



WETENSKAPLIKE BYDRAES
REEKS H: INTREEREDE NR. 206

Arterial thrombosis and its management

Arteriële trombose en sy bestuur

Prof HF Kotzé

Intreerede gehou op 12 Mei 2006

Die Universiteit is nie vir menings in die publikasie aanspreeklik nie.

Navrae in verband met *Wetenskaplike Bydraes* moet gerig word aan:

Die Registrateur
Noordwes-Universiteit
2520 POTCHEFSTROOM

Kopiereg © 2006 NWU

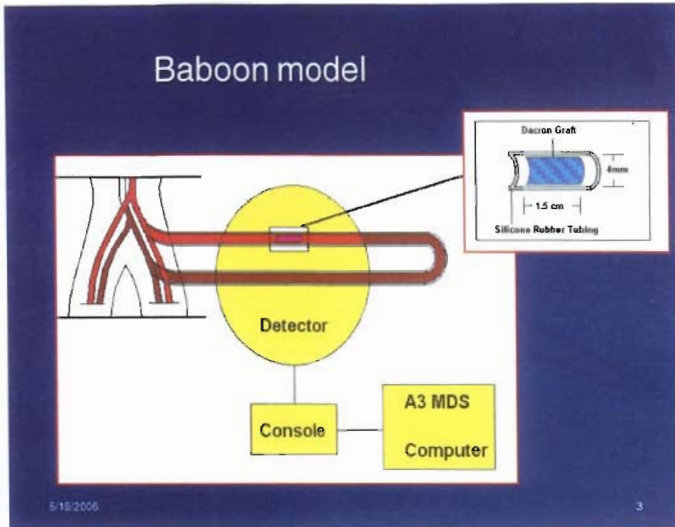
ISBN 1-86822-514-3

Mense wat my lewe, elk op sy eie manier, beïnvloed het

- Gesin: Alta, Heléne, CD, Paul, Jana en Xander
Lank sonder my aandag agv plaatjies en trombose
- Pa Kallie en Ma Johanna
Verantwoordelikheid / betroubaarheid
- Mnr Gerhard van Graan
Wye algemene belangstelling / kennis
- Prof Carools Reinecke
Klasgee "sonder" notas
- Dr Nick Strydom
Akkuraat werk
- Prof Anton Heyns
Wyer kennis van fisiologie / geneeskunde lei tot meer
volledige data interpretasie
- Proff Laurie Harker en Steve Hanson
Geleenthede in VSA

Volgorde

- Model van trombose
- Wat is trombose en wanneer vind dit plaats
Stolling en bloedplaatjies
- Die fisiese faktore wat trombusvorming beheer
- Effek van inhibisie van bloedplaatjiefunksie op trombose
- Effek van Inhibisie van bloedstolling op trombose
- PLATSAK "Droom"
- Samevatting



Die resultate waarna ek deurgaans gaan verwys is met 'n bobbejaanmodel van ex vivo trombose gegeneer. In hierdie model word 'n silikon rubber fistel vanaf die femorale arterie na die femorale vene in die bobbejaan ingeplant. 'n Oppervlak wat trombogenies is word dan in hierdie fistel ingevoeg. Die voordeel van hierdie model is dat die setel van trombose buite die liggaam is, terwyl die normale in vivo prosesse van inhibisie, inaktivering en katabolisme van geaktiveerde trombogeniese faktore steeds in die liggaam plaasvind.

Plaatjie-neerlegging op die trombogeniese oppervlak word dan gemeet as die neerlegging van plaatjies wat met die radioisotoop Indium-111 gemerk is. Hierdie gemerkte plaatjies kan dan met 'n sintilliasie kamera "afgeneem" word om die hoeveelheid radioaktiwiteit te bepaal. Radioaktiwiteit word dan omgewerk na die aantal plaatjies in die trombus om die grootte van 'n trombus te bepaal. Hierdie metings en berekeninge word in tyd gedoen sodat 'n tyd / plaatjie-neerleggingskromme saam te stel.

Hierdie model slegs by twee Universiteite gebruik: by Universiteit van die Vrystaat en by die Oregon State University in Oregon VSA. Die resultate wat met hierdie model gegeneer word, word ook allerweë beskou as die finale antwoord van meganismes in trombogenese en wat die invloed van inhibisie van hierdie meganismes op trombusvorming is.

■ Resultate eweknie beoordeel

■ Nie ek, maar 'n span mense



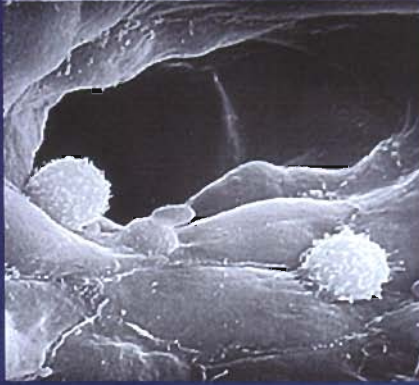
5-15-2008

4

Die resultate waarna ek deurgaans gaan verwys is alles gepubliseer in tydskrifte wat eweknie beoordeling gebruik voordat voordat artikels aanvaar word. Die resultate is dus deur kundiges getoets en is daarom betroubaar.

Verder is dit net so belangrik dat ek in die begin sê dat hierdie werk nie my eie is nie, maar dié van 'n span, en ek moet veral die name van (v.l.n.r) Jan Roodt, Muriel Meiring en Seb Lamprecht noem. Alhoewel daar ander mense ook betrokke was, het hierdie drie die "hoofspan" uitgemaak.

Endothelium is non-thrombogenic

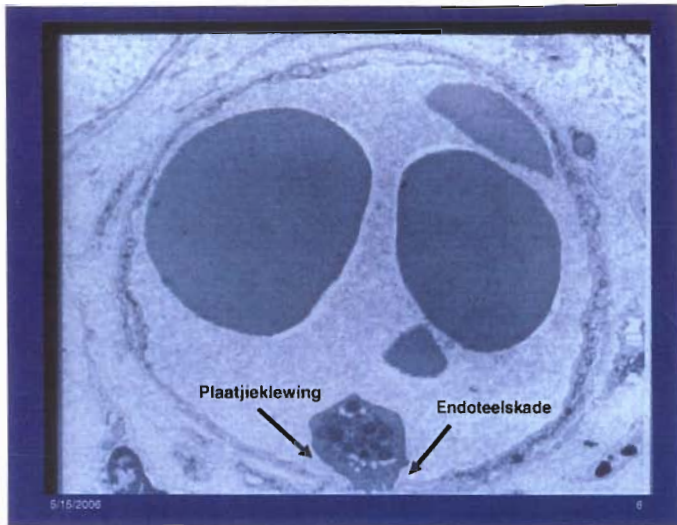


5/15/2006

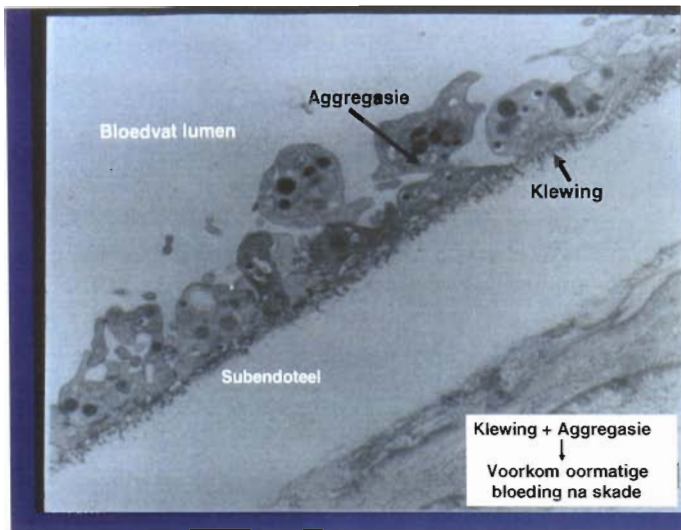
5

Hierdie is soos dit aan die binnekant van 'n aar lyk. Die endoteelselle voer die aar mooi uit. Die selle wat op die endoteel sit, is witbloedselle. Dit is normaal.

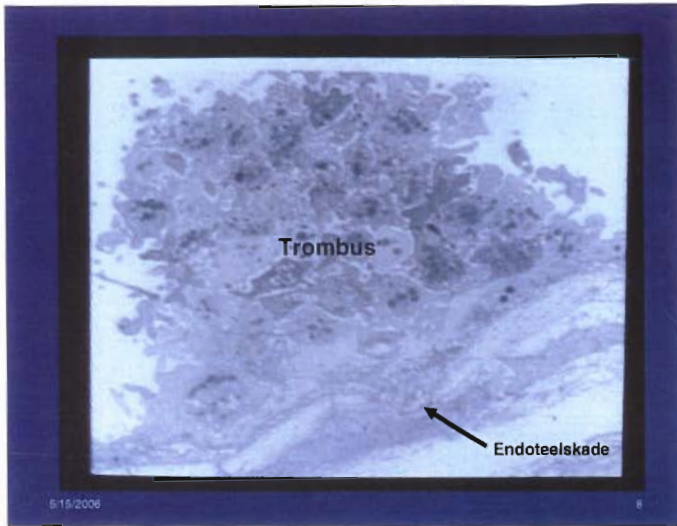
Endoteelselle is nontrombogenies, m.a.w. hulle aktiveer nie die stollingstelsel of bloedplaatjies nie. Interessant is dat die endoteel nou beskou word as die grootste orgaan in die liggaam. Byvoorbeeld, die long endoteelselle, as mens dit op 'n plat vlak sou kon "uitpak" is so groot soos 'n rugbyveld. Verder is dit ook noemenswaardig dat endoteelfunksie verskil afhangende van waar dit is. So bevat endoteelselle in die longe sekere eienskappe en dié in die lewer ander.



Soora endoteel beskadig word, word die weefsel onder die endoteel aan bloed blootgestel. Daar verskeie molekules in hierdie subendoteel wat trombose aan die gang sit. Die eerste stap is dat plaatjies aan hierdie molekules gaan kleef en dat hierdie plaatjies dan geaktiveer word.

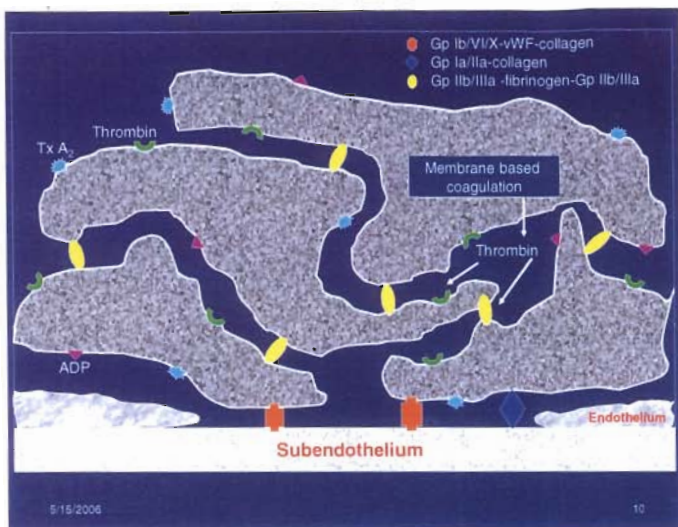


Soos wat die tyd aangaan, kleef al meer en meer plaatjies aan die subendoteel. Daar is egter ook plaatjies wat aan mekaar begin vassit, 'n proses bekend as plaatjie-aggregasie.



Met die verloop van tyd groei hierdie trombus omdat meer en meer plaatjies aanmekaar vaskleef. Daar is 'n paar dinge wat nou kan gebeur.

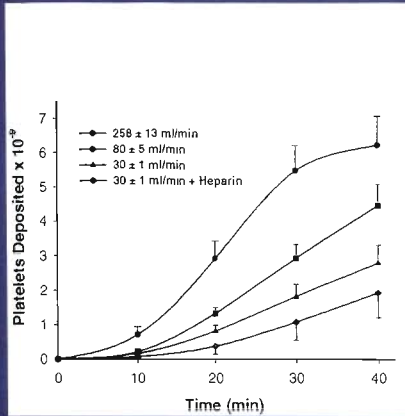
- Onder normale omstandighede sal hierdie trombus net groei totdat bloeding uit die bloedvat gestop het.
- In gevalle waar erge stimulasie van trombogenese plaasvind, kan die trombus aanhou groei en die bloedvat verstop.
- Stukkies van die trombus kan afbreek (emboïseer) en kleiner vate distaal tot die trombus verstop.



Die prosesse in die vorige skyfie kan vereenvoudig word tot 'n paar belangrike stappe wat die spilpunt van trombose is. Hierdie funksies word almal deur reseptore op die bloedplaatjiemembraan beheer. Daar is twee tipes reseptore:

- Die sewe transmembraan reseptore vir stowwe wat plaatjies aktiveer. Dit sluit in die reseptore vir ATP, Tromboksaan A₂ en trombin.
- Die glikoproteïen (Gp) reseptore wat insluit:
 - Gp Ia/IIa wat omkeerbaar aan kollageen in die subendoteel bind en die beweging van die plaatjie oor die beskadigde deel van die bloedvat vertraag.
 - Gp Ib/VI/XII wat met die hulp van von Willebrand faktor onomkeerbaar aan kollageen in die subendoteel bind. Hierdie interaksie anker die plaatjie aan die subendoteel
 - Gp IIb/IIIa wat met die hulp van fibrinogeen onomkeerbaar aan 'n Gp IIb/IIIa reseptor op naburige plaatjies bind sodat die trombus kan groei.

Effect of blood flow on platelet deposition

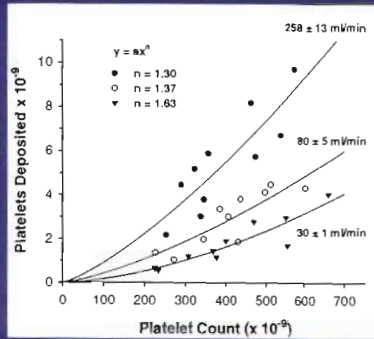


5/15/2006

11

Daar is verskeie fisiese faktore wat die groei van 'n trombus bepaal. In hierdie skyfie is dit duidelik dat meer plaatjies aan trombose deelneem as die bloedvloeiensnelheid hoër is. Dit is logies, aangesien vinniger bloedvloei meer plaatjies by die punt van trombose laat verbygaan.

Effect of blood flow on platelet deposition

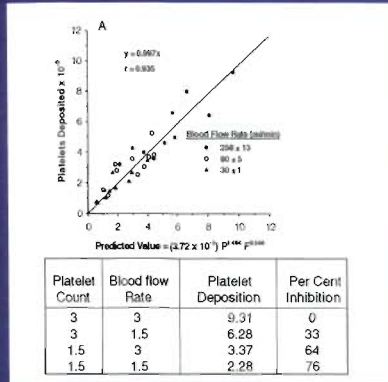


5/15/2006

12

Hier kan mens ook sien dat die aantal plaatjies in die sirkulasie net so 'n belangrike effek het as bloedvloei. Die inter afhanklikheid van die aantal plaatjies met bloedvloei is ook duidelik by verskillende plaatjetellings. Weereens is dit maklik om te verklaar. As daar meer plaatjies in die bloed is, sal meer by 'n gegewe punt verbyvloei.

Relative contribution of platelet count and blood flow rate on platelet deposition



5/15/2006

13

Ons het 'n wiskundige model gebruik om te probeer onderskei wat die relatiewe bydrae van bloedvloeiensnelheid en plaatjietelling tot trombusvorming is.

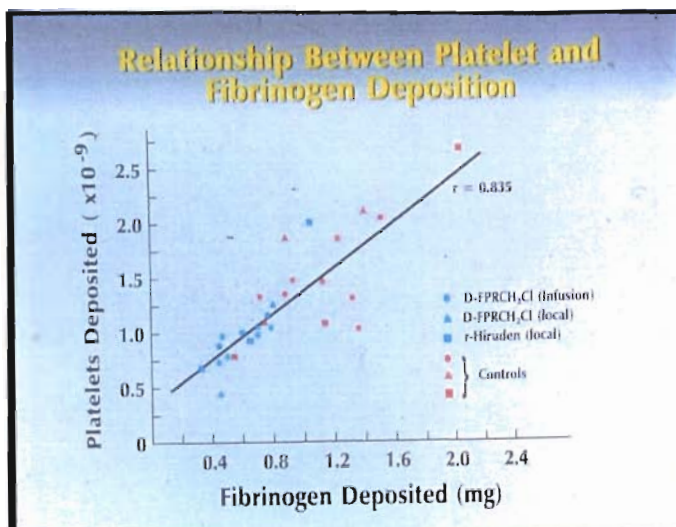
Die Y-as is die werklike aantal plaatjies in die trombus soos wat ons dit gemeet het. Die X-as is die berekende aantal plaatjies soos wat dit met die model bereken is. Die berekende en werklike waarde stem ooreen want die helling van die kromme is so te sê een, terwyl die snypunt nul is, dus 'n een tot een verhouding.

As mens die r-waarde kwadreer gee dit 'n aanduiding van daardie persentasie wat bloedvloei en plaatjietelling bydra tot die aantal bloedplaatjies in die trombus. In hierdie geval is dit 87%, m.a.w. slegs 13% van plaatjieseerlegging in die trombus word nie deur vloeiensnelheid en plaatjietelling bepaal nie.

Die model gee ons egter ook ander belangrike inligting tov inhibisie van trombusvorming deur manipulasie van die vloeiensnelheid en plaatjietelling. Dus, teoreties:

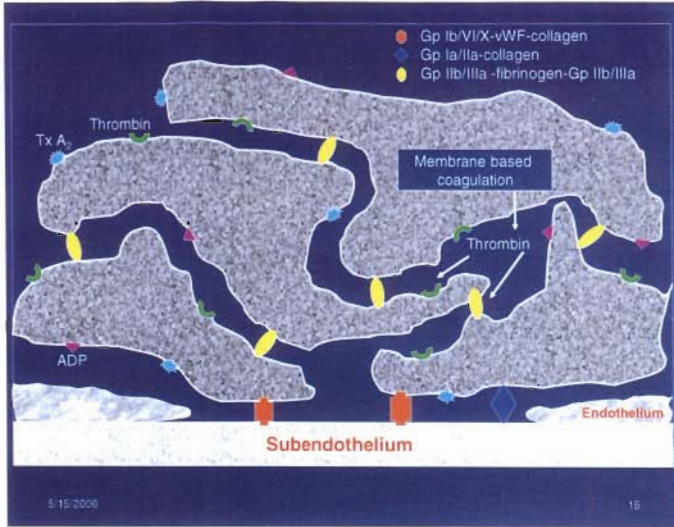
- Begin met vloeiensnelheid en plaatjietelling arbitrêr op 3, dan is daar geeninhibisie van trombusvorming nie
- As net vloeiensnelheid halveer word, word trombusvorming met 33% inhibeer.
- As net plaatjietelling halveer word, word trombusvorming met 64% inhibeer.
- As beide faktore halveer word, word trombusvorming met 76% inhibeer.

Die resultate wys ook duidelik dat die plaatjietelling 'n baie groter rol speel as vloeiensnelheid om die bydrae van plaatjies tot die grootte van die trombus te bepaal. Dus, net 'n verlagings in die plaatjietelling kan al as effektiewe voorkoming van trombose gebruik word.



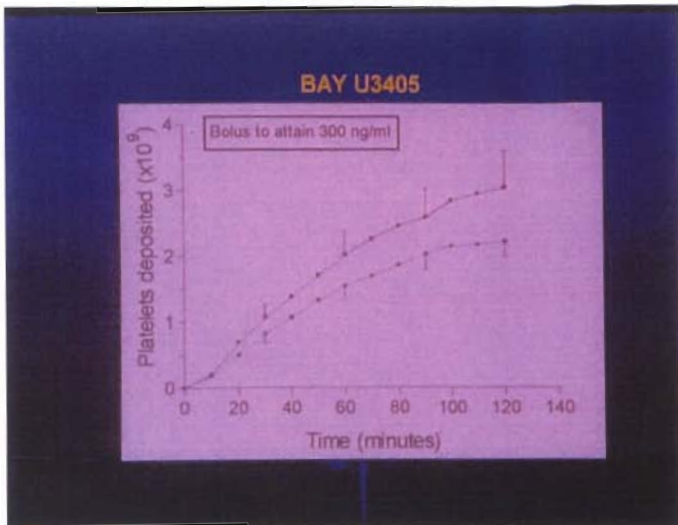
Hier is ook 'n belangrike boodskap. Hoë fibrinogeenkonsentrasies word allerweë as een van die risikofaktore vir hartaanvalle en beroertes beskou. Hierdie data wys duidelik wat die verhouding tussen die aantal plaatjies in 'n trombus en die hoeveelheid fibrinogeen in dieselfde trombus is. As daar meer plaatjies is, is daar meer fibrinogeen. Dit is ook belangrik om daarop te let dat die verhouding geld as trombusvorming geïnhibeer word.

Dit is belangrik om daarop te let dat die snypunt van die kromme nie deur die nulpunt gaan nie. Dit beteken dat daar plaatjies in die trombus sal wees sonder dat fibrinogeen teenwoordig is. Dit moet so wees, aangesien die klewingsfase van plaatjiefunksie nie afhanklik is van fibrinogeen nie, maar wel van von Willebrand faktor.



In die eerste geval kyk ons na 'n produk wat Bayer ontwikkel het. Die middel verhoed dat trombosaan A_2 aan sy reseptor op die plaatjiemembraan bind. Plaatjies kan dus nie deur trombosaan A_2 geaktiveer kan word nie.

Hierdie benadering is feitlik dieselfde as wat met aspirien (asetielsaliisielsuur) bereik word. Aspirien stop die produksie van trombosaan A_2 . Die aanname dat dit trombose verminder word as mens genoeg vis eet berus ook op hierdie meganisme van plaatjie aktivering. 'n Visdieet het ook tot gevolg dat minder trombosaan A_2 vorm.



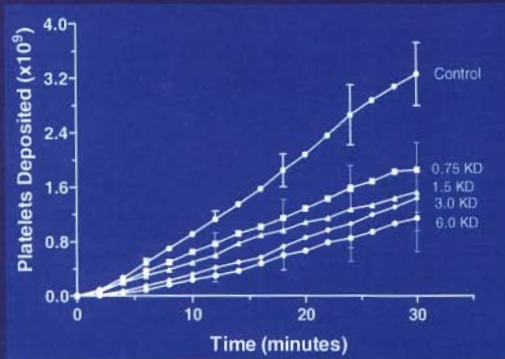
Ons het 'n oordosis van die reseptor inhibitor gegee, en tog was die inhiberende effek op trombus groei nie dramaties gewees nie. Na 2 uur was die trombus maar ongeveer 30% kleiner gewees as in die geval van die kontrole studies. Dit is dus nie 'n baie effektiewe benadering vir inhibisie nie. Ek kan net noem dat aspirien nog slegte gevaar het in soortgelyke studies.

Hierdie benadering om middels te ontwikkel wat trombose inhibeer is ook nie meer baie populêr nie. Hierdie tipe resultate het daartoe bygedra.



Die volgende waarna ons kyk is die effek van inhibisie van klewing en aggresie op trombose.

Inhibition of platelet deposition by preventing platelet adhesion



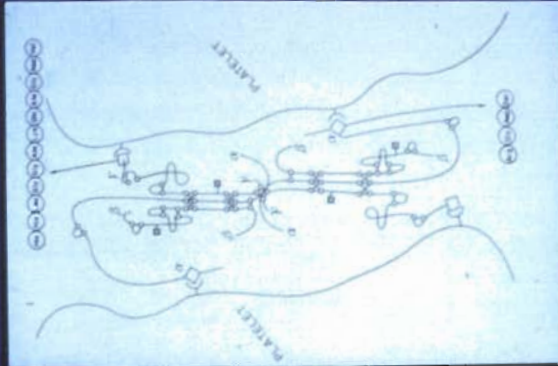
5/15/2006

18

Die volgende waarna ons kyk is die effek van inhibisie van klewing op trombose. In hierdie geval het ons 'n antiliggam van hans Deckmyn van België gebruik. Hierdie antiliggam verhoed dat von Willebrand faktor aan sy reseptor op die plaatjiemembraan bind.

Dit is baie duidelik dat inhibisie van klewing 'n dramatiese effek op die groei van 'n trombus het. Hierdie effek is ook dosis afhanklik.

Platelet-platelet interaction

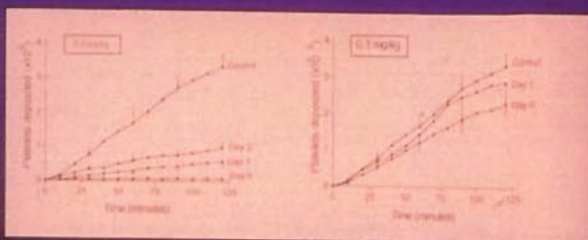


Fibrinogeen vorm die brug tussen plaatjies sodat plaatjie aggregasie kan plaasvind. Daar is 2 setels op die fibrinogeen molekule wat aan die reseptor Gp I b/IIIa bind. 'n Dodekapeptied en 'n tripeptied Arg-Gly-Asp. Hierdie is 'n model wat probeer verduidelik hoedat die binding plaasvind.

Volgens die model bind die Dodekapeptied van een fibrinogeen molekule aan 'n plaatjie en die tripeptied aan die ander.

Daar is verskeie studies wat duidelik gewys het dat trombusvorming inhibeer word as mens verhoed dat fibrinogeen d.m.v. die tripeptied aan Gp II/IIIa op die plaatjie membraan bind.

MA-16N7C2



	Receptor occupation			
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3
0.3 mg/kg	64 ± 8	38 ± 11	30 ± 17	16 ± 12
0.1 mg/kg	41 ± 8	26 ± 15	9 ± 13	

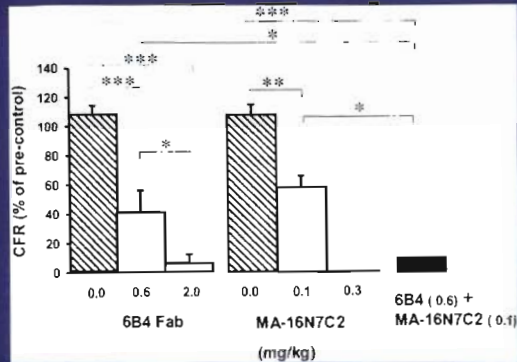
Hierdie is resultate wat ons gekry het met 'n antiliggam (MAB) wat spesifiek verhoed dat Fibrinogeen d.m.v. die Arg-Gly-Asp aan sy reseptor op die plaatjie membraan bind. 'n Enkele bolus inspuiting van die MAB is gebruik. Die FAB het ons ook by Hans Deckmyn van België gekry.

Daar is 'n paar belangrike rigtingwysers in hierdie resultate:

- Die antiliggam werk vir 'n paar dae werk. In die geval van die hoë dosis (0.3 mg/kg), was trombosvorming nog merkbaar geïnhibeer 48 uur nadat die antiliggam toegedien is.
- Dieselfde geld nie vir die lae dosis (0.1 mg/kg) van MAB nie.
- Hierdie resultate is nog meer 'onduidelik' as mens kyk na die aantal reseptore waaraan die MAB gebind is. Plaatjies het ongeveer 45 000 reseptore vir fibrinogeen.
- Op 1 dag met die hoë dosis was ongeveer 38% van die reseptore beset met die MAB. Met die lae dosis op dag 0 was ongeveer 41% van die reseptore beset. Tog was die inhibisie op dag 1 (hoë dosis) dramaties groter as op Dag 0 (lae dosis)
- Dieselfde geld vir dag 2 (hoë dosis) en dag 1 (lae dosis) waar reseptor okkupasie ongeveer 30% en 26% respektiewelik was.
- Hierdie resultate kan net verklaar word as ons aanneem dat plaatjies kan dien as stoorplek vir die antiliggam. Dit is bekend dat plaatjie aktief antiliggam opneem en stoor. In die geval van die hoë MAB dosis, sal meer MAB opgeneem en gestoor word. As plaatjies dan op opeenvolgende dae geaktiveer word deur trombose, word meer MAB uit hierdie plaatjies vrygestel om trombose te inhibeer.

Dus plaatjies kan op hierdie wyse gebruik word om met antitrombotiese middels 'gelaaï' te word wat dan vrygestel word as plaatjies geaktiveer word, = trombusgerigte behandeling.

Effect of simultaneous inhibition of platelet adhesion and aggregation on thrombus formation



5-15/2006

21

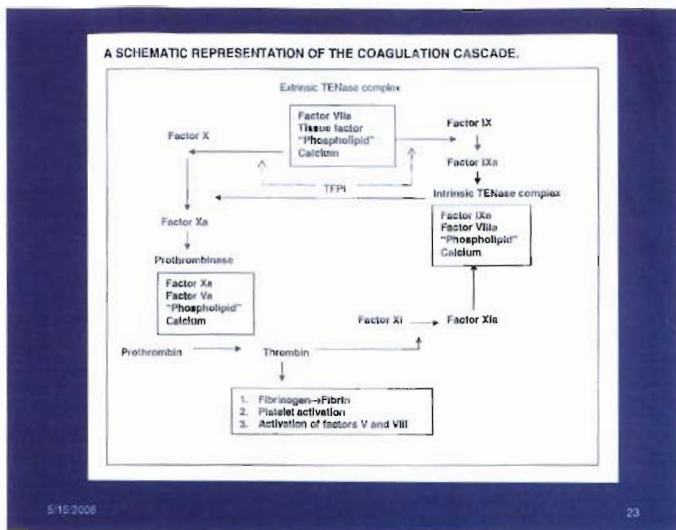
Ons het gekyk na die invloed op trombosvorming as mens eers klewing en daarna aggregasie inhibeer en gesien dat dit baie effektief is om trombose te inhibeer. Ongelukkig veroorsaak daardie konsentrasie van MAb wat effektief is, ook 'n bloedingsneiging, m.a.w. inhibisie is te effektief. Bloedingsneiging kan gevaarlik wees omdat inwendig in die buik of in die brein kan wees. Mens weet gewoonlik nie daarvan voordat dit te laat is nie.

Daarom het ons bietjie gekyk na kombinasie terapie waar ons beide plaatjie klewing en aggregasie gelyktydig geïnhibeer het.

- Hoë konsentrasie van klewing inhibisie (6B4 Fab) het trombosvorming omtrent volledig geïnhibeer. Die laer konsentrasie het met ongeveer 60% geïnhibeer.
- Soortgelyk het 'n hoë konsentrasie MA-16N7C2 aggregasie omtrent volledig inhibeer en 'n lae konsentrasie met ongeveer 60%.
- Kombinasie van die 'oneffektiewe' klewing en aggregasie MAb's het volledige inhibisie tot gevolg gehad, m.a.w. 'n kumulatiewe effek.
- Hierdie resultaat is verkry sonder dat die bloeityd, 'n aanduiding van 'n bloedingsneiging, verleng het. Die gevaar om 'n bloedingsneiging te ontwikkel is dus nie groot nie.



Die volgende waaraan ek wil raak is die rol van trombin in trombose.



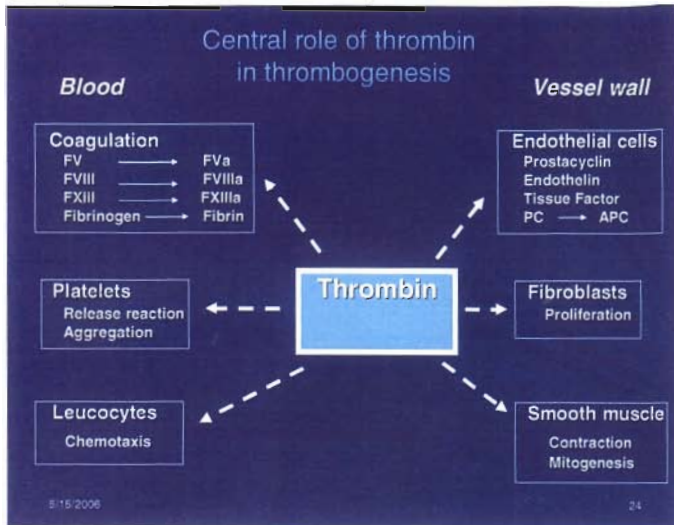
Trombin kan amper as die spilpunt van trombose beskou word. Trombin vorm as die stillingskaskade geaktiveer word. Hierdie is 'n skematiese voorstelling van hoe die stillingskaskade werk. Die sneller vir aktivering is Weefsel Faktore (TF). Subendoteel en aterosklerotiese plakette is tyk aan TF. 'n Plakket wat oopbars of endoteel wat beskadig word, stel TF bloot. Dit begin 'n kringloop van reaksies wat protrombin aktiveer.

Elk van die vierkante stel 'n ensiemkompleks voor wat 'n spesifieke substraat aktiveer. Die kompleks bestaan uit 'n ensiem, wat die substraat sny om dit te aktiveer, 'n ko-ensiem wat die ensiem help om sy werk vinniger te doen, fosfolipiede wat verskaf word deur geaktiveerde plaatjies se membraan en Ca wat die kompleks stabiliseer. Die fosfolipied op die plaatjie membraan speel 'n kritieke rol om die vorming van trombin te beperk tot die setel van trombose. As dit nie hiervoor was nie, sou trombin oral in die liggaam gevorm het en mens sou as't ware een groot stolsel word as die kaskade eers geaktiveer word.

Daar is 'n tweede beskermingsmeganisme teen trombin wat ek alreeds genoem het:

- Trombin 'n baie sterk aktiveerder van trombose en dit word hoofsaaklik by die trombus gevorm.
- Endoteel langs die beskadigde gedeelte bevat trombomodulien. Dit is 'n reseptor vir vry trombin in die plasma. As trombin aan trombomodulien bind, kan dit nie meer stilling aktiveer nie, maar wel proteïen C. Aktiewe proteïen C is bekend as die sterkste natuurlike inhibitor van trombose

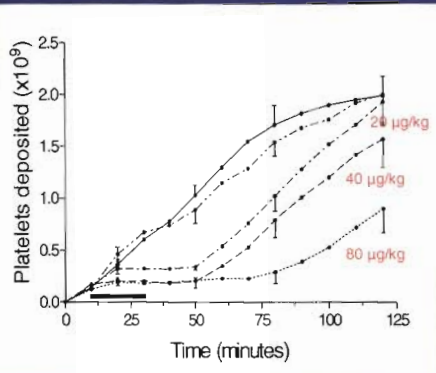
Al hierdie meganismes werk dus saam om trombose tot plek van beskadiging van die bloedvat te beperk.



Hier kan ons sien dat trombin 'n sentrale rol in trombose speel. Die rol is nie net beperk tot die bloed nie, maar het ook 'n rol in die bloedvat waar beskadiging plaasgevind het.

Dit is dan ook nie verbasend dat trombin en die inhibisie van trombin en/of sy vorming 'n hoofteiken is om antitrombotiese middels te ontwikkel nie. Die volgende paar skyfies gaan hieroor handel

Inhibition of Platelet deposition by different concentrations of hirudin



5/15/2006

25

Ons het hirudien gebruik om trombin se aktiwiteit te inhibeer. Dit is 'n peptied wat uit die bloedsuier geïsoleer is. Ek het dit by Fritz Markwardt van Jena in Duitsland gekry.

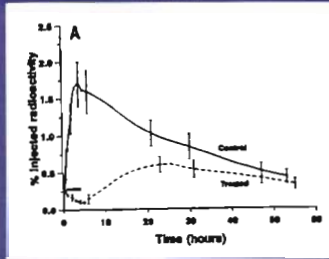
Die resultate het 'n paar belangrike dinge uitgewys.

- Die effek van hirudien op trombusvorming is dosis afhanklik. Let op dat ons net vir 'n tydperk van ongeveer 30 minute met hirudien behandel het.
- Dit is egter belangrik om te kyk na wat gebeur as mens ophou behandel. By hoë konsentrasies lyk dit asof die inhibisie van trombusvorming vir 'n tydjie aanhou, en dat tempo van trombusvorming ook stadiger is.

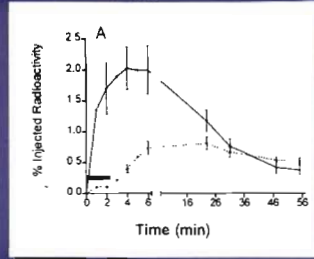
Dit laat mens onmiddellik wonder wat sal gebeur as mens met 'n hoë konsentrasie vir langer tydperk behandel. Kan mens as't ware die vermoë van 'n trombus om te groei, beïnvloed.

Inhibition of Platelet deposition

Hirudin



r-TAP



5-15-2006

26

Ons het dit gaan toets. Hier is die resultate. Ons het die trombus vir 4 ure met 'n hoë dosis hirudien behandel en daarna vir ongeveer 60 uur gevolg. Die resultate is duidelik: daar is 'n groot verskil tussen die hirudien behandelde en nie-behandelde bobbejane. Dit is duidelik dat die behandelde trombus baie kleiner was as die nie-behandelde. Die hoofrede hiervoor moet wees dat die trombusoppervlak na behandeling minder trombogenies was. Daar kan verskeie redes hiervoor wees waarop ek nie op die oomblik wil ingaan nie.

In die tyd wat ons hierdie studies gedoen het, het ek vir George Vlasuk van CORVAS in San Diego ontmoet. Hy het op daardie stadium 'n rekombinante "Tick Anticoagulant Peptide" (r-TAP) ontwikkel. Die oorspronklike peptid is uit bosluise ontwikkel. r-TAP inhibeer die vorming van trombien.

Ons het die studie wat ons met hirudien gedoen het, herhaal om te sien of en hoe die data verskil.

Dit lyk asof daar nie werklik 'n verskil is in die resultate nie. Daar is verskeie maniere hoedat mens die resultate met mekaar kan vergelyk. Mens kan die volgende bereken:

- Maksimum trombus grootte;
- Tyd wat dit neem om maksimum te bereik
- Area onder die kromme wat 'n samevoeging van trombus grootte X tyd is.

Graph analyses

	Control	TAP	Hirudin
Peak Radioactivity			
% Whole body	2.18±0.85	0.86±0.10*	0.53±0.24**
Time (days)	0.30±0.12	0.74±0.36*	1.14±0.12*
AUC (h x%deposition)	54±17	33±6*	27±13*

* p<0.05 versus control

p<0.05 TAP versus hirudin

5/15/2006

27

Hier is resultate saamgevat. Die waardes vir beide hirudien en r-TAP verskil baie van die kontrole waardes, maar nie van mekaar nie.

Die gevolgtrekking is dat daar nie 'n verskil in trombus vormings is tussen die twee benaderings van behandeling.

Mathematical model

Platelet deposition at a given time [I(t)] is determined by the average residence time, random platelet destruction and the fraction of platelets incorporated into the thrombus.

$$I(t) = \frac{\Phi K}{(1-K\Phi)(1-e^{-kt})} \times [e^{-kt} - e^{-t\Phi} - (1-K\Phi)e^{-kT} + (1-K\Phi)e^{-(t\Phi+kt)}]$$

Where

Φ = average residence time,
t = time,

T = maximum lifespan = 6.2 days,
k = random platelet destruction
= $\tau = (1-e^{-kT})/k$; Mills-Dornhorst

K = fraction of platelets incorporated into the thrombus

8/15/2006

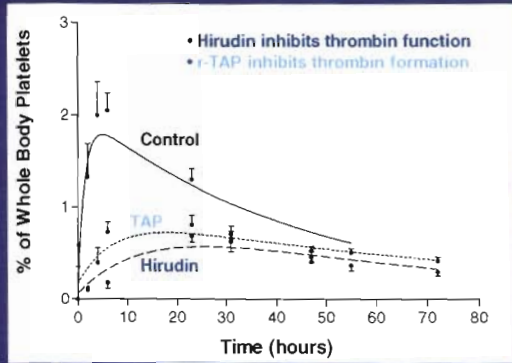
28

Hierdie is 'n model wat Steve Hanson, Departementshoof van die "Department of Biomedical Engineering", Oregon State University' in die VSA ontwikkel het om juis hierdie tipe data te beskryf. Dit model lyk verskriklik, maar is eintlik baie eenvoudig.

Die model stel dit dat die aantal plaatjies in die trombus op enige tyd stip afhanklik is van:

- Theta: gemiddelde verblyftyd van 'n plaatjie in die trombus;
- t = tyd
- T = Maksimum leeftyd van plaatjies
- k = willekeurige plaatjieverbruik. k word bepaal deur die leeftyd van plaatjies onder die eksperimentele omstandighede.
- K = die fraksie van totale plaatjie wat in trombus ingebou word.

Platelet deposition curves



6/16/2006

29

Mens kan duidelik sien dat die model die data baie goed beskryf. Dit beteken dat die afleidings wat gemaak word, waar is.

Mathematical analysis

Measurement	Control	r-TAP	Hirudin
Average residence time (d)	0.06±0.04	0.30±0.27	0.74±0.19
Rate of platelet destruction (%/day)			
Total random	57±23	27±15	44±17
Thrombus	41±20	6±3	1±1
% of total platelets destroyed by thrombus			
	63±22	25±14	3±2

6/15/2008

30

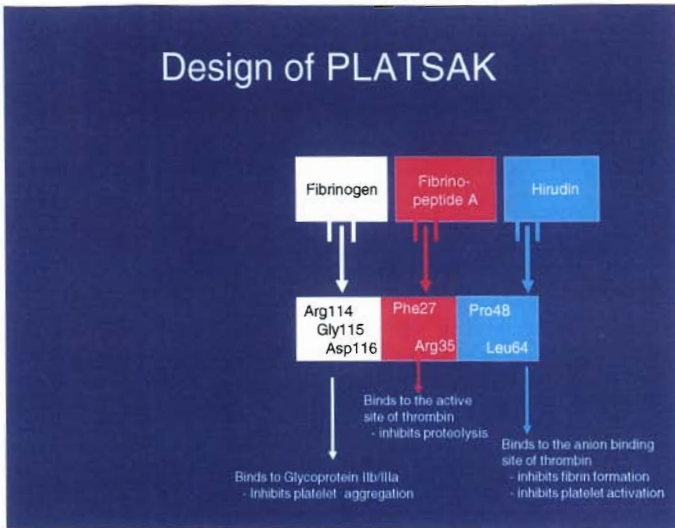
As mens na die resultate kyk, is daar groot verskille t.o.v. die verskillende benaderings om trombose te inhibeer.

- In die nie-behandelde bobbejane is die verblyftyd van plaatjies in die trombus kort. Dit is baie langer in die bobbejane waar trombienvorming voorkom is en die langste verblyftyd is wanneer trombien direk geïnhibeer is.

- Die volgende belangrike verskil is die persentasie van die plaatjies wat deur die trombus self vernietig is. In die onbehandelde bobbejane was ongeveer 63% van die plaatjies deur die trombus self vernietig. Na r-TAP behandeling is ongeveer 'n kwart en na hirudien ongeveer 3% van die plaatjies deur die trombus vernietig.

Die les hieruit is dat mens nie net 'n stel data aanvaar nie. Mens moet gaan dieper soek of daar werklik verskille is. Die normale grafiek analises het nie verkille uitgewys nie. As mens egter die data toets aan wiskundige modelle wat die prosesse beskryf, is die prentjie heel anders.

Design of PLATSAK



Ek het vir 'n lang ruk gewonder wat sal gebeur as mens die funksionele gedeeltes van verskillende proteïene saamvoeg in een molekule. Sal die molekule die funksies van die individuele komponente behou of nie?

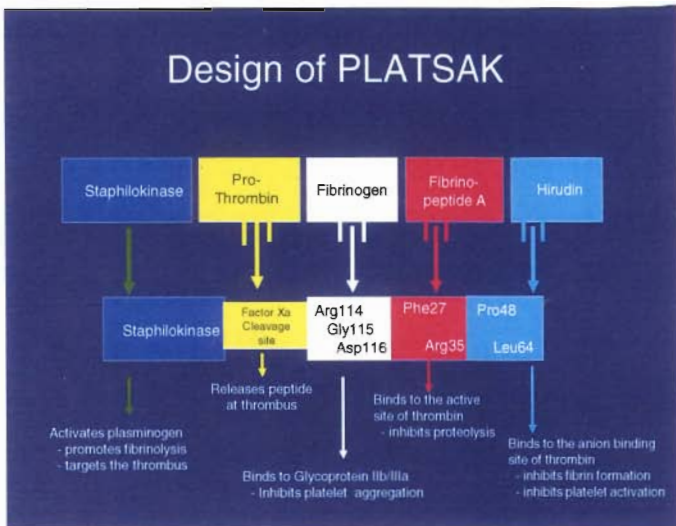
Hierdie is 'n molekule wat ek en Gert Pretorius (Prof Piet se broer) ontwikkel het om juis daardie vraag te probeer antwoord.

Ons het aanvanklik 'n peptied wat uit 29 aminosure bestaan het, ontwerp. Die peptied het die funksionele gebiede van drie proteïene gehad.

- 'n Argienien-glisien-aspartien gedeelte wat van fibrinogeen wat verhoed dat plaatjie-aggregasie kan plaasvind
- 'n Gedeelte van 9 aminosure afkomstig van fibrinopeptied A wat trombin se aktiwiteit inhibeer. Die fibrinopeptied A word deur trombin van fibrinogeen afgesny
- 'n Gedeelte van 17 aminosure wat vanaf hirudien kom en wat verhoed dat trombin aan sy substraat bind.

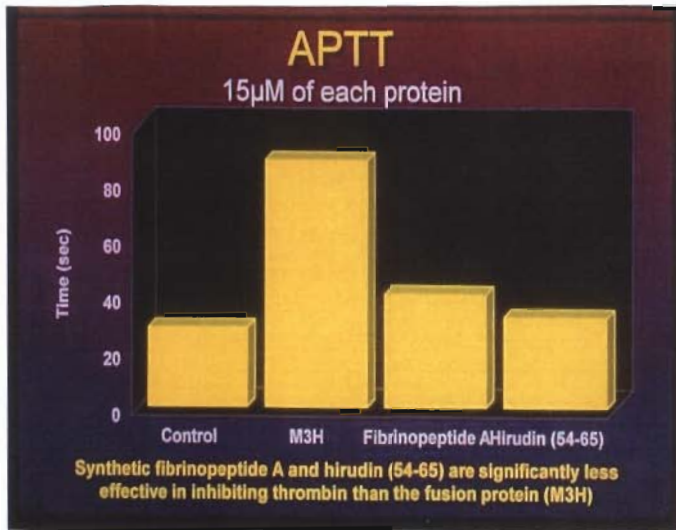
Ons het toe probeer om hierdie peptied rekombinant in E-coli te sintetiseer maar was onsuksesvol. Dit was tot ons agtergekrom het E-coli klein peptiede as afbraakprodukte herken. Dus, so vinnig as wat die peptied gemaak word, so vinnig word hy weer afgebreek.

Design of PLATSAK



Om afbraak te verhoed, moes ons die proteïen groter maak en daarvoor het ons staphilokinase (SAK) gebruik. SAK is 'n ensiem wat 'n trombus kan oplos. Ons het dus 'n vierde funksie in die proteïen ingebou. 'n Belangrike eienskap van SAK is dat dit net aan fibrin in 'n trombus bind, m.a.w. dit is hoogs spesifiek om net aan 'n trombus te gaan bind. Die SAK is dus getaak om die antitrombotiese peptied na 'n gevormde trombus te dra.

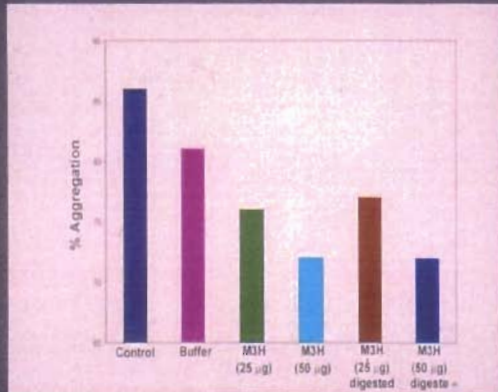
Ons het toe ook verder 'n setel ingebou waar geaktiveerde stollingsfaktor X die peptied van die SAK kan afsny. Mens moet onthou dat stollingsfaktore geaktiveer word waar 'n trombus vorm. Die gevolg is dat die antitrombotiese peptied in die omgewing van die trombus vrygestel word. In die teoretiese beteken dit dat baie minder van die middel nodig sal wees om effektief trombose te inhibeer.



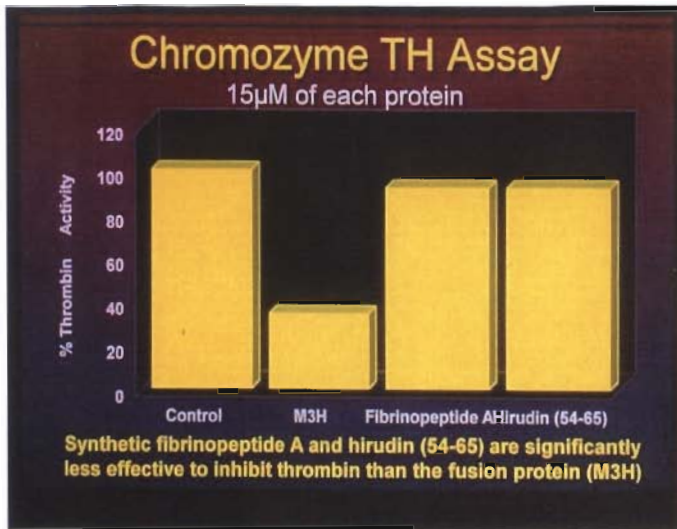
Die resultate was baie belowend. Hierdie metings meet trombin se vermoë om bloedplasma te laat stol. Hoe langer dit neem, hoe swakker werk die trombin.

Dit is baie duidelik dat die gekombineerde peptied baie beter werk as die individuele peptiede. Die stolyd as die peptied gebruik word, is baie langer as wat dit is vir net fibrinopeptied A of die gedeelte van hirudien was.

Inhibition of Platelet Aggregation

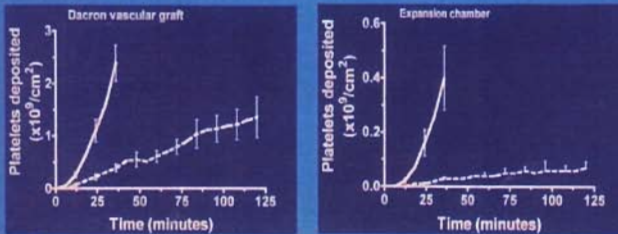


Die resultate hier wys ook dat die peptid plaatjieaggregasie inhibeer, dus plaatjefunksie word geïnhibeer. Die effek is ook dosis afhanklik.



Die metings hier meet direk die aktiwiteit van trombin. Die peptid kort trombin aktiwiteit merkbaar in terwyl die afsonderlike peptiede geen effek op trombin het nie.

Inhibition of platelet deposition



Rate of platelet deposition (x10 ⁷ platelets/cm ² /min)		
Control:	8.85 ± 1.83	4.39 ± 1.97
Treated:	1.43 ± 0.71	0.22 ± 0.12
% Inhibition:	83 ± 8	94 ± 4

Die peptied het ook antitrombotiese werking as dit in bobbejane ingespuut word. Dit inhibeer trombusvorming met tussen 80 en 95%. Die peptied werk dus ook as mens dit in vivo gebruik.

Eintlik werk dit te goed, want die bobbejane wat ons gebruik het, het 'n bloedingsneiging ontwikkel. Mens so sekerlik kon verander aan die samestelling van die peptied om dit minder gevaarlik te maak. Ongelukkig het die geld opgegaan en ons moes hierdie projek staak.

Samevatting (1)

- Ontwikkel setelgerigte middels wat hoofsaaklik proteïene is

- Antitrombotiese behandeling
 - Weet trombose gaan plaasvind en na hartaanvalle en beroerte
 - Genoeg hoogs effektiewe middels
 - bloeding bly steeds 'n probleem: kombinasie terapie
 - moontlike oplossing
 - moet intravaskulêr toegedien word

8/15/2006

37

Mens moet jouself die vraag afvra: So what?

Omdat ons weet watter setels op proteïene is dit baie maklik om middels te ontwikkel wat aan daardie setel gaan bind en sy funksie inhibeer. Hierdie middels is vreemde proteïene wat ingespuut word. Een van die probleme daarmee is dat hulle die immuunreaksie uitlok. Die gevolg is dat hierdie proteïene nie weer ingespuut kan word nie omdat hulle feitlik onmiddellik uit die sirkulasie verwyder word. Daar is wel maniere om dit te omseil.

As mens kyk na die bestuur van trombose moet mens na twee aspekte kyk.

In die een geval is die behandeling gerig op toestande wat ons weet trombose gaan plaasvind. Verskeie chirurgiese prosedures is hier ter sprake en ook nadat mense hartaanvalle en beroerte gehad het. Hier is die doel om verdere trombose te voorkom. Daar is hoogs effektiewe middels wat gebruik kan word. Hulle gebruik gaan egter gepaard met 'n verhoogde risiko van bloeding. Hier kan kombinasie terapie 'n oplossing bied. Die proteïene moet intravaskulêr toegedien word omdat hulle nie uit die spysverteringskanaal geabsorbeer kan word nie; hulle word verteer. Dit skep sy eie probleme, veral met langtermyn behandeling. Die probleem kom egter by toediening. Omdat baie van hierdie middels se leeftyd in bloed kort is, moet pasiënte op 'n intraveneuse drup geplaas word. In die langtermyn is dit nie moontlik nie.

Samevatting (2)

■ Profilakties

- aspirien en warfarin enigste wat per mond ingeneem kan word
egter nie 100% effektief nie
- Geen van effektiewe middels per mond
proteïene kan nie geabsorbeer nie
- Astra-Zeneca
ximelagatran (proteïen-nabootser), wag egter vir FDA goedkeuring

An apple a day keeps the doctor away
An aspirin a day **may** keep the cardiologist /
neurologist away
A (???) a day **shall** keep the cardiologist /
neurologist away

5/15/2008

38

Die groter probleem is om middels te ontwikkel wat as profylakse gebruik kan word, maw iets wat gaan keer dat mens hartaanvalle of beroerte gaan kry.

Aspirien en in 'n mate, warfarin, is al wat op die oomblik beskikbaar is vir hierdie doel. Hulle kan egter nie trombose volledig voorkom nie. Aspirien se probleem is dat dit deur tromboksaan A_2 werk. Omdat tromboksaan maar een van drie aktiveringsmeganismes van plaatjies is, kan mens verstaan hoekom dit nie so effektief is nie.

Toediening van die effektiewe proteïene teen trombin en plaatjiereseptore skep hier nog 'n groter probleem as met gewone behandeling.

Astra-Zeneca het Ximelagatran, 'n proteïen nabootser, ontwikkel wat uit die spysverteringskanaal absorbeer kan word. Dit is gerig teen trombin. Dit is effektief en sy absorpsie en funksie is baie voorspelbaar. So, daar is hoop vir die toekoms. Die middel moet egter nog deur die FDA goedgekeur word.