

Blood outgrowth endothelial cell - gemedieerde bloedstolling

Gepubliceerd: 16-06-2011 Laatst bijgewerkt: 28-04-2024

Het doel van dit onderzoek is een beter inzicht te verkrijgen in het stollingssysteem door middel van een gedetailleerde karakterisering en kwantificering van de biosynthese en expressie van verschillende stollingseiwitten in BOECs. De data...

Ethische beoordeling	Goedgekeurd WMO
Status	Werving gestopt
Type aandoening	Stollingsstoornissen en bloedingsdiathesen (excl. trombocytopenische)
Onderzoekstype	Observationeel onderzoek, zonder invasieve metingen

Samenvatting

ID

NL-OMON35931

Bron

ToetsingOnline

Verkorte titel

BOEC-STOL

Aandoening

- Stollingsstoornissen en bloedingsdiathesen (excl. trombocytopenische)
- Bloed- en lymfestelselaandoeningen, congenitaal
- Embolieën en trombose

Synoniemen aandoening

Trombose; Aderlijke trombus

Betreft onderzoek met

Mensen

Ondersteuning

Primaire sponsor: Leids Universitair Medisch Centrum

Overige ondersteuning: Technologiestichting STW

Onderzoeksproduct en/of interventie

Trefwoord: Bloedstolling, Proteïne C systeem, Trombose, Voorloper endotheelcellen

Uitkomstmaten

Primaire uitkomstmaten

De resultaten uit het onderzoek zijn van fundamenteel biochemische aard en hebben geen directe, klinische betekenis. Gezien de aard van de experimenten is het niet de verwachting dat er bepaalde toevalsbevindingen worden gedaan.

Secundaire uitkomstmaten

Niet van toepassing.

Toelichting onderzoek

Achtergrond van het onderzoek

Samenvatting

Het risico op het ontwikkelen van een bloeding of trombose is met de huidige kennis van het bloedstollingsstelsel nog steeds moeilijk te meten. Het doel van dit fundamentele onderzoek is om beter inzicht te verkrijgen in de bloedstolling door middel van een gedetailleerde karakterisering van voorlopercellen van het endotheel, de zogenaamde *blood outgrowth endothelial cells* (BOECs), die in kleine hoeveelheden circuleren in het bloed [1]. Meer informatie over de specifieke rol van endotheel-gemedieerde mechanismen in het stollingsstelsel zal bijdragen aan de identificatie van nieuwe parameters voor een betere en meer nauwkeurige beoordeling van het individuele risico op een bloedings- of stollingsneiging.

Het endotheeloppervlak speelt een belangrijke rol in de bloedstolling. Echter, in de gebruikelijke stollingstesten wordt de functie van het endotheel buiten beschouwing gelaten omdat deze niet direct in het bloed meetbaar is. In het Eindhoven Laboratorium voor Experimentele Vasculaire Geneeskunde beschikken we over de expertise om BOECs volgens bestaande procedures te isoleren en op te kweken tot volledig functionele endotheelcellen [2]. In dit onderzoek zullen deze BOECs geïsoleerd worden uit het bloed van gezonde vrijwilligers. In de vervolgens gegenereerde endotheelcellijnen zal de biosynthese en expressie van verschillende endotheelwitten die een belangrijke rol spelen in het

bloedstollingsmechanisme gekarakteriseerd en gekwantificeerd worden. De uitkomsten van dit onderzoek zullen worden opgenomen in een rekenkundig model van het stollingssysteem, met als overkoepelend doel om aan de hand van dit verbeterde model parameters te identificeren die het risico op het ontwikkelen van een bloedings- of stollingscomplicatie meten.

Achtergrond

Huidige risico's bloedingen/trombose moeilijk in te schatten

Het bloedstollingsstelsel bestaat uit een ingewikkelde set van reacties die het lichaam beschermen tegen bloeding en trombose. Een voorbeeld van de laatstgenoemde afwijking is veneuze trombose, welke de meest optredende complicatie bij ziekenhuisopname is en voorkomen kan worden mits het juiste protocol wordt opgevolgd [3]. Helaas is er tot op heden geen goede stollingstest voorhanden die vooraf kan bepalen welke patiënten een verhoogd risico hebben op het ontwikkelen van trombose. Veneuze trombose wordt behandeld door medicatie met zogenaamde bloedverdunners, waarvan de effectiviteit getoetst wordt aan de hand van de *International Normalized Ratio* (INR). Ofschoon met deze methode bloedingen door overdosering normaliter voorkómen worden [4], kunnen medicatie gerelateerde bloedingen toch ontstaan, zelfs als de metingen binnen de streefwaarden van de INR blijven. Zo heeft een studie aangetoond dat per jaar 3% van de patiënten die met een oraal antistollingsmiddel door de trombosedienst in Nederland worden behandeld een ernstige (orgaan)bloeding krijgen [5]. Deze voorbeelden geven aan dat er een duidelijke vraag is naar nieuwe testen die het bloedings- en tromboserisico in elk individu beter kunnen bepalen. Een verbeterd rekenkundig model van de bloedstolling kan hierbij als leidraad dienen en een indicatie geven welke parameters hiervoor getest moet worden.

Rol van endotheelcellen in bloedstolling

Aangezien endotheelcellen de vaatwand bekleden en veel membraan gebonden eiwitten bevatten, is de bijdrage van deze cellen aan de bloedstolling niet direct meetbaar in afgenomen bloed en/of plasma. Deze cellen en hun bestanddelen spelen echter wel een belangrijke rol in het stolproces en hun acties moeten dan ook in beschouwing genomen worden om goede voorspellingen te kunnen doen over de bloedstolling. Endotheelcellen zijn via verschillende mechanismen betrokken bij de bloedstolling, zoals via de aanmaak van von Willebrand factor (VWF). Wanneer het endotheel geactiveerd wordt komt VWF vrij in de bloedbaan, waar het bijdraagt aan de adhesie en aggregatie van bloedplaatjes. Voorts fungeert VWF ook als dragereiwit van bloedstollingsfactor VIII; beide functies zijn belangrijk voor het procoagulante effect van VWF [6]. Een andere groep endotheel-specifieke stollingseiwitten maakt onderdeel uit van het proteïne C systeem [7]. Dit systeem raakt geactiveerd wanneer trombine bindt aan trombomoduline (TM), een membraaneiwit dat zich op endotheelcellen bevindt. Het zo gevormde complex zet proteïne C om in geactiveerd proteïne C (APC), welke samen met zijn cofactor proteïne S in staat is de

bloedstollingsfactoren Va en VIIIa te inactiveren, waarop de bloedstolling wordt geremd. APC kan ook binden aan de endotheliale proteïne C receptor (EPCR), een ander membraaneiwit dat verankerd is op het endotheel. Dit complex is in staat protease activated receptor 1 (PAR-1), een endotheel transmembraaneiwit, te activeren waardoor er een beschermend (*cytoprotective*) effect op het endotheel ontstaat [8]. Recentelijk is er ontdekt dat het enzym proteïne disulfide isomerase (PDI) vrijkomt wanneer het endotheel een protrombotisch fenotype aanneemt. PDI zet encrypted tissue factor om in geactiveerd tissue factor en draagt op deze manier bij aan de bloedstolling [9].

Bovenstaande opsomming geeft aan dat het endotheel via diverse mechanismen een belangrijke rol speelt in de stollingscascade; helaas ontbreekt tot op heden een gedetailleerde karakterisering van hun directe contributie aan de bloedstolling. Dit onderzoek heeft daarom als doelstelling deze endotheel-gemedieerde mechanismen en hun relatie tot het stollingssysteem beter te karakteriseren door de biosynthese en expressie van verschillende eiwitten te karakteriseren en kwantificeren in BOECs. Dit zal gedaan worden onder zowel normale omstandigheden als onder condities die in vivo aanleiding kunnen geven tot trombose (zoals bij weinig zuurstof, met weinig voedingsstoffen, bij lage pH en in aanwezigheid van ontstekingsmediatoren). De opgedane kennis zal uniek inzicht verschaffen in de bijdrage van endotheelcel-specifieke stollingscomponenten aan de normale stolling evenals aan trombose.

Rekenkundig model

Alle informatie die verkregen wordt in dit onderzoek zal worden ingevoerd in een nieuw rekenkundig model van de bloedstolling. Door ook de bijdrage van de endotheelcel-gemedieerde mechanismen hierin op te nemen zullen de voorspellingen van dit model meer overeenkomen met de werkelijkheid. Dit simulatie model van de bloedstolling zal de basis leggen voor de ontwikkeling van een optimale combinatie van stollingstesten om de hemostatische balans van een individuele patiënt in kaart te brengen en daarmee te bepalen in hoeverre deze patiënt een risico voor het ontwikkelen van een bloeding of trombose bezit.

Referenties (1)

1. Lin Y, Chang L, Solovey A, Healey JF, Lollar P, Hebbel RP. Use of blood outgrowth endothelial cells for gene therapy for hemophilia A. *Blood*. 2002 Jan 15;99(2):457-62
2. van den Biggelaar M, Bouwens EA, Kootstra NA, Hebbel RP, Voorberg J, Mertens K. Storage and regulated secretion of factor VIII in blood outgrowth endothelial cells. *Haematologica*. 2009 May;94(5):670-8
3. Cohen AT, Tapson VF, Bergmann JF, Goldhaber SZ, Kakkar AK, Deslandes B, Huang W, Zayaruzny M, Emery L, Anderson FA Jr; ENDORSE Investigators. Venous thromboembolism risk and prophylaxis in the acute hospital care setting (ENDORSE study): a multinational cross-sectional study. *Lancet*. 2008 Feb 2;371(9610):387-94
4. Cannegieter SC, Rosendaal FR, Wintzen AR, van der Meer FJ, Vandenbroucke JP,

- Briët E. Optimal oral anticoagulant therapy in patients with mechanical heart valves. *N Engl J Med*. 1995 Jul 6;333(1):11-7
5. Veeger NJ, Piersma-Wichers M, Tijssen JG, Hillege HL, van der Meer J. Individual time within target range in patients treated with vitamin K antagonists: main determinant of quality of anticoagulation and predictor of clinical outcome. A retrospective study of 2300 consecutive patients with venous thromboembolism. *Br J Haematol*. 2005 Feb;128(4):513-9
6. de Wit TR, van Mourik JA. Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001 Jun;14(2):241-55
7. Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jul;25(7):1311-20
8. Ruf W, Dorfleutner A, Riewald M. Specificity of coagulation factor signaling. *J Thromb Haemost*. 2003 Jul;1(7):1495-503
9. Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, Ruf W. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep 19;103(38):13932-7

Doel van het onderzoek

Het doel van dit onderzoek is een beter inzicht te verkrijgen in het stollingssysteem door middel van een gedetailleerde karakterisering en kwantificering van de biosynthese en expressie van verschillende stollingseiwitten in BOECs. De data verkregen in het onderzoek zullen geïntegreerd worden in een rekenkundig model om het inzicht in het volledige stollingssysteem te verbeteren, met als overkoepelend doel om parameters te identificeren die het risico op het ontwikkelen van een bloedings- of stollingsneiging in individuele patiënten te voorspellen.

De specifieke onderzoeksdoelen zijn:

1. Het kwantitatief en kwalitatief bepalen van de transcriptie en expressie van endotheel specifieke bloedstollingscomponenten, waaronder VWF, TM, EPCR, PAR-1, PDI, onder verschillende condities:
 - onder normaal fysiologische condities,
 - onder condities die in vivo aanleiding kunnen geven tot trombose (zoals bij weinig zuurstof, met weinig voedingsstoffen, bij lage pH en in aanwezigheid van ontstekingsmediatoren).
2. Het directe effect van de endotheliale stollingsfactoren op de bloedstolling vaststellen door de BOECs te includeren in bestaande stollingsassays, zoals onder andere in de trombinegeneratie assay [10,11].

Referenties (2)

10. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost*. 2006 Nov;96(5):553-61

11. Bos MH, Meijerman DW, van der Zwaan C, Mertens K. Does activated protein C-resistant factor V contribute to thrombin generation in hemophilic plasma? J Thromb Haemost. 2005 Mar;3(3):522-30

Onderzoeksopzet

Selectie proefpersonen

Voor het onderzoek zal bloed worden afgenomen bij 50-100 gezonde, meerderjarige vrijwilligers. Via advertenties zullen zij op de hoogte worden gebracht van het onderzoek. De resultaten uit het onderzoek zijn van fundamenteel biochemische aard en hebben geen directe, klinische betekenis. Gezien de aard van de experimenten is het niet de verwachting dat er bepaalde toevalsbevindingen worden gedaan. Er zullen dan ook geen resultaten aan de proefpersonen worden teruggekoppeld, ook niet eventuele toevalsbevindingen. Aangezien de isolatie van BOECs uit het bloed niet in alle gevallen succesvol is, zal de proefpersonen gevraagd worden of ze bereid zijn op een later tijdstip nogmaals bloed te laten afnemen (maximaal totaal drie keer).

Uitvoering en bloedafname

De vrijwilligers worden door middel van advertenties op de hoogte gebracht van het onderzoek. Als deze proefpersonen aangeven geïnteresseerd te zijn in deelname krijgen zij zowel schriftelijk als telefonisch informatie over het onderzoek. Daarna wordt hen gevraagd naar het LUMC te komen. Nadat zij schriftelijk toestemming hebben verleend voor deelname aan het onderzoek zal 50-100 ml citraatbloed worden afgenomen.

Codering van de bloedmonsters

De bloedmonsters van het onderzoek zullen worden gecodeerd, opdat persoonsgegevens alleen bekend zijn bij de verantwoordelijke onderzoeker. Laatstgenoemde heeft ook de sleutel tussen de code en de persoonsgegevens, welke niet toegankelijk is voor andere medewerkers.

Bewerking van de bloedmonsters

De BOECs zullen in het Eindhoven Laboratorium voor Experimentele Vasculaire Geneeskunde worden geïsoleerd en in kweek worden gebracht. Vervolgens zullen de gegenereerde endotheelcellijnen in vloeibare stikstof bewaard worden voor verdere experimenten. De cellen zullen gedurende tien jaar bewaard blijven. Voorts zal uit de cellen DNA geïsoleerd worden om de identiteit van bepaalde endotheel componenten te bevestigen. Ook zullen mRNA niveaus van een aantal eiwitten bepaald worden, evenals hun expressieniveaus. De BOECs zullen verder worden gekarakteriseerd onder normale en protrombotische omstandigheden, dit zal onder andere gebeuren door de cellen te includeren in bestaande stollingsassays.

Ethische aspecten

Belasting voor de proefpersonen

De proefpersonen hebben niet direct belang bij het onderzoek. De studie zal meer inzicht geven in de rol van endotheelcellen in bloedstolling, aangezien deze gegevens zullen worden gebruikt voor het maken van een nieuw rekenkundig model van de bloedstolling. De belasting voor de proefpersonen is minimaal; in principe slechts eenmalige bloedafname, hoewel in enkele gevallen een tweede of derde bloedafname gevraagd zou kunnen worden. De proefpersonen krijgen een vergoeding voor de gemaakte reiskosten en een cadeaubon van €25 als dank voor deelname. Omdat het slechts om bloedafname gaat, is het risico voor de deelnemers verwaarloosbaar.

Informed consent

Deelnemers aan het onderzoek zullen vooraf zowel mondeling als schriftelijk worden geïnformeerd over de studie. Proefpersonen zullen alleen geïncludeerd worden nadat zij hier schriftelijke toestemming voor hebben gegeven. Alle deelnemers kunnen zich voor informatie wenden tot Dr. W.M. Lijfering, Tel: 071 526 5639. Voor een onafhankelijk advies kunnen de deelnemers zich wenden tot Dr. F.J.M. van der Meer, Tel: 071 526 3901.

Privacy

De bloedmonsters zullen zoals eerder beschreven gecodeerd worden en alleen de verantwoordelijke onderzoeker Dr. M.H.A. Bos heeft toegang tot de sleutel tussen deze code en de persoonsgegevens. Er zullen geen onderzoeksresultaten aan de proefpersonen worden teruggekoppeld.

Inschatting van belasting en risico

De belasting voor de proefpersonen is minimaal; in principe slechts eenmalige bloedafname, hoewel in enkele gevallen een tweede of derde bloedafname gevraagd zou kunnen worden. Omdat het slechts om bloedafname gaat, is het risico voor de deelnemers verwaarloosbaar. Hooguit ontstaat er een blauwe plek door het bloedprikken. Dit kan voorkómen worden door de prikplaats goed af te drukken.

Contactpersonen

Publiek

Leids Universitair Medisch Centrum

Albinusdreef 2
2333 ZA
NL

Wetenschappelijk

Leids Universitair Medisch Centrum

Albinusdreef 2
2333 ZA
NL

Locaties

Landen waar het onderzoek wordt uitgevoerd

Netherlands

Deelname eisen

Leeftijd

Volwassenen (18-64 jaar)
65 jaar en ouder

Belangrijkste voorwaarden om deel te mogen nemen (Inclusiecriteria)

Gezonde, meerderjarige vrijwilligers.

Belangrijkste redenen om niet deel te kunnen nemen (Exclusiecriteria)

Niet gezond zijn.

Onderzoeksopzet

Opzet

Type: Observationeel onderzoek, zonder invasieve metingen
Blinding: Open / niet geblindeerd

Controle:	Geen controle groep
Doel:	Anders

Deelname

Nederland	
Status:	Werving gestopt
(Verwachte) startdatum:	05-07-2011
Aantal proefpersonen:	100
Type:	Werkelijke startdatum

Ethische beoordeling

Goedgekeurd WMO	
Datum:	16-06-2011
Soort:	Eerste indiening
Toetsingscommissie:	METC Leids Universitair Medisch Centrum (Leiden)

Registraties

Opgevolgd door onderstaande (mogelijk meer actuele) registratie

Geen registraties gevonden.

Andere (mogelijk minder actuele) registraties in dit register

Geen registraties gevonden.

In overige registers

Register	ID
CCMO	NL36368.058.11