



UZ  
LEUVEN



# Evaluatie van trombocytengranulen in het laboratorium

Lien Gruwier

Supervisor: Prof. Dr. Marc Jacquemin

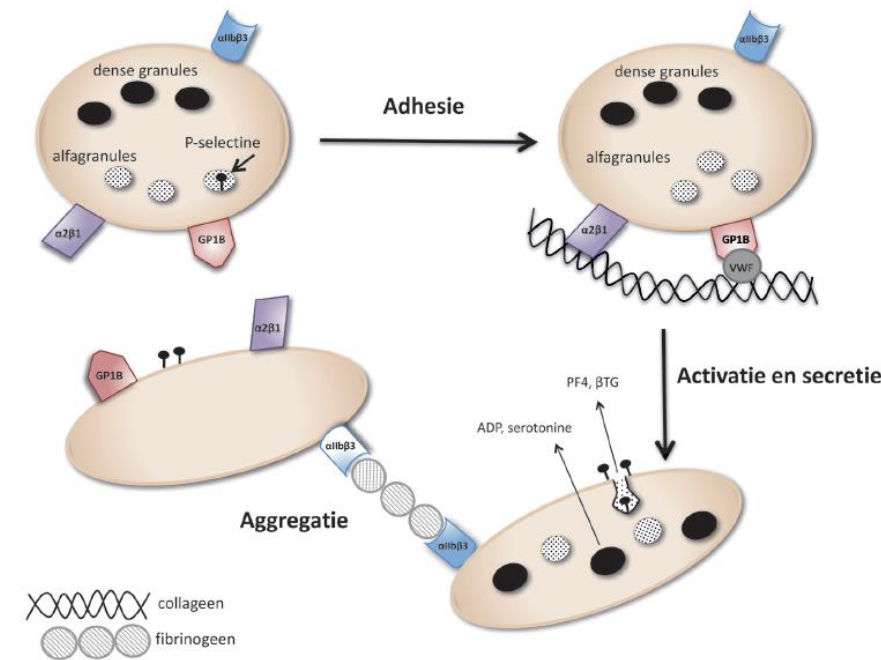
01/06/2021



- Introductie
  - Trombocytengranulen
  - IPFDs en IPSDs
  - Diagnostiek van IPSDs
- Onderzoeksvragen
- Appraisal
  - Deel 1: Literatuurnazicht
  - Deel 2 – 4: Optimalisatie in ons laboratorium
- Acties / To Do

# Introductie: trombocytengranulen

- Trombocyten:  
kernloze celfragmenten > megakaryocyten
- Primaire hemostase:  
adhesie → activatie → vorming plaatjesaggregaten
- Exocytose van plaatjesgranulen  
> normale aanmaak en transport van granulen  
> normale activatie-pathway:  
signaal voor secretie van de granule-inhoud



# Introductie: trombocytengranulen

- 3 types van granulen
  - dense granulen ( $\delta$ -granulen):  
serotonine, ADP, ATP,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  en fosfaten  
→ verdere activatie en rekrutering van circulerende trombocyten
  - $\alpha$ -granulen:  
vnl. stollingsfactoren, groeifactoren, angiogene mediators, ...
  - lysosomen:  
glycohydrolase, cathepsine en heparinase  
→ afbraak extracellulaire matrix en betere migratie trombocyten

# Introductie: IPFDs en IPSDs

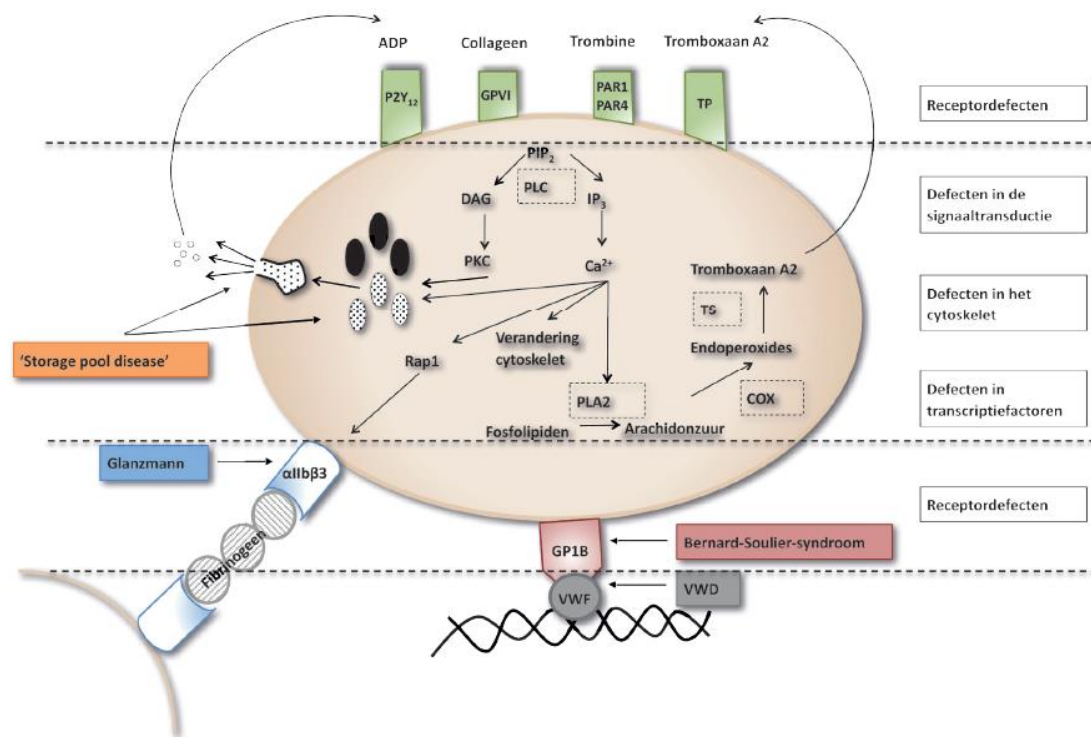
## Inherited Platelet Function Disorders

= alle congenitale plaatjesfunctiestoornissen

Prevalentie: 1 per 100 tot 2 per 1 000 000 ?

## Inherited Platelet Secretion Disorders

= IPFDs gekenmerkt door deficiënte aanmaak en/of deficiënte secretie van plaatjesgranulen



# Introductie: IPFDs en IPSDs

TABLE 2 Inherited platelet function disorders (IPFDs): a revised classification

	Structural defect	Mutated gene
<b>1- Abnormalities of adhesive protein receptors</b>		
Glanzmann thrombasthenia	$\alpha_{IIb}\beta_3$	ITGA2B, ITGB3
Bernard Soulier syndrome	GPIb/IX/V	GP1BA, GP1BB, GP9
Platelet-type VWD	GPIb/IX/V	GP1BA
22q11.2 deletion syndrome	GPIb/IX/V	del22q11.2
Defects of collagen receptors	$\alpha_2\beta_1$ , GPVI	ND, GP6
<b>2- Abnormalities of G protein-coupled receptors</b>		
Defect of the TP receptor	TxA2 receptor	TBXA2R
Defect of the P2 Purinergic Receptors	P2Y <sub>12</sub> receptor	P2RY12
<b>3- Defects of platelet granules (isolated/syndromic)</b>		
<b><math>\alpha</math>-granules</b>		
Gray platelet syndrome (GPS)	Primary protein abnormality unknown	NBEAL2
Arthrogyposis, renal dysfunction, and Cholestasis (ARC) syndrome	Protein required for vesicle trafficking and fusion and for platelet $\alpha$ -granule biogenesis	VPS33B, VIPAS39
Paris-Trousseau syndrome	Primary protein abnormality unknown	Del11q23 (FLI1)
<b><math>\delta</math>-granules</b>		
Hermansky-Pudlak syndrome	Proteins involved in vesicle formation and trafficking	HPS1, AP32B1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, DTNBP1, BLOC1S3, PLDN, HPS10
Chediak-Higashi syndrome		LYST
Isolated $\delta$ -storage pool deficiency	Deficiency of $\delta$ -granules	ND
SLFN14 related thrombocytopenia	Primary protein abnormality unknown	SLFN14
$\alpha$ / $\delta$ storage pool deficiency	Deficiency of platelet $\alpha$ - and $\delta$ -granules	ND
<b>4- Signal transduction proteins defects</b>		
Cytosolic phospholipase A <sub>2</sub> defect	PLA2 enzyme	PLA2G4A
Cyclo-oxygenase 1 deficiency	COX-1 enzyme	ND
Thromboxane synthase deficiency	Tx synthase enzyme	TBXAS1
Phospholipase C deficiency	PLC- $\beta$ 2	ND
PKA defect	cAMP-dependent protein kinase A	PRKAGG
G proteins defects	G $\alpha$ s protein	GNAS/ RGS2
Leukocyte adhesion deficiency-III (LAD-III)	Kindlin-3	FERMT3
CalDAG-GEFI defect	Guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rap1	RASGRP2
Src defect	Tyrosine kinase Src	SRC

## 5- Defects of transcription factors

Familial platelet disorder with associated myeloid malignancy (FPD/AML)	Haematopoietic transcription factor	RUNX1
FLI1-related $\delta$ granule defect	Haematopoietic transcription factor	FLI1 (SVNs)
GATA1-defect	Haematopoietic transcription factor	GATA1
GFI1B-related defect	Haematopoietic transcription factor	GFI1B

## 6- Defects of cytoskeletal proteins

Wiskott-Aldrich Syndrome/XLT	WASP	WAS
ADAP defect	Adhesion and degranulation-promoting adaptor protein	FYB
Filamin A defects	Filamin A	FLNA

## 7- Defects of membrane phospholipids

Scott's syndrome	Transmembrane protein 16F (Ca <sup>2+</sup> -activated chloride channel)	TMEM16F
Stormorken syndrome	Ca <sup>2+</sup> sensor in the endoplasmic reticulum	STIM1, ORAI1

## 8- Enhanced platelet fibrinolytic activity

Quebec platelet disorder	Urokinase-type activator	PLAU (duplication)
--------------------------	--------------------------	--------------------

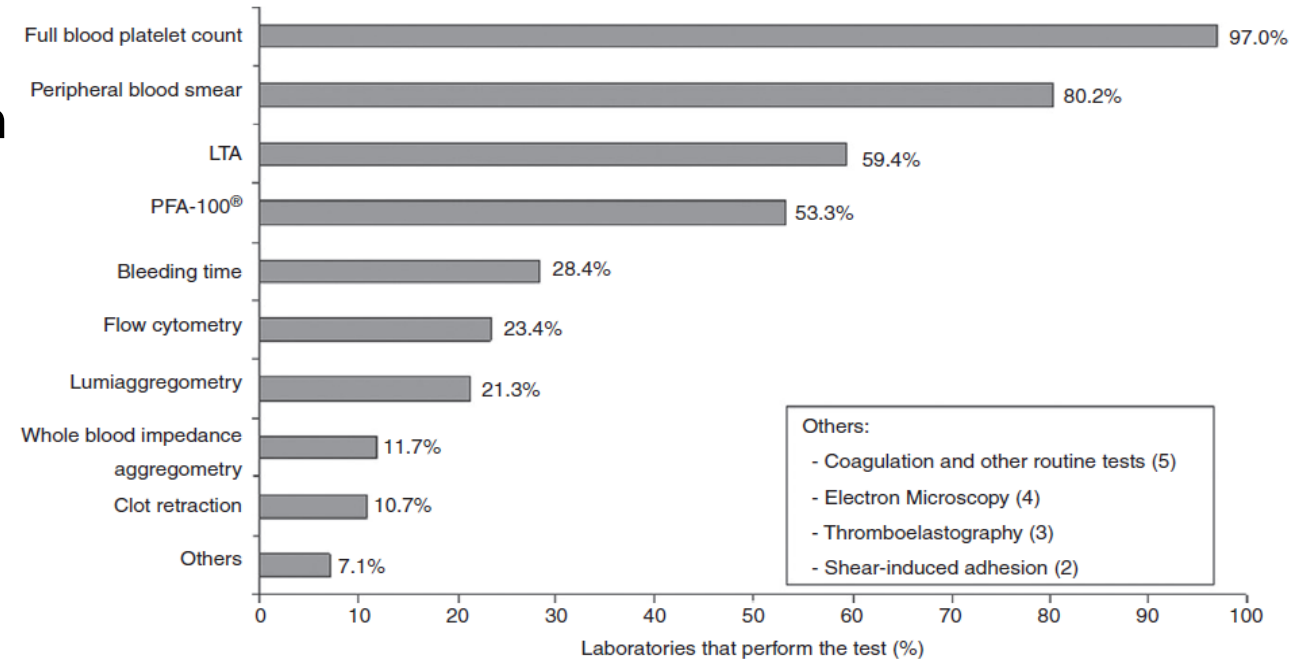
## 9- Unclassified

Primary secretion defect	Primary protein abnormality unknown	ND
--------------------------	-------------------------------------	----

# Introductie: diagnostiek van IPSDs

- Rondvraag ISTH (2014):
  - >50% geen specifieke assay voor granulen
  - Gebrek aan standaardisatie
  - Waarom?
    - > financiële restricties
    - > gebrek aan wetenschappelijke ondersteuning
    - > hoge analytische variabiliteit
    - > hoge intra-individuele variabiliteit

→ **Onderdiagnostiek!**



**Fig. 3.** First-step laboratory tests used in the approach to patients with a suspected inherited platelet function disorder (IPFD), in order of frequency (No. of respondents: 197/202, 97.5%). Others (i.e. first-step laboratory tests used by < 5% of respondents) are reported in the inset indicating the number of respondents. LTA, light transmission aggregometer; PFA-100®, Platelet Function Analyzer-100®.

# Introductie: diagnostiek van IPSDs

- Ernstige vormen:
  - Suggestieve kliniek (bv. albinisme)
  - Sterker afwijkende functietesten
  - Gekende genetische achtergrond
- Milde vormen:
  - Pas klachten op volwassen leeftijd of na belasting
  - Routine functietesten kunnen normaal zijn
  - Genetische achtergrond dikwijls ongekend



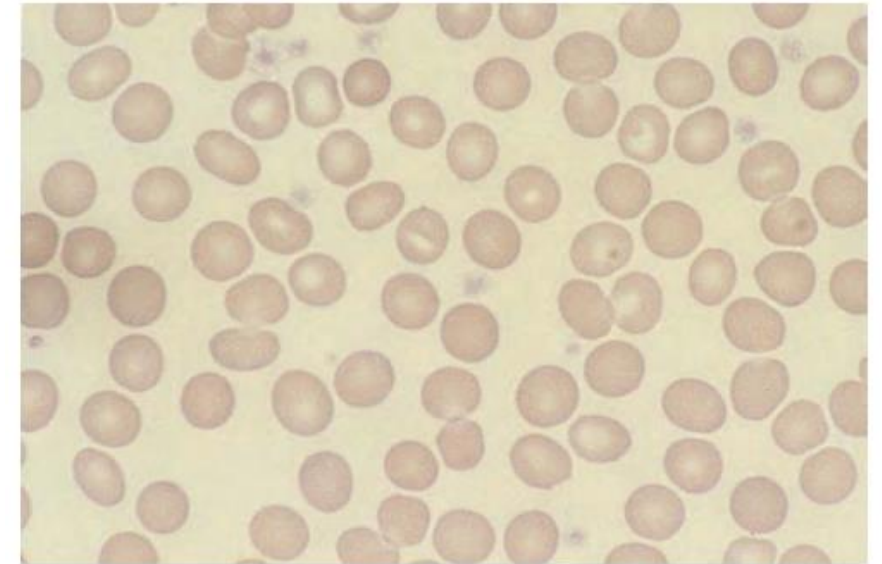
# Onderzoeksvragen

- Welke methodes worden in de literatuur beschreven om defecten in plaatjesgranulen op te sporen? → DEEL 1
- Is een optimalisatie van de diagnostiek naar IPSDs mogelijk in ons laboratorium?
  - Welke tekortkomingen zijn er voor de diagnostiek van IPSDs?  
→ DEEL 2
  - Voldoen de ATP secretietest referentiewaarden?  
→ DEEL 3
  - Kunnen we met de ATP secretietest ook de inhoud van de granulen nakijken?  
→ DEEL 4

# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## A. Algemeen

- Trombocytentelling
  - $\delta$ -SPD meestal normaal
  - $\alpha$ -SPD meestal (macro)trombocytopenie
  - Rest: zeer variabel
- Lichtmicroscopie
  - Geen waarde voor beoordeling  $\delta$ -granulen
  - Afwezigheid van  $\alpha$ -granulen (GPS, ARC syndroom)  
→ grote, bleke bloedplaatjes op May-Grunwald-Giemsa kleuring

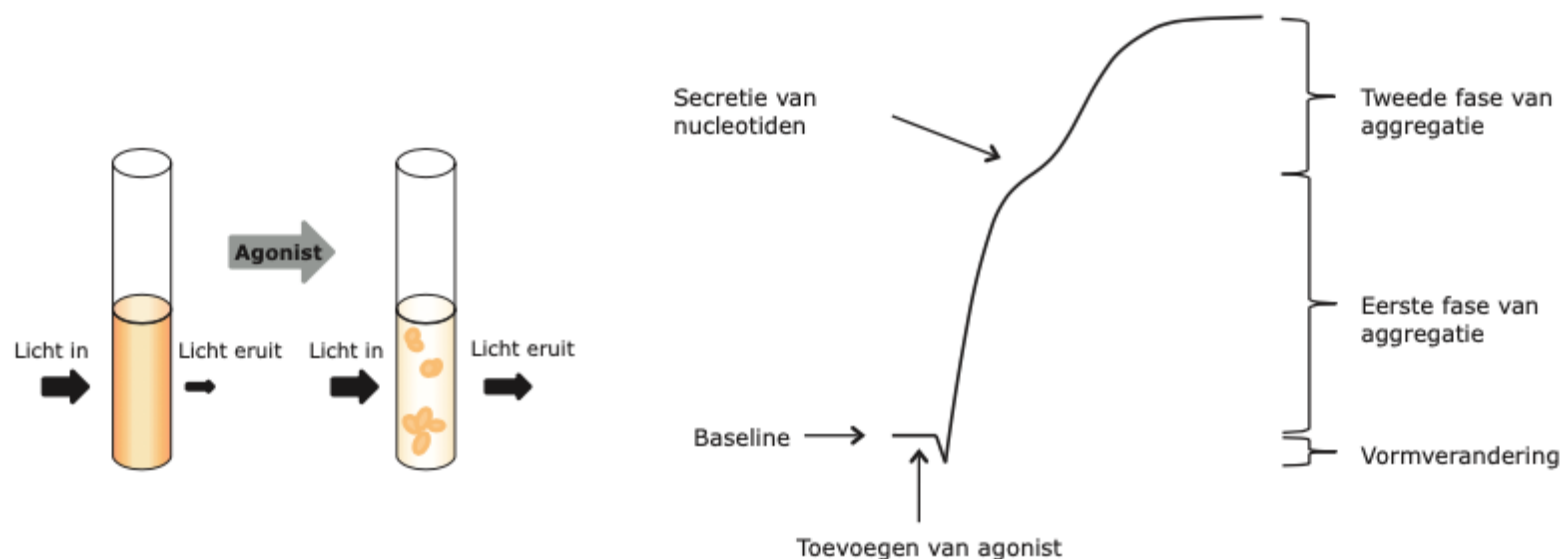


**Fig. 8.94** The blood film of a patient with the grey platelet syndrome showing six agranular platelets.

# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## A. Algemeen

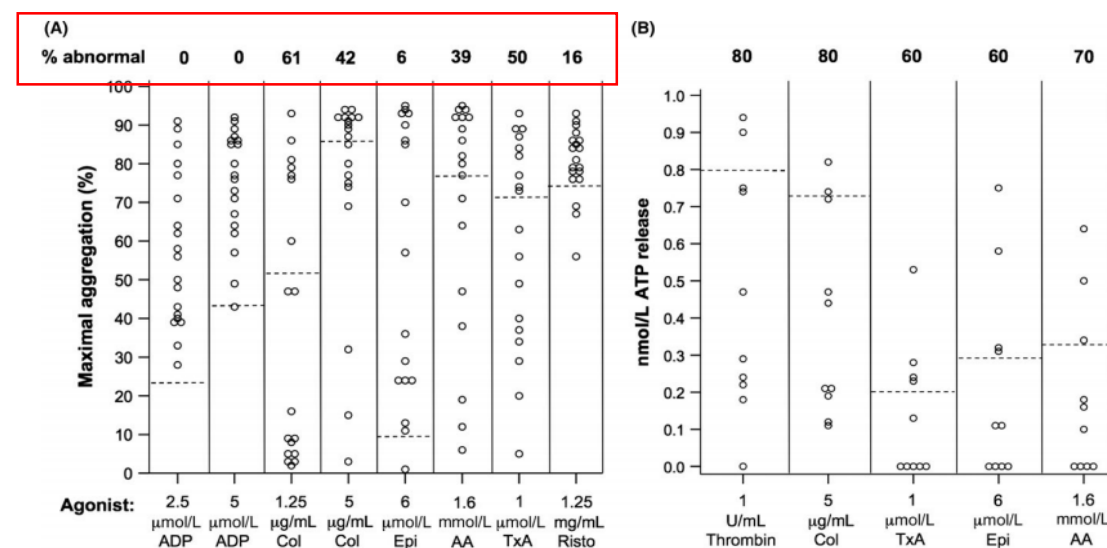
- Lichttransmissieaggregometrie



# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## A. Algemeen

- Lichttransmissieaggregometrie
  - Lage sensitiviteit: 1/3<sup>e</sup> tot 1/2<sup>e</sup> van de patiënten met defect in granulen vertoont normale LTA
  - Indien afwijkend:
    - Verminderde of afwezige secundaire golf
    - Verminderde maximale aggregatie



**FIGURE 4** Maximal platelet aggregation responses and lumi-aggregometry dense granule ATP release findings with different agonists for individuals with confirmed dense granule deficiency. (A) Percent maximal aggregation responses are shown for DGD participants, evaluated with the following agonists: 2.5 and 5.0 µmol/L adenosine diphosphate (ADP), 1.25 and 5.0 µg/mL collagen (Col), 6 µmol/L epinephrine (Epi), 1.6 mmol/L arachidonic acid (AA), 1 µmol/L thromboxane analogue (TxA) (U46619), and 1.25 mg/mL ristocetin (Risto). (B) Lumi-aggregometry estimates of dense granule ATP release for DGD participants, evaluated with the following agonists: 1 U/mL thrombin, 5.0 µg/mL collagen (Col), 1 µmol/L thromboxane analogue (TxA) (U46619), 6 µmol/L epinephrine (Epi), and 1.6 mmol/L arachidonic acid (AA). A&B). Dotted lines show the lower limit of the RI for each agonist. The percentage of DGD patients that were abnormal with each agonist is indicated

# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## A. Algemeen

- Platelet Function Analyzer (PFA)
  - Voordelen: simpel en snel, volbloed, weinig staalvolume
  - Nadelen: zeer variabel bij IPSDs  
→ geen goede screeningstool

**Table 1** PFA-100® closure times (CT) findings in congenital and acquired, non-drug-induced platelet disorders

	Total number of subjects reported (numbers per study)	CADP CT	CEPI CT	References
<i>Disorders with normal platelet counts</i>				
Glanzmann thrombasthenia	23 (2,6,1,8,5,1)	P	P	[7,8,16,34,49,50]
Aspirin-like defect	6	N	P	[7]
P2Y <sub>12</sub> deficiency	4 (1*,2,1)	N or P	N or P	[16] (M. Cattaneo, unpublished; P. Nurden, unpublished)
Dense granule deficiency	30 (4,6,7,1,12)	N or P	N or P	[7,8,14,16,34]
Hermansky–Pudlak syndrome	44 (7,13,5,19)	N or P	N or P	[8,34,50,53]
Primary secretion defects	30 (10,10,10)	N	N or P	[14,34,52]
Platelet procoagulant defect	1	N	N	[16]
<i>Disorders with reduced or normal platelet counts</i>				
Bernard–Soulier syndrome	8 (2,6)	P	P	[8,34]
Platelet-type von Willebrand disease	3	P	P	[7]
Grey platelet syndrome	3 (1,2)	P	P	[16,34]
Wiskott–Aldrich syndrome	5	N or P	N or P	[34]
Hereditary macrothrombocytopenia associated with non-muscle Myosin Heavy Chain IIa syndromes	5 (3,2)	N	N or P	[16,35]
Macrothrombocytopenia of undefined cause	11	N or P	N or P	[34]
Undefined autosomal dominant thrombocytopenia	1	N	N	[16]
<i>Primary bone marrow disorders</i>				
Myelodysplastic or myeloproliferative syndromes, with or without thrombocytosis	69 (7,62)	N or P	N or P	[16,92]

Note, the data reported with CADP and CEPI cartridges, indicated as normal (N) or prolonged (P), are based on small numbers of reported cases. \*Indicates a patient with an ADP receptor/signal transduction defect [16] that was later found to be P2Y<sub>12</sub> deficient (W. L. Nichols, pers. comm.). M. Cattaneo, Università di Milano, Milan, Italy; P. Nurden, Hôpital Cardiologique, UMR 5533 CNRS, Pessac, France; W. L. Nichols, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.

# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## A. Algemeen

- Moleculaire diagnostiek
  - Gerichte Sanger sequencing bij zeer typisch fenotype (bv. HPS of CHS)
  - Meestal klinisch heterogeen → high-throughput sequencing
    - panel van relevante genen = targeted sequencing
    - volledige exoom = whole exome sequencing
    - volledige genoom = whole genome sequencing
  - In UZ Leuven sinds 2019  
'virtual whole exome sequencing'

# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## A. Algemeen

- Moleculaire diagnostiek

Coagulation/anticoagulation panel
<i>ADAMTS13, HRG, F10, F11, F12, F13A1, F13B, F2, F5, F7 F8, F9, FGA, FGB, FGG, GGCX, KNG1, LMAN1, MCFD2, PIGA, PLG, PROC, PROS1, SERPINE1, SERPINC1, SERPIND1, SERPINF2, THBD, VKORC1, VWF</i>
Platelet disorder panel
<i>ABCG5, ABCG8, ACTB, ACTN1, ANKRD26, ANO6, AP3B1, AP3D1, ARPC1B, BLOC1S3, BLOC1S6, CDC42, CYCS, DIAPH1, DTNBP1, ETV6, FERMT3, FLI1, FLNA, FYB1, GATA1, GF11B, GNE, GP1BA, GP1BB, GP6 GP9, HOXA11, HPS1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, IKZF5, ITGA2B, ITGB3, KDSR, LYST, MECOM, MPIG6B, MPL, MYH9, NBEA, NBEAL2, P2RY12, PLA2G4A, PLAU, RASGRP2, RBM8A, RNU4ATAC, RUNX1, SLFN14, SRC, STIM1, STXBP2, TBXA2R, TBXAS1, THPO, TUBB1, VIPAS39, VPS33B, VWF, WAS</i>
Bleeding of unknown aetiology panel
<i>ACVRL1, CHST14, COL1A1, COL3A1, COL5A1, COL5A2, ENG, SMAD4</i>

} 63 genen → 27 relevant voor IPSDs

Nadeel: minder detectie van nieuwe genetische defecten

↔ WES/WGS: moeilijke classificatie pathofoon / niet-pathofoon  
steeds te correleren met kliniek en plaatjesfunctietesten

# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## A. Algemeen

- Elektronenmicroscopie
  - $\delta$ -granulen  
'dens' > calcium  
5 – 9 per trombocyt  
200 – 300 nm diameter
  - $\alpha$ -granulen  
variabele elektrondensiteit,  
densere centrale zone  
50 – 80 per trombocyt  
200 – 500 nm diameter

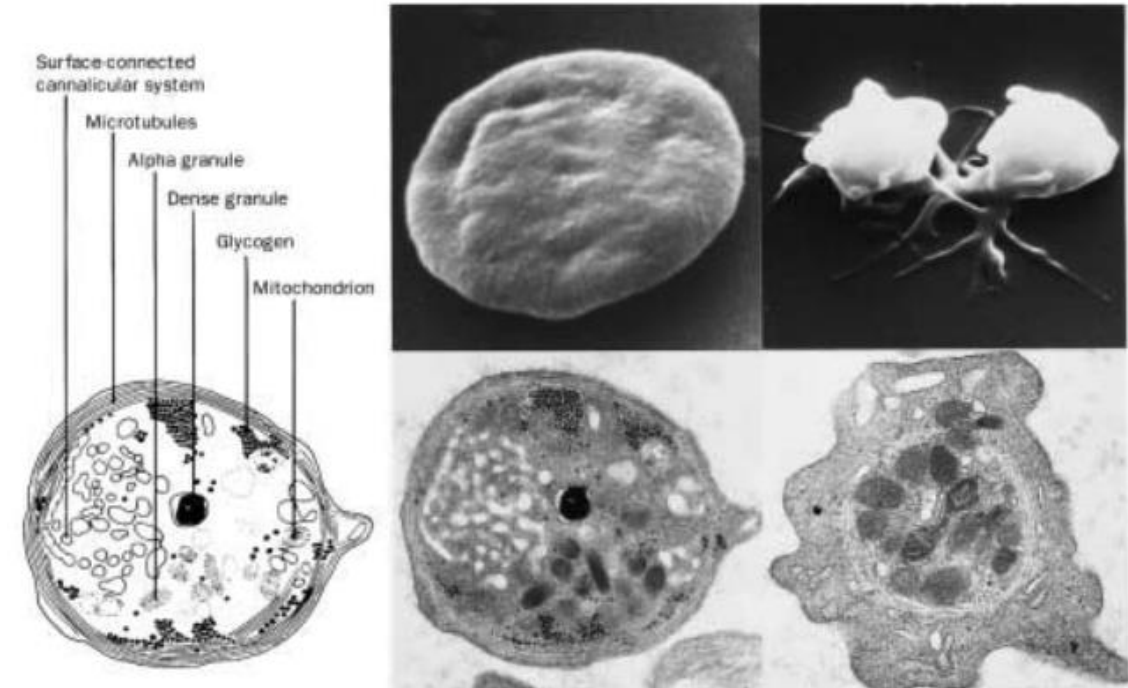


Figure 1: **Electron micrograph of resting and activated platelets**

Top photographs are scanning electron micrographs demonstrating the disc shape of normal circulating platelets (left,  $\times 20\,000$ ) and the more spherical form of activated platelets with many long pseudopodia (right,  $\times 10\,000$ ). Lower left photograph is a transmission electron micrograph of the cross-section of a resting platelet ( $\times 21\,000$ ) with a matched drawing labelling the normal subcellular structures. Lower right photograph ( $\times 30\,000$ ) of an activated platelet shows the constriction of the microtubular ring around the centralised granules and the formation of pseudopodia. Electron micrographs courtesy James G White and Marcy Krumwiede, University of Minnesota. Reproduced with permission from: George JN. Haemostasis and fibrinolysis. In: Stein JH, et al, eds. Internal medicine, 5th edn. St Louis: Mosby, 1998: 534–40.



# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## A. Algemeen

- Elektronenmicroscopie
  - Voordelen:  
hoge sensitiviteit en reproduceerbaarheid → ‘gouden standaard’  
volledige ultrastructuur kan bekeken worden
  - Nadelen:  
vergt veel expertise en tijd  
enkel beschikbaar in zeer gespecialiseerde centra  
geen informatie over adequate vrijzetting

# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

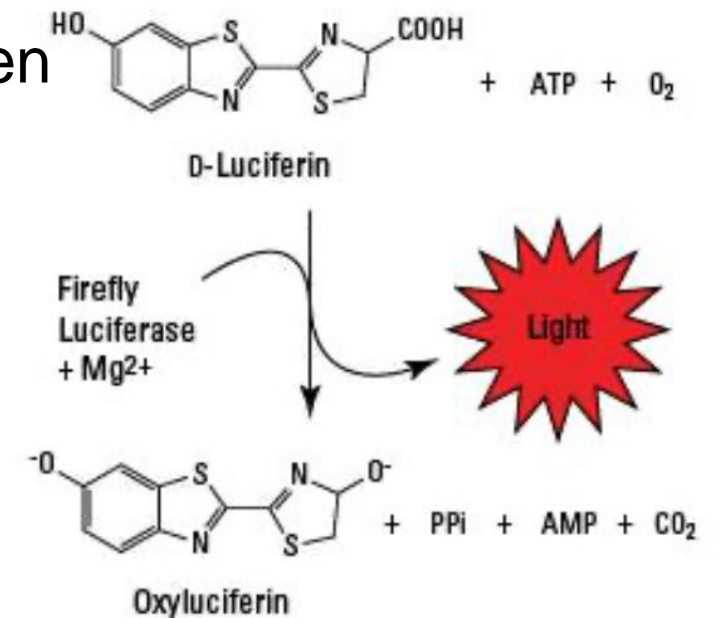
## B. $\delta$ -granulen

- Flowcytometrie
  - Mepacrine
    - Voordelen:  
klein staalvolume, volbloed, meting van inhoud én secretie, hoge negatieve predictieve waarde voor  $\delta$ -SPD (97%)
    - Nadelen: **lage positieve predictieve waarde voor  $\delta$ -SPD (35%)**
  - CD63  
geen onderscheid mogelijk tussen opslag- en secretieprobleem

# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## B.δ-granulen

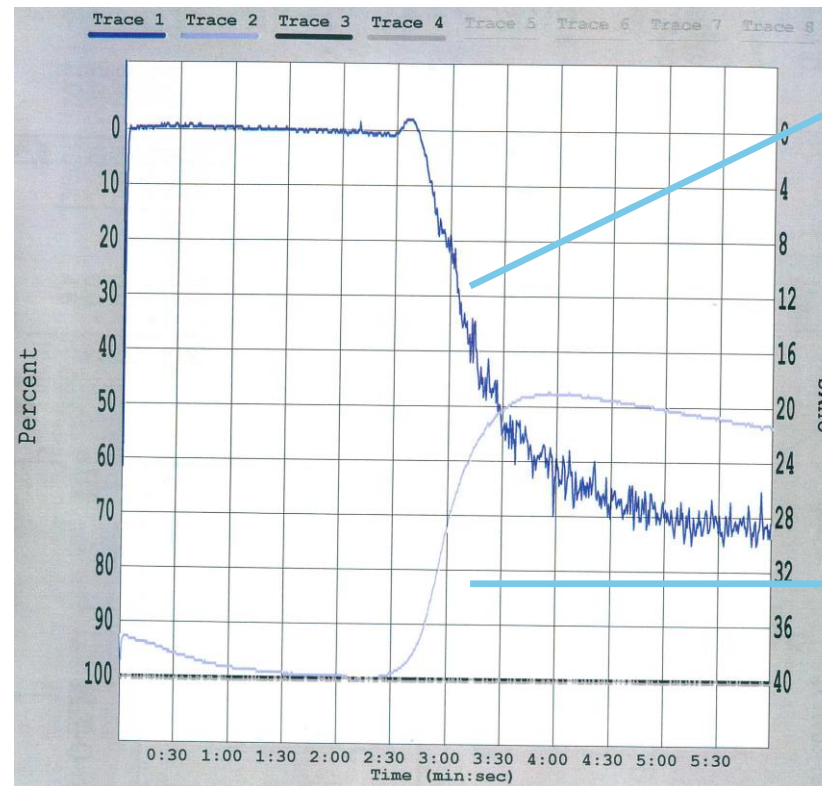
- ATP/ADP meting met lumino(aggrego)metrie
  - 40-60 nmol ATP en 20-40 nmol ADP in  $10^9$  trombocyten
    - 1/3<sup>e</sup> in 'metabole' cytoplasmatische pool (vnl. ATP)
    - 2/3<sup>e</sup> in 'storage' δ-granulen (vnl. ADP)
  - Meting ATP/ADP secretie (na agonist)
  - Meting ATP/ADP inhoud (na extractie)
    - differentiatie tussen δ-SPD en secretiedefect
  - Meetmethode o.b.v. bioluminescentie
  - ADP meting:
    - eerst omzetting naar ATP met phosphoenolpyruvaat - pyruvaatkinase



# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## B. $\delta$ -granulen

- ATP/ADP meting met lumino(aggrego)metrie



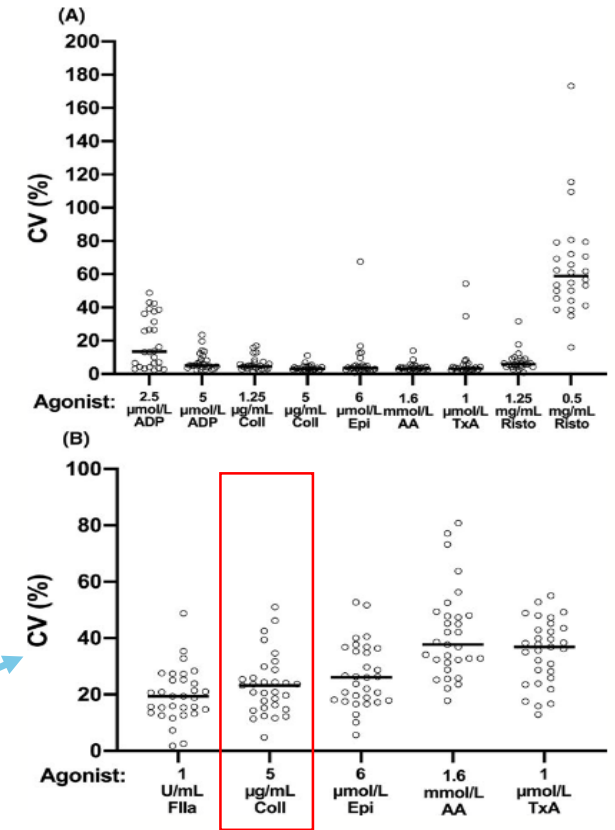
Turbiditeit (plaatjesaggregatie)  
na stimulatie met agonist

Lichtemissie (ATP secretie)  
na stimulatie met agonist

# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## B.δ-granulen

- ATP/ADP meting met lumino(aggrego)metrie
  - Hoge analytische variabiliteit
    - > concentratie luciferine/luciferase reagens
    - > concentratie ATP standaard
    - > concentratie en type van agonisten
    - > duur van incubatie en meting
    - > temperatuur
    - > al dan niet gecorrigeerde bloedplaatjestelling
    - > volume PRP
  - Hoge intra-individuele variabiliteit



**FIGURE 1** Illustration of the coefficient of variation for estimating platelet maximal aggregation and platelet dense granule adenosine triphosphate release end-points. Panels compare data (A: maximal aggregation; B: ATP release) for 26 unique individuals that donated the quality control sample for platelet function tests on  $\geq 3$  occasions in Hamilton, Ontario. Lines indicate the median CV for the agonists adenosine triphosphate (ATP), collagen (Coll), epinephrine (Epi), arachidonic acid (AA), thromboxane analogue U46619 (TxA), ristocetin (Risto), and thrombin (Fila)

# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## B. $\delta$ -granulen

- ATP/ADP meting met lumino(aggrego)metrie
    - Klinische waarde?
      - Badin et al, 2016:  
afwijkende ATP secretie heeft geen voorspellende waarde bij diagnostiek bloedingsziekte (odds ratio 1.5 (95% CI 0.6 -3.9))
      - Brunet et al, 2018:  
bij 10 patiënten met bewezen  $\delta$ -granule tekort op EM, hadden 2 patiënten een normale ATP secretietest
- Kleine klinische studies met variabele resultaten  
zowel specificiteit als sensitiviteit lijken toch twijfelachtig

# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## B.δ-granulen

- ATP/ADP meting met High Pressure Liquid Chromatography
  - Voordelen:  
zeer gevoelige, specifieke en accurate meting van ATP en ADP  
zowel inhoud als secretie kan gemeten worden
  - Nadelen:  
hoge aankoopprijs  
nood aan specifiek hoogopgeleid laboratoriumpersoneel

# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## C. $\alpha$ –granulen

- Flowcytometrie: CD62p (P-selectin)
  - Voordelen: klein staalvolume, volbloed
  - Nadelen: geen onderscheid tussen opslag- en secretieprobleem, lage negatieve predictieve waarde (87%), gebrek aan standaardisatie
- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) met detectie van PF-4 of fibrinogeen: zowel beoordeling van opslag (lysaat) als secretie (na agonist) mogelijk



# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## C. $\alpha$ –granulen

- Immunofluorescentie-microscopie  
IF labeling thrombospondin-1, vWF, fibrinogeen, P-selectin, ... op PB of PRP uitstrijkjes
  - Voordelen:  
Klein staalvolume, volbloed, uitstrijkjes kunnen opgestuurd worden naar meer gespecialiseerde centra
  - Nadelen:  
Enkel beoordeling inhoud

# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## D. Conclusie

- Verscheidenheid aan testen beschikbaar, maar ...
  - Weinig gestandaardiseerd
  - Technisch ingewikkeld
  - Slecht reproduceerbaar
  - Niet noodzakelijk goede correlatie met klinische diagnose
- Moleculaire diagnostiek is veelbelovend, maar genetisch defect van vele IPSDs nog ongekend

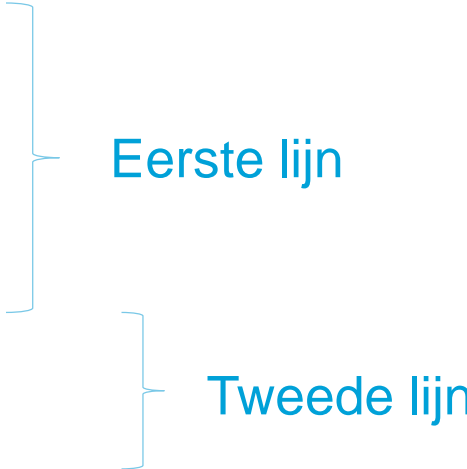
# Appraisal – Deel 1: literatuurnazicht

## D. Conclusie

	Structureel defect	Bloeding	Andere symptomen	Bloedplaatjestelling	Morfologie LM	Morfologie TEM	Granula-inhoud	Granula-secretie	LTA	Flowcytometrie	Genetica
<b>Defecten van receptoren die bestaan voor adreïne</b>											
<b>Defect van de collageen receptoren</b>	α2β1 of GPVI	variabel	geen	normaal of milde trombocytopenie	normaal of macrothrombocyten	normaal	normaal	verminderd bij gebruik collageen	verminderde aggregatie op collageen, CRP en conulicine	GPIIb/IIIa (α2β1) of GPVI deficiënte	AD; ongekend / AR; GP6
<b>Defecten van G-proteïne gekoppelde receptoren</b>											
<b>Defect van de trombospan receptor</b>	TxA2 receptor	mild	geen	normaal	normaal	normaal	normaal	verminderd bij gebruik agonisten LTA	afwezig of ernstig verstoord respons op arachidonzuur en TxA2 analogen (bv. U46619); verminderde aggregatie na collageen en afwezig secundaire golf na stimulatie met ADP of epinephrine; normale respons op thrombine	normaal	AD; TBA2B gen
<b>Deficiëntie van plaatjesgranula</b>											
<b>• SPO (Storage pool disease)</b>											
<b>Gray Platelet Syndrome (GPS)</b>	neurorachisch-lila 2 (NSEAL-2) proteïne: belangrijk bij vesikel transport	mild tot matig	splenomegalie	milde trombocytopenie	macrothrombocyten, grijs of bleke plaatjes (ghost lila), hypergranulatie van de neutrofielen, dyserythropoese	stark verlaagd aantal / afwezig e granula	afwezig e granula	geen vrijpating van inhoud e granula	variabel; kan normaal zijn, maar verminderde aggregatie op thrombine, collageen en TRAP-6 wordt beschreven	P-selectine kan verlaagd zijn (maar niet altijd)	AR/AD; NSEAL2 of G6IB
<b>Arthrogryposie, renale dysfunctie en cholesterol (AR2) syndroom</b>	eiwit die instaat voor transport/fuse van vesicels en biologische van e granula	ernstig	neurotische cholesterol, nefrotische en arthrogryposie, failure to thrive, meestal overlijden <i>cl</i>), soms verstandelijke	verlaagd	macrothrombocyten grijs of bleke plaatjes hypergranulatie van de neutrofielen	afwezig e granula	afwezig e granula	geen vrijpating van inhoud e granula	meestal normaal, verminderde aggregatie op ADP beschreven	P-selectine meestal sterk verlaagd (maar niet altijd)	AR; VPS33B of VPSA39
<b>Paris-Trousseau syndroom</b>	primair eiwit defect ongekend	mild	bevoering, hyperreflexie en carpal / pedal / paroxysmatische afwijkingen	matige tot ernstige trombocytopenie	macrothrombocyten	reuze e granula	normaal	geen vrijpating van inhoud e granula na stimulatie met thrombine	normaal	normaal	FL11 gen (6q11-q23)
<b>• SPO</b>											
<b>Hermansky-Pudlik syndroom (HPS)</b>	eiwitten die instaan voor de vorming en transport van vesicels	matig tot ernstig	multisysteemlaesie: oculocutane albinisme, myopatie en hoarsiteit, soms ook pulmonaire fibrose, granulomatose colitis en immunodeficiëntie	normaal	normaal	verlaagd aantal / afwezig e granula	verlaagd aantal / afwezig e granula	verminderde vrijpating inhoud e granula	variabel; kan normaal zijn, maar verminderde / afwezig secundaire golf op ADP en ionophore en verminderde aggregatie op collageen worden beschreven	normaal	AR; HPS1, APBB1, HPS2, HPS4, HPS5, HPS6, DNTBP1, BLOC1L3, PLDN, HPSD
<b>Chediak-Higashi syndroom (CHS)</b>	eiwitten die instaan voor de vorming en transport van vesicels	mild	multisysteemlaesie: oculocutane albinisme, ernstige immunodeficiëntie en progressieve neurodegeneratieve dysfunctie	normaal	normale bloedplaatjes, inclusief granula in leukocyten	verlaagd aantal e granula, soms reuze e granula	verlaagd aantal e granula; verlaagde ADP-inhoud (STRAP-ratio gestegen)	verminderde vrijpating inhoud e granula	variabel; kan normaal zijn, maar verminderde / afwezig secundaire golf op ADP en ionophore en verminderde aggregatie op collageen worden beschreven	normaal	AR; LYST
<b>SLFN14 gerelateerde trombocytopenie</b>	primair eiwit defect ongekend	mild tot ernstig	geen	verlaagd	macrothrombocyten	verlaagd aantal / afwezig e granula	verlaagd aantal / afwezig e granula	verminderde vrijpating inhoud e granula	normaal	normaal	SLFN14
<b>Gelateerde S-SPO</b>	primair eiwit defect ongekend	mild tot ernstig	geen	normaal	normaal	verlaagd aantal / afwezig e granula	verlaagd aantal / afwezig e granula	verminderde vrijpating inhoud e en e granula	normaal	normaal	ongekend
<b>• S-SPO</b>	primair eiwit defect ongekend	geen info	geen info	normaal	normaal, soms grijs of bleke plaatjes	verlaagd aantal e granula en e granula	verlaagd aantal e granula	verminderde vrijpating inhoud e en e granula	normaal	normaal	meestal AD; ongekend
<b>Defecten in eiwitten die bestaan voor signaaltransductie</b>											
<b>Deficiëntie van cytosol foofolpase A<sub>2</sub> (FPA<sub>2</sub>)</b>	PLA2 enzyme	mild tot matig	recidiverende gastro-intestinale ulcera	normaal							AR; PLA2G4A
<b>Cyfose-rygmatose (EDN1) deficiëntie</b>	CDX1 enzyme	geen info	geen info	geen info	normaal						ongekend
<b>Thrombospan synthase deficiëntie</b>	Tx synthase enzyme	mild tot matig	bodymorforme, anemie	normaal							TBXA11 ongekend
<b>Foofolpase C deficiëntie</b>	PLC-β2	geen info	geen info	geen info	macrothrombocyten	normaal	normaal	verminderde vrijpating inhoud e en e granula	variabel; kan normaal zijn, maar afwezig secundaire golf en verminderde aggregatie op zwakke agonisten worden beschreven	normaal	AR; PRKAC5 GNAC/RS22
<b>PKA defect</b>	• cAMP-afhankelijke proteïne kinase A Gcs proteïne	matig tot ernstig	anemie	geen info geen info	macrothrombocyten	normaal	normaal	verminderde vrijpating inhoud e en e granula	variabel; kan normaal zijn, maar afwezig secundaire golf en verminderde aggregatie op zwakke agonisten worden beschreven	normaal	AR; PRKAC5 GNAC/RS22
<b>G-proteïne defect</b>											
<b>Leukocyte adhesion deficiency-II (LAD-II)</b>	Kindlin-3	matig tot ernstig	immunodeficiëntie, splenomegalie, anemie, osteopenie, vroege wondheilings	normaal of milde trombocytopenie	normaal						AR; FERMT3
<b>CaDAG-GEH defect</b>	calcium- and DAG-regulated guanine exchange factor 1	ernstig	geen	normaal							RAGAP2
<b>Tyrosine kinase Src defect</b>	Tyrosine kinase Src	ernstig	botdefecten (osteoporose en bodymorforme)	verlaagd	gelijkaardig aan GPS	gelijkaardig aan GPS	verlaagd aantal / afwezig e granula	geen vrijpating van inhoud e granula			SRC
<b>Defecten in transcriptiefactoren</b>											
<b>GATA-1 related syndroom</b>		matig	geassocieerd met dyserythropoetische anemie, beta-thalassaemie en congenitale erythrocytische porfyrie	verlaagd	macrothrombocyten	verminderde inhoud van de e granula	verminderde inhoud van de e granula	verminderde vrijpating inhoud e granula	verminderde aggregatie in respons op collageen en ristocetine; normale aggregatie in respons op ADP en thrombine	normaal	X-gebonden; GATA1
<b>Familial platelet disorder with associated myeloid malignancy (PMD/AM)</b>	Hematoopoëtische transcriptiefactoren	mild	geassocieerd met evolutie naar hematologische maligniteit	milde trombocytopenie	normaal	verlaagd aantal e granula (soms ook e granula)	verlaagd aantal e granula (soms ook e granula)	verminderde vrijpating inhoud e granula	verminderde aggregatie in respons op meerdere agonisten	normaal	AD; RUNX1
<b>FLI1-gerelateerd e granula defect</b>		matig tot ernstig	eczeem / psoriasis / alopecia	milde trombocytopenie	normaal	verlaagd aantal e granula, reuze e granula	verlaagd aantal e granula	verminderde vrijpating inhoud e granula	verminderde aggregatie in respons op collageen en PAR-1	normaal	AD; FLI1
<b>GR18 gerelateerd defect</b>		matig tot ernstig	geen	matige trombocytopenie	macrothrombocyten, dyserythropoese	verlaagd aantal of verminderde inhoud van de e granula	verminderde inhoud van de e granula	verminderde vrijpating inhoud e granula	normaal	normaal	AD; GFB18
<b>Defecten in het cytoskelet</b>											
<b>Wiskott-Aldrich syndroom / hereditair X-gebonden trombocytopenie (XLT)</b>	Wiskott-Aldrich syndroom proteïne (WASP)	variabel	eczeem, immunodeficiëntie, verhoogde vatbaarheid voor auto-immuun ziekten en maligniteit (niet bij XLT)	ernstige trombocytopenie	microthrombocyten	meestal normaal; soms verlaagd aantal e granula	meestal normaal; soms verlaagd aantal e granula	verminderde vrijpating inhoud e en e granula	meestal normaal	normaal	X-gebonden; WAS
<b>Fliaminoopische gerelateerde macrothrombocytopenie</b>	Stamline A	variabel	spectrum van zeldzame aandoeningen	milde trombocytopenie	macrothrombocyten	deel trombocyten vertonen reuze e granula, deel trombocyten hebben verlaagd aantal e granula	normaal	verminderde vrijpating inhoud e en e granula bij activatie via GPVI (collageen en conulicine)	verminderde aggregatie bij activatie via GPVI (collageen en conulicine)	normaal	X-gebonden; FLNA
<b>Tegengeroepen (bimodulische) inhoud van de trombocyt</b>											
<b>Quebec platelet disorder</b>	Urbkristine-type plasmogeen activator (uPA)	matig tot ernstig; beïnvloedt goed op gebruik van anti-fibrinolytica	geen	normaal of milde trombocytopenie	normaal	abnormale inhoud van de e granula (uPA bevat andere eiwitten in de granula e)	abnormaal veel uPA in de e granula	abnormaal hoge vrijpating van uPA uit de e granula	verminderde aggregatie in respons op epinephrine	normaal	AD; PLAU
<b>Ongekend defect</b>											
<b>primair secretiedefect (PSD)</b>	primair eiwit defect ongekend	mild	geen info	normaal	normaal	normaal	normaal	verminderd	normaal	normaal	ongekend

# Appraisal – Deel 2:

## Welke tekortkomingen zijn er voor de diagnostiek van IPSDs?

- Huidige diagnostiek:
  1. Lichtmicroscopie perifeer bloeduitstrijkje
  2. Lichttransmissieaggregometrie
  3. Platelet Function Analyzer
  4. ATP secretie
  5. Elektronenmicroscopie
  6. Moleculaire diagnostiek

Eerste lijn

Tweede lijn
- Tekortkomingen eerste lijnsscreening
  1. Diagnostiek van patiënten met een  $\alpha$ -granulenstoornis
  2. Differentiatie tussen aandoeningen die gepaard gaan met **verminderde ATP secretie** (enkel verminderde secretie of ook verminderde inhoud?)

# Appraisal – Deel 2:

## Welke tekortkomingen zijn er voor de diagnostiek van IPSDs?

- Tekortkomingen eerste lijnsscreening
  1. Diagnostiek van patiënten met een  $\alpha$ -granulenstoornis
    - Nood aan test die vrijzetting van  $\alpha$ -granulen kan meten (flowcytometrie / ELISA)  
MAAR bij meest courante secretiestoornissen is er zowel verminderde vrijzetting van  $\alpha$ - als  $\delta$ -granulen → worden opgepikt met **ATP secretietest**
    - Lichtmicroscopie, PFA en LTA hebben lage sensitiviteit voor  $\alpha$ -SPD  
→ gericht aanvragen van **2<sup>e</sup> lijn diagnostiek** bij klinische verdenking
  2. Differentiatie tussen aandoeningen die gepaard gaan met verminderde ATP secretie (enkel verminderde secretie of ook verminderde inhoud?)
    - Breder gebruik **EM** (praktisch haalbaar?)
    - **Aanpassen ATP secretietest** of ontwikkeling **HPLC** methode?  
→ zie deel 4

# Appraisal – Deel 3:

## Voldoen de ATP secretietest referentiewaarden?

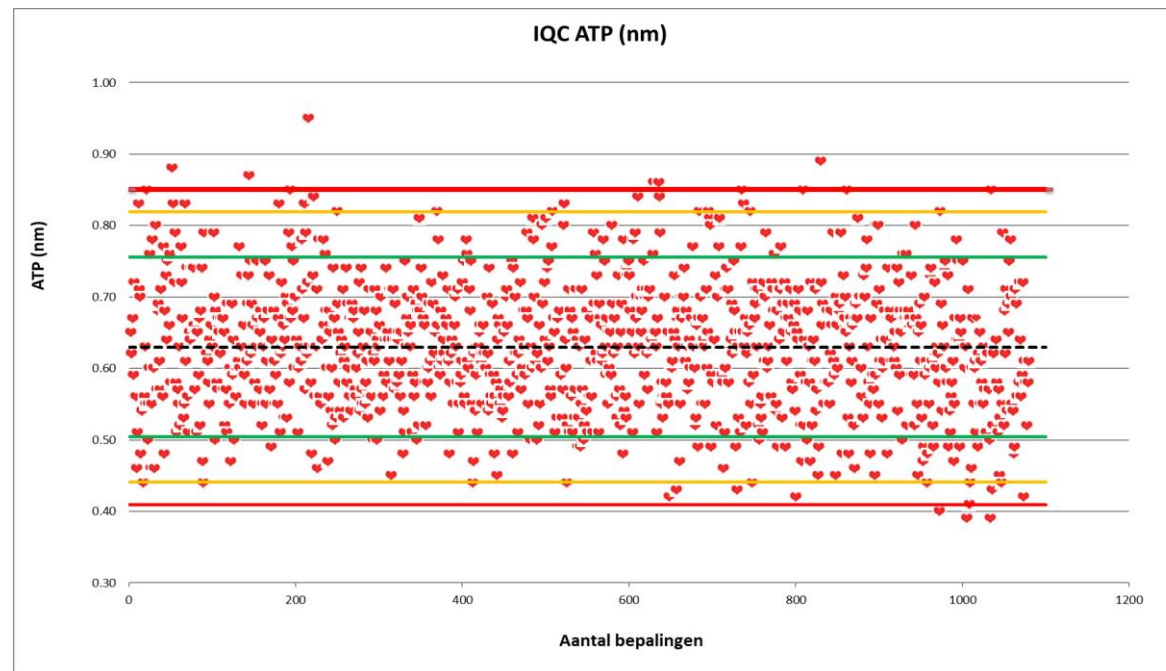
- Bepalen van referentiewaarden voor plaatjesfunctietesten is een uitdaging:
  - beperkte stabiliteit van patiëntenstalen
  - beperkte standaardisering
  - beperkte reproduceerbaarheid
  - hoge intra-individuele variabiliteit?
- Huidige onderste referentiewaarde voor de ATP secretietest:  
alleen de p10 van historisch nazicht normale donoren is gekend =1.5  $\mu\text{mol/L}$
- ATP secretiest wordt vaak aangevraagd bij kinderen
  - Veel kinderen vallen onder de 1.5  $\mu\text{mol/L}$  vallen
  - Moeilijk om voldoende gegevens (literatuur / eigen studies) te bekomen
- CLSI richtlijn EP28-A3C

# Appraisal – Deel 3:

## Voldoen de ATP secretietest referentiewaarden?

- Indirecte methode

- **Data mining**: referentiewaarden filteren uit database van patiëntenresultaten
- Belangrijk: stabiliteit analysemethode en patiëntenpopulatie
- Dataverzameling: 1/1/2017 t.e.m. 31/12/2020



→ Stabiele analysemethode

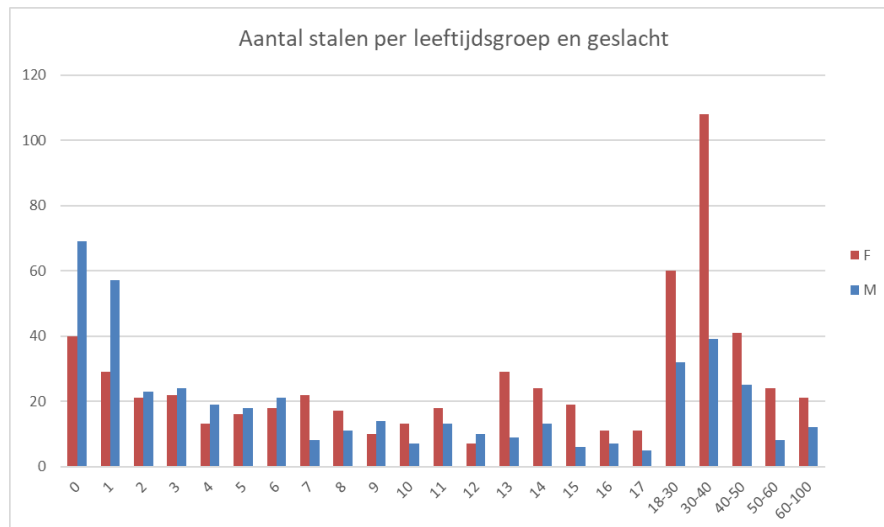
# Appraisal – Deel 3:

## Voldoen de ATP secretietest referentiewaarden?

- Indirecte methode
  - Beschrijving volledige dataset en beoordeling stabiliteit patiëntenpopulatie

	aantal	minimum	Q1	mediaan	Q3	maximum
2017	265	0.0	1.50	2.00	2.60	5.6
2018	276	0.0	1.40	1.70	2.10	5.2
2019	264	0.1	1.50	1.90	2.40	4.5
2020	239	0.0	1.30	1.80	2.30	4.6

→ Stabiele patiëntenpopulatie



1044 stalen  
> 57% vrouw  
> 43% man

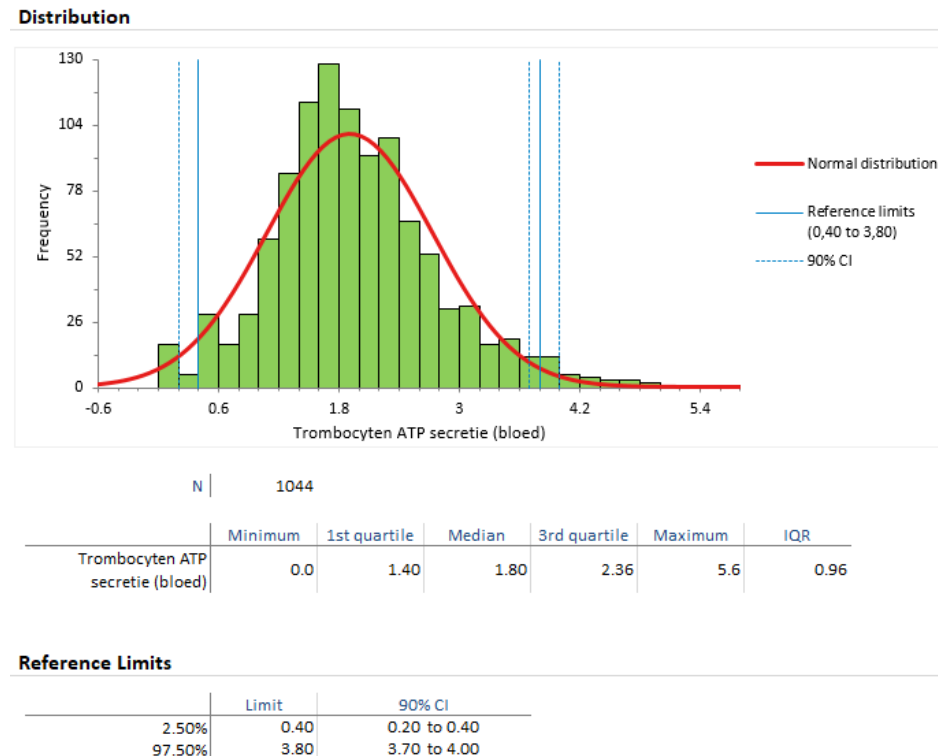
647 kinderen (<18j)  
397 volwassenen



# Appraisal – Deel 3:

## Voldoen de ATP secretietest referentiewaarden?

- Indirecte methode
  - Beschrijving volledige dataset en beoordeling stabiliteit



Percentiel 2.5 = 0.40  $\mu\text{mol/L}$

Percentiel 10 = 1.0  $\mu\text{mol/L}$

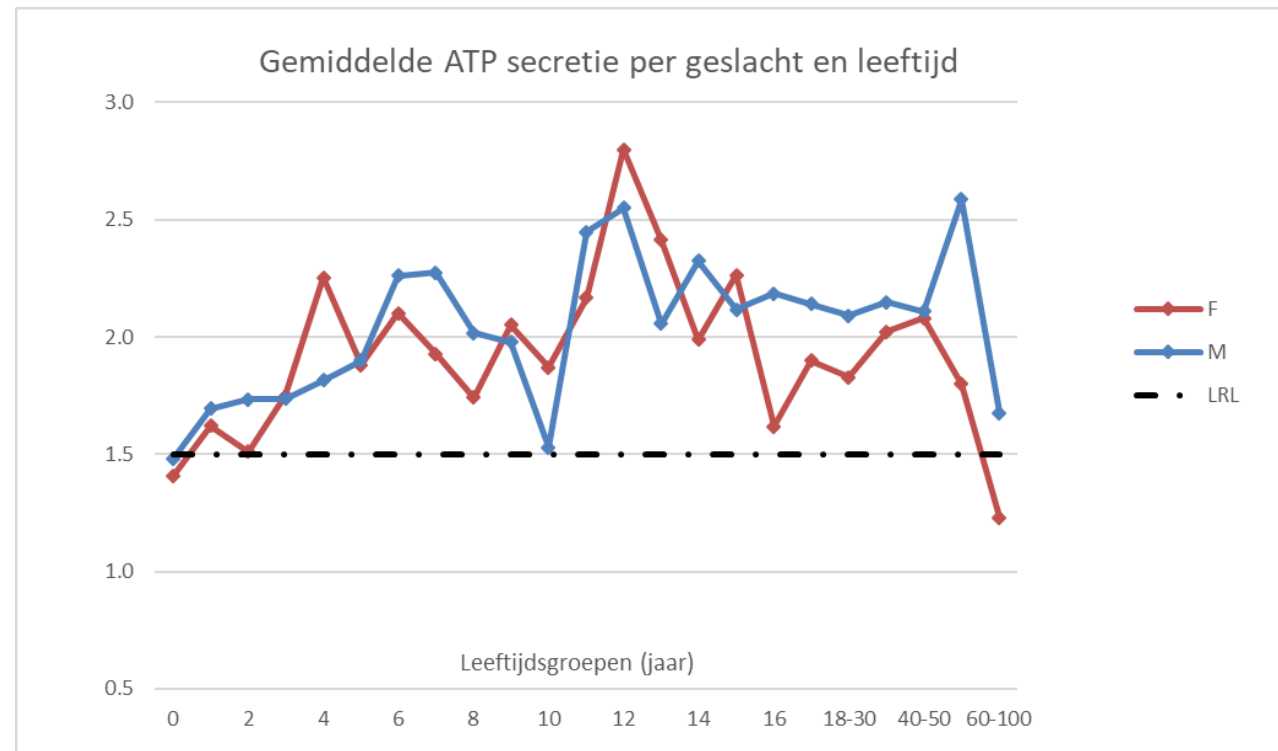
Lager dan huidige referentielimiet: (1.5  $\mu\text{mol/L}$ )

- 1) Te veel pathologische resultaten geïnccludeerd?
- 2) Huidige referentielimiet niet van toepassing op volledige populatie (invloed van leeftijd of geslacht)?

# Appraisal – Deel 3:

## Voldoen de ATP secretietest referentiewaarden?

- Indirecte methode
  - Subgroepanalyse



# Appraisal – Deel 3:

## Voldoen de ATP secretietest referentiewaarden?

- Indirecte methode
  - Exclusie strategie: zo weinig mogelijk contaminatie met ‘pathogene’ resultaten

Selectie 1 (meest strikte exclusiecriteria)	# overgebleven stalen
Exclusie patiënten met >1 staalafname	760
Exclusie patiënten met afwijkende LTA	508
Exclusie patiënten met afwijkend aantal bloedplaatjes	484
Exclusie verlengde PFA	427
Exclusie verlengde aPTT	393
Exclusie verlengde PT	286
Exclusie ATP secretie < 0,15	285

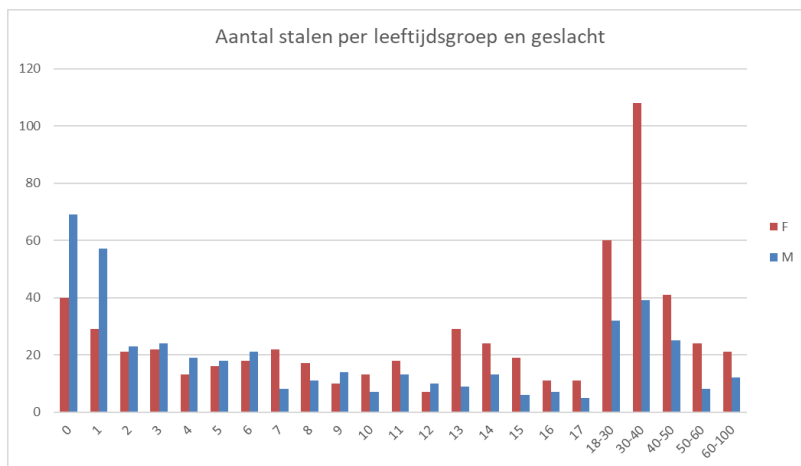
Selectie 2	# overgebleven stalen
Enkel laatste staal van patiënten met meerdere staalafnames	891
Exclusie patiënten met afwijkende LTA	594
Exclusie patiënten met afwijkend aantal bloedplaatjes	564
Exclusie verlengde PFA	507
Exclusie verlengde aPTT	469
Exclusie verlengde PT	349
Exclusie ATP secretie < 0,15	347

Selectie 3	# overgebleven stalen
Enkel laatste staal van patiënten met meerdere staalafnames	891
Exclusie patiënten met afwijkende LTA	594
Exclusie verlengde PFA	519
Exclusie ATP secretie < 0,15	518

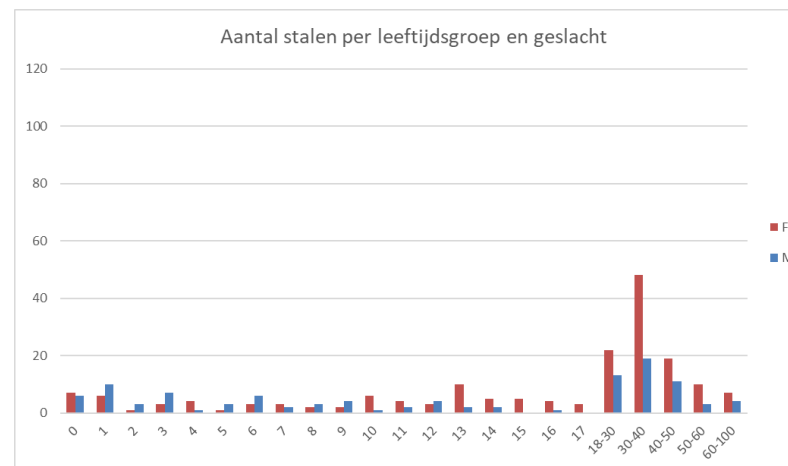
# Appraisal – Deel 3:

## Voldoen de ATP secretietest referentiewaarden?

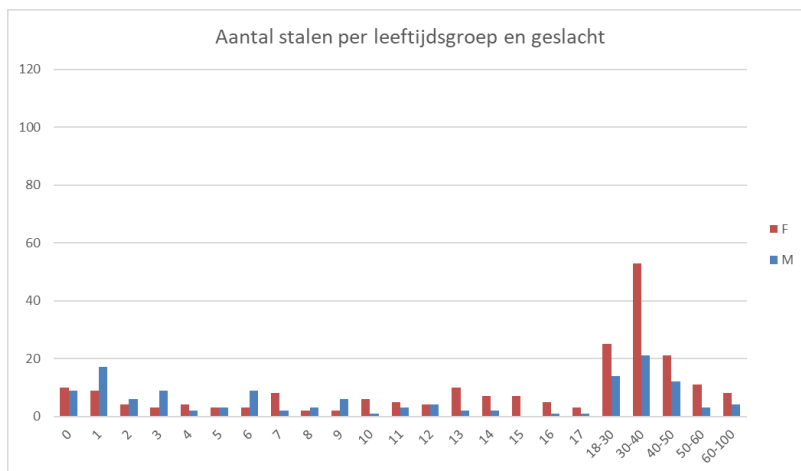
Volledige dataset (n = 1044)



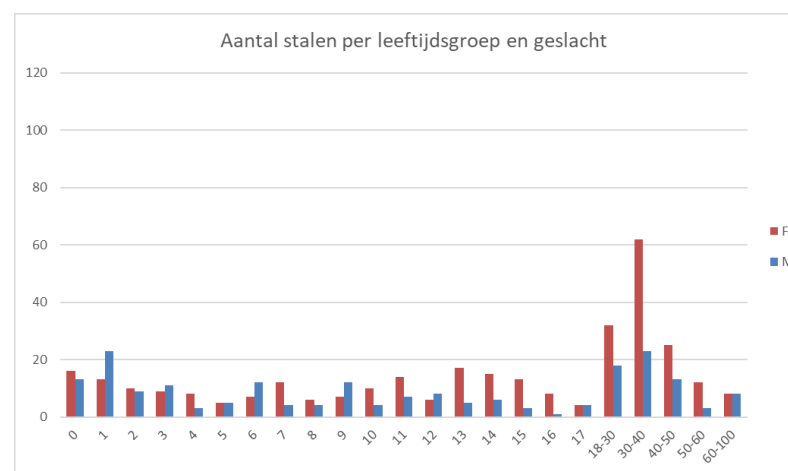
Selectie 1 (n = 285)



Selectie 2 (n = 347)



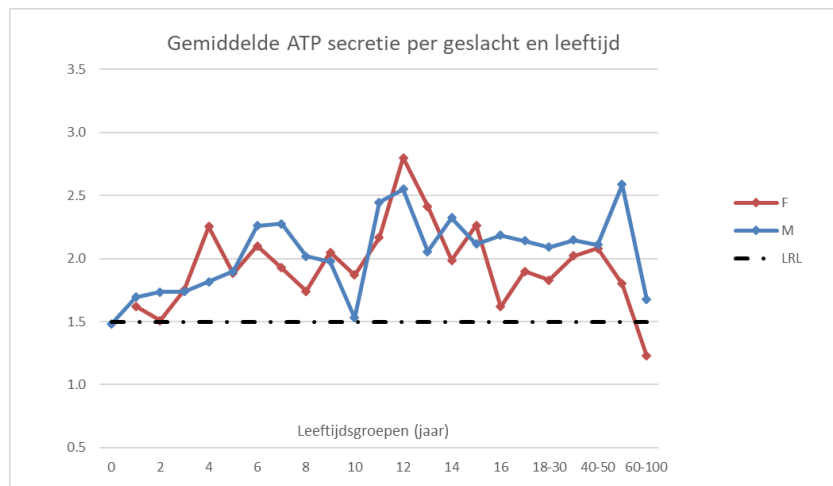
Selectie 3 (n = 518)



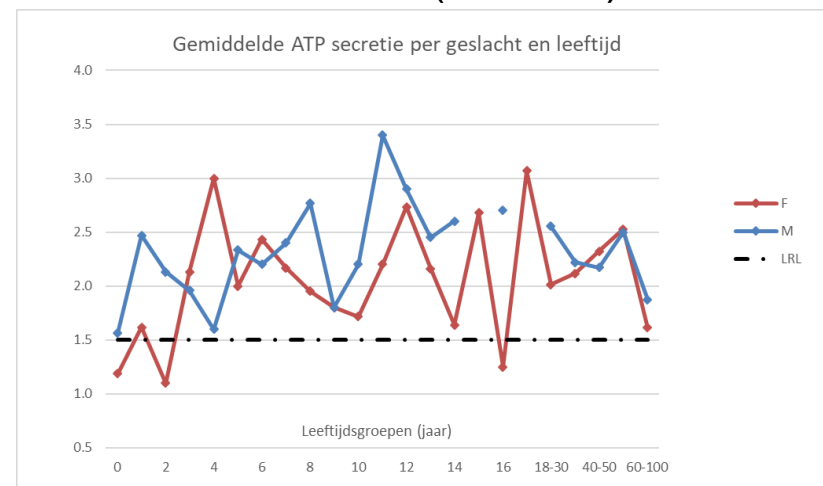
# Appraisal – Deel 3:

## Voldoen de ATP secretietest referentiewaarden?

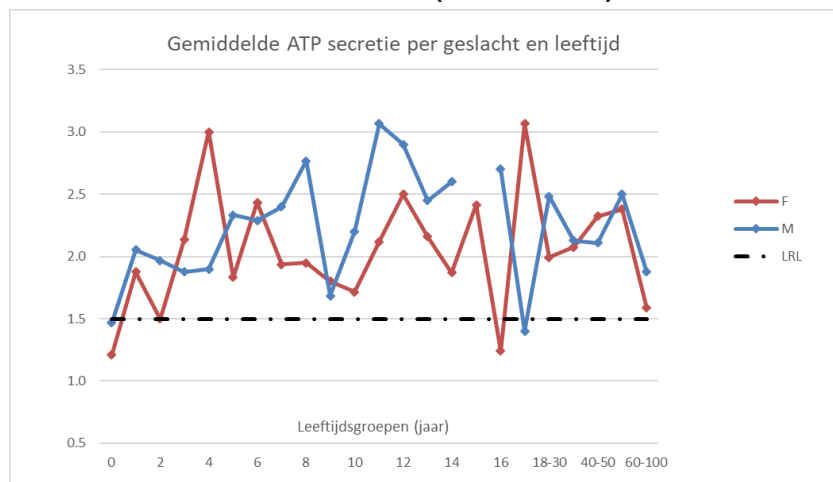
### Volledige dataset (n = 1044)



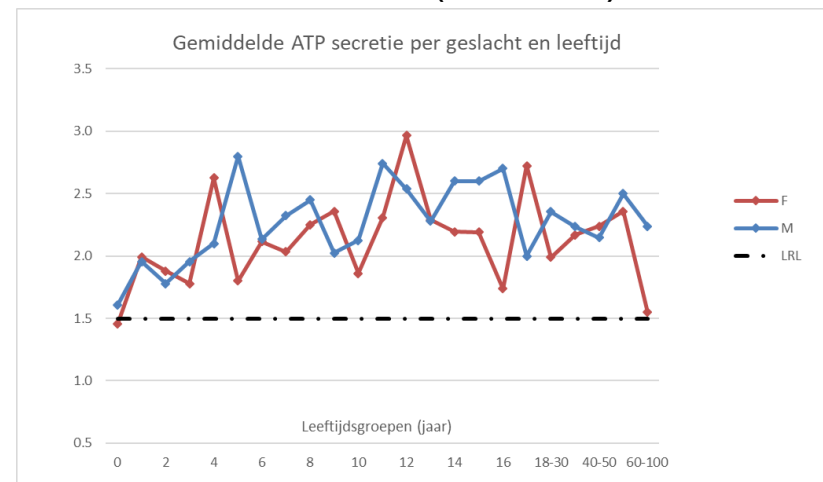
### Selectie 1 (n = 285)



### Selectie 2 (n = 347)



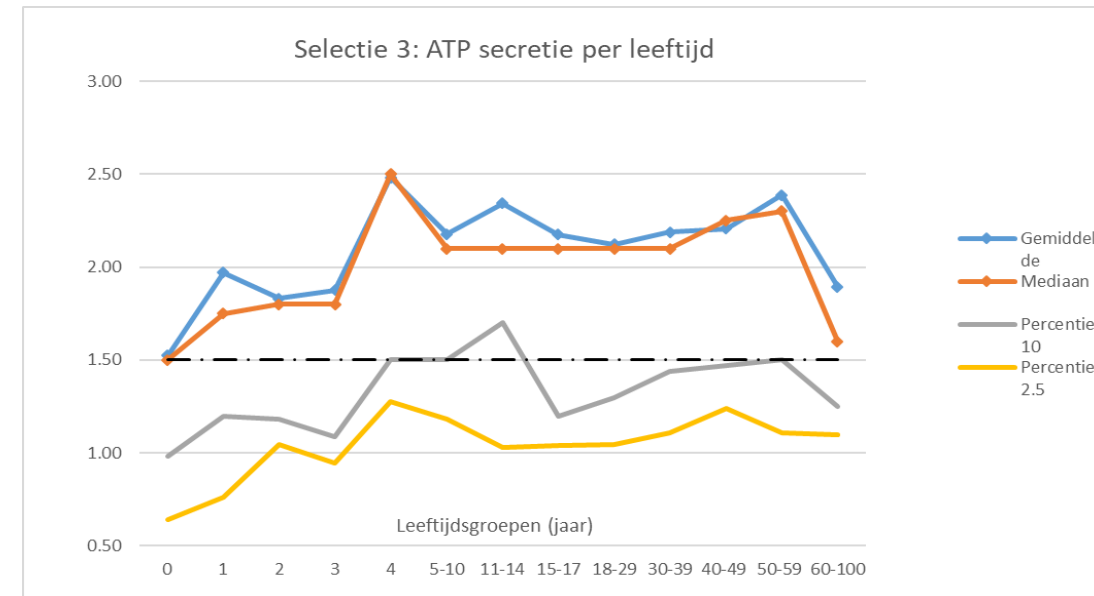
### Selectie 3 (n = 518)



# Appraisal – Deel 3:

## Voldoen de ATP secretietest referentiewaarden?

- Conclusie indirecte methode
  - Subgroepanalyse: ‘partition criteria’ van Harris en Boyd ( $Z > Z^*$ )  
→ differentiatie volgens leeftijd nodig voor subgroep 0, 1, 2 en 3 jaar
  - In database te weinig ‘gezonde’ stalen om per leeftijdscategorie referentiewaarden te bepalen  
→ overleg met pediaters
  - Huidige onderste referentielimiet ( $1.5 \mu\text{mol/L}$ ) is te hoog voor algemene populatie
  - Voorstel: vanaf 5 jaar onderste referentielimiet op  $1.1 \mu\text{mol/L}$  (p2.5)



# Appraisal – Deel 4:

## Kunnen we met ATP secretietest ook de inhoud van granulen nakijken?

- Huidige methode ATP secretietest: lumino-aggregometer van Chrono-log (model 700)
- Meting ATP inhoud:  
nood aan **nucleotide-extract** (o.b.v. PRP, ethanol en EDTA)  
MAAR andere matrix dan onbehandeld PRP → zeer hoge variabiliteit (CV 80%)
- Verschillende experimenten om betere reproduceerbaarheid te verkrijgen:
  - Type buffer
  - Verdunning
  - Temperatuur van extract
  - Temperatuur van reagens
  - Volgorde van pipetteren

Betere reproduceerbaarheid, maar CV nog steeds +/- 30%  
→ nog steeds te hoog voor routine gebruik

# Acties / To Do

- 1) Informeren van klinici over de lage sensitiviteit van lichtmicroscopie, PFA en LTA**  
→ gericht aanvragen van ATP secretietest, EM en/of genetische diagnostiek bij verdachte patiënten
- 2) Aanpassing van de referentiewaarden van de ATP secretietest bij patiënten vanaf 5 jaar**  
Bij voorkeur worden de berekende referentiewaarden nog getoetst bij een 20-tal gezonde vrijwilligers
- 3) In overleg gaan met pediaters omtrent de ATP secretietest bij kinderen < 5 jaar**  
→ optimalisatie rapportering
- 4) Verdere oppuntstelling van de ATP inhoud test op het Chrono-log toestel**  
Indien geen verdere optimalisatie mogelijk is, zal een op HPLC gebaseerde methode of breder gebruik van EM overwogen worden.



# Referenties

- Chen Y, Yuan Y, Li W. Sorting machineries: how platelet-dense granules differ from  $\alpha$ -granules. *Bioscience Reports* 2018;38(5):BSR20180458.
- Jurk K. Platelet granules – secretory and secretive. *Hamostaseologie* 2017;37(3):208–10.
- Gresele P, Falcinelli E, Bury L. Laboratory diagnosis of clinically relevant platelet function disorders. *International Journal of Laboratory Hematology* 2018;40(S1):34–45.
- Mumford AD, Frelinger AL, Gachet C, et al. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thromb Haemost* 2015;114(7):14–25.
- Gresele P, Bury L, Falcinelli E. Inherited Platelet Function Disorders: Algorithms for Phenotypic and Genetic Investigation. *Semin Thromb Hemost* 2016;42(3):292–305.
- Gresele P, Harrison P, Bury L, et al. Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a worldwide survey. *J Thromb Haemost* 2014;12(9):1562–9.
- Hayward CPM, Moffat KA, Brunet J, et al. Update on diagnostic testing for platelet function disorders: What is practical and useful? *Int J Lab Hematol* 2019;41(S1):26–32.
- M.W. Blaauwgeers, I. van Asten, A. Huisman, R.T. Urbanus, R.E.G. Schutgens. Congenitale trombocytopathie: huidige diagnostiek en toekomstperspectief. *Ned Tijdschr Hematol* 2016;13:332–40.
- Hayward CPM, Pai M, Liu Y, et al. Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009;7(4):676–84.
- Brunet JG, Iyer JK, Badin MS, et al. Electron microscopy examination of platelet whole mount preparations to quantitate platelet dense granule numbers: Implications for diagnosing suspected platelet function disorders due to dense granule deficiency. *Int J Lab Hem* 2018;40(4):400–7.

# Referenties

- Koltai K, Kesmarky G, Feher G, Tibold A, Toth K. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. *IJMS* 2017;18(8):1803.
- Hayward CPM, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK, 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(2):312–9.
- Kerényi A, Schlamadinger Á, Ajzner É, et al. Comparison of PFA-100 Closure Time and Template Bleeding Time of Patients with Inherited Disorders Causing Defective Platelet Function. *Thrombosis Research* 1999;96(6):487–92.
- Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, Lordkipanidzé M. Advances in Platelet Function Testing—Light Transmission Aggregometry and Beyond. *JCM* 2020;9(8):2636.
- Dupuis A, Bordet J-C, Eckly A, Gachet C. Platelet  $\delta$ -Storage Pool Disease: An Update. *JCM* 2020;9(8):2508.
- Freson K. Implementatie van een gen-panel test voor erfelijke bloeding, tromboses en bloedplaatjesaandoeningen. Presentatie UZ Leuven 17/11/2020.
- Downes K, Megy K, Duarte D, et al. Diagnostic high-throughput sequencing of 2396 patients with bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood* 2019;134(23):2082–91.
- Van Laer C., Jacquemin M., Peerlinck K., Freson K. Thrombogenomics implementation in Belgium. *Belg J Hematol* 2020;12(3):99–105.
- van Asten I, Blaauwgeers M, Granneman L, et al. Flow cytometric mepacrine fluorescence can be used for the exclusion of platelet dense granule deficiency. *J Thromb Haemost* 2020;18(3):706–13.
- Harrison P, Mackie I, Mumford A, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *British Journal of Haematology* 2011;155(1):30–44.

# Referenties

- Badin MS, Graf L, Iyer JK, Moffat KA, Seecharan JL, Hayward CPM. Variability in platelet dense granule adenosine triphosphate release findings amongst patients tested multiple times as part of an assessment for a bleeding disorder. *International Journal of Laboratory Hematology* 2016;38(6):648–57.
- von Papen M, Gambaryan S, Schütz C, Geiger J. Determination of ATP and ADP Secretion from Human and Mouse Platelets by an HPLC Assay. *Transfus Med Hemother* 2013;40(2):109–16.
- Gresele P, the Subcommittee on Platelet Physiology. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015;13(2):314–22.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). 2021; Available from: <https://omim.org/>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document EP28-A3c. 2008.
- Yardumian DA, Mackie IJ, Machin SJ. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. *Journal of Clinical Pathology* 1986;39(7):701–12.
- Jones GRD, Haeckel R, Loh TP, et al. Indirect methods for reference interval determination – review and recommendations. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 2019;57(1):20–9.
- Hoffmann JJML, van den Broek NMA, Curvers J. Reference Intervals of Reticulated Platelets and Other Platelet Parameters and Their Associations. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2013;137(11):1635–40.
- Lahti A. Partitioning biochemical reference data into subgroups: comparison of existing methods. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(7):725–33.
- Holmsen H, Storm E, Day HJ. Determination of ATP and ADP in blood platelets: a modification of the firefly luciferase assay for plasma. *Anal Biochem* 1972;46(2):489–501.

# Referenties

- Holmsen H, Dangelmaier CA. Measurement of secretion of adenine nucleotides. In: Methods in Enzymology. Academic Press; 1989,p.195–205.Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668798969060X>
- Gunning WT, Raghavan M, Calomeni EP, et al. A Morphometric Analysis of Platelet Dense Granules of Patients with Unexplained Bleeding: A New Entity of Delta-Microgranular Storage Pool Deficiency. JCM 2020;9(6):1734.
- Wojenski CM, Schick PK. Development of storage granules during megakaryocyte maturation: accumulation of adenine nucleotides and the capacity for serotonin sequestration. J Lab Clin Med 1993;121(3):479–85.
- White MM, Foust JT, Mauer AM, Robertson JT, Jennings LK. Assessment of lumiaggregometry for research and clinical laboratories. Thromb Haemost 1992;67(5):572–7.
- Soslau G., Parker J. The Bioluminescent Detection of Platelet Released ATP: Collagen-induced Release and Potential Errors. Thrombosis Research 1992;66:15–21.
- Bain B.J. Blood Cells: A Practical Guide, 5th edition. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2015.
- George JN. Platelets. The Lancet 2000;355(9214):1531–9.