

# Endotoxin and microparticles as markers for inflammation and coagulation

Citation for published version (APA):

Joop, K. (2009). *Endotoxin and microparticles as markers for inflammation and coagulation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20090227kj>

## Document status and date:

Published: 01/01/2009

## DOI:

[10.26481/dis.20090227kj](https://doi.org/10.26481/dis.20090227kj)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Summary



Inflammation, either bacterial or nonbacterial, coagulation and the determinants of their interplay are longstanding topics of research. The present thesis describes the application of laboratory diagnostic and research tools in various disease states and models relating to this interplay, as discussed in Chapter 1.

*Chapter II: Eelationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta*

This study investigated the relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in cows that experienced a dystocia or retained their placenta. From a total of 59 cows plasma and uterine lochia samples were collected to determine lipopolysaccharide (LPS) and the plasma IgG anti-LPS concentrations. Of these cows, 15 were healthy, 31 suffered from retained placenta (RP) and 13 had dystocia, All were clinically examined 1 or 2 days after parturition. RP cows had significantly higher LPS levels in uterine lochia as compared to cows with dystocia and healthy postpartum cows. High LPS levels in lochia at 1 or 2 days postpartum were significantly related to abnormal cervical discharge. Nevertheless, LPS was not detectable in blood in any group, also no significant difference was measured in anti-LPS IgG levels in plasma. We concluded that the presence of *E. coli* and LPS (endotoxins) in lochia early postpartum favors the development of uterine infections by *A. pyogenes* and gram-negative anaerobes later postpartum. LPS was not observed in plasma, suggesting that either it is not absorbed into the blood, or IgG anti-LPS or other detoxification mechanisms efficiently detoxify them.

*Chapter III: Relationship between gastro-intestinal complaints and endotoxemia, cytokine release and the acute-phase reaction during and after a long-distance triathlon in highly trained men*

This study was performed to establish whether the gastro-intestinal (GI) complaints observed during and after ultra-endurance exercise are related to gut ischaemia-associated leakage of endotoxins into the circulation and subsequent cytokine production. We collected blood samples from 29 athletes before, immediately after, and at 1, 2 and 16 hours after a long-distance triathlon. Most participants (93%) had gastro-intestinal symptoms, and even 7% of the participants abandoned the race because of severe gastro-intestinal distress. Endotoxin levels were detectable in 68% of the athletes, associated with a reduction in IgG anti-LPS antibody levels. We observed immediately after the race an increased plasma level of IL-6 reflective of an acute phase response, associated with an increase in CRP and a decrease in pre-albumin concentrations. Nevertheless, we could not establish any significant correlation between the extent of endotoxemia and the gastro-intestinal symptoms. Although LPS does enter the circulation after ultra-endurance exercise, LPS leakage does not seem to be responsible for the observed gastro-intestinal problems in these athletes.



*Chapter IV: Plasma procalcitonin before and after ultra endurance exercise*

To investigate whether levels of plasma procalcitonin are indicative for bacterial translocation and are not elevated by muscle damage, we have determined plasma levels of procalcitonin, endotoxin and creatininekinase before and after ultra endurance exercise. There was (mild) endotoxemia and significant muscle damage detectable in some, but not all (29), athletes, even before and at 1, 2 and 16 hours after the exercise. Plasma procalcitonin concentrations before exercise were low, and increased after the exercise. Plasma procalcitonin concentrations did not significantly correlate with endotoxin levels or with increasing plasma concentrations of creatinekinase (muscle damage). Nevertheless, the maximum procalcitonin concentrations correlate with maximum IL-6 levels and with the acute phase reactant CRP. We concluded that during and after ultra endurance exercise the rise in procalcitonin is likely to be induced by exercise-induced cytokine alterations.

*Chapter V: Predictive values for fatal outcome in septic patients: A comparison between the SIMPLY RED®- and the chromogenic LPS-assays*

The presence of LPS in the systemic circulation is an important predictor of for fatal outcome. The detection of LPS by the regular chromogenic Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay is too expensive and labour intensive to perform on only a few patient samples per day. A simple bedside test applied on a whole blood sample, the SimpliRED® Endotoxin (SRE) assay, has been reported to be of clinical value in critically ill patients. In the present study we evaluated the LAL and SRE assays for their ability to predict mortality in patients clinically suspected to have sepsis.

74 Patients were included; out of 61 septic patients 6 died as result of sepsis, while in 13 patients sepsis could not be confirmed by bacterial culture. Of the 55 survivors, samples of 5 were positive for the LAL, 12 for the SRE and 2 for both assays. Both the positive and negative predictive values were low for both assays in all septic patients. Even when considering APACHE II score selected patients the positive and negative predicted value remained too low for clinical use. The performance of the blood and local cultures were similar to the results of the both endotoxin assays. We conclude that neither the SRE nor the LAL assay is useful in predicting or excluding mortality in patients clinically suspected of having sepsis.

*Chapter VI: Endotoxin, cytokines and procalcitonin in febrile patients admitted to hospital: identification of subjects with high mortality risk*

We prospectively examined 464 febrile patients (median age, 61 years) for predictors of in-hospital death. We measured clinical data (age, underlying disease, duration of fever, chills, and shock on admission) and plasma endotoxin, TNF-alpha, IL-6, IL-10, and procalcitonin



levels. The mortality rate was higher in patients with shock on admission (n=31; 7nonsurvivors) compared to patients not in shock at admission (n=433; 26 nonsurvivors). The endotoxin concentration showed the strongest association with mortality risk, predicting 5 of the 7 deaths with a 5% false-positive rate. For patients without shock on admission, mortality was associated with age and underlying disease: clinical data predicted 30% of the deaths, whereas IL-6 and procalcitonin levels identified an extra 10%.

When febrile patients are screened on hospital admission to identify those with a high risk for mortality, clinical judgment (age, underlying disease, and recent history) outweighs the predictive value of endotoxin, cytokine, and procalcitonin levels. Only in patients who present with shock measurement of endotoxin levels may help to predict a fatal outcome.

*Chapter VII: Microparticles from patients with Multiple Organ Dysfunction Syndrome and Sepsis support coagulation through multiple mechanisms*

We investigated the number and cellular origin of MP in patients with multiple organ dysfunction syndrome (MODS) and sepsis. 9 Patients and 14 healthy controls were included. Number and cellular origin of the MP were determined with flow-cytometry. The coagulation activation status in vivo was quantified by plasma prothrombin fragment F1+2- and thrombin-antithrombin (TAT) measurements.

Annexin V-positive MP in the patients originated predominantly from platelets (PMP), and to a lesser extent from erythrocytes, endothelial cells (EMP) and granulocytes (GMP).

Compared to healthy controls, the numbers of annexin V-positive PMP and TF-exposing MP were decreased, EMP were decreased or found equal, erythrocyte-derived MP were equal and GMP were increased. GMP numbers correlated with plasma concentrations of elastase, but not with CRP or IL-6 concentrations. Patient MP triggered thrombin formation, which was reduced compared to the healthy controls and strongly inhibited by an anti-factor XII MoAb (n=2), by anti-factor XI MoAb (n=8) or by anti-TF MoAb (n=4). Concentrations of F1+2 and TAT were elevated and correlated inversely proportional with the number of circulating MP and their thrombin generation capacity.

*Chapter VIII: Decreased number of microparticles in severe dengue virus infection possible involvement in disease pathogenesis.*

Severe dengue virus infections are characterized by haemorrhagic manifestations that are thought to be due to a combination of thrombocytopenia and thrombocytopathia. Recent data suggest that abnormalities in blood coagulation and fibrinolysis also play a role in disease severity. In view of the evidence for a role of MP in coagulation, we investigated the presence



and cellular source of circulating MP in patients suffering from a severe dengue virus infection. This study demonstrated a near deficiency of MP (especially platelet derived MP) during a severe infection.

*Chapter IX: Pravastatin reduces levels of the glycoprotein IIIa subunit from the fibrinogen receptor on platelet derived microparticles in patients with type 2 diabetes*

A major clinical problem in patients with diabetes is the high risk for cardiovascular diseases. Different studies show that statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce cardiovascular complications in patients with diabetes. This anti-thrombotic effect is primarily ascribed to its cholesterol lowering effect, however other so called pleiotropic effects have also be proposed. The objective in this study was to study the effect of pravastatin, in patients with diabetes (type 2), on the number, cellular origin and antigenic composition of MP.

Patients (n=48) with type 2 diabetes were treated for 8 weeks in a cross over study with pravastatin or no medication. The number of MP was determined as annexin V positive signal determined with flow-cytometry, and the antigen composition of the MP with mean fluorescence. We found that the number, cellular origin and the tissue factor exposure on MP was unaffected by pravastatin. Nevertheless there was a reduction, during Pravastatin treatment, of Glycoprotein IIIa (CD61) on platelet MP. Reduced expression of the fibrinogen receptor and may be responsible in part for the risk reduction of cardiovascular event by statin treatment.



# **Samenvatting**





In dit proefschrift wordt een aantal aspecten beschreven welke samenhangen met de reactie van het lichaam op ontsteking. Twee aspecten spelen een hoofdrol in het proefschrift: ten eerste, de meting in lichaamsvloeistoffen van bacterieel endotoxine (lipopolysaccharide, LPS), als belangrijke mediator van bacteriële infectie in mens en dier. Ten tweede, de reactie van de bloedstolling op ontsteking en hiermee gepaard gaande ziektebeelden. Specifiek werd onderzoek gedaan naar het vrijkomen in bloed van micropartikels (MP) en dan met name naar de cellulaire afkomst en relevantie van deze MP. In hoofdstuk 1 wordt de achtergrond van dit onderzoek geschetst en wordt ingegaan op de opbouw van het proefschrift, omvattende twee verschillende onderdelen.

*Hoofdstuk II: Relatie tussen bacteriële baarmoeder ontsteking, endotoxine concentraties en het ontwikkelen van baarmoederslijmvliesontsteking in runderen na een moeilijke bevalling of bij het achterblijven van de placenta.*

Deze studie bestudeert de relatie tussen bacteriële baarmoederontsteking en endotoxine concentraties enerzijds, en het ontwikkelen van baarmoederslijmvliesontsteking nadat de koe een moeilijke bevalling heeft gehad of wanneer de placenta achterblijft anderzijds. Van de 59 runderen werden plasma en baarmoeder slijmmonsters verzameld, waarin de endotoxine concentraties werden bepaald. In het plasma werd ook de IgG anti-endotoxine concentratie gemeten.

Van deze 59 runderen waren 15 gezond met een normale bevalling, 31 waarbij de placenta was achtergebleven ('retained placenta', RP) en 13 hadden dystocia. Alle runderen werden klinisch onderzocht 1 of 2 dagen na baring. De Runderen met RP hadden beduidend hogere niveaus LPS in het baarmoederslijm vergeleken met dystocia en gezonde postpartum koeien. De hoge niveaus LPS in baarmoederslijm bij 1 of 2 dagen post partum hadden een duidelijke relatie met betrekking tot abnormale cervicale vloeijing. Desalniettemin, was er geen LPS aantoonbaar in het plasma van deze drie groepen runderen, ook werden geen significante verschillen gemeten in niveaus van anti-LPS IgG in plasma. Concluderend uit deze studie, zou de aanwezigheid van E. coli en LPS (endotoxinen) in baarmoederslijm postpartum een aanwijzing kunnen zijn voor het ontwikkelen van bacteriële baarmoederontsteking post partum. Het niet aantoonbaar zijn van LPS in plasma zou verklaard kunnen worden, doordat LPS niet de baarmoederwand kan passeren, of doordat anti-LPS antistoffen het LPS efficiënt binden en klaren.

*Hoofdstuk III: Verband tussen gastro-intestinale klachten en endotoxemia, cytokinen en de acuut-fase reactie tijdens en na een triatlon, bij zeer getrainde atleten.*

Deze studie werd uitgevoerd om vast te stellen of de gastro-intestinale (GI) klachten die tijdens en na zeer extreme inspanningen worden waargenomen in relatie kon worden gebracht met darm ischemie geassocieerde lekkage van endotoxine in de circulatie met bijbehorende cytokine



productie. Bij 29 atleten werd bloed afgenomen voor de triatlon, onmiddellijk daarna, en 1, 2 en 16 uur na de triatlon. De meeste deelnemers (93%) hadden gastro-intestinale symptomen, en 7% van de deelnemers verlieten de race wegens gastro-intestinale problemen. Endotoxines waren aantoonbaar in 68% van de atleten, in relatie met verlaagde anti IgG anti-LPS concentraties in het bloed. Ook werd onmiddellijk na de race een verhoogde acuut fasereactie waargenomen met een duidelijk verhoogde IL-6 concentratie, gepaard gaande met een verhoogd CRP en een daling van de pre-albumine concentraties. Er werd geen significante correlatie aangetoond tussen endotoxemia en de gastro-intestinale klachten. Hoewel bekend is dat LPS vanuit de darmen naar de systemische circulatie kan passeren gedurende extreme inspanningen, kon er geen verband worden aangetoond tussen de gastro-intestinale klachten en het aangetoonde LPS in het bloed.

#### *Hoofdstuk IV: Plasma procalcitonine concentratie voor en na extreme inspanning*

Om te onderzoeken of verhoogde concentraties procalcitonine in plasma van atleten indicatief zijn voor bacteriële translocatie en verklaard worden door spierschade, zijn plasmaconcentraties van procalcitonine, endotoxine en creatininekinase voor en na extreme inspanning bepaald. Er waren (milde) endotoxemie en significante spierschade aantoonbaar in de meeste, maar niet alle atleten (29), vóór en na, 1, 2 en 16 uren van inspanning. Concentraties van het plasma procalcitonine vóór waren laag, en stegen na de inspanning. Concentraties van het plasma procalcitonine correleerden niet met endotoxine concentraties of met stijgende plasmaconcentraties van creatininekinase (maat voor spierschade). Wel correleerden de maximale procalcitonine concentraties met maximale IL-6 concentraties en met de acuut fase reactant CRP. Concluderend, tijdens en na extreme inspanning stijgt de procalcitonine concentratie in bloed, hetgeen waarschijnlijk samenhangt met pro-inflammatoire cytokine productie en niet door lekkage van endotoxines.

#### *Hoofdstuk V: Voorspellende waarden voor septische patiënten met hoge mortaliteit: Een vergelijking tussen de SIMPLY RED® en de LAL LPS-bepaling.*

De aanwezigheid van LPS in de circulatie is een belangrijke voorspeller van een slechte prognose bij patiënten. De bepaling van LPS door de chromogene amoebocyste Limulus lysate (LAL) analyse is duur en arbeidsintensief om dagelijks uit te voeren. Een eenvoudige bedside test die rechtstreeks op volbloed kan worden toegepast is de Endotoxine SIMPLY RED® (SRE) test, een potentieel klinisch waardevolle test in patiënten met sepsis. In de huidige studie vergelijken wij de chromogene LAL en SRE test en bepalen we de voorspellende waarde in patiënten met een klinisch beeld van sepsis.

Vierenzeventig patiënten werden geïncludeerd; waarvan 61 bewezen sepsis hadden. 6 patiënten stierven als gevolg van sepsis, en in 13 patiënten kon sepsis niet worden bevestigd door een positieve bacteriële kweek. Van de 55 overlevenden, waren er 5 positief in de LAL, 12 in de SRE en 2 in beide testen.



Zowel de positieve als negatieve voorspellende waarden voor beide analyses, in alle septische patiënten, waren laag. Ook wanneer de APACHE II score van de patiënten werd meegenomen in overweging bleven de positieve en negatieve voorspellende waarden te laag voor klinisch gebruik van een van beide tests. De voorspellende waarden van de bloed- en de lokale kweken waren gelijk aan de resultaten van de beide endotoxine analyses. In deze studie kon voor zowel de SRE als de LAL test niet worden aangetoond dat deze te gebruiken is als voorspeller van mortaliteit in patiënten met klinisch bewezen sepsis.

*Hoofdstuk VI: Endotoxine, cytokinen en procalcitonine in koortsachtige patiënten opgenomen in het ziekenhuis: identificatie van patiënten met een hoog mortaliteitsrisico.*

Wij onderzochten in 464 koortsachtige patiënten (gemiddelde leeftijd 61 jaar) de voorspellers van mortaliteit.

Naast anamnestiche factoren (leeftijd, onderliggende ziekte, duur van koorts, rillingen, en shock bij opname) werden TNF-alpha waarden, plasma endotoxine, IL-6, IL-10, en procalcitonine concentraties in bloed gemeten. De mortaliteit was hoger in patiënten die in shock waren bij opname (n=31; 7 overleden) vergeleken bij patiënten die dat niet waren bij opname (n=433; 26 overleden). De endotoxine concentratie was de beste voorspeller van het mortaliteitsrisico, deze voorspelde 5 van de 7 overleden patiënten. Voor patiënten die niet in shock waren bij opname, was de mortaliteit geassocieerd met hogere leeftijd en onderliggende ziekte: de klinische gegevens verzameld bij de anamnese voorspelden 30% van de sterfgevallen, terwijl IL-6 en procalcitonine concentraties een additionele 10% identificeerden.

Wanneer patiënten met koorts in het ziekenhuis worden opgenomen, is het klinische oordeel (leeftijd, onderliggende ziekte, en recente medische geschiedenis) een betere voorspeller voor mortaliteit dan de waarden bij opname van endotoxine, cytokine, en procalcitonine. Bij patiënten die zich presenteren in shock is de endotoxine-waarde ook een voorspeller voor een slechte prognose.

*Hoofdstuk VII: Micropartikels van patiënten met meervoudig orgaan falen en sepsis bevorderen de stolling via meerdere wegen*

Wij onderzochten het aantal en de cellulaire oorsprong van micropartikels (MP) in patiënten met meervoudig orgaan falen (MOF) en sepsis. 9 Patiënten en 14 gezonde controles werden onderzocht op de aanwezigheid van MP in bloedmonsters. Het aantal en de cellulaire oorsprong van de MPs werden bepaald met behulp van flowcytometrie. De stollingsstatus werd bepaald door plasma protrombine fragment F1+2- en trombine-antitrombine complex (TAT) metingen.

De meeste Annexine V positieve MPs waren afkomstig van plaatjes (PMP) en in mindere mate van erythrocyten, endotheel cellen (EMP) en granulocyten (GMP).



Vergeleken met gezonde controles, waren de aantallen PMP die Annexin V en tissue factor positief waren verlaagd, EMP waren gelijk of verlaagd, EMP waren gelijk en GMP waren verhoogd. GMP aantallen correleerden met plasmaconcentraties van elastase, maar niet met CRP of IL-6 concentraties.

MP afkomstig van de patiënten bevorderden de trombine vorming, die vergeleken met de gezonde controles sterk rembaar was door toevoeging van anti-factor XII monokonaal (n=2), anti-factor XI monokonaal (n=8), of anti-TF monokonaal (n=4). De concentraties F1+2 en TAT waren verhoogd en correleerden omgekeerd evenredig met het aantal circulerende MP en hun trombone-vormende capaciteit.

### *Hoofdstuk VIII: Verlaagd aantal micropartikels in ernstige knokkelkoorts infectie: mogelijke rol in pathogenese?*

Knokkelkoorts (dengue hemorrhagic fever) infectie wordt in de ernstige fase van de ziekte ondermeer gekenmerkt door bloedingen, hetgeen wordt toegeschreven aan thrombocytopenie en thrombocytopathie. Recente studies suggereren dat de abnormale bloedstolling en fibrinolyse een rol spelen in de bloedingsneiging in dit ziektebeeld. Omdat er aanwijzingen zijn voor een rol van de MP in de stolling, bestudeerden wij de aanwezigheid van MP en hun cellulaire oorsprong in patiënten met een ernstige knokkelkoortsinfectie.

Kinderen met verdenking van knokkelkoorts in de leeftijd van 2 tot 14 jaar, die werden opgenomen in de intensive care van het kinderziekenhuis Dr. Kariadi Hospital in Semarang, Indonesia, werden in deze studie opgenomen. Gezonden schoolgaande kinderen in de leeftijd categorie 6 tot 13 jaar, en uit hetzelfde gebied als de zieken kinderen waren de controle groep.

De diagnose knokkelkoorts werd via een serologische antigeen test en RNA immuun blot test bevestigd. Van acht willekeurige patientjes met een bewezen knokkelkoorts infectie werd van de tijdserie, dag 0 (opname),dag 1,2,7 en 30 o.a. MP bepaald.

Het aantal thrombocyten was lager op dag 1 en 2 dan op de dag van opname en op dag 7 was het aantal genormaliseerd. Het aantal MP was bij opname en de eerste 2 dagen verlaagd en bereikten normale aantallen op dag 30 in vergelijking met de controles. Deze studie toonde een verlaagd aantal MP (m.n. MP afkomstig van plaatjes) gedurende ernstige infectie aan.

### *Hoofdstuk IX: Pravastatine vermindert glycoproteïne IIIa, de fibrinogeen receptor op micropartikels afkomstig van bloedplaatjes in patiënten met type 2 diabetes.*

Een belangrijk klinisch probleem in patiënten met diabetes is het risico van cardiovasculaire complicaties. De verschillende studies tonen aan dat statines (HMG-CoA reductase remmers)



het risico op cardiovasculaire complicaties in patiënten met diabetes kunnen verminderen. Dit beschermende effect wordt hoofdzakelijk toegeschreven aan het cholesterol verlagend vermogen, hoewel andere, zogenaamd pleiotrope effecten van statines ook worden gepostuleerd. De doelstelling in deze studie was om het effect van pravastatine, in patiënten met diabetes (type 2), op het aantal, cellulaire oorsprong en antigene samenstelling van MP te bestuderen. Patiënten (n=48) met type diabetes 2 werden in een cross-over studie, 8 weken behandeld met pravastatine en 8 weken zonder.

Met behulp van flowcytometrie werd het totaal aantal, de cellulaire oorsprong en de antigenen samenstelling van de MP bepaald.

Wij vonden dat het aantal, de cellulaire oorsprong en de tissue factor expressie op de MP niet door pravastatine werden beïnvloed. Wel was er een verlaging van Glycoproteïne IIIa (CD61) op MP afkomstig van bloedplaatjes tijdens de behandeling met pravastatine. De verminderde fibrinogeen receptor zou theoretisch een bijdrage kunnen leveren aan het gunstige effect van statine-behandeling bij patiënten met diabetes, maar meer onderzoek is ook hier aangewezen.



