

# Thrombin generation: innovations and clinical applications

## Citation for published version (APA):

Ninivaggi, M. (2014). *Thrombin generation: innovations and clinical applications*. Maastricht University.

## Document status and date:

Published: 01/01/2014

## 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**

Dit proefschrift beschrijft het onderzoek naar vernieuwingen op het gebied van trombinevorming en de klinische toepassing van deze assay. In **Hoofdstuk 1** worden de verschillende testen beschreven die heden ten dage in het ziekenhuis gebruikt worden om de stolling te onderzoeken. Dit betreft niet alleen de routinetesten die stoltijden meten en hiermee de concentratie aan stollingsfactoren bepalen, maar ook de testen die de plaatjesfunctie en -activatie evalueren. Een belangrijke innovatie op het gebied van plaatjesfunctie is ongetwijfeld tromboelastografie. Deze test wordt in het ziekenhuis steeds meer geïntegreerd en gebruikt om patiënten (peri-operatief) te behandelen. De Calibrated Automated Thrombogram (CAT) assay, dat trombinevorming meet, wordt momenteel nog niet als standaardtest in het ziekenhuis gebruikt, maar het is een veelbelovende test die al veelvuldig gebruikt wordt voor onderzoeksdoeleinden.

In **Hoofdstuk 2** wordt de nieuwe volbloedtrombinevorming (VB-TV) test beschreven. Deze assay werd ontwikkeld door de al bestaande CAT-assay zo aan te passen dat deze ook werkt voor volbloed. De belangrijkste aanpassing was het creëren van een dunne laag bloed door een rond filterpapier te gebruiken dat in een 96-wellsplaat past. Hierbij komen de erythrocyten vast te zitten in het filterpapier en kunnen daardoor niet sedimenteren en samenclusteren in het gevormde stolsel. Uitdroging wordt voorkomen door het filterpapier met een druppel olie af te dekken. Een andere aanpassing was het gebruik van een Rhodamine substraat in plaats van het aminomethylcoumarine (AMC) substraat dat in de CAT-assay gehanteerd wordt. Hemoglobine interfereert veel minder met het excitatie- en emissie-spectrum van Rhodamine dan met dat van AMC. De VB-TV assay is reproduceerbaar en in staat om stollingsstoornissen te detecteren. Deze test heeft het principiële voordeel dat trombinevorming wordt gemeten onder omstandigheden die de toestand in het lichaam beter benaderen aangezien ook alle bloedcellen aanwezig zijn. Een praktisch voordeel is dat er niet gecentrifugeerd hoeft te worden, hetgeen tijd bespaart alsook de kans op het maken van fouten. Een ander groot voordeel van de VB-TV assay is het kleine volume bloed dat nodig is (60  $\mu$ l). Dit maakt deze assay interessant voor het meten van de trombinevorming in proefdieren waar de hoeveelheid bloed gering is, zoals in muizen. Dit wordt in **Hoofdstuk 3** verder uitgewerkt tot een test waarvan de experimentele variatie aanvaardbaar is (<10%). Wij laten zien dat deze test capabel is om stoornissen in de stolling te detecteren aan de hand van experimenten met *Brain and muscle ARNT-like protein (Bmal1)*-knock out (KO) muizen in vergelijking met wild-

type (WT) muizen. Het is alom bekend dat deze KO muizen een versneld verouderingsproces hebben en daardoor een grotere kans hebben op het ontwikkelen van trombose. Met onze test hebben we inderdaad een hogere trombinevorming in de Bmal1-KO muizen gemeten dan in hun WT leeftijdsgenoten. Het feit dat er een kleine hoeveelheid bloed nodig is, maakt dat je de muis niet hoeft op te offeren waardoor er veel meer condities kunnen worden getest met het bloed van eenzelfde muis en de stollingsstatus van een muis in de tijd gevolgd kan worden.

**Hoofdstuk 4** beschrijft het onderzoek naar het effect van hypoxie op de stolling. Voor dit onderzoek zijn we met twee groepen van elk 15 proefpersonen naar het Mont Blanc gebied getrokken. Één groep is actief klimmend omhoog gegaan, terwijl de andere groep dat passief via de kabelbaan deed. De reden hiervoor was om het effect van inspanning op de bloedstolling te kunnen onderscheiden van het effect van hypoxie op de bloedstolling. Bloedstalen werden genomen op 50m, 1100m, 2045m, 3100m en 3900m hoogte. Trombinevorming in plasma was hoger in de actieve groep dan in de passieve groep, wat kan verklaard worden door de verhoging in factor VIII als gevolg van een verhoging in Von Willebrand Factor, hoogstwaarschijnlijk geïnduceerd door de fysieke inspanning. Trombinevorming in volbloed daarentegen, verhoogde met toenemende hoogte in beide groepen. Uit deze studie kan geconcludeerd worden dat hypoxie de bloedcellen, of de interactie van het plasma met de bloedcellen beïnvloedt, waardoor het een protrombotisch fenotype induceert.

In **Hoofdstuk 5** wordt aangetoond hoe de CAT assay klinisch toegepast kan worden. Het is bekend dat hemofilie A patiënten met een factor VIII gehalte <5% onderling sterk verschillen m.b.t hun bloedingsneiging. Uit de literatuur is ook bekend dat er geen goede correlatie is met het factor VIII gehalte. Dit zou kunnen komen doordat de bestaande factor VIII metingen in het gebied <2% onnauwkeurig zijn. Wij hebben daarom een nieuwe assay ontwikkeld die in staat is om accuraat de concentratie aan factor VIII te kunnen meten onder de 2%. De hypothese was dat hemofilie patiënten met een milde bloedingsneiging nog genoeg factor VIII hebben dat hun beschermt tegen het ontwikkelen van ernstige bloedingen. Uit dit onderzoek bleek dat het factor VIII gehalte van de mild en ernstig bloedende patiënten niet verschilden. De patiënten bleken echter wel te verschillen als de trombinevorming in plasma gemeten werd met de klassieke CAT-methode geïnitieerd met weefselfactor. Dit betekent dus dat bloedende en niet bloedende hemofilie patiënten niet zozeer verschillen in de

hoeveelheid factor VIII die hen rest, maar wel in het gebruik dat ze kunnen maken van deze sporen factor VIII door verschillen in de efficiëntie van de rest van het stollingssysteem. Verder onderzoek is nodig om uit te wijzen wat het mechanisme is en hoe we deze resultaten kunnen gebruiken in de kliniek.

**Hoofdstuk 6** beschrijft het onderzoek naar het effect van verschillende conformaties van  $\beta_2$ -glycoproteïne I op de trombinevorming in een plasma omgeving. Hierbij hebben we kunnen concluderen dat de natuurlijke vorm van het proteïne geen effect heeft op de trombinevorming, maar dat de geactiveerde “open” conformatie van de proteïne voor een verlaging van de trombinevorming zorgt. Deze verlaging veroorzaakt door “open”  $\beta_2$ -glycoproteïne I was afhankelijk van de dosis en de incubatietijd. Het feit dat deze verlaging in trombinevorming enkel waarneembaar was bij lage concentraties aan weefselfactor maakt dat  $\beta_2$ -glycoproteïne I waarschijnlijk een effect heeft op de intrinsieke stollingsroute van de stollingscascade. Verder onderzoek is nodig om het mechanisme te achterhalen dat hiervoor verantwoordelijk is.

Een andere klinische toepassing van de CAT assay wordt beschreven in **Hoofdstuk 7**. In dit hoofdstuk wordt er gekeken naar het effect van *in vitro* bloed- en plasmaverdunning op trombinevorming en tromboelastografie. De rol van de bloedcellen en de toevoeging van geconcentreerde stollingsfactoren werd ook hierbij onderzocht. We hebben gevonden dat de trombocyten een deel van de verdunning kunnen compenseren, terwijl de erythrocyten helemaal geen effect op de maximale sterkte van het stolsel hadden. Die maximale sterkte blijkt bij lage verdunningen volledig afhankelijk te zijn van het trombocytenaantal. Pas wanneer dit sterk verlaagd is, begint de stolselvorming beïnvloed te worden door de fibrinogeenconcentratie. Toevoeging van fibrinogeen aan sterk verdund plasma had enkel een effect op de sterkte van het stolsel en niet op de trombinevorming. Daarentegen had toevoeging van protrombine-complex-concentraat (bestaande uit geconcentreerd factor VII, IX, X, II, proteïne C en S) aan sterk verdund plasma alleen een invloed op de trombinevorming en niet op de stolselvorming. Deze *in vitro* data werden bevestigd door trombinevorming en tromboelastografie te onderzoeken in bloedstalen voor en na cardiothoracale chirurgie. Na de operatie blijkt het bloed van deze patiënten sterk verdund te zijn ( $\pm 45\%$ ), waarbij de effecten in trombocyten-arm plasma op de trombinevorming en tromboelastografie ernstiger zijn dan in trombocyten-rijk plasma, wat de compenserende rol van de trombocyten weer aangeeft. Het effect van *in vivo*

toediening van fibrinogeenconcentraten aan patiënten met sterke bloedverduunning werd beschreven in **Hoofdstuk 8**. Bij dit onderzoek werden ernstig bloedende patiënten willekeurig verdeeld in twee groepen. Eén groep kreeg 4 plasma eenheden en de andere groep kreeg 2 plasma-eenheden samen met 2 gram fibrinogeen. Bloedstalen werden afgenomen voor en na de transfusie en hierin werd de trombinevorming gemeten (met de CAT) en de stolselsterkte bepaald (met de tromboelastografie). Uit deze studie kan geconcludeerd worden dat patiënten die behandeld werden met de fibrinogeen concentraten een verbeterde stolselsterkte vertoonden, maar wel ten koste van een trombinevorming die minder snel steeg dan die bij de patiënten die enkel behandeld werden met plasma.

De samenvattende conclusie van de thesis komt in het laatste **Hoofdstuk 9** aan bod. Hierbij worden eerst de mogelijkheden en de problemen rond de CAT assay bediscussieerd, samen met de innovaties en de klinische toepassingen, inclusief de rol van de bloedcellen hierin. Vervolgens worden richtlijnen gegeven om te komen tot een robuuste en gestandaardiseerde trombinevormingstest met een geringe intra- en inter-laboratoriumvariatie. De ideale stollingsfunctietest zou naast de thrombinevorming ook de functie van de vaatwand moeten kunnen testen en dit onder verschillende flow-condities (overeenkomend met veneuze en arteriële stroming). In onze laboratoria is er een apparaat in ontwikkeling dat de trombinegeneratie en de stolselsterkte kan meten onder flow, maar verder onderzoek is nodig om te bepalen of deze veelbelovende assay in staat is om de trombinegeneratie test nog een stap dichterbij de fysiologie van de mens te brengen.