Maastricht University

Thrombin generation and fibrin formation in dilutional coagulopathy : towards improved peri-operative transfusion protocols

Citation for published version (APA):

Schols, S. E. M. (2010). Thrombin generation and fibrin formation in dilutional coagulopathy : towards improved peri-operative transfusion protocols. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. https://doi.org/10.26481/dis.20100219ses

Document status and date:
Published: 01/01/2010

DOI:
10.26481/dis.20100219ses

Document Version:
Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

• A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
• The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
• The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

• Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
• You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
• You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the “Taverne” license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 25 Apr. 2024

Summary

Thrombin generation in dilutional coagulopathy

Patients, who suffer from massive blood loss during major surgery or experience severe trauma, are infused with large volumes of fluids and blood products. In the patient plasma, this inevitably leads to further dilution of the blood components and cells. Optimal hemostasis requires the presence of minimal levels of platelets and coagulation factors, since these mediate the formation of platelet aggregates, thrombin and a fibrin clot, all of which are necessary to stop a bleeding event. Massive infusion of fluids (colloids and crystalloids) and blood products (erythrocyte and platelet suspensions) often disturbs the patient's ability to form a strong fibrin clot, and increases the risk of (persistent) bleeding problems. This clinical condition is referred to as dilutional coagulopathy, and is difficult to treat. In the current clinical practice, the impaired coagulation of a patient is monitored with routine coagulation tests, i.e. the activated partial thromboplastin time, the prothrombin time and the international normalized ratio. However, these tests are notoriously insensitive for conditions of dilution. Nowadays, there is growing interest in the use of so-called capacitive coagulation tests, *i.e.* thrombin generation and thromboelastography, which give information not only of the lag time to coagulation, but also of the maximal capacity of plasma to generate thrombin and elastic fibrin clots, respectively. In the present thesis, it is aimed to unravel the biochemical mechanism of dilutional coagulopathy by capacity measurements of thrombin generation and fibrin clot formation.

In **chapter 1**, the clinical situation of dilutional coagulopathy is explained, and the conditions are described that can worsen this deficiency. Normal hemostasis upon vascular damage is the result of a complex interplay of mechanisms, where platelets become activated, form an aggregate and expose phosphatidylserine at their surface, which greatly facilitates the binding and activation of coagulation factors. Thrombin is generated and mediates the conversion of fibrinogen into fibrin, which together with red cells and platelets form a massive fibrin clot that stops a bleeding. In dilutional coagulopathy, the loss and consumption of platelets and coagulation factors and the routine fluid transfusion can lead to a vicious circle, in which coagulation becomes even more impaired, and a life-threatening situation can occur. The current treatment regime tends to increase the overall dilution.

In **chapter 2**, an overview is provided of current transfusion protocols for massive blood loss. There is international consensus on consecutive transfusion of fluids (crystalloids and colloids), red cell concentrates, fresh frozen plasma (FFP), and platelet concentrates. The transfusions are routinely guided by the outcome of routine coagulation tests and blood cell counts. It is argued that measurement of the processes of thrombin generation and fibrin clot formation will give better

biochemical information on the coagulant activity in plasma from patients with dilutional coagulopathy and, likely, of the bleeding risk of the patients. Also the outcome of new transfusion protocols may better be monitored by using these two capacitive coagulation assays. However, both methods have hardly been used in this clinical setting. In the following chapters, research is described to do so.

Chapter 3 describes a study to determine the optimal conditions for measurement of thrombin generation and fibrin clot formation in plasmas from patients with dilutional coagulopathy. The most representative parameter for thrombin generation was the thrombin peak height, and for fibrin clot formation the maximal amplitude of rotational thromboelastography. Activation of plasma with a high concentration of tissue factor was required to establish the maximal capacity of plasma of thrombin generation and fibrin clot formation. This capacity was measured in the presence of platelets or phospholipids as procoagulant lipid surface. It appeared that the addition of platelets could compensate for the effect of dilution up to 60% plasma, without impairment of thrombin generation and fibrin clot formation. Dilution of plasma with colloids led to a reduced elasticity of fibrin clots, but not to altered thrombin generation. Additional investigations were performed to determine whether *in vitro* supplementation of factors to diluted plasma could restore the coagulation process. Combining diluted plasma with FFP resulted in an increased thrombin generation and fibrin clot formation. Supplementation of factor XIII or fibrinogen concentrate to diluted plasma led to a recovery of fibrin clot formation, but not of thrombin generation. Taken together, these results show that the two capacitive measurements report on activity of different parts of the coagulation process, and that platelets are essential to keep the clotting ability of diluted plasma at a certain minimal level.

Transfusion of FFP is a common intervention to treat dilutional coagulopathy. The effect of this transfusion on the coagulant activity of patient plasmas was studied in **chapter 4**. Blood samples were obtained during or after major general surgery from patients, who experienced massive bleeding due to prior dilution. After FFP transfusion, bleeding stopped in the majority of the patients, whereas it continued in about one third of the patients. After the intervention, thrombin generation in plasma on average increased, however without fully recovering to the level measured in undiluted normal pool plasma. Coagulation variables were then compared of patients with stopped bleeding and of patients with persistent bleeding. Interestingly, after FFP transfusion, plasma from patients with persistent bleeding showed significantly lower thrombin generation and fibrinogen levels than plasma from patients in whom bleeding stopped. On the other hand, routine coagulation times were not different between the two patient groups. These results pointed to a

possible relation between the stop of bleeding and the values of thrombin generation and fibrinogen in plasma.

In **chapter 5**, further research was performed to identify the coagulation problems during peri-operative dilution. In plasma from patients, who had taken a vitamin K antagonist, thrombin generation was markedly reduced, while fibrin clot formation was only delayed but not reduced. Hence, both assays provide information on the activity of different parts of the coagulation process. In order to discriminate between different degrees of dilutional coagulopathy, threshold levels of normal thrombin generation and fibrin clot formation were set, below which these two processes were considered to be impaired. Using these threshold values, both thrombin generation and fibrin clot formation appeared to be in the normal range for most plasmas from patients, who were subjected to moderate dilution during a cardiopulmonary surgery procedure. However, both processes were markedly impaired in plasmas from patients, who had undergone major general surgery and had experienced massive blood loss. This difference in hemostatic activity between the groups of patients with moderate and severe dilution was not detected with routine coagulation tests. The results further indicate that the determination of both thrombin generation and fibrin clot formation is of additional value in predicting the extent of peri-operative dilutional coagulopathy. Likely, measurement of both processes will better predict the risk of bleeding than the routine coagulation tests.

Platelets are essential in the formation of a thrombus following vascular damage. They are known to interact directly with fibrin via integrin αIIbβ3, but in addition platelets can adhere via glycoprotein (GP)Ib-V-IX to von Willebrand factor (VWF) that is bound to fibrin. In **chapter 6** a novel mechanism is described that platelets, conversely, are also involved in the formation of fibrin fibers under conditions of low-shear flow. Using high-resolution microscopic technologies, it was established that individual platelets develop a star-like network of fibrin fibers on their surface, when they are exposed to flowing plasma under conditions of thrombin generation. This fibrin formation was preceded by a rise in intracellular Ca^{2+}-concentration, exposure of phosphatidylserine, and formation of thrombin. Blockage of the interaction of GPIb-V-IX with VWF prevented this star-like fibrin formation, whereas inhibition of integrin αIIbβ3 was hardly effective. In addition, minor or no fibrin formation was seen in plasmas from patients with von Willebrand disease. Similarly, platelets from mice deficient in VWF or GPIbα failed to form fibrin fibers, such in contrast to matched wildtype platelets. Together, these results point to a new function of GPIb-V-IX interaction with VWF, namely to trigger the formation of fibrin fibers.

In **chapter 7** the principal findings of this thesis are discussed in the light of recent literature. A central place has the discussion on new interaction mechanisms between

platelets, thrombin and fibrin. In addition, it is concluded that thrombin generation and fibrin clot formation in the presence of platelets are important to stop persistent bleeding in case of peri-operative dilutional coagulopathy. With the new capacitive coagulation tests and the available factor concentrates, it is foreseen that improved transfusion protocols can be developed, aimed to interfere in those places of the coagulation system where the deficiency is most eminent. The results described in this thesis will hopefully contribute to this development in transfusion medicine.

Samenvatting

Trombinegeneratie en fibrinevorming bij verdunningscoagulopathie

Tijdens grote chirurgische ingrepen of na een ernstig trauma kunnen patiënten veel bloed verliezen. Dit bloedverlies wordt gecompenseerd door het geven van infusievloeistoffen en bloedproducten. Een nadelig gevolg van dergelijke transfusies is dat daarbij verdunning optreedt van het bloedplasma en de bloedcellen. Voor een optimale hemostase zijn minimale concentraties van bloedplaatjes en stollingsfactoren in het bloed nodig om via plaatjesactivering en trombinevorming een fibrinestolsel te maken, waarmee een bloeding gestopt kan worden. Door infusie van vloeistoffen en bloedproducten kan het vermogen van een patiënt om voldoende fibrinestolsels te maken in gevaar komen, waardoor het risico op bloedingen toeneemt en bestaande bloedingen niet gestopt kunnen worden. De ontstane klinische situatie, ook wel een verdunningscoagulopathie genoemd, is moeilijk te behandelen. In de klinische praktijk worden stollingsstoornissen geëvalueerd met behulp van routine stollingstesten, waaronder de geactiveerde partiële tromboplastinetijd, de protrombinetijd en de hiervan afgeleide internationaal genormaliseerde ratio. Het is echter gebleken dat deze stollingstijden niet nauwkeurig genoeg zijn om de stollingsstatus van patiënten die verdund zijn goed te meten. In de laatste jaren is er een toename in het gebruik van zogenaamde capacitieve stollingstesten, zoals de trombinegeneratiemeting en de trombo-elastografie, die een indruk geven van het totaal vermogen van het plasma om trombine te maken en een elastisch fibrinestolsel te vormen. Door zowel trombinegeneratie als fibrinestolselvorming te meten is getracht in dit proefschrift het mechanisme te ontrafelen dat ten grondslag ligt aan de verminderde werking van het stollingssysteem tijdens verdunning. Door een beter begrip van stollingsstoornissen als gevolg van verdunning, kan hopelijk in de toekomst een meer gerichte therapie gegeven worden, waardoor de bestaande tranfusieprotocollen voor massaal bloedverlies kunnen worden verbeterd.

Het inleidende **hoofdstuk 1** beschrijft het ontstaan van peri-operatieve stollingsstoornissen als gevolg van bloedverdunning en de factoren die deze situatie kunnen verergeren. Adequate hemostase na beschadiging van een vaatwand bestaat uit vele interactie-mechanismen waarbij plaatjes na adhesie aan vaatwand-componenten geactiveerd worden, waarbij ze aggregeren en het fosfolipide fosfatidylserine (PS) op hun celoppervlak exposeren. Dit stelt stollingsfactoren in staat om een complex te vormen, waardoor de stollingscascade op gang komt. Door de vorming van trombine wordt fibrinogeen omgezet in fibrine, dat dan samen met plaatjes en rode bloedcellen een fibrinestolsel vormt, waardoor een bloeding gestopt wordt. Door een samenspel van verbruik en verlies van plaatjes en stollingsfactoren en door het massaal toedienen van transfusieproducten kan bij bloedverdunning een

vicieuze cirkel ontstaan, waarin bestaande stollingsstoornissen kunnen verergeren. De huidige behandelingsopties om het bloedvolume te handhaven en bloedverlies te laten stoppen, hebben tot gevolg dat alleen bepaalde bloedcomponenten worden aangevuld in nog steeds verdunde vorm, met als gevolg dat de verdunning als zodanig slechts ten dele ongedaan wordt gemaakt.

Een overzicht van de meest gebruikte transfusieprotocollen bij massaal bloedverlies is gegeven in **hoofdstuk 2**. Het blijkt dat er een algemene consensus bestaat voor de wijze van transfusie van rode bloedcellen, plaatjes en vers ingevroren plasma (FFP). Deze is gebaseerd op het uitvoeren van routine stollingstesten en bloedceltellingen. In dit hoofdstuk wordt betoogd dat door een biochemische analyse van de stollingsstatus van patiënten met stollingsstoornissen als gevolg van verdunning, een goede inschatting gemaakt kan worden van een eventueel verhoogd risico op massaal bloedverlies. In het bijzonder kunnen metingen van de trombinegeneratie en de fibrinevorming bijdragen tot zo'n biochemische analyse. Waarschijnlijk dienen allebei de processen gemeten te worden, omdat ze gereguleerd worden door ten dele verschillende pro- en antistollingsfactoren. Door het tegelijk uitvoeren van deze capaciteitstesten kunnen nieuwe transfusie-protocollen beter geëvalueerd worden. Echter deze meetmethoden waren nog niet voldoende gevalideerd om een goede klinische toepasbaarheid te garanderen. In de volgende hoofdstukken is een start gemaakt met deze validatie.

Voor het evalueren van de stollingsstatus bij patiënten met verdunnings-coagulopathie was het noodzakelijk om de optimale condities te bepalen, waaronder de trombinegeneratie en fibrinevorming in plasma gemeten kunnen worden. Het onderzoek hiernaar staat beschreven in **hoofdstuk 3**. De meest representatieve parameter voor trombinegeneratiemeting bleek de piekhoogte te zijn, en voor de fibrinevorming de maximale rotatie-amplitude van de trombo-elastografie. Activeren van plasma met een hoge concentratie weefselfactor was nodig om een waarde te krijgen van het maximaal stollend vermogen. Dit maximaal stollend vermogen werd gemeten in plasma dat ofwel plaatjes ofwel fosfolipiden bevatte. Gebleken is dat de aanwezigheid van plaatjes een plasmaverdunning tot 60% kon compenseren, zonder dat er een effect op de trombinegeneratie of fibrinevorming detecteerbaar was. Plasmaverdunning met colloïden resulteerde in een minder elastisch fibrinestolsel, zonder dat de trombinegeneratie verminderd werd. In dit hoofdstuk is verder beschreven hoe factorconcentraten een verminderde stolling als gevolg van verdunning kunnen herstellen. Het mengen van FFP met (patiënten)plasma leidde tot een stijging van zowel de trombinegeneratie als de fibrinevorming. Toevoeging van factor XIII of fibrinogeen aan verdund plasma resulteerde in herstel van de fibrinevorming, maar had geen invloed op de trombinegeneratie. Samengevat laten

deze resultaten zien dat beide capacitatieve testen gevoelig zijn voor een verschillende deel van het stollingsproces, en dat plaatjes van essentieel belang zijn om bij coagulopathie het stollend vermogen van het plasma voldoende hoog te houden.

Bij de behandeling van peri-operatieve verdunningscoagulopathie worden regelmatig transfusies met FFP gegeven. Het effect hiervan op het stollend vermogen bij dergelijke patiënten is bestudeerd in **hoofdstuk 4**. Hierbij is gebruik gemaakt van de geoptimaliseerde testcondities van het voorgaande hoofdstuk. Metingen werden uitgevoerd met plasmamonsters verzameld van een aantal patiënten, die tijdens of vlak na een grote chirurgische ingreep stollingsstoornissen ontwikkelden en daardoor massaal bloedverlies vertoonden. Na transfusie met FFP bleek, als verwacht, een groot deel van de patiënten gestopt te zijn met bloeden. Echter meer dan één derde van de patiënten toonde persisterend bloedverlies. Na de transfusie was er een gemiddelde stijging van de trombinegeneratie voor de hele groep patiënten, alhoewel deze meting altijd onder de normaalwaarde in onverdund plasma bleef. Vervolgens is er een vergelijkende analyse uitgevoerd van de stollingstijden in de plasmas, de factorconcentraties en de trombinegeneratie-metingen. Hieruit kwam naar voren dat de patiënten met persisterend bloedverlies na transfusie een trombinegeneratie en een plasma fibrinogeenspiegel hadden, die duidelijk lager waren dan de waarden van patiënten bij wie de bloedingen gestopt waren, terwijl de stollingstijden in beide groepen niet verschillend waren. Samengevat geven deze resultaten aan dat voldoende trombinegeneratie en voldoende fibrinogeen samen kunnen bijdragen tot het stoppen van persisterend bloedverlies bij coagulopathie.

In **hoofdstuk 5** is vervolgonderzoek verricht naar stollingsstoornissen die optreden na verdunning tijdens grote chirurgische ingrepen. In het plasma van patiënten die een vitamine-K antagonist gebruikten, was de trombinegeneratie sterk verlaagd, terwijl de fibrinevorming alleen verlengd was maar niet verminderd. Hieruit blijkt dat beide testen informatie geven over een verschilllend deel van het stollingssysteem. Om de mate van stollingsstoornis door verdunning te kunnen bepalen zijn drempelwaarden opgesteld, waaronder de trombinegeneratie en fibrinevorming als afwijkend worden beschouwd. In het merendeel van de plasmamonsters van patiënten die matig waren verdund tijdens een cardiopulmonale chirurgische ingreep, bleek zowel de trombinegeneratie als de fibrinevorming boven deze drempelwaarden te zitten. In het overgrote deel van de plasmamonsters afkomstig van sterk verdunde patiënten met peri-operatief bloedverlies waren beide processen afwijkend. Zo'n onderscheid kon niet worden aangetoond met de routine stollingstesten. De resultaten tonen verder aan dat het uitvoeren van beide testen

een meerwaarde heeft bij de voorspelling van de mate van verdunningscoagulopathie en uiteindelijk optredende bloeding.

Het is bekend dat plaatjes een rol spelen bij de trombusvorming als gevolg van vaatwandschade. Plaatjes kunnen rechtstreeks aan fibrine hechten via integrine αIIbβ3, maar ook aan fibrine-gebonden von Willebrand factor (VWF) middels glycoproteïne (GP)Ib-V-IX. Een nieuw mechanisme hoe plaatjes betrokken zijn bij de vorming van fibrine onder stromingscondities is beschreven in **hoofdstuk 6**. Door gebruik te maken van hoge resolutie microscopie is aangetoond dat individuele plaatjes op hun oppervlak een stervormige groei van fibrinevezels laten ontstaan, wanneer zij blootgesteld werden aan stromend plasma onder condities van trombinegeneratie. Deze fibrinevorming werd voorafgegaan door een stijging van de intracellulaire Ca^{2+}-concentratie, expositie van PS, en vorming van trombine op het plaatjesoppervlak. Door het remmen van de interactie van GPIb-V-IX met VWF stopte de stervormige fibrinevorming, terwijl blokkade van integrine αIIbβ3 nauwelijks effect had. Verder vond nauwelijks fibrinevorming plaats met VWF-arm plasma afkomstig van patiënten met von Willebrand ziekte. Ook bij muizen die deficiënt waren in VWF of GPIbα bleken de plaatjes geen fibrine meer te vormen. Deze resultaten wijzen op een nieuwe functie van GPIb-V-IX in interactie met VWF, namelijk bij de vorming van fibrinevezels.

De algemene discussie, die in **hoofdstuk 7** is gegeven, beschouwt de resultaten van dit proefschrift aan de hand van recente literatuur. Centraal hierbij staat bespreking van nieuw gevonden interactiemechanismen tussen plaatjes, trombine en fibrine. Verder is geconcludeerd dat trombinegeneratie en fibrinevorming in aanwezigheid van plaatjes van belang zijn om in het geval van peri-operatieve stollingsstoornissen, persisterend bloedverlies te laten stoppen. Aan de hand van de ontwikkelde testen, kunnen samen met de sinds kort in opkomst zijnde factorconcentraten, vernieuwde transfusieprotocollen opgesteld worden, die daar ingrijpen in het stollingssysteem waar zich de deficiëntie bevindt. De in dit proefschrift beschreven resultaten helpen mogelijkerwijs om verbetering in de transfusiegeneeskunde tot stand te brengen.