

7. Utermann G, Hee M, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man. *Nature* 1977; 269: 604-607.
8. Weisgraber KH, Newhouse YM, Mahley RW. Apolipoprotein E genotyping using the polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide probes. *Biochem Biophys Res Comm* 1988; 157: 1212-1217.
9. Wenham PR, Newton CR, Price WH. Analysis of apolipoprotein E genotypes by amplification refractory mutation system. *Clin Chem* 1991; 37: 241-244.
10. Aozaki R, Kawaguchi R, Ogasa U, Hikiji K, Kubo N, et al. Rapid identification of the common apo E isoform genotype using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Mol Cell Probes* 1994; 8: 51-54.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2005; 30: 282-284

Activatie van stolling tijdens hemodialyse is afhankelijk van de wijze van antistolling

P.C.M. BARTELS, M. SCHOORL en M. SCHOORL

Inleiding

Tijdens hemodialyse (HD) is er een intensief contact tussen het bloed van de patiënt en de membraan van de kunstnier. Het contact kan resulteren in activatie van trombocyten en het genereren van trombine (1). Ten gevolge van obstructies in het dialysesysteem en veranderingen in de wand van het kunstnierzmembraan wordt de efficiëntie van HD beperkt. De mate van activatie van het stollingssysteem is afhankelijk van het type en de permeabiliteit van het kunstnierzmembraan. In vergelijking met polysulfon(PS)-'high-flux'- en celluloseetriacetaat(CT)-membranen induceren cuprofaan(CU)- en polyacrylnitril(AN69)-kunstnierzmembranen aanzienlijk meer activatie (2-4). Om activatie van stolling in het extracorporele circuit te voorkomen wordt heparine of 'low-molecular-weight heparin' (LMWH) toegediend. Applicatie van heparine en LMWH beperkt trombocytenaggregatie. De werking van antitrombine III wordt gepotentieerd en reeds gevormd trombine wordt geneutraliseerd, waardoor het ontstaan van een fibrinestolsel wordt tegengegaan. Als alternatief voor blootstelling aan heparine of LMWH is HD m.b.v. citraat een elegante wijze van antistolling. Lokale toepassing van antistolling m.b.v. citraat is voor wat betreft filtratie van elektrolyten en schadelijke stoffen even effectief gebleken als gebruik van heparine of LMWH (5). De complexe procedure voor toediening resulteert echter snel in verstoring van het elektrolyten- en zuurbas-evenwicht.

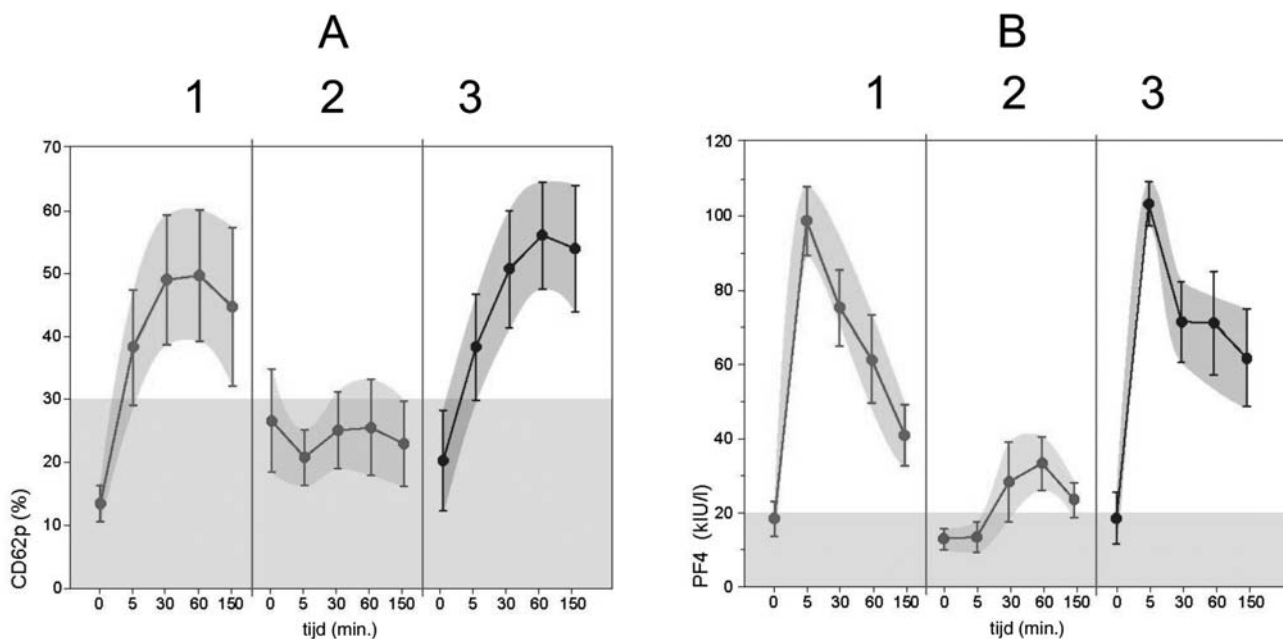
In dit onderzoek wordt bepaald of de wijze van antistolling invloed heeft op de activatie van trombocyten en stollingsfactoren. CD62p en plaatjesfactor 4 (PF4) komen na stimulatie vrij uit α -granulae van trombo-

cyten. CD62p komt als gevolg van activatie tot expressie op het membraan van de trombocyt. PF4 komt in dergelijke omstandigheden in toenemende mate voor in plasma. Daarnaast wordt activatie van stolling aan de hand van vorming van trombine-antitrombine-III-complexen aangetoond. Glycoproteïne V is een subunit van het trombocyten-GP1b-V-IX-complex. Door binding aan von-Willebrand-factor fungeert het GP-1b-V-IX-complex als mediator bij adhesie van trombocyten aan het subendotheel van de vaatwand. Na activatie van trombine wordt 'soluble' glycoproteïne V (sGPV) afgesplitst van glycoproteïne V (6). Protrombinefragment 1 en 2 (F1+2) wordt afgesplitst van protrombine in geval van verhoogde FXa-activiteit.

Patiënten en methoden

Acht patiënten (20-80 jaar) zijn gedurende 3 weken gedialyseerd op een 'high flux' polysulfon-F-60-membraan. Achtereenvolgens wordt heparine (2000-3500 IU bolusinjectie + continue 1000 IU/uur), LMWH (Fragmin®, 2000-5000 U bolusinjectie) en trinitriumcitraat (continue applicatie) als antistollingsmiddel gebruikt. Exclusiecriteria voor patiënten aan de studie betreffen het gebruik van salicylaten, warfarine, dipyridamol of andere preparaten die de trombocytenfunctie beïnvloeden (Persantin®). Bij elke derde sessie zijn tijdens de HD-behandeling bloedmonsters afgenomen uit de arteriële lijn op t = 0 en vervolgens uit de efferente lijn op t = 5, 30, 60 en 150 minuten. Bloedmonsters zijn afgenomen in Vacutainer-buizen met K₂EDTA, 0,105 M natriumcitraat en CTAD (Becton Dickinson, Plymouth, UK). Expressie van CD62p is bepaald m.b.v. een flowcytometer (Beckman Coulter, Mijdrecht, Nederland). Met behulp van ELISA methoden zijn zowel TAT en F1+2 (Enzygnost®, Dade Behring, Marburg, Duitsland) als PF4 en sGPV (Asserachrom®, Diagnostica Stago, Asnières, Frankrijk) bepaald.

Laboratorium voor Klinische Chemie, Hematologie & Immunologie, Medisch Centrum Alkmaar



Figuur 1. Activatie van trombocyten bij toepassing van verschillende anticoagulantia op $t = 0, 5, 30, 60,$ en 150 minuten na aanvang van hemodialyse. A: % CD62-positieve trombocyten. B: concentratie PF4 ($X_{\text{gem}} \pm \text{SEM}$). Anticoagulantia: 1. Fragmin®, 2. citraat, 3. heparine.

Dialyseprotocol

HD is uitgevoerd met behulp van een polysulfon®-membraan F-60 (Fresenius, Bad Homburg, Duitsland) en het biBAG 'high flux dialyser system' (Fresenius, Bad Homburg, Duitsland). Bloedstroomsnelheden varieerden van $20 - 250$ ml/min., terwijl ultrafiltratiesnelheden varieerden van $300-1000$ ml/min. De HD-sessie duurde $3-4$ uur afhankelijk van de patiëntenbehoefte en de effectiviteit van de behandeling.

Statistische evaluatie

Statistische evaluatie is uitgevoerd m.b.v. enkelvoudige variantieanalyse ('one-way'-ANOVA) en Student's t-test voor gepaarde resultaten (SPSS software 10.0 Windows).

Resultaten

Tijdens citraatdialyse vindt geen significante toename plaats van het percentage CD62-positieve trombocyten en de concentratie PF4 in plasma (figuur 1). Bij gebruik van heparine en LMWH stijgt het percentage CD62p-positieve trombocyten voor beide anticoagulantia op analoge wijze van $20 \pm 10\%$ op $t = 0$ naar $40 \pm 12\%$ op $t = 5$ en $50 \pm 10\%$ op $t = 30$ minuten ($X_{\text{gem}} \pm \text{SEM}$). De PF4-concentratie in plasma stijgt van 20 ± 5 op $t = 0$ naar 100 ± 10 kIU/l op $t = 5$ minuten. In een later stadium daalt de concentratie PF4 tot een niveau van 50 ± 12 kIU/l op $t = 150$ minuten (figuur 1). De plasmaconcentratie protrombine F1+2 is reeds bij aanvang van de hemodialyse ($t = 0$) verhoogd ($3,3 \pm 0,5$ nmol/l). Het niveau blijft tijdens HD vrijwel constant. De concentratie TAT stijgt bij applicatie van de drie anticoagulantia van $4,5 \pm 0,5$ $\mu\text{g/l}$ op $t = 0$ naar $8,5 \pm \mu\text{g/l}$ op $t = 150$ minuten. De concentratie sGPV stijgt van 48 ± 16 kIU/l op $t = 0$ naar

60 ± 20 kIU/l op $t = 150$ minuten (tabel 1). De concentratie protrombine F1+2 in plasma geeft een indicatie omtrent op langere termijn gegenereerd trombine. De concentraties van TAT en sGPV reflecteren het korte termijn effect op activatie van stolling tijdens HD. Een verhoogde concentratie F1+2 op $t = 0$ wijst op aanwezigheid van een verhoogde stollingsneiging als gevolg van niet aflatende activatie van de stolling tijdens de voorafgaande HD-behandelingen.

Discussie en conclusie

Biocompatibiliteit van kunstnierenmembranen wordt o.a. bepaald door evaluatie van de mate van activatie van stolling. Activatie van stolling kan worden beperkt door de aard en dosering van anticoagulantia in de tijd optimaal af te stemmen op de sterke verstoring van de stollingsbalans die optreedt tijdens de hemodialyse behandeling. De resultaten van het huidige onderzoek verschaffen een nauwkeurige registratie omtrent het verloop van activatie van stolling in de loop van de tijd. Piekvorming is vastgesteld in de beginfase van de hemodialyse. De piekvorming wordt drastisch gereduceerd door applicatie van citraat. De werking van citraat is gebaseerd op beperking van de release van myeloperoxidase uit intracellulaire granulae van polymorfonucleaire cellen. Applicatie van heparine of LMWH resulteert in een vergelijkbaar effect op de snelheid en de mate van trombocytenactivatie. Het patroon van toename van TAT, F1+2 en sGPV is identiek. Er is duidelijk sprake van een activatie piek onmiddellijk na start van HD. In het geval van HD worden beide anticoagulantia als gelijkwaardig beschouwd.

Aanvullende studies zijn nodig om de gesignaleerde discrepanties bij activatie van trombocyten en stollingsproducten in plasma te onderzoeken.

Tabel 1. Parameters voor activatie van stolling bij toepassing van verschillende anticoagulantia ($X_{gem} \pm SEM$) op t = 0, 5, 30, 60 en 150 minuten na aanvang van hemodialyse

	Tijd na HD (min)	Heparine		Fragmin		Citraat	
		X_{gem}	SEM	X_{gem}	SEM	X_{gem}	SEM
TAT ($\mu\text{g/l}$)	0	5,7	0,4	5,7	0,7	4,3	0,6
	5	4,7	1,4	4,7	0,4	4,2	0,5
	30	6,0	0,4	6,0	0,3	6,6	0,9
	60	6,9	0,6	6,9	0,6	8,1	1,3
	150	7,8	1,1	7,8	1,0	9,3	1,6
F1+2 (nmol/l)	0	3,7	0,7	3,7	0,7	2,9	0,4
	5	3,5	0,6	3,5	0,9	2,9	0,5
	30	3,0	0,7	3,0	0,6	2,9	0,5
	60	3,2	0,5	3,2	0,8	3,3	0,6
	150	2,9	0,5	2,9	0,6	3,5	0,6
SGP-V (IU/ml)	0	52	6	46	7	47	6
	5	49	5	47	7	48	6
	30	51	6	61	11	51	9
	60	55	6	58	12	52	5
	150	55	6	60	9	58	9

NS = niet significant; TAT = trombine-antithrombine-III-complex; F1+2 = protrombinefragment 1+2; sGPV = 'soluble' glycoprotein V; HD = hemodialyse. Verschillen tussen anticoagulantia waren alle niet statistisch significant.

Literatuur

1. Opatrny K Jr, Bouda M, Kohoutkova L, Sefrna F. A clinical study to assess the effect of heparin in dialyser rinsing solutions. *Int J Artificial Organs* 1997; 20: 112-118.
2. Bartels PCM, Schoorl M, Schoorl M, Nubé MJ. Deviation in coagulation activation due to treatment with different haemodialysis membranes. *Scand J Clin Lab Invest* 2003; 63: 417-424.
3. Sirolli V, Ballone E, Di Stante S, Amoros L, Bonomini M. Cell activation and cellular-cellular interactions during hemodialysis: Effect of dialyzer membrane. *Int J Artif Organs* 2002; 25: 529-537.
4. Kuragano T, Kuno T, Takahashi Y, Yamamoto C, Nagura Y et al. Comparison of the effects of cellulose triacetate and polysulfone membrane on GPIIb/IIIa and platelet activation. *Blood Purif* 2003; 21: 176-182.
5. Apsner R, Buchmayer H, Lang T, Unver B, Speiser W, Suner-Plassmann G, Hörl WH. Simplified citrate anticoagulation for high-flux hemodialysis. *Am J Kid Dis* 2001; 38: 979-987.
6. Moog S, Mangin P, Nadège L, et al. Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. *Blood* 2001; 98: 1038-1046.