

# Platelet procoagulant activity and thrombus formation

## Citation for published version (APA):

Keuren, J. F. W. (2004). *Platelet procoagulant activity and thrombus formation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20041210jk>

## Document status and date:

Published: 01/01/2004

## DOI:

[10.26481/dis.20041210jk](https://doi.org/10.26481/dis.20041210jk)

## 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.

---

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Bloedplaatjes vervullen een belangrijke rol in de bloedstolling (hemostase). De binnenbekleding van een intact bloedvat bestaat uit endotheelcellen die antitrombotische eigenschappen hebben. Als endotheel beschadigd raakt gaan bloedplaatjes zich hechten aan subendotheliale matrix eiwitten zoals collageen (adhesie). Bij gezonde personen is er een evenwicht dat ervoor zorgt dat bloedingen snel gestopt kunnen worden en er niet onnodig stolsels gevormd worden. Wanneer er spontaan een trombus ontstaat die een bloedvat afsluit noemen we dit trombose. Bij een arteriële trombose komt er in het weefsel achter de trombose geen bloed meer waardoor dit weefsel kan afsterven na verloop van tijd. Arteriële trombose is een acute complicatie die zich kan ontwikkelen in atherosclerotische (verkalkte) bloedvaten. Gebeurt dit in het hart, dan spreken we van een hartinfarct en als dit in de hersenen plaatsvindt, noemen we dit een herseninfarct.

Fundamentele kennis omtrent het ontstaan en groei van een trombus vormt de basis voor de ontwikkeling van effectieve antitrombotische middelen. Dit is dan ook de achterliggende gedachte van het onderzoek dat beschreven is in dit proefschrift. De studies in het eerste gedeelte van dit proefschrift (hoofdstukken 2-4) zijn uitgevoerd om een beter begrip te krijgen van de eiwitten, receptoren en signaaltransductie processen die verantwoordelijk zijn voor de vorming van plaatjes met stollingsbevorderende (procoagulante) activiteit.

Bij behandeling van vernauwde of door een trombus verstopte bloedvaten wordt vaak lichaamsvreemd materiaal gebruikt wordt, wat veelvuldig leidt tot klinische complicaties. Een voorbeeld is het plaatsen van een stent na percutane transluminale angioplastie (dotteren). Bekende problemen zijn plotselinge occlusie van stents door trombi, ook wel restenose genoemd, of bloedingproblemen als gevolg van antiplaatjes- of antistollingstherapie. Omdat trombine onontbeerlijk is in het proces van trombusvorming veronderstellen wij dat het coaten met trombine remmers, zoals heparine, de biocompatibiliteit van lichaamsvreemde oppervlakken in contact met bloed zal verbeteren. De resultaten van klinische studies met heparine coatings zijn echter niet consistent positief. Het tweede deel van dit proefschrift (hoofdstukken 5-7) bestudeert contact van bloed met lichaamsvreemde oppervlakken. Het doel van deze studies is het verkrijgen van meer inzicht in het werkingsmechanisme van heparine coatings.

## **GP Iba en integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ stimuleren trombine generatie in plaatjes-rijk plasma**

Onder arteriële stromingscondities is plaatjesadhesie afhankelijk van de binding aan von Willebrand factor (VWF) via glycoproteïne (GP) Iba en integrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Beide receptoren zouden ook een rol kunnen spelen in de vorming van plaatjes met procoagulante activiteit. In hoofdstuk 2 hebben wij gekeken naar het effect van afschuifsnelheden, veroorzaakt door een roterende cilinder, op GP Iba en integrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  afhankelijke trombine generatie in stollend plaatjes-rijk plasma (PRP). Trombinevorming werd continu gemeten met behulp van een fluorescerend trombinesubstraat. Antilichamen tegen VWF bindingsepitopen op GP Iba reduceerden trombinevorming in PRP met 25-30% bij een hoge ( $420 \text{ s}^{-1}$ ), maar niet bij een lage ( $120 \text{ s}^{-1}$ ), afschuifsnelheid. De integrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  antagonist abciximab reduceerde de plaatjes-afhankelijke trombinevorming tot 43%. Verder nam het remmende effect van abciximab af bij hogere afschuifsnelheden. De rol van integrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  werd verder bevestigd in experimenten met PRP van Glanzmann

patiënten, die geen functioneel integrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  tot expressie brengen. Trombinevorming in het PRP van deze patiënten was sterk gereduceerd. Verassend genoeg stimuleerde de remmer van de plaatjes aggregatie (abciximab) trombinevorming in PRP van Glanzmann patiënten. Omdat abciximab geen effect had op de trombinevorming in plaatjes-vrij plasma, moet dit effect plaatjesafhankelijk zijn. Tot nu toe hebben we nog geen verklaring gevonden voor dit fenomeen. We concluderen dat bij arteriële afschuifsnelheden de vorming van een procoagulant bloedplaatje en trombinevorming afhankelijk zijn van plaatjesadhesie (aan fibrine) via GP Iba en integrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .

## **VWF-C domein is verantwoordelijk voor plaatjesadhesie aan fibrine**

Fibrine stimuleert de procoagulante activiteit van plaatjes door trombine en is op deze manier belangrijk voor de groei van een trombus. Onder arteriële stromingscondities is VWF nodig voor plaatjes interactie met fibrinedraden. Het doel van de studie in hoofdstuk 3 was het lokaliseren van de domeinen op VWF die verantwoordelijk zijn voor de binding aan fibrine. Wij hebben gevonden dat VWF specifiek bindt aan fibrine. Met behulp van VWF mutanten, die bepaalde domeinen missen, hebben we aangetoond dat de bindingsplaats voor fibrine zich bevindt in het C-domein. In een perfusiemodel waarin bloed onder hoge afschuifsnelheden ( $1500 \text{ s}^{-1}$ ) over fibrine oppervlakken stroomt hebben we verder laten zien dat het C-domein op VWF essentieel is voor plaatjesadhesie op fibrine. Het specifiek blokkeren van de interactie van plaatjes met fibrine zou een doorbraak kunnen zijn voor het ontwikkelen van een nieuw soort antitromboticum. Het voordeel is dat alleen excessieve trombusgroei geremd wordt. Dit betekent waarschijnlijk dat het risico op bloedingen beperkt blijft omdat plaatjes interactie met extracellulaire matrix eiwitten niet verstoord is. Verder onderzoek is echter nodig om uit te zoeken welke specifieke aminozuur sequentie in het VWF-C domein verantwoordelijk is voor de binding aan fibrine.

## **PAR-1 is verantwoordelijk voor het synergistisch effect van trombine op de collageen geïnduceerde procoagulante respons van plaatjes**

In het bloedstollingsproces is de snelheid van trombinevorming afhankelijk van de aanwezigheid van negatief geladen fosfatidylserine aan het oppervlak van geactiveerde bloedplaatjes. Een bloedplaatje dat fosfatidylserine tot expressie brengt noemen we daarom een procoagulant bloedplaatje. Over het algemeen wordt aangenomen dat de vorming van een procoagulant bloedplaatje geïnitieerd wordt door een verhoging van de intracellulaire calciumconcentratie. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat trombine een zwakke agonist is met betrekking tot de vorming van plaatjes met deze procoagulante activiteit. Trombine bleek echter synergistisch te werken met collageen bij het induceren van procoagulante activiteit. In hoofdstuk 4 van dit proefschrift werd onderzocht of dit synergistisch effect gerelateerd is aan veranderingen in intracellulair calcium en wat de bijdrage is van de trombine receptoren GP Iba, PAR-1 en PAR-4.

We toonden aan dat trombine slechts een tijdelijke verhoging geeft in intracellulair calcium en nauwelijks effect heeft op de procoagulante respons van bloedplaatjes. Echter, in aanwezigheid van collageen bleef het calciumsignaal na activering met trombine langdurig op een

hoog niveau, wat resulteerde in een procoagulante activiteit die 15 keer zo hoog was als die bij controle plaatjes. Hieruit concluderen we dat de procoagulante activiteit van een plaatje veroorzaakt wordt door een langdurige verhoging in intracellulair calcium. Dit werd bevestigd met behulp van flow cytometrie, waarin aangetoond werd dat de aanwezigheid van fosfatidylserine aan de buitenkant van het plaatjesmembraan altijd samengaat met een verhoogd intracellulair calcium niveau. Deze verhoging bleek afhankelijk te zijn van de influx van extracellulair calcium. Verder werd slechts een subpopulatie van de plaatjes ( $\pm 15\%$ ) procoagulant na activering met collageen en trombine. Deze heterogene respons zou te maken kunnen hebben met een verminderde receptor functie bij oudere bloedplaatjes, maar dit moet verder uitgezocht worden.

Met behulp van een antilichaam (MoAb 2D2) tegen de trombine-bindingsplaats op GP Iba werd duidelijk dat deze receptor niet betrokken was bij de vorming van plaatjes met procoagulante activiteit. Remming van de trombinereceptoren PAR-1 en PAR-4 met selectieve intracellulaire remmers en selectieve receptor desensitisatie toonde aan dat PAR-1, maar niet PAR-4, activering noodzakelijk is voor zowel de langdurig verhoogde intracellulaire calcium niveaus, als de procoagulante respons geïnduceerd door trombine en collageen. De bevinding dat PAR-1 activering verantwoordelijk is voor de langdurig verhoogde intracellulaire calcium niveaus, is niet in overeenstemming met de korte levensduur van de receptor na activering met trombine. Wij speculeren dan ook dat de interactie van collageen met het bloedplaatje de inactiveringskinetiek van de PAR-1 receptor veranderd.

Deze studie impliceert dat antagonisme van PAR-1 een drastisch remmend effect heeft op de procoagulante activiteit van collageen geadherende bloedplaatjes. Dit suggereert dat specifieke remming van de PAR-1 receptor een effectieve strategie is om trombinevorming aan het oppervlak van een vormende trombus, en dus trombusgroei, te beperken. Verder onderzoek in trombose modellen is nodig om dit te bevestigen.

## **Fibrinogeen adsorptie, plaatjesadhesie en trombine vorming aan gehepariniseerde oppervlakken**

Thrombus vorming aan een artificieel oppervlak in contact met bloed is een complex proces dat begint met eiwit adsorptie vanuit plasma en eindigt met plaatjesadhesie en fibrinevorming. Om te kijken wat de bijdrage is van eiwitadsorptie en plaatjesadhesie aan trombinevorming hebben we een studie uitgevoerd met niet-gecoate (NC) en gehepariniseerde (HC) oppervlakken (hoofdstuk 5). Eiwit adsorptie, plaatjesadhesie en trombinevorming in volbloed werden bestudeerd met respectievelijk ellipsometrie, een dynamische plaatjesadhesie assay en een amidolytische trombine assay. De trombinevorming in bloed dat stroomt (afschuifsnelheid  $50 \text{ s}^{-1}$ ) over HC oppervlakken was sterk gereduceerd in vergelijking met NC oppervlakken. Aan de andere kant lieten plaatjesadhesie en eiwitadsorptie metingen vanuit ontsteld bloed zien dat plaatjes niet hechten aan NC en HC oppervlakken omdat geen fibrinogeen aanwezig was in de eiwitlaag die gevormd is aan het oppervlak vanuit plasma. Deze bevindingen indiceren dat, in vitro, de trombogeniciteit van een materiaal niet kan worden voorspeld met plaatjesadhesie en eiwitadsorptie data vanuit ontsteld bloed. Pre-incubatie van NC en HC oppervlakken met fibrinogeen of 2000x verdund plasma resulteerde in vergelijkbare hoeveelheden geadsorbeerd fibrinogeen, wat resulteerde in plaatjesadhesie vanuit stromend bloed. Deze

resultaten geven aan dat plaatjesadhesie correleert met de beschikbaarheid van fibrinogeen aan het oppervlak en dat er geen verschil is tussen NC en HC oppervlakken met betrekking tot eiwit adsorptie en plaatjesadhesie vanuit ontsteld bloed. Het HC oppervlak is anti-trombogene vanwege de binding van antitrombine, dat lokaal gevormde trombine direct neutraliseert. Bewijs voor deze stelling wordt geleverd in hoofdstuk 6, waarin we aantoonen dat antitrombine alleen aanwezig is in eiwitlagen, gevormd vanuit plasma, aan HC oppervlakken. Hoofdstuk 7 bevestigt verder dat antitrombine gebonden aan HC oppervlakken volledig verantwoordelijk is voor de antitrombotische eigenschappen, omdat heparinisatie de trombine vorming platlegde in normaal, maar niet in antitrombine deficient bloed.

Klinische studies laten zien dat heparine coatings op stents of synthetische omleidingen (vascular graft) de biocompatibiliteit van deze lichaamsvreemde oppervlakken niet significant verbeteren. Een reden dat heparine coatings tot nog toe geen verbetering opleverden in patientenstudies kan zijn dat gesulfateerde polysaccharides, zoals heparine, interacties aangaan met groeifactoren en op deze manier neo-intima vorming kunnen stimuleren. Aangehouden is echter dat minder gesulfateerde polysaccharides gladde spiercel proliferatie remmen. In hoofdstuk 6 hebben we daarom de trombogene eigenschappen van geïmmobiliseerd heparine vergeleken met minder gesulfateerde polysaccharides chondroitine sulfaat en algiinaat. We hebben laten zien dat trombine vorming in bloed dat stroomt over de oppervlakken gecoat met chondroitine sulfaat en algiinaat sterk gereduceerd is in vergelijking met het NC oppervlak. Deze reductie kan verklaard worden uit de verminderde eiwitadsorptie aan deze oppervlakken. Echter, in vergelijking met HC oppervlakken waren de oppervlakken gecoat met de minder gesulfateerde polysaccharide slechts gedeeltelijk tromboresistent. Deze bevindingen geven aan dat als een hoge oppervlakte dichtheid van geïmmobiliseerd heparine negatieve effecten heeft, een mengeling van heparine en algiinaat of chondroitin sulfaat een interessant alternatief kan zijn.

## **Geïmmobiliseerd heparine maakt collageen tromboresistent**

Bloedcompatibiliteit van lichaamsvreemde oppervlakken hangt af van immunologische en trombogene eigenschappen van het materiaal. Het is bekend dat heparine weinig effect heeft op de ontstekingsreactie die gepaard gaat met de bloed-materiaal interactie. Wij stellen voor om collageen te gebruiken als stent of vascular graft coating vanwege zijn zwakke antigeniciteit, de bewezen biocompatibiliteit bij verschillende medische toepassingen (artificiële hartkleppen, huidvervanger) en het geven van een goede ondergrond voor endotheelcel groei. Het nadeel van collageen is uiteraard de actieve rol in plaatjesadhesie en -activering. In hoofdstuk 7 hebben wij onderzocht of het immobiliseren van heparine op collageen de trombogeniciteit omlaag kan brengen. Het bleek dat, zowel onder statische, als onder stromingscondities, trombinevorming aan het gehepariniseerde collageen oppervlak werd voorkomen. Dit indiceert dat het immobiliseren van heparine op collageen een effectieve maatregel is om trombusvorming aan het oppervlak te verhinderen. Deze bevindingen zijn een aanmoediging om gehepariniseerd collageen te testen als stent coating in diernodellen en uiteindelijk in humane studies.