

Unravelling von Willebrand Factor

Citation for published version (APA):

van der Vorm, L. N. (2020). *Unravelling von Willebrand Factor: Active von Willebrand Factor in conditions of (un)balanced haemostasis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Optima Grafische Communicatie. <https://doi.org/10.26481/dis.20200710lv>

Document status and date:

Published: 01/01/2020

DOI:

[10.26481/dis.20200710lv](https://doi.org/10.26481/dis.20200710lv)

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

Take down policy

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

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Nederlandse samenvatting

NEDERLANDSE SAMENVATTING

In dit proefschrift beschrijven we onze studies met als doel om meer inzicht te krijgen in de *in vitro* en *in vivo* condities die bijdragen aan activatie van von Willebrand Factor (VWF) en binding van actief VWF aan bloedplaatjes. Hiertoe hebben we zowel mechanistische laboratorium studies als klinische studies in gezonde individuen en verschillende patiënten populaties uitgevoerd.

Hoofdstuk 1 van dit proefschrift vormt de algemene introductie, bestaande uit achtergrondinformatie over de bloedstolling en de rationale achter dit proefschrift. Naast de fysiologische hemostase worden afwijkingen in de hoeveelheid of functie van (actief) VWF besproken die de balans van de bloedstolling naar de bloedings- (bijvoorbeeld de ziekte van von Willebrand) of de trombotische kant (arteriële/veneuze trombose) kunnen laten doorslaan.

Gezien de grote hemostatische potentie van actief VWF is het van cruciaal belang om te begrijpen welke factoren bijdragen aan veranderingen in de hoeveelheid circulerend actief VWF en de interactie met bloedplaatjes. Dit is dan ook het overkoepelende doel van de studies in dit proefschrift. De belangrijkste "tool" waarmee we actief VWF en de interactie met bloedplaatjes hebben onderzocht is een antilichaam fragment bestaande uit een enkele zware keten (afgekort VHH). Deze VHH, genaamd S-VWFA1, is gebruikt in alle experimenten beschreven in dit proefschrift en bindt specifiek aan het A1 domein van actief VWF. Hieronder volgt een samenvatting van de uitgevoerde studies en de belangrijkste bevindingen.

Deel I. Detectie van actief VWF door een VHH: mechanismen en assay validatie

Aangezien bloedplaatjes net als onze VHH binden aan een epitoom in het VWF A1 domein, verwachtten we dat de VHH de interactie tussen bloedplaatjes en actief VWF zou kunnen blokkeren. In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift beschrijven we experimenten met als doel het in kaart brengen van het effect van S-VWFA1 VHH op de interactie tussen bloedplaatjes en VWF. In een flowcytometrische test en in licht transmissie aggregometrie kon S-VWFA1 de binding van bloedplaatjes aan VWF geactiveerd met ristocetine (i.e. een antibioticum dat VWF ontvouwt) en aan actief VWF met een type 2B mutatie volledig blokkeren. Echter, in een perfusie assay en in de PFA-200®, waarbij bloedplaatjes en VWF op hoge snelheid over een oppervlak met collageen stromen, kon S-VWFA1 de adhesie van plaatjes niet remmen, of pas bij heel hoge concentraties (>50 µg/mL). GPIb binding aan collageen-gebonden VWF in een statische assay bleef ook onaangedaan door S-VWFA1. Uit deze resultaten concluderen we dat S-VWFA1 alleen

bloedplaatjes binding aan actief VWF in oplossing blokkeert, maar niet aan collageen-gebonden actief VWF.

Neutralisatie van de interactie tussen bloedplaatjes en VWF zou een aantrekkelijke behandelingsstrategie zijn bij aandoeningen die gepaard gaan met verhoogde hoeveelheden circulerend actief VWF. Om te bepalen of een bepaalde ziekte geassocieerd is met verhoogde concentraties actief VWF dient eerst te worden onderzocht welke waarden men zou verwachten in een gezonde populatie. In **hoofdstuk 3** rapporteren we de technische validatie van een ELISA waarin S-VWFA1 gebruikt wordt om actief VWF te "vangen".¹ Deze assay was specifiek voor actief VWF, reproduceerbaar (intra- en inter-assay CVs tussen de 2.4–7.2% en 4.1–9.4%) en lineair in de range van 90.1–424.5% (t.o.v. normaal gepoold plasma). Daarnaast hebben we met deze assay actief VWF bepaald in 120 gezonde individuen. Deze waarden voor actief VWF correleerden significant met andere, gevestigde VWF assays en het referentie interval werd vastgesteld op 91.6–154.8%. De gevalideerde assay is vervolgens gebruikt om actief VWF te meten in gezonde individuen die intensief sporten en bij verschillende patiënten populaties.

Deel II. Effecten van (herhaalde) intensieve lichamelijke inspanning op (actief) VWF

Aan bovenstaand referentie interval is te zien dat de fractie actief VWF in de circulatie varieert tussen gezonde individuen. Eén van de niet-erfelijke factoren die het vrijkomen van VWF uit het endotheel stimuleert is intensieve lichamelijke inspanning. Het is algemeen bekend dat regelmatig bewegen het risico op hart- en vaatziekten verlaagt. Echter, meer en intensievere lichaamsbeweging is niet altijd beter en kan juist ook veneuze en arteriële trombose veroorzaken. Dit wordt ook wel de "exercise paradox" genoemd.

Sporten beïnvloedt de bloedstolling op verschillende manieren. Zo is bekend dat vooral in ongetrainde mensen acute hevige inspanning een verhoogde stollingsneiging veroorzaakt. Herhaaldelijk sporten (trainen) zou de hemostatische respons wellicht kunnen conditioneren, maar daarover is veel minder bekend. **Hoofdstuk 4** geeft daarom een overzicht van de effecten van herhaald intensief sporten op de bloedstolling, gebaseerd op recente literatuur. Daarnaast presenteren we in dit hoofdstuk data van een pilot studie waarin we de effecten van herhaald fietsen (80 km op zeeniveau, op submaximale intensiteit) op de bloedstolling hebben bestudeerd.² Het was reeds bekend dat endotheel activatie cruciaal is voor de toegenomen stollingsneiging als gevolg van acute intensieve lichamelijke inspanning. Echter, we vonden dat de toename van FVIII, VWF antigeen, propeptide en actief VWF kleiner werd op elk van de drie opvolgende dagen dat onze proefpersonen hetzelfde parcours fietsten. Dit effect suggereert ofwel

adaptatie van de respons van het endotheel op de inspanning of uitputting van de VWF voorraad in de endotheelcellen. De verhoogde FVIII concentratie resulteerde in een hogere piek trombine generatie. De bloedplaatjes activatie daarentegen, gemeten als P-selectine expressie na stimulatie met verschillende agonisten, nam juist af, en compenseert daarmee deels voor de endotheel-geïnduceerde protrombotische staat. Deze verlaagde bloedplaatjes activatie herstelde niet naar het originele niveau op de volgende dag voorafgaand aan het fietsen, duidend op uitputting van de respons van bloedplaatjes op herhaalde intensieve inspanning.

In een vervolgstudie, beschreven in **hoofdstuk 5** werd een extra variabele geïntroduceerd, namelijk hypoxie.³ Het is bekend dat trainen op grote hoogte, waar de zuurstofspanning lager is, leidt tot een verhoogde concentratie hemoglobine in het bloed, waardoor het zuurstoftransport naar o.a. de spieren verbetert. Echter, hypoxie induceert ook een verhoogde stollingsneiging, o.a. via een verhoogde FVIII concentratie. Aangezien zowel hypoxie als inspanning de stolling lijken te activeren, zou men verwachten dat inspanning op grote hoogte een wederzijds versterkend effect zou hebben. Het omgekeerde lijkt het geval in meerdere studies die beschrijven dat hypoxie de protrombotische effecten van inspanning juist dempt. In deze pilot studie werd onderzocht of dit ook geldt voor herhaalde inspanning, zoals optreedt bij training op grote hoogte en bij bergbeklimmers. Hiervoor voerden zes, lichamelijke fitte mannen in totaal 4 inspanningstesten (fietsen) van 2 uur uit: 1 keer op zeeniveau en 3 keer op achtereenvolgende dagen op 3,375 m hoogte. Naast markers voor endotheel activatie (actief VWF, VWF antigeen en propeptide) werden plasmatische stolling (trombine generatie), bloedplaatjesactiviteit en stolselafbraak gemeten. De metingen op zeeniveau bevestigden onze resultaten van de eerste fietsstudie, namelijk verhoogd actief VWF, VWF antigeen, FVIII en daardoor ook een verhoogde trombine generatie piek na het fietsen. Weer was de degranulatie (P-selectine expressie) van bloedplaatjes juist verlaagd na de inspanningstest. Op 3,375 m hoogte was het aggregatie potentiaal van de bloedplaatjes ook lager. Al met al kunnen we concluderen dat intensieve lichamelijke inspanning een verhoogde stollingsneiging induceert die met name wordt gemedieerd door het endotheel (toename in (actief) VWF en FVIII). Na herhaalde inspanning wordt deze respons van het endotheel kleiner. Hypoxie dempt de protrombotische staat verder door het verminderen van de plaatjesactivatie.

De twee bovenstaande pilot studies hebben een aantal beperkingen, met name het kleine aantal deelnemers, bovendien allemaal mannen, waardoor de resultaten voorzichtig moeten worden geïnterpreteerd. Een grotere follow-up studie is nodig om klinisch relevante veranderingen te identificeren en om te onderzoeken of onze bevindingen ook geldig zijn in vrouwen.

Deel III. Actief VWF in aandoeningen met ongebalanceerde bloedstolling

Na het bestuderen van actief VWF in gezonde individuen in de eerste twee delen van dit proefschrift, hebben we gekeken naar de rol van actief VWF in een drietal aandoeningen die geassocieerd zijn met een trombotische- of bloedingsneiging.

Hoofdstuk 6 rapporteert een prospectieve observationele cohort studie in patiënten met chronische obstructieve longziekte (COPD). Deze patiënten hebben een verhoogd risico op ischemische hart- en vaatziekten, met name tijdens en kort na een exacerbatie (i.e. plotselinge verergering van de symptomen die langer dan 2 dagen aanhouden). Exacerbaties worden meestal veroorzaakt door een infectie en gaan gepaard met verhoogde systemische ontsteking. Ontsteking is bovendien sterk gelinkt aan bloedstolling. Het doel van deze studie was daarom om de effecten van een exacerbatie van COPD op de bloedplaatjes, het endotheel en de plasmatische stolling in kaart te brengen, en deze te relateren aan de mate van ontsteking. Bij 52 patiënten werd bloed verzameld tijdens de exacerbatie, 3 dagen erna (tijdens behandeling in het ziekenhuis), en bij 32 van deze patiënten ook bij herstel (~8 weken na ontslag). Vergeleken met herstel werd er tijdens exacerbatie een stijging in het aantal plaatjes-monocyten complexen (PMCs) vastgesteld, maar geen verhoogde P-selectine expressie of activatie van de fibrinogeenreceptor op plaatjes. Bovendien was er tijdens een exacerbatie sprake van chronische endotheel activatie die resulteert in verhoogde VWF antigeen en activiteit en in stijging van actief VWF, maar in stabiele VWF propeptide. Ten derde was de trombine generatie (piek, ETP en snelheid) verhoogd tijdens een exacerbatie vergeleken met herstel. PMC vorming, (actief) VWF en trombine generatie waren allen positief geassocieerd met de ontstekingsmarker CRP. Deze bevindingen dragen bij aan het begrip van de protrombotische staat van COPD patiënten tijdens en na een exacerbatie. Ze vormen zo de basis voor toekomstige studies naar markers die het risico van deze patiënten op een cardiovasculair event kunnen voorspellen en daarmee richting kunnen geven aan het beleid voor trombose profylaxe.

Een andere ziekte die geassocieerd is met zowel systemische ontsteking als een verhoogd trombotisch risico is chronische nierinsufficiëntie/nierfalen. Een eerdere studie vond endotheel disfunctie in deze patiënten, gekenmerkt door toename in VWF antigeen en FVIII activiteit.⁴ Wij waren geïnteresseerd in de hoeveelheid actief VWF in het bloed van deze patiënten en in de invloed van het stadium van nierinsufficiëntie en het type dialyse. In deze studie, beschreven in **hoofdstuk 7**, vonden we inderdaad verhoogde actief VWF waarden in alle patiëntengroepen (chronische nierinsufficiëntie, eindstadium nierfalen met hemodialyse of peritoneaal dialyse) ten opzichte van gezonde controles.⁵ Ook totaal VWF was verhoogd maar de verschillen tussen de groepen

waren minder groot. Er was een zichtbaar toenemende trend van actief VWF, maar niet van VWF antigeen (totaal VWF), met de ernst van de nierinsufficiëntie. Het achterliggende mechanisme is waarschijnlijk chronische blootstelling van het endotheel aan inflammatoire cytokines en oxidatieve stress, waardoor steeds meer endotheel schade ontstaat en UL-VWF vrijkomt in de circulatie. Bovendien vond een eerdere studie in patiënten met chronische nierinsufficiëntie verminderde ADAMTS13 activiteit (het enzym dat UL-VWF in kleinere fragmenten knipt) in vergelijking met controles.⁶ Daardoor zal een deel van het UL-VWF niet worden geknipt en in zijn actieve conformatie blijven. Eerder werd aangetoond dat hoge concentraties VWF een voorspeller zijn voor microalbuminurie, hart-vaat ziekten en mortaliteit in deze patiëntengroep. Op basis van onze resultaten zouden actief VWF levels wellicht nog sterker geassocieerd kunnen zijn met deze klinische uitkomsten. Grotere studies met klinische follow-up moeten aantonen of dit daadwerkelijk het geval is.

Terwijl de meeste studies naar actief VWF focussen op ziekten die geassocieerd zijn met trombotische complicaties (door verhoogd actief VWF), kan spontane interactie tussen actief VWF en plaatjes de hemostatische balans ook doen doorslaan naar de bloedingskant, zoals in von Willebrand ziekte type 2B. Het is echter niet bekend of de fractie van actief VWF in de circulatie ook een rol speelt in patiënten met een milde bloedingsneiging zonder trombocytopenie. De diagnose van deze patiënten is erg lastig en in veel gevallen wordt de onderliggende oorzaak nooit gevonden. In **hoofdstuk 8** hebben we daarom actief VWF bepaald in een populatie van 109 patiënten met een milde bloedingsdiathese. Actief VWF correleerde in deze populatie significant met de andere VWF parameters, net als in gezonde individuen (zie **hoofdstuk 3**). Actief VWF en VWF antigeen levels, alsook VWF ristocetine cofactor activiteit, waren relatief lager dan de vastgestelde referentie intervallen, maar dit was niet significant. Actief VWF was ook niet significant verschillend tussen individuen met en zonder verhoogde klinische bloedingscore (ISTH-BAT) en tussen individuen met een verdenking op de ziekte van von Willebrand versus andere oorzaken van de bloedingsneiging. Met deze studie tonen we aan dat kwantificeren van actief VWF geen diagnostische meerwaarde heeft naast de gevestigde VWF antigeen en VWF ristocetine cofactor activiteit assays in deze populatie.

Eerdere studies hebben aangetoond dat naast ADAMTS13 ook plasmine VWF kan knippen.^{7,8} Om meer inzicht te verwerven in de effecten van plasmine op (actief) VWF, plaatjes en hun interactie hebben we een grondige literatuurstudie gedaan, beschreven in **hoofdstuk 9** van dit proefschrift. Interessant genoeg wordt er meer plasmine gevormd in patiënten tijdens een acute episode van TTP, hetgeen suggereert dat plasmine als "back-up" mechanisme voor ADAMTS13 zou kunnen werken om grote UL-VWF

multimeren te klaren.⁷ Het toedienen van trombolytica (recombinant tPA) zou mogelijk kunnen werken om tijdelijk hogere concentraties plasmine te genereren. Naast het knippen van VWF en zijn primaire substraat fibrine heeft plasmine nog veel andere effecten, waaronder proteolyse van een groot aantal andere stoffactoren.⁹ Daarnaast beïnvloedt plasmine de bloedplaatjesactiviteit, o.a. door het knippen van verschillende receptoren betrokken bij plaatjes activatie (PAR-4), adhesie en aggregatie (GP1b, GPIIb/IIIa). Hoewel het onwaarschijnlijk is dat plasmine-gemedieerde plaatjesactivatie een rol speelt bij fysiologische hemostase, zouden deze effecten wel van belang kunnen zijn na het toedienen van trombolytica, aangezien de concentratie van plasmine dan supra-fysiologisch hoog is. Mechanistische studies zijn nodig om een beter begrip te krijgen van de effecten van plasmine op bloedplaatjes activatie en binding aan (actief) VWF.

Tot slot worden in **hoofdstuk 10** de belangrijkste conclusies samengevat en geplaatst in de context van de literatuur. Ook worden mogelijke implicaties van onze bevindingen en richtingen voor toekomstig onderzoek besproken. Neutralisatie van de interactie tussen bloedplaatjes en VWF is een potentiële strategie ter preventie/behandeling van hemostatische complicaties veroorzaakt door verhoogde hoeveelheden circulerend actief VWF. De eerste *in vitro* experimenten met S-VWFA1 duiden op mogelijke voordelige eigenschappen van deze VHH, namelijk het blokkeren van bloedplaatjes binding aan VWF in oplossing maar niet aan collageen-gebonden VWF. *In vivo* experimenten in diermodellen zijn nodig om te bepalen of S-VWFA1 daadwerkelijk excessieve plaatjes-VWF interactie (zoals in TTP en de ziekte van von Willebrand type 2B) kan oplossen. Daarnaast bevestigen de bevindingen in COPD en CKD patiënten dat het kwantificeren van actief VWF in plasma informatie kan geven over de onderliggende oorzaken van een verhoogd trombotisch risico. Echter, er zijn grote, klinische uitkomst studies nodig om vast te stellen wat de meerwaarde is van actief VWF naast bestaande VWF assays (o.a. VWF antigeen, ristocetine cofactor activiteit, VWF-GPIbM binding) als biomarker voor hart- en vaatziekten, in de diagnostiek en/of de monitoring van therapie.

REFERENTIES

1. van der Vorm LN, Li L, Huskens D, Chayoua W, Kelchtermans H, de Groot PG, et al. Analytical characterization and reference interval of an enzyme-linked immunosorbent assay for active von Willebrand factor. *PLoS One*. 2019;14(2):e0211961.
2. van der Vorm LN, Huskens D, Kicken CH, Remijn JA, Roest M, de Laat B, et al. Effects of Repeated Bouts of Exercise on the Hemostatic System. *Semin Thromb Hemost*. 2018;44(8):710-22.
3. Kicken CH, van der Vorm LN, Zwaveling S, Schoenmaker E, Remijn JA, Huskens D, et al. A Hypoxic Environment Attenuates Exercise-Induced Procoagulant Changes Due to Decreased Platelet Activation. *TH Open*. 2019;3(3):e216-e26.
4. Huang MJ, Wei RB, Wang Y, Su TY, Di P, Li QP, et al. Blood coagulation system in patients with chronic kidney disease: a prospective observational study. *BMJ Open*. 2017;7(5):e014294.
5. van der Vorm L, Visser R, Huskens D, Veninga A, Adams D, Remijn J, et al. Circulating active von Willebrand factor levels are increased in chronic kidney disease and end-stage renal disease. *CKJ*. 2019:1-3.
6. Shen L, Lu G, Dong N, Jiang L, Ma Z, Ruan C. Von Willebrand factor, ADAMTS13 activity, TNF-alpha and their relationships in patients with chronic kidney disease. *Exp Ther Med*. 2012;3(3):530-4.
7. Tersteeg C, de Maat S, De Meyer SF, Smeets MW, Barendrecht AD, Roest M, et al. Plasmin cleavage of von Willebrand factor as an emergency bypass for ADAMTS13 deficiency in thrombotic microangiopathy. *Circulation*. 2014;129(12):1320-31.
8. Brophy TM, Ward SE, McGimsey TR, Schneppenheim S, Drakeford C, O'Sullivan JM, et al. Plasmin Cleaves Von Willebrand Factor at K1491-R1492 in the A1-A2 Linker Region in a Shear- and Glycan-Dependent Manner In Vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(5):845-55.
9. van der Vorm LN, Remijn JA, De Laat B, Huskens D. Effects of Plasmin on von Willebrand Factor and Platelets: A Narrative Review. *TH Open*. 2018;2(2):e218-e28.