

In dit proefschrift worden enige aspecten van de diagnostiek en behandeling van idiopathische thrombocytopenische purpura (ITP) onder de loep genomen.

Hoofdstuk I is een algemene inleiding op het onderwerp, waarin een kort overzicht wordt gepresenteerd van de huidige inzichten ten aanzien van diagnose en therapie van ITP. ITP wordt in het algemeen tot de autoimmuunziekten gerekend. Daarom zijn er voor de diagnostiek van ITP een groot aantal testen ontwikkeld, waarmee de hoeveelheid plaatjes (=thrombocyten)-geassocieerde immunoglobulinen wordt gemeten. De meeste van deze testen registreren slechts plaatjes-geassocieerd IgG (PA-IgG). Deze testen verschillen onderling aanzienlijk zowel in normaalwaarden van donorthrombocyten als in waarden gemeten bij thrombocytopenische patiënten.

In Hoofdstuk II worden de resultaten van een onderzoek beschreven naar enige variabelen, welke van invloed zijn op de bepaling van PA-IgG. De gemiddelde PA-IgG waarde van normale donorthrombocyten bleek, getest in een recent ontwikkelde radioimmunoassay, te dalen wanneer de thrombocyten eerst een tijd in EDTA buffer werden bewaard of wanneer zij voor de bepaling waren gefixeerd met paraformaldehyde (PFA). Tegelijkertijd met deze daling bleek het modale plaatjesvolume in grootte toe te nemen. De mogelijke oorzaak van deze daling van PA-IgG zou het vrijkomen van plasma IgG uit het zg. 'surface-connected canalicular system' kunnen zijn, wat tengevolge van de zwelling van de thrombocyt onder invloed van het EDTA of PFA in het thrombocytenoppervlak wordt opgenomen. Indien men PA-IgG direct na thrombocytenbereiding zonder PFA fixatie meet, dan vindt deze uitstoting van IgG in het incubatiemedium plaats met als gevolg dat een grotere hoeveelheid IgG gemeten wordt en dientengevolge een hogere PA-IgG waarde. Met deze radioimmunoassay bleek het goed mogelijk om hoeveelheden thrombocytgebonden alloantistoffen te meten. Verder bleek de aanwezigheid van fragmenten van thrombocyten of andere celtypen in de te testen monsters een aspecifiek verhoogde PA-IgG waarde te kunnen veroorzaken.

In Hoofdstuk III wordt een onderzoek beschreven naar de sensitiviteit en specificiteit van de immunofluorescentie test op thrombocyten (PIFT) voor de diagnose ITP. De sensitiviteit voor ITP bleek hoog, de specificiteit laag te zijn. Deze lage specificiteit was niet alleen het gevolg van

een frequente coincidentie van autoimmuun thrombocytopenie met andere ziekten, maar ook van het frequent voorkomen van zg. EDTA- en/of PFA-afhankelijke antistoffen.

Sensitiviteit en specificiteit van de radioimmunoassay ter bepaling van PA-IgG bleken in dezelfde orde van grootte te liggen als die van de PIFT (Hoofdstuk IV). Er bleek een significante correlatie tussen de gemiddelde hoeveelheid PA-IgG en de hoogte van de PIFT-scores met anti-IgG te bestaan. Er werden vaker afwijkende grootte-verdelingen van de thrombocytenpopulatie gevonden bij patiënten met een verhoogde PA-IgG, wat zou kunnen wijzen op een invloed van thrombocytenfragmenten op de PA-IgG bepaling. Daarnaast werden er vaker IgM antistoffen aangetoond bij patiënten met een verhoogde PA-IgG waarde bij een negatieve PIFT met anti-IgG. Dit zou kunnen wijzen op beïnvloeding van de PA-IgG bepaling door hetzij *in-vitro* thrombocyten-agglutinatie geïnduceerd door IgM antistoffen, hetzij de aanwezigheid van thrombocytenfragmenten ontstaan tengevolge van IgM antistoffen-gemedieerde thrombocytendestructie *in vivo*.

In Hoofdstuk V wordt het bestaan van fragmentaire thrombocyten in plaatjes-rijk plasma van thrombocytopenische patiënten aangetoond met behulp van een radioimmunoassay waarmee thrombocyten en thrombocytenfragmenten kunnen worden gedetecteerd middels een sandwich van twee monoclonale antistoffen, welke gericht zijn tegen het thrombocyt-specifieke glycoproteïne IIb-IIIa complex (GP IIb-IIIa). Scheiding van thrombocyten en thrombocytenfragmenten werd verkregen door gebruik te maken van een discontinue albumine gradiënt (7.5-20%, v/v).

Met behulp van de in Hoofdstuk V beschreven techniek bleek het mogelijk in erythrocytenconcentraten contaminatie met thrombocyten vast te stellen (Hoofdstuk VI). Hierbij bleek deze techniek erg gevoelig ten opzichte van metingen met een elektronische deeltjesteller. Tevens bleek er tijdens de bereiding van een erythrocytenconcentraat fragmentatie van thrombocyten op te treden. Dit kan van belang zijn voor de bereiding van erythrocytenconcentraten, omdat ongewenste immunisatie kan optreden tengevolge van transfusie met een dergelijk product, met name wanneer naast fragmentatie van thrombocyten ook fragmentatie van leukocyten zou optreden gedurende de bereiding van het leukocyt-arme erythrocytenconcentraat.

In Hoofdstuk VII staan de resultaten beschreven van een onderzoek naar

thrombocyt-specifieke antigenen. Hierbij werd gebruik gemaakt van een immunoblotting techniek, waarmee het mogelijk is specifieke binding van antistoffen aan een bepaald eiwit te visualiseren. Met name blijkt dit goed mogelijk te zijn voor het bepalen van de antigeniciteit van bepaalde trombocyten alloantistoffen. Daardoor is deze techniek uitermate geschikt om specificiteit te bepalen van alloantisera welke serologisch moeilijk typeerbaar blijken.

Van de 24 geteste autoantisera bleken er maar twee in de immunoblot te reageren. Bovendien bleek geen enkel eluaat gemaakt van ITP trombocyten (welke alle een sterk positieve reactie in de PIPT vertoonden) te reageren in de immunoblot. Vijf van deze eluaten bleken wel in een immunoprecipitatie techniek GP IIb-IIIa te kunnen precipiteren, wat zou kunnen wijzen op een verlies van de antigene determinant tijdens de immunoblot procedure, waarbij een specifieke conformatie verloren kan zijn gegaan. De reactiviteit in de immunoblot techniek bleek in dit onderzoek erg afhankelijk van omstandigheden vóór en tijdens de bereiding van het trombocyten-solubili-zaat (aanwezigheid van EDTA en N-ethylmaleamide; koude-activatie van trombocyten).

In Hoofdstuk VIII worden de resultaten van behandeling van ITP met het CLB-immunoglobulinepreparaat beschreven. Er werd een -veelal tijdelijke- stijging van het trombocytenaantal gezien bij ongeveer 75% van de ITP patiënten. Er bleek geen relatie te bestaan tussen de sterkte van de PIPT of een positieve Clq-binding test vóór infusie en de respons op gammaglobuline therapie. Splenectomie in het verleden bleek evenmin de voorspelbaarheid van een gunstige reactie op gammaglobuline therapie te vergroten.