



Variaties in het eiwit α_2 -antiplasmine

Projectnummer: 2009-1

foto: Arno Massee



dr. D.C. Rijken

New insights in the potential role of α_2 -antiplasmin
in arterial and venous thrombosis
Erasmus Medisch Centrum

VRAAGSTELLING VAN HET ONDERZOEK

De stolling van het bloed komt tot stand via een subtiel samenspel tussen diverse eiwitten en andere stoffen in het bloed. Sommige van die stoffen bevorderen de vorming van bloedstolsels, andere werken de stolling juist tegen door het bloedstolsel weer op te lossen. Het eiwit α_2 -antiplasmine (α_2 AP) behoort tot de eerstgenoemde categorie: het bevordert de stolling van het bloed. α_2 AP draagt bij aan de stolling van het bloed door te binden aan een reeds gevormd bloedstolsel en in dat stolsel de activiteit van het eiwit plasmine te remmen. Plasmine is een eiwit dat het stolsel afbreekt. Het eiwit stollingsfactor XIII zorgt ervoor dat α_2 AP aan het stolsel bindt. In het bloed komt α_2 AP in twee vormen voor. Ongeveer 30 procent van het α_2 AP in het bloed bestaat uit het complete α_2 AP-eiwit. De overige 70 procent mist een stukje doordat het enzym antiplasmin-cleaving enzyme (APCE) een klein deel van het α_2 AP-eiwit heeft afgeknipt. De korte vorm van α_2 AP bindt sneller aan een bloedstolsel en beschermt het stolsel mogelijk meer tegen afbraak door plasmine dan de lange vorm van

α_2 AP. Dat laatste zou betekenen dat de korte vorm van α_2 AP de stolling van het bloed meer bevordert dan de lange vorm van het eiwit. In theorie is de korte vorm van het eiwit daardoor een grotere risicofactor voor het ontstaan van bloedstolsels (arteriële en veneuze trombose) dan de lange vorm van α_2 AP.

Het doel van dit project was na te gaan of de lengte van α_2 AP inderdaad van invloed is op de mate waarin dit eiwit het stolsel beschermt tegen afbraak. Het tweede doel was na te gaan wat de lengte van α_2 AP betekent voor het risico op het ontstaan van arteriële en/of veneuze trombose.

WELKE DELEN VAN DE VRAAGSTELLING ZIJN BEANTWOORD IN HET VERSLAGJAAR?

Om de invloed van de lengte van α_2 AP op de stabiliteit van de stolsels na te gaan hebben de onderzoekers de beide vormen van α_2 AP op het oplossen van stolsels op een gestandaardiseerde wijze getest (met de zogeheten plasma clot lysis turbiditeitstest). Hierbij zagen zij geen verschil tussen beide vormen van α_2 AP, een onverwachte bevinding aangezien publicaties van andere onderzoeksgroepen wel een verschil melden. Dit riep bij de onderzoekers vragen op naar de precieze rol van stollingsfactor XIII, het eiwit dat α_2 AP aan het stolsel koppelt. Gebruikmakend van een andere stolseltest -



een test waarbij het stolsel 30 minuten na vorming ineen wordt gedrukt - liet zien dat de stolselbeschermende werking van factor XIII (en α_2 AP) wel groot is als het stolsel ineen wordt gedrukt, maar niet als het stolsel niet ineen wordt gedrukt (zoals tijdens de eerder gebruikte clot turbiditeitstest). Mogelijk is het stolselbeschermende effect van factor XIII groter wanneer alle α_2 AP-moleculen die niet aan het stolsel zijn gebonden uit het stolsel worden geperst, opperen de onderzoekers. In het lichaam vindt tijdens bloedstolling immers een soortgelijk proces plaats. Kort na de vorming 'krimpt' het stolsel onder invloed van de bloedplaatjes. Ook dan worden alle niet aan het stolsel gebonden eiwitten uit het stolsel geperst. Overigens zagen de onderzoekers ook bij deze proeven amper verschillen tussen de lange en korte vorm van α_2 AP wat betreft het oplossen van stolsels. Dat sluit echter niet uit dat er in het lichaam toch verschil is in de mate waarin de lange en korte vorm van α_2 AP de stolling bevorderen, stellen de onderzoekers. De proeven met het ineendrukken van het stolsel zijn mogelijk niet helemaal een juiste afspiegeling van het stollingsproces zoals het in het lichaam plaatsvindt.

De onderzoekers ontwikkelden en valideerden vervolgens een methode om in bloedplasma de hoeveelheid van beide vormen van α_2 AP te meten. Vervolgens gingen zij met deze methode na of de hoeveelheid 'lang' en 'kort' α_2 AP in het plasma verschilt tussen gezonde controles en mensen bij wie een bloedprop in een slagader is ontstaan (arteriële trombose). Aan dit onderzoek, de ATTAC-studie geheten, deden 500 gezonde controlepersonen mee en 650 mensen met arteriële trombose. Uit de metingen bleek dat het plasma van mensen met arteriële trombose niet - zoals vooraf gedacht - minder van de 'lange' vorm van α_2 AP bevat, maar zelfs een klein beetje meer. Een toegenomen omzetting van 'lang' naar 'kort' (= sterker werkend) α_2 AP is dus geen verklaring voor het optreden van arteriële trombose, concluderen de onderzoekers. De onderzoekers gaan nu nog na of verschillen in de hoeveelheid 'lang' of 'kort' α_2 AP samenhangen met de kans op veneuze trombose.

WELKE ASPECTEN VAN DE KENNIS OVER TROMBOSE ZIJN MET HET ONDERZOEK GEDIEND?

Het onderzoek heeft meer (en nieuw) inzicht gegeven in de wijze waarop factor XIII betrokken is bij de binding van α_2 AP aan fibrine en bij het oplossen van stolsels. In het bijzonder is meer inzicht verkregen in de rol die het samentrekken van het stolsel hierbij speelt. Het onderzoek heeft geen aanwijzingen opgeleverd dat de lengte van α_2 AP een rol speelt bij het ontstaan van arteriële trombose. Het nog lopende onderzoek moet uitwijzen of die rol er wel is bij het ontstaan van veneuze trombose.

LITERATUURPUBLICATIES

Uitte de Willige S, Leebeek FWG, Rijken DC. Development of ELISAs to detect full-length and C-terminally intact alpha-2-antiplasmin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2012, 10 (6): e10.

Uitte de Willige S, Malfliet JJMC, Deckers JW, Dippel DWJ, Leebeek FWG, Rijken DC. N-terminal heterogeneity of alpha-2-antiplasmin is associated with plasma clot lysis time and risk of arterial thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2013, 11, Supplement 2: 407.

Uitte de Willige S, Malfliet JJMC, Janssen HLA, Leebeek FWG, Rijken DC. Increased N-terminal cleavage of alpha-2-antiplasmin in patients with liver cirrhosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2013, 11: 2029-36.

Rijken DC, Malfliet JJMC, Abdul S, Leebeek FWG, Uitte de Willige S. The effect of factor XIII on plasma clot lysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2014; Supplement, in press. Manuscript in voorbereiding.

Uitte de Willige S, Malfliet JJMC, Deckers JW, Dippel DWJ, Leebeek FWG, Rijken DC. Determinants of circulating fibroblast activation protein (FAP)/antiplasmin-cleaving enzyme (APCE) level and N-terminal cleavage of alpha-2-antiplasmin; association with arterial thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2014; Supplement, in press. Manuscript in voorbereiding.



Een herseninfarct na een hersenbloeding

Projectnummer: 2010-4

foto: Arno Massee



prof. dr. J.C.M. Meijers

A new perspective on delayed cerebral ischemia
after aneurysmal subarachnoid hemorrhage
– the role of cerebral microthrombosis
Academisch Medisch Centrum

VRAAGSTELLING VAN HET ONDERZOEK

Ieder jaar krijgen in Nederland ruim 1000 mensen een subarachnoïdale bloeding (SAB). Dit is een hersenbloeding die optreedt als een hersenslagader openbarst, meestal als gevolg van een zwakke, uitpuilende plek (aneurysma) in de hersenslagader. Bij mensen die de hersenbloeding hebben overleefd, bestaat een grote

kans dat (een deel van) hun hersenen in de weken erna te kampen krijgt met zuurstofgebrek. De oorzaak van het ontstaan van deze zogeheten cerebrale ischemie of herseninfarct is onbekend. Mogelijk speelt het ontstaan van kleine bloedstolsels (microtrombose) in de bloedvaten van de hersenen hierbij een rol.

Het doel van dit project is de rol van microtrombose bij het ontstaan van cerebrale ischemie na een SAB nader te bestuderen aan de hand van proefdieren (muizen). Indien blijkt dat microtrombose inderdaad van belang is bij het ontstaan van cerebrale ischemie, zal worden onderzocht wat de bijdrage is van stollingsfactoren, ontstekingsfactoren en van de cellen aan de binnenkant



van de bloedvaten (endotheelcellen) aan het ontstaan van de microtrombose na een SAB.

WELKE DELEN VAN DE VRAAGSTELLING ZIJN BEANTWOORD IN HET VERSLAGJAAR?

De onderzoekers bootsten de SAB in de hersenen van muizen na door een kleine hoeveelheid bloed in de hersenen van de muizen aan te brengen. Dit deden ze bij verschillende soorten muizen: 'gewone' muizen en muizen die - als gevolg van genetische manipulatie - niet in staat zijn het enzym ADAMTS13 te maken. ADAMTS13, een eiwit dat het ontstaan van bloedstolsels tegengaat. Eerder onderzoek heeft uitgewezen dat het bloed van mensen die een SAB hebben doorgemaakt minder ADAMTS13 bevat.

Van beide soorten muizen kregen sommige dieren korte tijd na het aanbrengen van het bloed in de hersenen menselijk ADAMTS13 toegediend.

De onderzoekers zagen dat als gevolg van het toedienen van ADAMTS13 zowel in hersenen van de gewone muizen als in de hersenen van de muizen die zelf geen ADAMTS13 kunnen maken minder microtrombose (en daardoor minder schade) ontstaat.

Volgens de onderzoekers tonen deze proeven aan dat de bloedstolling die na de SAB in de hersenen optreedt niet alleen een positieve kant heeft, namelijk het stelpen van de bloeding, maar ook een negatieve kant.

De stolling leidt tot een daling van de hoeveelheid ADAMTS13 waardoor de kans op het ontstaan van microtrombose toeneemt.

*Ieder jaar krijgen ruim
1000 Nederlanders een SAB*

WELKE ASPECTEN VAN DE KENNIS OVER TROMBOSE ZIJN MET HET ONDERZOEK GEDIEND?

Met dit onderzoek is aangetoond dat (een tekort aan) ADAMTS13 een zeer waarschijnlijke oorzaak is van het ontstaan van microtrombose in de hersenen kort na een SAB. Het onderzoek suggereert tevens dat het toedienen

*Bloedstolling na een SAB
heeft een positieve,
maar ook negatieve kant*

van ADAMTS13 kort na het optreden van de SAB kan voorkomen dat er kort na de SAB microtrombose in de hersenen optreedt. In muizen is dit nu aangetoond, vervolgonderzoek zal moeten uitwijzen of een behandeling met ADAMTS13 ook bij mensen effectief en veilig is. Aangezien microtrombose ook bij andere ziekten een rol speelt, kunnen de in dit project verkregen inzichten ook van belang zijn voor andere stollingsziekten.

LITERATUURPUBLICATIES

Vergouwen MD, Knaup VL, Roelofs JJ, de Boer OJ, Meijers JC. Effect of recombinant ADAMTS13 on microthrombosis and brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Thromb Haemost* 2014; 12, 943-947.



Wetenschap - Onderzoekers aan het woord

Lessen uit slangengif

Projectnummer: 2011-1

foto: Arno Massee



dr. M.H.A. Bos en drs. D. Verhoef
Molecular regulation of blood coagulation factor V:
from snakes to humans
Leids Universitair Medisch Centrum
Projectleiders: dr. M.H.A. Bos en dr. P.H. Reitsma

VRAAGSTELLING VAN HET ONDERZOEK

De stolling van het bloed beschermt mens en dier tegen overmatig bloedverlies bij verwonding. Stolling van het bloed vindt plaats via een kettingreactie van processen waarbij diverse eiwitten en andere stoffen betrokken zijn. Veel van deze processen verlopen alleen als de betrokken eiwitten contact maken met een elektrisch negatief geladen oppervlak, zoals het oppervlak van de bloedplaatjes. Hoe dit negatieve oppervlak precies bijdraagt aan het op gang brengen van de reacties die

tot stolling van het bloed leiden, is onbekend. Doel van dit project is hierin meer inzicht te krijgen.

WELKE DELEN VAN DE VRAAGSTELLING ZIJN BEANTWOORD IN HET VERSLAGJAAR?

Voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag hebben de onderzoekers gebruik gemaakt van het gif van de Australische 'common brown snake'. Een onderdeel van dit gif vertoont sterke overeenkomsten met de menselijke stollingsfactor V, een van de eiwitten in de stollingscascade. Een belangrijk verschil is echter dat het 'slangenfactor V' geen negatief geladen oppervlak nodig heeft om geactiveerd te raken.

De onderzoekers hebben verschillende varianten van menselijk factor V gemaakt door op verschillende plaatsen een stukje van het menselijke eiwit te vervangen



door stukjes van het 'slangenfactor V'. Het vervangen van stukjes menselijk factor V door de overeenkomstige fragmenten uit het slangengif bleek echter niet uit te maken voor de werking van het menselijke factor V. Ook het inbouwen van stukjes eiwit die uniek zijn voor het 'slangenfactor V' had geen invloed op de werking van het menselijke factor V-eiwit op de bloedstolling. Omgekeerd had ook het vervangen van stukjes slangeneiwit door menselijk eiwit geen effect op de werking van het slangeneiwit.

Op grond van deze bevindingen concluderen de onderzoekers dat het slangengif op een andere manier werkt dan het menselijke factor V. In een vervolgproject zullen zij trachten op te helderen hoe het slangeneiwit precies werkt. Ook zullen zij nagaan of er nog andere verschillen zijn tussen het slangengif en menselijke factor V.

WELKE ASPECTEN VAN DE KENNIS OVER TROMBOSE ZIJN MET HET ONDERZOEK GEDIEND?

Ofschoon inmiddels veel bekend is over de verschillende componenten van de cascade aan reacties die leidt tot stolling van het bloed, zijn veel details van het proces nog onduidelijk. Het gebrek aan deze detailkennis maakt dat afwijkingen in de stolling, zoals trombose, nog niet goed begrepen worden. Dat maakt op zijn beurt effectieve behandeling of preventie van trombose moeilijk. Meer kennis van de rol die activering van factor V door contact met een negatief oppervlak speelt in de stollingscascade wijst mogelijk de weg naar nieuwe vormen van therapie om trombose te behandelen of te voorkomen.

Door gebrek aan detailkennis wordt trombose nog niet goed begrepen

Het gif van de Australische bruine slang lijkt sterk op een menselijke stollingsfactor

LITERATUURPUBLICATIES

Daniël Verhoef, Rodney M. Camire, Pieter H. Reitsma, Mettine H.A. Bos. Functional characterization of a structural element unique to venom factor V from the Australian common brown snake *Pseudonaja textilis*. Mondelinge presentatie bij de "XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis". Amsterdam (NL), 29 juni – 4 juli 2013.

Mondelinge presentatie tijdens het "5th International Conference of Exogenous Factors Affecting Thrombosis and Hemostasis". Amsterdam (NL), 5 – 6 juli 2013.

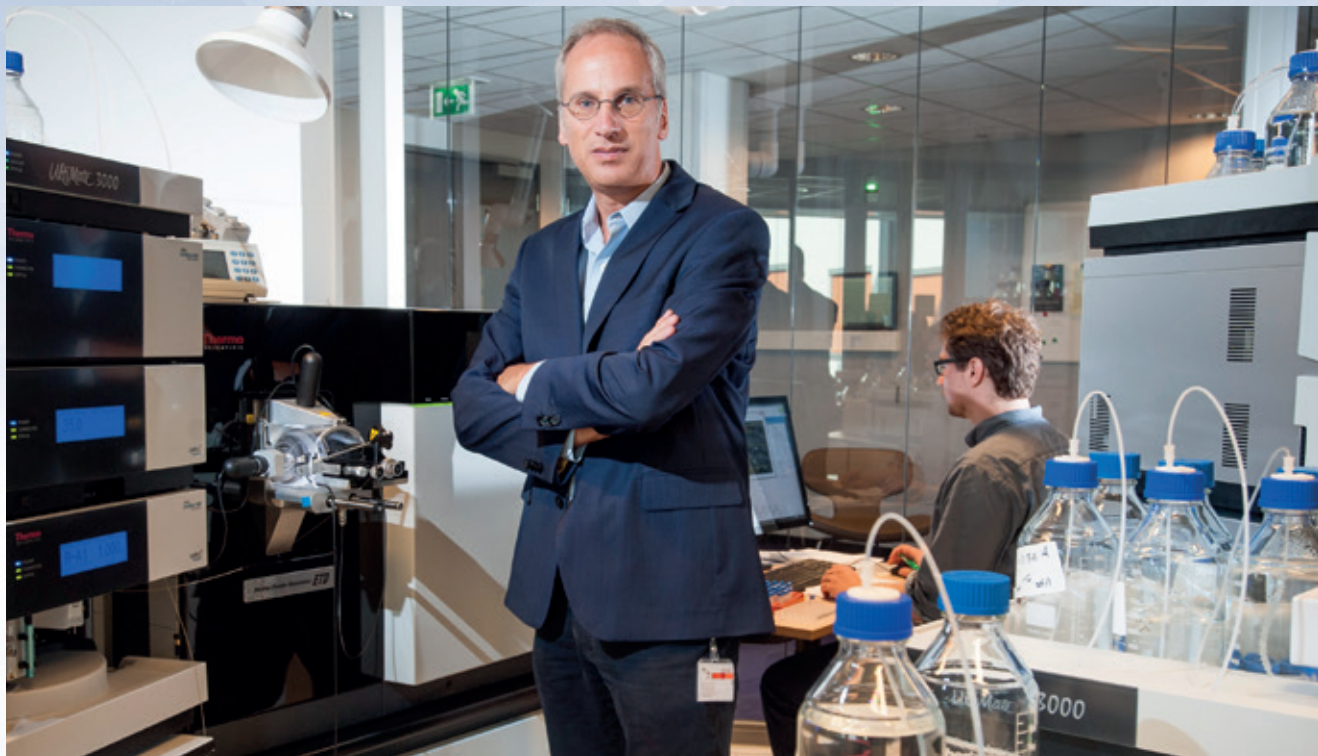
Daniël Verhoef, Xiaoxun Yang, Sudharsan Pathasarathy, Pieter H. Reitsma, Rodney M. Camire, Mettine H.A. Bos. Functional implications of the unique disulfide bond in venom factor V from the Australian common brown snake *Pseudonaja textilis*. *Toxin Reviews* 2014; 33: 37-4.



Geknipt von Willebrand Factor; geschikt voor diagnostiek bij stollingsafwijkingen?

Projectnummer: 2012-3

foto: Arno Massee



prof. dr. J.C.M. Meijers

Assessing cleavage in von Willebrand factor: a new diagnostic tool for bleeding and thrombosis?

Academisch Medisch Centrum

VRAAGSTELLING VAN HET ONDERZOEK

Het eiwit Von Willebrand Factor (vWF) speelt een belangrijke rol bij de stolling van het bloed. Het eiwit komt vrij uit vaatwandcellen op de plaats waar een beschadiging in de vaatwand is opgetreden. De bloed-plaatjes uit het voorbij stromende bloed blijven plakken aan de vWF-moleculen waardoor een bloedprop ontstaat op de plaats van de beschadiging. De vWF-moleculen dienen bovendien als hechtingsplaats voor stollingsfactoren zoals factor VIII.

Ieder vWF-molecuul is als het ware een kralenketting bestaand uit 50 tot 80 identieke kralen. Hoe langer de ketting, des te beter de stollingsbevorderende werking van vWF. Van het enzym ADAMTS13 is bekend dat het in staat is de lange, goed werkende vWF-moleculen in kleinere stukken te knippen. Mogelijk zijn ook andere enzymen in het bloed hiertoe in staat. Hoe meer van deze enzymen er in het bloed zijn (of hoe sterker de activiteit van deze enzymen) des te minder lange vWF-moleculen er in het bloed zijn en des te minder is de stollingsneiging van het bloed.

Doel van dit project is na te gaan of het meten van de hoeveelheid 'geknipt' vWF in het bloed nuttig is voor de diagnostiek van stollingsafwijkingen.

Afgerond project



WELKE DELEN VAN DE VRAAGSTELLING ZIJN BEANTWOORD IN HET VERSLAGJAAR?

De onderzoekers hebben een test ontwikkeld die met behulp van een antilichaam specifiek het 'geknipte' vWF kan aantonen. Met deze test hebben zij aangetoond dat er naast ADAMTS13 nog enkele andere enzymen in staat zijn vWF te knippen. Hieronder de enzymen cathepsine G, proteinase 3 en elastase die alle voorkomen in witte bloedcellen. Ook als deze enzymen het vWF knippen vermindert dit de stollingbevorderende werking van vWF.

De onderzoekers hebben vervolgens bij 646 gezonde mensen en 520 mannen die pas een hartinfarct hadden doorgemaakt gemeten hoeveel 'geknipt' vWF er bij hen in het bloed aanwezig was. De hoeveelheid geknipt vWF bleek niet te verschillen tussen beide groepen. Hieruit concluderen de onderzoekers dat de meting van 'geknipt' vWF niet geschikt is voor de diagnostiek bij patiënten met trombose. Of de test wel nuttig is voor mensen met een bloedingsneiging wordt verder onderzocht.

Er is nu een test die direct de geknipte vorm van vWF kan detecteren

WELKE ASPECTEN VAN DE KENNIS OVER TROMBOSE ZIJN MET HET ONDERZOEK GEDIEND?

Veranderingen in het vWF molecuul kunnen leiden tot bloedingen of trombose. vWF is een eiwit waarvan de werking afneemt als het wordt geknipt. Tot nu toe was er geen test die direct de geknipte vorm van vWF kon detecteren. In dit onderzoek is een dergelijke test opgezet. Nu kan worden nagegaan of met behulp van deze test ziektes die gepaard gaan met (een risico op) bloedingen of trombose kunnen worden opgespoord.

LITERATUURPUBLICATIES

Nog geen.

Ieder vWF-molecuul is als het ware een kralenketting bestaand uit 50 tot 80 identieke kralen



Op zoek naar betere antistollingsmedicijnen

Projectnummer: 2009-4

foto: Arno Massee



prof. dr. J.C.M. Meijers
Effectiever antistollen door de remming van de
intrinsieke route van de bloedstolling
Academisch Medisch Centrum

VRAAGSTELLING VAN HET ONDERZOEK

Wereldwijd gebruiken miljoenen mensen medicijnen die de stollingsneiging van het bloed verminderen (ook wel antistollingsmiddelen of anticoagulantia genoemd). Zij doen dit omdat ze een verhoogde kans hebben op de spontane vorming van stolsels in het bloed (trombose). Dergelijke stolsels kunnen bloedvaten afsluiten hetgeen ernstige gezondheidsschade kan veroorzaken. Antistollingsmiddelen werken over het algemeen goed, mits ze in de juiste dosering worden gebruikt. Het probleem daarbij is dat het doseren van deze medicijnen erg nauw luistert. Een beetje te veel medicijn leidt gemakkelijk tot spontane bloedingen, terwijl bij een beetje te

weinig medicijn de kans op trombose al snel oploopt. Vandaar de zoektocht naar medicijnen waarbij de dosering minder nauw luistert.

De stolling van het bloed komt tot stand door een geraffineerd samenspel tussen tal van eiwitten en andere stoffen in het bloed. Velen hiervan vormen – in theorie – een doelwit om mate en de snelheid van de stolling te beïnvloeden. Stollingsfactor XI is één van die eiwitten. Er zijn aanwijzingen dat het remmen van de activiteit van stollingsfactor XI het ontstaan van trombose kan voorkomen zonder dat de kans op bloedingen hierbij ernstig toeneemt. Medicijnen die dit stollingseiwit als ‘doelwit’ hebben, bestaan echter nog niet. Dit project onderzoekt hoe de activiteit van stollingsfactor XI op een zo effectief en veilig mogelijke manier te beïnvloeden is.



Kan het remmen van de aanmaak van factor XI het proces van atherosclerose remmen?

WELKE DELEN VAN DE VRAAGSTELLING ZIJN BEANTWOORD IN HET VERSLAGJAAR?

Eerder hebben de onderzoekers met succes twee antilichamen tegen stollingsfactor XI getest in muizen. De antilichamen blijken in staat trombose te voorkomen in muizen met een verhoogde kans op trombosevorming, zonder dat hierbij het risico op bloedingen toeneemt. Deze antilichamen zijn echter niet geschikt voor gebruik bij mensen. Ze zijn opgewekt in muizen; het menselijk afweersysteem herkent deze muizeneiwitten als lichaamsvreemd en zal ze zo snel mogelijk opruimen. De onderzoekers hebben daarom één van beide antilichamen zodanig aangepast (gehumaniseerd) dat het wel geschikt is voor gebruik bij mensen. In muizen bleek dit aangepaste antilichaam nog steeds trombose te voorkomen. Het risico op bloedingen is nu echter wel verhoogd. De onderzoekers gaan nu na waardoor dit komt.

Er zijn aanwijzingen dat sommige stollingsfactoren, waaronder factor XI, mogelijk een rol spelen bij het ontstaan van atherosclerose ('aderverkalking'). Atherosclerose is een belangrijke motor achter het ontstaan van hartinfarcten en beroertes. De onderzoekers willen daarom graag weten of het afremmen van de aanmaak van factor XI het ontstaan van atherosclerose kan verminderen. Om een antwoord op die vraag te krijgen hebben zij een specifiek type muizen, die gemakkelijk atherosclerose ontwikkelen, zodanig behandeld dat deze muizen nog maar heel weinig factor XI konden aanmaken. Momenteel bekijken de onderzoekers of bij deze muizen minder atherosclerose

voorkomt. Dat zal moeten uitwijzen of het remmen van de aanmaak van factor XI een zinvolle weg is om het proces van atherosclerose te vertragen of zelfs te voorkomen.

WELKE ASPECTEN VAN DE KENNIS OVER TROMBOSE ZIJN MET HET ONDERZOEK GEDIEND?

Het onderzoek zal een antwoord geven op de vraag of het blokkeren van de activiteit van factor XI een effectieve en veilige manier is om het risico op trombose te verminderen.

De experimenten met de antilichamen tegen factor XI leveren tevens meer inzicht in de wijze waarop een bloedstolsel precies ontstaat.

Het onderzoek zal bovendien inzicht geven in de mogelijk rol van factor XI bij het ontstaan van atherosclerose.

LITERATUURPUBLICATIES

Van Montfoort et al. Factor XI regulates pathological thrombus formation on acutely ruptured atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 34, 1668-1673.

Van Montfoort ML et al. Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:147-51.

Van Montfoort et al. Two novel inhibitory anti-human factor XI antibodies prevent cessation of blood flow in a murine venous thrombosis model. *Thromb Haemost.* 2013; 110:1065-73.

Van Montfoort et al. Anticoagulation beyond direct thrombin and factor Xa inhibitors: indications for targeting the intrinsic pathway? *Thromb Haemost.* 2013; 110:223-32.

Van Montfoort ML et al. Stollingsfactor XI als nieuw aangrijpingspunt voor antistolling. *Trombnibus* 2011;3:45.

Medicijnen die factor XI als 'doelwit' hebben bestaan nog niet



Abnormaal bloedstolsel (trombose) van de arm opsporen met MRI

Projectnummer: 2011-3

foto: Arno Massee



prof. dr. M.V. Huisman
Magnetic Resonance Direct Thrombus Imaging (MRDTI) bij patiënten met klinische verdachte diepe veneuze trombose van de arm
Leids Universitair Medisch Centrum

VRAAGSTELLING VAN HET ONDERZOEK

De aanwezigheid van een abnormaal bloedstolsel (trombose) in een bloedvat in een arm is met verschillende technieken aan te tonen. Zeer nauwkeurig is de flebografie, een techniek waarbij contrastvloeistof in de bloedvaten van de arm wordt ingespoten waarna een röntgenfoto duidelijk moet maken of er een trombose in een van de vaten zit. Nadeel van deze techniek is dat de patiënt hierbij wordt blootgesteld aan röntgenstraling en dat er bij sommige patiënten een allergie ontstaat tegen de contrastvloeistof.

Een minder belastende techniek is echografie, beeldvorming met behulp van geluidsgolven. Deze methode is echter minder nauwkeurig; met name een trombose in een bloedvat onder het sleutelbeen is met echografie moeilijk op te sporen.

Doel van dit project is na te gaan hoe bruikbaar beeldvorming met behulp van MRI (Magnetic Resonance Imaging) is bij het opsporen van trombose in de arm. Hiervoor is een speciale methodiek, Magnetic Resonance Direct Thrombus Imaging (MRDTI) ontwikkeld. De onderzoekers hebben onlangs aangetoond dat deze techniek betrouwbaar is om trombose in een beenader op te sporen.



WELKE DELEN VAN DE VRAAGSTELLING ZIJN BEANTWOORD IN HET VERSLAGJAAR?

Om binnen de duur van het project de MRDTI techniek te kunnen testen bij voldoende patiënten is de techniek ingevoerd in drie ziekenhuizen. De artsen in deze ziekenhuizen zullen gedurende 24 maanden alle patiënten met een verdenking op trombose in een armader vragen om mee te doen aan het onderzoek. De eerste resultaten lijken erop te wijzen dat MRDTI goed bruikbaar is om op een patiëntvriendelijke manier en met grote nauwkeurigheid na te gaan of er sprake is van een bloedprop in een ader in de arm.

WELKE ASPECTEN VAN DE KENNIS OVER TROMBOSE ZIJN MET HET ONDERZOEK GEDIEND?

Een betrouwbare en patiëntvriendelijke methode om met hoge mate van zekerheid de aanwezigheid van een trombose in een bloedvat van de arm aan te tonen, kan bijdragen aan een betere diagnostiek van dit klinisch belangrijke probleem. Toepassen van MRDTI zal er ook aan bijdragen dat patiënten met een verdenking op trombose in een armader minder worden blootgesteld aan röntgenstraling en dat er minder allergische reacties ontstaan. Het weinig belastende karakter van de techniek maakt ook dat ook bij patiënten die vanwege een mindere goede lichamelijke conditie, bijvoorbeeld een ernstige nierfunctiestoornis, onderzoek gedaan kan worden naar het voorkomen van trombose in een armader. Toepassen van MRDTI kan ook de kosten van de diagnostiek verlagen aangezien de diagnostiek met deze techniek sneller verloopt waardoor de patiënt niet 7 dagen in het ziekenhuis hoeft te worden opgenomen.

MRDTI lijkt patiëntvriendelijk en nauwkeuring

Hoe bruikbaar is MRDTI bij het opsporen van armtrombose?

LITERATUURPUBLICATIES

RE Westerbeek, CJ Van Rooden, M Tan, AP van Gils, S Kok, MJ De Bats, A De Roos, MV Huisman. Magnetic resonance direct thrombus imaging of the evolution of acute deep vein thrombosis of the leg. *J Thromb Haemost.* 2008 Jul;6(7):1087-92

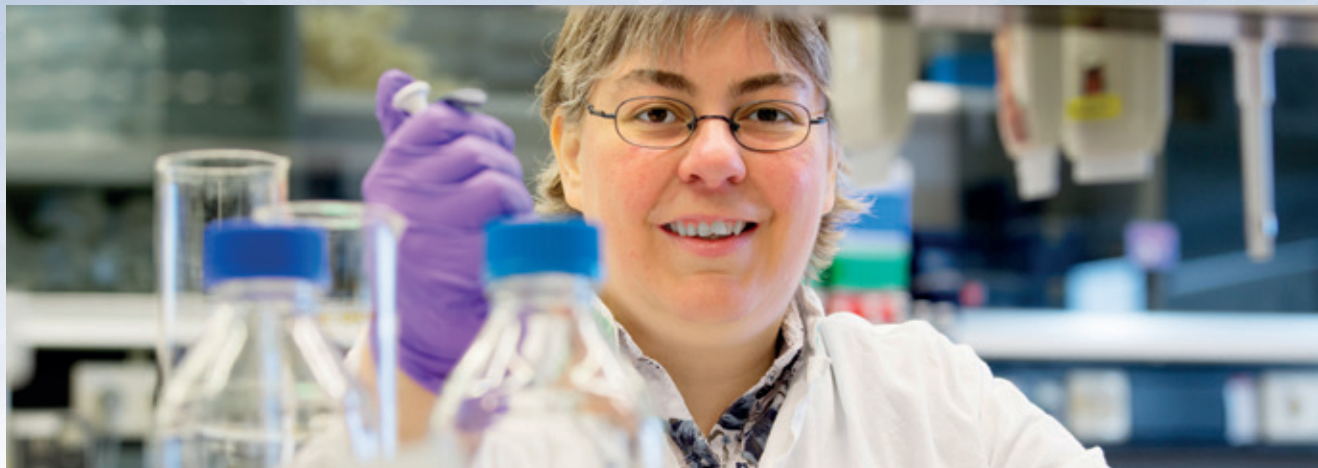
M Tan, GC Mol, CJ van Rooden, et al. Ability of magnetic resonance direct thrombus imaging (MRDTI) to differentiate acute recurrent ipsilateral deep vein thrombosis from residual thrombosis. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-04-566380>



Hoe fibrinogeen γ' de activiteit van trombine in toom houdt

Projectnummer: 2011-2

foto: Appie Derks



dr. E. Castoldi

Modulation of thrombin generation and activity by total fibrinogen and fibrinogen γ'
Universiteit Maastricht

VRAAGSTELLING VAN HET ONDERZOEK

Bij de vorming van een bloedstolsel speelt de vorming van fibrinedraden een belangrijke rol. Deze draden vormen het netwerk dat stevigheid verleent aan de bloedprop die ontstaat als bloedplaatjes aan elkaar hechten op de plaats van een verwonding.

De fibrinedraden ontstaan als het eiwit fibrinogeen wordt omgezet in fibrine. Deze omzetting gebeurt met behulp van het enzym trombine.

Fibrinogeen komt in twee vormen voor in het bloed: fibrinogeen γA en fibrinogeen γ' . De γ' -vorm, goed voor ongeveer 10 procent van de totale hoeveelheid fibrinogeen in het bloed, wordt niet alleen omgezet in fibrine, het oefent zelf een remmende werking uit op de activiteit van het enzym trombine. Hierdoor houdt het de activiteit van trombine enigszins in toom, waardoor het een al te sterke vorming van fibrine voorkomt. Hoe belangrijk die remmende werking van fibrinogeen γ' op trombine is, wordt goed zichtbaar bij mensen die als gevolg van een erfelijke afwijking – FGG H2 geheten – weinig fibrinogeen γ' maken. Zij hebben een verhoogde kans op trombose

doordat de stolling minder geremd wordt.

Hoe fibrinogeen γ' de activiteit van trombine precies onderdrukt is niet duidelijk. Doel van dit project is hier meer zicht op te krijgen.

WELKE DELEN VAN DE VRAAGSTELLING ZIJN BEANTWOORD IN HET VERSLAGJAAR?

In dit verslagjaar hebben de onderzoekers zich vooral beziggehouden met de relatie tussen fibrinogeen γ' en het fenomeen van de zogeheten APC-resistentie. APC, volledig geactiveerd proteïne C, remt de stolling doordat het de activiteit van twee stollingbevorderende eiwitten, te weten factor Va en factor VIIIa, remt. Hiermee is APC de tegenhanger van trombine dat niet alleen zorgt voor de omzetting van fibrinogeen in fibrine, maar tevens voor de activering van factor V en factor VIII.

Verloopt de remming van factor Va en factor VIIIa door APC niet goed, dan is er sprake van APC-resistentie. APC-resistentie gaat gepaard met een verhoogde kans op de spontane vorming van bloedstolsels in de bloedvaten (veneuze trombose).

De onderzoekers merkten op dat APC-resistentie erger is bij mensen met relatief weinig fibrinogeen γ' in het bloed dan bij mensen met veel fibrinogeen γ' in het bloed. In in vitro experimenten toonden de onderzoekers



vervolgens aan dat fibrinogeen γ' de APC-resistentie vermindert. Dat gebeurt zowel in het plasma van 'gewone' mensen als in het plasma van mensen die een erfelijk bepaald verhoogd risico op trombose hebben vanwege een afwijkend variant van het gen voor factor V (factor V Leiden).

Fibrinogeen γ' is bij alle mensen in staat te binden aan trombine. Hierdoor neemt de werking van trombine af. Niet alleen de door trombine gestimuleerde omzetting van fibrinogeen in fibrine neemt af, ook de door trombine gestimuleerde activering van factor V en factor VIII.

Het gevolg daarvan is dat de remmende werking van APC op factor Va en factor VIIIa meer tot zijn recht komt.

De onderzoekers hebben ook aangetoond dat er slechts een klein stukje van het fibrinogeen γ' molecuul (het zogenaamde fibrinogeen γ' -peptide) nodig is om de activiteit van trombine af te remmen (en daardoor de stollingsneiging van het bloed te verminderen).

Dit maakt het fibrinogeen γ' -peptide een aantrekkelijke kandidaat als uitgangspunt voor nieuwe antitrombotische middelen.

WELKE ASPECTEN VAN DE KENNIS OVER TROMBOSE ZIJN MET HET ONDERZOEK GEDIEND?

Het onderzoek levert ondersteuning voor het idee dat fibrinogeen γ' de stolling van het bloed onderdrukt door op een specifieke plaats te binden aan trombine en zo de stollingsbevorderende werking van trombine te remmen. Dit verklaart waarom mensen met weinig fibrinogeen γ' (patiënten met FGG H2) een verhoogde kans hebben op trombose.

In de toekomst zou het fibrinogeen γ' -peptide mogelijk de basis kunnen vormen voor een nieuw antitrombotisch middel. Dit zou onder andere gebruikt kunnen worden om de APC-gevoeligheid van het plasma van factor V Leiden-dragers te verhogen.

LITERATUURPUBLICATIES

Omarova F, Uitte de Willige S, Ariëns RAS, Rosing J, Bertina RM, Castoldi E. Inhibition of thrombin-mediated factor V activation contributes to the anticoagulant activity of fibrinogen γ' . *J Thromb Haemost* 2013; 11: 1669-78.

Omarova F, Uitte de Willige S, Simioni P, Ariëns RAS, Rosing J, Bertina RM, Castoldi E. Fibrinogen γ' increases the sensitivity to activated protein C in normal and factor V Leiden plasma. Aanvaard voor publicatie in *Blood*.

Omarova F, Uitte de Willige S, Dirven RJ, Ariëns RAS, Rosing J, Bertina RM, Castoldi E. Total fibrinogen and fibrinogen γ' modulate thrombin generation in plasma. Mondelinge presentatie bij de XXII International Fibrinogen Workshop. Brighton (Groot Brittannië), 4-6 juli 2012.

Omarova F, Uitte de Willige S, Ariëns RAS, Rosing J, Bertina RM, Castoldi E. Inhibition of thrombin-mediated factor V activation as a novel anticoagulant effect of fibrinogen γ' . Mondelinge presentatie bij het congres van de International Society on Thrombosis en Haemostasis (ISTH). Amsterdam, 1-4 juli 2013. Onderscheiden met een Young Investigator Award t.w.v. € 500,-.

Omarova F, Uitte de Willige S, Simioni P, Ariëns RAS, Bertina RM, Rosing J, Castoldi E. Fibrinogen γ' increases the sensitivity to activated protein C in normal and FV Leiden plasma. Mondelinge presentatie bij het congres van de International Society on Thrombosis en Haemostasis (ISTH). Amsterdam, 1-4 juli 2013.

Omarova F, Uitte de Willige S, Simioni P, Ariëns RAS, Bertina RM, Rosing J, Castoldi E. Fibrinogen γ' increases the sensitivity to activated protein C in normal and FV Leiden plasma. Mondelinge presentatie bij het Symposium van de Nederlandse Vereniging van Trombose en Hemostase (NVTH). Koudekerke, 9-10 april 2014. Onderscheiden met een Award of Excellence t.w.v. € 2000,-.

Omarova F, Uitte de Willige S, Simioni P, Ariëns RAS, Bertina RM, Rosing J, Castoldi E. Fibrinogen γ' increases the sensitivity of plasma to activated protein C. Geaccepteerd als mondelinge presentatie bij de XXIII International Fibrinogen Workshop. Marseille (Frankrijk), 9-11 juli 2014.



Wetenschap - Onderzoekers aan het woord

Meer zekerheid bij diagnose cerebrale veneuze sinustrombose

Projectnummer: 2012-2

foto: Marcel Israël



dr. J. Coutinho

Klinische beslisregel en D-dimeer concentratie bij patiënten met verdenking cerebrale veneuze sinustrombose

Academisch Medisch Centrum

VRAAGSTELLING VAN HET ONDERZOEK

Een afsluiting van een ader in de hersenen door een bloedpropje (cerebrale sinustrombose) is een relatief zeldzame oorzaak van een beroerte. Veel vaker is afsluiting van een slagader hiervan de oorzaak. De klachten bij cerebrale sinustrombose zijn afhankelijk van de plaats en de uitgebreidheid van

de trombose. Het kan gaan om hoofdpijn, epilepsie, braken, misselijkheid, verminderd bewustzijn (tot coma), eenzijdig krachtsverlies/verlamingsverschijnselen, problemen met het zien, doofheid aan één kant, enzovoort. Dit uitgebreide scala aan klachten maakt het stellen van de juiste diagnose moeilijk. Van alle patiënten bij wie op grond van de klachten het vermoeden bestaat dat er sprake is van cerebrale veneuze sinustrombose blijkt, na (duur) aanvullend onderzoek, slechts 10 tot 15 procent daadwerkelijk deze aandoening te hebben. Er is daarom grote behoefte aan een methode die snel en accuraat (en liefst goedkoop) kan vaststellen wanneer er



sprake is van cerebrale veneuze sinustrombose. Doel van dit project is aan de hand van klinische verschijnselen en metingen van bloedwaarden van 250 patiënten met cerebrale sinustrombose een scorings-systeem te ontwikkelen dat in staat is patiënten met cerebrale veneuze sinustrombose snel en accuraat te herkennen.

WELKE DELEN VAN DE VRAAGSTELLING ZIJN BEANTWOORD IN HET VERSLAGJAAR?

De onderzoekers zijn in het tweede jaar verder gegaan met het verzamelen van gegevens van patiënten die voldoen aan de criteria voor cerebrale veneuze sinustrombose. Van deze patiënten zijn de medische gegevens in kaart gebracht en is bloed verzameld voor het bepalen van diverse stollingswaarden (met name D-dimeer). Pas als van alle 250 deelnemers de gegevens en het bloed verzameld zijn, zal een analyse van de gegevens kunnen plaatsvinden en zullen de metingen in het bloed worden uitgevoerd.

Sinustrombose kent een uitgebreid scala aan klachten

WELKE ASPECTEN VAN DE KENNIS OVER TROMBOSE ZIJN MET HET ONDERZOEK GEDIEND?

Het ontwikkelen van een betrouwbaar scoringssysteem voor het herkennen van cerebrale veneuze sinustrombose zal het mogelijk maken patiënten met deze aandoening gemakkelijker te herkennen. Dit zal (zowel de patiënt als het zorgsysteem) onnodig onderzoek (en mogelijk ook kosten) besparen.

LITERATUURPUBLICATIES

Nog geen.

Sinustrombose is een relatief zeldzame oorzaak van een beroerte



APS: meer antistoffen = meer risico op trombose?

Projectnummer: 2012-1

foto: Arno Massee



prof. dr. Ph.G. de Groot

A mouse model for the antiphospholipid syndrome
Universitaire Medisch Centrum Utrecht

VRAAGSTELLING VAN HET ONDERZOEK

Het antifosfolipidensyndroom, naar de Engelse schrijfwijze vaak afgekort als APS, is een van de vele aandoeningen waarbij het lichaam spontaan afweerstoffen vormt tegen bestanddelen van het eigen lichaam. Bij APS vormt het afweersysteem antistoffen tegen enkele zogeheten fosfolipiden (vetachtige stoffen) in het bloed. De gevormde antilichamen binden echter niet alleen aan de fosfolipiden maar ook aan enkele eiwitten in het bloed die betrokken zijn bij de stolling van het bloed. Ook kunnen de antilichamen bloedplaatjes activeren en cellen in de bloedvatwand aanzetten tot het uitscheiden van stoffen die de stolling van het bloed bevorderen. Het gevolg van dit alles is dat mensen met APS een

verhoogde kans hebben op de spontane vorming van bloedstolsel in de aderen (veneuze trombose) en/of in de slagaderen (arteriële trombose). Vrouwen met APS lopen bovendien een sterk verhoogde kans dat hun zwangerschap vroegtijdig eindigt in miskraam, dat hun kind dood geboren wordt of dat zij aan het eind van de zwangerschap te maken krijgen met pre-eclampsie (zwangerschapsvergiftiging).

Mensen met APS krijgen ter voorkoming van trombose en/of problemen in de zwangerschap medicijnen toegediend die de stolling van het bloed tegengaan. Een nog onbeantwoorde vraag ten aanzien van APS is in hoeverre de hoeveelheid antistoffen in het bloed verband houdt met de grootte van de kans op trombose en/of zwangerschapsproblemen. Daardoor is het in de praktijk niet duidelijk of het verantwoord is om te stoppen met de preventieve medicijnen als de hoeveelheid antistoffen in het bloed is afgenomen,



Het antifosfolipidensyndroom geeft een verhoogde kans op trombose

of - andersom - of de dosis medicijnen moet worden verhoogd als de hoeveelheid antistoffen in het bloed toeneemt. Het doel van dit project is om in een muizenmodel voor APS na te gaan of er een verband bestaat tussen de hoeveelheid APS-antistoffen in het bloed en het risico op trombose en/of zwangerschapsproblemen. Het project zal daarnaast enkele nieuwe vormen van behandeling tegen APS testen.

WELKE DELEN VAN DE VRAAGSTELLING ZIJN BEANTWOORD IN HET VERSLAGJAAR?

In het eerste projectjaar heeft de onderzoeker, die het project gaat uitvoeren, geleerd om te gaan met de muizen en zich de (operatie)technieken eigen gemaakt die nodig zijn om de experimenten te kunnen uitvoeren. Daarnaast hebben de onderzoekers de eiwitten gemaakt die nodig zijn om APS bij muizen te kunnen opwekken (dit kan door de muizen te behandelen met eiwitten afkomstig van sommige bacteriën), evenals eiwitten die nodig zijn om trombose in de muis aan te tonen en eiwitten die mogelijk trombose door antifosfolipiden antilichamen kunnen voorkomen.

De onderzoekers hebben bij een groep patiënten uit Tanzania de hoeveelheid antifosfolipiden antistoffen in het bloed gemeten. Deze patiënten komen uit een regio in Tanzania waar mensen vaak een infectie met een bacterie oplopen en waar - vergeleken met Nederland - veel mensen een herseninfarct krijgen.

Veel van deze herseninfarcten gaan samen met de aanwezigheid van antifosfolipiden antistoffen. De onderzoekers zullen nagaan of, en zo ja welke infecties mogelijk het risico vergroten dat het lichaam antifosfolipiden antistoffen gaat aanmaken.

WELKE ASPECTEN VAN DE KENNIS OVER TROMBOSE ZIJN MET HET ONDERZOEK GEDIEND?

Tot nu toe is het niet mogelijk te voorspellen hoe groot de kans is dat iemand die een trombose heeft doorgemaakt, opnieuw een trombose zal krijgen. In het geval van APS zijn de antifosfolipiden antistoffen betrokken bij het ontstaan van de trombose. Onbekend is of er een verband bestaat tussen de hoeveelheid antifosfolipiden in het bloed en het risico op (een nieuwe) trombose. Als duidelijk is wat het verband is tussen de hoeveelheid antifosfolipiden antistoffen in het bloed en het risico op (een nieuwe) trombose, wordt het mogelijk om in te schatten hoe groot het risico is op trombose van iedere APS-patiënt. Dat maakt het wellicht mogelijk de zwaarte van de behandeling aan te passen (mogelijk te stoppen) aan de hand van de hoeveelheid antistoffen in het bloed.

LITERATUURPUBLICATIES

(Nog) geen.

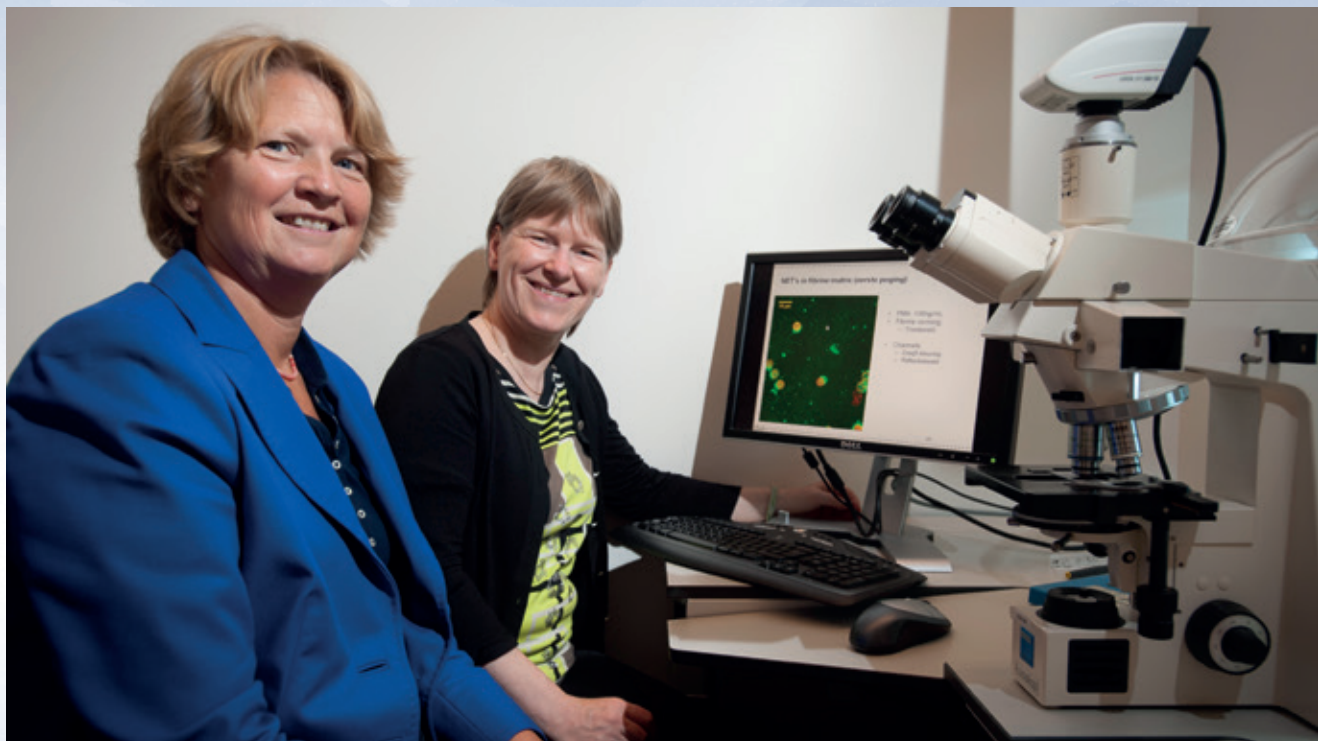
Is er een verband tussen de hoeveelheid APS-antistoffen en het risico op trombose?



De invloed van stolseleigenschappen op het herstel na een acuut hartinfarct

Projectnummer: 2013-2

foto: Arno Massee



dr. M.P. M. de Maat en dr. H.M.M. van Beusekom
Functional three-dimensional architecture of the
coronary thrombus in relation to phenotype:
in vivo and in vitro thrombus fate?
Erasmus Medisch Centrum

VRAAGSTELLING VAN HET ONDERZOEK

Een acuut hartinfarct ontstaat wanneer een bloedstolsel één (of meer) slagaderen afsluit die het hart van zuurstofrijk bloed voorzien. De hartspeer krijgt daarvoor te weinig zuurstof waardoor hartspeerweefsel afsterft en het hart het bloed niet meer goed door het lichaam kan pompen. De twee meest gebruikte manieren om de bloedstroom door de afgesloten kransslagader(en) weer op gang te krijgen zijn het mechanisch verwijderen van het bloedstolsel tijdens een dotterprocedure of het toedienen van een medicijn dat het stolsel oplost.

In Nederland is de eerste methode het meest gangbaar, maar in het buitenland komt de tweede methode nog vaak voor. Hoe goed de patiënt herstelt van deze behandelingen hangt voor een deel af van de bouw en samenstelling van het bloedstolsel dat de verstopping van de kransslagader(s) heeft veroorzaakt. Zo lost het ene stolsel gemakkelijker op onder invloed van medicijnen dan het ander. En veroorzaakt het ene stolsel meer schade aan de bloedvatwand dan een ander.

Doel van dit project is uit te zoeken hoe de precieze samenstelling en de driedimensionale bouw van een stolsel samenhangen met het herstel van de patiënt. Als hier meer inzicht in komt, zal het mogelijk worden de behandeling van patiënten na een acuut hartinfarct af te stemmen op de eigenschappen van het stolsel bij die patiënt.



Mogelijk is de behandeling na een acuut hartinfarct af te stemmen op de aard van het stolsel

WELKE DELEN VAN DE VRAAGSTELLING ZIJN BEANTWOORD IN HET VERSLAGJAAR?

In de eerste maanden van het project hebben de onderzoekers stolsels verzameld van patiënten met een acuut hartinfarct. Van deze stolsels hebben zij de samenstelling en bouw in kaart gebracht. Hierbij is onder andere gekeken naar de verschillende soorten bloedcellen in het stolsel en het netwerk van draden in het stolsel.

WELKE ASPECTEN VAN DE KENNIS OVER TROMBOSE ZIJN MET HET ONDERZOEK GEDIEND?

Door na te gaan hoe de samenstelling en driedimensionale bouw van stolsels samenhangen met de schade die het stolsel veroorzaakt aan de vaatwand en met de kans op herstel van de patiënt zal het mogelijk worden de behandeling van patiënten met een acuut hartinfarct af te stemmen op de eigenschappen van het stolsel bij die patiënt.

LITERATUURPUBLICATIES

Mevrouw Anouchska Autar heeft een abstract getiteld "Functional architecture of the coronary artery thrombus" gepresenteerd op het XXIIIrd International Fibrinogen Workshop te Marseille.

Hoe hangen de samenstelling en bouw van een stolsel samen met het herstel na een acuut hartinfarct?