66e-PE  
anV-APC

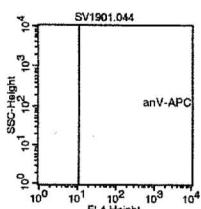
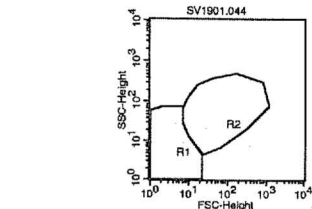


File: SV1901.044 Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gate: No Gate Gated Events: 2895  
Total Events: 2895 X Parameter: FL2-Height (Log)  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-------|
| R1      | 2332   | 80.55   | 80.55   | 2.15   | 1.77       | 9.67   | 7.21       | 1,2   |
| R2      | 492    | 16.99   | 16.99   | 2.77   | 2.15       | 29.30  | 22.37      | 1,2   |
| FITC    | 10     | 0.35    | 0.35    | 5.00   | 3.39       | 14.76  | 10.42      | 3,2   |
| PE      | 9      | 0.31    | 0.31    | 10.91  | 10.85      | 17.28  | 13.89      | 4,2   |
| anV-APC | 2208   | 76.27   | 76.27   | 2.19   | 1.80       | 11.01  | 8.41       | 7,2   |

File: SV1901.044 Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gate: -PE Gated Events: 9  
Total Events: 2895 X Parameter: FL4-Height (Log)  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-------|
| R1      | 6      | 66.67   | 0.21    | 43.97  | 28.42      | 10.77  | 9.59       | 1,2   |
| R2      | 3      | 33.33   | 0.10    | 1.60   | 1.41       | 30.31  | 26.16      | 1,2   |
| FITC    | 3      | 33.33   | 0.10    | 2.10   | 1.91       | 24.17  | 23.22      | 3,2   |
| PE      | 9      | 100.00  | 0.31    | 29.85  | 9.95       | 17.28  | 13.89      | 4,2   |
| anV-APC | 4      | 44.44   | 0.14    | 82.81  | 60.70      | 8.50   | 7.69       | 7,2   |



File: SV1901.044 Acquisition Date: 19-Apr-04  
Gate: G5 Gated Events: 10  
Total Events: 2895 X Parameter: FL4-Height (Log)  
Y Parameter: SSC-Height (Log)

| Region  | Events | % Gated | % Total | X Mean | X Geo Mean | Y Mean | Y Geo Mean | Px,Py |
|---------|--------|---------|---------|--------|------------|--------|------------|-------|
| R1      | 8      | 80.00   | 0.28    | 14.66  | 5.57       | 11.73  | 8.31       | 1,2   |
| R2      | 2      | 20.00   | 0.07    | 1.91   | 1.68       | 25.87  | 25.83      | 1,2   |
| FITC    | 10     | 100.00  | 0.35    | 12.11  | 4.38       | 14.76  | 10.42      | 3,2   |
| PE      | 3      | 30.00   | 0.10    | 2.10   | 1.91       | 24.17  | 23.22      | 4,2   |
| anV-APC | 3      | 30.00   | 0.10    | 35.35  | 34.08      | 9.87   | 6.35       | 7,2   |