

Platelet responsiveness and function during storage : implications for platelet transfusion therapy

Citation for published version (APA):

Cauwenberghs, S. (2007). *Platelet responsiveness and function during storage : implications for platelet transfusion therapy*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20070620sc>

Document status and date:

Published: 01/01/2007

DOI:

[10.26481/dis.20070620sc](https://doi.org/10.26481/dis.20070620sc)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Bloedplaatjes zijn cellulaire fragmenten, die afgesplitst worden door de megakaryocyten in het beenmerg, en die een cruciale rol spelen in het hemostatische proces. Bij vaatwandbeschadiging bewerkstelligen zij de stelping van het bloed door samen te klonteren en dan de stolling mogelijk te maken. Een sterk verlaagd aantal plaatjes in de circulatie, bijvoorbeeld door een afwijkende beenmergfunctie of een verhoogd verbruik of verlies aan plaatjes, leidt tot onvoldoende hemostase en versterkt daarmee het risico op levensbedreigende bloedingen. In dergelijke situaties worden patiënten getransfundeerd met een plaatjespreparaat dat afkomstig is van bloeddonoren. Deze donorplaatjes dienen geruime tijd na de transfusie in de circulatie te blijven. Meestal wordt aangenomen is dat een verhoging van het aantal circulerende plaatjes vanzelf leidt tot een verbeterde hemostase in de patiënt. Tot op heden is er nauwelijks ingegaan op de vraag of de plaatjes die getransfundeerd worden voldoende hemostatisch actief zijn. Deze vraag is niet onbelangrijk, omdat het risico op bloedingen enkel zal verkleinen wanneer de donorplaatjes, net als de autologe plaatjes, in staat zijn om adequaat te reageren op een vaatwandbeschadiging.

Zoals beschreven in hoofdstuk 1, definiëren wij het reactievermogen van plaatjes als de capaciteit om te kunnen reageren op belangrijke fysiologische stimuli. Hieronder vallen collageen en de von Willebrand factor, die na een vaatwandbeschadiging beide blootgesteld worden aan de bloedstroom; verder de plaatjesproducten ADP, ATP en tromboxaan A_2 , welke autocrien gesecreteerd worden; fibrinogeen waarmee geactiveerde plaatjes aan elkaar kunnen kleven; en ook trombine dat het meest actieve product is van de bloedstolling. Wanneer een bloedvat beschadigd wordt, leidt dit eerst tot een stabiele adhesie van plaatjes, vervolgens tot activeringsreacties via een verhoging van de vrije calciumconcentratie in het cytosol, en vormverandering van de plaatjes. Vervolgens verkleven de plaatjes tot een aggregaat (trombus), en onder invloed van trombine ontstaat er een stevig stelsel van plaatjes en fibrine. Als gevolg van deze plaatjesreacties wordt de beschadiging in het vat efficiënt gerepareerd en daarmee de bloeding gestopt.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de literatuur die beschrijft dat de opslag van donorplaatjes, zoals die plaatsvindt bij de bloedbank, leidt tot veranderingen in hun functionaliteit. Deze veranderingen die gepaard gaan met opslag worden vaak omschreven als *platelet storage lesion*. Aangenomen wordt dat deze lesie beïnvloed wordt door de wijze van verwerking van het donorbloed en de manier van opslag van de cellen. Het begrip *platelet storage lesion* blijkt echter niet eenduidig gedefinieerd te zijn, maar sterk afhankelijk van de test waarmee de functionaliteit van de opgeslagen plaatjes bepaald wordt. De meest gebruikelijke testen betreffen het energiemetabolisme van de plaatjes, hun integriteit dan wel het voorkomen van activatiemerkers op het celoppervlak. Een nadeel is dat dergelijke assays ongevoelig zijn voor het opsporen van veranderingen in het reactievermogen van plaatjes, die met fysiologische agonisten gestimuleerd worden. In dit proefschrift is daarom gezocht naar meer gevoelige technieken om deze veranderingen te bepalen, zowel voor als na de transfusie van plaatjes in een patiënt.

Bekend was dat plaatjes tijdens hun bereiding en opslag kleine hoeveelheden ADP en ATP secreteren, als gevolg waarvan de plaatjesreceptoren voor ADP en ATP zeer snel geïnactiveerd raken. Het was dus te verwachten dat één van de eerste effecten van plaatjesopslag het verlies van reactiviteit op ADP en ATP zou zijn. Deze veronderstelling bleek niet zonder meer te kloppen. Hoofdstuk 3 beschrijft dat de P2Y-receptoren voor ADP en de P2X₁-receptoren voor ATP lange tijd actief blijven, wanneer de plaatjes opgeslagen worden in plasma. Daarmee wordt ook het vermogen van de cellen tot vormverandering en aggregatie behouden. Aangetoond is dat het plasma specifieke enzymen bevat, zogenaamde ecto-nucleotidasen, die instaan voor de afbraak van gesecreteerd ADP en ATP. Desensitizatie van de ADP- en ATP-receptoren door autocriene secretie blijkt dus van minder belang, zolang plaatjes opgeslagen worden in hun natuurlijk medium, namelijk plasma.

Om kostenbesparende en andere redenen is er een tendens om plaatjes op te slaan in buffermedia (synthetische bewaarvloeistoffen) met slechts een beperkte hoeveelheid plasma. Hoofdstuk 4 beschrijft de functionaliteit van plaatjes die opgeslagen worden in dergelijk buffermedia. Deze plaatjes

vertonen *in vitro* een verhoogde mate van activering (meer expressie van P-selectine) en een verminderd reactievermogen op ADP, ten gevolge van ADP-receptor desensitizatie. Het verlagen van de hoeveelheid plasma, en daarmee de hoeveelheid ADP-afbrekende enzymen in de bewaarvloeistof, leidt dus tot een verslechterde conditie van de plaatjes tijdens opslag. Een gevolg hiervan is een verminderde ADP receptorsignalering tijdens trombusvorming onder stromingscondities.

Een typisch fenomeen dat optreedt tijdens de opslag van plaatjes is het afsnoeren van stolactieve micropartikels. In hoofdstuk 5 is bestudeerd in hoeverre deze micropartikelvorming het gevolg is van een verhoogde activatietoestand van de fibrinogeenreceptor (integrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$). Aangetoond is dat geactiveerd $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ op de plaatjes een signaal initieert, dat leidt tot een lokaal verhoogde afbraak van filamenteus actine, en daarmee tot het loskomen van celskelet en plasmamembraan. Het gevolg van deze membraandestabilizatie is de vorming van micropartikels, die door een verlies van membraan-asymmetrie stolactief worden. Dit mechanisme verschilt wezenlijk van de eerder beschreven vorming van micropartikels door plaatjes die gestimuleerd worden met sterke agonisten zoals trombine en collageen. In dit laatste geval ontstaan de micropartikels na een verhoging in cytosolisch calcium en activatie van calpaïne, dat op zijn beurt instaat voor afbraak van het celskelet. In tegenstelling hiermee kon geen functie van calpaïne detecteerd worden in micropartikels die afgesnoerd werden door opgeslagen plaatjes. In hoeverre deze stolactieve micropartikels na transfusie bijdragen tot het stoppen van een bloeding is nog onduidelijk. Wel staat vast dat zij snel uit de circulatie verdwijnen.

Plaatjes opgeslagen in plasma bleken in verminderde mate in staat te zijn tot trombusvorming in vergelijking tot vers geïsoleerde plaatjes. Aangezien het verminderde reactievermogen van de opgeslagen plaatjes niet het gevolg was van desensitizatie van de ADP- en ATP-receptoren, is in hoofdstuk 6 gezocht naar alternatieve verklaringen. Plaatjesopslag leidde tot een verminderd vermogen tot calciummobilizatie vanuit het endoplasmatisch reticulum naar het cytosol. Deze verlaagde calciumrespons was onafhankelijk van het type agonist

en van de signaalweg gebruikt door de agonisten. Aangezien de calciumvoorraad in het endoplasmatisch reticulum niet verminderde na opslag van plaatjes, werd de verminderde calciummobilizatie verklaard door een verminderde werking van de inositol 1,4,5-trifosfaat-receptoren, die als calciumkanalen fungeren. Er zijn aanwijzingen dat bij veroudering een verminderde calciummobilizatie de voorbode is van een apoptose-achtig proces, en daarmee tot een verkorting van de circulatietijd van de plaatjes. Dit biedt een nieuwe uitdaging voor de bloedbank, namelijk zoeken naar middelen om de veranderde calciummobilizatie en apoptose te vertragen om daarmee de maximale opslagtijd van plaatjes (nu 5 tot 7 dagen) te verlengen.

In hoofdstuk 7 is het verlaagde reactievermogen als gevolg van plaatjesopslag bestudeerd na transfusie in patiënten met lage plaatjesaantallen. Dit betrof leukemiepatiënten, die trombocytopen waren ten gevolge van de behandeling voor deze aandoening. Aangezien er geen goede methoden beschikbaar waren voor het testen van de plaatjesfunctie in plasma of bloed van patiënten met trombocytopenie, moesten deze eerst ontwikkeld worden. Hoofdstuk 7 beschrijft twee van zulke testen, namelijk meting van de trombusvorming in bloed onder stromingscondities, en meting van de trombinegeneratie in stollend plaatjes-rijk plasma. Bij een groep patiënten werd nagegaan dat deze testen inderdaad in staat zijn om positieve effecten van een transfusie met plaatjes te detecteren. Aangetoond werd dat opgeslagen plaatjes na transfusie goed in staat zijn trombi te vormen en de generatie van trombine te stimuleren.

Deze twee testen zijn verder gebruikt om na transfusie de functionaliteit te bepalen van plaatjes, die opgeslagen zijn in plasma of in synthetische bewaarvloeistof. In het laatste geval kon een herstel in reactievermogen op ADP geconstateerd worden. Verder bleken beide functietesten nuttig te zijn voor het opsporen van afwijkingen in trombusvorming of stolling, bijvoorbeeld bij een patiënt met *graft-versus-host* disease. Verwacht wordt dat deze testen in de toekomst bruikbaar zullen zijn voor het bepalen van de hemostase-activiteit in bloed van patiënten met trombocytopenie, en dan als indicator kunnen dienen voor het risico op bloedingen.

De algemene discussie in hoofdstuk 8 bespreekt de bevindingen van dit proefschrift in verhouding tot de recente literatuur. In het bijzonder wordt ingegaan op de veranderingen in signalering die optreden bij de opslag van plaatjes, en op de gevolgen hiervan voor de trombusvorming en het op gang brengen van de stolling. Geconcludeerd is dat *in vivo* studies van belang zijn om een goed beeld te krijgen van het precieze hemostatisch effect van een plaatjestransfusie. Al met al dragen de studies beschreven in dit proefschrift bij tot een beter begrip van het proces van *platelet storage lesion* en de mogelijke consequenties daarvan voor de transfusiepraktijk. De beschreven resultaten helpen hopelijk om de bewaarcondities van plaatjes te optimaliseren en de praktijk rond plaatjestransfusie te verbeteren.