

The tissue factor pathway of blood coagulation in health and disease

Citation for published version (APA):

Ariens, R. A. S. (1997). *The tissue factor pathway of blood coagulation in health and disease*. Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/1997

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting

De bloedstolling is van vitaal belang, zij beschermt het organisme tegen bloeding en waarborgt dat de bloedsomloop gesloten blijft. De stolling is een snel reagerend systeem, waarbij stollingsfactoren elkaar activeren in een reeks van biochemische reacties. Belangrijke eigenschappen van dit biochemische systeem zijn positieve feedback en versterking, zodat zelfs een kleine stimulus leidt tot voldoende stolselvorming. Een te hoge activiteit van de bloedstolling kan echter leiden tot inwendige stolsels of trombose. Daarom worden de stollingsfactoren tegengewerkt door specifieke remmers, die vaak via een mechanisme van negatieve feedback de stollingreacties stoppen. De bloedstolling is een *fijn uitgebalanceerd proces, dat geactiveerd wordt zodra de vaatwand beschadigd is, maar gecontroleerd wordt in tijd en ruimte wanneer de integriteit van de bloedsomloop hersteld is.*

Weefselfactor (tissue factor, TF) activeert de bloedstolling. Dit is een cellulair membraaneiwit dat normaal alleen door perivasculaire cellen tot expressie gebracht wordt. Wanneer het bloed in contact komt met TF-rijke cellen, bindt TF stollingsfactor VII (FVII). De vorming van dit complex leidt tot de activering van factoren IX en X. Geactiveerd factor X (FXa) op zijn beurt activeert factor II of trombine, waarna trombine fibrinogeen in fibrine omzet en bloedplaatjes activeert (figuur 3, hoofdstuk 1). Het stolsel wordt gevormd door een netwerk van fibrine waaraan zich de geactiveerde plaatjes hechten. De activering van de bloedstolling door weefselfactor wordt specifiek geremd door de tissue factor pathway inhibitor (TFPI) met een negatief feedback mechanisme: TFPI bindt en remt eerst FXa, waarna deze remmer een quaternair complex vormt met FXa, FVIIa en TF (figuur 8, hoofdstuk 1).

Het doel van de in dit proefschrift beschreven onderzoek was om de *in vivo* rol van de tissue factor pathway van de bloedstolling beter te karakteriseren, vooral in relatie tot trombose. Om studies van de componenten van de tissue factor pathway in groepen van patiënten met bepaalde (trombotische) ziekten te kunnen interpreteren, is het van belang goed te begrijpen of en, zo ja, hoe deze componenten variëren in de gezonde populatie. We hebben daarom het effect van twee belangrijke fysiologische variabelen, leeftijd en geslacht, op de bloedplasmaconcentraties van het eerste enzym van de tissue factor pathway (factor VII) en van de remmer TFPI bestudeerd in een grote groep van 160 gezonde mensen, met een leeftijd van 21 tot 101 jaar (**hoofdstuk 2**). Bloedplasmaconcentraties van TFPI, FVIIa (de geactiveerde vorm van factor VII) en FVIIc (het pro-enzym gemeten met een biologische activiteitstest) correleerden allen positief met leeftijd. Het bleek dat deze correlatie het sterkste was in de vrouwelijke helft van de onderzochte groep. Ook bij mannen stijgen de

bloedplasmaconcentraties van TFPI, FVIIa en FVIIc met de leeftijd, maar dit was statistisch niet significant. Het is mogelijk dat de bloedplasmaconcentraties van de componenten van de tissue factor pathway meer met leeftijd correleren bij vrouwen vanwege veranderingen in de hormonenstofwisseling zodra de menopauze inzet. Deze resultaten geven aan hoe belangrijk het is om de juiste, naar leeftijd en geslacht bijpassende, controlegroep te zoeken, wanneer men bloedplasmaconcentraties van TFPI, FVIIa en FVIIc wil meten in een groep patiënten met een bepaalde ziekte.

Het grootste deel van TFPI bevindt zich niet in het bloed, maar komt vrij na injectie van heparine (een veel gebruikt bloedstolling remmend medicijn). Dit deel is waarschijnlijk gebonden aan heparine-achtige moleculen (glycosaminoglycanen) van de endotheelcellen die bloedvaten omsluiten (figuur 9, hoofdstuk 1). Om te onderzoeken of deze fractie van TFPI herhaaldelijk vrij gemaakt kan worden, hebben we bij drie vrijwilligers de bloedplasmaconcentraties van TFPI gemeten na herhaalde intraveneuze injecties van heparine (**hoofdstuk 3**). Het bleek dat 8 achtereenvolgende injecties van heparine (met intervallen van 9 tot 19 uur) telkens dezelfde hoeveelheid TFPI vrijmaakten. Dit is in overeenstemming met de theorie dat deze fractie van TFPI reversibel gebonden is aan de glycosaminoglycanen van het endotheel, en dat heparine deze fractie tijdelijk in de bloedcirculatie brengt. Wanneer de heparine uit de bloedstroom verdwijnt (normaal binnen 2 tot 4 uur na een intraveneuze injectie), bindt de TFPI zich waarschijnlijk opnieuw aan het vasculaire endotheel.

Deficiëntie van de in het organisme voorkomende stollingsremmers kan veneuze trombose en long embolie tot gevolg hebben. Tot nu toe waren er nog geen patiënten met deficiëntie van TFPI en veneuze trombose bekend, maar in voorgaande studies waren alleen bloedplasmaconcentraties van TFPI gemeten. Aangezien de door heparine vrijkomende TFPI waarschijnlijk een belangrijke rol speelt in de stollingsremmende eigenschappen van het vasculaire endotheel, besloten we om te onderzoeken of deficiëntie van deze door heparine vrijkomende fractie kan leiden tot veneuze trombose (**hoofdstuk 4**). We hebben een aantal jonge patiënten met veneuze trombose en lage concentraties van de door heparine vrijkomende TFPI gevonden. Deze lage concentraties werden zowel door een biologische activiteitstest als een immunologische test (ELISA) gemeten. Zij bleken ongeveer 50% van de gemiddelde concentratie in de naar leeftijd en geslacht bijpassende controle groep te zijn. Dit resultaat duidt op een heterozygote deficiëntie. Antitrombine deficiëntie bijvoorbeeld wordt alleen in heterozygote vorm gevonden, homozygote deficiëntie van antitrombine - waarbij er helemaal geen antitrombine in het bloed aanwezig is - is waarschijnlijk niet compatibel met het leven. Analooch zou ook TFPI-deficiëntie alleen in heterozygote vorm kunnen bestaan. Zeven van de

12 patiënten met lage door heparine vrijkomende TFPI concentraties hadden ook lage basale TFPI concentraties (voor de heparine injectie), wanneer deze gemeten werden met ELISA. In een aantal gevallen kon met behulp van de ELISA-test dus lage concentraties van de door heparine vrijkomende TFPI gemeten worden zonder dat injectie van heparine nodig was, maar de verschillen waren minder duidelijk dan na injectie van heparine. De deficiëntie van de door heparine vrijkomende TFPI bleek geen tijdelijk defect te zijn, want dezelfde lage concentraties werden opnieuw gevonden na een paar maanden. Aangezien lage concentraties van de door heparine vrijkomende TFPI ook werden gevonden bij de naaste familie-leden van 6 patiënten, zijn waarschijnlijk deze lage concentraties genetisch bepaald. Deze resultaten geven aan dat genetische deficiëntie van door heparine vrijkomende TFPI een mogelijke oorzaak is van trombofilie (genetisch overgedragen ziekte van veneuze trombose; zie hoofdstuk 1, paragraaf 1.5). Twee waarnemingen verdienen echter aandacht. Ten eerste bleken de concentraties van TFPI nogal te variëren in de gezonde populatie, meer dan die van bijvoorbeeld antitrombine. Het is dus mogelijk dat TFPI concentraties van 50% volledig normaal zijn, en niet tot trombose leiden. Ten tweede had geen van de familieleden ooit trombose gehad, en daarom kon er dus geen co-segregatie van trombose met lage concentraties van door heparine vrijkomende TFPI aangetoond worden. Verder onderzoek, naar bijvoorbeeld de moleculaire genetica van het TFPI gen in de patiënten, is nodig om te bevestigen dat deficiëntie van door heparine vrijkomende TFPI werkelijk een mogelijke oorzaak van trombofilie is.

Veneuze trombose komt vaak voor bij patiënten met het nefrotisch syndroom en proteinurie. Men denkt dat verworven deficiëntie van stollingsremmers, door het abnormale verlies van de remmers in de urine, één van de oorzaken van de veneuze trombose is. Inderdaad vonden diverse onderzoekers deficiënties van antitrombine bij patiënten met het nefrotisch syndroom. Het nefrotisch syndroom kan daarom als een *in vivo* model dienen van veneuze trombose veroorzaakt door deficiënties van stollingsremmers. In **hoofdstuk 5** hebben we eerst onderzocht, met behulp van nieuwe testen van stollingsactivering, in hoeverre de bloedstolling geactiveerd is bij patiënten met het nefrotisch syndroom. Het bleek dat er een pretrombotische staat aanwezig was bij deze patiënten. De pretrombotische staat werd duidelijk door abnormaal hoge bloedplasmaconcentraties van F1+2 (activeringspeptide van trombine) en TAT (het complex van trombine - antitrombine). Bovendien vonden we abnormaal hoge concentraties van geactiveerd factor VII (FVIIa), dat aantoont dat de pretrombotische staat veroorzaakt wordt door activering van de tissue factor pathway. Deze verhoogde activering van de tissue factor pathway is waarschijnlijk de oorzaak van de veneuze trombose bij patiënten met het nefrotisch

syndroom en proteinurie. Vervolgens hebben we onderzocht of deficiëntie van TFPI een van de mogelijke oorzaken van de verhoogde activering van de tissue factor pathway in deze patiënten zou kunnen zijn (**hoofdstuk 6**). Geen enkele deficiëntie van TFPI werd gevonden bij 31 patiënten. Integendeel, de bloedplasmaconcentraties van deze remmer waren abnormaal hoog. De concentratie van TFPI was ook hoog na injectie van heparine. Deficiëntie van TFPI kan daarom dus niet de oorzaak zijn van de pretrombotische staat en trombotische complicaties in patiënten met het nefrotisch syndroom.

Atherosclerose van de kransslagaders is de oorzaak van hartaandoeningen. Het breken van de atherosclerotische plaque kan tot trombose en mogelijk tot totale obstructie van de slagader leiden, met acute syndromen zoals hartinfarcten of (onstabiele) angina pectoris als gevolg. Niet alle plaques leiden echter tot trombose wanneer ze breken; tijdens autopsie van personen die niet aan hartkwalen gestorven zijn, worden vaak gebroken plaques zonder trombi in de kransslagaders gevonden. In de literatuur is reeds vaker de hypothese geponeerd dat de hoeveelheid TF, die in de atherosclerotische plaque aanwezig is, bepaalt of het breken van de plaque leidt tot trombose. Voldoende bewijs om deze hypothese te bevestigen was echter nog niet gevonden. De onlangs ontwikkelde techniek van directional coronary atherectomy (DCA) heeft het mogelijk gemaakt om met deze relatief weinig invasieve operatie de atherosclerotische plaque uit te snijden en te verkrijgen voor laboratoriumonderzoek. Om te onderzoeken of de hoeveelheid TF die in de plaque aanwezig is bepaalt of trombose plaatsvindt na het breken van de plak, hebben we de TF-concentratie en -activiteit gemeten in plaques verkregen met DCA bij 50 patiënten met hartaanvallen, onstabiele angina pectoris en stabiele angina pectoris (**hoofdstuk 7**). Ten eerste bleek dat alle TF die aanwezig was in de atherosclerotische plaque ook functioneel volledig actief was. Ten tweede hebben we gevonden dat er meer TF-eiwit en -activiteit aanwezig was in de plaques van patiënten met hartaanvallen en onstabiele angina pectoris, dan in die van patiënten met stabiele angina pectoris. In sommige plakmonsters van patiënten met stabiele angina pectoris was er geen meetbare hoeveelheid van TF te vinden. We hebben daarom de conclusie getrokken, dat de trombose reactie (die acute infarct-syndromen veroorzaakt) op het breken van de atherosclerotische plaque afhankelijk is van de hoeveelheid TF die in de plaque aanwezig is.

Een aantal verschillende, relatief weinig invasieve technieken, waarbij een sonde wordt ingebracht via een slagader van het been en naar de dichtgeslibde kransslagader wordt geleid, zijn ontwikkeld om de atherosclerotische plaque te verwijderen. Tegenwoordig worden ze vaak toegepast in plaats van de meer invasieve by-pass (die een hartoperatie vereist) om patiënten met atheroscle-

rotische hartaandoeningen te behandelen. Deze technieken, zoals 'percutaneous transluminal coronary angioplasty' of PTCA (waarbij de atherosclerotische plaque wordt ingedrukt door een opblaasbaar ballonnetje), rotatie met een diamanten punt, 'directional coronary atherectomy' of DCA (waarbij een mesje de plaque wegsnijdt en opvangt in een zakvormig uiteinde van de sonde) en het aanbrengen van een stent (een buisvormig netwerkje van metaal dat de ader open houdt), drukken, snijden, breken en schaven de atherosclerotische plaque echter af, zodat de sterk stollingsactiverende kern van de plaque wordt bloot gesteld aan het stromende bloed. Intensieve behandeling met medicijnen die de bloedstolling en de agregatie van bloedplaatjes remmen zijn daarom onmisbaar tijdens deze procedures om acute trombose te voorkomen. In **hoofdstuk 8** hebben we het effect van anti-trombose behandeling met de plaatjesagregatie remmer ticlopidine op bloedplasmaconcentraties van TF bestudeerd. Over het algemeen bleek dat bloedplasmaconcentraties van TF hoger waren bij patiënten met acute syndromen (hartinfarct en onstabiele angina pectoris) dan bij patiënten met stabiele angina pectoris. De vergelijking van deze resultaten met die van hoofdstuk 7 doet vermoeden dat bloedplasmaconcentraties van TF correleren met de TF-expressie in de atherosclerotische plak. Omdat de hoeveelheid TF in de plaque de trombose-reactie op het breken van de plaque bepaalt, zou het kunnen zijn dat bloedplasmaconcentraties van TF een indicatie vormen voor het risico van een hartinfarct. Ticlopidine bleek de bloedplasmaconcentraties van TF significant te verlagen bij patiënten die de angioplastische hermodelleringsprocedures ondergingen. Waarschijnlijk remt dit medicijn dus niet alleen de agregatie van bloedplaatjes, maar ook de activering van de tissue factor pathway van de bloedstolling.