



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Novel insights in thrombosis pathophysiology using Mice with Impaired anticoagulation

Heestermans, M.

Citation

Heestermans, M. (2018, September 25). *Novel insights in thrombosis pathophysiology using Mice with Impaired anticoagulation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/66034>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/66034>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/66034> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Heestermans, M.

Title: Novel insights in thrombosis pathophysiology using Mice with Impaired anticoagulation

Issue Date: 2018-09-25

Nederlandse Samenvatting

Marco Heestermans

9

Het stollingssysteem van de mens zorgt voor de vorming van bloedstolsels, om bloedverlies te beperken in het geval van een lichamelijke verwonding. Het stollingssysteem is relatief goed geconserveerd door het gehele dierenrijk, en zelfs vissen bezitten een vergelijkbaar mechanisme om bloed te laten stollen. Het behoud van dezelfde fundamentele principes om bloedverlies tegen te gaan benadrukt de noodzaak van het systeem. Het impliceert bovendien dat een verstoring van het stollingssysteem ernstige gevolgen kan hebben, wat ook het geval is. In het geval dat er een bloedstolsel wordt gevormd op het moment dat dit niet nodig is (er is dus geen bloeding), kunnen er bloedpropjes in de circulatie komen. Trombose is de ziekte die de vorming van bloedpropjes en de complicaties die dit met zich mee brengt beschrijft. Als een individu in het geval van vaatschade geen bloedstolsel kan vormen door een niet-functionerend stollingssysteem, kunnen er bloedingen optreden. De instandhouding van een evenwicht in het stollingssysteem is dus cruciaal om te voorkomen dat een individu trombose of bloedingen ontwikkelt.

Trombose kan worden onderverdeeld in twee categorieën: veneuze en arteriële trombose. Bij veneuze trombose ontstaat er een bloedprop in de aderen van een patient (meestal de benen). Dit kan lokaal problemen veroorzaken, maar ernstige complicaties treden vooral op wanneer het lokaal gevormde bloedstolsel los schiet en via het hart in de longen belandt. Dit ziektebeeld wordt een longembolie genoemd en kan uiteindelijk zelfs de dood tot gevolg hebben. Arteriële trombose vindt plaats in de slagaderen. Als hier een bloedpropje wordt gevormd, kan het bloedvat worden afgesloten en zullen de distaal gelegen organen niet worden voorzien van zuurstof. Een beroerte of een hartinfarct zijn ziektebeelden die het gevolg kunnen zijn van arteriële trombose.

Tijdens mijn promotieonderzoek, waarvan in deze PhD thesis de belangrijkste bevindingen zijn uiteengezet, was het doel om nieuwe inzichten te verkrijgen in de initiatie en progressie van veneuze en arteriële trombose. We hebben dit getracht door in een levend systeem factoren die de stolling tegengaan (anti-coagulanten) te remmen. Deze remming verstoort de balans van het stollingssysteem, waardoor een intern milieu wordt gecreëerd waarin factoren die de stolling bevorderen (pro-coagulanten) de overhand krijgen. Dit kan trombose veroorzaken. Het proefdier wat tijdens ons onderzoek is gebruikt om veneuze en arteriële trombose te bestuderen is de muis (*Mus musculus*). Hoewel er geen misverstand kan bestaan over de diverse verschillen tussen mensen en muizen, zijn beide organismes evolutionair gezien nauw verwant en wordt de muis beschouwd als een geschikt *in vivo* model om stolling en trombose (en verschillende andere ziektes) in te bestuderen. Gecontroleerde en specifieke remming van anti-coagulanten wordt gerealiseerd door gebruik te maken van zogenoemde gen-specifieke *small interfering RNAs* (siRNAs). siRNAs kunnen worden geïnjecteerd in de bloedbaan van de muis en belanden, nadat ze zijn ingepakt in lever-specifieke liposomen, in de lever, waar ze de transcriptie (en dus

productie) van specifieke genen kunnen remmen. De anti-coagulanten waarvan we de productie remmen worden exclusief geproduceerd in de lever.

Hoewel siRNAs tijdens mijn promotieonderzoek uitsluitend zijn gebruikt om de invloed van bepaalde genen in een modelsysteem te bestuderen, kunnen ze ook worden toegepast om klinische vraagstukken te beantwoorden. Door middel van remming van de productie van specifieke (lever)eiwitten kunnen bepaalde ziektebeelden worden verbeterd of zelfs worden verholpen. In **hoofdstuk 2** wordt dieper ingegaan op de chemische eigenschappen van siRNAs, en in welke situaties siRNAs gebruikt kunnen worden. In het vervolg van dit hoofdstuk is het gebruik van siRNAs (en gerelateerde remmers van eiwitten gebaseerd op RNA of DNA oligonucleotides, tot welke groep van therapeutica siRNAs behoren) voor zowel fundamentele als therapeutische doeleinden in het kader van trombose en bloedingen uiteengezet.

De anti-coagulanten antitrombine en proteïne C worden exclusief in de lever geproduceerd. Zoals eerder vermeld, wordt in de muis door remming van dergelijke anti-coagulanten een pro-coagulant intern milieu gecreëerd. Als we antitrombine en proteïne C tegelijk remmen in een gezonde muis, ontwikkelt deze veneuze trombose. In de aderen in het gebied rondom de kaakspieren worden spontaan (zonder chirurgische interventies) grote trombi gevormd. Bovendien vindt in de lever afzetting plaats van fibrine, een product van pro-coagulante eiwitten en een van de belangrijkste bestanddelen van een trombus. Deze manier om veneuze trombose te veroorzaken met behulp van siRNAs is uniek en is fundamenteel anders dan bij andere diermodellen om de ziekte te bestuderen. In andere diermodellen wordt namelijk veneuze trombose geïnduceerd door middel van vaatschade of stase (stilstand van het bloed). Voor deze modellen zijn complexe chirurgische ingrepen noodzakelijk. Hoewel deze invasieve diermodellen ons veel informatie hebben opgeleverd over het ontstaan en de progressie van (experimentele) veneuze trombose, kan onze manier om veneuze trombose te veroorzaken vernieuwende inzichten geven over fundamentele processen van de ziekte, met als uiteindelijke doel de ontwikkeling van nieuwe therapieën.

In **hoofdstuk 3** hebben we in het muismodel voor spontane veneuze trombose de invloed van drie nieuwe kandidaat-hoofdrolspeleers getest: bloedplaatjes, neutrofielen en coagulatie factor XII. Remming van bloedplaatjes voorkwam spontane veneuze trombose. In tegenstelling tot studies gedaan met andere diermodellen, bleek dat remming van neutrofielen en coagulatie factor XII niet cruciaal was bij de ontwikkeling van veneuze trombose. Dit impliceert dat experimentele veneuze trombose zich op verschillende manieren kan manifesteren, en dat hierbij verschillende factoren betrokken kunnen zijn. Of dit bij patienten met veneuze trombose ook het geval is, zal verder onderzoek moeten uitwijzen. In **hoofdstuk 4** gaan we dieper in op de rol van coagulatie factor XII in spontane veneuze trombose. In dit hoofdstuk bevestigen we

allereerst dat deze factor niet betrokken is bij spontane veneuze trombose in muizen. Bovendien tonen we in dit hoofdstuk aan dat het gebruik van siRNA om de rol van bepaalde eiwitten te bestuderen resultaten kunnen opleveren die misleidend kunnen zijn, een belangrijke observatie in het kader van verder siRNA onderzoek.

Veneuze trombose wordt niet alleen in muizen onderzocht, maar ook in de menselijke populatie. Door grote groepen van mensen met en zonder de ziekte te vergelijken, kunnen bepaalde genetische varianten worden geïdentificeerd die geassocieerd zijn met de aanwezigheid van het ziektebeeld: komt een bepaalde genetische variant relatief vaak voor in een patiëntenpopulatie, kan dit duiden op de aanwezigheid van een biologische variant waardoor een individu een verhoogde kans op trombose heeft. De snelle ontwikkelingen op het gebied van *genome sequencing* heeft ervoor gezorgd dat het tot in detail in kaart brengen van de genetische code van het DNA steeds sneller en goedkoper kan, waardoor steeds grotere populaties met elkaar kunnen worden vergeleken. Het sneller genereren van meer data in grotere populaties heeft als gevolg dat steeds meer genetische varianten worden geassocieerd aan het optreden van trombose. Een recent geïdentificeerde variant is gelokaliseerd op het gen *SLC44A2*, een gen wat tot voor kort nog nooit geassocieerd was met trombose. In **hoofdstuk 5** is getracht de aanwezigheid van de variant met de verhoogde kans op veneuze trombose te koppelen aan biomarkers voor neutrofiel activatie (een belangrijke marker voor trombose), met als doel om een beter inzicht te krijgen in de rol van *SLC44A2* met betrekking tot trombose.

Arteriële trombose is net als veneuze trombose een ziekte waarover nog veel onbekend is, en meer kennis is noodzakelijk om behandeling van de ziekte te verbeteren. Om de ziekte te onderzoeken in een levend systeem wordt er wederom veelvuldig gebruik gemaakt van muizen. Het grootste probleem is echter dat muizen normaal gesproken geen arteriële trombose ontwikkelen; er zijn weliswaar muismodellen beschikbaar voor het verdikken en verharderen van de slagaders (de beginfase van de ziekte, ook wel atherosclerose of (slag)aderverkalking genoemd), maar deze muizen ontwikkelen nooit (zichtbare) arteriële trombi in de verkalkte slagaderen.

De exacte oorzaak van het uitblijven van arteriële trombose in muizen in tegenstelling tot mensen is onbekend, hoewel er waarschijnlijk meerdere factoren een rol spelen. Een van de vele verschillen tussen mensen en muizen is de samenstelling van het bloed. Het is bekend dat de anti-coagulatie in muizen sterker is. Observaties hieromtrent hebben ons tot de hypothese geleid dat de sterke anti-coagulatie een belangrijke reden is waarom er geen arteriële trombose optreedt in muizen met ernstig verkalkte slagaderen. In **hoofdstuk 6** is het onderzoek beschreven naar het optreden van spontane arteriële trombose in muizen, door het remmen van anticoagulant proteïne C met behulp van siRNAs. Spontane arteriële trombose in muizen is nog nooit eerder beschreven, en onze studie toont bovenal aan dat onder normale omstandigheden proteïne C

een belangrijke rol speelt in het voorkomen van arteriële trombose in muizen. Bovendien kan dit muismodel wellicht worden gebruikt om arteriële trombose te bestuderen, met als ultieme doel de behandeling van de ziekte te verbeteren. In **hoofdstuk 7** wordt er dieper ingegaan op het fenomeen van spontane arteriële trombose in muizen, waarbij het duidelijk wordt dat vooral het stromingsprofiel van het bloed een cruciale rol speelt met betrekking tot de locatie van de trombosevorming.

Hoofdstuk 1 is een inleiding van het promotie-onderzoek voor een beter begrip van de specifieke hoofdstukken. In dit hoofdstuk wordt in meer detail het kader geschetst waarin het promotieonderzoek heeft plaatsgevonden. In de algemene discussie in **hoofdstuk 8** worden de belangrijkste ontdekkingen, inzichten, pijnpunten en perspectieven van het promotieonderzoek bediscussieerd.