

Resultaat onderzoek 2001

- Project 99.003 "Faktor XI: een risicofactor voor trombose"
- Project 99.004 "The in vivo contribution of monocytic tissue factor expression to thrombosis"
- Project 20.002 "De moleculaire basis van verworven APC-resistentie tijdens pilgebruik en zwangerschap"

Project 99.003 "Faktor XI: een risicofactor voor trombose"

A. Vraagstelling onderzoek

Met behulp van een diermodel met verhoogde factor XI spiegels zal het mechanisme worden onderzocht wat verantwoordelijk is voor het tromboserisico.

B. Welke delen van de vraagstelling werden in het verslagjaar beantwoord?

In deze periode werd een diermodel opgezet, waarin het effect van verhoogde niveaus van factor XI op het oplossen van stolsels in de long werd onderzocht. Hiervoor werd een radioactief gemaakt stolsel verpulverd en in de staartvene van muizen ingespoten. De kleine stolseltjes komen dan in de long vast te zitten en worden door het normale fibrine oplossend systeem, de fibrinolyse, opgeruimd. Het idee was dat verhoogde niveaus van factor XI het oplossen van de stolsels zou vertragen. Dit werd echter niet gevonden en het maakte hierbij niet uit of de verhoogde niveaus van factor XI aanwezig waren bij het maken van de radioactieve stolsels of in de circulatie van de muis. Dit betekende dat het ons niet gelukt was om in dit diermodel de hypothese van de studie te bevestigen. Hoewel het niet helemaal uit te sluiten is dat het bestudeerde model niet optimaal was, was het misschien ook mogelijk dat de epidemiologische bevinding, dat verhoogde factor XI niveaus samengaan met een verhoogd risico op veneuze trombose, niet veroorzaakt wordt door een causaal verband, maar dat er andere factoren invloed hebben op zowel de verhoging van factor XI als het risico op trombose. Dit zou ook de verklaring kunnen zijn voor andere associaties van stollingsfactoren met trombose, zoals voor factor VIII en factor IX. Een geschikte kandidaat voor een effect op zowel stollingsfactoren als trombose is een ontstekingsreactie. Om dit te onderzoeken is een vrijwilligersstudie opgezet, waarin we het effect van een activator van de ontsteking (endotoxine) op de niveaus van stollingsfactoren in de tijd hebben bestudeerd. De resultaten van deze studie lieten zien dat het niveau van stollingsfactoren drastisch verandert als gevolg van ontstekingsactivatie. Een verhoging was te zien van factoren VIII, IX, X en XI. Niet alle stollingsfactoren werden verhoogd: factor VII niveaus werden bijvoorbeeld verlaagd. Deze reacties van stollingsfactoren op een ontstekingsactivator zou kunnen verklaren dat sommige stollingsfactoren als indicatoren van veneuze trombose kunnen worden beschouwd. Of er ook een oorzakelijk verband is tussen de verhoogde niveaus van stollingsfactoren en veneuze trombose wordt dan minder waarschijnlijk.

C. Welke aspecten van de kennis over trombose worden met het onderzoek gediend?

Epidemiologisch onderzoek heeft duidelijk gemaakt dat de 10% van de bevolking met de hoogste factor XI niveaus een ruim 2 maal zo grote kans heeft op trombose dan personen met lagere factor XI niveaus. Ongeveer 10% van de jaarlijkse trombosegevallen zou verklaard kunnen worden door hoog factor XI. In dit voorstel wilden we onderzoeken of in een diermodel het verhogen van factor XI in de circulatie leidt tot een protrombotisch risico. Onderzoek van het werkingsmechanisme van (verhoogd) factor XI moet leiden tot mogelijkheden om het risico te beperken. Op zich zijn er twee mogelijkheden voor de epidemiologische bevindingen: verhoging van factor XI is de oorzaak van het verhoogde risico op trombose, of de verhoging van factor XI is het gevolg van een andere oorzaak van trombose. Het onderzoek in diermodellen heeft geen aanwijzingen gegeven dat verhoging van factor XI rechtstreeks leidt tot een verhoogd risico op trombose. Het is echter niet uit te sluiten dat bij gebruik van andere dan de door ons gebruikte modellen er wel een causaal

verband zou kunnen worden gevonden. In het tweede deel van ons onderzoek zijn er wel aanwijzingen gevonden dat het voorkomen van een verhoogd gehalte van factor XI (alsook van andere stollingsfactoren) bij trombosepatiënten mogelijk veroorzaakt kan worden door een reactie van het lichaam op infecties of ontstekingen. Het belang van deze bevindingen moet in vervolgonderzoek verder worden onderzocht.

D. Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

Publicatie is in voorbereiding.

Project 99.004 "The in vivo contribution of monocytic tissue factor expression to thrombosis"

A. Vraagstelling onderzoek

Het doel van het onderzoek is vast te stellen wat de bijdrage van monocytair tissue factor is bij de initiatie en voortgang van de bloedstolling en ontstekingsreacties.

B. Welke delen van de vraagstelling werden in het verslagjaar beantwoord?

In de laatste fase van het project hebben we een belangrijke stap gezet in het beantwoorden van de vraagstelling. We zijn namelijk in staat geweest om 20 leukocyt TF deficiënte muizen te maken (helaas blijkt het aantal TF knock-out embryo's veel lager te liggen dan in de literatuur beschreven, zodat we 'slechts' 20 conditionele knock-out muizen hebben kunnen maken). Deze muizen hebben we blootgesteld aan een hoge dosis LPS teneinde de rol van leukocytair TF tijdens ontsteking te kunnen bepalen.

Voorlopige resultaten laten zien dat de muizen die geen TF op hun leukocyten tot expressie brengen minder ziek worden dan wildtype muizen na de toediening van LPS. De conditionele TF knock-out muizen vertonen ook een lagere cytokine respons dan hun wildtype controles. Tenslotte is ook de stollingsactivatie verlaagd in de knock-outs in vergelijking met de controles.

Deze experimenten wijzen uit dat leukocytair TF een 'slechte' rol speelt tijdens ontstekingsprocessen, het verhoogt de stollingsactivatie en de cytokine productie waardoor de muizen zieker worden dan muizen die geen TF op hun leukocyten tot expressie brengen.

Naast deze experimenten hebben we ook het veneuze trombosemodel (hypoxie) zoals beschreven in de oorspronkelijke projectaanvraag verder uitgewerkt. De komende periode zullen we dit model gebruiken om de rol van leukocytair TF in veneuze trombose te bestuderen.

C. Welke aspecten van de kennis over trombose worden met het onderzoek gediend?

Het verlies van bloed door beschadigingen als gevolg van een letsel aan de bloedvaten wordt voorkomen door een proces genaamd hemostase. Tijdens dit proces wordt een reeks plasma eiwitten geactiveerd met als resultaat de vorming van een onoplosbaar fibrine stolsel. Het hemostatische systeem wordt nauwlettend gereguleerd door verschillende activerende en remmende mechanismen die in combinatie met de fibrinolyse verantwoordelijk zijn voor de balans tussen het vormen en oplossen van fibrine stolsels. Verstoring van deze balans kan leiden tot bloedingsneiging (hemofilie) of tot overmatige stolselvorming (trombose).

Het bovenbeschreven proces van de bloedstolling wordt geactiveerd door de blootstelling van tissue factor aan het bloed. Naast deze duidelijke "goede" rol van tissue factor in het voorkomen van bloedverlies bij verwondingen worden ook een aantal "kwade" rollen aan tissue factor toegediend. Zo lijkt tissue factor betrokken bij hart- en vaatziekten, trombose en bij ontstekingsproblemen. Opvallenderwijs lijken al deze ziektebeelden op te treden als gevolg van de aanwezigheid van tissue factor op de monocyten.

Het beschikbaar komen van een model waarin de rol van monocytair tissue factor bestudeerd kan worden zal een zeer belangrijke bijdrage leveren aan het fundamenteel wetenschappelijke onderzoek naar de rol van het monocytair tissue factor in arteriosclerose, trombose en sepsis. Tevens zal zo'n model een belangrijke bijdrage leveren aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor tissue factor gerelateerde ziektes.

D. Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

Abstracts:

Schoenmakers HHF, Groot AP, ten Cate H, Reitsma PH and Spek CA. Thrombomodulin deficiency inhibits the hypoxia-induced inflammatory response in the brain of mice. *Blood* 94: 458, 1999.

Saskia HHF Schoenmakers, Hugo ten Cate, Pieter H Reitsma and C Arnold Spek.

Uncoupling

of coagulation activation and cytokine production in hypoxia. *Blood* 96 (Suppl), 2000.

Saskia HHF Schoenmakers, Angelique P Groot, Janneke J Timmerman, Hugo ten Cate, Pieter H Reitsma and C Arnold Spek. A modest decrease in tissue factor activity does not influence endotoxemia-induced coagulation and inflammation. *Blood* 96 (Suppl), 2000.

Manuscripten:

Hugo ten Cate, Saskia HHF Schoenmakers, Rendrik Franco, Janneke J Timmerman, Angelique P Groot, C Arnold Spek and Pieter H Reitsma. Microvascular coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med* 29, S95-S97.

Saskia HHF Schoenmakers, Angelique P Groot, Hugo ten Cate, Pieter H Reitsma and C Arnold Spek. Systemic hypoxia alters coagulation and inflammatory balance in mice. Submitted for publication.

Project 20.002 "De moleculair basis van verworven APC-resistentie tijdens pilgebruik en zwangerschap"

A. Vraagstelling onderzoek

Gebruik van orale contraceptiva (OC) gaat gepaard met een toename van het risico op veneuze trombose, dat groter is bij gebruik van de derde generatie pil dan van de tweede generatie pil. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een door pilgebruik geïnduceerde verhoogde weerstand tegen de anticoagulante werking van geactiveerd protein C (verworven APC-resistentie). APC-resistentie bij pilgebruik of hormonale veranderingen (zoals tijdens zwangerschap) kan vooral aangetoond worden m.b.v. een in Maastricht ontwikkelde test die het effect van APC meet op de trombine vorming geïnitieerd via de extrinsieke stolcascade (weefselfactor-afhankelijk). De vraagstelling was m.b.v. een verzameling plasmamonsters van gezonde vrijwilligers: mannen, geen pilgebruikende vrouwen, pilgebruiksters en zwangere vrouwen een mechanistische verklaring te vinden voor verworven APC-resistentie en met name voor het verschil in gevoeligheid tussen de in Maastricht ontwikkelde test en de klassieke APC-resistentie test die gebaseerd is op het meten van het effect van APC op stolling via de intrinsieke stolcascade (aPTT).

B. Welke delen van de vraagstelling werden in het verslagjaar beantwoord?

Op een drietal onderdelen van de vraagstelling is grote vooruitgang geboekt.

1) In samenwerking met Prof. Stehouwer (Amsterdam) is aangetoond dat hormone replacement therapy (HRT) bij post-menopausale vrouwen ook APC-resistentie veroorzaakt. Het grootste effect werd gevonden bij zgn. unopposed oestrogen (estradiol) vergeleken met een combinatie preparaat (estradiol+progestageen)^{1,2}. Toediening via de huid m.b.v. pleisters gaf de laagste effecten¹. In samenwerking met Prof. Evers (Maastricht) werd verhoogde APC-resistentie aangetoond bij vrouwen die een zwangerschap met

preeclampsie doorgemaakt hadden³.

2) De grotere gevoeligheid van de in Maastricht ontwikkelde test voor verworven APC-resistentie blijkt niet veroorzaakt door de meettechniek (trombinevorming vs stoltijden) of door de weg van trombinevorming (intrinsieke of extrinsieke stolling)⁴. Het is vooral de kracht waarmee stolling geïnitieerd wordt! De start van de klassieke (aPTT) test is zó sterk dat de hoeveelheid gevormde trombine mét of zonder APC gelijk is! Bij verlaging van de hoeveelheid initiator kon trombinevorming voldoende door APC geremd worden en werd de meting (via de intrinsieke weg) net zo gevoelig voor pilgebruik als onze (extrinsieke) test⁴.

3) Intrinsieke en extrinsieke stolling komen samen bij protrombine activering door FXa, Ca²⁺, fosfolipide en de cofactor FVa. De gevoeligheid (in plasma) voor APC van dit gezamenlijke gedeelte van trombinevorming werd getest door trombinevorming rechtstreeks te starten met een FXa/calcium/fosfolipide mengsel. Deze meting bleek beduidend minder gevoelig voor pilgebruik dan onze oorspronkelijke test⁴. De basis voor verworven APC-resistentie dient dus vnl. in de reacties die tot FXa-vorming leiden gezocht te worden. Deze conclusie past bij de bevindingen van een recente analyse van de Leiden Thrombophilia Study (LETS) waarin bleek dat onze meting vooral gevoelig is voor TFPI en proteïne S terwijl de klassieke (aPTT-gebaseerde) test zeer gevoelig is voor FVIII⁵. De effecten van de modulatoren (TFPI of FVIII) wijzen erop dat verhoogde FXa vorming leidt tot APC-resistentie. Op basis van bovenstaande conclusies kan gesteld worden dat vooral in situaties waarin verhoogde FXa vorming optreedt (bv. bij pilgebruik) trombinevorming minder efficiënt door APC gereguleerd wordt.

C. Welke aspecten van de kennis over trombose worden met het onderzoek gediend?

Al sedert de introductie van orale contraceptiva is duidelijk dat pilgebruik gepaard gaat met een verhoogde kans op het ontstaan van veneuze trombose. Inmiddels is duidelijk dat een belangrijk mechanisme dat bijdraagt tot het ontstaan van trombose bij pilgebruik gezocht moet worden in het verminderde vermogen van het proteïne C systeem om trombinevorming tegen te gaan (verworven APC-resistentie). Wij hebben in de afgelopen periode laten zien dat hormoon vervangende therapie (HRT) bij post-menopausale vrouwen ook leidt tot verworven APC-resistentie^{1,2}. Mogelijk dat dit het door epidemiologen gerapporteerde verhoogde risico dat bij HRT optreedt kan verklaren.

Het was een open vraag in welk gedeelte van de stolling de invloed van pilgebruik op de regulering door APC gezocht moest worden. Aangezien vooral de in Maastricht ontwikkelde (extrinsieke) test gevoelig was voor met pilgebruik geassocieerde APC-resistentie werd verondersteld dat het antwoord wellicht in de regulatie van het extrinsieke stolsysteem gevonden kon worden. Ons onderzoek heeft echter aangetoond, dat het verschil in gevoeligheid voor verworven APC-resistentie tussen de in Maastricht ontwikkelde test en de op de klassieke aPTT-gebaseerde APC-resistentie test een direct gevolg is van de hoeveelheid toegevoegde initiator (ofwel de kracht waarmee trombinevorming geïnitieerd wordt). Verworven APC-resistentie wordt pas duidelijk aantoonbaar onder condities van verminderde FXa vorming onafhankelijk van de weg waarlangs trombinevorming geïnitieerd is⁴.

Ons onderzoek geeft verder aan dat de met pilgebruik geassocieerde APC-resistentie niet beperkt is tot de directe regulatie van factor Va als cofactor in het protrombinasecomplex maar dat het vooral (mede) veroorzaakt wordt door verhoogde FXa vorming. In hoeverre deze verhoogde Xa vorming een gevolg is van, of nog versterkt wordt door, een verminderde werking van het proteïne C/proteïne S systeem in de regulatie van FVIII(a) kan op dit moment nog niet worden ingeschat.

Het is wellicht van belang te onderstrepen dat inmiddels voor een groot aantal parameters bepaald is hoe de APC-resistentie metingen (zowel de klassieke als de in Maastricht ontwikkelde test) beïnvloed worden bij verandering van plasma concentraties⁵. In vrijwel alle gevallen (zeker voor de belangrijkste modulatoren als TFPI, proteïne S, protrombine, FVIII, FV) blijken de veranderingen, zoals die in de literatuur voor pilgebruik gerapporteerd worden, verhoogde APC-resistentie te voorspellen. Desondanks blijft nog steeds een belangrijk deel van de verworven APC-resistentie als gevolg van pilgebruik onverklaard. Dit betekent dat

mogelijk tot nog toe onbekende modulators en/of mechanismen van verworven APC-resistentie alsnog op identificatie wachten. Een andere mogelijkheid is echter dat pilgebruik niet alleen veranderingen in hoeveelheid stoffactor tot gevolg heeft maar dat via nog onbekende invloeden de functie van een of meerdere factoren beïnvloed wordt. Vervolgonderzoek zal op deze vragen antwoord moeten geven.

D. Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

1. Post MS, Rosing J, van der Mooren MJ, Zweegman S, van Baal WM, Kenemans P, Stehouwer CDA. Short-term oral hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women: increased resistance to activated protein C. *Brit. J. Haematol* 2002; In press.
2. Post MS, Thomassen MCLGD, van der Mooren MJ, van Baal WM, Rosing J, Kenemans P, Stehouwer CDA. Oral and transdermal hormone replacement therapy have different effects on resistance to activated protein C in healthy postmenopausal women. Ms in preparation.
3. Nap AW, van Pampus ECM, van Oerle R, Spaanderman MEA, Aardenburg R, Hamulyak K, Rosing J, Tans G, Damoiseaux J, Peeters LLH. Increased prevalence of activated protein C resistance in a population of formerly preeclamptic patients. *Am. J. Obst. Gynecol.* Ms submitted.
4. Thomassen MCLGD, Curvers J, Magedeleyns E, Tans G, Rosing J. Oral contraceptives-induced acquired APC resistance in a thrombin generation-based test is not limited to the extrinsic pathway. Ms in preparation
5. de Visser MCH, van Hylckama Vlieg A, Tans G, Rosing J, Dahm AEA, Sandset PM, Rosendaal FR, Bertina RM. Determinants of the APTT- and ETP-based APC resistance tests. Ms in preparation.