

Innovative applications of global assays of hemostasis

Citation for published version (APA):

Hulshof, A.-M. (2023). *Innovative applications of global assays of hemostasis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20231215ah>

Document status and date:

Published: 01/01/2023

DOI:

[10.26481/dis.20231215ah](https://doi.org/10.26481/dis.20231215ah)

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.

Addendum

Summary

Clinicians face several clinical challenges in the laboratory monitoring of complex hemostatic pathologies using traditional assays of hemostasis. Global assays of hemostasis provide a multi-dimensional assessment of a patient's hemostatic status that may better represent the *in vivo* condition compared to traditional assays. This thesis explores innovative applications of global assays of hemostasis, specifically rotational thromboelastometry (ROTEM) and thrombin generation assays, in two high-risk patient cohorts, where traditional assays of hemostasis appear lacking.

Chapter 1 provides an overview of clinical and laboratory perspectives on hemostasis, and reviews current challenges in routine laboratory monitoring. It introduces the global assays of interest and the cohort studies that provided the data for the studies included in this thesis.

Part one of this thesis (**chapters 2 to 7**) comprehensively evaluates the hemostatic abnormalities and potential of global assays of hemostasis in mechanically ventilated COVID-19 patients admitted to the intensive care unit (ICU).

Chapter 2 reviews thrombin-fibrin(ogen) interactions in hemostasis and host defense. Thrombin generation experiments were fundamental to advocate the role of fibrin as a thrombin protector, rather than an inhibitor. Furthermore, the context-dependent role of fibrinogen at the interplay of coagulation and inflammation is appraised. The deposition of fibrin matrices elicits a procoagulant response both directly by incorporating thrombin into the clot, but also indirectly through the immune system. These fibrinogen-immune interactions were considered highly relevant in the COVID-19 pandemic as hospitalized patients presented with profound elevations in fibrinogen levels.

In **chapter 3**, the tissue plasminogen activator (tPA) ROTEM and adapted thrombin generation assays were validated for hospitalized COVID-19 patients. Calibrated automated thrombinography assays were optimized to assess plasma thrombin generation in the presence of heparins. The tPA ROTEM assay was sensitive to the expected relevant coagulant changes in response to *ex vivo* addition of heparins and fibrinogen. No clear fibrinolytic effect was observed in this assay following the different conditions. Taken together, the tPA ROTEM assay and adapted thrombin generation assays were considered suitable to monitor hemostasis, fibrinolysis, and the heparin anticoagulant effect in COVID-19 patients.

Chapter 4 studies COVID-19 associated coagulopathy over time as illustrated by EXTEM, FIBTEM and tPA ROTEM measurements in a cohort of mechanically ventilated COVID-19 patients. Persisting hypercoagulability was observed throughout ICU admission, illustrated by the increase in ROTEM clot firmness. Furthermore, patients repeatedly presented with prolonged or even unmeasurable tPA ROTEM fibrinolysis parameters, advocating pertinent hypofibrinolysis. Last, clotting times (CTs) above the upper limit of normal were observed in the majority of patients. Together these results demonstrate the ability of viscoelastic assays to characterize coagulopathy in critical COVID-19.

These results were confirmed and expanded in **chapter 5**, where trajectories of these biomarkers over time provided several insights in the progression of COVID-19 in survivors and non-survivors. Prolonged clot initiation and further deterioration of fibrinolysis and clot stiffness over time were associated with mortality. Furthermore, prolonged CT values at intubation were recognized as an early marker for 45-day mortality in the cohort of mechanically ventilated COVID-19 patients. Together, these findings expand the evidence supporting implementation of viscoelastic measurements in routine monitoring of COVID-19 ICU patients. Exploration of underlying determinants and incorporation of serial data in survival analyses are required to further establish the clinical relevance of viscoelastic assays in this setting.

Chapter 6 demonstrates the recovery of hypercoagulability and hypofibrinolysis as measured by tPA ROTEM in COVID-19 survivors six months after ICU discharge. Other traditional assays of hemostasis, specifically fibrinogen and D-dimer, do suggest persisting involvement of hemostasis in some patients. No differences in hemostasis parameters were detected at follow-up between patients with and without venous thromboembolism during hospitalization.

In **chapter 7** the ROTEM INTEM/HEPTEM CT ratio, aPTT and anti-Xa were compared in a subcohort of COVID-19 ICU patients receiving unfractionated heparin (UFH) or therapeutic low molecular heparin (LMWH) to evaluate the potential of ROTEM to detect and monitor heparins. The CT ratio demonstrated good discriminating ability for the detection of UFH. Additionally, for every increase in anti-Xa, the INTEM/HEPTEM CT value rises more in patients on UFH, illustrating ROTEM's sensitivity to the anticoagulant effect of heparin on factor IIa in addition to Xa. Taken together, the ROTEM CT ratio may more accurately reflect the *in vivo* anticoagulant status, though the heparin therapeutic range and associations with clinical outcomes are currently lacking.

Part two of this thesis (**chapters 8 and 9**) focuses on platelet function tests and ROTEM in high clinical-risk patients receiving antithrombotic treatment following percutaneous coronary intervention (PCI).

Chapter 8 proposes two adaptations to improve agreement between the platelet function tests Multiplate and VerifyNow. Both the addition of prostaglandin E1 to the Multiplate ADP assay, and the calculation of the inhibitor percentage, did not improve the correlation between the Multiplate ADP and VerifyNow P2Y12 assay in patients receiving dual antiplatelet therapy.

Chapter 9 explores the potential of routine and tPA ROTEM assays for long-term risk-assessment in a cohort of high clinical-risk post-PCI coronary artery disease patients with several combinations of dual antithrombotic therapy. All patients, independent of antithrombotic treatment strategy, demonstrated elevated clot firmness one month following PCI compared to a group of perioperative (non-PCI) controls not using antithrombotic medication. Patients receiving dual antiplatelet therapy (DAPT) presented additionally with a decreased fibrinolytic potential. Though both findings suggest a procoagulant phenotype, ROTEM parameters in the DAPT patient group were not associated with major adverse cardiovascular events during the five-month follow-up. EXTEM CT was prolonged in patients with clinically significant bleeding over the follow-up, but demonstrated low diagnostic accuracy. In addition, the ability of ROTEM parameters to identify patients treated with anticoagulants (direct oral anticoagulants and vitamin K antagonists) was addressed and both FIBTEM and EXTEM CT demonstrated excellent discriminating capacity. This observation in combination with the whole-blood and point-of-care characteristics of viscoelastic assays, highlight their potential for the detection of anticoagulants in acute settings.

Concluding, **chapter 10** contains a general discussion of the work presented in this thesis, the clinical implications and addresses directions for future research. This thesis reviews applications of global assays of hemostasis to improve hemostasis care in mechanically ventilated COVID-19 and high-risk post-PCI patients.

Nederlandse samenvatting

In de klinische praktijk bestaan er verschillende uitdagingen bij het monitoren van patiënten met complexe hemostase problematiek middels traditionele laboratoriumtesten. Deze traditionele testen geven veelal slechts één onderdeel van de hemostase (bloedplaatjes of plasma coagulatiefactoren) weer, waardoor een (groot) aantal laboratoriumtesten ingezet dient te worden om een globaal overzicht van de hemostase in een patiënt te verkrijgen. Globale hemostase laboratoriumtesten geven een completer overzicht van de hemostase, die mogelijk meer overeenkomt met de *in vivo* situatie van een patiënt. Onder globale hemostasetesten vallen rotational thromboelastometry (ROTEM) en trombinegeneratie. In dit proefschrift worden innovatieve toepassingen van deze globale hemostase testen geëvalueerd in twee verschillende populaties, waar traditionele testen onvoldoende geschikt zijn om patiënten adequaat te monitoren.

Hoofdstuk 1 beschrijft de relevante theoretische achtergrond binnen de hemostase voor het huidige proefschrift en de uitdagingen in de klinische praktijk bij het monitoren van patiënten middels traditionele hemostase testen. Daarnaast worden de globale hemostase testen ROTEM en trombinegeneratie geïntroduceerd.

ROTEM is een visco-elastische laboratoriumtest die de dynamische ontwikkeling van een stolsel weergeeft in volbloed door het meten van de toenemende weerstand op een oscillerende pin. Deze ontwikkeling wordt weergegeven in een temogram, waaruit verschillende parameters afgeleid kunnen worden die de stolselvorming illustreren. Er zijn verschillende ROTEM testen beschikbaar om de extrinsieke stolselvorming (EXTEM, FIBTEM), intrinsieke stolselvorming (INTEM, HEPTM) en stolselafbraak (tPA) weer te geven. In de klinische praktijk worden visco-elastische hemostase testen ingezet binnen transfusiemanagement bij cardio thoracale chirurgie, trauma en post-partum bloedingen.

Trombine wordt beschouwd als het centrale enzym in de stollingscascade en vervult, naast de omzetting van fibrinogeen naar fibrine, verschillende stollingsbevorderende en antistollende functies. De trombingeneratietest evalueert de hoeveelheid trombine die wordt gevormd over de tijd na activatie van de stollingscascade in het plasma van een patiënt. In het huidige proefschrift wordt gebruik gemaakt van de calibrated automated thrombogram (CAT) om de trombine generatie te beoordelen. De trombine activiteit wordt gemeten middels trombine-gemedieerde splijting van een meetbaar fluorogeen substraat. Dit wordt weergegeven in een trombogram, waaruit wederom verschillende parameters kunnen worden afgeleid. Ondanks de grote beschikbaarheid van onderzoeken in de medische literatuur, heeft de trombine generatie test heden nog geen toepassingen in de klinische praktijk.

In het eerste deel van dit proefschrift (**hoofdstukken 2 tot en met 7**) wordt de toepassing van globale hemostasetesten in mechanisch geventileerde patiënten met COVID-19 op de intensive care (IC) geëvalueerd. Binnen de populatie COVID-19 patiënten op de IC, werd een hoge incidentie trombotische complicaties (met name longembolieën) geobserveerd ondanks standaard profylactische antistolling op de IC.^{1,2} Het werd al snel duidelijk dat de afwijkende hemostase een belangrijke rol speelt binnen de morbiditeit en mortaliteit van COVID-19 patiënten.³ Zodoende kwamen uit de kliniek verschillende vraagstellingen naar voren over de mogelijkheden om deze complexe hemostase afwijkingen te monitoren, en de meest geschikte therapeutische interventies om verdere progressie en trombotische complicaties te voorkomen.

Hoofdstuk 2 beschrijft de interactie tussen trombine, fibrinogeen en het immuunsysteem. Trombinegeneratie experimenten speelden een fundamentele rol bij het beoordelen van de interactie tussen deze verschillende componenten, met name de functie van fibrine als trombine beschermer. Hiernaast wordt ook de context-afhankelijke rol van fibrinogeen in de wisselwerking tussen hemostase en het immuunsysteem geëvalueerd. Zo leidt de depositie van fibrine matrices tot een stollingsbevorderend effect, middels het directe trombine beschermende effect van fibrine en indirect via de activatie van immuun cellen. Aan de andere kant suggereren experimenten dat oplosbaar fibrinogeen het immuunsysteem juist onderdrukt door het rekruteren van leukocyten te verminderen. Samengevat zijn de fibrinogeen-immuun interacties context-afhankelijk, waarbij verschillende fibrinogeenvormen *in vitro* een paradoxaal effect hebben op het immuunsysteem. Deze bevindingen zijn mogelijk zeer relevant voor het ontrafelen van hemostase-immuunsysteem interacties in COVID-19 patiënten op de IC, die zich presenteren met onder andere zeer hoge fibrinogeen concentraties.

In **hoofdstuk 3** worden de tPA ROTEM en aangepaste trombine generatie testen gevalideerd voor ziekenhuispatiënten met COVID-19. Om geschikte trombine generatie curves te krijgen in de aanwezigheid van heparines (zowel laagmoleculairgewicht heparine; LMWH, als ongefractioneerde heparine; UFH) werd in eerste instantie de concentratie stollingsactivator geoptimaliseerd. Vervolgens werd het effect van heparine en hoge concentraties fibrinogeen op beide globale hemostasetesten onderzocht in het bloed van gezonde vrijwilligers. De aangepaste trombinegeneratie testen toonden een gewenste heparine afhankelijke verlaging van het trombine potentiaal. In de tPA ROTEM test resulteerde de toevoeging van fibrinogeen en heparine tot de verwachte toename in stolselsterkte en bloedstollingstijd (clotting time; CT), respectievelijk. Er werd geen duidelijk effect van de verschillende experimentele condities op de fibrinolyse parameters geobserveerd. Samengenomen suggereren deze resultaten dat de

aangepaste trombinegeneratie en tPA ROTEM testen geschikt zijn om de hemostase, fibrinolyse en het effect van heparine in patiënten met COVID-19 te evalueren.

Om de toepassing van globale hemostasetesten te onderzoeken in COVID-19 patiënten, werden patiënten uit het Maastricht intensive care COVID-19 (MaastrICht) cohort geëvalueerd. In dit cohort werden alle patiënten met bevestigde COVID-19 die geïntubeerd waren op de IC in het Maastricht Universitair Medisch Centrum+ (MUMC+) geïnccludeerd. Bij deze patiënten werd een grote hoeveelheid informatie verzameld gedurende IC opname, waaronder wekelijkse globale hemostasetesten. In dit proefschrift wordt specifiek de toepassing van routine en tPA ROTEM testen in mechanisch geventileerde patiënten met COVID-19 bediscussieerd.

Hoofdstuk 4 beschrijft de hemostase afwijkingen zoals gemeten in de EXTEM, FIBTEM en tPA ROTEM testen in COVID-19 patiënten op de IC tot zes weken na intubatie. Patiënten demonstreerden persisterende hypercoagulabiliteit gedurende IC opname, zoals geïllustreerd door de verhoogde maximale stolselsterkte (maximum clot firmness; MCF). Hiernaast waren de parameters die de stolselafbraak weergeven, de lysis onset time (LOT) en lysis time (LT), verlengd en in veel gevallen zelfs onmeetbaar. Dit duidt op een forse hypofibrinolyse gedurende minimaal de eerste zes weken vanaf intubatie. Tot slot, verlenging van de bloedstollingstijd (CT) ten opzichte van de lokale referentiewaarden werd in het merendeel van patiënten geobserveerd. De achterliggende etiologie van de bloedstollingstijd verlenging is tot dusver onbekend. Samengenomen bevestigen deze resultaten de potentie van visco-elastische laboratoriumtesten, specifiek ROTEM, om de stollingsafwijkingen bij COVID-19 patiënten op de IC te karakteriseren.

De bevindingen uit hoofdstuk 4 werden verder uitgebreid in **hoofdstuk 5**, waar het traject over tijd van deze parameters tussen COVID-19 patiënten die overleven of die komen te overlijden op de IC is gepresenteerd. Patiënten die kwamen te overlijden op de IC toonden verdere verslechtering van hypercoagulabiliteit en hypofibrinolyse over de tijd ten opzichte van patiënten die werden ontslagen van de IC. Daarnaast hadden overleden patiënten over de tijd gemiddeld langere bloedstollingstijden. Een verlenging van deze bloedstollingstijd bij intubatie was daarnaast geassocieerd met een verhoogd risico op 45-dagen mortaliteit op de IC. Deze resultaten ondersteunen de toepassing van visco-elastische laboratoriumtesten in mechanisch geventileerde COVID-19 patiënten. Verdere exploratie van onderliggende determinanten en het incorporeren van seriële data in de overlevingsanalyses zijn noodzakelijk om de verdere klinische relevantie van visco-elastische testen in deze setting te bevestigen.

Hoofdstuk 6 demonstreert het herstel van de hemostase afwijkingen zes maanden na IC ontslag, zoals gemeten met de tPA ROTEM. Bij ontslag van de IC werden nog fors afwijkende tPA ROTEM parameters geobserveerd in COVID-19 patiënten, maar zowel de stolselsterkte (MCF) als fibrinolyse parameters (LOT en LT) waren zes maanden later genormaliseerd. Andere traditionele hemostasetesten, specifiek fibrinogeen en D-dimeer metingen, bleven nog wel verhoogd ten opzichte van de refrentiewaarden in enkele patiënten. Traditionele en visco-elastische hemostase parameters bij de follow-up toonden geen verschil tussen patiënten die gedurende de ziekenhuisopname wel of niet met een veneuze trombo-embolie (VTE) werden gediagnosticeerd. De mogelijke rol van hemostase in de lange termijn morbiditeit van patiënten met COVID-19 op de IC dient verder geëxploreerd te worden.

In **hoofdstuk 7** wordt de potentiële toepassing van ROTEM om heparine te detecteren en monitoren geëvalueerd. De ROTEM INTEM/HEPTEM CT ratio, geactiveerde partiële tromboplastine tijd (aPTT) en anti-Xa laboratoriumtest werden vergeleken in een subcohort COVID-19 IC patiënten. De INTEM/HEPTEM CT ratio illustreert het verschil tussen de initiatie van de hemostase in de aan- en afwezigheid van een heparine neutraliserende component (heparinase). In hoofdstuk 7 werd de eerst beschikbare ROTEM INTEM/HEPTEM CT ratio na het starten van UFH of een therapeutische dosering LMWH geanalyseerd. Deze ratio demonstreerde een goed discriminerend vermogen om de aanwezigheid van UFH te detecteren. Verder werd geobserveerd dat de INTEM/HEPTEM CT ratio meer toeneemt per eenheid anti-Xa stijging in patiënten die werden behandeld met UFH ten opzichte van therapeutisch LMWH. Dit illustreert de gevoeligheid van de ROTEM laboratoriumtest voor het effect van UFH op stollingsfactor IIa naast Xa. Mogelijk biedt de volbloed ROTEM CT-ratio een accurater beeld van het *in vivo* heparine effect ten opzichte van de traditionele plasma-gebaseerde laboratoriumtesten. Echter, op dit moment ontbreken de heparine therapeutische range en associatie met klinische uitkomstmaten voor de INTEM/HEPTEM CT ratio, wat de klinische implementatie beperkt.

Het tweede deel van dit proefschrift (**hoofdstuk 8 en 9**) focust op het gebruik van bloedplaatjesfunctietesten en ROTEM in hoog-risico patiënten, die worden behandeld met antistolling na percutane coronaire interventie (PCI, dotterprocedure). Hoog-risico patiënten zijn gedefinieerd als patiënten met meerdere risicofactoren voor trombotische en/of bleedingscomplicaties na PCI. Patiënten met coronairlijden die recent een PCI hebben gehad, worden traditioneel behandeld met aspirine in combinatie met een P2Y₁₂-remmer. Dit wordt ook wel duale antiplaatjestherapie (DAPT) genoemd. Patiënten met specifieke comorbiditeiten (o.a. atriumfibrilleren) ontvangen anticoagulantia (vitamine K antagonist; VKA of direct oraal anticoagulans; DOAC) in

combinatie met antiplaatjesmedicatie. Bij het voorschrijven van antitrombotische therapie ontstaat een delicate balans tussen het voorkomen van een (recidief) trombotische complicatie en bloedingen. Binnen dit cohort werd onder andere de rol van verschillende laboratoriumtesten onderzocht om lange termijn complicaties te voorspellen.

Eerder werd in een deel van dit cohort een matige overeenstemming tussen de therapeutische referentiewaarden van verschillende bloedplaatjesfunctietesten aangetoond.⁴ In **hoofdstuk 8** worden derhalve twee voorstellen besproken om de overeenstemming tussen de plaatjesfunctietesten Multiplate en VerifyNow te verbeteren. Prostaglandine E1 is standaard aanwezig in de VerifyNow P2Y12, maar niet in de Multiplate ADP test. Om het effect van dit reagens op de overeenstemming tussen de testen te evalueren, werd de Multiplate ADP met en zonder prostaglandine E1 vergeleken met de VerifyNow P2Y12 test. Ten tweede werd een inhibitie percentage berekend door de gemeten plaatjesfunctie te delen door de 'basis plaatjesfunctie' van de corresponderende laboratoriumtest. Beide voorstellen leidden niet tot een verbetering van de correlatie tussen de Multiplate ADP en VerifyNow P2Y12 testen in een subcohort post-PCI patiënten die werden behandeld middels DAPT. Het lijkt derhalve onwaarschijnlijk dat prostaglandine E1 of een verschil in 'basis plaatjesfunctie' ten grondslag liggen aan het gebrek aan overeenstemming tussen de besproken bloedplaatjesfunctietesten.

Hoofdstuk 9 exploreert de toepassing van routine en tPA ROTEM in het cohort post-PCI patiënten die worden behandeld met verschillende combinaties duale antitrombotische medicatie: DAPT, P2Y12-remmer met een VKA, of P2Y12-remmer met een DOAC. Alle patiëntengroepen, onafhankelijk van de antitrombotische behandeling, presenteerden met een toegenomen stolselsterkte één maand post-PCI ten opzichte van de controlegroep, bestaande uit perioperatieve patiënten zonder antitrombotische medicatie. Daarnaast werd een verminderde fibrinolyse geobserveerd in de DAPT patiëntengroep, maar niet in studiegroepen met een VKA of DOAC. Ondanks dat deze laboratoriumbevindingen een toegenomen stollingsneiging suggereren, werden geen verschillen geobserveerd tussen DAPT patiënten met en zonder cardiovasculaire complicaties. De EXTEM CT meting één maand na de PCI behandeling was wel verlengd in DAPT patiënten met klinisch relevante bloeding complicaties, maar toonde desalniettemin een lage diagnostische nauwkeurigheid. Tot slot werd de potentie van ROTEM parameters om anticoagulantia (VKA en DOAC) te detecteren onderzocht, en zowel de FIBTEM en EXTEM CT toonden een zeer goede nauwkeurigheid. Deze observatie, in combinatie met de volbloed en point-of-care karakteristieken van visco-

elastische testen, belichten de mogelijkheid om anticoagulantia te detecteren in acute situaties.

Tenslotte bespreekt **hoofdstuk 10** het gepresenteerde werk in dit proefschrift en worden aanwijzingen voor toekomstig onderzoek besproken. In het huidige proefschrift worden innovatieve toepassingen van globale hemostasetesten geëvalueerd met als uiteindelijke doel om de hemostase zorg voor mechanisch geventileerde COVID-19 patiënten en hoog-risico post-PCI patiënten te verbeteren.

Referenties

1. Klok FA, Kruip M, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers D, Kant KM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res.* 2020;191:145-7.
2. Klok FA, Kruip M, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers D, Kant KM, et al. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis. *Thromb Res.* 2020;191:148-50.
3. Leentjens J, van Haaps TF, Wessels PF, Schutgens REG, Middeldorp S. COVID-19-associated coagulopathy and antithrombotic agents-lessons after 1 year. *Lancet Haematol.* 2021;8(7):e524-e33.
4. Vries MJA, Macrae F, Nelemans PJ, Kuiper G, Wetzels RJH, Bowman P, et al. Assessment and determinants of whole blood and plasma fibrinolysis in patients with mild bleeding symptoms. *Thromb Res.* 2019;174:88-94.

