

## Wetenschappelijk jaarverslag

In het verslagjaar rondden de wetenschappers vier projecten af. Vier projecten werden nog uitgevoerd en drie projecten (die in 2009 door het bestuur met een subsidie werden beloond) waren nog niet aangevangen. Van deze laatste projecten is dan ook nog geen verslag opgenomen ('New insights into the potential role of  $\alpha$ 2-antiplasmin in arterial and venous thrombosis' van dr. D.C. Rijken, 'Modulation of coagulation by glycoprotein Ib $\alpha$  - a study using nanodisc technology' van dr. T. Lisman en 'Effectiever antistollen door remming van de intrinsieke route van de bloedstolling?' van prof.dr. J.C.M. Meijers).

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: 2005-1

32

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), Universiteit van Amsterdam

#### Vraagstelling onderzoek

Bij ernstige infecties zoals longontsteking of bloedvergiftiging wordt de bloedstolling geactiveerd. Het lichaam heeft enkele mechanismen om bloedstolling te remmen, zoals bijvoorbeeld het aanmaken van proteïne C (PC). PC remt niet alleen stolling, maar lijkt ook ontstekingsreacties tegen te gaan. PC moet om werkzaam te kunnen zijn eerst worden geactiveerd tot APC (ofwel geactiveerd PC), waarbij een ander eiwit, genaamd de endotheliale PC receptor (EPCR), van belang is. Dit project onderzocht de rol van de EPCR tijdens ernstige infectie en ontsteking. Er werd onderzocht hoe ernstige ontstekingen en de bloedstolling verlopen, wanneer er zeer veel of helemaal geen EPCR

in het lichaam aanwezig is. Dit onderzoek werd gedaan met gebruik van muizen die door genetische manipulatie EPCR in versterkte mate produceren of juist deficiënt zijn voor EPCR. Ook onderzocht dit project het belang van het lichaamseigen APC door muizen te behandelen met anti-lichamen die de werking van PC/APC tegengaan.

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

Onderzocht werd of de aanwezigheid van veel of juist geen EPCR op de bloedvatwand tot verschillende uitkomsten bij longontsteking leidt. Hiertoe werden muizen met overmatig veel of geen EPCR via de luchtwegen geïnfecteerd met bacteriën. De afwezigheid van EPCR bleek de hoeveelheid bacteriën in de longen te verminderen 48 uur na begin van een longontsteking, terwijl de aanwezigheid van heel veel EPCR geen effect had op de hoeveelheid bacteriën of ontsteking. Afwezigheid van EPCR resulteerde ook in een betere afweer (met minder groei van bacteriën) na toediening van bacteriën via de bloedbaan; muizen met heel veel EPCR hadden in dit model meer bacteriën in hun bloed en organen. Het elimineren van PC/APC (door middel van een antistof) leidde tot een verhoogde bacteriële uitgroei bij experimentele infecties. Deze data wijzen erop dat EPCR een ongunstige rol speelt bij de afweer tegen longontsteking en de bloedvergiftiging die daarvan het gevolg kan zijn, terwijl PC/APC een gunstige rol spelen.

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

De modellen die wij onderzochten zijn relevant voor ziekten bij de mens die gepaard gaan met activering van de bloedstolling. Deze stollingsactivatie kan dermate fors zijn, dat de patiënt verspreid in het lichaam bloedstolsels krijgt, waaraan hij of zij zelfs 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, en zou daarnaast ook kunnen leiden tot betere behandeling van trombose buiten de setting van ontstekingsziekten.

### Literatuurpublicaties

#### Publicaties

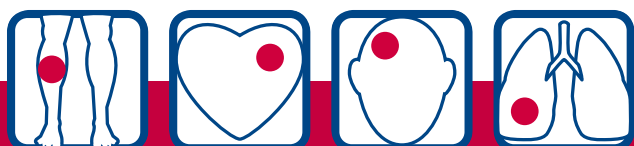
- Schouten M, van der Sluijs K, Gerlitz B, Grinnell BW, Roelofs JJ, Levi M, van 't Veer C, van der Poll T. Activated protein C ameliorates coagulopathy but does not influence outcome in lethal H1N1 influenza: a controlled laboratory study. *Crit. Care* [accepted]
- Schouten M, van der Sluijs K, Roelofs JJ, Levi M, van 't Veer C, van der Poll T. Factor V Leiden mutation does not affect coagulopathy or outcome in lethal H1N1 influenza. *Eur Respir J* [accepted]
- Schouten M, Van der Poll T. Coagulation disorders in sepsis. Chapter 10 in *Management of sepsis: the PIRO concept*. 2009
- 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.
- Hofstra JJ, Schouten M, Levi M. Thrombophilia as a risk factor for outcome in sepsis. *Intensive Care Medicine Annual update*. 2008: 713-20.
- 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.
- Hofstra JJ, Schouten M, Levi M. Thrombophilia and outcome in severe infection and sepsis. *Semin Thromb Hemost*. 2007 Sep;33(6):604-9.

#### Abstracts & orale presentaties

- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

#### Abstract & posterpresentatie

- Schouten M, Van 't Veer C, Levi M, Esmon CT, Van der Poll T. Endogenous protein C inhibits pulmonary coagulation but facilitates bacterial dissemination in the early phase of pneumococcal pneumonia in mice. *International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)*, Geneva, Jul 2007.



**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 (i) welke wond-eiwitten weefselfactorsynthese in bloedplaatjes opwekken; (ii) hoe bloedplaatjes deze wond-eiwitten herkennen en vervolgens weefselfactorsynthese op gang brengen en, (iii) welke medicijnen de synthese van weefselfactor in bloedplaatjes remmen.

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

Tot de wond-eiwitten 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 wond-eiwitten met behulp van receptoren, een soort antennes op het oppervlak van cellen, die signalen naar het binnenste van het bloedplaatje doorgeven en synthese van weefselfactor starten. Dit is bijzonder. Synthese van eiwitten gebeurt eigenlijk alleen in cellen met een kern vol DNA. Echter, bloedplaatjes hebben geen kern. Zij blijken wel het afgelezen DNA te bevatten, dat mRNA wordt genoemd. Dit mRNA wordt pas actief als bloedplaatjes een wond-eiwit hebben herkend en eraan hechten. Synthese van weefselfactor is een langzaam proces. Het duurt ongeveer een uur voordat remmende delen uit

het mRNA zijn verwijderd en eiwitsynthese opgang komt. Pas na vier uur is er voldoende weefselfactor gevormd om de stolling op gang te brengen. Ook losse plaatjes synthetiseren weefselfactor, mits ze met trombine worden gestimuleerd. De capaciteit is echter 600 maal lager dan in bloedplaatjes die hechten aan een wond-eiwit. 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**

*Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag:*

1. Gerrits, A.J., C.A. Koekman, T.W. van Haften and J.W.N. Akkerman. Platelet tissue factor synthesis in type 2 diabetes patients is resistant to inhibition by insulin. Diabetes 2010, published on line March 3, 2010
2. Gerrits, A.J. Insulin resistance in platelets and monocytes. Thesis Utrecht University 07-01-2010.



**Projectnummer: 2007-2**

Titel project: Thyroid dysfunction and venous thrombosis  
 Projectleiders: dr. SC. 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 worden 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 moeten worden gekeken en bij patiënten met een te snel werkende schildklier zal men zich moeten realiseren dat het risico op trombose tijdelijk verhoogd is.

Een aantal tromboses 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**

*Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag:*

1. Cannegieter SC, Debeij J, Dekkers OM, Christiansen SC, Naess I, Asvold BO, Hammerstrom J, Rosendaal FR. Increased levels of thyroxin increase the risk of venous thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009; Volume 7, Supplement 2: Abstract OC-WE-013.



**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: Maastricht University Medical Centre

**Vraagstelling onderzoek**

Jaarlijks krijgen 24.000 Nederlanders een herseninfarct, bij een kwart hiervan is een verstopping van een (heel) klein bloedvatje in de hersenen de oorzaak. In deze studie wordt gekeken naar de rol van de bloedvaatwand 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 bloedvaatwand een rol kunnen spelen. De functie van de bloedvaatwand kan worden beoordeeld door het meten van stoffen in het bloed, die worden uitgescheiden door de bloedvaatwand (vaatwandmarkers).

**Welke delen van de vraagstelling werden in het verslagjaar beantwoord?**

Door het bloed van 149 patiënten en 42 gezonde personen te onderzoeken vonden wij bijzondere verschillen in de concentraties van vaatwandmarkers. Zo bleek de concentratie van sommige stoffen verhoogd (o.a. von Willebrand factor en weefsel plasminogeen activator) en van een andere vaatwandmarker juist laag (tissue factor pathway inhibitor, TFPI).

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. Wij vonden dat er juist meer TFPI vrijkomt na een gift van heparine bij patiënten vergeleken met gezonde mensen.

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

De verschillen in bloedspiegels van de verschillende endotheelmarkers tussen patiënten en gezonde controles kunnen impliceren dat (overmatige) activatie van de binnenbekleding van bloedvaten (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**

*Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag:*

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.
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.



## Lopende projecten

### Projectnummer: 2008-3

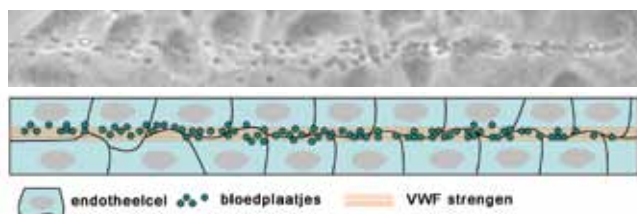
Titel project: Vorming en verankering van Von Willebrand Factor strengen op het oppervlak van endotheelcellen

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

Instelling: Sanquin

### Vraagstelling onderzoek

Om onnodig bloedverlies te voorkomen is het belangrijk dat schade aan de vaatwand zo snel mogelijk hersteld wordt. Dit gebeurt door de bloedplaatjes die heel snel aan de vaatwand kunnen 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 (zie figuur 1). Binnen dit onderzoek kijken we op welke wijze de VWF strengen gevormd worden. Daarnaast bestuderen we op welke wijze de VWF strengen aan de vaatwand vast blijven zitten.

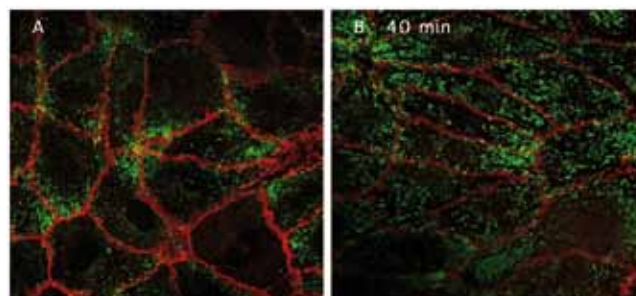


Figuur 1. Laag van endotheelcellen met op het oppervlak VWF strengen waaraan bloedplaatjes zijn gebonden. De VWF strengen (op onderste panel weergegeven in rood) kunnen op de foto niet waargenomen worden. In het onderste panel zijn de VWF strengen met de daaraan gebonden bloedplaatjes schematisch weergegeven.

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

Zoals hierboven weergegeven kunnen VWF strengen op het oppervlak van endotheelcellen bloedplaatjes binden. Dit proces speelt een belangrijke rol bij het herstellen van schade aan de vaatwand. De VWF strengen worden gemaakt in endotheelcellen die de vaatwand bekleden. In deze cellen zijn de VWF strengen in opgerolde toestand

aanwezig in speciale reservoirs. Na beschadiging van de vaatwand komen deze reservoirs ter beschikking en worden de VWF strengen onder invloed van stroming heel snel ontrold. Hierdoor ontstaan de zeer lange VWF strengen zoals die in figuur 1 zijn weergegeven. De speciale reservoirs in endotheelcellen, waarin de VWF strengen aanwezig zijn, noemen we "Weibel-Palade bodies." In figuur 2 zijn endotheelcellen weergegeven. In rood zien we de omtrek van de cel. De cellen liggen erg dicht tegen elkaar aan zodat er geen contact is van het bloed met de onderliggende weefsels. De Weibel-Palade bodies zijn als groene organellen te zien. Per cel zijn er ongeveer 150 aanwezig. Onder invloed van stroming bewegen de Weibel-Palade bodies zich naar de grenzen van de cellen.



Figuur 2. Endotheelcellen bevatten reservoirs voor opgerolde VWF strengen die na een vaatwand beschadiging vrijkomen. De reservoirs (Weibel-Palade bodies) zijn in groen weergegeven. (A) Na een korte incubatie (40 minuten) met stromend medium bevinden de Weibel-Palade bodies zich vlakbij de grenzen van de cel (weergegeven in rood). (B) Endotheelcellen die langdurig met stromend medium behandeld worden zijn langgerekt. Ook onder deze condities zijn de Weibel-Palade bodies vooral te zien bij de grenzen van de cel.

In figuur 2A is een foto gemaakt van endotheelcellen die zijn blootgesteld aan korte periode van stroming (40 minuten). De Weibel-Palade bodies bevinden zich in deze cel bijna allemaal vlakbij de grenzen van de cel. In figuur 2B hebben we endotheelcellen 5 dagen onder stroming gekweekt. De morfologie van de cellen verandert drastisch. De endotheelcellen zijn langgerekt en de cellen oriënteren zich in de richting van de stroming. Ook onder



deze condities zien we dat de Weibel-Palade bodies zich dichtbij de grenzen van de endotheelcellen bevinden. We denken dat het belangrijk is dat de Weibel-Palade bodies vlakbij elkaar zitten in endotheelcellen. Na stimulatie van endotheelcellen komt de inhoud van deze reservoirs in de bloedbaan terecht: mogelijk is het voor de vorming van de lange VWF strengen essentieel dat de Weibel-Palade bodies bij elkaar zijn gelocaliseerd. Op deze wijze kunnen er snel lange VWF strengen gevormd worden die zeer effectief bloedplaatjes kunnen binden waardoor beschadigingen in de vaatwand snel gerepareerd kunnen worden.

### **Welke aspecten van de kennis over trombose zijn 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 verstoord ontstaat 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 worden ontwikkeld.

### **Literatuurpublicaties**

Dragt B, Gijzen KA, de Laat HB and Voorberg J. (2010) Hämostaseologie 30: A65 (meeting abstract) Flow-induced changes in the distribution of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. (Awarded with poster prize).



**Projectnummer: 2008-2**

Titel project: Werkingsmechanismen van geactiveerd proteïne C in een hartinfarctmodel in de muis

Projectleider: dr. G. Nicolaes en prof. dr. H. Ten Cate

Instelling: Maastricht University Medical Center

**Vraagstelling onderzoek**

Het proteïne C-systeem heeft buiten zijn antistollende functies ook een regulerende rol in ontsteking. Eerdere studies lieten een beschermende werking van geactiveerd proteïne C (APC) op hartschade zien na een hartinfarct via een verminderde ontsteking en celdood, in een muismodel. In deze studie willen we nagaan welk werkingsmechanisme van APC, meer bepaald de antistollende of de celsignalerende functies of beiden, verantwoordelijk is/zijn voor dit beschermend effect. Dit willen we onderzoeken door het ontwikkelen van gemuteerde APC-eiwitten die een veranderde antistolling of celsignalerende werking hebben. Hierbij zullen zowel de farmacologische eigenschappen als de celbeschermende effecten van APC in een muismodel worden onderzocht. Verder zullen deze APC mutanten ook gebruikt worden in een celschademodel om te achterhalen welke celreceptoren specifiek betrokken zijn bij de beschermende effecten van APC. Ten slotte zal één van de mutanten met een lichtgevende stof gelabeld worden om na toediening in de muis getraceerd te kunnen worden in het hartinfarct.

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

Humaan APC en 2 gemuteerde vormen van APC (1 mutant die geen antistollende werking heeft maar wel celbeschermend is en 1 mutant die geen celbeschermende functie heeft maar wel nog antistollende eigenschappen bezit) zijn ontwikkeld en zijn in grotere hoeveelheden geproduceerd om te voldoen aan de hoeveelheden nodig in deze studie. De mutant die enkel een antistollende werking heeft blijkt een beschermende werking te hebben op hartschade bepaald door het meten van de infarctgrootte. Dit resultaat

geeft een indicatie dat de antistollende werking van APC een rol speelt in de beschermende functie van APC. Verder werd ook de niet-actieve variant van APC, namelijk het proteïne C, toegediend en dit eiwit liet ook een verminderde infarctschade zien. De exacte werkingsmechanismen in vivo zullen in de volgende maanden worden bepaald. Om het effect van APC op cellulair niveau te onderzoeken, hebben we een zogenaamd hypoxiemodel ontwikkeld waarbij hartspiercellen geïsoleerd en enige tijd zonder zuurstof geplaatst worden om zo het hartinfarct na te bootsen. Het gebruik van APC (mutanten) in dit model zal ook in de volgende maanden plaatsvinden.

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

Een trombose of bloedstolsel dat ontstaat in één van de kransslagaders als gevolg van het scheuren van een atherosclerotische plaque, kan leiden tot een myocardinfarct door de afsluiting van de betreffende slagader (ischemie). Het ischemisch proces wordt gekenmerkt door weefselschade als gevolg van celdood en ontsteking. Wanneer het bloedvat door middel van therapie weer geopend wordt om de bloedstroom te herstellen (reperfusie), zal dit ook gepaard gaan met schade aan het betreffende weefsel door middel van een ontstekingsreactie. APC wordt in de kliniek reeds gebruikt als behandeling bij sepsis maar heeft als bijwerking een verhoogd risico op bloedingen. Beperken van de infarctschade door middel van APC (mutanten) kan een therapeutische toepassing bieden bij het verminderen van ischemie/ reperfusieschade zonder hierbij een verhoogd risico op bloedingen te geven.

**Literatuurpublicaties**

STBG Loubele, H ten Cate, HMH Spronk. Anticoagulant therapy in critical organ ischemia/ reperfusion injury. Thrombosis and Haemostasis. July 2010. Accepted for publication.





**Projectnummer: 2008-1**

Titel project: Neutrophil Protease-activated receptor-4  
in disseminated intravascular coagulation

Projectleider: dr. C.A. Spek

Instelling: Academisch Medisch Centrum

**Vraagstelling onderzoek**

Traditioneel wordt gedacht dat de bloedstollingsfactoren er slechts voor zorgen om het bloeden bij verwondingen te stoppen. De laatste jaren is echter duidelijk geworden dat bloedstollingsfactoren meer doen dan het bloed laten stollen. Zo blijkt trombine (een van de belangrijkste stollingsfactoren) zogenaamde protease-geactiveerde receptoren (PARs) te activeren wat vervolgens resulteert in, onder andere, ontstekingsprocessen. In eerdere experimenten hebben we laten zien dat het remmen van PAR-4 leidde tot een verlaagde ontstekingsrespons. Het bleek dat muizen behandeld met P4pal10 (een PAR-4 remmer) minder ziek waren na blootstelling aan LPS (bacterieel eiwit dat ontsteking induceert). Het is echter belangrijk om te realiseren dat P4pal10 naast PAR-4 een aantal andere receptoren zou kunnen remmen en dus is het niet met zekerheid te zeggen of PAR-4 een essentiële rol speelt bij ontstekingsprocessen. Het huidige project had dan ook als doel het bevestigen van de rol van PAR-4 bij ontstekingsprocessen.

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

De belangrijkste vraag van het huidige project was om te bevestigen dat PAR-4 een essentiële rol speelt bij ontstekingsprocessen. Hiertoe hebben we muizen zonder PAR-4 blootgesteld aan het ontstekingsmodel en tot onze verrassing bleken de PAR-4-deficiënte muizen helemaal niet beschermd tegen de ontsteking wat suggereert dat PAR-4 geen belangrijke rol speelt bij ontstekingen en dat de gunstige effecten van P4pal10 toe te schrijven zijn aan PAR-4-onafhankelijke processen. Nu is in de literatuur beschreven dat P4pal10 naast PAR-4 ook PAR-1 deels kan remmen en daarom hebben we in vervolg experimenten PAR-4-deficiënte muizen behandeld met een PAR-1-remmer. Helaas bleek echter dat de afwezigheid van PAR-1 en

PAR-4 tezamen ook geen enkel voordeel opleverde voor de muizen in de ontstekingsexperimenten.

Uit bovenstaande resultaten blijkt dus dat P4pal10 niet beschermend is in ontstekingsprocessen door het remmen van PARs. Om uit te zoeken hoe P4pal10 dan wel beschermt hebben we neutrofielen (ontstekingscellen in het lichaam die bacteriën opruimen) geïsoleerd en deze neutrofielen hebben we behandeld met p4pal10 waarna we hun functie hebben bestudeerd. In deze experimenten bleek dat P4pal10 inderdaad een belangrijke neutrofiel-functie (migratie in de richting van bacteriële indringers) remt maar dat dit niet op een PAR-4-afhankelijke manier is. Momenteel proberen we te achterhalen via welk mechanisme P4pal10 dan wel de functie van neutrofielen remt.

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

Bacteriële infecties leiden in een groot aantal gevallen tot activatie van de bloedstolling. Deze bloedstollingsactivatie is niet slechts een soort epifenomeen maar draagt voor een belangrijk deel bij aan orgaanschade (en leidt in ernstige gevallen zelfs tot de dood). Het onderliggende mechanisme waarbij de bloedstolling bijdraagt aan orgaanschade tijdens infecties is niet duidelijk en als gevolg daarvan zijn er geen goede behandelmethodes. Het huidige project trachtte een onderliggend mechanisme te achterhalen, namelijk PAR-4-afhankelijke neutrofielfunctie. Nu uit onze experimenten blijkt dat PAR-4 (en ook PAR-1) niet belangrijk zijn bij ontstekingsgeïnduceerde orgaanschade trachten we te achterhalen op welke manier P4pal10 dan wel gunstig werkt bij ontstekingsreacties.

**Literatuurpublicaties**

Geen



**Projectnummer: 2009-2**

Titel project: The role of blood coagulation in acute lung injury  
 Projectleider: dr. C. van 't Veer  
 Instelling: AMC

**Vraagstelling onderzoek**

De long is een orgaan dat gevoelig is voor trombotische complicaties in een aantal humane ziektes. Complicaties in de long kunnen leiden tot acuut longfalen wat gepaard gaat met fibrinestolsels en ontsteking in de luchtruimte van de longblaasjes waardoor patiënten moeten worden beademd. Acuut longfalen ontstaat meestal in patiënten bij wie een tweede complicatie op een eerste complicatie volgt. Het is de vraag hoe de bloedstolling bijdraagt aan het ontstekingsproces in de long bij acuut longfalen. Enzymen die vrijkomen bij de bloedstolling kunnen Protease Activated Receptoren (PAR's) activeren die ontsteking kunnen veroorzaken. Verder kan geactiveerd stollingsfactor FXIII ontstekingsreceptoren aan elkaar koppelen waardoor ontstekingsprocessen heftiger verlopen. De cruciale ontstekingsfactor C5a komt vrij maar wordt ook geïnactiveerd door de bloedstolling. De vraagstelling van het onderzoek is daarom of, wanneer en hoe stollend bloedplasma ontsteking induceert in de luchtwegen.

**Welke delen van de vraagstelling werden in het verslagjaar beantwoord?**

Om de capaciteit van stollend plasma tot het aanzetten van ontstekingsprocessen in de long te bepalen hebben we een nieuw model opgezet. Hierbij wordt bloedplasma van muizen in de luchtpijp van andere muizen gespoten. Het bloedplasma was eerst ontstold maar door vlak voor inspuiting het plasma weer te voorzien van genoeg calcium kan het plasma stollen in de luchtwegen. Na 6 uur worden de longen van de muizen in dit model uitgespoeld om te onderzoeken hoe stolling- en ontstekingsprocessen zijn verlopen. Hierbij hebben we gevonden dat er een redelijk grote hoeveelheid stollend plasma in de longen van gewone gezonde muizen kan worden gespoten zonder dat dit leidt tot een heftige ontstekingsreactie. Er werden wel stoffen gevonden in de long die ontstekingscellen zouden

kunnen aantrekken, maar de ontstekingscellen zelf waren niet aanwezig na de plasmaprovocatie in de long. Verder bleek dat de fibrinemoleculen in het stolsel volledig aan elkaar gekoppeld waren door FXIII, waardoor het stolsel redelijk beschermd zou zijn tegen het oplossen door het fibrinolytische systeem. Een zeer hoge concentratie van het fibrineafbraakproduct dat ontstaat door FXIII-crosslinking en vervolgens afbraak door het fibrinolytische enzym plasmine gaf aan dat er in de luchtwegen een zeer grote fibrinolytische capaciteit aanwezig is. Remming van FXIII-activiteit leidde niet tot een verlaging van de ontstekingscel aantrekkende stoffen. Deze resultaten geven aanleiding om plasma-inspuiting in de long te gaan doen onder omstandigheden die makkelijker tot ontsteking leiden.

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

De modellen die we onderzoeken zijn modellen voor ziekten die gepaard gaan met stollingsactivatie in de mens. Stolling en ontsteking gaan vaak samen en in deze studie doen we kennis op over hoe deze processen elkaar specifiek wel of niet beïnvloeden in het longcompartiment. Door dit in muizen te doen kunnen we omstandigheden creëren waarin oorzaak en gevolg duidelijker worden. Dit leidt in principe tot vergroting van inzicht in trombotische processen wat kan leiden tot betere modellen om verbeterde therapie te ontwikkelen.

**Literatuurpublicaties**

Deze studie loopt op het moment van productie van dit jaarverslag 4 maanden en heeft nog niet geleid tot publicaties.

