

## Thema Bloedstolling

### Nieuwe inzichten in de regulatie van bloedstolling en fibrinolyse

B.N. BOUMA

**Recente studies hebben aangetoond dat het bloedstollingssysteem een belangrijke rol speelt bij de regulatie van de fibrinolyse. Deze regulatie is afhankelijk van de vorming van trombine via het intrinsieke systeem nadat het stolsel gevormd is. Dit trombine activeert een remmer van de fibrinolyse die vervolgens C-terminale lysineresiduen afsplitst van fibine die van belang zijn voor de binding en activatie van plasminogeen. Trombine vormt dus niet alleen het stolsel maar beschermt het ook tegen afbraak. Een verminderde vorming van trombine via het intrinsieke systeem leidt tot een bloedingsneiging doordat het stolsel onvoldoende beschermd wordt tegen afbraak, terwijl in het omgekeerde geval een verhoogde vorming van trombine kan leiden tot een trombose. Dit mechanisme is een mogelijke verklaring voor de bloedingsneiging bij patiënten met een factor XI deficiëntie en het biedt nieuwe aanknopingspunten voor de behandeling van trombotische complicaties.**

*Trefwoorden: bloedstolling; fibrinolyse; trombose*

Het stollingssysteem is een belangrijke component in het normale hemostaseproces. Het systeem komt op gang na beschadiging van de vaatwand om bloedverlies te voorkomen. De opvattingen over het werkingsmechanisme van de bloedstolling zijn gebaseerd op het waterval- of cascademodel zoals die 30 jaar geleden door Davie en Ratnoff (1) en Macfarlane (2) werden geïntroduceerd. De bloedstolling werd gezien als een serie van gekoppelde proteolytische reacties waarin zymogenen worden omgezet in serineproteases, uiteindelijk leidende tot de vorming van trombine dat het oplosbare fibrinogeen omzet in het onoplosbare fibrine. Het stollingssysteem werd gedacht te bestaan uit een extrinsieke en een intrinsieke route. Activatie van de extrinsieke route vindt plaats door weeffactor dat door de beschadiging van de vaatwand beschikbaar komt (3) terwijl de intrinsieke route op gang komt wanneer plasma in aanraking

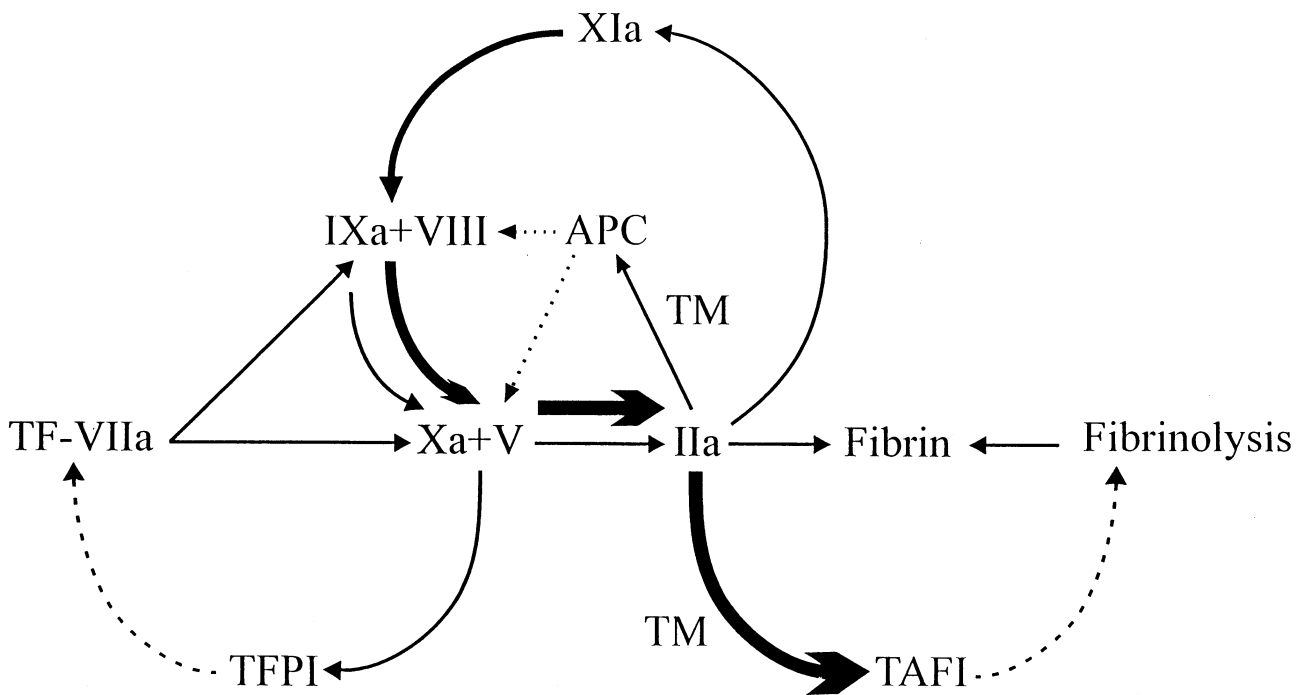
komt met een negatief geladen oppervlak. Alhoewel in vivo het negatief geladen oppervlak niet bekend is werd aangenomen dat het contactstelsel een rol speelt bij de initiatie van het intrinsieke systeem. Het contactstelsel bestaat uit factor XII, prekallikreïne, hoog molecuulair gewicht kininogeen en factor XI. De fysiologische relevantie van het contactstelsel is echter onduidelijk aangezien een deficiëntie van factor XII, prekallikreïne en hoog molecuulair gewicht kininogeen niet resulteert in een bloedingsneiging. Daarentegen hebben patiënten met een factor XI deficiëntie en vooral de Ashkenaze Joden een variabele bloedingsneiging die zich vooral uit in weefsels met een hoge fibrinolytische activiteit (tonsillen, neus, urinewegen) (4,5). Dit suggereert dat er een alternatieve route is voor de activatie van factor XI en onlangs werd een dergelijke route beschreven (6,7). Trombine bleek in staat factor XI te activeren zelfs in afwezigheid van een negatief geladen oppervlak (6,7). Verder bleek factor XI een rol te spelen in de remming van de fibrinolyse (8). Deze waarnemingen leiden tot een bloedstollingsmodel waarin geen verschil bestaat tussen de extrinsieke en intrinsieke routes.

#### Het bloedstollingsmodel

In dit model (figuur 1), komt de stolling op gang als bloed in aanraking komt met weeffactor. Weeffactor bindt factor VII(a) en dit complex activeert factor IX en factor X. Bij hoge weeffactor concentraties wordt voornamelijk factor X geactiveerd door het weeffactor-factor VII(a)-complex, terwijl bij lage weeffactor concentraties de activatie van factor IX door het weeffactor-factor VII(a)-complex een belangrijke bijdrage gaat leveren aan de activatie van factor X (10,11). Zodra kleine hoeveelheden factor Xa gevormd zijn wordt het extrinsieke systeem direct geremd door "tissuefactor pathway inhibitor" (TFPI) (12). TFPI vormt eerst een complex met factor Xa dat daarna aan het weeffactor-factor VIIa bindt hetgeen resulteert in een quaternair complex dat niet langer in staat is de stolling te activeren. Echter ondertussen is er al voldoende trombine gevormd om fibrinogeen om te zetten in fibrine. Daarna gaat de trombinevorming in het stolsel door (8,13). De meeste trombine wordt gevormd na de fibrinevorming via het intrinsieke systeem door de activatie van factor XI door trombine (13). Alhoewel in het begin kleine hoeveelheden factor XIa gegenereerd worden,

*Trombose en Hemostase Laboratorium. Afdeling Hematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht, en Instituut voor Biomembranen, Universiteit van Utrecht.*

Correspondentie: Prof. Dr. B.N. Bouma, Afdeling Hematologie (G03.647), Universitair Medisch Centrum Utrecht, Heidelberglaan 100, Postbus 85500, 3508 GA Utrecht.



**Figuur 1.** Regulatie van bloedstolling en fibrinolyse. Het model wordt in detail uitgelegd in de tekst. Ter bevordering van de duidelijkheid van de figuur zijn de meeste zymogenen en procoagulante oppervlakken niet weergegeven. De gebruikte afkortingen zijn: TF-VIIa: Tissue factor (weefselfactor)- factor VIIa complex; TFPI: tissue factor pathway inhibitor; Xa + V (het protrombinase complex); IXa +VIII (het tenase complex); IIa: trombine; APC: geactiveerd protein C; TM: trombomoduline; TAFI: trombin activatable fibrinolysis inhibitor; XIa: factor XIa. Een ononderbroken lijn betekent activatie, terwijl een onderbroken lijn remming betekent. De ononderbroken lijn tussen Xa en TFPI geeft aan dat Xa een complex met TFPI vormt en dit complex remt daarna TF-VIIa. Overgenomen met toestemming van referentie 9.

wordt toch door het intrinsieke systeem hoge concentraties trombine gevormd door de continue activatie van factor XI door trombine en door de amplificerende kracht van het tenase-complex en het protrombinase-complex (8). Deze hoge concentraties trombine zijn nodig voor een adequate hemostatische respons en voor de remming van de fibrinolyse.

#### Regulatie van de fibrinolyse door trombine

Trombine speelt op verschillende manieren een rol bij de remming van de fibrinolyse. Het remt de lysis van een stolsel door de activatie van factor XIII (14) en door de inactivatie van "single chain urokinase" (scu-PA) (15). Onlangs werd een nieuw mechanisme beschreven voor de remming van de fibrinolyse door trombine (16). Trombine bleek in staat de zogenaamde "Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor" (TAFI) te activeren. Geactiveerd TAFI is identiek aan carboxypeptidase-B of carboxypeptidase-U en het remt de fibrinolyse door afsplitsing van carboxyterminale lysineresiduen van fibrine die een rol spelen bij de plasminogeenbinding en activatie (17-20). Voor de activatie van TAFI door trombine is veel trombine nodig in tegenstelling tot de kleine hoeveelheden trombine die nodig zijn voor fibrinevorming en plaatjesactivatie. De hoge concentraties trombine die nodig zijn voor de activatie van TAFI worden gevormd na de fibrinevorming in het stolsel via de intrinsieke route door de activatie van factor XI door trombine (21). Geactiveerd TAFI remt de fibrinolyse waardoor de afbraak van het stolsel wordt tegenge-

gaan. Samenvattend komt het er op neer dat via de extrinsieke route de trombine gevormd wordt die tot fibrinevorming leidt en dat daarna via de intrinsieke route hoge concentraties trombine gevormd worden die door de activatie van TAFI het stolsel beschermen tegen afbraak.

#### De bloedingsafwijking bij factor XI deficiëntie

Met het boven beschreven stollingsmodel kan de bloedingsneiging bij patiënten met een factor XI deficiëntie verklaard worden. Deze patiënten hebben met name last van bloedingen in weefsels met een hoge fibrinolytische activiteit en het is juist in deze weefsels dat de remming van de fibrinolyse op adequate wijze plaats moet vinden. Bij patiënten met een factor XI deficiëntie wordt wel trombine gevormd via de extrinsieke route waardoor fibrinevorming plaatsvindt. Door de afwezigheid van factor XI wordt echter onvoldoende trombine gevormd via de intrinsieke route voor de activatie van TAFI waardoor het stolsel onvoldoende beschermd wordt tegen afbraak in weefsels met een hoge fibrinolytische activiteit. De activatie van factor XI door trombine verklaart ook waarom een deficiëntie van factor XII, hoog moleculair gewicht kininogeen en prekallikreine geen bloedingsneiging tot gevolg heeft. Hoewel dit impliceert dat het contactstelsel geen rol speelt in de bloedstolling, zijn er toch aanwijzingen dat het contactstelsel bijdraagt aan de activatie van het intrinsieke systeem bij bepaalde pathologische condities zoals sepsis (22), anafylaxis (23) en arthritis (24).

### **Verhoogd factor XI gehaltes zijn een risico factor voor veneuze trombose**

De rol van factor XI in de bloedstolling is tweevoudig: het draagt bij via de generatie van trombine aan de fibrinevorming en -opnieuw via de generatie van trombine - aan de bescherming van het stolsel tegen fibrinolyse. Onlangs werd gepostuleerd dat verhoogde gehaltes van factor XI in plasma tot een versterkte secundaire generatie van trombine zouden kunnen leiden. Dit zou dan tot een te sterke of langdurige remming van de fibrinolyse kunnen leiden met trombose-risico tot gevolg. Inderdaad werd bij hoge factor XI waarden zoals die voorkomen in 10% van de populatie een tweevoudig verhoogd risico voor veneuze trombose gevonden (25).

### **Rol van het proteïne-C systeem**

Het bloedstollingsmodel verklaart ook de profibrinolytische rol van geactiveerd proteïne-C. Geactiveerd proteïne-C inactieveert factor Va en factor VIIIa waardoor de generatie van trombine vermindert en de activatie van TAFI geremd wordt (26,27). Het belang van de onlangs ontdekte factor V R506Q-mutatie (factor V Leiden) zou ook verklaard kunnen worden door de rol van trombine in de remming van de fibrinolyse (28). De R506Q-mutatie voorkomt splitsing door geactiveerd proteïne-C op die plaats waardoor de inactivatie van factor Va vertraagd wordt met meer trombinevorming als gevolg. Dit resulteert in een versterkte activatie van TAFI en dus in een remming van de fibrinolyse (29). Hieruit blijkt opnieuw dat er een delicate balans is tussen de procoagulante (antifibrinolytisch) en anticoagulante (profibrinolytisch) eigenschappen van het stollingssysteem.

De endotheelcelcofactor trombomoduline speelt een dubbele rol in dit mechanisme. Het versterkt niet alleen de activatie van proteïne-C door trombine maar het versterkt ook de activatie van TAFI door trombine (30). Aan de ene kant vermindert trombomoduline dus de generatie van trombine terwijl het aan de andere kant de lage concentraties trombine effectiever maakt in de activatie van TAFI waardoor de fibrinolyse geremd wordt. (31,32). Welke werking de belangrijkste rol speelt onder fysiologische omstandigheden is nog onduidelijk.

### **Hemofilie A en B**

Elke verstoring van de intrinsieke route resulteert in een versnelde lysis van een stolsel. Dit zou met name van belang kunnen zijn bij patiënten met een deficiëntie van factor VIII of IX (hemofilie A en B). Het is bekend dat deze patiënten een ernstige bloedingsneiging hebben en dit zou het gevolg kunnen zijn van een drievoudig defect: verminderde trombine vorming via de extrinsieke route bij lage weefselfactorconcentraties, een verminderde generatie van trombine via het intrinsieke systeem en een gestoorde remming van de fibrinolyse. Dit resulteert niet alleen in een inadequate haemostatische respons maar ook eventueel gevormd fibrine zou te snel lysen hetgeen tot destabilisatie van de hemostatische prop leidt. De aanwezigheid van een gestoorde antifibrinolytische capaciteit zou kunnen verklaren waarom hemofilie

patiënten bloeden ondanks de aanwezigheid van normale plasmaconcentraties van de factoren VII en X en ook waarom de bloeding pas uren of dagen na beschadiging van de vaatwand optreedt. Deze verschijnselen zijn altijd toegeschreven aan gestoorde fibrinevorming maar dat is onwaarschijnlijk gezien het feit dat zo weinig trombine nodig is voor fibrinevorming terwijl ook de extrinsieke route normaal functioneert bij hoge weefselfactorconcentraties.

Trombomoduline bleek in staat de versnelde lysis van stolsels van factor X-, IX-, VIII-, en XI-deficiëntie plasmas in vitro te corrigeren (31). Hiermee werd aangetoond dat trombomoduline de activatie van TAFI door de lage concentraties trombine die onder deze omstandigheden gevormd wordt, versterkt (31).

### **Implicaties voor de behandeling van trombose**

In een experimenteel trombose-model werd aangetoond dat remming van factor XI een versnelde endogene lysis gaf van trombi in de vena jugularis in konijnen (33).

Remming van de activatie van de intrinsieke route door trombine gemedieerde factor XI activatie zou dus een alternatieve mogelijkheid kunnen zijn voor de behandeling van trombotische complicaties. Op het moment van de stolling is slechts een klein deel van het protrombine omgezet in trombine, terwijl de continue generatie van trombine na de fibrinevorming leidt tot het verbruik van het grootste deel van het protrombine dat in het stolsel aanwezig is. De hoeveelheid trombine in het stolsel wordt sterk beïnvloed door factor XI. In vivo, zou remming van de activatie van factor XI door trombine bij het begin van het intrinsieke systeem resulteren in stolsels die minder trombogeen zijn, minder mitogeen zijn en ook meer gevoelig zijn voor fibrinolyse door een verminderde activatie van TAFI. Hoewel een adequate hemostatische respons de generatie van trombine vereist door het extrinsieke en het intrinsieke systeem, heeft een therapie met remmers van geactiveerd factor XI het potentiële voordeel dat hemostatische propvorming nog kan plaatsvinden via de extrinsieke route, terwijl de continue generatie van trombine via de intrinsieke route niet plaatsvindt. Dit maakt het stolsel minder trombogeen en gevoeliger voor lysis. Dat TAFI een belangrijke rol speelt in de lysis van een stolsel werd onlangs aangetoond in een arterieel trombolysemodel. In dit diermodel versterkte de remming van TAFI de tPA-geïnduceerde lysis van een trombus (34).

### **Literatuur**

1. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964; 145: 1310-1312.
2. MacFarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964; 202: 498-499.
3. Rapaport SI, Rao LVM. The tissue factor pathway: how it has become a "Prima Ballerina". *Thromb Haemost* 1995; 74: 7-17.
4. Asakai R, Chung DW, Davie EW, Seligsohn U. Factor XI deficiency in Ashkenazi Jews in Israel. *N Engl J Med* 1991; 325: 153-158.

5. Berliner S, Horowitz I, Martinowitz U, Brenner B, Seligsohn U. Dental surgery in patients with severe factor XI deficiency without plasma replacement. *Blood Coagul Fibrinol* 1991; 3: 465-468.
6. Naito K, Fujikawa K. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *J Biol Chem* 1991; 266: 7353-7358.
7. Gailani D, Broze GJ. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 1991; 253: 909-912.
8. Borne PAK von dem, Meijers JCM, Bouma BN. Feedback activation of factor XI by thrombin in plasma results in additional formation of thrombin that protects fibrin clots from fibrinolysis. *Blood* 1995; 86: 3035-3042.
9. Bouma BN, von dem Borne PAK, Meijers JCM. Factor XI and protection of the fibrin clot against lysis- a role for the intrinsic pathway of coagulation in fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1998; 80: 24-27.
10. Osterud B, Rapaport S. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5260-5264.
11. Marlar RA, Kleiss AJ, Griffin JH. An alternative pathway of human blood coagulation. *Blood* 1982; 60: 1353-1358.
12. Broze GJ. The role of tissue factor pathway inhibitor in a revised coagulation cascade. *Semin Hematol* 1992; 29: 159-169.
13. Rand MD, Lock JB, Veer C van 't, Gaffney DP, Mann KG. Blood clotting in minimally altered whole blood. *Blood* 1996; 88: 3422-3445.
14. Ichinose A. The physiology and biochemistry of factor XIII. In: *Haemostasis and Thrombosis*. Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds Edinburgh: Churchill livingstone 1994; 531-546.
15. Gurewich V, Pannell R. The inactivation of single-chain urokinase (Pro-urokinase) by thrombin and thrombin-like enzymes: relevance of the findings to the interpretation of fibrin-binding experiments. *Blood* 1987; 69: 769-772.
16. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995; 270: 14477-14484.
17. Tan AK, Eaton DL. Activation and characterization of procarboxypeptidase B from human plasma. *Biochemistry* 1995; 34: 5811-5816.
18. Hendriks D, Sharpe S, Sande M van, Lommaert MP. Characterization of a carboxypeptidase in human serum distinct from carboxypeptidase N. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27: 277-285.
19. Wang W, Hendriks D, Scharpe S. Carboxypeptidase U, a plasma carboxypeptidase with high affinity for plasminogen. *J Biol Chem* 1994; 269: 15937-15944.
20. Redlitz A, Tan AK, Eaton DL, Plow EF. Plasma carboxypeptidases as regulators of the plasminogen system. *J Clin Invest* 1995; 96: 2534-2538.
21. Borne PAK von dem, Bajzar L, Meijers JCM, Nesheim ME, Boume BN. Thrombin mediated activation of factor XI results in a TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) dependent inhibition of fibrinolysis. *J Clin Invest* 1997; 99: 2323-2327.
22. Nuijens JH, Huijbregts CCM, Eerenberg-Belmer AJM, Abbink JJ, Strack van Schijndel RJM, Felt-Bersma RJF, Thijs LG, Hack CE. Quantification of plasma factor XII-C1-inhibitor and kallikrein-C1-inhibitor complexes in sepsis. *Blood* 1988; 72: 1841-1848.
23. Linden PWG van der, Hack CE, Eerenberg AJM, Struyvenberg A, Zwan JK van der. Activation of the contact system in insect-sting anaphylaxis: association with the development of angioedema and shock. *Blood* 1993; 82: 1732-1739.
24. Abbink JJ, Kamp AM, Nuijens JH, Eerenberg AJM, Swaak AJF, Hack CE. Relative contribution of contact and complement activation to inflammatory reactions in arthritic joints. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 1231-1238.
25. Meijers JCM, Tekelenburg WLH, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *New Engl J Med* 2000; 342: 696-701.
26. Bajzar L, Nesheim M, Tracy PB. The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI dependent. *Blood* 1996; 88: 2093-2100.
27. Fouw NJ de, Haverkate F, Bertina RM. Protein C and fibrinolysis: a link between coagulation and fibrinolysis. *Adv Exp Med Biol* 1990; 281: 235-243.
28. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, Ronde H de, Velden PA van der, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-67.
29. Bajzar L, Kalafatis M, Simioni P, Tracy PB. An anti-fibrinolytic mechanism describing the prothrombotic effect associated with factor V Leiden. *J Biol Chem* 1996; 271: 22949-22952.
30. Bajzar L, Morser J, Nesheim ME. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1996; 271: 16603-16608.
31. Broze GJ, Higuchi DA. Coagulation-dependent inhibition of fibrinolysis: role of carboxypeptidase-U and the premature lysis of clots from hemophilic plasma. *Blood* 1996; 88: 3815-3823.
32. Sakharov DV, Plow EF, Rijken DC. On the mechanism of the antifibrinolytic activity of plasma carboxypeptidase B. *J Biol Chem* 1997; 272: 14477-14482.
33. Minnema MC, Friederich PW, Levi M, Borne PAK von dem, Mosnier LO, Meijers JCM, Biemond BJ, Hack CE, Bouma BN, Cate H ten. Enhancement of jugular vein thrombolysis by neutralization of factor XI: in vivo evidence of factor XI as antifibrinolytic factor. *J Clin Invest* 1998; 101: 10-14.
34. Klement P, Liao P, Bajzar L. A novel approach to arterial thrombolysis. *Blood* 1999; 94: 2735-2743.

---

## Summary

*New insights in the regulation of blood coagulation and fibrinolysis. Bouma BN. Ned Tijdschr Klin Chem* 2000; 25: 275-278.

Recent studies indicated that the coagulation system plays an important role in the regulation of fibrinolysis. The regulation is dependent of the generation of thrombin via the intrinsic system after the fibrin clot has been formed. This thrombin activates an inhibitor of fibrinolysis that removes C-terminal lysine residues from fibrin that play an important role in the binding and activation of plasminogen. Thrombin thus not only forms the fibrin clot but it also protects it against lysis. A decreased generation of thrombin via the intrinsic system results in a bleeding tendency because the clot is insufficiently protected against lysis whereas an increased generation of thrombin may result in a thrombotic tendency. This mechanism provides an explanation for the bleeding tendency of patients with a factor XI deficiency and it offers new possibilities for the development of therapeutic agents for the treatment of thrombotic complications

*Key-words: bloodclotting; fibrinolysis; thrombosis*