

# Betekenis van de 'Platelet Function Analyzer-100<sup>®</sup>' in de dagelijkse diagnostiek

**Auteur** J.W.N. Akkerman

**Trefwoorden** aspirine, bloedingstijd, clopidogrel, glycoproteïne IIb/IIIa-antagonist, 'Platelet Function Analyzer-100<sup>®</sup>', trombocytopathie, ziekte van Von Willebrand

## Samenvatting

Voor het inschatten van het bloedingsrisico met de 'Platelet Function Analyzer-100<sup>®</sup>' bij ingrepen, zoals vroeger met de 'Bloedingstijd' gebeurde, is nog onvoldoende basis. In de dagelijkse diagnostiek is de 'Platelet Function Analyzer-100<sup>®</sup>' een waardevol instrument voor de diagnose van de ziekte van Von Willebrand (type 1, 2A, 2B en 3) en voor deze patiënten superieur aan de 'Bloedingstijd'. Ook ernstige trombocytopathieën worden door de 'Platelet Function Analyzer-100<sup>®</sup>' herkend. Dit geldt ook voor trombocytopenieën, maar hier ligt een directe plaatjestelling natuurlijk meer voor de hand.

Voor de diagnose van milde trombocytopathieën is de 'Platelet Function Analyzer-100<sup>®</sup>' niet geschikt. Verworven trombocytopathieën door gebruik van glycoproteïne IIb/IIIa-antagonisten leiden tot een verlengde 'closure time'. Gebruik van aspirine bij gezonde personen geeft een verlengde 'closure time' met het collageen/epinefrinefilter. Bij patiënten is de invloed van cyclo-oxygenase 1-remmers op de 'Platelet Function Analyzer-100<sup>®</sup>' zeer wisselend en eenzelfde beeld wordt gevonden bij gebruik van P2Y12-antagonisten als clopidogrel.

*(Ned Tijdschr Hematol 2006;3:133-7)*

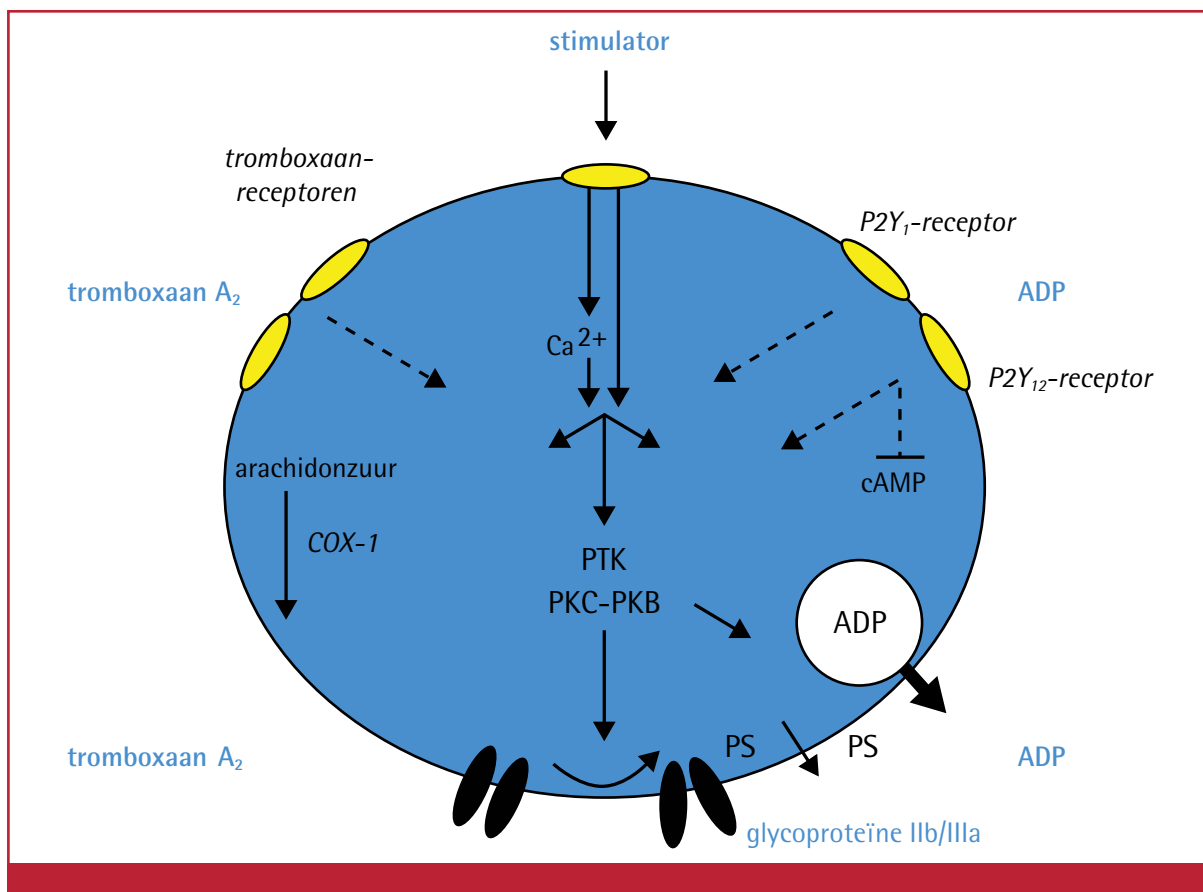
## Inleiding

De 'Bloedingstijd' is jarenlang een populaire test geweest om het risico op een bloeding in te schatten bij operatief ingrijpen of een blinde lever- of nierbiopsie. De diagnostiek van trombocytopenieën, trombocytopathieën en de ziekte van Von Willebrand ('Von Willebrand disease'; VWD) werd ook mede op deze test gebaseerd. In het begin van de jaren tachtig van de vorige eeuw hebben meta-analyses een einde gemaakt aan het inschatten van een verhoogd bloedingrisico bij operatief ingrijpen met behulp van de 'Bloedingstijd'. De waarde van de 'Bloedingstijd' voor de diagnostiek van trombocytopenieën en VWD blijft overeind.<sup>1,2</sup>

Met het wegvallen van de 'Bloedingstijd' voor een breed veld van indicaties, ontstond acuut de behoefte aan een alternatief. Dat leek voorhanden. In de jaren tachtig van de vorige eeuw werd in Duitsland een apparaat ontwikkeld waarin met citraat ontsold bloed

onder gecontroleerde druk door een kleine opening werd gestuwd. De opening was aangebracht in een membraan met daarin een mengsel van collageen en ADP, het zogenoemde C-ADP-membraan, dan wel met een mengsel van collageen en epinefrine, C-EPI-membraan genoemd. In combinatie met een 'shear' snelheid van circa  $5.000 \text{ s}^{-1}$ , wat overeenkomt met de schuifkrachten in capillairen en atherosclerotische arterieën, induceerden deze plaatjesactivatoren adhesie en aggregatie, met verstopping van de opening tot gevolg. Er ontstond een drukverschil dat als 'closure time' (CT) werd vastgelegd.

De voordelen van deze methode waren het gebruik van volbloed, het meten van plaatjesadhesie onder hoge 'shear' snelheid en de kleine hoeveelheid bloed die voor de meting nodig was. De firma Dade-Behring ontwikkelde het apparaat verder uit. Het alternatief voor de 'Bloedingstijd' was geboren: de 'Platelet Function Analyzer' (PFA)-100<sup>®</sup>.

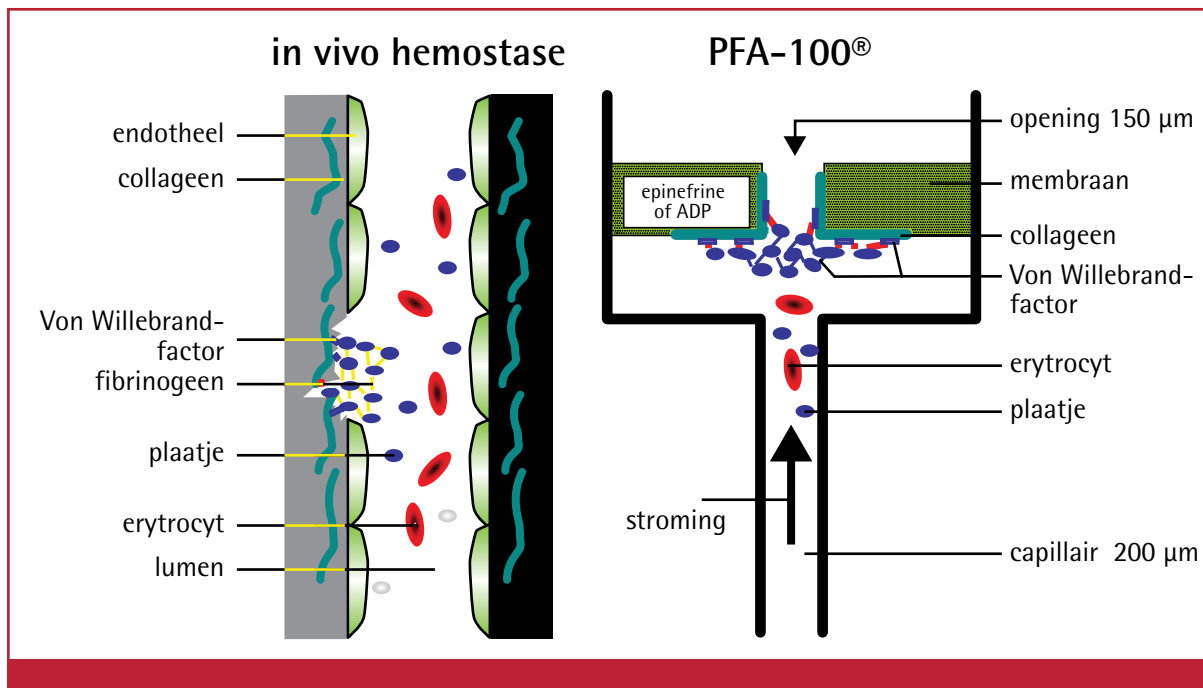


**Figuur 1.** De activatie van bloedplaatjes. Een stimulator bindt aan een receptor en start de verhoging van intracellulair  $Ca^{2+}$  en de activatie van fosfotyrosinekinases en de proteïnekinases B en C. Dit leidt tot opening van de fibrinogeenreceptor (glycoproteïne IIb/IIIa) en translocatie van het negatief geladen 'phosphatidylserine' (PS). Fibrinogeenbinding leidt tot aggregatie en PS bevordert de stolling op het plaatjesoppervlak. Secretie van ADP en het vrijkomen van tromboxaan  $A_2$  bevorderen plaatjesactivatie door binding aan de P2Y<sub>1</sub>-, P2Y<sub>12</sub>- en tromboxaanreceptoren. cAMP=cyclisch AMP, COX-1=cyclo-oxygenase type 1, PTK='proteïne tyrosine kinase' (fosfotyrosinekinase), PKC=proteïnekinase C, PKB=proteïnekinase B.

### Belangrijke plaatjeseigenschappen voor het stelpen van een bloeding

Bloedplaatjes bevatten receptoren voor stimulerende stoffen als trombine (zie *Figuur 1*). Trombinebinding start processen die de fibrinogeenreceptor (glycoproteïne IIb/IIIa) openzetten, waarna fibrinogeen bindt. De plaatjes worden aan elkaar gekoppeld, waarna een aggregaat ontstaat. Twee processen zorgen ervoor dat aggregatie snel verloopt. Ten eerste de secretie van ADP uit granula (de  $\delta$ -granula). ADP bindt aan een ADP-receptor (P2Y<sub>1</sub>-receptor) die het activatiesproces versnelt en aan een ADP-receptor (P2Y<sub>12</sub>-receptor) die het cyclisch AMP (cAMP)-niveau in het plaatje verlaagt. cAMP is een plaatjesremmer, dus hoe lager cAMP, hoe sneller aggregatie. Clopidogrel interfereert met de activatie van de P2Y<sub>12</sub>-receptor, waardoor de aggregatie minder snel verloopt.

Ten tweede de vorming van tromboxaan  $A_2$  (Tx $A_2$ ). Tx $A_2$  wordt gesynthetiseerd via cyclo-oxygenase type 1 (COX-1) en versnelt het activatiesproces door binding aan Tx $A_2$ -receptoren. Aspirine remt COX-1 en daarmee de aggregatie. Deze processen kunnen in de aggregometer worden gemeten. Daarnaast leidt plaatjesactivatie tot translocatie van het negatief geladen fosfatidylserine ('phosphatidylserine'; PS) van de binnenkant naar de buitenkant van het plasmamembraan (procoagulantactiviteit). De vitamine K-afhankelijke stollingsfactoren II, VII, IX en X binden hieraan, waardoor de stolling wordt versneld. In vaten met een hoge stroomsnelheid moeten de plaatjes eerst worden afgeremd voordat zij in de wond kunnen adhereren. Hiervoor zorgt Von Willebrandfactor (VWF). Dit plasma-eiwit wordt gesynthetiseerd in



Figuur 2. De PFA-100® bootst plaatjesadhesie en -aggregatie na in stromend bloed. Dit figuur is met toestemming van Dade-Behring Nederland gepubliceerd.

endotheelcellen. Het bindt aan collageen, verandert van vorm en koppelt vervolgens aan de VWF-receptor op het plaatje (glycoproteïne Ib).

### Algemene eigenschappen van de PFA-100®

Na enkele ontwikkelingsstadia te hebben doorlopen, is de PFA-100® nu een bekende verschijning in veel diagnostische en researchlaboratoria (zie Figuur 2). Het is dus tijd om de balans op te maken. Is de PFA-100® een betrouwbaar alternatief voor de 'Bloedingstijd'? Is de test een verbetering bij het opsporen van congenitale en verworven plaatjesstoornissen? De balans is opgemaakt en wel door een daartoe benoemde commissie. De subcommissie van de 'International Society on Thrombosis and Haemostasis' (ISTH) heeft een werkgroep in het leven geroepen om de waarde van de PFA-100® te evalueren. Het rapport is in het februari-nummer van het tijdschrift van de ISTH verschenen en geeft de algemene consensus van de ISTH weer.<sup>3</sup> Dit uitgebreide rapport, aangevuld met enkele andere artikelen, leidt tot de volgende conclusies.

1. De CT van de PFA-100® is bijzonder gevoelig voor congenitale en verworven trombocytopenieën. Beneden  $100 \times 10^9$  plaatjes/l is de CT omgekeerd evenredig met het plaatjesaantal.<sup>3</sup> Bij een hematocriet lager dan 25% is de CT verlengd.<sup>3</sup> De CT

is zeer gevoelig voor afwijkingen van VWF. De CT is verlengd bij ernstige trombocytopenieën. Afwijkingen in stollingsfactoren beïnvloeden de PFA-100® niet.

2. Omdat met volbloed wordt gewerkt, is ijking een probleem. Variabelen als het gebruik van vacuainers, de tijd tussen bloedafname en uitvoering van de test, de citraatconcentratie van het onstolde bloed, het moment van de dag waarop de test wordt gedaan en de leeftijd van de patiënt hebben invloed op de CT.
3. Verlengde CT-waarden worden gevonden na consumptie van flavonoïden. Dit is een groep stoffen die ondermeer wordt aangetroffen in thee en rode wijn en waarvan een heilzame werking zou uitgaan bij de preventie van hart- en vaatziekten.

### Vervangt PFA-100® de 'Bloedingstijd' bij het inschatten van bleedingsrisico bij operatief ingrijpen en blinde biopsie?

Het is op dit moment niet verantwoord de PFA-100® te gebruiken als basis voor behandelingen die een bloeding tegengaan of voorkomen en wel om de simpele reden dat tot nu toe hiernaar onvoldoende onderzoek is gedaan. Omdat de 'Bloedingstijd' heeft afgedaan als basis voor zo'n inschatting, is het weinig zinvol om PFA-100®-resultaten te ver-

gelijken met die van de 'Bloedingstijd'. Een groot-schalig onderzoek naar de relatie tussen de CT's van de PFA-100® en bloedingsproblematiek is dringend gewenst.

### Gebruik van PFA-100® bij congenitale trombocytopathieën

De ziekte van Glanzmann wordt gekenmerkt door het slecht functioneren van glycoproteïne IIb/IIIa. Aggregatie is afwezig en er is een sterk verhoogde bloedingsneiging. Er zijn vier oorzaken: 1) de receptor is afwezig; 2) de receptor is aanwezig, maar kan niet worden geactiveerd; 3) de receptor is aanwezig en kan worden geactiveerd, maar fibrinogeen kan niet binden en 4) de receptor is constitutief geactiveerd en met fibrinogeen bedekt. Bij de types 1 tot en met 3 is zowel de CT met C-ADP-filter als met C-EPI-filter sterk verlengd (gegevens van type 4 ontbreken).

Het syndroom van Bernard-Soulier wordt gekenmerkt door een deficiëntie van glycoproteïne Ib. Deze afwijking leidt ook tot verlengde CT-waarden bij gebruik van beide filters. De plaatjes van patiënten met het 'platelet type' van VWD en het 'Gray Platelet Syndrome' (deficiëntie van  $\alpha$ -granula) geven ook met beide filters een verlengde CT.

Bij minder ernstige plaatjesafwijkingen wordt de interpretatie ingewikkelder. Plaatjes van patiënten met een COX-1-deficiëntie hebben een normale CT met het C-ADP-membraan, maar een verlengde CT met het C-EPI-membraan. Dit zou erop wijzen dat adhesie en aggregatie op het C-EPI-membraan vooral worden ondersteund door de vorming van TxA<sub>2</sub>. Zowel normale als verlengde CT's worden gevonden bij een deficiëntie van de P2Y<sub>12</sub>-receptor, de  $\delta$ -granula ('storage pool disease'), het syndroom van Hermansky-Pudlak ( $\delta$ -granuladeficiëntie gecombineerd met andere afwijkingen) en het myelodysplastische en myeloproliferatieve syndroom. Het syndroom van Wiskott-Aldrich (deficiëntie van het WAS-eiwit dat betrokken is bij actomyosineregulatie) en afwijkingen in procoagulantactiviteit (het verschijnen van PS op het plaatjesoppervlak) leiden niet tot een verlengde CT.

Het is duidelijk dat de PFA-100® gevoelig is voor ernstige trombocytopathieën, maar bij de mildere vormen een wisselend beeld geeft. Daarbij moet worden bedacht dat het hier om afwijkingen gaat met een zeer lage prevalentie. Het aantal studies met de PFA-100® is overeenkomstig laag, waardoor de conclusies slechts een voorlopig karakter hebben.

### Gebruik van PFA-100® bij de ziekte van Von Willebrand

De PFA-100® is een waardevol hulpmiddel bij de diagnostiek en behandeling van patiënten met VWD.<sup>4</sup> Bij afwijkingen in de VWF is de PFA-100® zelfs gevoeliger dan de 'Bloedingstijd'. De lagere VWF-spiegels bij gezonde personen met bloedgroep 0 gaan gepaard met een langere CT. VWF is een polymeer en naarmate de polymerisatie toeneemt, is de hemostatische effectiviteit groter. Deze eigenschap wordt ook door de PFA-100® herkend en leidt tot lagere CT's bij een hogere polymerisatiegraad.

Kwantitatieve VWF-defecten worden verdeeld in een partieel tekort (type 1) en een vrijwel totaal tekort (type 3). Bij type 1 kan de bloedingstijd verlengd zijn en liggen de VWF-concentraties tussen 10 en 50% van normaal. Het VWF-multimerenpatroon is normaal.<sup>5</sup> Bij type 3 is de bloedingstijd verlengd en is er geen aantoonbaar VWF in plasma en plaatjes.

De belangrijkste kwalitatieve VWF-defecten (type 2) worden als volgt onderverdeeld. Bij type 2A is de bloedingstijd verlengd, terwijl de VWF-concentratie licht verlaagd is. Het gehalte hoge multimeren is ook verlaagd. Bij type 2B is de bloedingstijd verlengd en de VWF-concentratie licht verlaagd. De concentratie hoge multimeren is daarbij verminderd. Vrij vaak wordt een trombocytopenie gezien. Bij type 2B zijn de plaatjes normaal, maar heeft het VWF-molecuul een verhoogde affiniteit voor plaatjes. Dit in tegenstelling tot het 'platelet type' van VWD (ook wel pseudo-Von Willebrand-ziekte genoemd), waarbij afwijkende trombocyten met een verhoogde affiniteit binden aan normaal VWF. In een uitgebreide studie waren de CT's met C-ADP-membraan bij 100% van de patiënten met typen 1, 2A, 2B en 3 verlengd.<sup>4</sup> Voor het C-EPI-membraan was dit percentage 96,5%. Het percentage patiënten dat een verlengde bloedingstijd had, was beduidend lager. De PFA-100® is dus een waardevolle vervanging van de 'Bloedingstijd' bij de diagnostiek van VWD.

Het is verder interessant dat bij gezonde individuen polymorfismen zijn aangetroffen met kwantitatieve verschillen in de collageenreceptor, integrine  $\alpha_2\beta_1$ . Deze verschillen worden door de PFA-100® met het C-EPI-membraan herkend.<sup>6</sup>

### Verworven trombocytopathieën

Remmers van de fibrinogeenreceptor (abciximab, tirofiban, eptifibatide) remmen de CT die is gemeten met beide membranen. Aspirine en andere COX-1-remmers remmen niet de CT met het C-ADP-membraan, maar dikwijls wel met het C-EPI-membraan. De afwijkingen

in de PFA-100<sup>®</sup> die bij congenitale COX-1-deficiëntie worden gevonden, zijn hiermee in overeenstemming. Zowel normale als verlengde CT-waarden worden gevonden bij remming van de P2Y<sub>12</sub>-receptor met clopidogrel. Dit is teleurstellend, omdat juist dit medicament aan populariteit wint bij het bestrijden van arteriële trombose. De combinatie clopidogrel met aspirine leidt wél tot een verlengde CT met het C-EPI-membraan. De uitslagen met het C-ADP-membraan kunnen echter zowel normaal als afwijkend zijn.

### Conclusie

De PFA-100<sup>®</sup> is een eenvoudig te bedienen apparaat. IJking is nog een probleem en de referentiewaarden die zijn gebaseerd op een gezonde populatie zijn nog ruim. De introductie van 'shear' snelheid zoals die door de PFA-100<sup>®</sup> wordt toegepast om plaatjes te activeren in combinatie met stimulatie door bekende stimulators, heeft geleid tot een betere diagnose van VWD. Ernstige plaatjesstoornissen worden ook door het apparaat herkend. In alle gevallen zal aanvullend onderzoek nodig zijn, omdat vele oorzaken tot een verlengde CT kunnen leiden.

### Contactgroep Kahler en Waldenström Patiënten (CKP)

De Contactgroep Kahler en Waldenström Patiënten (CKP) is een – in 1983 opgerichte – vereniging voor patiënten die lijden aan multipel myeloom (de Ziekte van Kahler) of de ziekte van Waldenström, verwant aan Kahler.

Het **lidmaatschap** van de CKP bedraagt € 16 / jaar; incl. kwartaalblad "Merg & Been" en het zojuist vernieuwde "Patiëntenboek - Multipel myeloom & De ziekte van Waldenström" (22 auteurs onder redactie van H. Jansen, Dr. P.W. Wijermans; 3e druk, 178 blz.; ISBN 90-802674-4-9). Voor leden en hun naasten is er een jaarlijkse **Landelijke Contactdag** met wetenschappelijke voorlichting en workshops. Voor **informatie** en **aanmelding**:

- Secretariaat CKP, W. van Bokkem, Landheer 65, 3171 DC Poortugaal; e-mail: ckp@kabelfoon.nl, of:
- bezoek de CKP-website: www.kahler.nl.

### Referenties

1. Lind SE. The bleeding time does not predict surgical bleeding. *Blood* 1991;77:2547-52.
2. Gewirtz AS, Kottke-Marchant K, Miller ML. The pre-operative bleeding time test: assessing its clinical usefulness. *Cleve Clin J Med* 1995;62:379-82.
3. Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK. The platelet physiology subcommittee of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost* 2006;4:312-9.
4. Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, Martin I, Boyer-Neumann C, Trossaert M, et al. Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases. *Blood* 1998;91:1325-31.
5. Hoffmann JJ, Akkerman JW, Nieuwenhuis HK, Overbeeke MA. *Hematologie*. 2<sup>e</sup> ed. Arnhem: Syntax Media; 2006.
6. Di Paola J, Federici AB, Mannucci PM, Canciani MT, Kritzik M, Kunicki TJ, et al. Low platelet alpha2beta1 levels in type I von Willebrand disease correlate with impaired platelet function in a high shear stress system. *Blood* 1999;93:3578-82.

Ontvangen 9 februari 2006, geaccepteerd 4 mei 2006.

### Correspondentieadres

**Prof. dr. J.W.N. Akkerman, bijzonder  
hoogleraar trombosebehandeling en  
trombosepreventie voor de Trombose-  
stichting Nederland**

Trombose en Hemostase Laboratorium LKCH  
Universitair Medisch Centrum Utrecht  
Postbus 85500  
3508 GA Utrecht  
Tel.: 030 250 65 12  
Fax.: 030 250 54 18  
E-mailadres: j.w.n.akkerman@umcutrecht.nl

Belangenconflict: geen gemeld.  
Financiële ondersteuning: geen gemeld.