

- mination pathway: an option for therapy for homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1991; 14: 375-378.
48. Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels JMF and Eskes TKAB. Neural-tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N Eng J Med* 1991; 324: 199-200.
 49. Blom HJ, Davidson AJ, Finkelstein JD, Luder AS, Bernardini I, Martin JJ, Tangerman A, Trijbels JMF, Mudd SH, Goodman SI, Gahl WA. Persistent hypermethioninemia with dominant inheritance. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 188-197.
 50. Franken DG, Vreugdenhil A, Boers GHJ, Verrips A, Blom HJ, Novakova IRO. Hyperhomocysteinemia and protein C-deficiency type 1 in one family. *Stroke* 1993; 24: 1599-1600.
 51. VanderMooren MJ, Wouters MCAJ, Blom HJ, Schellekens LA, Eskes TKAB, Rolland R. Hormone replacement therapy may reduce high serum homocysteine in postmenopausal women. *Eur J Clin Invest*, in press.
 52. Stet EH, DeAbreu RA, Bokkerink JPM, Blom HJ, Lambooy HJ, Vogels-Mentink TM, DeGraaf-Hess AC, VanRaay-Selten, Trijbels JMF. Reduction of S-adenosylmethionine synthesis by 6-mercaptopurine and methylmercaptopyrimidine ribonucleoside in Molt F4 malignant lymphoblasts. *Biochem J*, in press.
 53. Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Blom HJ, Nijhuis JG, Thomas CMG, Trijbels JMF, Borm GF, Eskes TKAB.

Neural-tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid. *Am J Obst Gyn*, in press.

54. VanAerts LAGJM, Blom HJ, DeAbreu RA, Trijbels JMF, Eskes TKAB, Copius Peereboom-Stegeman JHJ and Noordhoek J. Prevention of neural tube defects by and toxicity of L-homocysteine in cultured post-implantation rat embryos. *Teratology*, in press.

Summary

Hyperhomocysteinemia. Blom HJ, Boers GHJ, Eskes TKAB en Trijbels JMF. Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 20-26.

Cystathionine β -synthase deficiency and thermolability of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) were examined as a possible cause of mild hyperhomocysteinemia in patients with premature vascular disease. Only one out of 20 patients with mild hyperhomocysteinemia and vascular disease had cystathionine β -synthase activity in the range of obligate heterozygotes for cystathionine β -synthase deficiency. Five out of 21 patients with mild hyperhomocysteinemia and vascular disease had thermolabile MTHFR.

In conclusion, heterozygosity for cystathionine β -synthase deficiency is probably not a major cause for mild hyperhomocysteinemia. In about 25% of the hyperhomocysteinemic patients with premature vascular disease, abnormal homocysteine metabolism can be attributed to thermolabile MTHFR.

Key-words: homocysteine; methionine; cystathionine β -synthase; methylenetetrahydrofolate reductase.

Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 26-31

Detectie en klinische relevantie van geactiveerde bloedplaatjes

M.C.L. SCHAAP en A. STURK

Enkele jaren geleden is een techniek op de flowcytometer beschreven, waarbij de in-vivo activatiestatus van de bloedplaatjes kan worden gemeten. Deze maakt gebruik van een combinatie van twee monoclonale antistoffen per monster: één gericht tegen een plaatjes-specifiek antigeen (glycoproteïne Ib), de ander tegen een antigeen dat verhoogd of verlaagd op het oppervlak van het bloedplaatje tot expressie komt bij activatie van deze cel. De laatste jaren zijn veel klinische studies verricht met antistoffen om de toestand van de fibrinogeen receptor te meten, of tegen oorspronkelijk granulaire gelocaliseerde componenten die bij de secretore reactie op het oppervlak voorradig komen (P-selectine, GP53). Hierbij is aangetoond dat de bloedplaatjes in een verhoogde activatietoestand circuleren bij bijvoorbeeld cardiobypass, PTCA behandeling, hemodialyse, pre-eclampsie en cocaïne gebruik. De techniek is voldoende reproduceerbaar

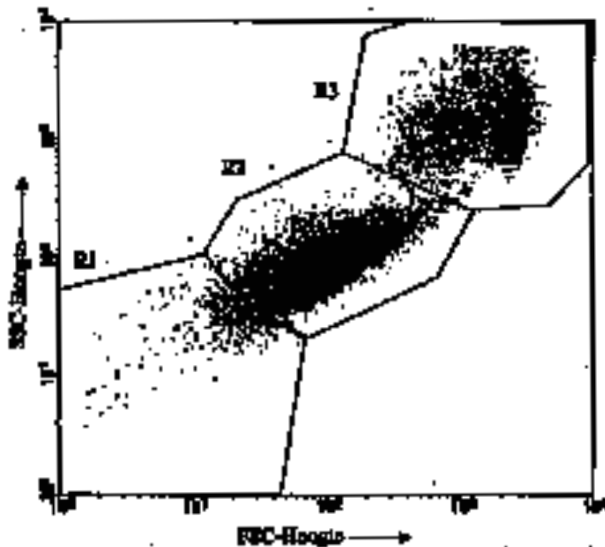
en gevoelig om ook in andere klinische situaties de mogelijke geactiveerde toestand van het circulerende bloedplaatje te onderzoeken. Dit zou vervolgens therapeutisch van nut kunnen zijn, hetgeen recent in een klinische studie met een Fab fragment van een antistof tegen het GPIIb/IIIa complex van de bloedplaatjes is aangetoond in patiënten die een PTCA ondergaan.

De fysiologische en pathologische rol van bloedplaatjes

Bloedplaatjes spelen een belangrijke rol bij de hemostase of bloedstelping. Activatie van het stollingssysteem resulteert in een fibrine netwerk dat met name van belang is voor de secundaire hemostase, de bestendiging van de bloedprop die ontstaat bij de beschadiging van een vaatwand. Vandaar dat defecten in het stollingssysteem van een patiënt met name leiden tot nabloedingen bij bijvoorbeeld kiesextracties. Daarentegen zijn de bloedplaatjes met name van belang voor de primaire hemostase, de vorming van een bloedplaatjesprop die in eerste instantie naast vasoconstrictie de lesie in de vaatwand dicht. De vorming van de plaatjesprop is het gevolg van de activatie van bloedplaatjes onder invloed van een veelheid aan sti-

Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis Leiden

Correspondentie: Prof. Dr. Sturk, afdeling Klinische Chemie (CKCL), Gebouw-1, E-2-P, Academisch Ziekenhuis Leiden, Rijnsburgerweg 10, 2333 AA Leiden.

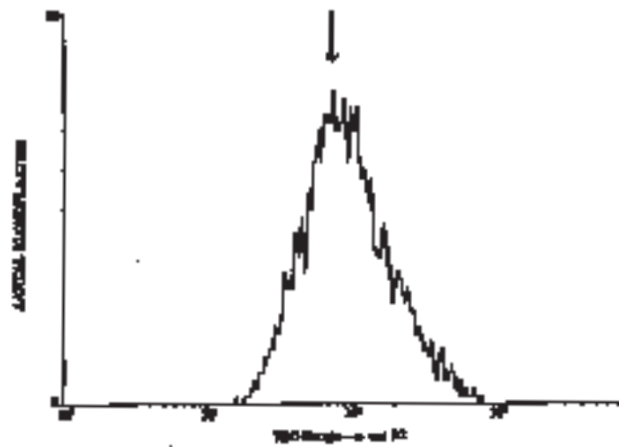


Figuur 1. Verdeling van de partikels met GPIb expressie bij een gezonde vrijwilliger. "Side scatter"(SSC) wordt uitgezet tegen "foreward scatter"(FSC). R1 bevat micropartikels die van bloedplaatjes afkomstig zijn via het afsnoeren van kleine stukken van het plasmamembraan, R2 de bloedplaatjes en R3 plaatjes-plaatjes en plaatjes-leucocyten complexen.

muli ter plaatse van de vaatwandleesie, waaronder collageen en laminine uit de vaatwand, trombine en een verstoorde stroming van het bloed.

De activatie van het bloedplaatje kan in een aantal stadia worden onderscheiden: adhesie aan de beschadigde vaatwand, reversibele adhesie van nieuwe bloedplaatjes aan de reeds verkleefde en daardoor geactiveerde bloedplaatjes op de lesie (primaire aggregatie), irreversibele adhesie van de bloedplaatjes aan elkaar (secundaire aggregatie) en een secretoire reactie. Bij de adhesie- en aggregatieprocessen spelen diverse eiwitten een rol, waaronder fibrinogeen en van Willebrand factor, maar ook fibronectine, vitronectine, collageen en laminine. Fibrinogeen heeft daarbij met name een rol als "kleefmiddel" tussen bloedplaatjes bij niet-stromingsomstandigheden zoals die bij de in-vitro aggregatietesten heersen. Onder fysiologische stromingscondities speelt met name van Willebrand factor een rol (1). De secretoire reactie betreft de uitstoot van granulaire bestanddelen naar het plasma. Het bloedplaatje heeft een aantal typen secretoire granula: α -granula, die een aantal plaatjes-specifieke eiwitten bevatten (β -tromboglobuline, plaatjesfactor 4), maar ook niet-plaatjes-specifieke eiwitten (o.a. fibrinogeen, factor V, plaatjes-groei factor); "dense bodies", die de laag-moleculaire stoffen bevatten die bij de secretoire reactie door het bloedplaatje worden uitgestoten (ADP, ATP, Ca^{2+} , serotonine); lysosomen.

De fysiologische rol van de bloedplaatjes blijkt duidelijk uit de hemorragische diathese die optreedt bij de bekende erfelijke defecten, zoals Glanzmann's Trombasthenie en Bernard Soulier syndroom, maar ook verworven defecten zoals nabloedingen na gebruik van aspirine bij een kiesextractie. De pathofysiologische rol van het bloedplaatje wordt echter ook



Figuur 2. De gemiddelde grootte van de bloedplaatjes bij een gezonde vrijwilliger. Het aantal partikels wordt uitgezet tegen de FSC van de bloedplaatjes (regio R2). De pijl geeft het gemiddelde kanaalnummer weer als relatieve maat voor de grootte.

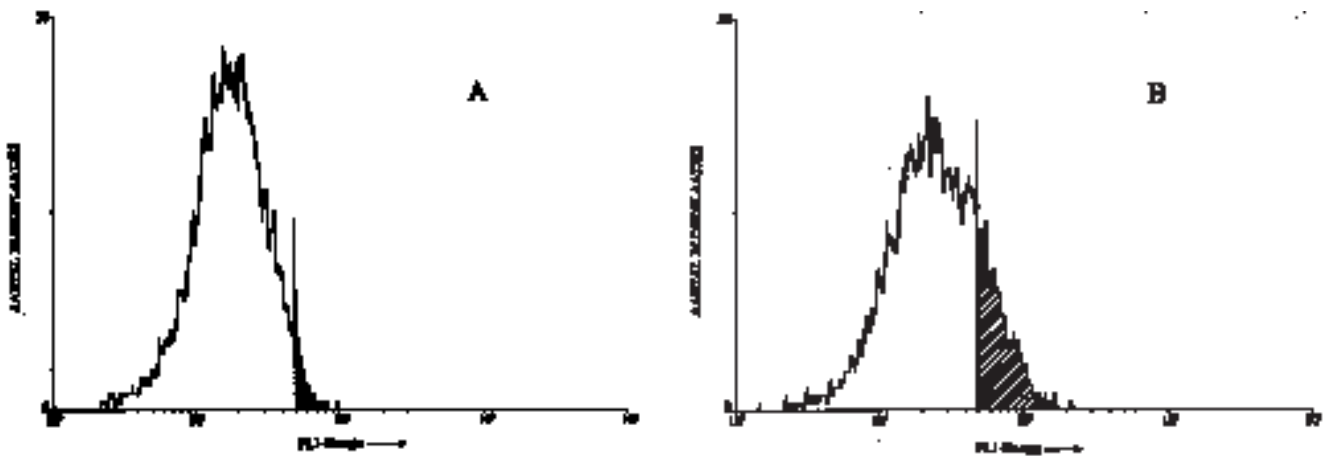
bij diverse ziektebeelden verondersteld, waaronder arteriële trombose, atherosclerose, restenose na percutane transluminale coronair angiografie (PTCA). Een betrouwbare ex-vivo meting van de activatiestatus van circulerende bloedplaatjes zou deze rol echter bij deze, maar ook bij diverse andere klinische situaties duidelijk maken.

Meting van de activatiestatus van bloedplaatjes ex-vivo

Bij de activatie van de bloedplaatjes ondergaat deze cel diverse moleculaire veranderingen. Voor de ex-vivo meting van de activatiestatus van bloedplaatjes m.b.v. flowcytometrie is van belang dat diverse antigenen op het oppervlak van deze cel veranderen bij de activatie:

- bij de activatie ondergaat een bepaald complex van twee glycoproteïnen, het IIb/IIIa complex (CD41), een conformatieverandering. Hierdoor gaat het functioneren als receptor voor fibrinogeen (2). Daarnaast is dit complex overigens ook een receptor voor van Willebrand factor, vitronectine en fibronectine
- bij de secretoire reactie fuseren de membranen van de granula met de plasmamembraan van de cel, waarna de granulaire inhoud in het medium vrijkomt. De granulaire membranen bezitten echter een aantal (glyco)proteïnen die bij de fusie aan het celoppervlak voorradig komen. Vanuit de α -granula betreft dat P-selectine, ook bekend als GMP-140, PADGEM en CD62 (3). Vanuit de lysosomale granula komt bijvoorbeeld een glycoproteïne met een molecuulgewicht van 53 kD voorradig (GP53, CD63) (4) en ook voor de dense bodies is een dergelijke component beschreven.

Voor de klinische toepassing van de meting van de activatiestatus van bloedplaatjes m.b.v. flowcytometrie zijn tot nu toe vrijwel uitsluitend monoclonale antistoffen gebruikt zoals PAC1, die specifiek het glycoproteïne IIb/IIIa complex herkennen in zijn conformatie als fibrinogeen receptor (5,6), of antistoffen



Figuur 3. Bepaling van de activatiestatus van de bloedplaatjes. De analyse van een P-selectine expressie is weergegeven. De bloedplaatjes (regio R2, analoog aan fig. 2) werden geanalyseerd en vergeleken met een monster van een gezonde vrijwilliger. Bij dit laatste monster werd de grenswaarde ingesteld op 1 à 2% (voor PAC1 op ca. 10%). In dit voorbeeld is de grenswaarde ingesteld op 2,1% (A). Bij het monster van de patiënt had dan 15,7% van de bloedplaatjes een hogere P-selectine expressie dan deze grenswaarde (B). Dan wordt de activatiestatus van de bloedplaatjes weergegeven als het verschil, dus 13,6%.

tegen het P-selectine (5,7). Daarbij wordt in volbloed eerst de populatie bloedplaatjes elektronisch met de flowcytometer uitgeselecteerd via een plaatjes-specifiek glycoproteïne, het Ib molecule (CD42b). Vervolgens wordt de mate van expressie van het activatieantigeen in die populatie gemeten m.b.v. de tweede antistof.

Details van de meting

De meting van de activatiestatus van bloedplaatjes ex-vivo m.b.v. dubbel-labeling flowcytometrie is met name gedegen beschreven door de groep van Shattil (5,7,8). Het protocol, gebaseerd op deze artikelen, zoals dat momenteel in diverse klinische situaties door onze groep wordt gebruikt, luidt als volgt: Voer een venapunctie uit onder minimale stuwning. Laat de eerste ml bloed wegvloeden. Verzamel vervolgens 9,0 ml bloed in 1,0 ml natriumcitraat (110 mmol/l Natriumtricitraat). Voeg binnen 5 minuten na de bloedafname 5 µl hoeveelheden bloed toe aan twee buizen, waarin zich reeds 30 µl Hepes buffer bevindt (137 mmol/l NaCl, 5,6 mmol/l glucose, 20 mmol/l Hepes, 2,7 mmol/l KCl, 1 mmol/l MgCl₂, 3,3 mmol/l NaH₂PO₄, 1 mg/ml bovine serum albumine, pH 7,4), evenals 5 µl biotine-gelabeld anti-GPIb antistof (Centraal Laboratorium Bloedtransfusiedienst, Amsterdam) en 5 µl FITC-gelabeld anti-P-selectine (CLB) of PAC1 (Dr. Shattil, zie ref. 7). Incubeer 15 minuten bij kamertemperatuur en in het donker. Houdt de monsters vervolgens steeds in het donker. Voeg 5 µl phycoerythrine/streptavidine (Dakopatts, Glostrup, Denemarken) toe. Incubeer 15 minuten bij kamertemperatuur. Verdun de monsters door toevoeging van 2,5 ml Hepes buffer. Analyseer de monsters binnen twee uur na bloedafname op de flowcytometer. Neem bij elke bloedafname van een patiënt (of serie bloedafnamen op een dag) een bloedmonster af van een gezonde vrijwilliger. Werk dit monster op identieke wijze en gelijktijdig met het monster van de patiënt op. In het Academisch Ziekenhuis Leiden wordt gebruik

gemaakt van een Facscan flowcytometer (Becton-Dickinson, San Jose, Californië, VS). Het materiaal dat van bloedplaatjes afkomstig is wordt selectief geteld (5.000 partikels, logaritmische instelling) door bij 545 nm te selecteren op de GP-Ib expressie (zie figuur 1). De bloedplaatjes (regio R2, 70-75% van alle partikels die van bloedplaatjes afkomstig zijn in het bloed), worden onderscheiden van micropartikels (regio R1) en plaatjes-plaatjes of plaatjes-leucocyten complexen (regio R3), door selectie op voorwaartse en zijwaartse verstrooiing (FSC en SSC). Als gemiddelde grootte van de plaatjespopulatie kan het gemiddelde kanaalnummer van de FSC van de R2 regio dienen (figuur 2). Vervolgens wordt bij 515 nm de mate van expressie van de FITC-gelabelde antistoffen tegen de activatie antigenen van de partikels uit de geselecteerde R2 regio bepaald (figuur 3). Daarbij wordt een grenswaarde van ongeveer 1% ingesteld m.b.v. het monster van de gezonde vrijwilliger. Bij die grenswaarde wordt het percentage partikels bij het monster van de patiënt bepaald met een hogere expressie van dit activatie antigeen (5,7,8).

Door de groep van Shattil is uitgebreid beschreven dat fixatie, zelfs met formaldehyde i.p.v. glutaraldehyde, de binding van de antistoffen afhankelijk van de antistof met 50% kan doen verlagen (7). Zij raden aan de monsters eerst met de antistoffen te incuberen en pas daarna tot fixatie over te gaan. In onze handen gaf dit echter onvoldoende reproduceerbare en met niet-gefixeerde monsters vergelijkbare resultaten. Bedacht moet worden dat bij de klinische situaties vaak slechts enkele procenten geactiveerde bloedplaatjes kunnen worden aangetoond. Wij houden dan ook altijd vast aan de analyse van vers, niet-gefixeerd bloed en meting binnen twee uur na de bloedafname. Dit wordt ook onderschreven door Cahill en medewerkers, die een verhoogde expressie van P-selectine en het lysosomale GP53 vonden na fixatie met formaldehyde (9).

De meting van de activatiestatus als een percentage

cellen met een verhoogde expressie van een activatie antigeen t.o.v. een controlemonster is de in de literatuur en ook de door ons gehanteerde methode. Op zich is het echter slechts een arbitraire maat, die geen recht doet aan het feit dat waarschijnlijk een groot aantal bloedplaatjes een verhoging van de expressie van dit antigeen hebben t.o.v. hun niet-geactiveerde beginsituatie. Die expressie is dan toch nog niet zodanig verhoogd dat de grenswaarde van het controlemonster wordt overschreden, maar verhoogde expressie t.o.v. de beginsituatie is er wel. Een meer juiste maat voor het weergeven van de gemiddelde activatiegraad van de hele bloedplaatjespopulatie is dan het gemiddelde kanaalnummer van de FITC expressie. Shattil en medewerkers (5,7,8) beschrijven dan tevens, dat deze expressie kan worden omgezet in een aantal aan de cel gebonden moleculen, dus op het oppervlak aanwezige aantallen antigenen, via een correlatie van de binding van de gebruikte batch FITC-gelabelde antistof in de flowcytometer aan de radioactief-gelabelde antistof in een reguliere bindingsstudie. Dit is echter niet de gebruikelijke methode.

Klinische toepassing van de meting van de activatiestatus van bloedplaatjes

Met name de laatste twee jaren zijn vele publikaties verschenen, waarbij m.b.v. flowcytometrie de activatiestatus van de bloedplaatjes is onderzocht in diverse klinische situaties.

Eén van de meest onderzochte klinische omstandigheden betreft de hartpatiënt (10). Bij 19 patiënten met onstabiele angina pectoris en non-Q wave infarcten hadden 15 patiënten een verhoogd aantal geactiveerde bloedplaatjes, gedetecteerd als P-selectine expressie, en 7 daarvan zelfs meer dan 10% geactiveerde bloedplaatjes (11). Na een myocardi infarct werd in een studie bij 22 patiënten nog 48 uur na deze gebeurtenis een verhoogd aantal bloedplaatjes gevonden, gedetecteerd met anti-P-selectine en de lysosomale merker GP53. Tevens werd daar een vergroting aangetroffen van het volume van de circulerende plaatjespopulatie (12).

Bij cardiopulmonale bypass vonden Metzelaar en medewerkers een verhoogde expressie van P-selectine en GP53, maar geen verandering in het GPIIb-gehalte. Dit laatste is mogelijk een gevolg van het gebruik van gefixeerde bloedplaatjes in deze studie (13). Diverse auteurs hebben namelijk beschreven dat de expressie van het GPIIb daalt na de start van de bypass procedure. Rinder en medewerkers (14) vonden in een studie bij 13 pediatrie hartpatiënten, naast aanzienlijke plaatjesactivatie, dat tijdens de bypass de GPIIb-expressie afnam tot 75% van de uitgangswaarde. Ook vonden zij een toename van het aantal circulerende complexen van bloedplaatjes-monocyten (van 36% naar 66% van de plaatjespartikels), gepaard gaand met een verlaging van het aantal complexen van bloedplaatjes-neutrofielen en bloedplaatjes-lymfocyten en een activatie van de monocytenuitendeling. De interactie van de bloedplaatjes met de leucocyten gaat overigens via P-selectine expressie op het bloedplaatje (14). Ook Matzdorff en medewerkers vonden de verlaagde expressie van GPIIb, tot 40% en dit werd

niet beïnvloed door aprotinine, een proteaseremmer die veel in de cardiochirurgie gebruikt wordt gezien de bewezen verlaging van het bloedverlies maar waarvan het werkingsmechanisme nog onduidelijk is: remming van fibrinolyse, bloedplaatjes activatie of beide (15). De verlaging van de GPIIb-expressie op het oppervlak van de bloedplaatjes is een gevolg van een herverdeling van deze receptor, die deels vanaf de plasmamembraan de instulpingen van dit membraan (het "open canalicular system" van het bloedplaatje) in migreert. Dit is een reversibel proces, dat in-vitro na ongeveer 60 minuten is hersteld (16).

Bij 16 patiënten die een PTCA ondergaan werd 24 of 48 uur na de ingreep een maximale activatiestatus van de bloedplaatjes aangetroffen, tot 30% geactiveerde bloedplaatjes, via detectie met anti-P-selectine of met PAC1 voor de conformatie van de fibrinogeenreceptor van het GPIIb/IIIa-complex (17). Ook bij deze studie werden echter gefixeerde bloedplaatjes gebruikt. In een studie bij 102 patiënten die PTCA ondergingen werd vóór de procedure de activatiestatus van de bloedplaatjes gemeten. Bij 46 patiënten werd met de markers P-selectine, GP53 en cel-gebonden trombospondine een verhoogd aantal bloedplaatjes gevonden vóór de ingreep. Van deze patiënten kregen er zes een acute occlusie of restenose binnen 24 uur. Bij geen van de patiënten zonder een geactiveerde status van de bloedplaatjes traden deze complicaties op. Het verschil in prevalentie was significant. De auteurs concludeerden dat deze techniek mogelijk een hoog-risico populatie kan identificeren voor complicaties na de PTCA ingreep (18). Dat bloedplaatjes een rol spelen bij de restenose na een PTCA blijkt overigens ook uit recente klinische studies met een Fab fragment van een antistof tegen het GPIIb/IIIa complex. Het gebruik van deze stof reduceert de restenose-prevalentie, maar gaat wel gepaard met een verhoogd bloedingsrisico (19,20).

Een tweede gebied waar diverse studies zijn verricht is de hemodialyse bij nierpatiënten. In een studie bij 13 patiënten met terminaal nierfalen werd m.b.v. flowcytometrie gevonden dat de bloedplaatjes van deze patiënten minder mepacrine opnamen dan gezonde vrijwilligers. Dit is een stof die zich verzamelt in de "dense bodies" van het bloedplaatje, en is daarmee een merker voor de granulaire inhoud cq. de mate waarin een bloedplaatje een secretoire reactie heeft ondergaan. De auteurs concluderen dat de "storage pool disease" bij deze patiënten wel eens een belangrijke factor zou kunnen zijn bij de bloedingsneiging die bij deze uremische patiënten wordt aangetroffen (21). Ook tijdens de hemodialyse procedure raken de bloedplaatjes geactiveerd (22), maar de mate waarin dat gebeurt is afhankelijk van het type dialysemembraan dat wordt gebruikt (23). Overigens werd met flowcytometrie aangetoond dat vrijwilligers na een plasmaferese ook een verhoogde expressie van P-selectine op het oppervlak van hun bloedplaatjes kunnen hebben, die dan 48 uur kan aanhouden (24). Verder is activatie van bloedplaatjes bij diverse andere klinische situaties aangetoond. Bijvoorbeeld via P-selectine en cel-gebonden fibrinogeen detectie bij vrouwen die een normaal verloop van de zwanger-

schap hadden, en een hogere activatie bij vrouwen die pre-eclampsie ontwikkelden (25). Bij een deel van de patiënten met de ziekte van Crohn of ulceratieve colitis via detectie van P-selectine of GP53 (26), maar niet bij drie patiënten met trombotische trombocytopenische purpura (27). Daarnaast heeft flowcytometrie bijgedragen aan de bevinding dat hypothermie het functioneren van de bloedplaatjes remt (28), dat bloedplaatjes van niet-fysiek actieve personen gemakkelijker in-vitro te activeren zijn in tegenstelling tot de bloedplaatjes van fysiek wel-actieve vrijwilligers (29), en dat cocaïne gebruikers als mogelijke verklaring voor het bij hen veelvuldig optreden van trombotische complicaties van hart- en perifere arteriën een verhoogd aantal geactiveerde bloedplaatjes hebben circuleren. Dit cocaïne effect is echter niet rechtstreeks te wijten aan deze stof, aangezien de verhoogde activatiestatus ook werd opgemerkt bij inname van een placebo (30).

Eigen onderzoek

De meting van de activatie van bloedplaatjes in volbloed met de beschreven techniek is begin 1993 door ons opgezet. Vervolgens zijn een aantal studies uitgevoerd en inmiddels ter publikatie aangeboden, of nog gaande gezien de vereiste langdurige patiëntenopname in de protocollen:

- Bij zwangeren wordt de activatiestatus bestudeerd als prognostische factor voor het gaan optreden van pre-eclampsie. Dit onderzoek is nog gaande en gezien zijn follow-up karakter nog niet aan analyse toe.
- Bij cardiochirurgische patiënten die cardiobypass ondergaan werd de afname van het GPIIb-gehalte tijdens de bypassprocedure bevestigd en verdergaande plaatjesactivatie aangetoond. Momenteel wordt het beschermende effect van aprotinine op de plaatjesactivatie bestudeerd.
- Bij patiënten met X-chromosoom gebonden adrenoleucodystrofie, een stapelingsziekte van langketen-vetzuren ten gevolge van een peroxisomaal defect, konden wij aantonen dat de therapie met Lorenzo's olie, zoals die bij deze patiënten wordt gebruikt, leidt tot trombopenie ten gevolge van een activatie en vergroting van de bloedplaatjes (bij 5 van de 8 patiënten).
- Bij septische patiënten wordt de rol van de activatie van de bloedplaatjes, maar ook andere bloedcellen, bestudeerd bij het ontstaan van diffuse intravasale stolling.
- In vitro werd de activatie van bloedplaatjes onder invloed van verschillende typen Röntgen contrastmedia bestudeerd (31). Hierbij werd met twee non-ionische, laag-osmolaire contrastmedia activatie aangetoond in bloed van 2 en 3 van de 6 geteste vrijwilligers, terwijl dit niet het geval was met een ionisch, laag-osmolair contrastmedium. Bovendien remde het ionische contrastmedium de activatie van bloedplaatjes onder invloed van trombine in vitro, terwijl de non-ionische media dit effect niet hadden. Momenteel bevindt een studie bij patiënten zich in de voorbereidingsfase.

Conclusie

De meting van de activatiestatus van bloedplaatjes in volbloed m.b.v. dubbel-labeling flowcytometrie is een gevoelige en reproduceerbare methode, waarmee een verhoogde activatiestatus reeds bij vele klinische situaties is aangetoond. Daarmee is nog niet bewezen dat dit ook van pathofysiologisch belang is. Antiplaatjes therapie zou dat in die situaties moeten uitwijzen.

Literatuur

1. Ruggeri ZM. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb Haemostas* 1993; 70: 119-123.
2. Sims PJ, Ginsberg MH, Plow EF, Shattil SJ. Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1991; 266: 7345-7352.
3. Berman CL, Yeo EL, Wencel-Drake JD, Furie BC, Ginsburg MH, Furie B. A platelet alpha-granule membrane protein that is associated with the platelet membrane after activation. *J Clin Invest* 1986; 78: 130-137.
4. Nieuwenhuis HK, Oosterhout JJG van, Rozemuller E, Iwaarden F van, Sixma JJ. Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood* 1987; 70: 838-845.
5. Abrams CH, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemostas* 1991; 65: 467-473.
6. George JN, Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ. 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.
7. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987; 70: 307-315.
8. Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood* 1990; 75: 128-138.
9. Cahill MR, Macey MG, Newland AC. Fixation with formaldehyde induces expression of activation dependent platelet membrane glycoproteins, P selectin (CD62) and GP53 (CD63). *Br J Haematol* 1993; 84: 527-529.
10. Cahill MR, Newland AC. Platelet activation in coronary artery disease. *Brit J Biomedical Science* 1993; 50: 221-234.
11. Becker RC, Tracy RP, Bovill EG, Mann KG, Ault K. The clinical use of flow cytometry for assessing platelet activation in acute coronary syndromes. *Coronary Artery Dis* 1994; 5: 339-345.
12. Schultheiss HP, Tschöpe D, Esser J, Schwippert B, Roessen P, Nieuwenhuis HK, Schmidt-Soltan C, Strauer B. Large platelets continue to circulate in an activated state after myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 243-247.
13. Metzelaar MJ, Korteweg J, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK. Comparison of platelet membrane markers for the detection of platelet activation in vitro and during platelet storage and cardiopulmonary bypass surgery. *J Lab Clin Med* 1993; 121: 579-587.
14. Rinder CS, Gaal D, Student LA, Smith BR. Platelet-leucocyte activation and modulation of adhesion receptors in pediatric patients with congenital heart disease undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 107: 280-288.
15. Matzdorff AC, Green D, Cohen I, Bauer KD. Effect of recombinant aprotinin on platelet activation in patients under-

- going open heart surgery. *Haemostasis* 1993; 23: 293-300.
16. Michelson AD, Benoit SE, Kroll MH, Li JM, Rohrer MJ, Kestin AS, Barnard MR. The activation-induced decrease in the platelet surface expression of the glycoprotein Ib-IX complex is reversible. *Blood* 1994; 83: 3562-3573.
 17. Nurden AT, Macchi L, Bihour C, Durrieu C, Besse P, Nurden P. Markers of platelet activation in coronary heart disease patients. *Eur J Clin Invest* 1994; 24, suppl. 1: 42-45.
 18. Tschöepe D, Schultheiss HP, Kolarov P, Schwippert B, Dannehl K, Nieuwenhuis HK, Kehrel B, Strauer B, Gries FA. Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischemic events after PTCA. *Circulation* 1993; 88: 37-42.
 19. The EPIC investigators. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *New Engl J Med* 1994; 330: 956-961.
 20. Topol EJ, Califf RM, Weisman HF, Ellis SG, Tchong JE, Worley S, Ivanhoe R, George BS, Fintel D, Weston M, Sigmon K, Anderson KM, Lee KL, Willerson JT. Randomised trial of coronary intervention with antibody against platelet IIb/IIIa integrin for reduction of clinical restenosis: results at six months. *The Lancet* 1994; 343: 881-886.
 21. Gawaz MP, Bogner C, Gurland HJ. Flow-cytometric analysis of mepacrine-labelled platelets in patients with end-stage renal failure. *Haemostasis* 1993; 23: 284-292.
 22. Reverter JC, Escolar G, Sanz C, Cases A, Villamor N, Nieuwenhuis HK, López J, Ordinas A. Platelet activation during hemodialysis measured through exposure of p-selectin: Analysis by flow cytometric and ultrastructural techniques. *J Lab Clin Med* 1994; 124: 79-85.
 23. Cases A, Reverter JC, Escolar G, Sanz C, Lopez-Pedret J, Revert L, Ordinas A. Platelet activation on hemodialysis: influence of dialysis membranes. *Kidney Int* 1993; 41, Suppl: 217-220.
 24. Wun T, Paglieroni T, Holland P. Prolonged circulation of activated platelets following plasmapheresis. *J Clin Apheresis* 1994; 9: 10-16.
 25. James SL, Goodall AH. Flow cytometric detection of circulating activated platelets and platelet hyper-responsiveness in pre-eclampsia and pregnancy. *Clin Science* 1994; 86: 731-739.
 26. Collins CE, Cahill MR, Newland AC, Rampton DS. Platelets circulate in an activated state in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994; 106: 840-845.
 27. Hoffman M, Monroe DM, Roberts HR. Platelet activation in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1993; 42: 182-185.
 28. Michelson AD, MacGregor H, Barnard MR, Kestin AS, Rohrer MJ, Valeri CR. Reversible inhibition of human platelet activation by hypothermia in vivo and in vitro. *Thromb Haemostas* 1994; 71: 633-640.
 29. Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, Errichetti A, Rosner BA, Michelson AD. Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation* 1993; 88: 1502-1511.
 30. Rinder HM, Ault KA, Jatlow PI, Koston TR, Smith BR. Platelet α -granule release in cocaine users. *Circulation* 1994; 90: 1162-1167.
 31. Hardeman MR, Konijnenberg A, Sturk A, Reekers JA. Activation of platelets by low-osmolar contrast media: differential effects of ionic and non-ionic agents. *Radiology* 1994; 192: 563-566.

Summary

Detection and clinical relevance of activated platelets. Schaap MCL en Sturk A. Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 26-31.

A few years ago a technique was described on the flow cytometer to measure the platelet activation status in-vivo. A combination of two monoclonal antibodies is used per sample: one directed against a platelet-specific antigen (glycoprotein Ib), the other against an antigen with increased or reduced platelet surface expression upon activation of this cell. The last few years many clinical studies have been performed with antibodies to detect the fibrinogen receptor status, or components originally localized in granular membranes that appear on the platelet surface due to the platelet secretory reaction (P-selectin, GP53). In these studies it was demonstrated that the platelets circulate in an increased activation state for example after cardiobypass, PTCA treatment, hemodialysis, in pre-eclampsia and in cocaine users. The technique is sufficiently reproducible and sensitive to detect a possible activated state of the circulating blood platelets in other clinical conditions. This could subsequently be of therapeutic benefit, as has recently been shown in a clinical study on the effect of an Fab fragment of an antibody to platelet GPIIb/IIIa in patients undergoing a PTCA.

Key-words: Activated platelets; platelet activation; flowcytometry.