

Samenvatting en beschouwing

Het verband tussen bloedplaatjesactiviteit en atherotrombose, in het bijzonder bij postmenopauzale vrouwen die hormoonsubstitutie gebruiken en bij patiënten met nierziekten

Uitwerking

De vraag wat het verband is tussen bloedplaatjesactiviteit en atherotrombose kan op ten minste twee manieren worden bekeken. In de eerste plaats is er de vraag naar het *mechanistische* aspect. Er is een grote verscheidenheid aan mogelijke interacties tussen humorale en cellulaire (waaronder bloedplaatjes) componenten die van belang zijn voor het ontstaan en de progressie van atherotrombose. Bloedplaatjes zelf zijn niet allen identiek aan elkaar, ook niet in één patiënt. En zelfs beïnvloeding van megakaryocyten in het beenmerg kan leiden tot veranderde bloedplaatjesfuncties. Naast hun zelfstandige bijdrage aan het ontstaan, de progressie en de complicaties van een atherosclerotische plaque, is het derhalve ook denkbaar dat er een ziektebevorderende interactie is tussen bloedplaatjes en andere risicofactoren voor atherotrombose, zoals hypertensie, hypercholesterolemie of roken. De tweede manier waarop deze vraag kan worden gesteld, betreft het *kwantitatieve* aspect. Als bloedplaatjes dan betrokken zijn bij de progressie van atherotrombosegerelateerde aandoeningen, in welke mate dan? Anders gezegd, als circulerende plaatjes nu bijvoorbeeld gemiddeld x% veranderen ('actiever worden') met hoeveel procent verandert dan het risico op genoemde ziekten? Beide vragen zijn van belang voor de verdere ontwikkeling van rationele bloedplaatjesgerichte behandelingsstrategieën die als doel hebben het voorkomen van atherotrombosegerelateerde aandoeningen. Er zijn vele manieren om de functie van bloedplaatjes te beïnvloeden (ander dan de al bekende aspirine). Vele daarvan zijn nog in ontwikkeling, en combinaties zijn nog niet of nauwelijks onderzocht¹⁻⁵. Rationeel ontworpen klinische experimenten zijn vervolgens nodig om het uiteindelijke effect van dergelijke behandelstrategieën te evalueren.

Het beste onderzoek

Het is alleen al om praktische redenen onmogelijk deze vragen definitief te beantwoorden met behulp van een groot opgezet cohortonderzoek gevolgd door enkele klinische onderzoeken zonder verkenning vooraf met behulp van kleinschaliger onderzoek. De totnogtoe bekende pathogenese van atherotrombose is daarvoor zowel met betrekking tot verschillende complicaties als in verschillende patiëntengroepen te divers, en het tijdsverloop tussen begin van de lesie en het optreden van complicaties te lang. Om die reden is het nuttig om verkennend onderzoek te doen in juist die patiëntengroepen die een hoog of juist een laag, of een door een interventie veranderd risico hebben op het ontstaan van atherotrombosegerelateerde ziekten. In dit proefschrift hebben we ons gericht op twee van zulke groepen: postmenopauzale vrouwen die hormonale substitutietherapie gebruiken en mensen met eindstadium- of juist milde

nierinsufficiëntie. Hebben we – deels achteraf gezien – dat onderzoek wel goed uitgevoerd?

De beste manier om het verband tussen plaatjesactiviteit en atherotrombose bij deze groepen te onderzoeken is het volgen van een groot cohort, met een lange follow-up tijd, waarbij juist zij die al manifest vaatlijden hebben van deelname worden uitgesloten⁶. Om de interne validiteit te vergroten zouden deelnemers met betrekking tot andere variabelen die van belang zijn voor het ontstaan van cardiovasculaire ziekten 'hetzelfde' moeten zijn (lipidenspectrum, bloeddruk, geslacht, bevolkingsgroep, leeftijd enzovoorts). Deze eis is minder van belang als het cohort groot genoeg is om (vooraf gedefinieerde) subgroep analyses te verrichten. Bij aanvang van dit onderzoek zou dan bloedplaatjesactiviteit moeten worden gemeten. Omdat er vele manieren zijn om bloedplaatjesfunctie meten, die deels verschillende aspecten van de bloedplaatjesfysiologie in kaart brengen, zouden verschillende tests simultaan moeten worden verricht. Alle andere (hemostatische en nonhemostatische) factoren die van belang zijn voor de pathogenese van atherotrombose moeten zo nauwkeurig mogelijk worden gemeten, om het verband tussen deze factoren en plaatjesfunctie enerzijds en atherotrombose anderzijds zo precies mogelijk in kaart te brengen. Vrijwel alle parameters moeten herhaaldelijk worden gemeten, in de eerste plaats om te zien of er in de loop van de tijd wellicht compensatoire mechanismen tussen te verschillende pathogenetische routes optreden, en in de tweede plaats om 'regression dilution' bias te vermijden⁷. De relevante klinische eindpunten die in dit cohort-onderzoek moeten worden onderzocht zijn bij voorbeeld 'acuut coronair syndroom', 'ischemische cerebrovasculaire ziekten' of 'perifeer arterieel vaatlijden'.

Als uit dit onderzoek naar voren is gekomen bij welke patiëntengroepen op welke wijze en in welke mate bloedplaatjesactivatie een rol heeft gespeeld in het ontstaan van atherosclerotische ziekten, dan is het tijd om klinisch onderzoek naar het effect van verschillende typen trombocytbeïnvloeding op de incidentie van hart- en vaatziekten te ontwerpen. Verschillende plaatjesremmers, maar ook verschillende doseringen of doseringsregimes zouden op die wijze in die patiëntencategorieën onder de loep genomen moeten worden. Wellicht speelt het meten van het effect van deze medicatie op de functie van bloedplaatjes in zo'n klinisch onderzoek ook een rol, om patiënten een op maat gesneden bloedplaatjesremmersregime voor te schrijven^{8,9}. Ook van deze studies moeten klinisch relevante eindpunten het studiedoel zijn; veranderde plaatjesfunctie of surrogaateindpunten (intimamediadikte), kunnen op dit moment de klinische eindpunten nog niet vervangen.

In hoeverre hebben wij ideaal onderzoek uitgevoerd?

Het behoeft geen commentaar dat het vrijwel onmogelijk is om dergelijk onderzoek achtereenvolgens en zonder vooronderzoek binnen het bestek van een proefschrift te verrichten. Derhalve trachtten we onderzoek te doen naar deelvragen die aan genoemde hoofdvraag zijn te ontleen, en die dus kunnen worden beschouwd als 'vooronderzoek'. Een deel van de veelheid aan bloedplaatjesfunctietesten brachten we in hoofdstuk 2A in kaart met als belangrijkste vraag: voorspellen deze testen in prospectief cohortonderzoek het optreden van 'acuut coronair syndroom', 'ischemische cerebrovasculaire ziekten' of 'perifeer arterieel vaatlijden'? Het bleek dat fluorescentiecytometrie - tot dusverre niet zo veelvuldig onderzocht - met betrekking tot deze vraag daartoe in de meerderheid der gevallen in staat was. We kozen daarom deze bepalingmethode, maar het ware wellicht beter geweest om ook andere bloedplaatjesfunctietesten in ons onderzoek mee te nemen. In de eerste

plaats om ze aan elkaar te relateren en in de tweede plaats omdat bekend is dat verschillende bloedplaatjesfunctietesten verschillende bloedplaatjesfuncties in kaart brengen.

We trachtten het effect van oestrogeen- en progestageengebruik (HRT) op bloedplaatjesactiviteit te onderzoeken. Dat kan het best met een dubbelblind, gerandomiseerd, placebogecontroleerd onderzoek. Zulk onderzoek verrichtten we, maar een grotere deelnemersgroep en een langere follow-upperiode hadden wellicht preciezer informatie opgeleverd. Overigens is het niet goed mogelijk om een veel langere follow-upperiode uit te voeren in het geval van vergelijken van placebo- en oestrogeengebruik. De klinische betekenis van de gevonden verschillen in bloedplaatjesactiviteit (bijvoorbeeld x% toename van plaatjesactiviteit gaat gepaard met y% toename in cardiovasculair risico) is niet goed bekend - zeker niet in het geval van gezonde postmenopauzale vrouwen. Hieruit volgt dat nog onderzocht moet worden hoe de gevonden verschillen in trombocytactiviteit kunnen worden vertaald in klinisch-relevante uitkomsten. Wellicht draagt ons onderzoek bij aan het opzetten van dergelijk onderzoek. De hypothese dat HRT via trombocytactivatie bijdraagt aan atherotrombose verdient, mede op grond van ons onderzoek, aandacht.

We onderzochten of biocompatibele en bioincompatibele hemodialysemembranen verschillend zijn met betrekking tot bloedplaatjesactivatie bij patiënten met terminaal nierfalen (hoofdstuk 4). Het ware beter geweest een grotere populatie te hebben onderzocht met een twee-armig, niet-kruislings ontwerp. De follow-upduur had langer moeten zijn en we hadden een meer gestandaardiseerd bloedafnametijdschema moeten volgen, met zo mogelijk verscheidene bloedafnames tijdens één dialysesessie. Daarnaast hadden we, om niet alleen het effect van de dialysemembraan, maar ook die van andere onderdelen van het extracorporele circuit te evalueren ook op verschillende punten in dat circuit monsters moeten nemen^{10;11}. De onderzochte groep hemodialysepatiënten was zeer heterogeen met betrekking tot de oorzaak van de nierinsufficiëntie en de aanwezigheid van (risicofactoren voor) hart- en vaatziekten en de populatie was natuurlijk veel te klein om over subgroepen uitspraken te kunnen doen. Niettemin draagt het onderzoek bij aan de notie dat ook bloedplaatjesactiviteit (naast complementactiviteit) een parameter van belang zou kunnen zijn in de evaluatie van biocompatibiliteit, en het daaruit verondersteld voortvloeiende effect op het cardiovasculaire risico bij patiënten met terminaal nierfalen.

Het is niet mogelijk om aan het hoofdstuk over het verband tussen een milde nierfunctiestoornis en bloedplaatjesactiviteit conclusies te verbinden met betrekking tot de causaliteit van dit verband (hoofdstuk 5). Het betreft hier immers een transversaal onderzoek, waarbij beide parameters gelijktijdig zijn gemeten. Wel kan de grootte van het verband op grond van dit onderzoek worden geschat, en dat kan van belang zijn voor het opzetten van een prospectief cohort-onderzoek waarin het tijdsverband tussen bloedplaatjesactiviteit en nierinsufficiëntie beter in kaart kan worden gebracht. In ons cohort van patiënten met een milde nierfunctiestoornis onderzochten we vervolgens, gerandomiseerd en placebogecontroleerd, het effect van een medicamenteus therapeutisch regime dat gericht is op het verminderen van oxidatieve stress (middels cholesterolverlaging, homocysteïneverlaging en vitamine E, hoofdstuk 6). In de behandelgroep vonden we ten opzichte van de placebogroep mogelijk een vermindering van lysosomale degranulatie in circulerende bloedplaatjes gedurende een follow-up van 2 jaar. Of het effect van de medicamenteuze interventie een *specifiek* effect op lysosomale degranulatie is, valt niet met zekerheid te zeggen.

Immers, de groep was wellicht te klein om statistisch significante verschillen in de andere bloedplaatjesactiviteitsparameters te detecteren. Eveneens is het door de onderzoeksopzet niet goed uit te maken welk element uit de behandelingsstrategie nu eigenlijk verantwoordelijk moet worden geacht voor het effect. Dat vereist immers een grotere onderzoeksgroep en een meerarmige randomisering waarin de verschillende elementen van de behandelstrategieën geïsoleerd en in verschillende combinaties met elkaar en met placebo worden vergeleken. De klinische betekenis van het gevonden verschil in lysosomale degranulatie is – weer door gebrek aan prospectieve gegevens – niet duidelijk.

Conclusie en implicaties

Uit het beschreven onderzoek kan een aantal conclusies met betrekking tot het verband tussen bloedplaatjesactiviteit en atherotrombose worden getrokken.

In de eerste plaats is het noodzakelijk dat bloedplaatjesactiviteitstesten verder worden ontwikkeld en gestandaardiseerd. Vooral de tests gebaseerd op kant-en-klare cartridges en flowcytometrie zijn goede kandidaten voor verdere ontwikkeling. Vervolgens is het noodzakelijk dat er prospectief cohortonderzoek wordt gedaan met behulp van deze tests met als eindpunten manifeste cardiovasculaire ziekte. Ten tweede kan – blijkens ons onderzoek – een deel van het verhoogde cardiovasculaire risico bij postmenopauzale vrouwen die gecombineerde hormoonsubstitutie gebruiken wellicht worden verklaard door het effect van deze hormonen op bloedplaatjesactiviteit. In de derde plaats is het aannemelijk dat er verschillen zijn tussen verschillende dialysemembranen met betrekking tot hun effect op bloedplaatjesactivatie. Daarbij is het niet vanzelfsprekend dat gebruik van een dialysemembraan die aanleiding geeft tot weinig complementactivatie ook met minder bloedplaatjesactivatie gepaard gaat. Ten vierde is er een verband tussen milde nierinsufficiëntie en activiteit van circulerende bloedplaatjes. Tenslotte zou een behandelingsstrategie gericht op het verminderen van oxidatieve stress bij patiënten met milde nierinsufficiëntie een remmend effect op bloedplaatjesactivatie kunnen hebben.

Wat is in de toekomst wenselijk als er geen belemmeringen zouden zijn op het gebied van tijd, geld, techniek en menskracht? Ten eerste een groot prospectief cohortonderzoek om klinische consequenties te kunnen verbinden aan de uitslag van bloedplaatjestesten. Met behulp van op deze wijze gevalideerde bloedplaatjesactiviteitstesten kunnen nieuwe therapieën (bij voorbeeld met betrekking tot hormonale substitutie, maar ook nieuw te ontwikkelen dialysemembranen) worden onderzocht. Wellicht opent dat de weg naar een meer op maat gesneden plaatjesremmingstherapie (met betrekking tot medicatieklasse, dosering en doseringsinterval).

Referenties

1. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *B.M.J.* 324:71-86, 2002
2. Tetik S, Demiralp EE, Yardimci KT: Effect of imatinib mesylate on platelet aggregation and fibrinogen binding to isolated platelets. *Adv.Mol.Med.* 1:165-170, 2005

3. Winn RK, Liggitt D, Vedder NB, Paulson JC, Harlan JM: Anti-P-selectin monoclonal antibody attenuates reperfusion injury to the rabbit ear. *J.Clin.Invest.* 92:2042-2047, 1993
4. Appeldoorn CC, Bonnefoy A, Lutters BC, Daenens K, van Berkel TJ, Hoylaerts MF, Biessen EA: Gallic acid antagonizes P-selectin-mediated platelet-leukocyte interactions: implications for the French paradox. *Circulation* 111:106-112, 2005
5. Theoret JF, Chahrour W, Yacoub D, Merhi Y: Recombinant P-selectin glycoprotein-ligand-1 delays thrombin-induced platelet aggregation: a new role for P-selectin in early aggregation. *Br.J.Pharmacol.* 148:299-305, 2006
6. Rothman KJ, Greenland S: *Modern epidemiology*, 2nd edn. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1998
7. Clarke R, Shipley M, Lewington S, Youngman L, Collins R, Marmot M, Peto R: Underestimation of risk associations due to regression dilution in long-term follow-up of prospective studies. *Am.J.Epidemiol.* 150:341-353, 1999
8. Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Huisman MV: Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch.Intern.Med.* 167:1593-1599, 2007
9. Sofi F, Marcucci R, Gori AM, Abbate R, Gensini GF: Residual platelet reactivity on aspirin therapy and recurrent cardiovascular events--a meta-analysis. *Int.J.Cardiol.* 128:166-171, 2008
10. Grooteman MP, Nube MJ: Impact of the type of dialyser on the clinical outcome in chronic haemodialysis patients: does it really matter? *Nephrol.Dial.Transplant.* 19:2965-2970, 2004
11. Borgdorff P, Tangelder GJ: Pump-induced platelet aggregation with subsequent hypotension: Its mechanism and prevention with clopidogrel. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 131:813-821, 2006