

Activación plaquetaria inducida durante la hemodiálisis: importancia del tipo de membrana

J. López Pedret, Aleix Cases, Ginés Escolar

Resumen

La GMP-140 es una proteína presente en los gránulos X plaquetarios. Utilizando un anticuerpo monoclonal específico hemos estudiado la activación plaquetaria durante la hemodiálisis con membranas que cuprophan en 8 pacientes.

Las muestras de sangre se obtuvieron antes de la HD (muestra I), al inicio de la HD de las líneas arterial (muestra II) y venosa (muestra III) y la segunda hora de HD de línea venosa (muestra IV).

La exposición de la GMP-140 se estudió mediante citometría de flujo (FACS).

Durante la HD existe una activación plaquetaria potente y progresiva. La repetida activación plaquetaria inducida por la hemodiálisis podría jugar un papel en la trombopenia urémica mediante el consumo preferente de aquellas plaquetas metabólicamente más activas y favorecer el desarrollo y progresión de la arterioesclerosis de estos pacientes. El grado de activación plaquetaria depende de la biocompatibilidad de la membrana.

PALABRAS CLAVE: Hemodiálisis. Activación plaquetaria. Biocompatibilidad.

Platelet activation induced during haemodialysis: the importance of the type of membrane.

GMP-140 is a protein which is present in the X granules of platelets. Using a specific monoclonal antibody we have studied platelet activation during haemodialysis with cuprophan membranes in 8 patients.

Samples of blood were taken before HD (sample I), at the beginning of HD from arterial (sample II) and venous (sample III) lines and after two hours of HD from the venous line (sample IV).

Exposure of GMP-140 was studied by means of flow cytometry (FACS).

During HD there is a powerful and progressive platelet activation. Repeated platelet activation induced by haemodialysis could play a role in a uraemic thrombopenia due to the preferential consumption of those platelets which are metabolically more active and favour the development and progression of arterioesclerosis in these patients. The degree of platelet activation depends on the biocompatibility of the membrane.

KEY WORDS: Haemodialysis. Platelet activation. Biocompatibility.

Hospital Clinic I Provincial
Barcelona

Introducción

La activación plaquetaria hasta muy recientemente se ha medido mediante métodos indirectos, determinando los niveles séricos de algunas sustancias liberadas por las plaquetas activadas (1-3). Recientemente se ha postulado que la detección de algunas proteínas expuestas en la superficie de la membrana de las plaquetas estimuladas sería un método más fiable para el diagnóstico de estados precoces de trombosis clínica (4). *La GMP-140 (CD62) es una proteína presente en los gránulos alfa plaquetarios que se expone selectivamente en la superficie de las plaquetas activadas con trombina (5, 6). Estudios recientes han demostrado que esta proteína se expone bajo diversas situaciones clínicas que implican activación plaquetaria (7-11).*

La hemodiálisis es una técnica de depuración extrarrenal que implica la circulación de la sangre del paciente a través de un circuito extracorpóreo con un stress mecánico de tipo intermedio y la exposición de esta sangre a superficies artificiales, factores ambos capaces de inducir activación plaquetaria.

Los pacientes urémicos presentan una diátesis hemorrágica en la cual se han implicado alteraciones plasmáticas y plaquetarias (12, 13). *Inicialmente se describió que la diálisis, tanto hemodiálisis como diálisis peritoneal, mejoraba el defecto hemostático en los pacientes urémicos (14). Sin embargo, la repetida activación de las plaquetas durante la hemodiálisis podría contribuir al desarrollo de la trombopatía. De hecho, es conocido que los pacientes en diálisis peritoneal, en los que no existe una activación plaquetaria repetida, presentan un menor grado de disfunción plaquetaria que los pacientes en hemodiálisis (15).*

Los objetivos del presente trabajo fueron analizar la activación plaquetaria determinada mediante la exposición de proteínas de activación en la superficie de la membrana por citometría de flujo y análisis ultraestruc-

tural de las plaquetas y comparar el grado de activación plaquetaria inducida por diferentes membranas en hemodiálisis "in vivo".

Pacientes y métodos

Protocolo 1. *Objetivo: Estudiar la activación plaquetaria durante la hemodiálisis*, analizando la exposición de proteínas de activación en la superficie de la membrana de las plaquetas y mediante análisis ultraestructural de las mismas.

A. Pacientes

Se estudiaron 8 *pacientes hemodializados*, 6 varones y 2 mujeres, con una edad media de 51 años (intervalo 32-72 años) y con un tiempo medio de estancia en HD de 48 meses (intervalo 3-122 meses). La hemodiálisis se realizó en todos los pacientes con un dializador capilar con membrana de cuprophane de 1 m² de superficie (ST-15, Travenol Lab Inc., Deerfield, IL, USA). Ninguno de los pacientes estudiados había tomado aspirina u otras drogas que afecten el funcionalismo plaquetario en las dos semanas previas al estudio, ni recibían tratamiento con rHuEPO.

Las muestras se obtuvieron antes de iniciar la sesión de hemodiálisis (muestra I) y de las líneas arterial (muestra II) y venosa (muestra III) simultáneamente al cabo de 15 minutos de iniciada la sesión de hemodiálisis, y de la línea venosa a las 2 horas del inicio de la HD (muestra IV). A fin de evitar una mayor activación durante la manipulación, las muestras de sangre (5 ml) se recogieron en tubos de polipropileno que contenían CPD (0.7 ml, pH 5.75: citrato sódico dihidrato, ácido cítrico monohidrato, dextrosa y fosfato disódico anhidro) como anticoagulante y 100 µl de paraformaldehído al 8% como fijador. En estudios previos se ha demostrado que la GMP-140 se mantiene en plaquetas fijadas. El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo por centrifugación a 120 x g durante 20 minutos. Las plaquetas fijadas en el PRP fueron aisladas por centrifugación a 1000 x g durante 15 minutos y resuspendidas en 0.2 ml de tampón PBS, refijadas en 2 ml de PBS con paraformaldehído al 1% y conservadas a 4°C hasta la realización de estudios posteriores.

En este protocolo se analizó la exposición de la GMP-140 por citometría de flujo mediante técnicas de marcaje simple y doble, explicadas más adelante, y estudio ultraestructural con microscopía electrónica.

Protocolo 2. *Objetivo: Analizar el grado de activación plaquetaria inducida durante la sesión de hemodiálisis por diferentes membranas "in vivo"*.

A. Pacientes

Se incluyeron en este estudio 9 *pacientes* afectados de insuficiencia renal crónica terminal en programa de he-

modiálisis periódica (7 hombres y 2 mujeres; edad media 62 años, intervalo 34-74 años, tiempo medio en HD 27 meses, intervalo 13-52 meses). En estos pacientes se determinó la activación plaquetaria inducida por diferentes tipos de membranas de hemodiálisis, siendo los pacientes controles de sí mismos. Ninguno de los pacientes había tomado aspirina u otros fármacos que afecten al funcionalismo plaquetario ni recibían tratamiento con rHuEPO durante el periodo en que se realizaron los estudios. Los estudios se realizaron siempre en la segunda sesión de hemodiálisis de la semana y se mantuvieron constantes en cada estudio las dosis de heparina y el flujo de sangre por minuto, con el fin de que la única variable no controlada fuera el tipo de membrana utilizada. Las condiciones del estudio fueron similares a las descritas en el protocolo 1. *Todos los dializadores evaluados eran de tipo capilar de una superficie similar* y con los siguientes tipos de membranas: Cuprophane (ST 15, Travenol, Deerfield, USA), Acetato de celulosa (CA 110, Nissso Corp, Osaka, Japón), Triacetato de celulosa (CT-110G, Nissso Corp, Osaka, Japón), Polimetilmetacrilato (Filtrizer, Toray Industries Inc, Japón), Polisulfona (HFT 10, Sorin Biomédica, Saluggia, Italia) y Poliacrilonitrilo (AN69) (Filtral IQ, Hospal, Meyzieu, Francia).

Las muestras de sangre se obtuvieron antes de iniciar la hemodiálisis (muestra I) y después de 15 minutos de iniciar la misma de las líneas arterial (muestra II) y venosa (muestra III). El análisis de la exposición de la GMP-140 se realizó mediante citometría de flujo con técnica de doble marcaje.

Métodos

Citometría de flujo

Técnica del marcaje simple: La exposición de la GMP-140 en la superficie de las plaquetas se midió mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Las plaquetas fijadas se lavaron por dos veces con tampón PBS pH 7.2 (Bio Mérieux, Marcy-l'Etoile, France) conteniendo albúmina bovina sérica al 1% y 1% de suero humano AB. Tras el lavado, las plaquetas se incubaron durante 1 hora a 4°C con un anticuerpo primario dirigido frente a la GMP-140 (CD62). Este anticuerpo (RUU 2.17) ha demostrado reconocer a la GMP-140 en estudios de immunoblotting y por inmunohistoquímica (16). Tras la incubación primaria, las plaquetas se lavaron dos veces con PBS pH 7.2 suplementado con albúmina bovina sérica y suero humano AB. Inmediatamente después, las muestras de plaquetas se incubaron durante 1 hora a 4°C con el anticuerpo secundario (IgG de cabra antirratón marcado con fluoresceína: Menarini, Badalona, Spain). El anticuerpo no fijado se eliminó mediante lavados repetidos de la muestra con PBS.

Técnica de doble marcaje: Las plaquetas se incubaron primero con un anticuerpo frente a la glicoproteína Ib (CD42b), a fin de reconocer de forma específica las pla-

quetas, y posteriormente revelado con un anticuerpo marcado con ficoeritrina (detectable a 585 nm). Las plaquetas fueron marcadas posteriormente para la GMP-140, tal como se ha descrito anteriormente.

El análisis de las muestras se realizó por citometría de flujo en un FACScan (Beckton, Dickinson, Mountain View, CA, USA). Las plaquetas se seleccionaron utilizando las ventanas FSC y SSC (forma y tamaño) y leído en FU (530 nm) en la técnica de marcaje simple, y por medio de la ventana FL2 (fluorescencia a 585 nm) y secundariamente a través de las ventanas FSC y SSC para la técnica de doble marcaje. A las curvas de distribución se les aplicó el test de Kolmogorov-Smirnoff y se registró la diferencia observada en el canal con la mayor diferencia.

Microscopía electrónica

Alícuotas de 200 μ l de plaquetas fijadas conteniendo 800.000 plts/p] se incubaron durante 30 minutos con 10 μ l del anticuerpo monoclonal RUU 2.17. Las plaquetas fueron lavadas tres veces mediante centrifugación y resuspensión en tampón PBS y después incubadas durante 30 minutos con 25 μ l IgG de cabra antirratón marcada con oro coloidal (Janssen Pharmaceutica, Holanda) en una solución 1:8 (v:v) de 0.02 M tampón Tris. Las plaquetas marcadas se lavaron tres veces en PBS pH 7.4, fijadas en glutaraldehído al 2% y cacodilato 0.1%; posteriormente se fijaron en ácido ósmico al 1% durante 15 minutos y procesadas para microscopía electrónica. La observación de las secciones ultrafinas se realizaron en un microscopio electrónico Philips modelo EM201.

Se realizó una cuantificación morfométrica de los cambios morfológicos y del marcado con oro. Las fotografías se obtuvieron a partir de secciones ultrafinas de plaquetas. Se evaluó el porcentaje de plaquetas no estrictamente discoideas utilizando un analizador morfométrico semiautomático (MOP 20, Kontron, Zurich, Suiza).

Los criterios para incluir una plaqueta como estrictamente discoide se obtuvieron primeramente en secciones de plaquetas de la muestra I. El área (A), perímetro (P) y factor forma (F) ($F=40A/P^2$) se calcularon en 10 plaquetas obtenidas al azar de cada muestra I. El área y factor forma medios derivados de estos cálculos fueron 2.898 \pm 0.890 μ m² y 0.5955 \pm 0.1117, respectivamente.

El factor forma da una medida precisa de las irregularidades en la forma. En un círculo perfecto (F=1), las desviaciones del círculo resultaban en un menor factor forma y estructuras muy irregulares resultaban en un factor forma cercano a F=0. Los valores obtenidos en plaquetas correspondían a las formas ovoide/discoide. En las muestras restantes (II y III), se excluyeron plaquetas con áreas inferiores a 2.076 μ m² (media IDS de las observaciones control). La plaqueta que cumplía estos requisitos previos se consideraba como no estrictamente discoide cuando su factor forma era inferior a 0.4827

(media - IDS de las observaciones control). La plaqueta que no cumplía estos criterios implicaba que la relación perímetro/área expresada por el factor forma estaba claramente desviada de la forma discoide regular hacia una forma más irregular.

El número de partículas de oro asociadas a la membrana se determinó en fotografías de microscopía electrónica obtenidas a 60.000 aumentos. La longitud perimétrica de la membrana se obtuvo delineando el perfil plaquetario sobre la tabla digitalizadora de un analizador morfométrico. El número de partículas de oro por μ m (o por plaqueta) se determinó morfométricamente.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media-DS. Para el análisis de los resultados se utilizó el test de la t de Student para datos apareados. Se consideraron como significativos valores de $p<0.05$.

Resultados

Protocolo 1:

A) *Citometria con marcaje simple*: Mediante la técnica de marcaje simple se observó un aumento de la exposición de la GMP-140 en la muestra III (obtenida de la línea venosa al inicio de la hemodiálisis) (12.3 \pm 5%, $p<0.01$ respecto a la muestra II), respecto a las muestras I, II y IV. No se observaron diferencias entre las muestras I, II y IV (Figuras 1 y 2).

B) *Citometria de flujo con doble marcaje*: con la técnica de doble marcaje se observó un incremento de la exposición de la GMP-140 en las muestras III y IV ($p<0.05$) respecto a las muestras I y II. No se observaron diferencias entre las muestras I, II ni entre la III y IV (Figuras 3 y 4).

C) *Estudio ultraestructural*: se observó un incremento progresivo durante la hemodiálisis de plaquetas no discoideas (activadas). El porcentaje de plaquetas no discoideas fue: muestra I 7.9 \pm 4.1%, muestra II 8.5 \pm 7% ($p=NS$ respecto a I), muestra III (29.1 \pm 3.3%, $p<0.01$ respecto a I y II) y muestra IV 54.3 \pm 8.4% ($p<0.01$ respecto a III y I). Asimismo se observó un incremento progresivo de la exposición de la GMP-140 en los estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos marcados con oro coloidal en las muestras III (19.7 \pm 6.1%, $p<0.05$ respecto a I) y IV (41.4 \pm 11.6%, $p<0.05$ respecto a III). Tampoco se observaron diferencias entre las muestras I y II (Figura 5).

Protocolo 2:

No había diferencias en la expresión de la GMP-140 entre las muestras obtenidas antes de la sesión de hemodiálisis y las muestras obtenidas de la línea arterial al inicio de la diálisis para ninguna de las membranas evq-

Figura 1. Intensidad de fluorescencia observada después del marcado simple con el anticuerpo fluoresceinado secundario. No se observaron diferencias en la intensidad de fluorescencia entre las muestras I y II tras la incubación con RUU 2.17. Se observó un aumento de la exposición de GMP-140 en las muestras obtenidas de la vía eferente a los 15 minutos del inicio de la hemodiálisis (muestra III).

EXPRESION DE GMP140

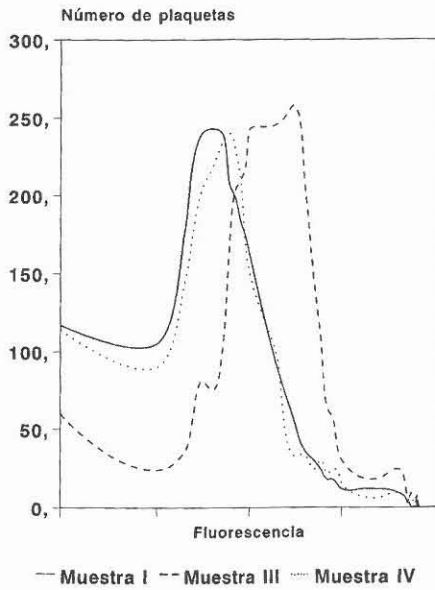


Figura 2. Diferencias de las áreas obtenidas aplicado el test de Kolmogorov-Smirnoff a las curvas de distribución. Las barras representan la media de los porcentajes de desplazamiento de la intensidad de fluorescencia en las plaquetas marcadas con RUU 2.17 con respecto a la muestra basal (\pm DS). Fueron estadísticamente significativas las diferencias observadas entre la muestra I y la III ($p < 0.01$). No se observaron diferencias en la exposición de GMP-140 en la muestra IV frente a la muestra basal.

EXPRESION DEL AcMo RUU-2.17 Aumento con respecto a la basal

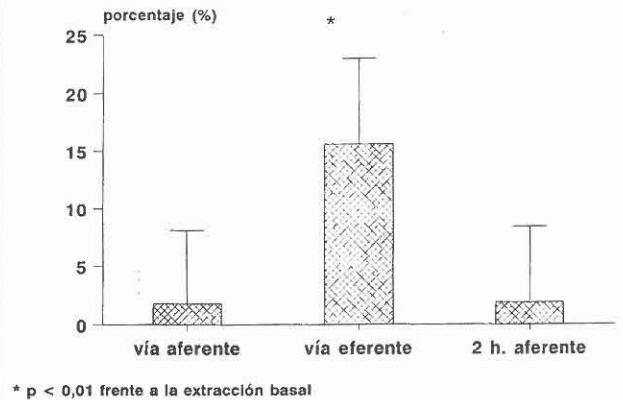


Figura 3. Intensidad de fluorescencia observada después del marcado doble. Se observó un aumento de la expresión de GMP-140 en las muestras III y IV.

EXPRESION DE GMP140 Doble marcado

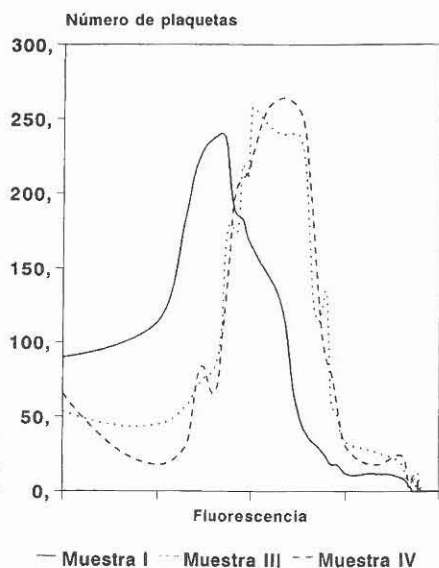
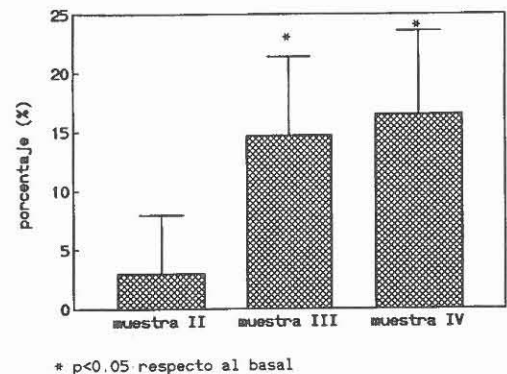


Figura 4. Diferencias de las áreas obtenidas aplicando el test de Kolmogorov-Smirnoff. Las barras representan la media de los porcentajes de desplazamiento de la intensidad de fluorescencia de las plaquetas marcadas con RUU 2.17 con respecto a la muestra basal (\pm DS). Fueron significativas las diferencias entre las muestras III y IV y la muestra I (basal) ($p < 0.05$).

EXPRESION DEL AcMo RUU-2.17 CON DOBLE MARCAJE Aumento con respecto a la basal



luadas. Sin embargo, se observó un desplazamiento significativo hacia la derecha en las muestras obtenidas de la línea venosa al inicio de la sesión de hemodiálisis respecto a las muestras obtenidas simultáneamente de la línea arterial en todas las membranas evaluadas (fig 6). Sin embargo, el grado de activación era diferente según el tipo de membrana: Cuprophane $13.95 \pm 3.94\%$, acetato de celulosa $7.4 \pm 4.52\%$, polimetilmetacrilato $6.93 \pm 4.6\%$, triacetato de celulosa $6.89 \pm 5.5\%$, polisulfona $3.83 \pm 2\%$ y poliácilonitrilo (AN-69) $2.14 \pm 2.21\%$. El cuprophane indujo una activación plaquetaria superior a cualquier otra membrana estudiada ($p < 0.05$), el acetato de celulosa, triacetato de celulosa y polimetilmetacrilato indujeron mayor activación que la polisulfona o el AN-69 ($p < 0.05$). No habían diferencias significativas en la activación plaquetaria inducida por acetato de celulosa, triacetato de celulosa y polimetilmetacrilato o entre la activación inducida por polisulfona o AN-69 (Figura 6).

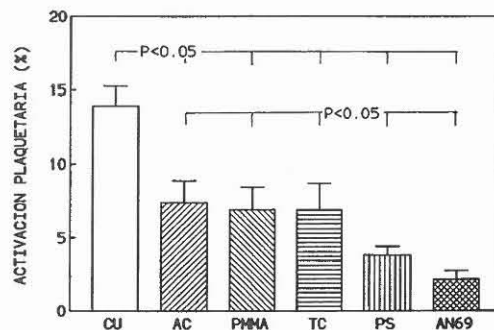
Discusión

Los resultados de nuestro estudio demuestran que durante la hemodiálisis existe una activación plaquetaria que es precoz, potente y progresiva a lo largo de la sesión. El estudio citométrico demostró una exposición precoz de la GMP-140. Sorprendentemente, cuando utilizamos la técnica de marcaje simple se observó una disminución aparente de la exposición de la GMP-140 durante la 2.^a hora de hemodiálisis, en aparente contradicción con los resultados de la técnica de marcaje doble (en la que se observó una estabilización de la activación) o los estudios ultraestructurales que demostraron un incremento progresivo de la activación plaquetaria. Estas discrepancias podrían explicarse porque los cambios en la forma y tamaño de las plaquetas, así como la existencia de un cierto grado de fragmentación de las mismas podría inducir que algunas partículas plaquetarias no alcanzaran el umbral establecido inicialmente en el citómetro. Este inconveniente se resolvió parcialmente con la técnica de marcaje doble, en la cual las plaquetas son identificadas primero mediante un anticuerpo selectivo y la segunda determinación se realizó solamente para aquellos corpúsculos positivos para la primera tinción.

Los resultados previos sobre expresión de la GMP-140 en plaquetas activadas durante la hemodiálisis no son uniformes. Mientras algunos autores no han observado un aumento de la expresión de la GMP-140 en las plaquetas medida mediante citometría de flujo durante la hemodiálisis "in vivo" (3) e "in vitro" (3,17), otros autores han demostrado un incremento significativo de la expresión de esta proteína (18) de acuerdo con nuestros resultados. Estas discrepancias podrían ser debidas a los diferentes anticuerpos monoclonales utilizados, diferencias en el tiempo de extracción de muestras y sobre todo al hecho que la mayoría de autores utiliza la técnica de marcaje simple, que como hemos demostrado en

Figura 6. Aumento medio de la expresión de la GMP-140 en la línea eferente obtenida a los 15 minutos del inicio de la hemodiálisis. CU: cuprophane, AC: acetato de celulosa, TC: triacetato de celulosa, PMMA: polimetilmetacrilato, PS: polisulfona y AN-69: poliácilonitrilo. $X \pm \text{es.m.}$

ACTIVACION PLAQUETARIA INDUCIDA POR DIFERENTES MEMBRANAS



este estudio, presenta una serie de limitaciones.

El hecho que no se hayan observado diferencias entre las muestras obtenidas antes de iniciar la hemodiálisis y las muestras obtenidas de la línea arterial al inicio de la sesión, cuando el paciente ya está heparinizado, sugiere que la heparina no jugaría un papel relevante en la inducción de activación plaquetaria durante la hemodiálisis.

El segundo protocolo fue diseñado para evaluar el grado de activación plaquetaria inducido por diferentes membranas de hemodiálisis. Nuestros resultados indican que durante la sesión de hemodiálisis existe una activación plaquetaria desde las fases precoces inducida por la membrana. Además observamos que el grado de activación plaquetaria depende de la composición de la membrana evaluada, ya que otras posibles variables que pudieran jugar un papel en la activación plaquetaria (reología, dosis de heparina y día de hemodiálisis) se mantuvieron constantes a lo largo del estudio, mientras que la geometría y superficie del dializador eran similares en los distintos dializadores. El papel que juega el tipo de membrana sobre la activación plaquetaria durante la hemodiálisis es controvertido en la literatura. Mientras algunos autores describen que las membranas celulósicas inducen mayor activación plaquetaria que las membranas de fibras artificiales (2,19,20), otros autores no observan diferencias en la activación plaquetaria inducida por diferentes membranas (17,21). Nuestros resultados, determinando de forma directa el porcentaje de plaquetas activadas, demuestran que el nivel de activación plaquetaria es inversamente proporcional al grado de biocompatibilidad de la membrana evaluada, de acuerdo con lo descrito por la mayoría de autores.

La activación plaquetaria repetida durante la hemodiálisis podría inducir algún grado de refractoriedad de

las plaquetas, ya que induciría la activación, y el consiguiente consumo, preferentemente de aquellas plaquetas metabólicamente más activas, lo que podría contribuir al defecto del funcionalismo plaquetario descrito en los pacientes urémicos (12, 13). En este sentido, se ha observado un deterioro de la agregación plaquetaria en muestras obtenidas de la línea venosa (22) y diversos estudios han confirmado **la existencia de un deterioro del funcionalismo plaquetario intradiálisis** (1, 20, 22, 23). Además, se ha demostrado que las plaquetas activadas que han liberado **selectivamente los gránulos pueden permanecer circulantes** durante mucho tiempo, aunque funcionalmente estén alteradas (10). Por otra parte, la repetida activación de las **plaquetas y la consiguiente liberación de mediadores contenidos en sus gránulos con importantes efectos vasoactivos**, proagregantes, quimiotácticos y proliferativos (platelet-derived growth factor, epidermal growth factor, transforming growth factor B, etc) podrían ser responsables, al menos en parte, de la arteriosclerosis acelerada descrita en estos pacientes (24). En este sentido, se han descrito aumentos de **los niveles plasmáticos de estos factores de crecimiento** en pacientes hemodializados (25, 26), así como un incremento de la actividad mitogénica durante la hemodiálisis con membranas de cuprophane (27).

Por consiguiente, este estudio demuestra que la técnica de hemodiálisis induce activación plaquetaria, aunque el grado de trombogenicidad depende de la biocompatibilidad de la membrana utilizada. Sin embargo, se requieren más estudios para demostrar el hipotético efecto beneficioso que sobre el funcionalismo plaquetario u otros efectos secundarios atribuidos a la repetida activación plaquetaria en los pacientes hemodializados pudiera tener el uso a largo plazo de las membranas más biocompatibles.

Conclusiones

1. Durante la hemodiálisis existe una activación plaquetaria precoz, potente y progresiva a lo largo de la sesión.

2. La activación plaquetaria recurrente que sufren los pacientes hemodializados podría jugar un papel en la fisiopatología de la trombopatía que presentan estos pacientes, mediante el consumo de aquellas plaquetas metabólicamente más activas. Además, la liberación de las **citoquinas contenidas en sus gránulos durante la activación** podrían favorecer el desarrollo de la arteriosclerosis.

3. El grado de activación plaquetaria durante la hemodiálisis depende de la naturaleza de la membrana utilizada, y es inversamente proporcional al grado de biocompatibilidad de la misma.

4. La utilización de membranas biocompatibles podría inducir a largo plazo un menor efecto nocivo sobre la trombopatía y la arteriosclerosis acelerada que presentan **estos pacientes respecto a las membranas celulares, aunque se precisan estudios posteriores que confirmen estas aseveraciones.**

5. La citometría de flujo es una técnica sensible para **detectar activación durante la hemodiálisis, aunque presenta algunas limitaciones, especialmente la técnica de marcaje simple.**

Bibliografía

- Green D, Santhanam S, Krumlovsky FA, del Greco F. Elevated B-thromboglobulin in patients with chronic renal failure: effect of hemodialysis. *J Lab Clin Med* 95: 679-685, 1980.
- Adler AJ, Berlyne GM. B-thromboglobulin and platelet factor-4 levels during hemodialysis with polyacrylonitrile. *Trans Am Soc Nephrol* 4: 100-102, 1981.
- Gawaz MP, Ward RA. Effects of hemodialysis on platelet-derived thrombospondin. *Kidney Int* 40: 257-265, 1991.
- Abrams Ch, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemostasis* 1991; 65: 467-473.
- McEver RP, Martin MN: A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem* 259: 9799-9804, 1984.
- McEver RP: Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. *Blood Cells* 16: 73-83, 1990.
- George JN, Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N, and Newman PJ: Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest* 78: 3403-348, 1986.
- Metzelaar MJ, Sixma JJ, and Nieuwenhuis HK: Detection of platelet activation using specific monoclonal antibodies. *Blood Cells* 16: 85-96, 1990.
- Bernan CL, Veo EL, Weneel-Drake JD, Furie BC, Ginsburg MH, Furie B: A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. *J. Clin Invest* 78: 130-137, 1986.
- Harker LA, Malpass TW, Branson HE, Hassell EA, Slichter SJ: Mechanism of abnormal bleeding in patients undergoing cardiopulmonary bypass: acquired transient platelet dysfunction associated with selective alpha-granule release. *Blood* 56:824-834, 1980.
- George JN, Pickett EB, Heinz R. Platelet membrane glycoprotein changes during the preparation and storage of platelet concentrates. *Transfusion* 1988; 28: 123-126.
- DiMinno G, Martinez J, McKean M, De la Rosa J, Burke J, Murphy S. Platelet dysfunction in uremia. Multifaceted platelet defect partially corrected by dialysis. *Am J Med* 79: 552-559, 1985.
- Castillo R, Lozano T, Escolar G, Revert L, Lopez J, Ordinas A. Defective platelet adhesion on vessel subendothelium in uremic patients. *Blood* 68: 337-342, 1986.
- Stewart JH, Castaldi PA. Uraemic bleeding. A reversible platelet defect corrected by dialysis. *Q J Med* 36: 409-423, 1967.

15. Nenei GG, Berrelini M, Agnelli G, Parise P, Buoncristiani U, Ballatori E. Effect of peritoneal dialysis, haemodialysis and kidney transplantation on blood platelet function. *Nephron* 23: 287-292, 1979.
16. Metzelaar MJ, Sixma JJ, Neuwenhuys HK: Activation dependent mAb recognizing a 140 kD platelet α -granule membrane protein, expressed after activation. In *Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens*. Edited by Knapp W, Dorken B, Rieber P, Schmidt RE, Stein H, von dem Borne AEG Kr (eds). Oxford University Press 1989. pp 1039-1040.
17. Sultan Y, London GM, Goldfarb B, Toulon P, Marehais SJ. Activation of platelets, coagulation and fibrinolysis in patients on long-term hemodialysis: influence of cuprophane and polyacrylonitrile membranes. *Nephrol Dial Transplant* 5: 362-368, 1990.
18. Deguchi N, Ohgashi, Tazaki H, Handa M, Ikeda Y. Haemodialysis and platelet activation. *Nephrol Dial Transplant* 6 (suppl 2): 40-42, 1991.
19. Sreeharan N, OC - MJ, Salter MCP, Donaldson DR, Rajah SM, Davison AM. Membrane effect on platelet function during hemodialysis: a comparison of cuprophane and polycarbonate. *Artif Organs* 6: 324-327, 1982.
20. Knudsen F, Nielsen AH, Kristensen SO. The effect of dialyser membrane material on intradialytic changes in platelet count, platelet aggregation, circulating platelet aggregates and antithrombin III. *Scand J Urol Nephrol* 19: 227-232, 1985.
21. Rcmuzzi A, Boeardo P, Benigni A. In vitro platelet adhesion to dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant* 6 (suppl 2): 3639, 1991.
22. Levin RO, Kwaan HC, Ivanovich P. Changes in platelet function during dialysis. *J Lab Clin Med* 92: 779-786, 1978.
23. Berrettini M, Buoneristiani U, Pariser P, Ballatori E, Nenci GG. Polyacrylonitrile versus cuprophane membranes for hemodialysis: evaluation of efficiency and biocompatibility by platelet aggregation studies. *Int J Artif Organs* 4: 218-222, 1981.
24. Lindner A, Charra B, Sherrard D. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 290: 697-701, 1974.
25. Schmidt GW, Moake JL, Rudy CK, Viks SL, Hamburger RJ. Alterations in hemostatic parameters during hemodialysis with dialyzers of different membrane composition and flow design. *Am J Med* 83: 411-418, 1987.
26. Lev-Ran A, Hwang DL, Ahmad B, Bixby II. Immunoreactive EGF in serum, plasma, platelets and urine of patients on chronic dialysis. *Nephron* 57: 164-166, 1991.
27. Hemmendinger S, Neumann MR, Beretz A, Klein-Soyer C, Cazenave JP, Rieh A, Sehn O, Jahn M. Mitogenic activity in human arterial smooth muscle cell is increased in the plasma of patients undergoing hemodialysis with cuprophane membranes. *Nephron* 53: 147-151, 1989.