

Interfacial Electrochemistry of Blood Coagulation Factors

Fundamentals and Applications

Doctoral Thesis

Author(s):

Simona, Benjamin R.E.

Publication date:

2015

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010504128>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 22562

Interfacial electrochemistry of blood coagulation factors: Fundamentals and applications

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

BENJAMIN R. E. SIMONA

MSc. Materials Science ETH

born on 04.11.1986

citizen of

Locarno (TI)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. János Vörös, examiner

Prof. Dr. Matthias Lütolf, co-examiner

PD Dr. René Brunisholz, co-examiner

2015

SUMMARY

Blood coagulation factors are proteins involved in a complex cascade of biochemical reactions regulating hemostasis, which is the physiological process by which bleeding is stopped. One of the fundamental steps in hemostasis is the transition from the liquid state of blood to the gel state; transition that we refer to as blood coagulation. This transition is mediated by the polymerization of the blood coagulation factor I (fibrinogen) and consequent formation of fibrin fibers. The polymerization process is triggered by the activation of fibrinogen, mediated by the coagulation factor II (thrombin). Finally, the transglutaminase coagulation factor XIII crosslinks fibrin fibers to chemically and mechanically stabilize the clot.

This thesis constitutes an experimental study of the electrochemical behavior of fibrinogen and coagulation factor XIII at interfaces. First studies on the electrochemical behavior of coagulation factors date the 1960's and 1970's. The rapid development of novel techniques in cardiac surgery occurring in those years, led scientists and physicians to study the interaction between blood and its components with artificial surfaces, in an attempt to find minimally thrombogenic implant surfaces. P. N. Sawyer (1926-2014) pioneered the study of the electrochemistry of blood, and demonstrated the influence of surface potentials and electrochemical reactions involving blood coagulation factors in coagulation at interfaces.

In the first part of this thesis, I employed surface-sensitive techniques to study the coagulation of blood at electrified interfaces and the behavior of fibrinogen at cathodic and anodic potentials. The work of Sawyer and co-workers, extensively described in Chapter 1, represents the starting point of my investigation. In particular, using

the quartz crystal microbalance with dissipation monitoring technique, coupled with an electrochemical setup, I first confirmed the reduced coagulation of blood at cathodic potentials. Subsequently, by using surface-sensitive and proteomics techniques, I investigated the nature of the fibrinogen cathodic products and its ability to electropolymerize at anodic potentials. This set of experiments has an impact in the field of bioelectronics, as electrodes are often in contact with blood for stimulation or sensing purposes. Understanding how blood components react at the interface with electrodes is of fundamental interest for their optimal design and operation. Furthermore, several of the aspects related to blood electrochemistry have an impact on the rational design of minimally thrombogenic blood-contacting devices.

In the second part of this thesis, I describe the use of electrochemically generated pH changes at interfaces to control the enzymatic activity of the coagulation factor XIII. Controlling the activity of factor XIII has for long been essential to rationally use this enzyme to crosslink food proteins to form gels. In recent years, researchers have developed synthetic hydrogels based on poly(ethylene glycol) (PEG) that can be crosslinked under physiological and biocompatible conditions via factor XIII. These gels are used in the biomedical field as soft substrates for the culture of cells in three dimensions. Engineering these substrates to mimic as closely as possible the natural tissue environment is an active field of research, and PEG gels are among the most used substrates to achieve this goal. In this work, I show that electrochemically controlling the factor XIII-mediated crosslinking of PEG gels can be used to create structured PEG gels. In particular, by exploiting the pH-dependent activity of this transglutaminase and the ability to locally modify the solution pH close to electrodes, I show the spatial control of the polymerization reaction. Hydrogel patterns on surfaces can be created rapidly and cost-effectively. In addition, the prevention of the crosslinking reaction at gel surface allows the fabrication of crosslinking density gradients that can be used to enhance the gel infiltration of cells seeded topically.

In conclusion, studying the nature and activity of blood coagulation factors at the interface with electrodes opens new perspectives in the development of new blood-contacting devices and in the manufacturing of structured soft materials for biomedical applications.

SOMMARIO

I fattori della coagulazione del sangue sono proteine implicate in una complessa cascata di reazioni biochimiche volte a regolare l'emostasi, ovvero il processo fisiologico responsabile dell'arresto di un'emorragia. Una tappa fondamentale di questo processo consiste nella transizione dallo stato liquido del sangue allo stato gelificato; transizione alla quale ci riferiamo con il termine di coagulazione del sangue. A mediare questa transizione è la polimerizzazione del fattore coagulante I (fibrinogeno) e la conseguente formazione di fibre di fibrina. Il processo di polimerizzazione viene iniziato a seguito dell'attivazione del fibrinogeno da parte del fattore coagulante II (trombina). Infine, la transglutaminasi fattore coagulante XIII è responsabile del cosiddetto crosslinking (legame covalente incrociato) delle fibre di fibrina, il quale dona stabilità chimica e meccanica al coagulo.

Questa tesi tratta lo studio empirico del comportamento elettrochimico del fibrinogeno e del fattore della coagulazione XIII a varie interfacce. I primi studi concernenti il comportamento elettrochimico dei fattori della coagulazione datano agli anni '60 e '70. Il rapido sviluppo nelle tecniche di cardiocirurgia verificatosi in quegli anni, spinse scienziati e medici a studiare l'interazione tra il sangue e le sue componenti con superfici artificiali, nel tentativo di trovare superfici con la minima propensione ad indurre la coagulazione sanguigna. P. N. Sawyer (1926-2014) fu pioniere nello studio dell'elettrochimica del sangue. Egli dimostrò il ruolo di potenziali di superficie e di reazioni elettrochimiche coinvolgenti fattori coagulanti nel processo di coagulazione in superficie.

Nella prima parte di questa tesi, ho utilizzato tecniche sensibili ai cambiamenti di superficie per studiare la coagulazione del sangue ad

interfacce elettrificate e il comportamento del fibrinogeno a potenziali catodici e anodici. Il lavoro di Sawyer e collaboratori costituisce il punto di partenza della mia ricerca. In particolare, ho utilizzato una tecnica denominata “quartz crystal microbalance with dissipation monitoring” in combinazione ad un apparato di misurazione elettrochimica ed ho confermato la ridotta coagulazione del sangue in prossimità di superfici catodiche. In seguito, sempre utilizzando tecniche sensibili a cambiamenti di superfici e tecniche di proteomica, ho investigato la natura dei prodotti catodici del fibrinogeno e la sua capacità ad elettropolimerizzare a potenziali anodici. Questi esperimenti hanno un impatto diretto nel campo della bioelettronica, in quanto elettrodi di vario tipo sono sovente in contatto con il sangue per applicazioni di stimolazione o di monitoraggio e rilevazione biologica. Comprendere le reazioni delle componenti del sangue all’interfaccia con elettrodi è di fondamentale importanza, al fine di ottimizzare il design e l’utilizzo di quest’ultimi. Inoltre, molti aspetti legati all’elettrochimica del sangue hanno un impatto diretto sul design di futuri strumenti ed apparecchiature che, a contatto col sangue, minimizzano la sua coagulazione in superficie.

Nella seconda parte di questa tesi, descrivo l’utilizzo di cambiamenti interfacciali di pH, generati elettrochimicamente, al fine di controllare l’attività enzimatica del fattore della coagulazione XIII. Il controllo dell’attività di questo enzima è da molto tempo essenziale per il suo utilizzo razionale nel legare proteine alimentari e produrre gel. Recentemente, ricercatori hanno sviluppato idrogel sintetici a base di glicole polietilenico (PEG), i quali possono essere formati in condizioni fisiologiche e biocompatibili attraverso l’azione del fattore XIII. Questi gel sono comunemente utilizzati nell’ambito biomedico come substrati soffici per la cultura cellulare in tre dimensioni. L’ingegneria di tali substrati, volta a renderli il più simili possibile al naturale ambiente tissulare umano, rappresenta un campo di ricerca molto attivo. Gli idrogel a base di PEG sono tra i substrati più usati per questo scopo. In questo lavoro ho dimostrato che l’utilizzo dell’elettrochimica per controllare la polimerizzazione di gel di PEG permette la produzione di ambienti di cultura cellulare

strutturati. In particolare, sfruttando l'attività pH-dipendente della transglutaminasi fattore XIII e l'abilità di modificare il pH di soluzioni in prossimità di elettrodi, è possibile controllare localmente il processo di gelificazione. Non solo possiamo dunque creare pattern di gel su vari supporti, ma anche gel con gradienti di densità alla loro superficie. Questi gradienti di densità stimolano l'infiltrazione all'interno del gel da parte di cellule depositate topicamente.

In conclusione, lo studio della natura ed attività dei fattori di coagulazione all'interfaccia con elettrodi apre nuove prospettive nello sviluppo di apparecchiature a contatto con il sangue e nella fabbricazione di materiali soffici strutturati per applicazioni biomediche.