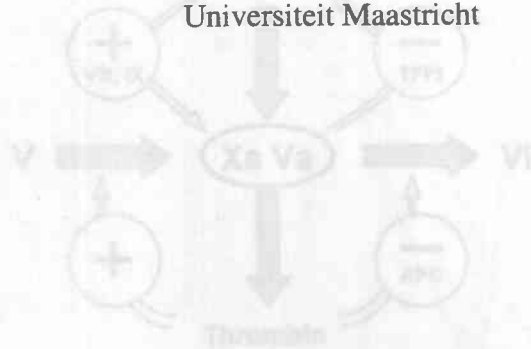


Voordracht gehouden in de gewone vergadering van de Afdeling Natuurkunde der Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen op maandag 29 mei 2000

Thrombine ontstaat snel en wordt daarna weer geïnactiveerd door anti-thrombine, zodat we in stollend bloed een voorbijgaande golf van thrombine activiteit zien (figuur 2). Deze thrombine-tijdscurve is de belangrijkste informatie over de functie van het stollingsstelsel.

Bloedstollend

H.C.Hemker
Universiteit Maastricht



Figuur 1. Een vereenvoudigd stollingsstelsel. De verticale as geeft de cascadegewijze activering van stollingsfactoren, de horizontale as geeft de modulatie van de thrombinevorming door activering en inactivering van factor VI. Relatieve de positieve en negatieve tegenkoppeling van deze factor zijn nog twee regelmechanismen weergegeven. Boven links: een verscherping van VIIa activeert factor Xa dat samen met factor VIII een alternatieve factor X activeert, geheel vergelijkbaar met Xa en Va in het prothrombinase, boven rechts: een feedback...

Thrombine is een enzym dat explosief ontstaat op de plaats van een wond en dat zijn werking uitoefent op de cellen van vaatwand en bloed en bloedplasma doet stollen. Daardoor houdt de wond op met bloeden (haemostase). Een te weinig aan thrombine (bloedersziekte) is even gevaarlijk als een teveel (thrombose, infarct). Het verbaast dan ook niet dat er een uiterst ingewikkeld regelmechanisme is om de thrombinevorming én efficiënt én binnen de perken te houden.

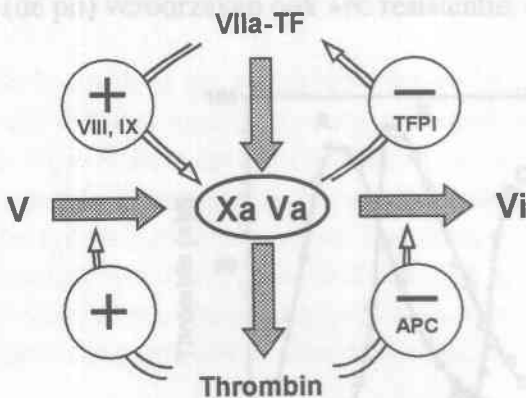
Overleven van de soort vereist in de eerste plaats dat men niet op jonge leeftijd doodbloedt, bijvoorbeeld bij een bevalling. De evolutie heeft de thrombinevorming dan ook afgesteld met de nadruk op 'efficiënt' meer dan op 'binnen de perken'. Daarmee is het overgedimensioneerd voor de westerse mens in zijn tweede levenshelft. Het is bloedstollend om te bedenken dat meer dan de helft van de bevolking overlijdt door ongewenste haemostatische activiteit zoals hart- en herseninfarct of emboli.

Een van de belangrijkste problemen bij het bestrijden van deze aandoeningen is dat we niet beschikken over een goede functietest die aangeeft bij wie het stollingsstelsel te hard werkt en wat het preciese effect van geneesmiddelen is.

In de eerste helft van deze tekst wordt een overzicht gegeven van het mechanisme van thrombinevorming, vooral met de bedoeling u het gecompliceerde regelmechanisme te laten bewonderen. De tweede helft van deze tekst beschrijft onze pogingen om een functietest te ontwikkelen.

De vorming van thrombine en de regelmechanismen (figuur 1).

Actief thrombine komt vanzelfsprekend niet vrij in het bloed voor. Het is een deel van het plasmaeiwit prothrombine. In een wond wordt thrombine uit prothrombine afgeplitst. De ontdekking van het prothrombine en zijn activering wordt algemeen toegeschreven aan de Duitser Alexander Schmidt, maar werd in feite gedaan door Cornelis Pekelharing (1848–1922, hoogleraar te Utrecht 1881–1918) en medegedeeld in deze vergadering nu 108 jaar geleden. Thrombine ontstaat snel en wordt daarna weer geïnactiveerd door anti-thrombine, zodat we in stollend bloed een voorbijgaande golf van thrombine activiteit zien (figuur 2). Deze thrombine-tijdcurve bevat in wezen alle relevante informatie over de functie van het stollingssysteem.



Figuur 1. Een vereenvoudigd stollingsschema. De verticale as geeft de cascadegewijze activering van stollingsfactoren, de horizontale as geeft de modulatie van de thrombinevorming door activering en inactivering van factor v. Behalve de positieve en negatieve tegenkoppeling via deze factor zijn nog twee regelmechanismen weergegeven. Boven links: een versterkingslus. Vlla-TF activeert factor IX dat samen met factor VIIIa een alternatieve factor X activator maakt, geheel vergelijkbaar met Xa en Va in het prothrombinase. Boven rechts: een feedbackremming. Factor Xa bindt aan een plasmaeiwit (TFPI) en dit duo is een sterke remmer van Vlla-TF.

Twee principes beheersen het mechanisme van de thrombinevorming¹:

1) De enzymcascade.

Factor VIIa (samen met weefselfactor, zie hierna) activeert factor X tot Xa. Factor Xa activeert prothrombine tot thrombine. Het is duidelijk dat in stap twee de enzymconcentratie in de tijd toeneemt, zodat het product, thrombine, steeds sneller gevormd wordt.

2) Heterogene biokatalyse.

Factor Xa is een lui enzym. In vrije oplossing, in plasma, vormt het niet meer dan ~1 molecuul thrombine per minuut. Zijn werking wordt duizend maal sneller als het samen met zijn substraat, prothrombine, bindt aan een geschikt membraan¹. De botsingskans door diffusie in het tweedimensionale vlak is veel groter dan in vrije oplossing². Omdat geschikte membranen alleen in een wond voorkomen beperkt efficiënte thrombinevorming zich tot de wond.

¹ De plasmaeiwitten die bij de bloedstolling een rol spelen worden stollingsfactoren genoemd en aangeduid met een romeins cijfer. Prothrombine is factor II. Activering wordt weergegeven met de index a: thrombine is dus factor IIa.

² Een celmembraan bestaat uit een dubbellaag van fosfolipiden. Van Denen en zijn medewerkers ontdekten dat de samenstelling van de binnenlaag verschilt van die van de buitenlaag. Alleen de binnenlaag bevat de fosfolipiden die de bloedstolling ondersteunen. Van Deenens leerlingen Bevers en Zwaal (Maastricht) werkten zijn ideeën uit met betrekking tot bloedplaatjes en bloedstolling.

De snelheid van thrombinevorming wordt nog eens duizend maal verhoogd als naast factor Xa het hulpeiwit factor Va aan de membraan geadsorbeerd is³. Thrombine activeert factor v. Zo veroorzaken de eerste sporen van thrombine direct een explosieve toename van de thrombinevorming. Tegelijkertijd heeft thrombine de hand in de vorming van een enzym dat factor Va vernietigt, het geactiveerde proteïne C (APC). De activering van v door thrombine gaat sneller dan de vorming van APC, zodat er een venster in de tijd ontstaat waarin thrombine explosief gevormd wordt. Bovendien is er voor de vorming van APC een element van de *intacte* vaatwand nodig, hetgeen de thrombinevorming weer tot het wondgebied beperkt.

Er bestaat een aangeboren afwijking van factor v (factor v Leiden) waardoor deze factor iets minder gevoelig wordt voor APC (APC resistentie⁴). De fijnzinnige afstemming van het stollingsmechanisme blijkt uit het feit dat er dan een thromboseneiging ontstaat. Orale contraceptiva (de pil) veroorzaken ook APC resistentie, dat is het mechanisme achter de pilthrombose^{5,6}.

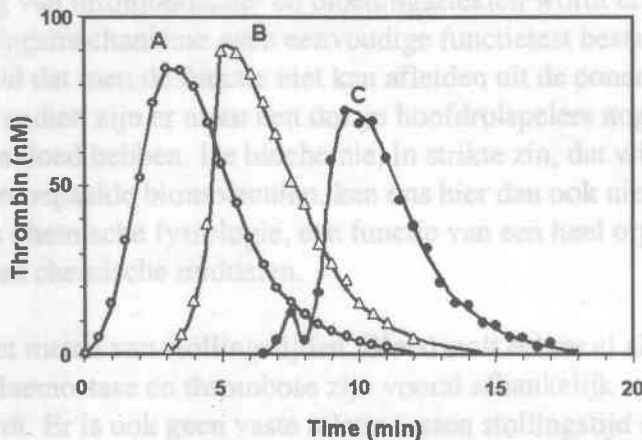


Fig. 2. Het Thrombogram

De curven tonen het verloop van de thrombine concentratie.

A. In stollend plaatjesarm plasma met veel weefselfactor (zg. extrinsieke thrombinevorming).

B. In stollend plaatjesarm plasma zonder weefselfactor maar in contact met glas (zg. Intrinsieke thrombinevorming).

C. In plaatjesrijk plasma met minimale hoeveelheid weefselfactor.

Membraangebonden enzymcomplexen spelen een rol bij de activering van factor X (op twee manieren) en bij de vorming van APC (zie figuur 1). De details van het mechanisme laten we rusten. Wel willen we nader ingaan op de rol van de bloedplaatjesmembraan.

Alleen membranen die aminophospholipiden bevatten zijn geschikt om de thrombinevorming te ondersteunen. Aminophospholipiden komen normaal alleen aan de binnenkant van de celmembraan voor², daarom zal een intacte cel (een rode of witte bloedcel bijvoorbeeld) de bloedstolling (gelukkig) niet onderhouden.

In het wondgebied komt het bloed in contact met a. weefselfactor, die met factor VIIa een membraangebonden complex aangaat dat factor Xa activeert, b. kapotte cellen, dat wil zeggen met de binnenkant van celmembranen en c. met collageen.

Door het contact met collageen en door het tegelijkertijd gevormde eerste sporen thrombine verliest de membraan van de bloedplaatjes zijn asymmetrie, zodat de aminophospholipiden die nodig zijn voor de bloedstolling aan de buitenkant van de celmembraan beschikbaar komen⁷.

Het bloedplaatjesaggregaat dat in de wond plakt, fungeert als een spons waaruit het gevormde thrombine niet weggespoeld wordt door de bloedstroom. Thrombine diffundeert tot buiten het aggregaat en veroorzaakt dat er fibrinedraden draden ontstaan aan de buitenkant. Omdat fibrine weer langsstromende bloedplaatjes invangt en activeert gaat het proces door totdat er geen bloed meer stroomt. Dat wil zeggen tot het gat is gedicht en er geen nieuwe stollingsfactoren en plaatjes worden aangevoerd.

Samenvattend, door de enzymcascade wordt het thrombine snel gevormd, door de binding aan het membraan blijft de vorming beperkt tot het wondgebied en door de activering en inactivering van factor v is de thrombinevorming kort en hevig in een beperkte tijd na de verwonding.

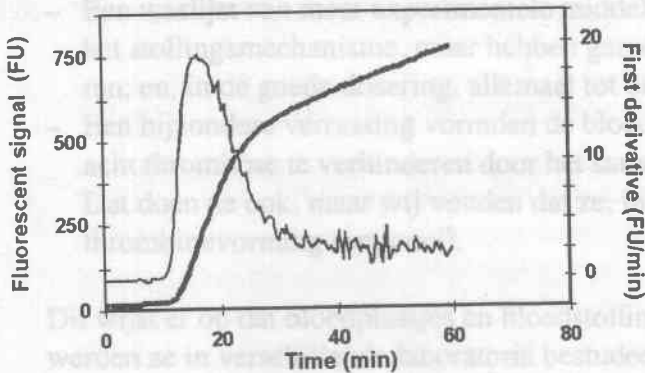
Het thrombogram, een functietest voor het stollingsmechanisme.

De bestrijding van thrombotische- en bloedingsziekten wordt ernstig bemoeilijkt doordat er voor het stollingsmechanisme geen eenvoudige functietest bestaat. Het reactiemechanisme is zo ingewikkeld dat men de functie niet kan afleiden uit de concentratie van de meespelende factoren. Bovendien zijn er naast een dozijn hoofdrolspelers nog evenveel minder belangrijke, die ook hun invloed hebben. De biochemie, in strikte zin, dat wil zeggen de concentraties en interacties van bepaalde biomoleculen, kan ons hier dan ook niet verder helpen. Het is een probleem van chemische fysiologie, een functie van een heel orgaan, namelijk bloed, testen met behulp van chemische middelen.

Klassiek is het meten van stollingstijden. Bloed stolt echter al als ~1% van het prothrombine is omgezet. Haemostase en thrombose zijn vooral afhankelijk van de thrombine die *daarna* gevormd wordt. Er is ook geen vaste relatie tussen stollingstijd en thrombinevorming. Alleen directe meting van de thrombinevorming kan daarom de gewenste informatie geven. Dat kan door uit stollend bloed iedere 5 of 10 seconden een monster te trekken en daarin de thrombine-concentratie te bepalen. De thrombine-tijd curve die men zo verkrijgt, noemen we het thrombogram (figuur 2). Deze methode, in gebruik tot ongeveer 1960, is uiterst arbeidsintensief. Tien jaar terug hebben we haar weer opgepakt en ze heeft goede diensten bewezen. Zo vonden we het werkingsmechanisme van heparines, het effect van de pil en verscheidene verbanden tussen bloedplaatjesfunctie en thrombinevorming. Treffend was b.v. dat het fibrinestolsel, dat altijd gezien was als het inerte eindproduct van het stollingsproces, zelf in staat bleek om bloedplaatjes te activeren en daardoor de aanzet geeft tot verdere thrombinevorming⁸.

Deze proeven suggereerden dat het de moeite waard zou zijn om het thrombogram op grote schaal routinematig te kunnen meten bij patiënten en bij het zoeken naar geneesmiddelen. Béguin voegde aan stollend plasma een thrombinesubstraat toe dat een gekleurd product afgeeft; in de hoop uit de omzettingssnelheid de thrombineconcentratie direct te kunnen aflezen. De bestaande substraten werden echter opgebruikt lang voordat het thrombinevormingsproces over is. We ontwikkelden daarom substraten die heel langzaam worden omgezet en die slecht aan thrombine binden. Daardoor verkregen we productvorming die gedurende het hele stollingsproces evenredig was met de thrombine concentratie. De eerste afgeleide van de productvormingscurve is dan automatisch het thrombogram (figuur 3).

De methode werkte echter niet in aanwezigheid van fibrinogeen en bloedplaatjes, omdat de troebeling die ontstaat bij stolling van het fibrinogeen de kleurmeting verstoort. Dit kon worden omzeild door fluorogene substraten te gebruiken. Daarmee kunnen we nu het thrombogram automatisch verkrijgen in plaatjesrijk plasma⁸. Om de situatie *in vivo* nog dichter te benaderen werken we op het ogenblik aan een methode voor het meten in vol bloed.



*Figuur 3. Automatische registratie van thrombinevorming in plaatjesrijk plasma.
Vette lijn: Fluorescentiesignaal;
Dunne lijn: Eerste afgeleide, i.e. thrombineactiviteit*

Resultaten met het thrombogram.

De eerste resultaten met het automatische thrombogram wijzen er op dat het inderdaad een goede kandidaat is voor de functietest die we tot nu toe misten.

- Bij alle aangeboren afwijkingen die voorbestemmen voor veneuse thrombose is het thrombogram verhoogd, onafhankelijk van het mechanisme. Als deze afwijkingen gelocaliseerd zijn in het APC systeem worden de afwijkingen zeer duidelijk door toevoeging van thrombomoduline, de vaatwandcomponent die bij de vorming van APC een rol speelt. Het meest spectaculair was de afwijking die Rosing⁶ op deze manier vond bij het gebruik van de anti-conceptiepil en het verschil dat zo kon worden aangetoond tussen de tweede en de derde generatie pillen.
- Bij patiënten die op jonge leeftijd (< 50 jaar) een herseninfarct kregen, vonden we in meer dan de helft van de gevallen een verhoogd thrombogram, soms alleen in plaatjesrijk plasma. Bij patiënten die een hartinfarct gehad hadden was het thrombogram ook verhoogd, ook lang na de acute fase.

Het lijkt er dus op dat zowel arteriële als veneuse thromboseneiging kan worden opgespoord, en dat de arteriële soms veroorzaakt worden door een afwijking in het plasma en soms door een in de bloedplaatjes. (Het thrombogram is echter niet verhoogd bij thromboseneigingen die in de vaatwand gelocaliseerd zijn, zoals homocysteinaemie.)

- Wij testten inmiddels ook het effect van haemofilie en andere, zeldzamere congenitale stollingsfactor deficiënties (v, VII, X en XI). Het thrombogram bleek tot < 20% van normaal verlaagd bij die patiënten die klinische bloedingsverschijnselen hebben.

- Alle antistollingsmiddelen verlagen het thrombogram, ofschoon hun werking op het mechanisme van de bloedstolling geheel verschillend is. Orale antistolling, de bloedverdunnende pillen van de thrombosedienst maken dat prothrombine zich niet aan membranen kan hechten en dus niet geactiveerd kan worden. Heparine, de antithromboseprikken na een operatie, hebben geen invloed op de thrombinevorming maar versnellen de inactivatie van het enzym. Beide werken goed tegen thrombose (veneus en arterieel) bij een dosering die het oppervlak onder het thrombogram tot tussen 20 en 40 % van normaal verlaagt.
- Een waslijst van meer experimentele middelen werken allemaal op een andere manier in op het stollingsmechanisme, maar hebben gemeen dat ze de hoeveelheid thrombine vermindere(n); en, in de goede dosering, allemaal tot ongeveer 30% van normaal.
- Een bijzondere verrassing vormden de bloedplaatjesremmers zoals aspirine. Ze worden geacht thrombose te verhinderen door het samenplakken van de bloedplaatjes verhinderen. Dat doen ze ook, maar wij vonden dat ze, in plaatjesrijk plasma en in heel bloed, ook de thrombinevorming remmen¹⁰.

Dit wijst er op dat bloedplaatjes en bloedstolling niet twee gescheiden systemen zijn, ook al werden ze in verschillende laboratoria bestudeerd en meestal met methoden die het waarnemen van interacties tussen het stollingssysteem en bloedplaatjes onmogelijk maakten. Een test zoals het thrombogram, die de globale functie van een groot stuk van het fysiologische mechanisme weergeeft, laat zien dat er veel informatie wegvalt als men zijn aandacht richt op te kleine subsystemen.

We menen dat het thrombogram zijn nut kan hebben bij het zoeken naar betere antithrombotica. De bestaande middelen hebben hun nadelen: of ze zijn onvoldoende efficiënt (aspirine, 10-15% reductie van de incidentie van het hartinfarct, ~30% van reductie van veneuse thrombose na bijvoorbeeld heupoperaties) of ze vereisen nauwkeurige controle (vitamine K antagonist, > 50% reductie van arteriële en veneuse thrombose) of ze moeten per injectie worden toegediend (heparines, idem). Het ideale middel, dat bijna 100% bescherming geeft, maar geen bloedingen of andere bijverschijnselen en in vaste dosering oraal gegeven kan worden is nog een utopie. Het thrombogram kan het zoeken vergemakkelijken want het is nu een geleerde gok ('educated guess') om te verwachten dat een dosering van een middel dat het thrombogram in plaatjesrijk bloed ~50% remt een antithrombotisch effect zal hebben. Zo zijn er minder dierproeven en klinische dose-finding trials nodig en dat zal de voortgang versnellen.

Het onderzoek tot nu toe heeft ons gebracht tot het formuleren van de eerste hoofdwet van haemostase en thrombose:

Hoe meer thrombine hoe meer thrombose en hoe minder bloeding, hoe minder thrombine hoe minder thrombose maar hoe meer bloeding.

Gelukkig geeft ~50% vermindering van de thrombinepotentiaal ook ruwweg 50% vermindering van de thrombosekans, terwijl bloedingen pas optreden onder 20% van normaal. Met behulp van het thrombogram moet het mogelijk zijn om deze grenzen nauwkeuriger te bepalen en aan de patient en het antithromboticum aangepaste doseringen te vinden die optimale bescherming bieden bij gering bleedingsrisico.

Literatuur

1. Hemker HC, Esnouf MP, Hemker PW, Swart AC, Macfarlane RG. Formation of prothrombin converting activity. *Nature* 1967; 215: 248-51.
2. Giesen PL, Willems GM, Hemker HC, Hermens WT. Membrane-mediated assembly of the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 1991; 266: 18720-5.
3. Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog JW, Zwaal RF, Hemker HC. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 1980; 255: 274-83.
4. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velde PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-74
5. Vandembroucke JP, Helmerhorst FM, Bloemenkamp KW, Rosendaal FR. Third-generation oral contraceptive and deep venous thrombosis: from epidemiologic controversy to new insight in coagulation [see comments]. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 887-91.
6. Rosing J, Middeldorp S, Curvers J, Christella M, Thomassen LG, Nicolaes GA, Meijers JC, Bouma BN, Buller HR, Prins MH, Tans G. Low-dose oral contraceptives and acquired resistance to activated protein C: a randomised cross-over study. *Lancet* 1999; 354: 2036-40.
7. Bevers EM, Comfurius P, van Rijn JL, Hemker HC, Zwaal RF. Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *Eur J Biochem* 1982; 122: 429-36.
8. Beguin S, Kumar R. Thrombin, fibrin and platelets: a resonance loop in which von Willebrand factor is a necessary link [published erratum appears in *Thromb Haemost* 1997 Aug;78(2):973]. *Thromb Haemost* 1997; 78: 590-4.
9. Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoord R, Beguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet rich plasma [In Process Citation]. *Thromb Haemost* 2000; 83: 589-91.
10. Reverter JC, Beguin S, Kessels H, Kumar R, Hemker HC, Collier BS. Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and 'clinical restenosis'. *J Clin Invest* 1996; 98: 863-7