

# Acquired alteration in platelets

## Citation for published version (APA):

Baaten, C. C. F. M. J. B. (2018). *Acquired alteration in platelets: insight into impairment and recovery of platelet function*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20180315cb>

## Document status and date:

Published: 01/01/2018

## DOI:

[10.26481/dis.20180315cb](https://doi.org/10.26481/dis.20180315cb)

## 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*

Platelets play crucial roles in thrombosis and hemostasis. In an injured vessel wall they rapidly adhere, become activated and aggregate into a thrombus clot to halt bleeding. Similarly, following rupture of an atherosclerotic plaque, platelets activate, aggregate and form an intra-arterial thrombus. Alterations in platelet activation and/or count can hence disturb the processes of thrombus and clot formation, with consequences for thrombosis or hemostasis. In this thesis, my emphasis is on acquired modes of platelet dysfunction and the underlying mechanisms of these.

*Chapter 1* provides relevant background information on the regulation of platelet activation and thrombus formation. Highlighted are key platelet receptors responsible for adhesion to the vessel wall and, furthermore, the evidence for response heterogeneity between platelets. Also introduced are the clinical concepts how thrombosis is prevented by dual antiplatelet therapy, with bleeding as a side effect; as well as the conditions for platelet transfusion. In the review *Chapter 2*, a novel concept is presented how inter-platelet heterogeneity can link to priming of platelets towards increased or decreased activation properties. Platelet heterogeneity can be observed at multiple levels. Structural heterogeneity can result from variability between individual megakaryocytes and from ageing of platelets in the circulation. Within a thrombus, response heterogeneity is enhanced by the specific location of the platelet in the thrombus and unequal distribution of receptor agonists, such collagen, ADP and thrombin. Regarding priming, during their time in circulation platelets will be exposed to a wide range of molecules that either increase or reduce the responsiveness. It is considered that, in pathological conditions, where the physiological balance between positive and negative priming factors is disturbed, platelets can become either hyper- or hypo-responsive. This can lead to an increased risk of thrombosis or bleeding, respectively. As a consequence of an underlying pathology, platelets can even be activated in the circulation, and subsequently appear as non-responsive, when assayed with *in vitro* tests. Therefore, we conclude that measurement is needed of both *in vivo* markers of platelet activation and *in vitro* activity of platelets, for a better understanding of the possible risks for thrombosis or bleeding.

In order to prevent recurrent thrombotic events, patients who suffered a myocardial infarction will receive dual antiplatelet therapy for one year, consisting of the cyclo-oxygenase inhibitor aspirin and an irreversible inhibitor of the ADP receptor P2Y<sub>12</sub>, prasugrel. In *Chapter 3* we investigated how the platelet activation properties recovered in patients, who stopped prasugrel intake after one year of treatment. Platelet responsiveness to ADP was hence tested at 0, 1, 2, 5 and 30 days after the cessation of drug intake. We found that after 5 days platelet responses to ADP were markedly improved, but still in part inhibited. *In vitro* addition of ticagrelor - a reversible P2Y<sub>12</sub> antagonist - suppressed the regained ADP responsiveness after >2 days, thus providing evidence for a gradual recovery of P2Y<sub>12</sub>-induced signaling. Interestingly, during the first days after discontinuation of prasugrel, we identified a separate population of platelets with fully regained responsiveness to ADP. Staining with the mRNA probes, thiazole orange or 5'-Cy-oligo-dT, showed that this population consisted of so-called juvenile platelets, *i.e.* newly released from the megakaryocytes residing in the bone marrow. Although the reactivity of the juvenile platelets was higher than that of older platelets,

interestingly, the reactivity of both populations continued to increase during the whole offset period, suggesting a prolonged inhibitory effect of prasugrel intake on P2Y<sub>12</sub> receptors of megakaryocytes.

In *Chapter 4* we determined the interactions between immobilized collagen and tissue factor for platelet- and fibrin-dependent thrombus formation under flow conditions. It appeared that, alongside collagen that is required for platelet adhesion, the tissue factor-triggered generation of thrombin is a controlling factor determining the platelet-thrombus volume. In particular at low flow rates, the thrombin generated on procoagulant platelets drives the formation of fibrin fibres outside of the thrombus area. Furthermore, under conditions where platelet adhesion is a limiting factor, we find fibrin fibres redistributed from the bottom to the top of a thrombus. This chapter also elucidates the effects of the flow shear rate on the localization of fibrin and on the micro-elasticity of the fibrin-thrombus.

The glycoproteins (GP), GPIb $\alpha$  and GPVI, are key surface receptors for platelet adhesion to von Willebrand factor and collagen, respectively. Both receptors are known to be susceptible to cleavage of their extracellular domains by the platelet membrane-bound extracellular proteases, ADAM10/17, in a process called receptor shedding. In *Chapter 5* we investigated the signaling pathways underlying ADAM10/17 mediated receptor shedding as well as the implications of this process for platelet functions. Interestingly, we found heterogeneity in extent of shedding between populations of (activated) platelets. Platelets with phosphatidylserine exposure due to a high intracellular calcium level or a high caspase activity appeared to preferentially cleave the glycoproteins GPIb $\alpha$  and GPVI. Phosphatidylserine exposure also coincided with glycoprotein shedding in platelets of a thrombus. However, as the platelets from a Scott syndrome patient, which are unable to expose phosphatidylserine, still showed unchanged ADAM mediated cleavage of GPIb $\alpha$  we concluded that phosphatidylserine exposure was not a prerequisite for shedding. Given the procoagulant effect of phosphatidylserine exposure, we subsequently investigated how receptor shedding affected the procoagulant potential of platelets. Remarkably, we found that this was increased by enhancing the binding of prothrombin to platelets and by accelerating fibrin formation.

In *Chapter 6* we identified and characterized the dysfunction of platelets acquired by chemotherapy treatment in patients, who were diagnosed with a hematological malignancy and developed thrombocytopenia. We found that platelets from these patients show impaired integrin activation, granule secretion and spreading, when stimulated via their ADP, thrombin or collagen receptors. Markedly, the severity of the platelet dysfunction was not related to the disease type, the type of chemotherapy, or the platelet count. Moreover, platelet dysfunction was not explained by apoptosis, nor was the spontaneous phosphatidylserine exposure in the absence of agonists, since no caspase activity could be detected. Rather, mitochondrial impairments were associated with the compromised platelet responses as patient platelets showed a lower

mitochondrial O<sub>2</sub> consumption and a decreased mitochondrial membrane potential. Transfusion of the patients with platelet concentrates led to an overall recovery of responsiveness, thrombus formation and platelet-dependent fibrin formation.

As a consequence of substantial blood loss due to trauma or major surgery, infusion of crystalloids and/or colloid fluids is necessary for patients to maintain fluid and electrolyte homeostasis. However, the infusion also leads to dilution of the hemostatic factors and ultimately to an increased risk of bleeding, a condition known as dilutional coagulopathy. In *Chapter 7* we investigated how addition of fibrinogen, platelets, red blood cells or prothrombin complex concentrate altered clot formation and thrombin generation in plasma samples resembling those of dilutional coagulopathy. We demonstrate that, in this case, fibrinogen as well as platelets can normalize the elastic clot formation assessed by thromboelastometry. In contrast, the impaired thrombin generation was particularly normalized by the addition of prothrombin complex concentrate. These results could be confirmed with blood obtained from patients before and after major fluid infusion. Here, again, it appeared that the platelet count and fibrinogen level were main predictors of the whole blood thromboelastometry outcome, in contrast to the hematocrit and prothrombin level. Clinical decisions on transfusion with fibrinogen or plasma, based on thromboelastometry measurements alone, should therefore take into account the platelet count.

In *Chapter 8*, a synthesis paper is presented of published *in vivo* and *in vitro* studies of murine arterial thrombosis and tail bleeding. In total 1407 studies were included, resulting in a comprehensive analysis of the roles of 401 mouse genes in thrombosis and hemostasis. By developing a scoring system of the pro- and antithrombotic effects of genetic modification, we found high correlations between gene effects of the most commonly used *in vivo* and *in vitro* models. Moreover, this synthesis identified 19 genes that solely affect arterial thrombosis without a role in bleeding. By constructing a network of human orthologues of murine genes that affect thrombosis and/or bleeding, we could identify multiple novel genes with a possible role in thrombosis and hemostasis. A role of several of these new genes was validated by studying thrombus formation *in vitro* using blood from eight genetically modified mouse models. This synthesis approach can provide a guide for the identification of new antithrombotic targets in the future.

In *Chapter 9*, the most important findings of this thesis are discussed in view of the current literature. It is reasoned that knowledge is needed of not only the platelet count, but also of the activation properties of the different platelet populations, in order to make an appropriate assessment of the hemostatic imbalance of patients with an (acquired) risk of thrombosis or bleeding.





*Samenvatting*



Bloedplaatjes spelen een cruciale rol bij zowel hemostase als trombose. Wanneer een bloedvatwand beschadigd raakt, leidt dat tot snelle aanhechting en activering van de bloedplaatjes. Het gevolg hiervan is een trombus van geaggregeerde plaatjes, die een bloeding kan stelpen. Ook na het scheuren van een arteriële atherosclerotische plaque worden plaatjes geactiveerd, en zij vormen dan een trombus die de arterie kan afsluiten. Als gevolg hiervan kunnen dus veranderingen in ofwel plaatjesactivering ofwel plaatjesaantal leiden tot een abnormale trombusvorming, en daarmee tot een verstoorde hemostase of verhoogde trombosegeïgning. In dit proefschrift zijn dergelijke veranderingen onderzocht, met een nadruk op relevante verworven vormen van plaatjesdysfunctie en de mechanismen die daarvoor verantwoordelijk kunnen zijn.

*Hoofdstuk 1* biedt relevante achtergrondinformatie over de regulatie van plaatjesactivering en trombusvorming. Uitgelicht zijn de voornaamste plaatjesreceptoren, zoals de receptoren die zorgen voor adhesie aan de vaatwand. Verder zijn de belangrijkste aanwijzingen in kaart gebracht voor heterogeniteit tussen verschillende plaatjestypen. Om het klinische belang te benadrukken van een adequate onderdrukking van plaatjesactiviteit bij (arteriële) trombose beschrijft dit hoofdstuk ook de mogelijkheden tot preventie middels duale antiplaatjestherapie, die echter regelmatig bloedingen als bijwerking hebben. In *Hoofdstuk 2* is een nieuw concept gepresenteerd over hoe de heterogeniteit tussen plaatjes van invloed kan zijn op het (on)gevoeliger maken (*priming*) van deze cellen voor stimulerende of inhiberende signalen. Deze heterogeniteit kan meerdere oorzaken hebben. Heterogeniteit in de samenstelling van plaatjes kan het gevolg zijn van verschillen tussen individuele megakaryocyten in het beenmerg, maar ook van een geleidelijke plaatjesveroudering. Binnen een trombus wordt de heterogeniteit tussen plaatjes ook bepaald door hun precieze locatie en daarmee samenhangend de ongelijke verdeling van plaatjesagonisten zoals collageen, ADP en trombine. Wat betreft het begrip *priming* worden plaatjes in de circulatie blootgesteld aan een scala van moleculen die hun responsiviteit stimuleren of juist remmen. Beargumenteerd is dat onder pathologische omstandigheden, waarin de fysiologische balans tussen positieve en negatieve *priming*-factoren verstoord is, de plaatjes van een patiënt hyper- danwel hypo-responsief kunnen worden. Dit kan leiden tot een verhoogd risico op trombose of bloeding. Als gevolg van een aandoening kunnen plaatjes in de circulatie zelfs geactiveerd worden en vervolgens dysfunctioneel raken, zoals dan blijkt uit *in vitro* testen. Op grond hiervan concluderen wij dat voor een goed begrip van de mogelijke risico's op trombose of bloedingen er metingen nodig zijn van zowel markers van de plaatjesactivering *in vivo* als de activiteit van geïsoleerde plaatjes *in vitro*.

Om een herhaalde trombose te voorkomen krijgen patiënten die een myocardinfarct hebben gehad een jaar lang duale antiplaatjestherapie, die bestaat uit de cyclo-oxygenase remmer aspirine en een irreversibele remmer van de P2Y<sub>12</sub> receptor voor ADP, prasugrel. In *Hoofdstuk 3* hebben we onderzocht hoe de plaatjesactivering herstelt in patiënten, die stoppen met prasugrel-behandeling. Daarvoor zijn de plaatjesresponsen op ADP gemeten op 0, 1, 2, 5 en 30 dagen na de laatste prasugrel-inname. Duidelijk werd dat op 5 dagen na stoppen de plaatjesrespons op ADP sterk verbeterd is, maar toch nog gedeeltelijk geremd. De herwonnen respons op ADP kon onderdrukt worden met ticagrelor – een reversibele P2Y<sub>12</sub> antagonist. Dit bevestigde dus een gradueel herstel van de signalering via P2Y<sub>12</sub> receptoren. Al op enige dagen na het stoppen van prasugrel-inname konden we

een afzonderlijke populatie van plaatjes identificeren, waarvan hun responsiviteit op ADP grotendeels hersteld was. Door plaatjes te labelen met een mRNA marker zoals thiazole-oranje of 5'-Cy-oligo-dT, konden we aantonen dat de hoog-reactieve populatie bestond uit zogenaamde juveniele plaatjes, dat wil zeggen plaatjes die recent uit het beenmerg zijn vrijgekomen. Hoewel de reactiviteit van de juveniele plaatjes hoger was dan die van de oude (geremde) plaatjes, bleef de reactiviteit van beide populaties toenemen tijdens de periode na het stoppen van de inname van prasugrel. Dit suggereert dat het plaatjes-onderdrukkend effect van prasugrel verlengd wordt door remming van de P2Y<sub>12</sub> receptoren van megakaryocyten in het beenmerg.

In *Hoofdstuk 4* is nagegaan hoe een oppervlak met collageen met/zonder weefselfactor bepalend is voor plaatjesadhesie, trombusvorming en ontstaan van een fibrinestolsel onder stromingscondities. Uit het onderzoek bleek dat naast collageen dat de plaatjesadhesie initieert, de trombine die ontstaat middels weefselfactor bepalend is voor de grootte van de gevormde plaatjes-fibrinestolsels. Met name bij lage stromingscondities stimuleerde trombinegeneratie op het oppervlak van procoagulante plaatjes de vorming van fibrinevezels buiten de trombus. Daarnaast bleek dat onder omstandigheden, waarbij de plaatjesadhesie beperkt is, de fibrinevezels herverdelen van de onderkant naar de top van de trombus. Dit hoofdstuk beschrijft verder hoe de stromingssnelheid en de lokalisatie van fibrine bepalend zijn voor de microelasticiteit van een trombus.

De glycoproteïnen (GP) GPIIb/IIIa en GPVI zijn belangrijke receptoren op het oppervlak van plaatjes voor hechting aan respectievelijk von Willebrand factor en collageen. Bekend is dat beide receptoren gevoelig zijn voor het knippen van hun extracellulaire domein door de extracellulaire proteasen ADAM10/17, welke zich ook op het plaatjesoppervlak bevinden. Dit knipproces wordt receptor *shedding* genoemd. In *Hoofdstuk 5* hebben wij onderzocht welke signaleringspaden in plaatjes ten grondslag liggen aan deze ADAM10/17-gemedieerde receptor-*shedding*. Ook hebben we de gevolgen bepaald van het *shedding*-proces voor de functionaliteit van plaatjes. Een belangrijke bevinding was dat de *shedding* van zowel GPIIb/IIIa als GPVI heterogeen verloopt, namelijk op bepaalde populaties van (geactiveerde) plaatjes. Vooral geactiveerde plaatjes met expositie van fosfatidylserine als gevolg van een hoge intracellulaire calciumconcentratie of een hoge caspase-activiteit bleken actief in het ADAM-gemedieerde knippen van GPIIb/IIIa en GPVI. Ook voor plaatjes in een trombus viel de glycoproteïne *shedding* samen met fosfatidylserine-expositie. Echter gezien de onveranderde *shedding* van GPIIb/IIIa in plaatjes van een patiënt met Scott syndroom, die dysfunctioneel zijn in fosfatidylserine-expositie, kon de conclusie getrokken worden dat fosfatidylserine-expositie geen vereiste is voor receptor-*shedding*. Gezien het procoagulante effect van fosfatidylserine-expositie, hebben we vervolgens onderzocht hoe *shedding* het stollingsvermogen van plaatjes beïnvloedt. Opmerkelijk vonden we een verhoogd stollingspotentiaal, omdat bij plaatjes met *shedding* de binding van stollingsfactoren toeneemt en de fibrinevorming versnelt.

*Hoofdstuk 6* had als doel identificatie van de verworven dysfunctie van plaatjes in patiënten, die gediagnostiseerd zijn met een hematologische maligniteit, en na chemotherapie behandeling een trombocytopenie ontwikkelen. Aangevoerd kon worden dat de plaatjes van deze patiënten een verminderde activering van integrines, een lage secretie van granula, en een defecte spreiding vertoonden, wanneer ze gestimuleerd

werden met ADP, trombine of collageen. Typisch was dat de mate van plaatjesdysfunctie niet gerelateerd was aan de diagnose, het type chemotherapie of het plaatjesaantal. Bovendien kon noch de plaatjes-dysfunctie noch de spontane fosfatidylserine-expositie van plaatjes verklaard worden door actieve apoptose, aangezien geen activiteit van de apoptose-marker caspase gedetecteerd kon worden. Echter de lage plaatjesfunctie was geassocieerd met een verminderde activiteit van de mitochondriën. De patiënten-plaatjes vertoonden namelijk een verminderde zuurstofconsumptie en een verlaagd membraanpotentiaal in de mitochondriën. Transfusie van de patiënten met plaatjesconcentraat leidde tot een algeheel verbeterde plaatjesresponsiviteit, trombusvorming en plaatjes-afhankelijke fibrinevorming.

Toediening van kristalloïde en colloïde vloeistoffen is noodzakelijk om een goede vocht- en elektrolytenbalans te behouden, met name wanneer er bij een patiënt substantieel bloedverlies optreedt als gevolg van trauma of ingrijpende chirurgie. Echter deze vloeistof-infusie leidt ook tot een verdunning van hemostatische factoren in het bloed, en kan daarmee aanleiding geven tot een verhoogd bloedingsrisico. Deze conditie staat bekend als verdunningscoagulopathie. In *Hoofdstuk 7* hebben wij onderzocht hoe in verdunde plasmamonsters de extra additie van fibrinogeen, bloedplaatjes, rode bloedcellen of *protrombine complex concentraat* (PCC) leidt tot een verbeterde trombinegeneratie en stolselvorming. Dit onderzoek werd uitgevoerd met plasmamonsters, die qua samenstelling vergelijkbaar waren met die van patiënten met verdunningscoagulopathie. In dit hoofdstuk konden we aantonen dat zowel fibrinogeen als plaatjesconcentraat een normaliserend effect heeft op de fibrinestolselvorming, zoals gemeten met tromboelastometrie. Anderzijds werd de lage trombinegeneratie het beste genormaliseerd door toevoeging van PCC. Deze conclusies werden bevestigd voor bloedmonsters verkregen van operatiepatiënten, bij wie het bloed verdund was door vloeistofinfusie tijdens de ingreep. Ook in deze metingen bleek dat het plaatjesaantal en de fibrinogeenconcentratie de belangrijkste voorspellende variabelen waren van de volbloed tromboelastometrie-test. Ook nu waren hematocriet en het protrombine-niveau veel minder relevant. In de klinische beslisregels omtrent transfusie van ofwel fibrinogeen ofwel plasma, die tegenwoordig vaak gebaseerd worden op tromboelastometrie-metingen, zou daarom ook het plaatjesaantal opgenomen moeten worden.

In *Hoofdstuk 8* is een vergelijkende kwantitatieve analyse beschreven van een groot aantal gepubliceerde studies naar arteriële trombose en staartbloeding in genetisch gemodificeerde muizen. In totaal zijn 1407 studies vergeleken, waarmee inzicht verkregen werd in de rol van 401 muizengenen bij arteriële trombose, trombo-embolie en hemostase. Middels een scoringsprocedure voor de pro- en antitrombotische effecten van genetische modificatie konden we een hoge correlatie vaststellen van de uitkomst van de meest gebruikte *in vivo* en *in vitro* trombosemodellen. Sterkte-analyse resulteerde in 19 muizengenen die een positieve rol spelen bij arteriële trombose, maar geen effect hebben op bloeding. Na samenstellen van een netwerk van humane orthologe eiwitten van die muizengenen die trombose en/of hemostase beïnvloeden, konden we meerdere nieuwe eiwitten en genen identificeren die mogelijk betrokken zijn bij deze processen.

Van een aantal van deze konden we een betrokkenheid valideren, door bestudering van de trombusvorming *in vitro*. Deze synthese-aanpak kan een toekomstige leidraad vormen voor de identificatie van nieuwe antitrombotische targets.

In *Hoofdstuk 9* zijn de meest belangrijkste bevindingen van dit proefschrift bediscussieerd in het licht van de huidige literatuur. Verder is beredeneerd dat zowel het plaatjesaantal als de activeringseigenschappen van de verschillende plaatjespopulaties bekend dient te zijn om tot een beoordeling te komen van de hemostatische disbalans van patiënten met een (verworven) risico op trombose of bloedingen.

