

Wetenschappelijk jaarverslag

In het verslagjaar werden vier projecten afgerond. Vijf projecten werden nog uitgevoerd en twee projecten (die in 2008 door het bestuur met een subsidie werden beloond) waren nog niet aangevangen. Van deze laatste projecten is dan ook nog geen verslag opgenomen ('Neutrophil Protease-activated receptor-4 in disseminated intravascular coagulation' van dr. C.A. Spek en 'Werkingsmechanismen van geactiveerd proteïne C in een hartinfarctmodel in de muis' van dr. G. Nicolaes en prof. dr. H. ten Cate).

In onderstaande eind- en voortgangsverslagen hebben de wetenschappers het resultaat van de gesubsidieerde projecten, ondanks de complexiteit ervan, zo helder mogelijk trachten weer te geven.

Afgeronde projecten

Projectnummer: 2004-1

Titel project: Modulatie van de lysofosfatidaat homeostase in het atheroom: een nieuwe strategie ter preventie van trombotische complicaties na plaqueruptuur

Projectleider: prof. dr. E.A.L. Biessen en prof. dr. Th.J.C. Van Berkel

Instelling: Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, afdeling Biofarmacie/Therapeutische Gen Modulatie, Universiteit Leiden, Leiden

Vraagstelling onderzoek

Scheuring van een vaatwandvernaauwing (plaque) kan ertoe leiden dat materiaal vanuit deze plaques in direct contact komt met de bloedsomloop. Dit kan de bloedstolling activeren met als mogelijk gevolg bloedvatafsluiting en hartinfarct. Met name vetten zoals het lysofosfatidaat (LPA) in deze plaques zijn verantwoordelijk voor het in gang zetten van de bloedstolling. Vooronderzoek heeft aangetoond dat verschillende sleutelfactoren in de aanmaak, afbraak en signaaloverdracht van LPA gedurende de plaqueontwikkeling toe- of afnemen en dat dit gepaard gaat met een netto ophoping en effect van LPA in de plaque.

Door correctie van het verstoorde evenwicht in de LPA-huishouding door gen/drugtherapie kan de accumulatie van dit vet in de plaque verminderd worden, wat het bloedstollingbevorderende karakter van de plaque en daarmee de kans op complicaties als gevolg van bloedstolling zal verminderen. In dit project zal het therapeutische perspectief van deze benadering onderzocht worden.

Welke delen van de vraagstelling zijn beantwoord en op welke wijze?

In 2007 hebben we een uitbreiding uitgevoerd van de studie naar het effect van LPA op atherosclerose in een muizenstam met een verhoogd cholesterolgehalte. LPA werd daarbij toegediend via injectie in de buikholte of ter plekke van de atherosclerotische plaque. De eerste strategie leidde tot verhoogde LPA-bloedspiegels die geen effect sorteerde op de ontwikkeling van de plaque maar wel een verslechtering in stabiliteit liet zien. Lokale toediening van LPA ter plekke van de plaque blijkt ook te leiden tot een verslechtering van de plaquestabiliteit en zelfs tot bloedingen in de plaque. Dit is mogelijk terug te voeren op een verhoogde activering van mestcellen in het vaatweefsel. Dit blijkt ook uit het feit dat de effecten omkeerbaar zijn bij toediening van een remmer van mestcel activatie. Dit zou erop kunnen wijzen dat lokale medicamenteuze remming van LPA een geschikte aanpak zou kunnen zijn om de stabiliteit van de plaque te herstellen.

Verdere studie naar de verschillende varianten van LPA in de plaque liet zien dat er ophoping plaatsvindt van varianten van LPA die in hoge mate in staat zijn om plaatjes te activeren. Daarnaast is een studie uitgevoerd naar de effecten van een op LPA gelijkend vetmolecuul, sphingosine 1-phosphate (S1P). Afwezigheid van een afbraakenzym voor S1P en daaropvolgende verhoging van de S1P-concentratie in het bloed en in meerdere organen, bleek de plaqueontwikkeling aanzienlijk af te remmen en dit was te wijten aan een verlaging van de cholesterolconcentratie in het bloed en een selectieve onderdrukking van het immuunsysteem.

Ten slotte heeft onderzoek met virale vectoren die sleutelfactoren in de aanmaak van LPA kunnen stimuleren of onderdrukken in muismodellen laten zien dat niet alle factoren even geschikt zijn als target. Dit heeft geleid tot productie van een vector met een LPA-producerend enzym, dat door uitscheiding in het bloed veelzijdige effecten kan hebben. Deze vector is al getest op functionaliteit en wordt op het moment toegepast in beschikbare muismodellen om de rol van het betreffende enzym te bepalen in de opstapeling van LPA in de plaque. De eerste data lijken te wijzen op een verhoogde activatie van bloedplaatjes.

Welke aspecten van de kennis over trombose zijn met het onderzoek gediend?

Onze studie naar de effecten van LPA toont aan dat vooral lokale blootstelling van weefsels met een hoog risico, zoals de atherosclerotische plaque, aan LPA de gevoeligheid voor plaatjesaggregatie en bloedingen negatief lijkt te beïnvloeden. Verder blijkt ook dat er in de plaque ophoping plaatsvindt van varianten van LPA die in hoge mate in staat zijn tot plaatjesactivatie. Daarnaast toont onze studie aan dat verandering in S1P anders dan verwacht vrijwel niet tot veranderingen leidt in plaatjesfunctie, maar wel in cholesterolmetabolisme en het immuunsysteem.

Literatuurpublicaties

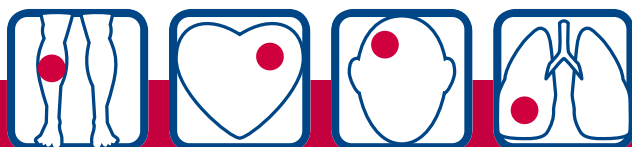
Full papers

1. Bot M*, Nofer JR*, Brodde M, Taylor PJ, Salm P, Brinkmann V, Van Berkel T, Assmann G, Biessen EAL. FTY720, a synthetic sphingosine 1-phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2007; 115(4): 501-508. (*equally contributing authors).
2. Bot M, Nofer JR, Van Berkel TJC, Biessen EAL. Lysophospholipids: edging up towards atherosclerosis. *Future Lipidol*. 2007; 2(3): 341-356.

3. Bot M, Bot I, Lopez-Vales R, Saulnier-Blache JS, Van De Lest CHA, Helms JB, David S, Van Berkel TJC, Biessen EAL. Atherosclerotic Lesion Progression Changes Lysophosphatidic Acid Homeostasis to Favor Its Accumulation. Manuscript in preparation.
4. Bot M, Bot I, De Jager SCA, Van Berkel TJC, Biessen EAL. Lysophosphatidic Acid: a Two-Faced Key Actor in Atherogenesis. Manuscript in preparation.
5. Bot M, Bot I, Westra M, De Jager SCA, Van Berkel TJC, Van Veldhoven PP, Nofer JR, Biessen EAL. Haematopoietic Absence of Sphingosine-1-Phosphate Lyase Decreases Atherosclerotic Lesion Development in LDL-Receptor Deficient Mice. Manuscript in preparation.
6. Bot M, McAleese L, Bot I, Van Berkel TJC, Heeren RMA, Biessen EAL. Lipid cartography of mouse atherosclerotic plaques by cluster-TOF-SIMS imaging. Manuscript in preparation.

Published abstract

1. Bot M, Bot I, Saulnier-Blache JS, Van Berkel TJC, Biessen EAL. Atherosclerotic Lesion Progression Changes Lysophosphatidic Acid Homeostasis to Favor Its Accumulation. *Circulation*. 2005; 112(17):II-290. (AHA 2005, poster presentation).
2. Bot M, Bot I, Saulnier-Blache JS, Van Berkel TJC, Biessen EAL. Atherosclerotic Lesion Progression Changes Lysophosphatidic Acid Homeostasis to Favor Its Accumulation. *Atherosclerosis supplements*. 2006; 7(3):230. (IAS 2006, poster presentation).
3. Bot M, Bot I, De Jager SC, Van Berkel TJC, Biessen EAL. Lysophosphatidic Acid: a Two-Faced Key Actor in Atherogenesis. *Circulation*. 2006; 114(18):II-341. (AHA 2006 oral presentation).



Projectnummer: 2004-5

Titel project: De rol van amyloid in hemostase
Projectleider: dr. M.F.B.G. Gebbink
Instelling: Universitair Medisch Centrum Utrecht

Vraagstelling onderzoek

Eiwitten zijn de bouwstenen van ons lichaam. Mensen maken meer dan 30.000 verschillende eiwitten. Elk van deze eiwitten heeft een unieke vorm en functie. Eiwitten worden intensief gebruikt en worden daarom continu vervangen. De 'versleten' eiwitten raken misvormd, verliezen hun functie en worden verwijderd. Versleten eiwitten hebben de neiging te klonteren en ophoping van dergelijke eiwitten kan leiden tot ziekte. Er zijn veel ziektes bekend die worden veroorzaakt door ophoping van eiwit, waaronder aderverkalking en dementie. Amyloid is de wetenschappelijke verzamelnaam voor ophoping van te verwijderen eiwitten in organen die leidt tot ziekte. Amyloid heeft een karakteristieke structuur, crossbeta genaamd, die zeer schadelijk is. De centrale vraag in ons onderzoek is hoe versleten eiwitten worden herkend en opgeruimd. Binnen dit project is daartoe de rol van bloedfactoren onderzocht.

Welke delen van de vraagstelling zijn beantwoord en op welke wijze?

Als voorwerk hadden we gevonden dat het bloedstolling-systeem twee enzymen bevat die de crossbeta-structuur herkennen. Beide enzymen lijken op elkaar en we hebben vast kunnen stellen welk deel van het enzym aan crossbeta bindt. Van het eerste enzym, factor XII, is al heel lang bekend dat het betrokken is bij de aanmaak van een stolsel als bloed wordt afgenomen in een buisje zonder antistollingsmiddel. Maar het was ook bekend dat dit enzym helemaal niet belangrijk is voor het maken van een bloedstolsel na een beschadiging van een bloedvat. Ons vooronderzoek had aangetoond dat factor XII wordt aangezet door versleten eiwitten en nu hebben we ontdekt dat dit wel leidt tot een ontstekingsreactie maar niet tot stolling. Hiermee hebben we de belangrijke paradox

tussen de activiteit van factor XII in een buisje en in het lichaam opgelost. Het tweede eiwit, weefsel-type plasminogeen activator (tPA), is belangrijk voor het opruimen van een bloedstolsel. Het bloedstolsel stimuleert daartoe de activiteit van tPA. In onze onderzoeksgroep hebben we al eerder kunnen onderbouwen dat zich in een bloedstolsel ook de crossbeta-structuur vormt en dat de werking van tPA ook wordt gestimuleerd door andere versleten eiwitten. tPA lijkt dus in het algemeen betrokken bij het opruimen van versleten eiwitten, waaronder die in een bloedstolsel. Op basis van dit voorwerk hebben we bloed van patiënten met een amyloid-gerelateerde ziekte verder geanalyseerd. We vonden verhoogde activiteit van beide enzymsystemen. Onze resultaten hebben verder inzicht verschaft en de door ons veronderstelde veel bredere rol voor deze enzymen uit de hemostase verder onderbouwd in het opruimen van versleten eiwitten om ons te beschermen tegen ziekten als gevolg van eiwitophoping.

Welke aspecten van de kennis over trombose zijn met het onderzoek gediend?

Bij veel ziektebeelden, zoals diabetes, bacteriële infecties, kanker, en uiteraard aderverkalking (atherosclerose) treden complicaties op als gevolg van veranderingen in de bloedstolling. De oorzaak van deze complicaties was slecht begrepen. Ons voorwerk en huidige onderzoek heeft twee proteases geïdentificeerd die door misvormde eiwitten worden geactiveerd. De door deze proteases geactiveerde systemen bleken ook geactiveerd bij ziekten veroorzaakt door amyloid. Op basis van ons onderzoek kan een nieuwe therapie worden ontwikkeld om problemen als gevolg van ophoping van misvormde eiwitten te verminderen en de kans op trombotische complicaties bij deze ziektebeelden te verminderen.

Literatuurpublicaties

In de volgende publicaties zijn gegevens opgenomen die mede door de subsidie van de Trombosesichting tot stand konden komen:

1. Maas, C, Govers-Riemslog, JWP, Bouma, B, Schiks, B, Hazenberg, B, Lokhorst, HM, Hammarström, P, ten Cate, H, de Groot, PG, Bouma, BN, Gebbink, MFBG. (2008). Factor XII is activated by misfolded proteins, which leads to kallikrein formation without initiating coagulation. J. Clin. Invest. 118, 3208-3218. See also: Cell Biology Select, Cell 134(6), 893,895.
2. Maas, C, Schiks, B, Strangi, R, Hackeng, TM, Bouma, BN, Gebbink, MFBG, Bouma, B (2008). Identification of fibronectin type I domains as amyloid-binding modules on tissue-type plasminogen activator and three homologues. Amyloid 15(3), 166-180.
3. Bouma, B, Maas, C, Hazenberg, BP, Lokhorst, HM, Gebbink, MFBG (2007). Increased plasmin-alpha2-anti-plasmin levels indicate activation of the fibrinolytic system in systemic amyloidosis. J Thromb Haemost. 5(6):1139-1142.
4. Maas, C. Thesis.2008.

Projectnummer: 2005-4

Titel project: Factor VII activating protease (FSAP): functional implications of the 'Marburg-1' polymorphism
Projectleiders: Prof. dr. K. Mertens
Instelling: Stichting Sanquin Bloedvoorziening, Amsterdam

Vraagstelling onderzoek

Het 'Factor Seven Activating Protease' (FSAP) is een in bloed voorkomend eiwit dat in 1996 is ontdekt. De functie ervan is onduidelijk. Sommige onderzoekers rapporteerden een rol bij het opruimen van stolsels in de bloedbaan (de fibrinolyse). Anderen vonden een stimulerend effect op de bloedstolling, door middel van de activering van stollingsfactor VII. Hierdoor heeft het eiwit de naam FSAP gekregen. Sindsdien hebben andere onderzoekers weer andere biologische effecten gevonden, zoals een regulerende rol bij vorming van atherosclerotische plaques. Het 'Marburg-1'-polymorfisme is een mutatie in het gen dat voor FSAP codeert. Deze komt bij ongeveer 5-10% van de Westerse bevolking voor. In die gevallen circuleert een variant van FSAP in het bloed. Welke consequenties dit heeft is onduidelijk. Immers, zolang de biologische rol van het 'normale' FSAP onzeker is, valt niet te voorspellen wat het belang van de Marburg-1-mutatie kan zijn. Deze vragen stonden centraal in dit project.

Welke delen van de vraagstelling zijn beantwoord en op welke wijze?

Om de rol van FSAP te kunnen bestuderen is dit eiwit in zuivere vorm nodig. Uit bloed is het echter bijzonder moeilijk te isoleren. De in de literatuur beschreven effecten zouden daarom behalve aan FSAP zelf ook aan onzuiverheden kunnen worden toegeschreven. Daarom hebben wij gebruik gemaakt van gezuiverd recombinant FSAP dat in zoogdiercellen is geproduceerd. Tot onze verrassing bleek recombinant FSAP in het geheel niet in staat te zijn om gezuiverd factor VII te activeren. Wel kon het onder extreme condities factor VII in kleinere fragmenten knippen.



Dit leidt echter niet tot activering, maar juist tot inactivering van factor VII. Evenmin leidde toevoeging van geactiveerd

FSAP aan bloedplasma tot een versnelling van de vorming van het stollingsenzym trombine. Een rol van FSAP in de stollingscascade is daarmee uiterst onzeker geworden. Daarentegen vonden wij wel dat FSAP de fibrinolyse kan activeren, maar of dat in ons lichaam een belangrijke rol speelt is nog onduidelijk. Verder vonden wij dat FSAP, net als trombine, de binnenkant van de vaatwand (het endotheel) kan activeren. Mogelijk wijst dit toch nog op een rol in het stollingssysteem.

Wat is het effect van de Marburg-1-mutatie? Om die vraag te kunnen beantwoorden is ook deze variant van FSAP als recombinant eiwit geproduceerd. De Marburg-1-mutatie bleek een aanzienlijk verlaagde enzymatische activiteit tot gevolg te hebben. Dit uitte zich in een verminderde activering van de fibrinolyse. Of dit ook in ons lichaam een rol speelt is onduidelijk, omdat ook andere eiwitten dan FSAP de fibrinolyse activeren. Misschien speelt FSAP, en dus ook de Marburg-1-variant slechts een ondergeschikte rol. In ieder geval suggereren onze resultaten dat de relevantie van FSAP en het Marburg-1-polymorfisme voor trombose geringer is dan bij de aanvang van het onderzoek algemeen werd aangenomen.

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

Onze bevinding dat FSAP, anders dan de naam suggereert, geen relevante factor VII-activator lijkt te zijn, is niet alleen verrassend, maar heeft ook belangrijke consequenties. Immers, daarmee heeft ook de Marburg-1-variant zijn relevantie voor de stollingscascade grotendeels verloren. Dit verklaart ook waarom diverse klinische studies tot nu toe geen verband konden aantonen tussen het Marburg-1-polymorfisme en het risico op trombose. Of het activerend effect op de fibrinolyse en op de vaatwand desondanks toch nog enige betekenis heeft, is nog onderwerp van nader onderzoek.

Literatuurpublicaties

- Stavenuiter F, *et al.*, The Marburg-1 mutation reduces the autocatalytic activity of Factor Seven Activating Protease (FSAP) J. Thromb. Haemostasis 2007, 5 Suppl. 2, Abstract O-W-088.

Projectnummer: 2006-2

Titel project:	Generating and characterization of multiplex assays for coagulation and fibrinolytic parameters
Projectleider:	dr. J.C.M. Meijers
Instelling:	Academisch Medisch Centrum

Vraagstelling onderzoek

Verhoogde niveaus van stollingsfactoren zijn risico-factoren voor veneuze en arteriële trombose. Het belang van screening van trombosepatiënten voor de verschillende stollingsfactoren is echter onduidelijk. Aangezien de stollingsfactoren onderdeel uitmaken van het stollingssysteem waarin de componenten elkaars functie kunnen beïnvloeden, zijn grote studies nodig die alle factoren kunnen bepalen. Met de huidige testen is dat moeilijk, omdat die bewerkelijk zijn en relatief grote hoeveelheden bloed nodig hebben. Daarom willen we in het huidige onderzoek testen opzetten en karakteriseren om stollingsfactoren te kunnen bepalen in een multiplex-opzet. Dat betekent dat er in één test meerdere stollingsfactoren tegelijkertijd uit één monster worden bepaald. Met behulp van deze nieuwe multiplextesten wordt het mogelijk om belang en samenhang van bekende risico-factoren te verduidelijken, en (nieuwe) risicofactoren voor veneuze en arteriële trombose te identificeren.

Welke delen van de vraagstelling werden in het verslagjaar beantwoord?

In dit jaar werden assays overgezet van een vaste drager naar het ‘bead-systeem’ dat gebruikt wordt voor het multiplexsysteem. De eerste factoren, die getest zouden worden, zijn die van het antistollingssysteem: totaal en vrij proteïne S, C4b-bindingseiwit, proteïne C, proteïne C inhibitor, proteïne Z, tissue factor pathway inhibitor en proteïne Z-afhankelijke protease inhibitor. De verschillende testen werden individueel opgezet. Hierna werden de testen in verschillende combinaties bij elkaar gebracht. Hieruit bleek dat een aantal factoren niet met elkaar gecombineerd kan worden, enerzijds omdat de antistofcombinaties niet

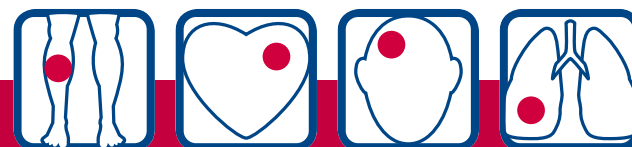
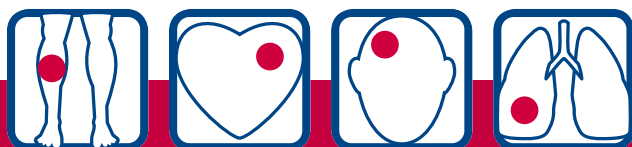
samengingen en anderzijds omdat er voor de test een andere verdunning gebruikt moest worden van het te testen plasma. De uiteindelijk opgezette multiplextest kon de volgende factoren analyseren: proteïne C, proteïne C inhibitor, totaal proteïne S en vrij proteïne S. Deze multiplextest werd gevalideerd en daaruit bleek dat de test niet goed reproduceerbaar was. Door modificaties in het testprotocol werd getracht om de reproduceerbaarheid van de multiplex te verbeteren. Deze aanpassingen gaven enige verbetering, maar konden de waarden van de bestaande vaste drager bepalingen nog niet benaderen. De conclusie van het onderzoek was dan ook dat de verwachte vergemakkelijking bij het opsporen van risicofactoren voor trombose helaas niet mogelijk is met de multiplexbenadering zoals die in dit project was uitgevoerd.

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

Met behulp van multiplextesten wordt het mogelijk om belang en samenhang van bekende risicofactoren te verduidelijken, en nieuwe risicofactoren voor veneuze en arteriële trombose te identificeren.

Literatuurpublicaties

N.v.t.



Lopende projecten

Projectnummer: 2005-1

Titel project:	The role of the endothelial cell protein C receptor in the regulation of coagulation and inflammation
Projectleider:	prof dr. T. van der Poll en prof. dr. M.M. Levi
Instelling:	Academisch Medisch Centrum (AMC); Center for Infection and Inflammation (CINIMA), Center for Experimental and Molecular Medicine(CEMM).

Vraagstelling onderzoek

Bij ernstige infecties zoals longontsteking of bloedvergiftiging wordt de bloedstolling geactiveerd. Hoe meer activering van de bloedstolling bij een patiënt met een dergelijke infectie, hoe groter de kans op overlijden.

Het lichaam heeft enkele mechanismen om bloedstolling te remmen, bij voorbeeld proteïne C (PC). PC is een eiwit met een sterk antistollende werking. Hiernaast lijkt het ook direct tegen ontstekingen te werken. PC moet om werkzaam te kunnen zijn eerst worden geactiveerd. Het geven van geactiveerd PC (APC) aan patiënten met ernstige bloedvergiftiging blijkt de sterfte te verlagen. Over een mogelijk gunstige rol van lichaamseigen APC is echter nog veel onduidelijkheid. Voor de activering van PC is een bepaald eiwit genaamd de endotheliale PC receptor (EPCR) van belang. EPCR komt vooral voor op de binnenbekleding van het bloedvat, maar bevindt zich ook los in de bloedbaan en op andere lichaamscellen. Ook over de rol van EPCR in ontsteking is nog weinig bekend.

Onze onderzoeksgroep onderzoekt in dit project de rol van de EPCR tijdens ernstige infectie en ontsteking. We onderzoeken hoe ernstige ontstekingen en de bloedstolling verlopen, wanneer er heel veel aan de cel gebonden of oplosbaar EPCR of juist helemaal geen EPCR in het lichaam aanwezig is. Dit doen we door muizen te onderzoeken die genetisch zijn veranderd. Ook onderzoeken we het belang van het lichaamseigen APC door

muizen te behandelen met antilichamen die de werking van PC en APC tegengaan.

Welke delen van de vraagstelling zijn beantwoord en op welke wijze?

We hebben onderzocht of de aanwezigheid van veel of juist geen EPCR op de bloedvatwand tot verschillende uitkomsten in longontsteking leidt. Dit blijkt niet het geval te zijn: Hoewel stolling in de long en het plasma wel sterk werden beïnvloed door de hoeveelheid EPCR, bleken dieren met veel of geen EPCR evenveel bacteriën in de longen te hebben en evenveel ontstekingsreactie, zowel na 24 als na 48 uur. Dat APC toch een belangrijke rol speelt, maar misschien vooral in de bloedbaan en minder in de long, blijkt uit proeven waarin we bij muizen PC hebben weggevangen met een antilichaam; muizen met veel minder APC in de long en in de bloedbaan blijken minder bacteriën in de bloedbaan te hebben.

Omdat het medicijn APC vooral wordt gegeven aan mensen die bij hun longontsteking een bloedvergiftiging hebben gekregen en omdat de rol van stolling tijdens bloedvergiftiging mogelijk heel anders is dan tijdens longontsteking, hebben we een model voor bloedvergiftiging opgezet. Hierbij worden bacteriën rechtstreeks in de bloedbaan ingespoten. In tegenstelling tot in longontsteking blijkt EPCR in dit model wel van groot belang; meer EPCR op de bloedvatwand geeft meer uitgroei van de bacteriën, mogelijk omdat de afweerreactie door EPCR teveel wordt gedempt. We zagen in dit model echter ook dat juist het wegvangen van lichaamseigen APC ook de bacteriële uitgroei vergroot. Waarschijnlijk is er in het lichaam een delicate balans van stolling en antistolling en van ontsteking en ontstekingsremming. Binnenkort zullen we kijken hoe muizen die helemaal geen EPCR hebben het doen in dit model. In een model van een andere ernstige ontsteking, namelijk buikvliesontsteking, bleek de EPCR niet heel duidelijk van belang te zijn. In dit model bleek het geheel wegvangen van APC echter ongunstig. Daarom willen we binnenkort in dit model ook gaan kijken hoe muizen het doen die helemaal geen EPCR hebben.

In een hyperoxie-model (dit is een model waarin wel longontsteking plaatsvindt, maar zonder voorafgaande infectie) hebben we ook naar het effect van de aanwezigheid van veel EPCR gekeken. We zagen in dit model geen duidelijk effect op de hoeveelheid ontstekingscellen maar deze proeven moeten nog verder worden uitgewerkt. Binnenkort willen we gaan bekijken wat het effect is van veel EPCR los in de bloedbaan en of dit hetzelfde werkt als of juist tegengesteld aan veel EPCR op de bloedvatwand.

Welke aspecten van de kennis over trombose zijn met het onderzoek gediend?

De modellen die wij onderzoeken zijn modellen voor ziekten die bij de mens gepaard gaan met activering van de bloedstolling. Deze stollingsactivering kan dermate fors zijn, dat de patiënt verspreid in het lichaam bloedstolsels krijgt, waar hij zelfs aan kan overlijden. Kennis over de samenhang tussen infectie en ontsteking enerzijds en bloedstolling anderzijds is van belang, niet alleen om stollingsfactoren op het spoor te komen die een rol spelen in ontsteking, maar ook om te begrijpen hoe de bloedstolling op zijn beurt wordt beïnvloed door ontsteking. Het EPCR/PC-systeem speelt een centrale rol op dit snijvlak van ontsteking en trombose. Kennis over de rol van EPCR in ontsteking en hiermee gepaard gaande bloedstolling zou kunnen leiden tot betere therapieën zowel tegen overmatige bloedstolling als tegen overmatige ontsteking in infectieziekten, maar zou ook kunnen leiden tot betere behandeling van trombose buiten de setting van ontstekingsziekten.

Literatuurpublicaties

De meeste genoemde onderzoeken zijn nog niet helemaal 'af' en derhalve is er nog geen sprake van volledige publicaties met originele data. Wel zijn veel van de data gepubliceerd als abstract en geselecteerd voor een presentatie op verschillende congressen en wetenschappelijke vergaderingen. Onlangs zijn drie abstracts geaccepteerd voor het ISTH congres (juli 2009, Boston), en hebben geleid tot een orale presentatie. Eén van de abstracts werd beloond met een 'Young Investigators Award'. Ook zijn van onze hand inmiddels drie reviews en twee hoofdstukken in boeken gepubliceerd over de samenhang tussen trombose en ontsteking:

Publicaties:

1. Schouten M, Van der Poll T. Coagulation disorders in sepsis. Chapter 10 in Management of sepsis: the PIRO concept. 2009 (in press).
2. Levi M, Schouten M, Van der Poll T. Sepsis, coagulation, and antithrombin: old lessons and new insights. Semin Thromb Hemost. 2008 (Nov);34(8):742-6.
3. Hofstra JJ, Schouten, Levi M. Thrombophilia as a risk factor for outcome in sepsis. Intensive Care Medicine Annual update. 2008: 713-20.
4. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, Van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. J Leukoc Biol. 2008 Mar;83(3):536-45.
5. Hofstra JJ, Schouten M, Levi M. Thrombophilia and outcome in severe infection and sepsis. Semin Thromb Hemost. 2007 Sep;33(6):604-9.

Abstract & orale presentaties:

1. Schouten M, Van 't Veer C, Esmon CT, Levi M, Van der Poll T. Protein C depletion enhances bacterial outgrowth and inflammation in murine E. coli peritonitis. International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), Boston, Jul 2009. Young investigators award.
2. Schouten M, Van 't Veer C, Esmon CT, Levi M, Van der Poll T. Protein C depletion enhances bacterial outgrowth and increases mortality in murine pneumococcal sepsis. International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), Boston, Jul 2009.
3. Schouten M, Van der Sluijs K, Van 't Veer C, Esmon CT, Levi M, Van der Poll T. Protein C depletion enhances inflammation and delays mortality in murine lethal influenza A infection. International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), Boston, Jul 2009.
4. Schouten M, Van 't Veer C, Esmon CT, Levi M, Van der Poll T. Protein C depletion reduces bacterial dissemination in murine pneumococcal pneumonia but aggravates systemic pneumococcal disease. Nederlandse Vereniging voor Trombose en Hemostase, Koudekerke, Apr 2008.
5. Schouten M, Van 't Veer C, Esmon CT, Levi M, Van der Poll T. Protein C depletion transiently enhances bacterial outgrowth and inflammation but does not impact on survival in E. coli peritonitis. Internistendagen, Maastricht, Apr 2008.



Projectnummer: 2007-1

Titel project: Regulatie van weefselfactorsynthese in bloedplaatjes
Projectleider: prof. dr. J.W.N. Akkerman
Instelling: UMC Utrecht

Vraagstelling onderzoek

Hoe wordt synthese van weefselfactor in bloedplaatjes gereguleerd? Weefselfactor is de starter van de bloedstolling. Het is een eiwit in de vaatwand dat onder normale omstandigheden niet met bloed in aanraking komt. Ontstaat er een wond, dan lekt bloed uit de vaten en moet bloedverlies worden gestopt. In de wond komt weefselfactor vrij en start de bloedstolling. Na enige tijd vullen stolsels en bloedplaatjes de wond op en wordt de bloeding gestopt. Er zijn aanwijzingen dat ook bloedplaatjes weefselfactor synthetiseren wanneer ze aan eiwitten uit de wond hechten. Het project heeft als doel duidelijk te maken (1) welke wondeiwitten weefselfactorsynthese in bloedplaatjes opwekken, (2) hoe bloedplaatjes deze wondeiwitten herkennen en vervolgens weefselfactorsynthese op gang brengen en (3) welke medicijnen de synthese van weefselfactor in bloedplaatjes remmen.

Welke delen van de vraagstelling zijn beantwoord en op welke wijze?

Tot de wondeiwitten behoren collageenvezels, trombine, fibrinogeen en von Willebrand Factor. Alle blijken weefselfactorsynthese in bloedplaatjes op te wekken, maar de mate waarin dit gebeurt, neemt af in de volgorde van collageen naar von Willebrand Factor. Het plaatje herkent de verschillende wondeiwitten met behulp van receptoren, een soort antennes die signalen naar het binnenste van het plaatje doorgeven en synthese van weefselfactor starten. Dit is bijzonder. Synthese van eiwitten gebeurt eigenlijk alleen in cellen met een kern vol DNA. Bloedplaatjes hebben geen kern. Zij blijken wel het afgelezen DNA te bevatten, dat RNA wordt genoemd. Dit RNA wordt pas actief als bloedplaatjes een wondeiwit hebben herkend en eraan hechten. Synthese van weefselfactor is een

langzaam proces. Het duurt ongeveer een uur voordat remmende delen uit het RNA zijn verwijderd en eiwit-synthese op gang komt. Pas na vier uur is er voldoende weefselfactor gevormd om de stolling op gang te brengen. Ook losse plaatjes synthetiseren weefselactivator mits ze met trombine worden gestimuleerd. De capaciteit is echter 600 maal lager dan in plaatjes die hechten aan een wondeiwit. In de omzetting van RNA naar weefselfactor speelt de secretie van ADP en de vorming van tromboxaan een grote rol. De medicijnen clopidogrel en aspirine zijn belangrijke medicamenten om arteriële trombose tegen te gaan. Zij remmen respectievelijk ADP en tromboxaan en remmen dus ook de synthese van weefselfactor in bloedplaatjes.

Welke aspecten van de kennis over trombose zijn met het onderzoek gediend?

Het onderzoek maakt duidelijk dat bloedplaatjes weefselfactor kunnen synthetiseren ook al hebben ze geen kern. Dit betekent dat bij een beschadiging van de vaatwand bloedstolling niet alleen vanuit de vaatwand maar ook vanuit de bloedplaatjes wordt gestart. Er zijn dus minstens twee bronnen om stolling te starten. Ook wordt duidelijk dat dit proces kan worden geblokkeerd met de medicijnen clopidogrel en aspirine, die al worden toegepast om arteriële trombose te onderdrukken. Er lijkt dus geen reden om nieuwe medicijnen te ontwikkelen om de synthese van weefselfactor in bloedplaatjes tegen te gaan.

Literatuurpublicaties

Het manuscript wordt binnenkort voor publicatie aangeboden.

Projectnummer: 2007-2

Titel project: Thyroid dysfunction and venous thrombosis
Projectleider: dr. S.C. Cannegieter
Instelling: Afdeling Klinische Epidemiologie, Leiden Universitair Medisch Centrum

Vraagstelling onderzoek

In het verleden zijn veel beschrijvingen gepubliceerd van patiënten die ernstige vormen van trombose ontwikkelden (zoals trombose in de hersenen) terwijl ze op dat moment een te sterk werkende schildklier hadden. Ook is onderzocht hoe het stollingsstelsel verandert bij een te sterk of een te langzaam werkende schildklier. Uit die studies bleek grofweg dat een te sterk werkende schildklier gepaard gaat met een verhoogde stollingsneiging, en een te langzaam werkende schildklier met een verhoogde bloedingsneiging. Ondanks deze gegevens zijn er nauwelijks klinische, gecontroleerde studies gepubliceerd waarin gekeken werd naar de relatie tussen schildklierziekte en het ontstaan van veneuze trombose. Het doel van dit onderzoek was dan ook om dit verband te onderzoeken in een al bestaand patiëntcontrole-onderzoek naar oorzaken van trombose.

Welke delen van de vraagstelling zijn beantwoord en op welke wijze?

We vonden een duidelijke relatie tussen de hoogte van het schildklierhormoon T4 en het risico op trombose. Zelfs binnen de normale waarden van T4 zagen we dat het risico al toe begon te nemen. Bovendien bleek dat het risico ook hoger was wanneer de tijdsduur tussen de bloedafname en de trombose korter was.

Enigszins vergelijkbare resultaten werden gevonden voor het hormoon TSH, een hormoon dat vanuit de hypofyse de productie van schildklierhormoon reguleert. Dit effect werd echter minder wanneer we voor T4 corrigeerden, dus dat suggereert dat het effect vooral veroorzaakt wordt door T4 zelf.

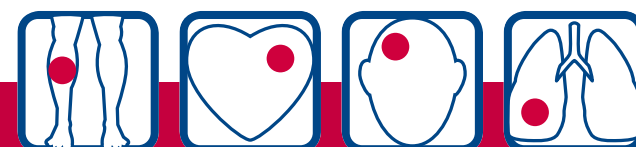
Welke aspecten van de kennis over trombose zijn met het onderzoek gediend?

Dit onderzoek heeft geleid tot meer inzicht in de pathofysiologie van trombose. In de patiëntenzorg zal gedacht moeten worden aan deze link, dus bij patiënten met trombose zal naar schildklierziekte gekeken moeten worden en bij patiënten met een te snel werkende schildklier zal men zich moeten realiseren dat het risico op trombose tijdelijk verhoogd is.

Een aantal gevallen van trombose zou vroeger geclassificeerd zijn als 'idiopathische trombose' (trombose zonder oorzaak) terwijl dat nu niet meer het geval is. Dit kan gevolgen hebben voor de duur van de antistollingsbehandeling.

Literatuurpublicaties

- Increased levels of thyroxin increase the risk of venous thrombosis, Cannegieter SC, Debeij J, Dekkers OM, Christiansen SC, Naess IA, Asvold BO, Hammerstrom J, Rosendaal FR.
- Abstract ingediend voor het congres van de International Society of Thrombosis and Haemostasis in Boston in juli 2009. Geaccepteerd als orale presentatie. Zal worden gepubliceerd als abstract in het Journal of Thrombosis and Haemostasis.



Projectnummer: 2007-3

Titel project: De rol van tissue factor pathway inhibitor in het ontstaan en de progressie van ischemische cerebrale letsels door cerebrale micro-angiopathie

Projectleider: Dr. R.J. van Oostenbrugge

Instelling: Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM) en Vakgroep Neurologie, beide Maastricht University Medical Center (MUMC)

Vraagstelling onderzoek

Jaarlijks krijgen 24.000 Nederlanders een herseninfarct. Bij een kwart van hen is een verstopping van een (heel) klein bloedvatje in de hersenen de oorzaak. In deze studie wordt gekeken naar de rol van de bloedvatwand op het ontstaan van dit type herseninfarct. In eerdere studies toonden we reeds aan dat dit type herseninfarct (dat in medische termen 'lacunair infarct' heet) op basis van klinische verschijnselen en bevindingen bij beeldvormend onderzoek ('hersenscans') in twee subtypen is te onderscheiden. Het blijft echter onduidelijk waarom de ene patiënt het ene type lacunair herseninfarct krijgt, terwijl een andere patiënt het andere type lacunair herseninfarct krijgt. Hier zouden heel goed verschillen in de functie van de bloedvatwand een rol kunnen spelen. De functie van de bloedvatwand kan worden beoordeeld door het meten van stoffen in het bloed, die worden uitgescheiden door de bloedvatwand (vaatwandmarkers).

Welke delen van de vraagstelling werden in het verslagjaar beantwoord?

Door het bloed van 159 patiënten en 49 gezonde personen te onderzoeken vonden wij bijzondere verschillen in de concentraties van vaatwandmarkers. Zo bleek de concentratie van sommige stoffen verhoogd (o.a. von Willebrandfactor) en van een andere vaatwandmarker juist laag (tissue factor pathway inhibitor). Om deze schijnbare discrepantie verder te onderzoeken hebben we aan 17 patiënten en 16 gezonde personen 1 maal een gift heparine (bloedverdunner die

TFPI vrijmaakt uit de vaatwand) gegeven, voorafgegaan en gevolgd door de afname van enkele buisjes bloed. Dit bloed wordt op dit moment verder onderzocht. Daarnaast bepaalden we ook de concentratie van enkele markers van de stolling (bijvoorbeeld D-dimeer, hetgeen de mate van stolling in het lichaam aangeeft); deze waren niet verschillend tussen patiënten en gezonde proefpersonen.

Welke aspecten van de kennis over trombose zijn met het onderzoek gediend?

De verschillen in bloedspiegels van de verschillende endotheel-markers tussen patiënten en gezonde controles kunnen impliceren dat (overmatige) activatie van het endotheel een rol speelt bij het ontstaan van dit ziektebeeld. Omdat we geen verschillen vonden in concentratie van de stollingmarkers, concluderen wij dat de bloedstolling waarschijnlijk een ondergeschikte rol speelt.

Literatuurpublicaties

1. Endothelial dysfunction in symptomatic lacunar stroke. A systematic review. Knottnerus ILH, Ten Cate H, Lodder J, Kessels F and van Oostenbrugge RJ. Cerebrovasc Dis. 2009;27(5):519-26. Epub 2009 Apr 16. Review.
2. Intracerebral haematoma at a microbleed site in two lacunar stroke patients on antithrombotic therapy. Knottnerus IL, van Oostenbrugge RJ, Lodder J. J Neurol 2008 Aug;255(8):1245-5.

Projectnummer: 2008-3

Titel project: Vorming en verankering van von Willebrand factor-strengen op het oppervlak van endotheelcellen

Projectleider: dr. B. de Laat en dr. J. Voorberg

Instelling: Sanquin Research, Amsterdam

Vraagstelling onderzoek

Om onnodig bloedverlies te voorkomen is het belangrijk dat schade aan de vaatwand zo snel mogelijk wordt hersteld. Dit gebeurt door de bloedplaatjes die heel snel aan de beschadigde vaatwand binden en daarmee lekkage voorkomen. In de vaatwand bevindt zich von Willebrand factor (VWF), een polymeer eiwit dat vrijkomt na beschadiging van de vaatwand. Uit eerder onderzoek is gebleken dat VWF zeer lange, kleverige strengen kan vormen waaraan bloedplaatjes kunnen binden. Binnen dit onderzoek kijken wij op welke wijze de VWF strengen worden gevormd. Over dit proces is nog erg weinig bekend en doel van ons onderzoek is om beter te begrijpen hoe deze strengen ontstaan en uit welke componenten ze zijn opgebouwd. Tevens willen we bestuderen hoe het komt dat deze strengen aan de vaatwand vast blijven zitten.

Welke delen van de vraagstelling werden in het verslagjaar beantwoord?

Zoals hierboven weergegeven komen na beschadiging van de vaatwand zeer lange strengen bestaande uit VWF-polymeren op de vaatwand terecht. Deze strengen kunnen bloedplaatjes binden. De VWF-polymeren worden gemaakt in endotheelcellen die de vaatwand bekleden. In deze cellen bevinden de VWF-strengen zich in een opgerolde toestand in speciale reservoirs die na beschadiging van de vaatwand vrijkomen. Hieruit worden de zeer lange VWF-strengen gevormd. De speciale reservoirs voor VWF-polymeren in endotheelcellen worden 'Weibel-Palade bodies' genoemd. In de eerste maanden van ons onderzoek is gebleken dat Weibel-Palade bodies van positie veranderen onder invloed van stroming. Onder statische condities zijn de Weibel-Palade bodies min of meer random verdeeld over de cel. Onder invloed van stroming bewegen de Weibel-Palade bodies zich naar de grenzen van de cel.

Ze lijken daarbij een voorkeur te hebben voor een positie waarbij drie cellen aan elkaar grenzen. We denken dat het belangrijk is dat de Weibel-Palade bodies vlakbij elkaar zitten. Na een vaatwandschadiging komen de VWF-strengen uit de Weibel-Palade bodies vrij en omdat ze dichtbij elkaar in de buurt zitten kunnen er heel lange VWF-strengen worden gemaakt. Op deze manier kunnen er in korte tijd veel bloedplaatjes binden waardoor de beschadigingen van de vaatwand weer snel hersteld kunnen worden.

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

De vorming van lange VWF bevattende strengen waaraan bloedplaatjes kunnen binden is belangrijk voor snel herstel van vaatwandschade. Wanneer dit proces niet efficiënt verloopt, kan bloedverlies optreden. Bij bepaalde ziektebeelden verloopt dit proces juist te snel. Zonder dat het nodig is komen de VWF bevattende strengen uit de vaatwand tevoorschijn. De vrijgekomen VWF-strengen binden bloedplaatjes waardoor vooral de kleine vaten verstopt kunnen raken. Dit resulteert in trombose. Om trombose in de kleine vaten te voorkomen is het belangrijk dat de VWF bevattende strengen ook weer snel opgeruimd kunnen worden. Als dit proces is verstoord ontstaan er propjes van bloedplaatjes. Dit laatste mechanisme speelt vooral een rol bij een zeldzame aangeboren of verworven afwijking die trombotische trombocytopenische purpura (TTP) wordt genoemd. Binnen dit project proberen we meer te weten te komen over de vorming en afbraak van de VWF-strengen in de vaatwand. Hierdoor kunnen in de toekomst mogelijk nieuwe therapieën voor trombose ontwikkeld worden.

Literatuurpublicaties

Op dit moment zijn er nog geen publicaties.

