

# Annexin A5: pharmacology, radiopharmaceutical aspects, and cell death imaging

## Citation for published version (APA):

Boersma, H. H. (2005). *Annexin A5: pharmacology, radiopharmaceutical aspects, and cell death imaging*. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20060406hb>

## Document status and date:

Published: 01/01/2005

## DOI:

[10.26481/dis.20060406hb](https://doi.org/10.26481/dis.20060406hb)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## 7.5 Samenvatting

Als een cel de vetachtige stof PS (fosfatidylserine) naar de buitenkant van de celmembraan brengt, is dit voor de omringende cellen een teken dat de cel gaat sterven. Sommige witte bloedcellen (macrofagen) worden met dit signaal opgeroepen om de betreffende cel op te eten. Het lichaamseigen eiwit annexine A5 kan aan PS binden. Annexine A5 kan gekoppeld worden aan een fluorescerende groep of een radioactief isotoop. Het onderzoek in dit proefschrift is gebaseerd op de hierboven beschreven eigenschap van annexine A5 om celdood te kunnen opsporen.

Eerder al kon met behulp van dit proces een methode ontwikkeld worden om celdood in gekweekte cellen te meten. De fluorescentie of radioactiviteit wordt hierbij omgezet in een meetbaar signaal. Na wat aanpassingen kon deze methode ook toegepast worden in proefdieren en in de mens. In dit proefschrift is gebruik gemaakt van deze methode.

Het doel van de uitgevoerde experimenten was het verbeteren van bestaande methoden om met radioactief annexine A5 celdood zichtbaar te maken. We hebben allereerst een verbeterde kwaliteitscontrole methode ontwikkeld. Verder is de verdeling van het eiwit in het lichaam en de radioactieve stralingsbelasting die het radioactieve annexine A5 tot gevolg heeft, onderzocht. Daarmee werd ook aangetoond dat radioactief annexine in de mens celdoodprocessen bij zowel kanker als hart- en vaatziekten zichtbaar kan maken. Ten slotte hebben we onderzocht hoe annexine A5 gebruikt kan worden voor het beoordelen van de werking van een celdoodremmend geneesmiddel.

Bij de in dit proefschrift beschreven experimenten hebben we zowel gebruik gemaakt van radioactief als fluorescerend annexine A5. Met een gammacamera zijn de radioactieve signalen omgezet in een zichtbaar beeld, terwijl voor de fluorescentieopnamen gebruik gemaakt werd van een fluorescentiemicroscoop om het fluorescente annexine A5 te laten zien.

**Hoofdstuk 1** behandelt de eigenschappen van annexine A5, en laat zien welke mogelijkheden het eiwit biedt voor onderzoek. Hierbij worden de biologische eigenschappen, de werking van het eiwit in het lichaam en de verdeling van annexine A5 in het lichaam beschreven. Verder is ingegaan op de manieren waarop annexine A5 in het lichaam zichtbaar gemaakt kan worden, en welke gevolgen het gebruik van de methode heeft voor beslissingen van de arts voor de behandeling van een patiënt. Daarnaast zijn de beperkingen en de relevantie van de methode besproken. We denken dat radioactief annexine A5 geschikt is om als standaardmethode gebruikt te worden voor het meten van celdoodprocessen bij patiënten met bijvoorbeeld kanker of hart- en vaatziekten. De methode kan niet alleen gebruikt worden voor het meten van celdood bij een bepaalde ziekte, maar ook om de behandelingseffecten van geneesmiddelen met invloed op de celdood te kunnen bepalen. Verder zou annexine

A5 een mogelijkheid kunnen bieden om als een soort transportstof te fungeren en een geneesmiddel af te leveren op een plaats waar celdood optreedt. In dat geval kunnen we spreken van een biologische 'kruisraket'.

Het eerste doel in dit proefschrift was het realiseren van een kwaliteitscontrole methode om snel en accuraat de biologische kwaliteit van radioactief of fluorescent annexine A5 te kunnen meten. Dit wordt beschreven in **Hoofdstuk 2**. Gewoonlijk hebben radioactieve stoffen die in de mens worden toegepast een heel korte halfwaardetijd (dit is de tijd waarin de helft van de radioactiviteit vervalt). Er is hierdoor maar weinig tijd voor de kwaliteitscontrole van het radioactief annexine A5 omdat het al snel aan een patiënt toegediend moet worden. We hebben aan deze eis voldaan door een simpele, snelle methode te ontwikkelen die nauwkeurig de hoeveelheid biologisch actief annexine A5 in de oplossing kan vaststellen. Voor de meting werden microscopisch kleine ijzeren bolletjes gebruikt die voorzien zijn van een PS-bevattend laagje. Deze bolletjes werden gemengd met een oplossing met daarin radioactief annexine A5. Het eiwit hechtte zich aan de bolletjes in aanwezigheid van calcium. Met een magneet konden de bolletjes na 10 minuten gescheiden worden van de oplossing. Door de oplossing te scheiden van de bolletjes kon de hoeveelheid radioactiviteit in de bolletjes worden bepaald en daarmee de aanwezigheid van annexine A5 erop. Eventuele onzuiverheden (bijvoorbeeld radioactiviteit die niet aan annexine A5 gebonden is) kon worden opgespoord door de van de bolletjes gescheiden oplossing te meten. We hebben deze methode uitgebreid getest. Daarbij werd aangetoond dat ze in staat is onzuiverheden te registreren, en dat de bepaling nauwkeurig te herhalen is. Verder was het mogelijk iets te zeggen over het PS-bindend vermogen van het gemeten annexine A5. Wanneer we bijvoorbeeld het eiwit kapot maakten bij 60°C of in zuur, dan konden we vaststellen, dat de binding aan de bolletjes minder werd. Met de bolletjesmethode is het mogelijk om in 25 minuten het bindend vermogen van annexine A5 aan PS te bepalen.

In de Hoofdstukken 3 en 4 wordt een uitgebreide beschrijving gegeven van de verdeling van radioactief annexine A5 in het lichaam van patiënten en proefpersonen. Radioactief annexine A5 wordt met een injectie in een bloedvat aan de patiënt toegediend. Ook wordt een vergelijking gemaakt tussen twee methoden die gebruikt zijn om annexine A5 radioactief te maken. Ten slotte wordt een indruk gegeven van de mogelijkheden die het eiwit biedt om beelden te maken van een hartinfarct en verschillende vormen van kanker.

In **Hoofdstuk 3** worden twee methoden die aanvankelijk gebruikt zijn om annexine A5 radioactief te maken met elkaar vergeleken. We hebben hierbij de verdeling in het lichaam van patiënten en een proefpersoon onderzocht. Daarnaast wordt een indruk gegeven van de verschillende mogelijkheden van beide methoden om opnamen van celdoodgebieden bij patiënten te maken. Om het gedrag van annexine A5 in het lichaam te kunnen beschrijven hebben we het verloop in de verdeling van de radioactiviteit in het bloed en de organen van patiënten gemeten. Naast de radioactiviteit is

ook de concentratie van het eiwit annexine A5 in bloed gemeten. Daarbij zijn de proefpersonen tot minimaal 4 uur na het inspuiten van het annexine A5 gevolgd. De eerste methode (het z.g. Imino-annexine A5) om annexine A5 radioactief te maken leverde een onvoldoende stevige binding van de radioactiviteit aan het annexine A5 op. Hierop werd besloten om voor de tweede onderzochte methode om annexine A5 radioactief te maken (het BTAP-annexine A5), de stabiliteit van het radioactieve annexine A5 te onderzoeken. Verder zijn de annexine A5 concentraties gemeten in een aparte groep met patiënten die net een hartinfarct hadden doorgemaakt. Deze gegevens zijn vergeleken met de patiëntengroep die in dit onderzoek werden behandeld met radioactief annexine A5. Voor het meten van de verdeling van de radioactiviteit in de organen is gebruik gemaakt van opnamen met een gammacamera. We hebben de verkregen gegevens geanalyseerd met verschillende computermodellen om de verdeling van radioactief annexine A5 in de mens te beschrijven.

De verdeling van radioactief annexine A5 in het bloed kon beschreven worden met een model, waarbij voor beide types annexine A5 de verdwijning uit het bloed plaatsvindt met een verloop in twee fasen. De eerste fase heeft een halveringstijd van de concentratie in het bloed van ongeveer 15 minuten, terwijl de tweede fase een halveringstijd heeft van ca. 4 uur. Het verschil tussen Imino-annexine A5 en BTAP-annexine A5 bestaat vooral hieruit, dat de aan BTAP-annexine A5 gebonden radioactiviteit veel sneller door het lichaam uitgescheiden wordt dan bij Imino-annexine A5 het geval is. Hoewel de halveringstijden ongeveer gelijk zijn, is de hoeveelheid radioactiviteit die bij de verdeling in het bloed voor BTAP-annexine A5 wordt omgezet groter dan voor Imino-annexine A5.

We hebben kunnen aantonen, dat BTAP-annexine A5 stabiel is in het bloed van patiënten tot 20 uur na injectie. De gemeten annexine A5 concentraties in het bloed van patiënten vertoonden veel variatie. De gevonden waarden kwamen ongeveer overeen met die van de controlegroep van patiënten die net een hartinfarct hadden doorgemaakt. We weten niet goed wat de oorzaak van deze schommelingen is. Het gevolg is wel, dat het hierdoor moeilijk is om een goede beschrijving te geven van de verdeling van het annexine A5 zelf in het lichaam, in tegenstelling tot de verdeling van de radioactiviteit. Verder konden we aantonen dat de radioactiviteit voor zowel Imino-annexine A5 als BTAP-annexine A5 zich sterk ophoopt in lever en nieren. Dit laatste heeft niets te maken met celdood in deze organen, maar is waarschijnlijk het gevolg van de stofwisseling die annexine A5 zelf of de aan annexine A5 gebonden radioactiviteit ondergaat. BTAP-annexine A5 wordt bovendien heel snel in de darmen zichtbaar. Met beide types annexine A5 was het mogelijk celdood op te sporen in patiënten die net een hartinfarct hebben doorgemaakt, in patiënten met vormen van kanker in hoofd en nek, in de ledematen en bij borstkanker. Door de grote hoeveelheid radioactiviteit die we in lever, nieren en darmen hebben aangetroffen, is het niet mogelijk celdood in deze organen op te sporen. Daarom is het nodig verder te zoeken naar nieuwe methoden om annexine A5 radioactief te maken of zelfs naar

heel nieuwe methoden om celdood zichtbaar te maken.

In **Hoofdstuk 4** hebben we alleen het BTAP-annexine A5 onderzocht. Opnieuw is de verdeling van de stof in het lichaam onderzocht, maar op een andere manier. De opname van annexine A5 in de afzonderlijke organen is gemeten en verder is ook de stralingsbelasting per orgaan (bijvoorbeeld lever, nieren, darmen) gemeten in de tijd. Daarbij hebben we de in hoofdstuk 3 gevonden uitkomst dat de opname van de radioactiviteit in lever en nieren erg hoog is nog beter kunnen bewijzen. Hiermee is bijvoorbeeld aangetoond, dat de opname van radioactiviteit in lever en nieren vrij lang duurt (ongeveer 16 uur), en dat hierdoor de belasting met radioactiviteit nog verder toeneemt. Opvallend is, dat de opname van radioactiviteit op de plaatsen waar celdood gemeten werd heel laag is. Er zijn dus relatief weinig annexine A5 deeltjes nodig om celdood zichtbaar te kunnen maken. Verder hebben we door dit onderzoek een inschatting kunnen maken van het uitscheidingspatroon van de radioactiviteit. Ongeveer 75% van de annexine A5 radioactiviteit wordt via de urine uitgescheiden, terwijl ca. 25 % via de ontlasting het lichaam verlaat. Hoewel de verblijfstijd van de radioactiviteit relatief lang is, is de uiteindelijke stralingsbelasting ongeveer net zo groot als voor andere radioactieve stoffen die we dagelijks in onderzoek met patiënten gebruiken.

Tenslotte hebben we een onderzoek gedaan waarbij gekeken is of een behandelingsmethode die celdood remt gemeten kan worden met zowel radioactief als fluorescent gemaakt annexine A5.

In **Hoofdstuk 5** hebben we de celdoodremmende eigenschappen van minocycline onderzocht. Dit is een veelgebruikt antibioticum waarvan eigenlijk pas de laatste jaren bekend is, dat het celdood kan remmen. Om het effect van minocycline te meten hebben we twee proefdierstudies uitgevoerd. In beide studies hebben we bij muizen en konijnen een afsluiting van de kransslagader aangebracht, waardoor een situatie wordt nagebootst die op een hartinfarct lijkt. Door de afsluiting na 30 of 40 minuten weer op te heffen wordt het openmaken van het bloedvat geïmiteerd, zoals dit bij patiënten met een hartinfarct vaak wordt uitgevoerd. De celdood die tijdens dit proces optreedt, wordt veroorzaakt door zuurstofgebrek in de hartspiercellen, waarna bij opheffing van de afsluiting juist zuurstofdeeltjes en andere reactieve stoffen ontstaan die de cel zichzelf laten beschadigen. In de eerste studie hebben we bij muizen een afsluiting van de kransslagader veroorzaakt. Na 30 minuten is de afsluiting opgeheven. Vervolgens is eerst met een injectie minocycline aan de muizen gegeven en daarna fluorescent annexine A5. De controlegroep ontving geen minocycline, maar een injectie met een zoutoplossing. Daarna is onder een fluorescentiemicroscop de ophoping van fluorescent annexine A5 in het hart van de muizen bekeken. Hiervan zijn digitale foto's genomen, die met een computerprogramma geanalyseerd zijn.

Op een vergelijkbare manier hebben we het afsluiten en openen van een kransslagader bij konijnen onderzocht. Hierbij is radioactief annexine A5 ingespoten. Kort voor het doodmaken van de konijnen is de kransslagader nog eens dichtgemaakt en een andere

radioactieve stof,  $^{201}\text{Tl}$ , bij de konijnen ingespoten om de doorbloeding van het hart te meten. Dit laatste is gedaan om de grootte van het infarctgebied te kunnen bepalen. We hebben het hart uit ieder konijn genomen om de gebieden waarin het hartinfarct is opgetreden zichtbaar te maken met een gammacamera. Verder is de radioactiviteit in de konijnenharten nauwkeurig gemeten, zodat van het gehele hart een kaart gemaakt kon worden met daarop de verdeling van radioactiviteit. De radioactiviteitsverdeling in het hart van de konijnen heeft een directe relatie met de hoeveelheid celdood die in de verschillende gebieden van het hart is opgetreden. Voor de experimenten in muizen en konijnen is de helft van de dieren (3 stuks) met minocycline behandeld. We hebben bij beide onderzoeken kunnen aantonen, dat de opname van fluorescent of radioactief annexine A5 lager is na toediening van minocycline aan de dieren. Dit betekent dat minocycline een remmend effect heeft op het optreden van celdood in een op een hartinfarct lijkende situatie bij proefdieren. Minocycline zou bij patiënten met een hartinfarct een beschermend effect kunnen hebben. Dit is een belangrijk onderwerp voor onderzoek in de toekomst.