

Nieuwe inzichten in de megakaryopoëse bij patiënten met myelodysplasie of idiopatische trombocytopenische purpura

Auteur E.J. Houwerzijl

Trefwoorden apoptose, celdood, ITP, MDS, megakaryocyten

Samenvatting

Op 6 februari 2008 promoveerde dhr. drs. E.J. Houwerzijl aan de Rijksuniversiteit Groningen op het promotieonderzoek, getiteld 'Studies on megakaryopoiesis in patients with myelodysplasia (MDS) and idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)'. Hij deed dit onder begeleiding van de promotor dhr. prof. dr. E. Vellenga en de copromotors dhr. dr. J.Th.M. de Wolf en dhr. dr. J.J.L. van de

Want, Universitair Medisch Centrum Groningen. Het onderzoek richtte zich hoofdzakelijk op de onderliggende mechanismen van trombocytopenie bij ITP en MDS. Vooral de trombocytproductie en de morfologie van megakaryocyten werden bestudeerd. Hieronder volgt een samenvatting van zijn onderzoek.

(*Ned Tijdschr Hematol 2008;5:206-8*)

Inleiding

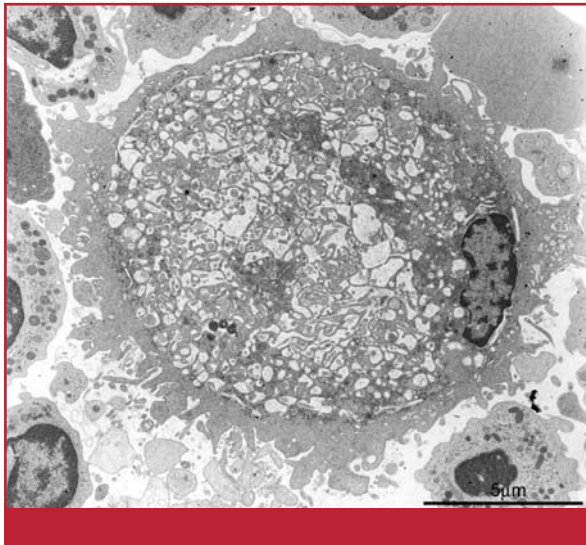
Idiopatische trombocytopenische purpura (ITP) werd tot voor kort in de meeste leerboeken omschreven als een ziekte die veroorzaakt werd door een autoantilichamemedieerde versterkte trombocytanafbraak, met als gevolg een compensatoir toegenomen trombopoëse. Meerdere studies, waaronder trombocytenuverlevingsstudies, suggereerden echter al dat de trombocytanaanmaak bij een groot deel van de ITP-patiënten normaal of verlaagd is.^{1,2} Slechts een minderheid vertoonde het klassieke beeld van een toegenomen trombocytproductie. Recentelijk werd aangetoond dat autoantilichamen van tweederde van de ITP-patiënten de in-vitroaanmaak en maturatie van megakaryocyten remmen.³ De mechanismen die ten grondslag liggen aan deze verstoorde megakaryopoëse, zijn in het promotieonderzoek onderzocht.

Het myelodysplastisch syndroom (MDS) omvat een groep van heterogene clonale stamcelaandoeningen die gekenmerkt worden door een ineffektieve en dysplastische hematopoëse, waardoor een belangrijk deel van de voorlopercellen nooit uitrijpt tot volwaardige bloedcellen. Hierdoor ontstaan er cytopenieën ondanks een vaak hypercellulair beenmerg. Trombo-

cytopenie komt bij MDS regelmatig voor en leidt vaak tot ernstige bloedingscomplicaties. Veel studies hebben aangetoond dat de ineffektieve hematopoëse bij vooral de laagrisicovormen van MDS wordt veroorzaakt doordat een belangrijk deel van de voorlopercellen vervroegd in apoptose gaan.⁴ Onderzoek heeft zich echter vooral gericht op erytroïde en myeloïde voorlopers. Studies naar MDS-megakaryocyten zijn door het relatief geringe aantal en de kwetsbaarheid van deze cellen schaars. Sommige auteurs konden bovendien geen premature apoptose in de megakaryocyten vaststellen of slechts in zeer beperkte mate.^{5,6} Daarnaast zijn er aanwijzingen dat MDS-trombocytenuitvoerders een afgenomen levensduur hebben.⁷ Om meer inzicht te krijgen in de mechanismen van trombocytopenie werden daarom de productie en de afbraak van trombocytenuitvoerders bij MDS-patiënten onderzocht.

ITP-megakaryocyten tonen kenmerken van vervroegde celdood

Megakaryocyten van 11 ITP-patiënten werden in detail onderzocht met elektronenmicroscopie en



Figuur 1. Elektronenmicroscopische opname van een para-apoptotische megakaryocyt van een patiënt met idiopathische trombocytopenische purpura. Het cytoplasma vertoont uitgebreide vacuolisatie ten gevolge van onder andere opgezwollen mitochondriën en een uitgezet demarcatiemembranensysteem.

immunohistochemie.⁸ Het grootste gedeelte (gemiddeld 78%) van alle megakaryocyten toonden uitgebreide morfologische afwijkingen die pasten bij apoptose en para-apoptose (zie *Figuur 1*). Para-apoptose is een vorm van niet-apoptotische celdood, waarbij vooral vacuolen en gezwollen mitochondriën in het cytoplasma worden gevormd. Typische eigenschappen van apoptose zoals uitgesproken condensatie van chromatine, vorming van apoptotische lichaampjes, en activering van caspases, enzymen die essentieel zijn voor de totstandkoming van apoptose, worden niet gezien. De rijpe megakaryocyten bleken het meest aangedaan ($84 \pm 16\%$ versus $37 \pm 37\%$ van de megakaryoblasten). Daardoor was het percentage rijpe megakaryocyten significant verlaagd en het percentage megakaryoblasten significant toegenomen bij ITP-patiënten. Het aantal megakaryocytaire voorlopers, de 'colony-forming units-megakaryocyte' (CFU-Mk), bleek echter niet verschillend van normaal beenmerg. Het grootste deel van de afwijkende megakaryocyten vertoonden kenmerken van para-apoptose. In 36% van de patiënten werden veel apoptotische megakaryocyten gevonden, maar alleen in het rijpe stadium. De gevonden afwijkingen in de megakaryocyten worden waarschijnlijk veroorzaakt door plasmafactoren, vermoedelijk de auto-antilichamen. Een belangrijk deel van de megakaryocyten die in aanwezigheid

van plasma van ITP-patiënten in vitro werden gekweekt vanuit normale CD34⁺-cellen, vertoonden namelijk soortgelijke morfologische, vooral para-apoptotische, afwijkingen. Daarnaast bleek dat het percentage afwijkende megakaryocyten sterk afnam tijdens een succesvolle behandeling met prednisolon en na intraveneuze immuunglobuline. Waarom zowel apoptose als para-apoptose worden gevonden in megakaryocyten van ITP-patiënten is onduidelijk. Wellicht heeft dit te maken met specifieke effecten van verschillende antilichamen. Een andere mogelijke verklaring is dat het toegenomen aantal apoptotische megakaryocyten een toename van de trombopoëse weerspiegelt bij een subgroep van ITP-patiënten. Megakaryocyten die trombocyten hebben geproduceerd gaan namelijk in apoptose.⁹ Een toename van apoptotische megakaryocyten kan daarom wijzen op een gestimuleerde trombopoëse.

MDS-megakaryocyten gaan te gronde aan caspase-3 onafhankelijke celdood

Bij patiënten met grotendeels laagrisico-MDS ($n=35$) zijn de aanmaak en de afbraak van trombocyten onderzocht.¹⁰ Onderzoek met radioactief gemerkte trombocyten toonde aan dat bij 50% van de MDS-patiënten de trombocytenoverlevingsduur is verkort. De trombocytenproductiesnelheid ('platelet production rate'; PPR) was verminderd bij 80% van de patiënten, ondanks dat het aantal megakaryocyten normaal of toegenomen was bij vrijwel alle patiënten, wat past bij het concept van ineffektieve hematopoëse. Plasmatrombopoëtin (TPO)-spiegels waren normaal en correleerden niet met de PPR. De glycolicine-index (GCI), een maat voor trombocyten- en/of megakaryocytenafbraak, bleek wel significant te zijn en negatief te correleren met de PPR. Aangezien er geen relatie was tussen de trombocytenoverlevingsduur en de GCI suggereert deze correlatie dat de trombocytenafgifte aan het bloed wordt verminderd door intramedullaire afbraak van trombocyten en/of megakaryocyten. Om te analyseren of deze afbraak in het beenmerg plaatsvindt, werden de megakaryocyten onderzocht op kenmerken van vervroegde celdood. Met elektronenmicroscopie werd geen toename van apoptose in MDS-megakaryocyten gevonden. Immunohistochemie dat gericht is op geactiveerde caspases in megakaryocyten was eveneens negatief. Wel werden nucleaire en cytoplasmatische afwijkingen gevonden die

pasten bij een vorm van niet-apoptotische necrose-achtige celdood. Het percentage megakaryocyten met deze afwijkingen was significant en negatief gecorreleerd met het trombocytentgetal.

Conclusie

Bij zowel MDS als ITP speelt naast een verhoogde afbraak, een verminderde aanmaak van bloedplaatjes een belangrijke rol in het ontstaan van de trombocytopenie. De experimenten tijdens het promotieonderzoek laten zien dat deze aanmaakstoornis bij beide aandoeningen mede veroorzaakt wordt door een versterkte mate van vroegtijdige celdood van megakaryocyten. Bij MDS speelt een caspase-3-onafhankelijke vorm van celdood zonder morfologische kenmerken van apoptose een rol. Bij ITP is er vooral sprake van para-apoptose. Welke mechanismen deze afwijkingen precies induceren is vooralsnog onduidelijk en onderwerp van verder onderzoek. Inherent aan de defecten op stamcelniveau die bij MDS bestaan, zullen intrinsieke afwijkingen van de megakaryocyten bij deze aandoeningen op de voorgrond staan. Externe factoren, zoals signalen vanuit het beenmergstroma zijn waarschijnlijk ook belangrijk. Bij ITP spelen de autoantilichamen een belangrijke rol.

Referenties

1. Stoll D, Cines DB, Aster RH, Murphy S. Platelet kinetics in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and moderate thrombocytopenia. *Blood* 1985;65:584-8.
2. Heyns A du P, Badenhorst PN, Lötter MG, Pieters H, Wesels P, Kotzé HF. Platelet turnover and kinetics in immune thrombocytopenic purpura: results with autologous ¹¹¹In-labeled platelets and homologous ⁵¹Cr-labeled platelets differ. *Blood* 1986;67:86-92.
3. McMillan R, Wang L, Tomer A, Nichol J, Pistillo J. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* 2004;103:1364-9.
4. Parker JE, Mufti GJ. The myelodysplastic syndromes: a matter of life or death. *Acta Haematol* 2004;111:78-99.
5. Bouscary D, De Vos J, Guesnu M, Jondeau K, Viguier F, Melle J,

et al. *Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia* 1997;11:839-45.

6. Li X, Pu Q. Megakaryocytopoiesis and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2005;46:387-91.

7. Bourgeois E, Caulier MT, Rose C, Dupriez B, Bauters F, Fenaux P. Role of splenectomy in the treatment of myelodysplastic syndromes with peripheral thrombocytopenia: a report on six cases. *Leukemia* 2001;15:950-3.

8. Houwerzijl EJ, Blom NR, Van der Want JJ, Esselink MT, Koornstra JJ, Smit JW, et al. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004;103:500-6.

9. De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, et al. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 2002;100:1310-7.

10. Houwerzijl EJ, Blom NR, Van der Want JJ, Louwes H, Esselink MT, Smit JW, et al. Increased peripheral platelet destruction and caspase-3-independent programmed cell death of bone marrow megakaryocytes in myelodysplastic patients. *Blood* 2005;105:3472-9.

Ontvangen 16 juni 2008, geaccepteerd 24 juni 2008.

Correspondentieadres

Dhr. dr. E.J. Houwerzijl, internist-vasculair geneeskundige

Universitair Medisch Centrum Groningen
Afdeling Interne Geneeskunde
Postbus 30001
9700 RB Groningen
Tel.: 050 361 61 61
E-mailadres: e.j.houwerzijl@int.umcg.nl

Belangenconflict: geen gemeld.
Financiële ondersteuning: het onderzoek werd financieel ondersteund door de Jan Kornelis de Cock Stichting en KWF Kankerbestrijding.