

# The impact of oral anticoagulants on haemostasis

## Citation for published version (APA):

Zwaveling, S. (2019). *The impact of oral anticoagulants on haemostasis: a step towards individualized therapy*. Ridderprint BV. <https://doi.org/10.26481/dis.20190503sz>

## Document status and date:

Published: 01/01/2019

## DOI:

[10.26481/dis.20190503sz](https://doi.org/10.26481/dis.20190503sz)

## 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.

# CHAPTER

Nederlandse  
samenvatting

| 9

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

In deze thesis hebben we de effecten van orale antistollingsmedicatie (anticoagulantia) op de bloedstolling en op de afbraak van bloedstolsels (fibrinolyse), onderzocht.

**Hoofdstuk 1** is de inleiding van dit proefschrift. In dit hoofdstuk wordt de fysiologie van de vorming en de afbraak van een stolsel uitgelegd. Daarna wordt ingegaan op enkele belangrijke aandoeningen waarin de bloedstolling verstoord is en wordt de huidige behandeling hiervan besproken. Trombose (ongewenste stolling) is een veel voorkomende aandoening met een hoge co-morbiditeit en mortaliteit. In Nederland gebruiken ongeveer 1,5 miljoen mensen anticoagulantia ter bescherming, of als behandeling, tegen trombose. De meest voorkomende bijwerking van deze medicijnen zijn bloedingen. Gebruikers van anticoagulantia hebben ongeveer 10-17% kans per behandeljaar om een bloeding te krijgen, waarvoor medische hulp noodzakelijk is.<sup>1</sup> Het adequaat instellen van antistolling is dus van groot belang. In Nederland wordt de zorg omtrent orale anticoagulantia geregeld via trombose-diensten. In deze gespecialiseerde centra wordt het effect van de medicatie gecontroleerd met behulp van een stollingstest: de protrombine tijd (PT). Voor vitamine K antagonisten (VKA's), die tot voor kort de meest gebruikte orale anticoagulantia waren, wordt met behulp van deze test de juiste, persoonlijke dosis bepaald.

In het afgelopen decennium hebben vier nieuwe, orale anticoagulantia, "direct werkende orale anticoagulantia" (DOACs) hun intrede gemaakt in de kliniek. Deze middelen remmen allen slechts één stollingsfactor, in tegenstelling tot de VKA's die de vorming van vier stollingsfactoren belemmeren. Dabigatran is een directe remmer van trombine (factor IIa). Rivaroxaban, apixaban en edoxaban remmen factor Xa. Mede vanwege deze selectieve remming wordt gezegd dat ze stabielere zijn qua farmacokinetiek en -dynamiek dan de VKA's. Grote, gerandomiseerde studies hebben de efficiëntie en veiligheid van DOACs onderzocht om veneuze trombose te voorkomen en te behandelen.<sup>2-9</sup> De auteurs van deze studies concludeerden dat DOACs in een vaste dosering kunnen worden voorgeschreven en dat (regelmatige) controle van de stolling gedurende de behandeling niet nodig is. Hierbij lijkt het gebied trombose en hemostase dus af te wijken van andere gebieden in de geneeskunde, waar behandeling meer en meer wordt gepersonaliseerd ('personalized medicine' in tegenstelling tot 'one-size-fits-all').

Hoewel het routinematige monitoren van DOACs wordt afgeraden door richtlijnen is er wel een toenemende consensus dat het meten van (het effect van) DOACs in sommige situaties nuttig kan zijn.<sup>10-13</sup> Het meten van het effect van deze middelen op de stolling is een uitdaging. Traditionele stollingstesten, zoals de PT en de aPTT, die respectievelijk gebruikt worden voor het meten van VKA's en heparines, geven een minder betrouwbare weergave van de effecten van DOACs. Er zijn wel speciale testen ontwikkeld om plasmaconcentraties van DOACs te meten. Deze testen zijn gevoelig voor de aanwezigheid van DOACs, maar zeggen weinig over het effect van deze DOACs op de stolling. In dit proefschrift wordt de trombinegeneratie (TG) test onderzocht als potentiële test om het effect van DOACs op de bloedstolling te meten. Deze test meet de hoeveelheid trombine die gevormd wordt over tijd. Daarbij kunnen onder bepaalde condities de extra feedbackloops van de stollingscascade ook gemeten worden. TG wordt daarom gezien als een functionele test die de globale stolling weergeeft, in tegenstelling tot slechts het eerste gedeelte (zoals bij de traditionele stollingstesten). Bovendien wijst eerder onderzoek uit dat TG het effect van meerdere soorten anticoagulantia op stolling kan weergeven.<sup>14,15</sup>

In **hoofdstuk 2** werd onderzocht of trombinegeneratie patiënten (n=129) met een verhoogd risico op bloedingen kan identificeren tijdens de behandeling met VKA. Trombinegeneratie werd gemeten met CAT (calibrated automated thrombinography) in plaatjesarm plasma (PPP), plaatjesrijk plasma (PRP) en in volbloed, met en zonder de toevoeging van trombomoduline (TM). Daarnaast werd voor elke patiënt de HASBLED-score uitgerekend (i.e. een bloedingsscore). In volbloed CAT bleek dat "endogene trombinepotentiaal" (ETP) en de peak-waarde bloedingen even goed konden voorspellen als de HAS-BLED score. Dit impliceert dat het zinvol zou kunnen zijn om de volbloed CAT te implementeren in HAS-BLED om zo de voorspellende waarde te vergroten. In PPP zagen we een trend maar geen significante daling in de ETP en peak bij patiënten met een bloeding, in tegenstelling tot eerdere onderzoeken.<sup>16,17</sup> Het toevoegen van TM, wat de test gevoeliger zou moeten maken, veranderde niets aan deze resultaten.

In **hoofdstuk 3** hebben we het verband tussen een verlaagde TG en het risico op bloedingen in patiënten op anticoagulantia verder onderzocht in een systematische literatuurstudie. Hoewel CAT vaak gebruikt wordt om de effecten van antistolling te onderzoeken in verschillende onderzoeksinstellingen, zijn er maar weinig klinische studies gedaan naar de directe relatie tussen TG en bloedingen in patiënten die behandeld worden met orale antistolling. Alle

artikelen die aan de inclusiecriteria voldeden (n=7), onderzochten patiënten die behandeld werden met VKA. De twee studies met de hoogste methodologische kwaliteit vonden beiden aanwijzingen dat er een verband bestaat tussen lage TG-waarden en bloedingen.<sup>16,18</sup> De andere studies, slechts van matige kwaliteit, sloten aan bij deze bevindingen, maar hadden zelf niet genoeg solide data om deze hypothese te kunnen valideren.

De remming van stolling door anticoagulantia is zichtbaar in het TG experiment doordat de TG-curve lager wordt en later van start gaat, hetgeen een teken is van een verminderde capaciteit om trombine te vormen. Klassiek wordt de tijd tot de vorming van het eerste trombine langer (lag time); wordt de tijd tot de maximale hoeveelheid trombine gevormd is langer (time-to-peak) en neemt de hoeveelheid gevormde trombine over tijd af (ETP), evenals de maximale hoeveelheid trombine (peak).<sup>14,15</sup> Wanneer dabigatran wordt toegevoegd aan het TG experiment, worden de lag time en de time-to-peak langer (zoals verwacht) maar worden de ETP en peak hoger (tegen de verwachting in). Dit zou kunnen leiden tot de foutieve conclusie dat de toevoeging van een reversibele trombineremmer de vorming van trombine zou stimuleren. In **Hoofdstuk 4** wordt het paradoxale effect van de directe trombineremmer (dabigatran) op CAT in meer detail behandeld. Er worden twee mechanismes aangetoond die verantwoordelijk zijn voor het artefact in TG:

1. Het grootste gedeelte van de verhoging van de TG curve komt door een artefact als gevolg van de calibratie. In CAT wordt een vaste concentratie  $\alpha_2$ -macroglobuline ( $\alpha_2$ M)-trombine als calibrator gebruikt. Hoewel trombine gebonden is aan  $\alpha_2$ M, kan deze nog steeds geremd worden door dabigatran. Wanneer dabigatran dus aanwezig is in de calibrator well, resulteert dit in een overschatting van de berekende hoeveelheid vrij trombine in de TG-well. We tonen vervolgens aan dat dit effect kan worden opgeheven door de toevoeging van idarucizumab (een antilichaam specifiek gericht tegen dabigatran) aan de calibrator well. Dit corrigeerde echter slechts een gedeelte van de verhoging van de ETP en peak, wat duidt op een tweede artefact.
2. Tijdens het TG experiment wordt een gedeelte van de nieuwe gevormde trombine weggevangen door binding aan  $\alpha_2$ M (20-25%); trombine gebonden in dit complex kan nog steeds fluorescent substraat knippen en daardoor de indruk wekken dat er nog steeds vrij trombine wordt gevormd. Hiervoor wordt in de berekening van de vrije trombineconcentratie gecorrigeerd door de hoeveelheid  $\alpha_2$ M-trombine af te trekken

van de totale hoeveelheid trombine. Omdat  $\alpha_2$ M-trombine dus ook kan worden geremd door dabigatran, wordt de hoeveelheid vrij trombine overschat in de berekening. Dit artefact kan niet gecorrigeerd worden door idarucizumab toe te voegen, omdat dit het gehele effect van dabigatran zal opheffen. Je meet in dit geval dan de ongeremde stolling van de patiënt (dus alsof hij/zij geen dabigatran zou gebruiken).

De opinie dat het meten van DOACs in bepaalde klinische situaties, de behandeling kan verbeteren voor sommige patiënten, heeft de afgelopen jaren steeds meer bijval gekregen.<sup>10-13,19</sup> Het is van belang dat hierin een onderscheid gemaakt wordt in het meten van DOAC spiegels in het plasma (de concentratie) of het effect van deze spiegels op de stolling zelf. Het is bekend dat de variatie van spiegels binnen en tussen personen erg veel verschilt, wat heeft geleid tot brede "normaalwaardes". Toch zijn er ook studies die een verband hebben gevonden tussen de hoogte van de spiegels en klinische uitkomsten, zoals trombose of bloedingen.<sup>4,20,21</sup> Meer onderzoek is nodig om te bepalen hoe sterk deze relatie is. Ons leek het interessant om naar zowel de spiegels als het effect op stolling te kijken.

**Hoofdstuk 5** beschrijft de ontwikkeling van een test die zowel de spiegels van rivaroxaban kan meten, alsook het effect op stolling, door gebruik te maken van dezelfde CAT-setup: de Xross-CAT. Een goede correlatie werd gevonden tussen de rivaroxaban spiegels gemeten met de Xross-CAT en de Biophen DiXal (een chromogene, gecalibreerde anti-FXa test die nu in de kliniek wordt gebruikt). De correlatie met de PT en de "Diluted Russel Viper Venom time" was matig, en komt overeen met de gevonden relatie tussen andere kwantitatieve en stollingstijd-testen.<sup>22</sup>

De relatie tussen de Xross-CAT spiegels en TG waarde was hyperbool, wat betekent dat kleine hoeveelheden rivaroxaban in staat zijn de vorming van trombine sterk te remmen. Daarnaast laat dit zien dat hogere concentraties rivaroxaban de ETP en peak relatief weinig beïnvloeden, doordat een plateaufase wordt bereikt. Het non-lineaire verband tussen plasmaconcentraties met ETP en peak wijst erop dat deze testparameters informatie geven over verschillende aspecten. Grotere cohort en observationele studies zijn nodig om te evalueren of er een voordeel is om naast concentraties ook het effect op TG te meten.

Dat de variatie tussen DOAC spiegels tussen patiënten groot is, is reeds bekend.<sup>21,23-27</sup> De variatie van DOAC concentraties binnen patiënten over tijd is nog weinig onderzocht.

In **Hoofdstuk 6** rapporteren we de variatie in het effect van een vaste concentratie rivaroxaban en apixaban (in vitro) op TG tussen gezonde personen (inter-individuele variatie). Daarnaast hebben we gekeken naar de variatie in het effect binnen 12 gezonde personen over de periode van een jaar (intra-individuele variatie). Onze data bevestigen de eerder gevonden grote inter-individuele variatie van een vaste concentratie FXa remmers op TG.<sup>14</sup> Het intra-individuele effect van FXa remmers op TG bleef vrij stabiel voor de meeste donoren, maar er waren enkele uitzonderingen. Interessant was dat donoren die het meeste variatie toonden bij de ene DOAC (bv. rivaroxaban), niet per definitie het meeste variatie vertoonden bij de andere DOAC (apixaban), of vice versa. Een andere bijzondere observatie was dat twee gezonde vrijwilligers over tijd een sterk verhoogde TG bleven hebben in vergelijking met de andere donoren. De respons van deze donoren op DOACs bleek ook verlaagd ten opzichte van de anderen. Deze donoren waren de enige gebruikers van hormonale anticonceptie. Aangezien deze studie volledig berust op farmacodynamische bevindingen, zal de variatie in effect op TG in vivo waarschijnlijk nog toenemen door de bijkomende farmacokinetische variatie. Verder onderzoek zal deze hypothese en de mogelijke consequenties van de variatie moeten uitwijzen.

In **Hoodstuk 7** zijn de in vitro effecten van een directe trombineremmer en directe FXa remmers op fibrinolyse onderzocht met behulp van turbiditeitsmetingen. Beide typen DOACs versnellen fibrinolyse door het (direct of indirect) remmen van trombine. Wanneer TM wordt toegevoegd, een katalysator van de activatie van Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) door trombine, duurt het langer voordat een stolsel wordt afgebroken (de afbraaktijd verlengt) zowel in de aan- en afwezigheid van DOACs.

Verder is het verschil in afbraaktijd van een stolsel tussen DOACs bestudeerd in twintig gezonde donoren, door plasma te spiken met een vaste concentratie dabigatran, apixaban en rivaroxaban. Er werd een duidelijke concentratie-afhankelijke versnelling van de afbraaktijd gevonden in de aan- en afwezigheid van TM voor dabigatran. Bij de direct FXa-remmers werd deze versnelde stolselafbraak enkel gezien in de afwezigheid van TM; in de aanwezigheid van TM was dit effect minimaal. Eerder is aangetoond dat dabigatran, als klein molecuul, trombine gebonden in een complex nog steeds kan remmen, doordat het actieve centrum

in trombine beschikbaar blijft. Volgens deze redenering zou dabigatran trombine kunnen remmen, ook al is het gebonden aan TM. Hierdoor zal minder TAFI door trombine kunnen worden geactiveerd, wat kan leiden tot een efficiëntere stolselafbraak. Trombine in complex met TM zal niet worden beïnvloed door directe FXa remmers, waardoor TAFI kan worden geactiveerd, hetgeen resulteert in een betere bescherming van het stolsel.

Tot slot worden in **Hoofdstuk 8** de belangrijkste conclusies samengevat en besproken. Deze thesis bevestigt dat TG een mogelijk hulpmiddel is om het bloedingsrisico in te schatten van patiënten die VKA gebruiken. Aanvullend onderzoek zal moeten aantonen of TG een plaats zou kunnen hebben in risicoscores.

We hebben aangetoond dat het effect van directe trombineremmers niet accuraat wordt weergegeven in de functionele parameters van TG, maar wel in de tijdsafhankelijke parameters. Het effect van verschillende directe FXa remmers wordt wel weergegeven in TG, hetzij met variabele effecten. In deze thesis wordt de ontwikkeling van een test beschreven waarbij zowel de concentratie van rivaroxaban kan worden gemeten, als het effect op stolling met TG. Verder tonen we aan dat het effect van een vaste concentratie DOAC op TG, sterk varieert tussen personen, maar redelijk stabiel blijft binnen een persoon in het verloop van de tijd. Dit houdt in dat in selecte groepen patiënten die DOACs gebruiken, wellicht sommigen baat hebben bij een bepaling van zowel de DOAC concentratie als het effect op TG. Verder onderzoek is nodig om een eventueel voordeel van functionele test versus een kwantitatieve test aan te tonen.



## REFERENTIES

1. Hellenbart EL, Faulkenberg KD, Finks SW. Evaluation of bleeding in patients receiving direct oral anticoagulants. *Vascular health and risk management*. 2017;13:325-342.
2. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2009;361(12):1139-1151.
3. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2011;365(10):883-891.
4. Giugliano RP, Ruff CT, Braunwald E, et al. Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2013;369(22):2093-2104.
5. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine*. 2011;365(11):981-992.
6. Schulman S, Kearon C, Kakkar AK, et al. Dabigatran versus warfarin in the treatment of acute venous thromboembolism. *The New England journal of medicine*. 2009;361(24):2342-2352.
7. Bauersachs R, Berkowitz SD, Brenner B, et al. Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. *The New England journal of medicine*. 2010;363(26):2499-2510.
8. Agnelli G, Buller HR, Cohen A, et al. Oral apixaban for the treatment of acute venous thromboembolism. *The New England journal of medicine*. 2013;369(9):799-808.
9. Buller HR, Decousus H, Grosso MA, et al. Edoxaban versus warfarin for the treatment of symptomatic venous thromboembolism. *The New England journal of medicine*. 2013;369(15):1406-1415.
10. Heidbuchel H, Verhamme P, Alings M, et al. Updated European Heart Rhythm Association Practical Guide on the use of non-vitamin K antagonist anticoagulants in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*. 2015;17(10):1467-1507.
11. Weitz JI, Eikelboom JW. Urgent Need to Measure Effects of Direct Oral Anticoagulants. *Circulation*. 2016;134(3):186-188.
12. Levy JH, Ageno W, Chan NC, Crowther M, Verhamme P, Weitz JI. When and how to use antidotes for the reversal of direct oral anticoagulants: guidance from the SSC of the ISTH. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2016;14(3):623-627.
13. Baglin T, Hillarp A, Tripodi A, Elalamy I, Buller H, Ageno W. Measuring Oral Direct Inhibitors (ODIs) of thrombin and factor Xa: A recommendation from the Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2013.
14. Bloemen S, Hemker HC, Al Dieri R. Large inter-individual variation of the pharmacodynamic effect of anticoagulant drugs on thrombin generation. *Haematologica*. 2013;98(4):549-554.
15. Gatt A, van Veen JJ, Woolley AM, Kitchen S, Cooper P, Makris M. Thrombin generation assays are superior to traditional tests in assessing anticoagulation reversal in vitro. *Thrombosis and haemostasis*. 2008;100(2):350-355.
16. Dargaud Y, Hoffman M, Lefrapper L, et al. Bleeding risk in warfarinized patients with a therapeutic international normalized ratio: the effect of low factor IX levels. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2013;11(6):1043-1052.
17. Bosch YP, Al Dieri R, ten Cate H, et al. Measurement of thrombin generation intra-operatively and its association with bleeding tendency after cardiac surgery. *Thrombosis research*. 2014;133(3):488-494.
18. Bloemen S, Zwaveling S, Ten Cate H, Ten Cate-Hoek A, de Laat B. Prediction of bleeding risk in patients taking vitamin K antagonists using thrombin generation testing. *PloS one*. 2017;12(5):e0176967.

19. Tripodi A, Ageno W, Ciaccio M, et al. Position Paper on laboratory testing for patients on direct oral anticoagulants. A Consensus Document from the SISET, FCSA, SIBioC and SIPMeL. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. 2018;16(5):462-470.
20. Testa S, Paoletti O, Legnani C, et al. Low drug levels and thrombotic complications in high-risk atrial fibrillation patients treated with direct oral anticoagulants. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2018;16(5):842-848.
21. Reilly PA, Lehr T, Haertter S, et al. The effect of dabigatran plasma concentrations and patient characteristics on the frequency of ischemic stroke and major bleeding in atrial fibrillation patients: the RE-LY Trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy). *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(4):321-328.
22. Douxfils J, Tamigniau A, Chatelain B, et al. Comparison of calibrated chromogenic anti-Xa assay and PT tests with LC-MS/MS for the therapeutic monitoring of patients treated with rivaroxaban. *Thrombosis and haemostasis*. 2013;110(4):723-731.
23. Testa S, Tripodi A, Legnani C, et al. Plasma levels of direct oral anticoagulants in real life patients with atrial fibrillation: Results observed in four anticoagulation clinics. *Thrombosis research*. 2016;137:178-183.
24. Chan NC, Coppens M, Hirsh J, et al. Real-world variability in dabigatran levels in patients with atrial fibrillation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2015;13(3):353-359.
25. Samama MM, Guinet C, Le Flem L, Ninin E, Debue JM. Measurement of dabigatran and rivaroxaban in primary prevention of venous thromboembolism in 106 patients, who have undergone major orthopedic surgery: an observational study. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2013;35(2):140-146.
26. Gong IY, Kim RB. Importance of pharmacokinetic profile and variability as determinants of dose and response to dabigatran, rivaroxaban, and apixaban. *Can J Cardiol*. 2013;29(7 Suppl):S24-33.
27. Kubitza D, Roth A, Becka M, et al. Effect of hepatic impairment on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of a single dose of rivaroxaban, an oral, direct Factor Xa inhibitor. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;76(1):89-98.

