

Managing anticoagulant therapies using innovative thrombin generation assays

Citation for published version (APA):

Bloemen, S. (2014). *Managing anticoagulant therapies using innovative thrombin generation assays*. 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

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.

Samenvatting

In dit proefschrift wordt het gebruik van de trombinegeneratie test beschreven voor het controleren van therapie met antistollingsmiddelen (anticoagulantia). De trombinegeneratie (TG) test of 'Calibrated Automated Thrombinography (CAT)' is een test die tot op heden voornamelijk in onderzoekslaboratoria gebruikt wordt en nog niet is ingevoerd als test in routinelaboratoria van ziekenhuizen. Aan de bestaande routinetesten zijn voor- en nadelen verbonden. Enkele voordelen zijn dat de metingen snel gebeuren en dat de testen vaak simpel uit te voeren zijn. Nadelen zijn dat de testen niet specifiek zijn, meestal niet het hele stollingssysteem voorstellen en dat één test niet de effecten van alle anticoagulantia kan meten.

Een overzicht van de algemene hemostase wordt gegeven in **hoofdstuk 1**. De verschillende anticoagulantia die in gebruik zijn of recent ontwikkeld zijn, worden aangehaald en hun werking, samen met de aangrijpingspunten in het stollingsschema, wordt omschreven. Ook wordt de TG test uitgelegd en worden redenen aangedragen waarom dit een veelbelovende test is die zich goed leent voor het evalueren van de effecten van de verschillende anticoagulantia. De TG test in volbloed is recent ontwikkeld en wordt in dit inleidend hoofdstuk eveneens besproken.

Hoofdstuk 2 licht het gebruik van de TG test verder toe. De redenen waarom deze test gebruikt kan worden en de manier waarop de test geïnterpreteerd kan worden komen aan bod. De TG test is een goede techniek om een tromboseneiging, maar ook een bloedingsneiging op te sporen. Aangezien deze test ook gevoelig is voor alle anticoagulantia die tot nu getest werden, zou deze techniek kunnen gebruikt worden voor het controleren van een behandeling met anticoagulantia. Wanneer de endogene trombine potentiaal (ETP), een parameter van de TG test, lager is dan 20% van de normale waarde stijgt het bloedingsrisico. Wanneer deze waarde gestegen is (>100%) is er een verhoogd risico op trombose. Naast plaatjesarm plasma kan ook plaatjesrijk plasma getest worden, waardoor de invloed van bloedplaatjes op de stollingsprocessen kan onderzocht worden.

Vitamine K antagonisten (VKAs) zijn wereldwijd de meest en langst gebruikte orale anticoagulantia. In **hoofdstuk 3** werden patiënten die VKAs nemen onderzocht door middel van CAT. In dit onderzoek werd bekeken of de toevoeging van trombomoduline (TM) aan de test in plasma meer informatie geeft over het effect van deze orale anticoagulantia. VKAs remmen namelijk niet alleen de procoagulante factoren II, VII, IX en X, maar ook de anticoagulante proteïnes C en S. TM is een eiwit dat zich op de vaatwand bevindt en moet daarom, net als weefselfactor, aan de test worden toegevoegd. Wanneer het gevormde trombine bindt aan TM, activeert dit proteïne C dat vervolgens samen met cofactor proteïne S factor Va en VIIIa remt. Dus door TM aan de test toe te voegen kunnen we ook de remming van proteïne C en S door VKAs bestuderen. In dit hoofdstuk hebben we aangetoond dat er, door de daling van proteïne C- en S-activiteit veroorzaakt door de VKAs, TM resistentie optreedt waardoor de trombinevorming verhoogd is in deze patiënten. Dit was vooral duidelijk bij de groep met een International Normalized Ratio (INR) tussen 1.0 en 2.0. Uit deze studie kan worden afgeleid dat toevoeging van TM resulteert in een betere weergave van de fysiologische processen.

In **hoofdstuk 4** wordt verder ingegaan op de effecten van TM bij het testen van de stolling van patiënten die VKAs innemen en ditmaal niet alleen in plasma, maar ook in volbloed. Door TG te meten in volbloed kan ook de functie van rode en witte bloedcellen samen met de bloedplaatjes in de stolling bestudeerd worden. Aangezien dit de eerste studie was die VKAs in volbloed analyseert, werd eerst onderzocht of de parameters van volbloed TG evenveel informatie geven als de parameters van TG in plasma. Alle parameters in volbloed bleken significant te correleren met de parameters in plasma. De TG parameters (in volbloed en plasma) correleerden met de INR. De tijdsafhankelijke parameters (lag time en time-to-peak) correleerden lineair positief met de INR terwijl de functionele parameters (ETP en peak) op hyperbole wijze negatief correleerden met de INR. De concentraties aan stollingsfactoren werden eveneens bepaald. Hieruit kon worden besloten dat, in vergelijking met gezonde donoren, er geen significant verschil was voor antitrombine en factor V. De factoren II, VII, IX en X, alsook

proteïnes C en S waren naar verwachting significant lager in de patiënten. Factor VIII en fibrinogeen, daarentegen, waren significant verhoogd in de patiënten (184% vs. 118% en 4.0 g/l vs. 3.2 g/l, respectievelijk). Dit kan eventueel resulteren in een hoger risico op trombose na het stopzetten van de therapie. De fibrinenetwerken gevormd tijdens de volbloed TG test werden bestudeerd door middel van 'scanning electron microscopy' (SEM). De fibrinevezels van de patiënten waren significant dunner dan die van de gezonde donoren, hoewel er minder trombine werd gevormd. De verhoogde fibrinogeen concentratie biedt hier een mogelijke verklaring voor.

De informatie van dezelfde patiënten wordt in **hoofdstuk 5** verder geanalyseerd. Hiermee werd aangetoond dat de TG test in volbloed een voorspellende waarde heeft voor het optreden van bloedingen in patiënten die VKAs innemen. Hematocriet, hemoglobine concentratie, TG in plasma en de INR gaven geen uitsluitsel over een hoger risico op bloeden bij de patiënten. Dit wijst erop dat het fosfolipide oppervlak dat voorzien wordt door de rode bloedcellen tijdens de stolling een rol speelt in de bloedingpathologie van deze patiënten. Op welke wijze dit gebeurt, moet echter verder onderzocht worden.

Naast VKAs bestaan er verschillende andere soorten anticoagulantia, bv. heparines die parenteraal worden toegediend, maar ook de nieuwe, niet-vitamine K antagonist orale anticoagulantia (NOACs) worden steeds vaker gebruikt. Er wordt beweerd dat patiënten die deze directe trombine (factor IIa) en factor Xa remmers innemen, in tegenstelling tot de VKAs, geen opvolging nodig hebben. De in vitro effecten van verschillende soorten anticoagulantia worden vergeleken in **hoofdstuk 6**. Hier bekeken we de invloed van een vaste concentratie ongefractioneerd heparine (indirecte IIa en Xa remmer), pentasaccharide (indirecte Xa remmer), dermataan sulfaat (indirecte IIa remmer), melagatran (directe IIa remmer) en otamixaban (directe Xa remmer) op de TG test. De remming vertoont een hoge variabiliteit tussen de verschillende donoren. Deze variatie was niet minder bij de directe inhibitoren vergeleken met de indirecte remmers. Hieruit blijkt dat er voorzichtigheid is geboden bij het besluiten tot niet controleren van het effect van de nieuwe anticoagulantia bij patiënten.

Wanneer we de TG bepaalden in de aanwezigheid van directe factor Xa remmers (zoals otamixaban en rivaroxaban) werd een atypische curve gevonden. In **hoofdstuk 7** wordt deze curve beschreven. Deze curve vertoont namelijk een vrij steile initiële helling gevolgd door een plateau en daarna een steile neerwaartse helling. Wanneer de intrinsieke factoren uitgeschakeld werden, wijzigde het eerste deel van de curve. Het tweede deel van de curve daarentegen veranderde wanneer de extrinsieke factoren niet bij de reactie betrokken werden. Dit wijst erop dat de intrinsieke en extrinsieke stollingscascade in verschillende mate bijdragen tot verschillende delen van de TG curve. Verder onderzoek moet uitwijzen of de vorm van de curve ook een relatie heeft met de klinische uitwerking van deze medicijnen. Mogelijk komen er minder bloedingen voor wanneer trombine onder deze omstandigheden gevormd wordt.

In **hoofdstuk 8** bestuderen we de nieuwe anticoagulantia en hun invloed op de TG test. We gaan ook dieper in op de vraag of monitoring van de anticoagulantia al dan niet nuttig kan zijn. Aangezien patiënten die deelnemen aan de klinische trials een strenge selectie hebben ondergaan, komen deze populaties vaak niet overeen met de normale populatie. In het echte leven kunnen hierdoor meer bloedingen en tromboses voorkomen dan in de studiepopulaties. Bijgevolg is een vaste dosis van de directe remmers die patiënten voorgeschreven krijgen, waarschijnlijk niet voor elk individu optimaal.

De belangrijkste conclusies worden samengevat en besproken in **hoofdstuk 9**. De toegevoegde waarde van de aanwezigheid van TM tijdens de TG test wordt toegelicht met behulp van de resultaten uit verschillende studies. De eindconclusie is dat het toevoegen van TM aan de test een betere weergave geeft van de fysiologische processen die in het lichaam plaatsvinden. De onduidelijke resultaten verkregen na toevoeging van TM in volbloed vereisen verder onderzoek. Daarnaast wordt de mogelijkheid van de TG test besproken om de uitwerking van verschillende anticoagulantia te onderzoeken, zowel *ex vivo* als *in vitro*. Hieruit is gebleken dat de volbloed TG test een voorspellende waarde heeft voor bloedingen in patiënten die VKAs innemen. Ook werd de TG test gebruikt om de inter-individuele variatie van verschillende anticoagulantia te bestuderen. De atypische

vorm van de TG curve in de aanwezigheid van directe factor Xa remmers werd tevens onderzocht.

We tonen aan dat de volbloed TG test voor het eerst met succes in klinische studies werd gebruikt. Deze test ligt dicht bij de fysiologie, aangezien alle bloedcellen in de reactie betrokken worden. Het effent ook de weg voor een point-of-care test die het makkelijker maakt om patiënten op een snelle manier te testen. Om de fysiologie nog beter na te bootsen werd er recent ook een test ontwikkeld die volbloed kan analyseren onder continue stroming. Na een succesvolle technische validatie wordt de toegevoegde waarde van deze veelbelovende techniek momenteel getest in verschillende klinische studies.