

ESTUDIO DE HEPARINAS Y HEPARINOIDE DE BAJO PESO MOLECULAR,  
PENTASACARIDO Y HEPARINA NO FRACCIONADA EN UN MODELO DE  
TROMBOSIS *IN VITRO*. EFECTO SOBRE EL DEPOSITO DE PLAQUETAS Y  
LA FORMACION DE FIBRINA.

LOZANO MOLERO, MIGUEL  
DEP. MEDICINA

presentada por Miguel LOZANO MOLERO, licenciado en Medicina y Cirugía  
Universidad de Barcelona, para optar al grado de Doctor.

Barcelona, Septiembre de 1992

(043)92  
LOZ



## **6. Resultados**

### 1. Dosis mínima de cada uno de los glicosaminoglicanos en estudio que inhibe la formación de trombina *in vitro*.

La concentración de cada uno de los GAGs a usar en los experimentos de flujo se seleccionó en base a la mínima cantidad que se requería para inhibir completamente la formación de trombina con sangre mantenida en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. Como indicador de la formación de la trombina se tomó la concentración de FPA. En las Figuras 12, 13, 14, 15 y 16 se muestra la evolución en el tiempo de la concentración de FPA (en nmol/l) para cada uno de los GAGs estudiados. Como consecuencia de estos experimentos se decidió utilizar las siguientes concentraciones en los experimentos bajo condiciones de flujo Fragmin® 20 UI/ml, Fraxiparine® 30 U IC/ml, Lomoparan® 10 U anti Xa/ml, Org 31550 200 U anti Xa/ml y HNF 5 UI/ml.

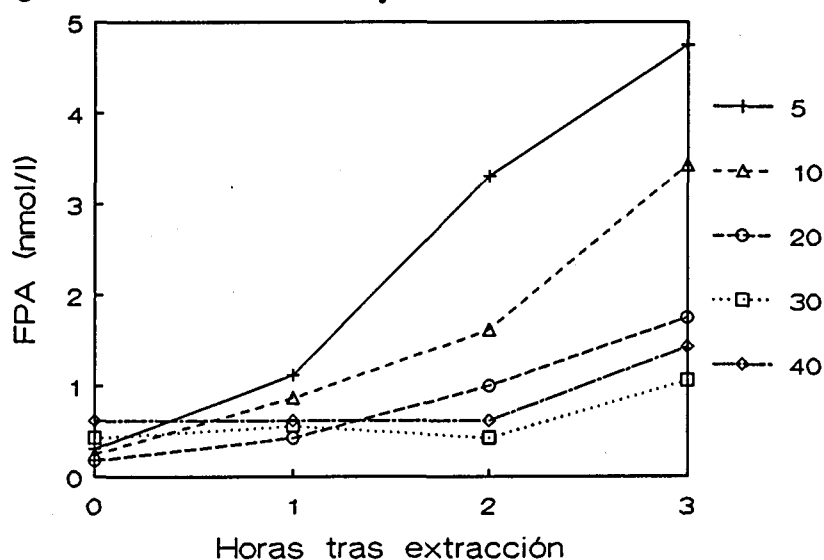
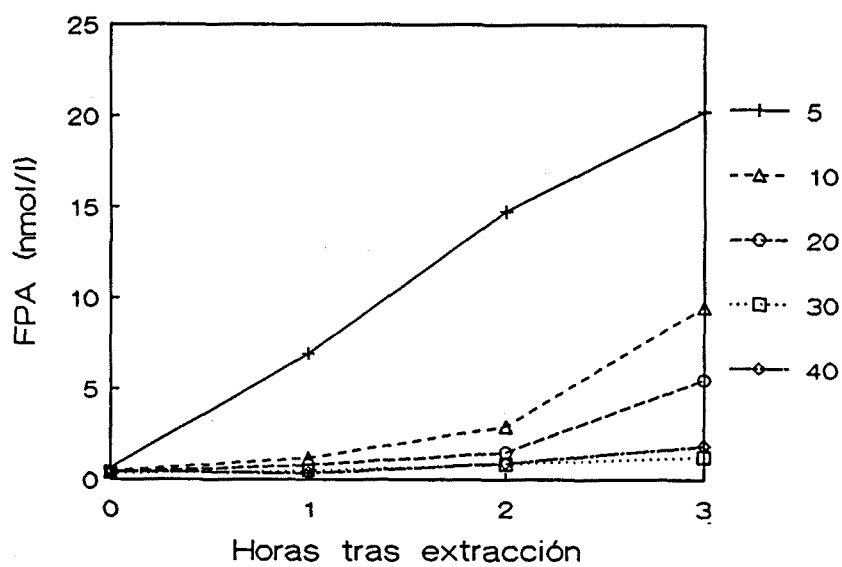
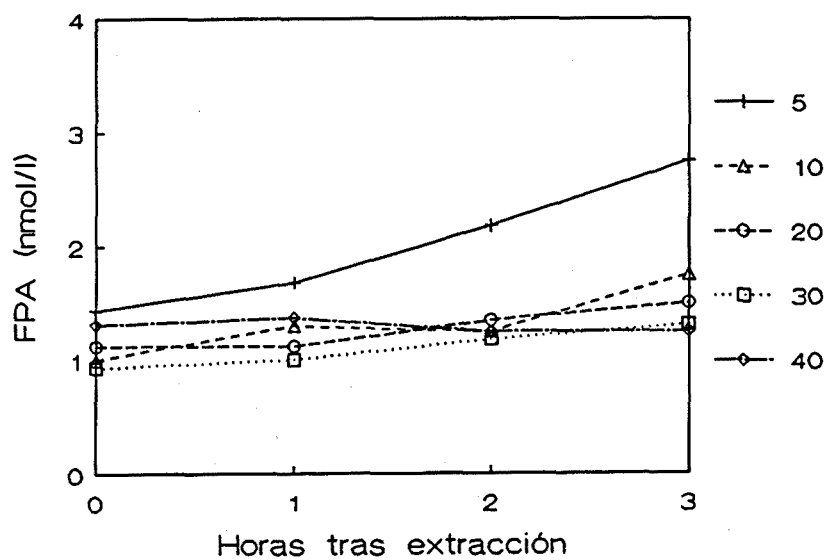


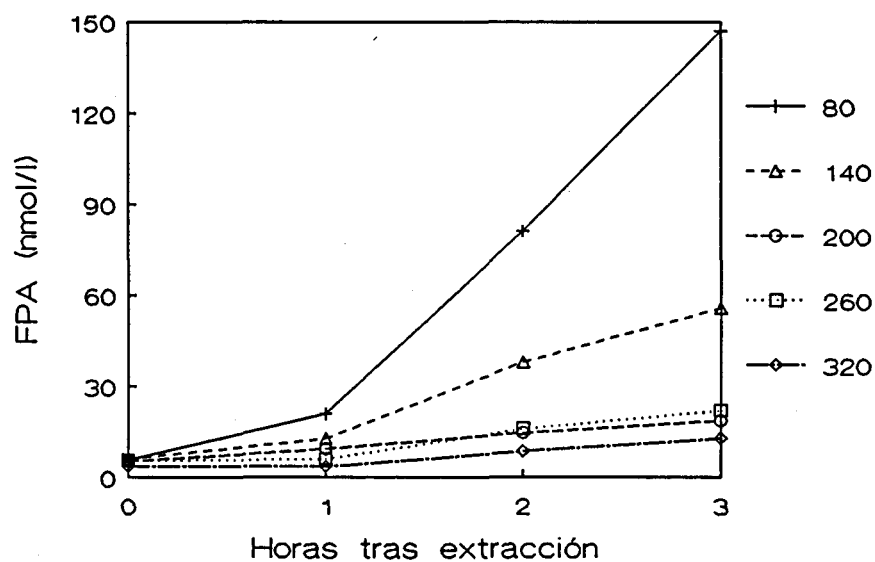
Figura 12. Aumento en la concentración de fibrinopéptido A en sangre anticoagulada con concentraciones crecientes (en U anti Xa/ml) de Fragmin® y mantenida a temperatura ambiente durante 3 horas.



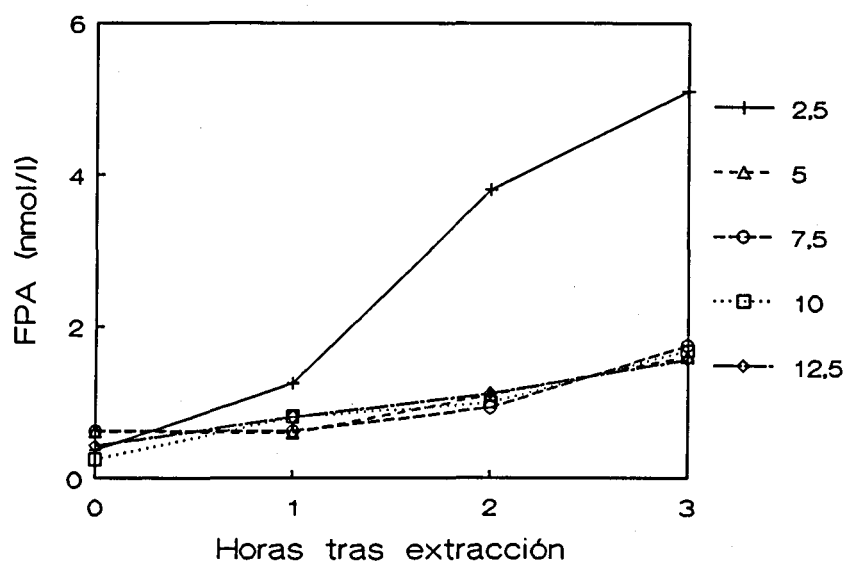
**Figura 13.** Aumento en la concentración de fibrinopéptido A en sangre anticoagulada con concentraciones crecientes de Fraxiparine® (en U IC/ml) y mantenida a temperatura ambiente durante 3 horas.



**Figura 14.** Aumento en la concentración de fibrinopéptido A en sangre anticoagulada con concentraciones crecientes de Lomoparan® (en U anti Xa/ml) y mantenida a temperatura ambiente durante 3 horas.



**Figura 15.** Aumento en la concentración de FPA en sangre anticoagulada con concentraciones crecientes del pentasacárido Org 31550 (en U anti Xa/ml) y mantenida a temperatura ambiente durante 3 horas.



**Figura 16.** Aumento en la concentración de fibrinopéptido A en sangre anticoagulada con concentraciones crecientes de heparina no fraccionada (en UI/ml) y mantenida a temperatura ambiente durante 3 horas.

Estas concentraciones obtenidas en condiciones estáticas se recomprobaron en perfusiones sobre MEC de células endoteliales no estimuladas. Tras la realización de estos experimentos fue necesario aumentar ligeramente las concentraciones a utilizar en los casos de Lomoparan® y Fraxiparine® pues se observó un incremento significativo en los

niveles de FPA postperfusión. Así se pasó a utilizar 15 U anti-Xa/ml en el caso de Lomoparan® y 40 U IC/ml para Fraxiparine®. En la Tabla 7 se muestran las concentraciones necesarias para cada uno de los GAGs expresadas en términos de actividad inhibidora del factor Xa tal como los suministra el fabricante y en términos de molaridad. Se puede ver que Fragmin® y Fraxiparine® son casi igualmente efectiva en términos de molaridad aunque difieren considerablemente cuando se expresan sus concentraciones en términos de actividad inhibidora del factor Xa según el fabricante. Mucha mayor cantidad se requiere de Lomoparan® y del pentasacárido Org 31550 probablemente debido a su menor actividad inhibidora de la trombina que poseen.

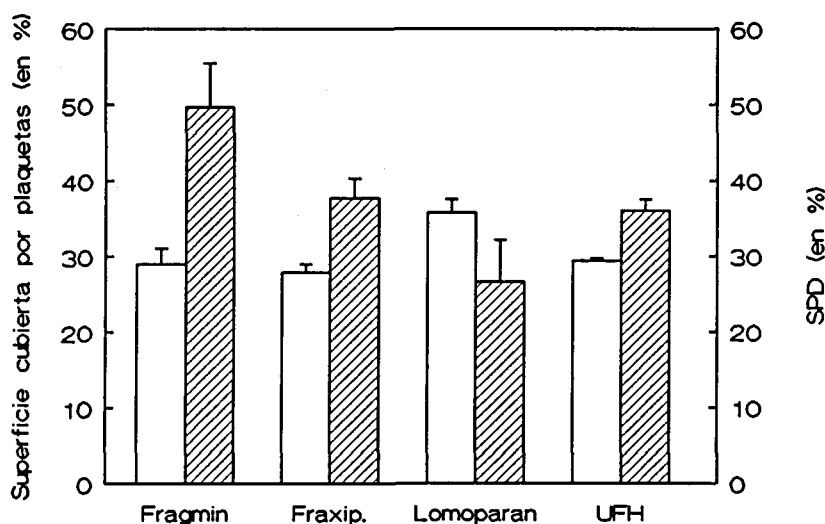
Tabla 7. Concentraciones de cada uno de los glicosaminoglicanos en estudio utilizadas en las perfusiones, expresadas en actividad inhibidora del factor Xa según el fabricante y en términos de molaridad.

	<u>/ml</u>	<u>nmol/ml</u>
Fragmin®	20 U anti-Xa	33,2
Fraxiparine®	40 U anti-Xa IC*	36,8
Lomoparan®	15 U anti-Xa	146,4
Org 31550	200 U anti-Xa	95,2
UFH	5 IU	1,9

\* unidades anti-Xa Instituto Choay

## 2. Efecto de los glicosaminoglicanos en el funcionalismo plaquetario.

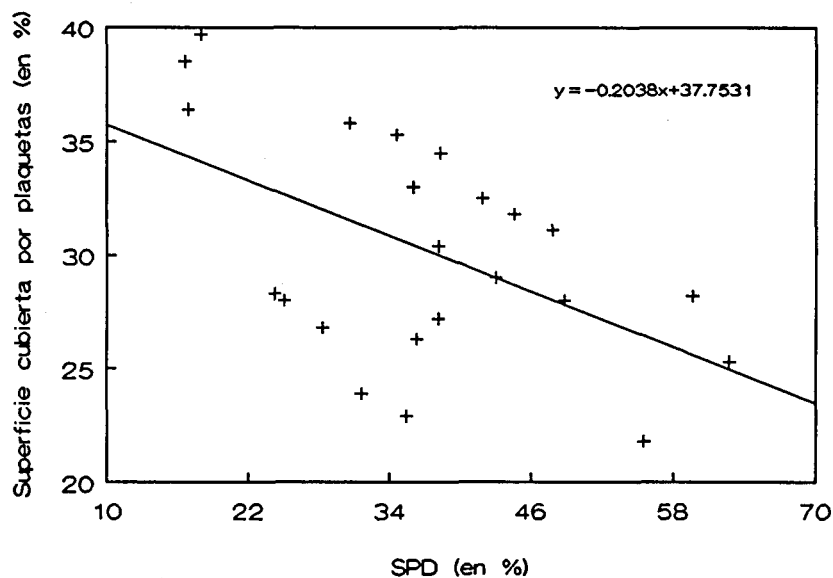
El efecto de los GAGs sobre el funcionalismo plaquetario se estudió en experimentos en los que se hizo recircular sangre sobre MEC de células endoteliales sin estimular a un coeficiente de cizalladura  $1.300 \text{ s}^{-1}$  durante 5 minutos y en donde se midió la adhesión plaquetaria a dicha superficie. Estos estudios no pudieron realizarse con el pentasacárido Org 31550 debido a la formación de agregados plaquetarios (ver después). La Fig. 17 muestra la superficie cubierta por plaquetas expresada como el tanto por ciento de la superficie expuesta al flujo para cada uno de los GAGs. En dicha figura también se señala las cifras de SPD para las mismas perfusiones. Con Lomoparan® se obtuvo una superficie cubierta mayor que con los otros GAGs estudiados ( $p=0.009$ ). Las diferencias observadas en cuanto al SPD alcanzaron significación estadística al comparar Lomoparan® con Fragmin®.



**Figura 17.** Superficie cubierta por plaquetas y desaparición de plaquetas aisladas (en %) en perfusiones sobre matriz extracelular no estimulada con sangre anticoagulada con distintos glicosaminoglicanos durante 5 min. a  $1.300 \text{ s}^{-1}$ . ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$ ).

Las cifras de SPD y la superficie cubierta por plaquetas en las perfusiones realizadas bajo estas condiciones mostraron un correlación lineal inversa estadísticamente significativas ( $r= -0,526$ ;  $p=0.01$ ; Fig. 18). La correlación fue

incluso más significativa cuando sólo se consideró el recuento de plaquetas en glutaraldehído (es decir plaquetas aisladas) y superficie cubierta por plaquetas en cada una de las perfusiones; sin embargo es este caso la correlación fue directa es decir cuanto mayor era el recuento de plaquetas aisladas al final de la perfusión mayor era la superficie cubierta ( $r=0,585$ ;  $p=0,003$ ; Fig. 19).



**Figura 18.** Correlación entre desaparición de plaquetas aisladas y superficie cubierta por plaquetas. Ver texto.

En las perfusiones realizadas sobre MEC de células endoteliales no estimulada se observaron áreas de agregados repartidas a lo largo de la zona perfundida; estos agregados adoptaban la forma de un "cometa" con una parte de mayor tamaño proximal al sentido del flujo que iba disminuyendo de tamaño en sentido distal (cola) hasta desaparecer por completo (ver Fig. 20). Sin embargo el número, tamaño y longitud de la "cola" de las zonas de agregados variaron considerablemente según el GAG en estudio. Así con la HNF no se observaron en absoluto, Lomoparan® presentó un escaso número, Fragmin® y Fraxiparine® se observaron en mayor número y con el pentasacárido Org 31550 la casi totalidad de la MEC perfundida estaba cubierta por agregados.



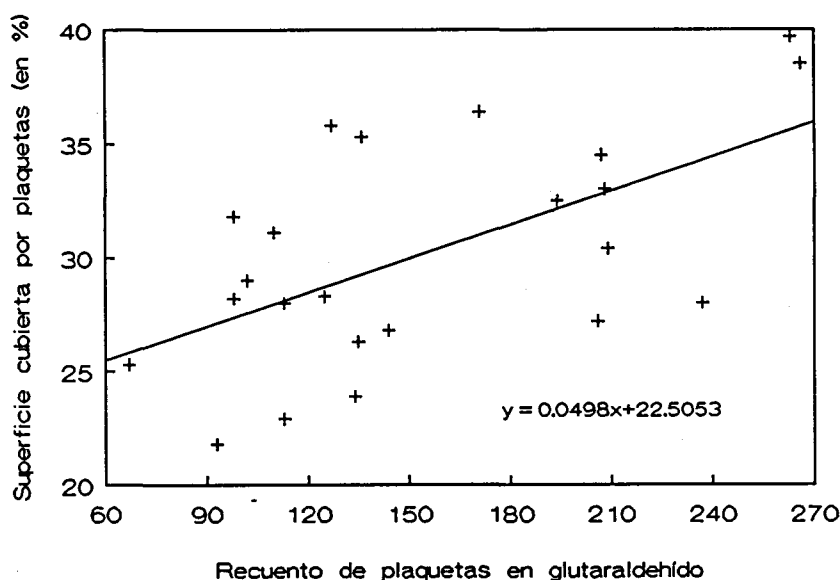


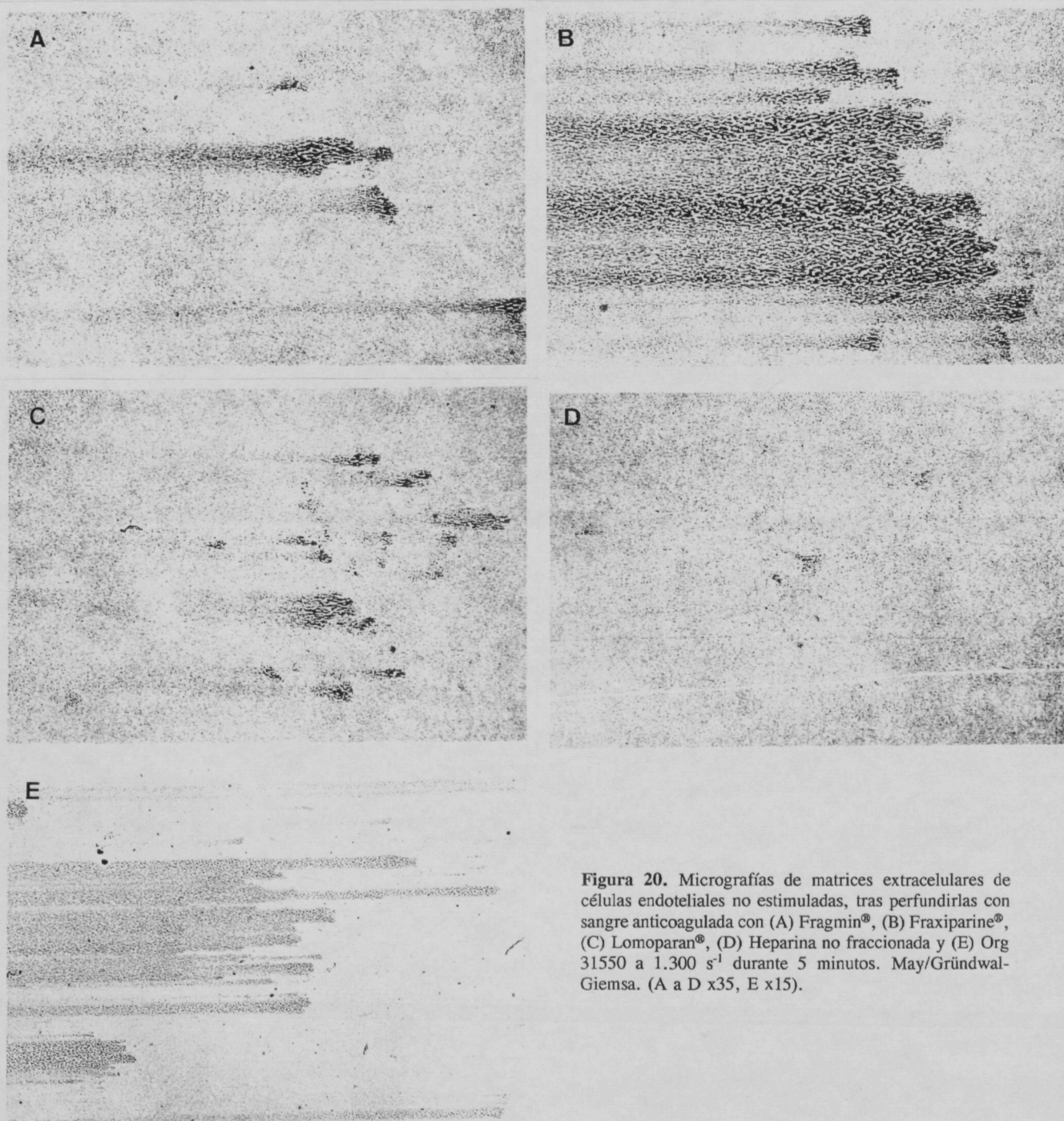
Figura 19. Correlación entre recuento de plaquetas en glutaraldehído y superficie cubierta por plaquetas. Ver texto.

Tabla 8. Tanto por ciento de la superficie perfundida cubierta por plaquetas y por agregados de diferentes alturas. Perfusiones realizadas con sangre anticoagulada con diversos anticoagulantes a  $1.300 \text{ s}^{-1}$  durante 5 minutos sobre matriz extracelular de células endoteliales estimuladas con un éster de forbol ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$ ).

	Superficie cubierta por plaquetas	< 5 $\mu\text{m}$	5-10 $\mu\text{m}$	> 10 $\mu\text{m}$
Fragmin®	53,4±3,8	22.1±3.5	19.4±3.9	11.6±3.7
Fraxiparine®	58,8±3,4	21.7±1.4	19.1±2.1	17.4±5.0*
Lomoparan®	57,7±2,7	27.4±4.9	21.8±0.9	8.0±3.2*
UFH	52,5±6,6	29.2±6.7	16±3.1	7.0±3.7*

\*  $p=0,04$

Para estudiar el efecto de los diferentes GAGs estudiados en la formación de los agregados plaquetarios, se realizaron perfusiones sobre MEC de células endoteliales estimuladas con PMA a un coeficiente de cizalladura de  $1.300 \text{ s}^{-1}$



**Figura 20.** Micrografías de matrices extracelulares de células endoteliales no estimuladas, tras perfundirlas con sangre anticoagulada con (A) Fragmin®, (B) Fraxiparine®, (C) Lomoparan®, (D) Heparina no fraccionada y (E) Org 31550 a  $1.300 \text{ s}^{-1}$  durante 5 minutos. May/Gründwal-Giemsa. (A a D x35, E x15).

durante 5 minutos, que fueron valoradas en secciones transversales evaluándose superficie cubierta y altura de los agregados. Los resultados se resumen en la Tabla 8. Los cubreobjetos perfundidos con sangre anticoagulada con Org 31550 no pudieron ser evaluados debidos a la presencia de una capa casi continua de fibrina que imposibilitó las evaluaciones. La superficie global cubierta por plaquetas, y las superficie cubierta por agregados menores de  $5 \mu\text{m}$  y agregados entre  $5$  y  $10 \mu\text{m}$  de altura fueron similares para todos los compuestos estudiados. Sólo los agregados mayores de  $10 \mu\text{m}$  de altura variaron de acuerdo con el anticoagulante utilizado. Con HNF y Lomoparan® se observaron agregados de menor altura que con Fragmin® y Fraxiparine®. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas cuando se compararon las alturas obtenidas con HNF y Lomoparan® con las observadas con Fraxiparine® ( $p=0.04$ ).

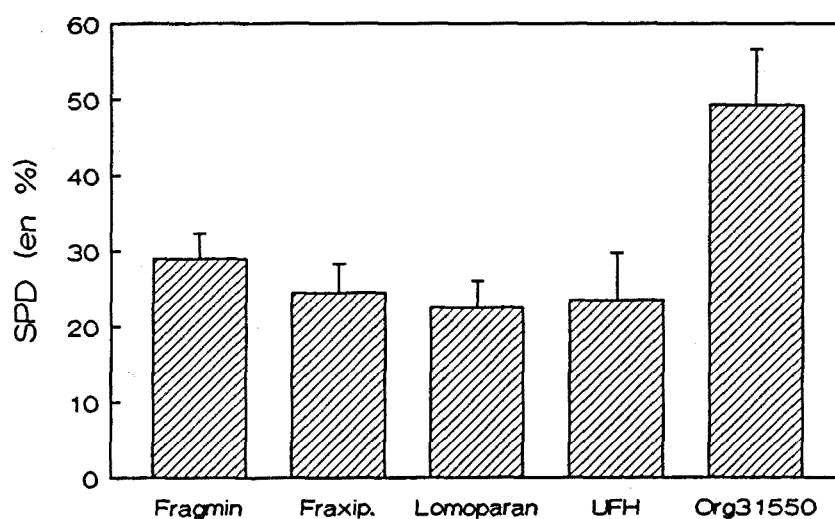
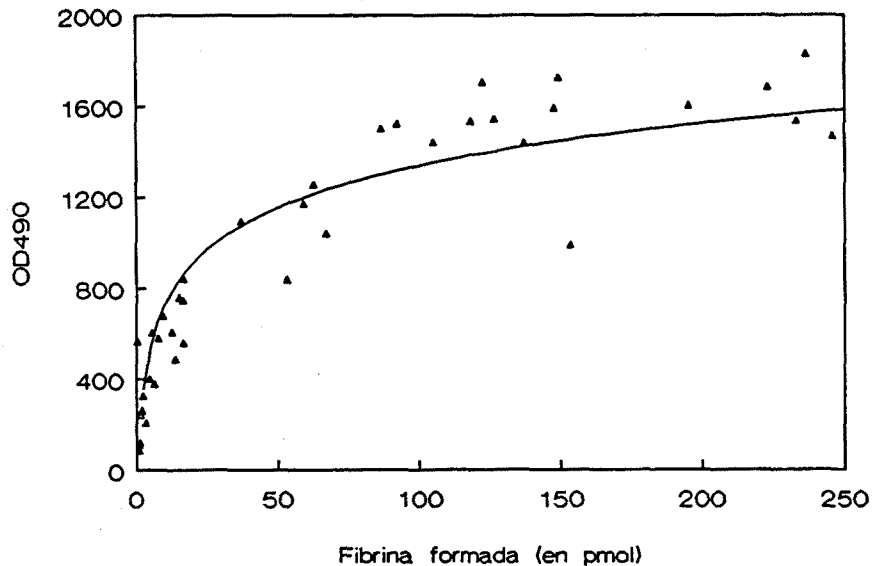


Figura 21. Cifras de desaparición de plaquetas aisladas en perfusiones sobre matriz extracelular estimulada con forbol realizadas a  $300 \text{ s}^{-1}$  durante 5 minutos, con sangre anticoagulada con distintos glicosaminoglicanos.

Bajo estas condiciones de perfusión las diferencias observadas en las cifras de SPD con Fragmin®, Fraxiparine®, Lomoparan® y HNF no fueron estadísticamente significativas. Los valores de SPD observados con Org 31550 fueron significativamente mayores que los obtenidos con los otros GAGs estudiados ( $p < 0.02$ , Fig. 21)

**3. Comparación de los métodos del fibrinógeno marcado con peroxidasa con el del fibrinógeno marcado con  $^{125}\text{I}$  en la cuantificación de la fibrina depositada sobre la matriz extracelular perfundida.**



**Figura 22.** Comparación entre el método del fibrinógeno marcado con peroxidasa y con el marcado con  $^{125}\text{I}$  en la cuantificación de la fibrina depositada. Ver texto.

Para validar el método del Fg-PO se realizaron experimentos en los que la fibrina depositada se cuantificó con los dos métodos a la vez. Los niveles medidos por ambos métodos no mostraron una buena correlación. En la Fig. 22 se muestra la gráfica resultante de dibujar para cada perfusión la cantidad de fibrina formada sobre el cubreobjeto según el método del Fg- $^{125}\text{I}$  y la densidad óptica medida a 490 nm asociada al mismo cubreobjeto. Se observa que si bien inicialmente la correlación es buena, a partir de una cierta cantidad de fibrina presente en el cubreobjeto (aproximadamente unos 20 pmol), la densidad óptica no aumenta de forma paralela sino que se aplana. La curva que mejor se ajusta a los puntos es de tipo logarítmico ( $r = 0,916$ ).

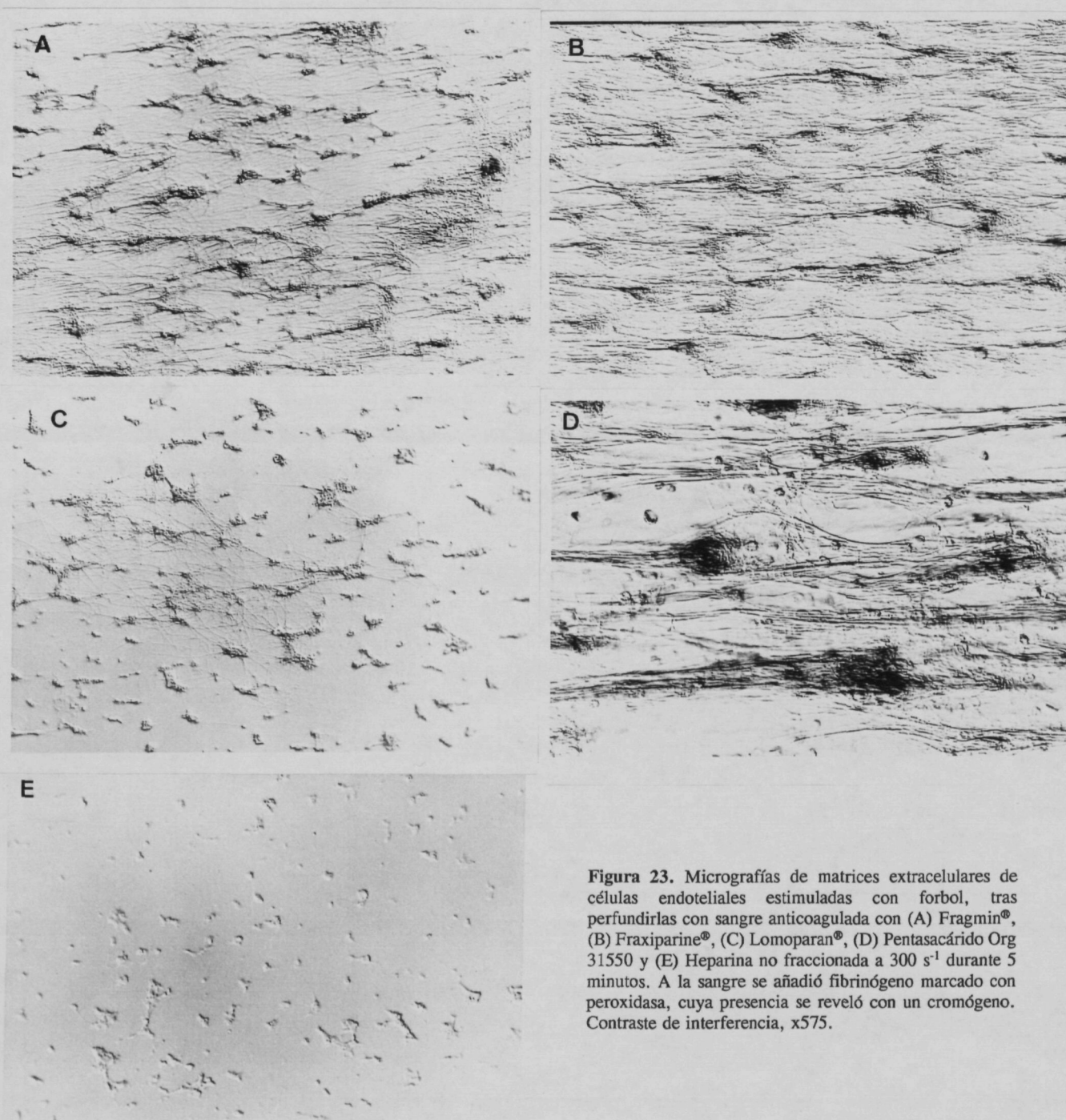
#### 4. Determinar el efecto de cada uno de los glicosaminoglicanos y las condiciones de flujo en el depósito de fibrina.

Tabla 9. Aumento en la concentración de fibrinopéptido A (en pmol/ml) y fibrina depositada (en pmol/cm<sup>2</sup>) sobre matriz extracelular estimulada con un éster de forbol tras perfusión durante 5 minutos a 300 y 1.300 s<sup>-1</sup> con sangre anticoagulada con diversos glicosaminoglicanos ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ).

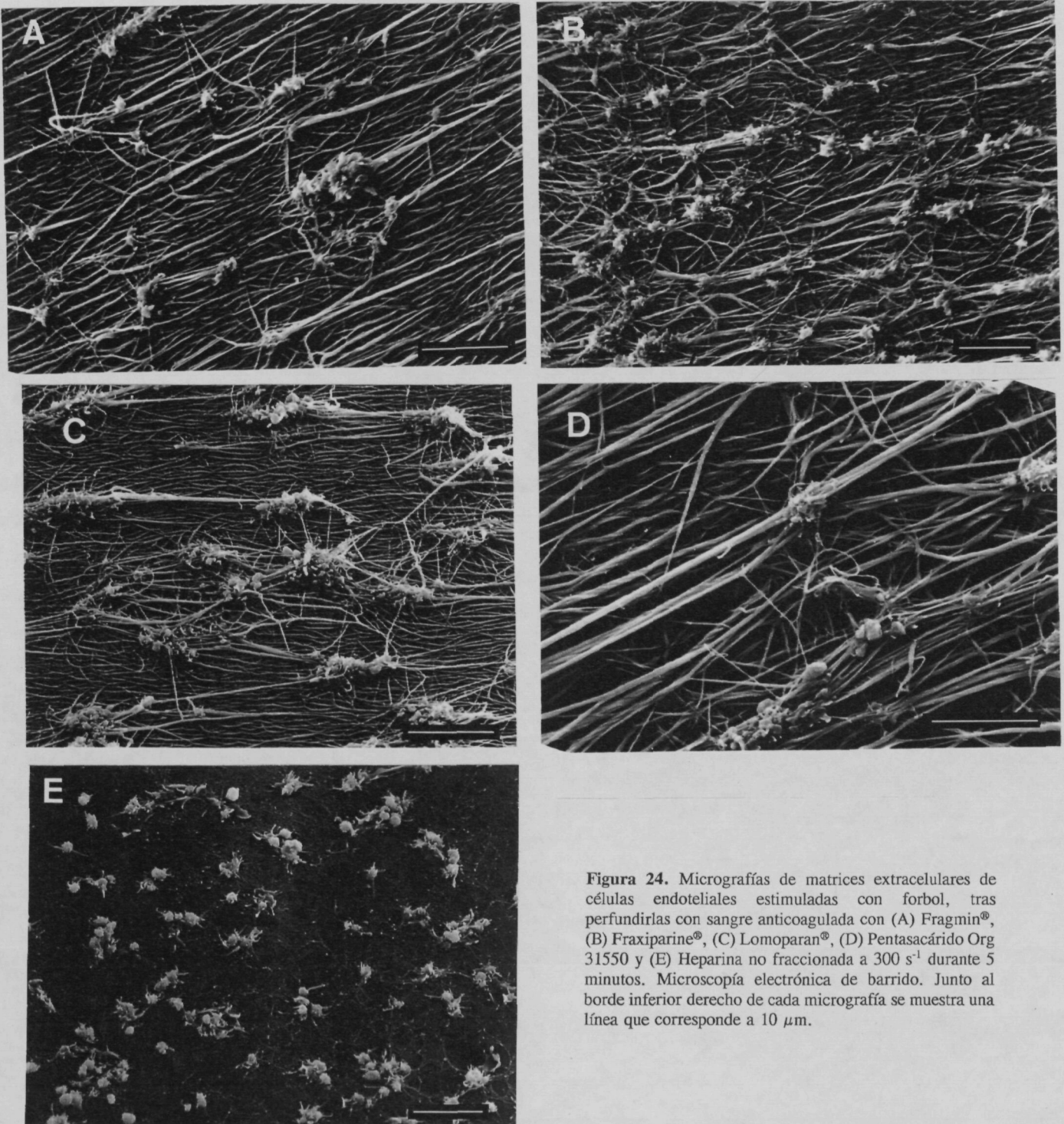
	300 s <sup>-1</sup>		1.300 s <sup>-1</sup>	
	FPA (n=6)	Fibrina (n=4)	FPA (n=3)	Fibrina (n=4)
Fragmin®	104,0±12,2	110,2±16,7	128,0±6,8	7,35±1,7
Fraxiparine®	185,0±11,3	147,6±21,1	252,3±112,0	27,64±11,7
Lomoparan®	17,8±4,0	65,0±12,0	53,2±36,2	9,11±2,6
Org 31550	1.431,8±150,6	201,1±25,0	1.506,9±980,0	165,2±24,7
UFH	4,6±1,8	4,7±2,6	13,5±6,2	1,76±0,2

La cantidad de fibrina depositada sobre los cubreobjetos y las concentraciones de FPA tras las perfusiones a un coeficiente de cizalladura de 300 y de 1.300 s<sup>-1</sup> durante 5 minutos se muestran en la Tabla 9. La cantidad de fibrina depositada después de las perfusiones con la sangre anticoagulada con HNF a ambos coeficientes de cizalladura es casi inexistente. La microscopía óptica de contraste de interferencia en la que se utilizó fibrinógeno marcado con PO y posteriormente teñido con DAB (Fig. 23) y la microscopía electrónica de barrido (Fig. 24) no evidenciaron fibrina en absoluto; los valores observados probablemente muestran los valores de fondo correspondientes al Fg-I<sup>125</sup> asociado a la MEC y/o a las plaquetas. Asimismo el incremento del FPA con la sangre anticoagulada con HNF fue no valorable.

Por el contrario, la fibrina formada en los cubreobjetos perfundidos con sangre anticoagulada con los otros GAGs varió considerablemente dependiendo del tipo de anticoagulante y del coeficiente de cizalladura. La sangre anticoagulada con el pentasacárido Org 31550 proporcionó las cantidades mayores de fibrina formada, seguido por Fraxiparine® y Fragmin®. Lomoparan® inhibió el depósito de fibrina



**Figura 23.** Micrografías de matrices extracelulares de células endoteliales estimuladas con forbol, tras perfundirlas con sangre anticoagulada con (A) Fragmin<sup>®</sup>, (B) Fraxiparine<sup>®</sup>, (C) Lomoparan<sup>®</sup>, (D) Pentasacárido Org 31550 y (E) Heparina no fraccionada a 300 s<sup>-1</sup> durante 5 minutos. A la sangre se añadió fibrinógeno marcado con peroxidasa, cuya presencia se reveló con un cromógeno. Contraste de interferencia, x575.



**Figura 24.** Micrográficas de matrices extracelulares de células endoteliales estimuladas con forbol, tras perfundirlas con sangre anticoagulada con (A) Fragmin<sup>®</sup>, (B) Fraxiparine<sup>®</sup>, (C) Lomoparan<sup>®</sup>, (D) Pentasacárido Org 31550 y (E) Heparina no fraccionada a 300 s<sup>-1</sup> durante 5 minutos. Microscopía electrónica de barrido. Junto al borde inferior derecho de cada micrografía se muestra una línea que corresponde a 10 µm.

en mayor proporción. Las diferencias entre las medias fue estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Cuando el coeficiente de cizalladura se aumentó de 300 a  $1,300 \text{ s}^{-1}$  la cantidad de fibrina depositada sobre los cubreobjetos disminuyó. En los casos de Org 31550 y HNF, la reducción no alcanzó significación estadística. Si lo fue en los casos de Fragmin® (85 %), Lomoparan® (85 %) y Fraxiparine® (81 %).

Las diferencias en los incrementos en FPA observadas en los dos coeficientes de cizalladura ( $300$  y  $1,300 \text{ s}^{-1}$ ) no fueron estadísticamente significativas para los diferentes GAGs probados. El incremento en FPA se detuvo al finalizar la perfusión excepto en el caso del pentasacárido Org 31550, con el que los niveles de FPA continuaron aumentando; diez minutos después de finalizar las perfusiones las concentraciones de FPA fueron aproximadamente un 30 % mayores que los niveles medidos inmediatamente después de acabar las perfusiones.

**Tabla 10.** Fibrina calculada y fibrina depositada (ambas en nmoles) sobre matriz extracelular estimulada con un éster de forbol tras se perfundida durante 5 minutos a 300 y a  $1.300 \text{ s}^{-1}$ , con sangre anticoagulada con diversos glicosaminoglicanos ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ).

	$300 \text{ s}^{-1}$		$1.300 \text{ s}^{-1}$	
	Fibrina calc. (n=6)	Fibrin depos. (n=4)	Fibrina calc. (n=3)	Fibrin depos. (n=4)
Fragmin®	$0,49 \pm 0,05$	$0,46 \pm 0,07$	$0,61 \pm 0,34$	$0,03 \pm 0,007$
Fraxiparine®	$0,87 \pm 0,05$	$0,62 \pm 0,08$	$1,19 \pm 0,53$	$0,11 \pm 0,04$
Lomoparan®	$0,08 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,17$	$0,03 \pm 0,01$
Org 31550	$6,0 \pm 1,78$	$0,84 \pm 0,1$	$7,1 \pm 4,6$	$0,69 \pm 0,01$
UFH	$0,02 \pm 0,008$	$0,02 \pm 0,011$	$0,06 \pm 0,02$	$0,007 \pm 0,001$

Los valores teóricos de la fibrina formada durante la perfusión calculada a partir de las cifras de incremento en el FPA y la cantidad de fibrina depositada medida sobre la MEC se resumen en la Tabla 10. En perfusiones llevadas a cabo a un coeficiente de cizalladura de  $300 \text{ s}^{-1}$  con sangre anticoagulada con HNF aproximadamente el 100 % de la fibrina formada se depositó sobre la MEC



perfundida. En el caso de Fragmin® ésta representó el 93 % y para Fraxiparine® alrededor del 70 %. En el caso de Lomoparan® se obtuvo un resultado discordante pues se depositó sobre la MEC 3 veces más fibrina que la cantidad teórica calculada a partir de las cifras de incremento del FPA. Para el pentasacárido Org 31550 sólo el 12,5 % de la fibrina generada durante la perfusión se encontró depositada sobre la MEC perfundida.

En las perfusiones realizadas a un coeficiente de cizalladura de  $1.300 \text{ s}^{-1}$  durante 5 minutos, el porcentaje de la fibrina formada que se depositó sobre la MEC estimulada con PMA era similar para todos los GAGs estudiados; así era del 5 % para Fragmin®, del 9 % para Fraxiparine®, del 12 % para Lomoparan®, del 10 % para Org 31550 y un 11 % para la HNF.

La fibrina depositada en las perfusiones llevadas a cabo a un coeficiente de cizalladura de  $1.300 \text{ s}^{-1}$  comparada con la fibrina depositada a  $300 \text{ s}^{-1}$  representaba una reducción del 93 % para Fragmin®, del 82 % para Fraxiparine®, del 88 % para Lomoparan®, del 18 % para Org 31550 y del 65 % para HNF. Curiosamente incluso con HNF con la que no se formó fibrina visible, se observó una reducción a la mitad de la fibrina depositada.

## **7. Discusión**

En esta tesis se ha estudiado en un modelo bien caracterizado de trombosis *in vitro* que utiliza exclusivamente componentes humanos<sup>228,298</sup>, el efecto anticoagulante de varios glicosaminoglicanos en condiciones de flujo. En dicho modelo, sangre anticoagulada con los glicosaminoglicanos se hace recircular a través de una cámara de perfusión rectangular sobre cubreobjetos recubiertos con matriz extracelular, bajo condiciones reológicas bien definidas. La presencia de factor tisular en la matriz extracelular se induce al estimular con un éster de forbol células endoteliales humanas en cultivo<sup>228</sup>; dicho factor tisular activando la vía extrínseca de la coagulación induce la síntesis de trombina con la consiguiente formación del trombo plaquetario y el depósito de fibrina.

El primer problema que se presenta al intentar comparar diversos glicosaminoglicanos es que la actividad inhibidora del factor Xa suministrada por el fabricante no es un buen reflejo de la actividad anticoagulante de los productos. Por ésta razón se decidió escoger como concentración de trabajo la concentración mínima del anticoagulante que inhibiera la formación de trombina en sangre total cuando ésta se mantenía en tubos de poliestireno a temperatura ambiente durante 3 horas. Esta concentración arbitraria se seleccionó también por razones prácticas, debido a que permitía realizar las perfusiones en las que la formación de trombina era inducida por el factor tisular presente realmente en el cubreobjeto perfundido. Como indicador de la formación de la trombina se tomó el fibrinopéptido A (FPA), un péptido que la trombina libera de cada una de las cadenas A $\alpha$  y que ha demostrado su utilidad en los estudios con las heparinas de bajo peso molecular<sup>80</sup>.

La concentración necesaria para cada uno de los glicosaminoglicanos estudiados se muestran en la Tabla 7 (pág. 105). Dependiendo de la actividad inhibidora del factor IIa y del peso molecular las cantidades necesarias de cada uno de los glicosaminoglicanos para inhibir el aumento del FPA varía considerablemente cuando se expresa en términos de moles/ml. Así se puede observar que para la heparina no fraccionada sólo 1,9 nmol/ml son suficientes mientras que para Lomoparan<sup>®</sup> se necesitan 146 nmol/ml. Las dos heparinas de bajo peso molecular ilustran bien la problemática de las diferentes formas de expresión de su potencia según el fabricante. Así en términos de actividad inhibidora del factor Xa según el fabricante parece que se necesitaría el doble de cantidad de Fraxiparine<sup>®</sup> que de

Fragmin<sup>®</sup>, sin embargo cuando se expresa en términos de nmoles, se observa que la cantidad que es necesaria de ambas es semejante. Para Lomoparan<sup>®</sup> se necesita mucha más cantidad que para los otros debido a su menor potencia y probablemente también a su mayor relación actividad inhibidora del factor Xa/actividad inhibidora del factor IIa que es de 20:1 en comparación con las heparinas de bajo peso molecular cuya relación ronda alrededor de 2-3,5:1.

Una vez establecidas las concentraciones idóneas para los experimentos de perfusión se estudió el efecto de los diversos glicosaminoglicanos en la adhesión plaquetaria sobre matriz extracelular de célula endotelial no estimuladas a altos coeficientes de cizalladura. Estos estudios no pudieron ser realizados para el pentasacárido sintético Org 31550, pues aunque no se puede demostrar la presencia de factor tisular por las técnicas habituales en las mencionadas matrices extracelulares, con el Org 31550 se observaba la formación de agregados que cubrían casi toda la superficie perfundida (ver Fig. 20, pág. 109). Para los otros glicosaminoglicanos, la superficie cubierta por plaquetas al final de la perfusión fue similar, excepto para Lomoparan<sup>®</sup> que presentó una superficie cubierta significativamente mayor. Esto probablemente no es debido a un efecto directo sobre la adhesión plaquetaria, pues se encontró una relación lineal inversa entre el grado de formación de microagregados en la sangre recirculada y la superficie cubierta por plaquetas. Parece probable por tanto que la mayor superficie cubierta observada con Lomoparan<sup>®</sup> sea debida a su menor capacidad de formación de los microagregados. La formación de los microagregados en el sistema de perfusión probablemente sea debida a pequeñas cantidades de ADP liberadas por hematíes dañados a su paso por la bomba de perfusión<sup>8</sup> y es probable que ello sea potenciado por algunos glicosaminoglicanos. Lomoparan<sup>®</sup> no posee éste efecto potenciador *in vitro*<sup>198</sup>; en clínica también se ha utilizado en pacientes afectos de trombocitopenia inducida por la heparina permitiendo mantener el nivel de anticoagulación hasta la resolución de la trombocitopenia<sup>208</sup>.

La adhesión plaquetaria también se estudió en perfusiones sobre matriz extracelular de células endoteliales estimuladas con PMA, a un coeficiente de cizalladura de  $1.300 \text{ s}^{-1}$  durante 5 minutos. En este caso no se observó diferencias en la superficie cubierta por plaquetas; ello es posible que se deba a que la trombina

local formada ejerce tal efecto sobre el depósito de las plaquetas (es uno de los agonistas más potente que se conoce) que habría enmascarado cualquier efecto de los diferentes glicosaminoglicanos en la formación de microagregados durante la recirculación de la sangre.

Los cubreobjetos perfundidos con la sangre anticoagulada con Org 31550 no pudieron ser evaluados en sección transversal, dado que la fibrina depositada sobre la matriz extracelular formaba una capa continua que impedía la visualización y valoración de los agregados plaquetarios. El tamaño de los agregados formados con la heparina no fraccionada y Lomoparan<sup>®</sup> fue más o menos igual; con Fraxiparine<sup>®</sup> (y quizás también con Fragmin<sup>®</sup> aunque en este caso no alcanzó significación estadística) se observó un aumento de los agregados de mayor altura (Tabla 8, pág. 108). Este aumento en la formación de agregados puede ser atribuido a diferencias en la cantidad de trombina formada<sup>270</sup>. Diferencias entre heparina no fraccionada y diversas heparinas de bajo peso molecular ha sido también encontrada por otros autores en un modelo experimental diferente al utilizado en esta tesis<sup>103</sup>.

Un hallazgo que apoya esta hipótesis es la diferencia en tamaño de las áreas de agregados que se observaban en las perfusiones sobre matriz extracelular no estimulada (Fig. 20, pág. 109). Estas áreas de agregados probablemente corresponden a grupos de células endoteliales que por alguna razón han resultado estimuladas y sintetizan factor tisular que es depositado de forma localizada en la matriz extracelular; el factor tisular desencadena la producción local de trombina y la formación de áreas de agregados plaquetarios<sup>298</sup>. Estas áreas tienen una forma en huso con la parte más estrecha situada distal al flujo, que acaba desapareciendo para confundirse con la zona de plaquetas extendidas. Dependiendo del glicosaminoglicano en estudio, el número y tamaño de las áreas variaba considerablemente. Dado que los cubreobjetos fueron expuestos al flujo de la sangre anticoagulada con cada uno de los glicosaminoglicanos de forma totalmente aleatoria, cabe asumir que la cantidad de factor tisular presente en la matriz extracelular fue comparable para cada uno de los glicosaminoglicanos en estudio. Por lo tanto las diferencias observadas en el número y tamaño de las áreas cabe atribuir las a la diferente capacidad de inhibir o bien la formación de la trombina o bien a ella misma una vez formada. Así con heparina no fraccionada y con

Lomoparan® solo se observaron un escaso número de minúsculas área; con Fraxiparine® se observaron más áreas y de mayor tamaño que con Fragmin®, con el pentasacárido sintético Org 31550 casi toda la superficie de la matriz extracelular expuesta al flujo estaba cubierta por agregados. El aspecto de estos últimos cubreobjetos sugería que una vez la trombina se formaba (los agregados empezaban en ocasiones a la mitad del cubreobjeto), ésta no era inhibida en absoluto y seguía induciendo la formación de agregados. Destacar que probablemente debido a que la trombina sólo actuaba a nivel local los niveles de FPA pre y postperfusión no sufrían cambios significativos en las perfusiones llevadas a cabo en estas condiciones.

Durante las perfusiones, en el caso de la heparina no fraccionada no se produjo formación de fibrina ni siquiera en presencia de factor tisular en la matriz extracelular. Para Fragmin®, Fraxiparine® y Lomoparan® la formación de trombina fue probablemente una fenómeno local como ha sido previamente demostrado para Fragmin®<sup>298</sup>. El pentasacárido Org 31550 fue una excepción pues la formación de trombina también se produjo en la fase líquida; tal como sugiere que los niveles de FPA continuaran aumentando incluso después de parar la perfusión, a diferencia de lo que sucedió con todos los otros compuestos estudiados. Este comportamiento del pentasacárido Org 31550 parece indicar que si un activador de la coagulación como el factor tisular induce la formación de trombina, ésta no puede ser inhibida por el anticoagulante y continua ejerciendo su efecto en la fase líquida.

Sin embargo, los incrementos en la concentración de FPA al final de las perfusiones llevadas a cabo sobre matriz extracelular de células endoteliales estimuladas con PMA varió de forma considerable entre los diferentes glicosaminoglicanos estudiados (Tabla 9, pág. 112). Grandes aumentos en los niveles de FPA postperfusión se encontró con Org 31550; los valores obtenidos con Fraxiparine fueron mucho menores, pero aún significativamente mayores que aquellos encontrados con Fragmin®, y éstos fueron casi cinco veces mayores que los observados con Lomoparan®. Los reducidos valores encontrados para la heparina no fraccionada indican que casi ninguna formación de trombina se produjo durante las perfusiones realizadas con este anticoagulante. El incremento en las cifras de FPA, obtenidas en las perfusiones llevadas a cabo a los dos coeficientes de

cizalladura estudiados (300 y 1.300 s<sup>-1</sup>), son similares; aunque existe un aparente aumento a 1.300<sup>-1</sup> en el caso de Lomoparan®, la diferencia no es significativa debido a la gran variabilidad en las cifras. Estos resultados están en contradicción con anteriores observaciones publicadas por Weiss *et al*, que encontraron una disminución en las cifras de FPA dependiente del coeficiente de cizalladura, en perfusiones realizadas con sangre nativa en una cámara de perfusión anular con aorta de conejo como superficie adhesiva<sup>277</sup>. Esta discrepancia probablemente deriva de diferencias en el modelo y técnica utilizada. Por otra parte en estudios efectuados en un modelo de flujo con enzimas purificados, Nemerson *et al*. han encontrado un aumento en la actividad de las enzimas de la coagulación al aumentar el coeficiente de cizalladura en lugar de una disminución<sup>192</sup>.

Cuando se estudió la fibrina depositada sobre la matriz extracelular perfundida con sangre anticoagulada con los glicosaminoglicanos, hubo que en primer lugar escoger el método adecuado para ello. Se compararon dos, ambos basados en el mismo principio; previo a la perfusión se añadía fibrinógeno marcado con un trazador y tras finalizarla se cuantificaba la cantidad del trazador presente en la matriz extracelular. De esta medición se infería la cuantía de la fibrina depositada. En un caso el marcador era la peroxidasa y en otro el <sup>125</sup>I. El no trabajar con elementos radioactivos tiene ventajas evidentes en cuanto al trabajo experimental y por ello en primer lugar se intentó utilizar el método de fibrinógeno marcado con PO (Fg-PO). Tras unas primeras experiencias, resultó evidente que a pesar de existir diferencias en la cantidad de fibrina depositada (especialmente cuando ésta era más abundante) con los diversos glicosaminoglicanos, las cifras obtenidas con el método del Fg-PO era casi iguales.

Para asegurar la validez del método, se realizaron experimentos en paralelo utilizando Fg-PO y Fg-<sup>125</sup>I. En ellos se pudo comprobar que cuando la cantidad de fibrina era pequeña existía una correlación lineal entre la cantidad de fibrina medida por Fg-<sup>125</sup>I y la densidad óptica proporcionada por la PO presente sobre el cubreobjeto. Sin embargo si la cantidad de fibrina se situaba por encima de los aproximadamente 20 pmol la curva se aplanaba siendo la correlación de tipo logarítmico. Posiblemente ello era debido a que la PO presente en las capas más profundas de la malla de fibrina, especialmente si el grosor era elevado, no tenían

acceso al sustrato cromógeno. Por estas razones se decidió utilizar el método del Fg-<sup>125</sup>I, que aunque más engorroso proporcionaba datos fiables respecto a la cantidad de fibrina depositada.

Las diferencias en la generación de trombina, tal como se desprende de las cifras de FPA, se reflejaron también en la cantidad de fibrina que se observó en perfusiones realizadas a un coeficiente de cizalladura de 300 s<sup>-1</sup>. Con mucho la mayor cantidad fue medida con Org 31550. Con Fraxiparine® la fibrina depositada fue menor, para Fragmin® fue de nuevo menor y con Lomoparan® se observó la mitad de la fibrina que se observó con Fragmin®. Con la heparina no fraccionada, no se encontró fibrina depositada en la matriz extracelular perfundida, la pequeña cantidad de radioactividad asociada al cubreobjeto de Thermanox®, debería ser atribuida a moléculas de fibrinógeno marcado fijadas sobre él, como se desprende de los estudios de microscopía tanto óptica como electrónica. El depósito de fibrina fue mucho menor a un coeficiente de cizalladura de 1.300 s<sup>-1</sup> para todos los glicosaminoglicanos estudiados excepto para el pentasacárido sintético Org 31550. En este caso se observó una pequeña reducción, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística.

La cantidad de fibrina que se había formado en el sistema de perfusión, se calculó a partir de la cantidad de FPA que se generó durante la misma. Cuando esta cantidad de fibrina teóricamente formada se comparó con la cantidad realmente encontrada sobre el cubreobjeto perfundido en experimentos paralelos, en los que la fibrina se cuantificó con Fg-<sup>125</sup>I, cifras similares se encontraron para todos los glicosaminoglicanos estudiados a un coeficiente de cizalladura de 1.300 s<sup>-1</sup>: aproximadamente el 10% de la fibrina formada se hallaba depositada sobre el cubreobjeto. Cuando se estudiaron las cifras obtenidas a un coeficiente de cizalladura de 300 s<sup>-1</sup> se observó alguna discordancia. Con Fragmin® y Fraxiparine® entre el 80 y el 90% de la fibrina formada se depositó sobre el cubreobjeto; en el caso de Org 31550 sólo se depositó el 10% del total formado. En el caso de Lomoparan® se observó un curioso resultado: la cantidad de fibrina marcada con radioisótopo encontrada sobre el cubreobjeto en este caso era mayor que la cantidad de fibrina teóricamente formada. Esto posiblemente indica que también alguna cantidad de fibrinógeno se había depositado sobre el cubreobjeto, lo que sugiere la



formación de complejos fibrinógeno-fibrina<sup>29</sup>. Existen algunas evidencias experimentales que indican que concentraciones relativamente altas de glicosaminoglicanos, pueden potenciar la formación de dichos complejos fibrinógeno-fibrina<sup>40,150</sup>.

En la presente tesis se han estudiados diversos glicosaminoglicanos bajo condiciones de flujo. De los resultados de dicho estudio parece concluirse que el pentasacárido sintético Org 31550, es decir un producto exclusivamente con acción inhibitoria del factor Xa, es inadecuado para prevenir la formación de trombina en un sistema donde el factor tisular esté presente. Ello podría indicar que el pentasacárido natural o bien sus derivados podrían ser útiles en la prevención de la trombosis en casos donde la formación del factor Xa su produce en fase líquida, aunque no tendría efecto cuando se produjese una lesión vascular con exposición del subendotelio. Además dado que el Org 31550 no es capaz de inhibir la trombina ya formada, no se podría utilizar en el tratamiento de las trombosis venosas ya establecidas.

Entre los otros glicosaminoglicanos, Lomoparan<sup>®</sup> ocupa una especial posición pues posee *in vitro* un efecto antitrombótico mayor que Fragmin<sup>®</sup> y Fraxiparine<sup>®</sup>. Este mayor potencial antitrombótico podría deberse a la presencia de dermatán sulfato<sup>177</sup>, pues recientemente se ha demostrado que los complejo de dermatán sulfato-cofactor II de la heparina son capaces de inhibir la trombina absorbida sobre la fibrina<sup>206</sup>, mientras que los complejos de antitrombina III-heparina no<sup>117,278</sup>. El relativamente alto depósito de fibrina observado con Lomoparan<sup>®</sup> a bajo coeficiente de cizalladura, es probablemente un artefacto de las altas concentraciones utilizadas en nuestro modelo. El perfil de acción de Fragmin<sup>®</sup> y Fraxiparine<sup>®</sup> era más o menos igual, con una tendencia de Fraxiparine<sup>®</sup> hacia un menor efecto antitrombótico. Si estas diferencias observadas *in vitro* tiene alguna trascendencia clínica, solo puede ser determinado tras la realización de los ensayos clínicos adecuados.

El perfil de acción de la heparina no fraccionada en el modelo de trombosis estudiado fue el esperado. Una concentración de 5 UI/ml inhibió completamente la formación de trombina en presencia de matriz extracelular con factor tisular. La

incapacidad de incluso grandes cantidades de factor tisular, tal como el presente en la matriz extracelular tras estimulación de las células con un éster de forbol sugiere que *in vivo* en presencia de dosis altas de heparina no fraccionada la aparición de una herida vascular estaría asociada a una hemorragia, como de hecho se observa. La observación de que las heparinas y heparinoides de bajo peso molecular a dosis anticoagulantes, pueden permitir aún la formación de trombina, sugiere que la menor tendencia hemorrágica observada con estos productos en el animal de experimentación podría estar también en el hombre, tal como se sugiere en recientes trabajos publicados<sup>126,152,217</sup>. Sin embargo son necesarios nuevos estudios clínicos para responder definitivamente esta cuestión.

## **8. Conclusiones**

1.- Todos los glicosaminoglicanos estudiados fueron capaces de inhibir la formación de trombina, en sangre mantenida en reposo a unas concentraciones dadas. La cantidad de glicosaminoglicano necesaria para ello varió ampliamente dependiendo del producto.

2.- Las unidades con las que los fabricantes expresan la actividad de sus preparados varían, en ocasiones, considerablemente. P. ej., para inhibir la formación de trombina se necesitaron cantidades semejantes Fragmin® y de Fraxiparine® en términos de molaridad; cuando la concentración se expresa de acuerdo con las unidades del fabricante se necesita el doble concentración de Fraxiparine® que de Fragmin®.

3.- El funcionalismo plaquetario, medido como el tanto por ciento de la superficie perfundida que está cubierta por plaquetas, se ve afectado en menor medida por Lomoparan® que por los otros glicosaminoglicanos estudiados, en un sistema sin formación de trombina. En presencia de trombina en el sistema las diferencias observadas en el funcionalismo plaquetario desaparecen.

4.- La superficie cubierta por plaquetas, en perfusiones realizadas con sangre anticoagulada con glicosaminoglicanos sobre matriz extracelulares no estimuladas, es inversamente proporcional a la cantidad de agregados plaquetarios presentes en la sangre al final de las perfusiones.

5.- El método del fibrinógeno marcado con peroxidasa, para cuantificar la fibrina depositada sobre las superficies perfundidas, sólo es útil cuando la cantidad de fibrina formada es baja. No es utilizable para estudiar el efecto de los glicosaminoglicanos, debido a la gran cantidad de fibrina que se forma. El fibrinógeno marcado con  $^{125}\text{I}$  continúa siendo el método de elección en estas circunstancias.

6.- La cantidad de fibrina formada con los diversos glicosaminoglicanos, y por ende la actividad inhibidora de la trombina, varió considerablemente. De mayor a menor capacidad se sitúan heparina no fraccionada, Lomoparán<sup>®</sup>, Fragmin<sup>®</sup>, Fraxiparine<sup>®</sup> y el pentasacárido sintético Org 31550.

7.- Estas diferencias en la inhibición de la trombina, también se pusieron de manifiesto al estudiar el tamaño de los trombos plaquetarios formados con cada uno de los glicosaminoglicanos.

8.- El depósito de fibrina para todos los glicosaminoglicanos estudiados se vió influído por el coeficiente de cizalladura. A altos coeficientes la cantidad de fibrina depositada fue menor; sin embargo la cantidad de fibrinopéptido A formado durante la perfusión no se modificó. Este hallazgo sugiere que la menor cantidad de fibrina depositada a alto coeficiente de cizalladura, depende más de una alteración en la polimerización de los monómeros de fibrina que de un defecto en la formación de trombina.

9.- Los hallazgos experimentales de esta tesis, proporcionan un nuevo fundamento teórico a la idea de que posiblemente, las/los heparina(oide)s de bajo peso molecular posean un menor riesgo hemorrágico. En efecto, a un nivel de anticoagulación comparable (aquel que inhibe la formación de trombina en la sangre en reposo), cuando se expone la sangre a un activador de la coagulación bajo condiciones de flujo, la heparina no fraccionada bloquea completamente la formación de trombina; sin embargo las/el heparina(oide)s de bajo peso molecular permite en estas circunstancias la generación de trombina.

10.- El heparinoide de bajo peso molecular Lomoparan<sup>®</sup>, muestra un perfil farmacodinámico peculiar. En efecto, tiene un menor efecto sobre el funcionalismo plaquetario que los otros glicosaminoglicanos estudiados, conservando una elevada actividad inhibidora de la trombina, más cercana a la heparina no fraccionada que a las heparinas de bajo peso molecular.

## **9. Bibliografía**

1. Dihydroergotamine-heparin prophylaxis of postoperative deep vein thrombosis. A multicenter trial. The Multicenter Trial Committee. JAMA 1984; 251:2960-2966.
2. Randomised controlled trial of subcutaneous calcium-heparin in acute myocardial infarction. The SCATI (Studio sulla Calciparina nell'Angina e nella Trombosi Ventricolare nell'Infarto) Group. Lancet 1989; 2:182-186.
3. Aarts PA, van den Broek SA, Prins GW, Kuiken GD, Sixma JJ, Heethaar RM. Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood. Arteriosclerosis 1988; 8:819-824.
4. Abildgaard U. Monitoring heparin treatment. In: Lane DA, Lindahl U, eds. Heparin. Chemical and biological properties, clinical applications. London: Edward Arnold, 1989:495-515.
5. Abildgaard U, Lindahl AK, Sandset PM. Heparin requires both antithrombin and extrinsic pathway inhibitor for its anticoagulant effect in human blood. Haemostasis 1991; 21:254-257.
6. Albada J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ. Treatment of acute venous thromboembolism with low molecular weight heparin (Fragmin) Results of a double-blind randomized study. Circulation 1989; 80:935-940.
7. Alegre A, Gomez JM, Velasco A, Vicente V. Necrosis cutánea y heparina. Med Clin Barc 1987; 88:170.
8. Alkhamis TM, Beissinger RL, Chediak JR. Artificial surface effect on red blood cells and platelets in laminar shear flow. Blood 1990; 75:1568-1575.
9. Andersson LO, Barrowcliffe TW, Holmer E, Johnson EA, Sims GEC. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin III and by gelfiltration. Thromb Res 1976; 9:575-583..



10. Asakai R, Chung DW. The molecular genetics of factor XI deficiency. *Baillière's Clin Haematol* 1989; 2:787-799.
11. Ashby B, Daniel JL, Smith JB. Mechanisms of platelet activation and inhibition. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4:1-26.
12. Aznar-Salatti J, Bastida E, Haas TA, et al. Platelet adhesion to exposed endothelial cell extracellular matrixes is influenced by the method of preparation. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:436-442.
13. Bara L, Billaud E, Gramond G, Kher A, Samama M. Comparative pharmacokinetics of a low molecular weight heparin (PK 10 169) and unfractionated heparin after intravenous and subcutaneous administration. *Thromb Res* 1985; 39:631-636.
14. Barritt DW, Jordan SC. Anticoagulant drugs in the treatment of pulmonary embolism: a controlled trial. *Lancet* 1960; i:1309-1312.
15. Baruch D, Bahnak B, Girma JP, Meyer D. von Willebrand factor and platelet function. *Baillière's Clin Haematol* 1989; 2:627-672.
16. Barzu T, Molho P, Tobelem G, Petitou M, Caen J. Binding and endocytosis of heparin by human endothelial cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1985; 845:196-203.
17. Barzu T, Van Rijn JL, Petitou M, Molho P, Tobelem G, Caen JP. Endothelial binding sites for heparin. Specificity and role in heparin neutralization. *Biochem J* 1986; 238:847-854.
18. Barzu T, Van Rijn JL, Petitou M, Tobelem G, Caen JP. Heparin degradation in the endothelial cells. *Thromb Res* 1987; 47:601-609.

- 
19. Bastida E, Escolar G, Ordinas A, Sixma JJ. Fibronectin is required for platelet adhesion and for thrombus formation on subendothelium and collagen surfaces. *Blood* 1987; 70:1437-1442.
  20. Basu D, Gallus A, Hirsh J, Cade J. A prospective study of the value of monitoring heparin treatment with the activated partial thromboplastin time. *N Engl J Med* 1972; 287:324-327.
  21. Bauer KA, Rosenberg RD. Role of antithrombin III as a regulator of in vivo coagulation. *Semin Hematol* 1991; 28:10-18.
  22. Bergqvist D, Matzsch T, Burmark US, et al. Low molecular weight heparin given the evening before surgery compared with conventional low-dose heparin in prevention of thrombosis [published erratum appears in *Br J Surg* 1988 Nov;75(11):1077]. *Br J Surg* 1988; 75:888-891.
  23. Berrettini M, Lämmle B, Griffin JH. Initiation of coagulation and relationships between intrinsic and extrinsic coagulation pathways. In: Verstraete M, Vermynen J, Lijnen R, Arnout J, eds. *Thrombosis and hemostasis*. Leuven: Leuven University Press, 1987:473-495.
  24. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RFA. Platelet Procoagulant Activity - Physiological Significance and Mechanisms of Exposure. *Blood Rev* 1991; 5:146-154.
  25. Bjornsson TD, Wolfram KM, Kitchell B. Heparin kinetics determined by three assay methods. *Clin Pharmacol Therap* 1982; 31:104-113.
  26. Boneu B, Caranobe C, Gabaig AM, et al. Evidence for a saturable mechanism of disappearance of standard heparin in rabbits. *Thromb Res* 1987; 46:835-844.
  27. Borsum T. Biochemical Properties of Vascular Endothelial Cells. *Virchows Arch [B]* 1991; 60:279-286.

- 
28. Bourne HR, Master SB, Sullivan KA. Mammalian G proteins: structure and function. *Biochem Soc Trans* 1987; 15:35-41.
29. Brass EP, Forman WB, Edwards RV, Lindan O. Fibrin formation: the role of the fibrinogen-fibrin monomer complex. *Thromb Haemost* 1976; 36:36-48.
30. Bratt G, Aberg W, Johansson M, Tornebohm E, Granqvist S, Lockner D. Two daily subcutaneous injections of Fragmin as compared with intravenous standard heparin in the treatment of deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1990; 64:506-512.
31. Bratt G, Tornebohm E, Granqvist S, Aberg W, Lockner D. A comparison between low molecular weight heparin (KABI 2165) and standard heparin in the intravenous treatment of deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1985; 54:813-817.
32. Bratt G, Tornebohm E, Widlund L, Lockner D. Low molecular weight heparin (KABI 2165, Fragmin): pharmacokinetics after intravenous and subcutaneous administration in human volunteers. *Thromb Res* 1986; 42:613-620.
33. Breyer HG. Thromboprophylaxis with Heparin and Low Molecular Weight Heparin in Elective Hip Surgery - Current Status and Perspectives. *Semin Thromb Hemostasis* 1991; 17:336-342.
34. Briant L, Caranobe C, Saivin S, et al. Unfractionated heparin and CY 216: pharmacokinetics and bioavailabilities of the antifactor Xa and IIa effects after intravenous and subcutaneous injection in the rabbit. *Thromb Haemost* 1989; 61:348-353.
35. Brommer EJP, Brakman P. Developments in fibrinolysis. In: Poller L, ed. *Recent advances in blood coagulation*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1991:17-33.

- 
36. Bruns RR, Palade GE. Studies on blood capillaries. I. General organization of blood capillaries in muscle. *J Cell Biol* 1968; 37:244-266.
37. Budzynki AZ, Olexa SA, Pandya BV. Fibrin polymerization sites in fibrinogen and fibrin fragments. *Ann NY Acad Sci* 1983; 408:301-313.
38. Caranobe C, Barret A, Gabaig AM, Dupouy D, Sie P, Boneu B. Disappearance of circulating anti-Xa activity after intravenous injection of standard heparin and of a low molecular weight heparin (CY 216) in normal and nephrectomized rabbits. *Thromb Res* 1985; 40:129-133.
39. Caranobe C, Petitou M, Dupouy D, et al. Heparin fractions with high and low affinities to antithrombin III are cleared at different rates. *Thromb Res* 1986; 43:635-641.
40. Carr ME, Powers PL. Effect of glycosaminoglycans on thrombin- and atroxin-induced fibrin assembly and structure. *Thromb Haemost* 1989; 62:1057-1061.
41. Carreras LO. Thrombosis and thrombocytopenia induced by heparin. *Scand J Haematol Suppl* 1980; 36:64-80.
42. Carter CJ, Kelton JG, Hirsh J, Cerskus A, Santos AV, Gent M. The relationship between the haemorrhagic and antithrombotic properties of low molecular weight heparins in rabbits. *Blood* 1980; 59:1239-1244.
43. Casu B. Methods of structural analysis. In: Lane DA, Lindahl U, eds. *Heparin. Chemical and biological properties, clinical applications*. London: Edward Arnold, 1989:26-49.
44. Casu B. Structure of heparin and heparin fragments. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 556:1-17.

- 
45. Chang JC. White clot syndrome associated with heparin-induced thrombocytopenia: a review of 23 cases. *Heart Lung* 1987; 16:403-407.
46. Choay J, Petitou M, Lormeau JC, Sinay P, Casu B, Gatti G. Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 116:492-499.
47. Chong BH, Berndt MC. Heparin-induced thrombocytopenia. *Blut* 1989; 58:53-57.
48. Chong BH, Fawaz I, Chesterman CN, Berndt MC. Heparin-induced thrombocytopenia: mechanism of interaction of the heparin-dependent antibody with platelets. *Br J Haematol* 1989; 73:235-240.
49. Chong BH, Ismail F, Cade J, Gallus AS, Gordon S, Chesterman CN. Heparin-induced thrombocytopenia: studies with a new low molecular weight heparinoid, Org 10172. *Blood* 1989; 73:1592-1596.
50. Cines DB, Tomaski A, Tannenbaum S. Immune endothelial-cell injury in heparin-associated thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1987; 316:581-589.
51. Cipolle RJ, Seifert RD, Neilan BA, Zaske DE, Haus E. Heparin kinetics: variables related to disposition and dosage. *Clin Pharmacol Therap* 1981; 29:387-393.
52. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haemat* 1957; 17:237-248.
53. Collen D, Lijnen HR. Molecular and cellular basis of fibrinolysis. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, eds. *Hematology: basic principles and practice*. New York: Churchill Livingstone, 1991:1232-1242.

- 
54. Collins R, Scrimgeour A, Yusuf S, Peto R. Reduction in fatal pulmonary embolism and venous thrombosis by perioperative administration of subcutaneous heparin. Overview of results of randomized trials in general, orthopedic, and urologic surgery. *N Engl J Med* 1988; 318:1162-1173.
55. Colman RW. Platelet receptors. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4:27-42.
56. Colman RW. Receptors That Activate Platelets. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 197:242-248.
57. Colman RW, Marder VJ, Salzman EW, Hirsh J. Overview of Hemostasis. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*. 2nd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1987:3-17.
58. Crafoord C. Preliminary report on post-operative treatment with heparin as a preventive of thrombosis. *Acta Chir Scand* 1937; 79:407-426.
59. Crafoord C, Jorpes E. Heparin as a prophylactic against thrombosis. *J Amer Med Ass* 1941; 116:2831-2835.
60. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964; 145:1310-1312.
61. Dawes J, Bara L, Billaud E, Samama M. Relationship between biological activity and concentration of a low-molecular-weight heparin (PK 10169) and unfractionated heparin after intravenous and subcutaneous administration. *Haemostasis* 1986; 16:116-122.
62. Dawes J, Pepper DS. Catabolism of low-dose heparin in man. *Thromb Res* 1979; 14:845-860.

- 
63. de Celis G, Martinez Brotons F, Pinto J, Dorca E. Trombocitopenia asociada con el uso profiláctico de la heparina. *Med Clin Barc* 1984; 83:86-87.
64. de Groot PG, Reinders JH, Sixma JJ. Perturbation of human endothelial cells by thrombin or PMA changes the reactivity of their extracellular matrix towards platelets. *J Cell Biol* 1987; 104:697-704.
65. de Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion. *Br J Haematol* 1990; 75:308-312.
66. de Swart CAM, Nijmeyer B, Roelofs JMM, Sixma JJ. Kinetics of intravenously administered heparin in normal humans. *Blood* 1982; 60:1251-1258.
67. Decousus HA, Croze M, Levi FA, et al. Circadian changes in anticoagulant effect of heparin infused at a constant rate. *Br Med J Clin Res* 1985; 290:341-344.
68. Diness V, Ostergaard PB. Neutralization of a low molecular weight heparin (LHN-1) and conventional heparin by protamine sulfate in rats. *Thromb Haemost* 1986; 56:318-322.
69. Diuguid DL, Furie B. Molecular genetics of hemophilia B. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, eds. *Hematology. Basic principles and practice*. New York: Churchill Livingstone, 1991:1316-1324.
70. Dolan G, Ball J, Preston FE. Protein C and protein S. *Baillière's Clin Haematol* 1989; 2:999-1042.
71. Doutremepuich C, de Haro E, De Sèze O, Guyot M, Bonini F. In-vivo and in-vitro neutralization of a low molecular weight fraction of heparin (CY 216) by protamine. In: Breddin K, ed. *Fraxiparine: analytical and structural data, pharmacology, clinical trials*. Stuttgart: Schattauer Verlag, 1989:97-107.
72. Doutremepuich C, Toulemonde F, Bousquet F, Bonini F. Comparison of the haemorrhagic effects of unfractionated heparin and a low molecular weight heparin fraction (CY 216) in rabbits. *Thromb Res* 1986; 43:691-695.

- 
73. Doyle DJ, Turpie AG, Hirsh J, et al. Adjusted subcutaneous heparin or continuous intravenous heparin in patients with acute deep vein thrombosis. A randomized trial. *Ann Intern Med* 1987; 107:441-445.
74. Dukes GE Jr, Sanders SW, Russo J Jr, et al. Transaminase elevations in patients receiving bovine or porcine heparin. *Ann Intern Med* 1984; 100:646-650.
75. Durand D, Ader JL, Rey JP, et al. Inducing hyperkalemia by converting enzyme inhibitors and heparin. *Kidney Int Suppl* 1988; 25:196-197.
76. Duroux P, Beclere A. A randomized trial of subcutaneous low molecular weight heparin (CY216) compared with intravenous unfractionated heparin in the treatment of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1991; 65:251-256.
77. Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 1991; 66:67-79.
78. Eichinger S, Kyrle PA, Brenner B, et al. Thrombocytopenia associated with low-molecular-weight-heparin. *Lancet* 1992; 337:1425-1426.
79. Emanuele RM, Fareed J. The effect of molecular weight on the bioavailability of heparin. *Thromb Res* 1987; 48:591-596.
80. Emanuele RM, Fareed J, Walenga JM, Hoppensteadt DA, Baker WH. Usefulness of fibrinopeptide A generation tests in experimental and clinical studies with low molecular weight heparin fractions. *Semin Thromb Hemost* 1985; 11:121-128.
81. Erickson LA, Schleef RR, Ny T, Loskutoff DJ. The fibrinolytic system of the vascular wall. *Clin Haematol* 1985; 14:513-530.
82. Escolar G, Krumwiede M, White JG. Organization of actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension. *Am J Pathol* 1986; 123:86-94.



83. Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989; 264:4743-4746.
84. Esmon CT, Suttie JW, Jackson CM. The functional significance of vitamin K action: difference in phospholipid binding between normal and abnormal prothrombin. *J Biol Chem* 1975; 250:4095-4909.
85. Fagher B, Lundh B. Heparin treatment of deep venous thrombosis. *Acta Med Scand* 1981; 210:357-361.
86. Faivre R, Neuhart E, Kieffer Y, Toulemonde F, Bassand JP, Mavrat JP. Subcutaneous administration of a low molecular weight heparin (CY222) compared with subcutaneous administration of standard heparin in patients with acute deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1987; 58:430.
87. Fajardo LF. The complexity of endothelial cells. A review. *Am J Clin Pathol* 1989; 92:241-250.
88. Fareed J, Walenga JM, Hoppensteadt DA, Ahsan A, Murphy R, Coyne E. Molecular composition of depolymerized heparins: relevance to biochemical and pharmacologic effects. In: Bounameaux H, Samama M, ten Cate JW, eds. Fraxiparine, second international symposium. Recent pharmacological and clinical data. Stuttgart: Schattauer, 1990:133-156.
89. Folkman J, Langer R, Linhardt RJ, Haudenschild C, Taylor S. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 1983; 221:719-725.
90. Fowlie J, Stanton PD, Anderson JR. Heparin-associated skin necrosis. *Postgrad Med J* 1990; 66:573-575.

- 
91. Fox JEB. The platelet cytoskeleton. In: Verstraete M, Vermeylen J, Lijnen R, Arnout J, eds. *Thrombosis and Haemostasis*. Leuven: Leuven University Press, 1987:175-225.
92. Frojmovic MM, Milton JG, Duchastel A. Microscopic measurements of platelet aggregation reveal a low ADP-dependent process distinct from turbidometrically measured aggregation. *J Lab Clin Med* 1983; 101:964-976.
93. Fuhrer G, Gallimore MJ, Heller W, Hoffmeister HE. F XII. *Blut* 1990; 61:258-266.
94. Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, eds. *Hematology: basic principles and practice*. New York: Churchill Livingstone, 1991:1213-1231.
95. Gallus A, Jackaman J, Tillett J, Mills W, Wycherley A. Safety and efficacy of warfarin started early after submassive venous thrombosis - a randomized clinical trial. *Lancet* 1986; 2:1293-1296.
96. Gallus AS. Anticoagulants in the prevention of venous thromboembolism. *Baillière's Clin Haematol* 1990; 3:651-684.
97. Gerrard JM, White JG, Peterson DA. The platelet dense tubular system: its relationship to prostaglandin synthetic and calcium flux. *Thromb Haemost* 1978; 40:224-231.
98. Giannelli F. Factor IX. *Baillière's Clin Haematol* 1989; 2:821-848.
99. Glazier RL, Crowell EB. Randomized prospective trial of continuous vs intermittent heparin therapy. *JAMA* 1976; 236:1365-1367.
100. Glimelius B, Busch C, Hook M. Binding of heparin on the surface of cultured human endothelial cells. *Thromb Res* 1978; 12:773-782.

101. Goudable C, Saivin S, Houin G, et al. Pharmacokinetics of a Low Molecular Weight Heparin (Fraxiparine) in Various Stages of Chronic Renal Failure. *Nephron* 1991; 59:543-545.
102. Goudable C, Ton That H, Damani A, et al. Low molecular weight heparin half life is prolonged in haemodialysed patients. *Thromb Res* 1986; 43:1-5.
103. Gray E, Padilla A, Barrowcliffe TW. Inhibition of thrombin generation by heparin and low molecular weight heparins - comparison of intrinsic and extrinsic systems. *Thromb Haemost* 1991; 65:844.(abstract)
104. Greinacher A, Michels I, Mueller-Eckhardt C. Heparin-associated thrombocytopenia: the antibody is not heparin specific. *Thromb Haemost* 1992; 67:545-549.
105. Griffith GC, Nichols G, Asher JD, Flandagan B. Heparin osteoporosis. *JAMA* 1965; 193:85-88.
106. Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension* 1988; 12:530-548.
107. Gueret P, Dubourg O, Ferrier A, Farcot JC, Rigaud M, Bourdarias JP. Effects of full-dose heparin anticoagulation on the development of left ventricular thrombosis in acute transmural myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1986; 8:419-426.
108. Hamberg M, Svenson I, Samuelson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:2994-2998.
109. Handa M, Titani K, Holland LZ, Roberts JR, Ruggeri ZM. The von Willebrand factor-binding domain of platelet membrane glycoprotein Ib. Characterization by monoclonal antibodies and partial amino acid sequence analysis of proteolytic fragments. *J Biol Chem* 1986; 261:12579-12585.

- 
110. Hawiger J. Formation and regulation of platelet and fibrin hemostatic plug. *Hum Pathol* 1987; 18:111-122.
111. Heeger PS, Backstrom JT. Heparin flushes and thrombocytopenia. *Ann Intern Med* 1986; 105:143-143.
112. Hiebert LM, Jaques LB. The observation of heparin on endothelium after injection. *Thromb Res* 1976; 8:195-204.
113. Hirsch GM, Karnovsky MJ. Inhibition of Vein Graft Intimal Proliferative Lesions in the Rat by Heparin. *Am J Pathol* 1991; 139:581-587.
114. Hirsh J. Heparin. *N Engl J Med* 1991; 324:1565-1574.
115. Hirsh J, Levine MN. Low Molecular Weight Heparin. *Blood* 1992; 79:1-17.
116. Hirsh J, van Aken WG, Gallus AS, Dollery CT, Cade JF, Yung WL. Heparin kinetics in venous thrombosis and pulmonary embolism. *Circulation* 1976; 53:691-695.
117. Hogg PJ, Jackson CM. Fibrin monomer protects thrombin from inactivation by heparin- antithrombin III: implications for heparin efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:3619-3623.
118. Holm HA, Ly B, Handeland GF, et al. Subcutaneous heparin treatment of deep venous thrombosis: a comparison of unfractionated and low molecular weight heparin. *Haemostasis* 1986; 16:2-30-7.
119. Holmer E, Soderberg K. Inhibition of heparin oligosaccharides by protamine chloride. *Semin Thromb Hemost* 1985; 11:241-242.
120. Hommes DW, Bura A, Mazzolai L, Buller HR, Tencate JW. Subcutaneous Heparin Compared with Continuous Intravenous Heparin Administration in the

---

Initial Treatment of Deep Vein Thrombosis - A Meta-Analysis. *Ann Intern Med* 1992; 116:279-284.

121. Horner AA. Macromolecular heparin from rat skin: isolation, characterization and depolymerization with ascorbate. *J Biol Chem* 1971; 246:231-236.

122. Hovig T. Megakaryocyte and platelet morphology. *Baillière's Clin Haematol* 1989; 2:503-541.

123. Howell WH. The purification of heparin and its chemical and physiological reactions. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1928; 42:199-206.

124. Howell WH, Holt E. Two new factors in blood coagulation: heparin and pro-antithrombin. *Am J Physiol* 1918; 47:328-341.

125. Höök M, Björk I, Hopwood J, Lindahl U. Anticoagulant activity of heparin: separation of high-activity and low activity heparin species by affinity chromatography on immobilized antithrombin. *FEBS Lett* 1976; 66:90-93.

126. Hull RD, Raskob GE, Pineo GF, et al. Subcutaneous low-molecular-weight-heparin compared with continuous intravenous heparin in the treatment of proximal-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1992; 326:975-982.

127. Hull RD, Raskob GE, Rosenbloom D, et al. Heparin for 5 days as compared with 10 days in the initial treatment of proximal venous thrombosis. *N Engl J Med* 1990; 322:1260-1264.

128. Ikeda Y, Handa M, Kawano K, et al. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest* 1991; 87:1234-1240.

129. Isenberg WM, Bainton DF. Megakaryocyte and platelet structure. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, eds. *Hematology: basic principles and practice*. New York: Churchill Livingstone, 1991:1157-1165.

130. Jaffe EA. Endothelial cell structure and function. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, eds. Hematology. Basic principles and practice. New York: Churchill Livingstone, 1991:1198-1213.
131. Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71:1906-1909.
132. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest 1973; 52:2745-2756.
133. Jaques LB. Protamine neutralization for heparin. Can J Pharmacol Sci 1977; 12:44-47.
134. Jenny RJ, Mann KG. Factor V: a prototype pro-cofactor for vitamin K-dependent enzyme complexes in blood clotting. Baillière's Clin Haematol 1989; 2:919-944.
135. Jick H, Slone D, Borda IT, Shapiro S. Efficacy and toxicity of heparin in relation to age and sex. N Engl J Med 1968; 279:284-286.
136. Jorpes E. The chemistry of heparin. Biochem J 1935; 29:1817-1830.
137. Kakkar VV, Murray WJ. Efficacy and safety of low-molecular-weight heparin (CY216) in preventing postoperative venous thrombo-embolism: a co-operative study. Br J Surg 1985; 72:786-791.
138. Karnovsky MJ, Wright TC Jr, Castellot JJ Jr, Choay J, Lormeau JC, Petitou M. Heparin, heparan sulfate, smooth muscle cells, and atherosclerosis. Ann N Y Acad Sci 1989; 556:268-281.
139. Kelton JG, Sheridan D, Santos A, et al. Heparin-induced thrombocytopenia: laboratory studies. Blood 1988; 72:925-930.

- 
140. Koller M, Schoch U, Buchmann P, Largiader F, von Felten A, Frick PG. Low molecular weight heparin (KABI 2165) as thromboprophylaxis in elective visceral surgery. A randomized, double-blind study versus unfractionated heparin. *Thromb Haemost* 1986; 56:243-246.
141. Kroll MH, Harris TS, Moake JL, Handin RI, Schafer AI. von Willebrand Factor Binding to Platelet GpIb Initiates Signals for Platelet Activation. *J Clin Invest* 1991; 88:1568-1573.
142. Kroll MH, Schafer AI. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 1989; 74:1181-1195.
143. Krulder JWM, de Boer A, Van den Besselaar AMHP, et al. Diurnal rhythm in anticoagulant effect of heparin during low dose constant rate infusion. A study in healthy volunteers. *Thromb Haemost* 1992; 68:30-32.
144. Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix. *FEBS Lett* 1990; 268:386-393.
145. Lagodzinski Z, Gorski A, Wasik M. Immunosuppressive action of low-dose heparin. Effect on skin allograft survival. *Transplantation* 1990; 50:714-715.
146. Lam LH, Silbert JE, Rosenberg RD. The separation of active and inactive forms of heparin. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 69:570-574.
147. Lambert M, Laterre PF, Leroy C, Lavenne E, Coche E, Moriau M. Modifications of liver enzymes during heparin therapy. *Acta Clin Belg* 1986; 41:307-310.
148. Lane DA, Caso R. Antithrombin: structure, genomic organization, function and inherited deficiency. *Baillière's Clin Haematol* 1989; 2:961-998.

- 
149. Lämmle B, Griffin JH. Formation of the fibrin clot: the balance of procoagulant and inhibitory factors. *Clin Haematol* 1985; 14:281-342.
150. Leboeuf RD, Gregg RR, Weigel PH, Fuller GM. Effect of hyaluronic acid and other glycosaminoglycans on fibrin polymer formation. *Biochemistry* 1987; 26:6052-6057.
151. Lecompte T, Luo SK, Stieltjes N, Lecrubier C, Samama MM. Thrombocytopenia Associated with Low-Molecular-Weight Heparin. *Lancet* 1991; 338:1217-1217.
152. Lensing AWA, Büller HR, Prandoni P. Bleeding after low-molecular-weight heparin. *Lancet* 1992; 339:1119-1120.
153. Levi M, Hack CE, Deboer JP, Brandjes DPM, Buller HR, Tencate JW. Reduction of Contact Activation Related Fibrinolytic Activity in Factor-XII Deficient Patients - Further Evidence for the Role of the Contact System in Fibrinolysis In vivo. *J Clin Invest* 1991; 88:1155-1160.
154. Levine LE, Bernstein JE, Soltani K, Medenica MM, Yung CW. Heparin-induced cutaneous necrosis unrelated to injection sites. A sign of potentially lethal complications. *Arch Dermatol* 1983; 119:400-403.
155. Levine MN, Hirsh J. An overview of clinical trials of low molecular weight heparin fractions. *Acta Chir Scand Suppl* 1988; 543:73-79.
156. Levine MN, Hirsh J, Kelton JG. Heparin-induced bleeding. In: Lane DA, Lindahl U, eds. *Heparin. Chemical and biological properties, clinical applications*. London: Edward Arnold, 1989:517-532.
157. Leyvraz PF, Richard J, Bachmann F, et al. Adjusted versus fixed-dose subcutaneous heparin in the prevention of deep-vein thrombosis after total hip replacement. *N Engl J Med* 1983; 309:954-958.



- 
158. Lindahl AK, Abildgaard U, Larsen ML, et al. Extrinsic Pathway Inhibitor (EPI) Released to the Blood by Heparin Is a More Powerful Coagulation Inhibitor Than Is Recombinant EPI. *Thromb Res* 1991; 62:607-614.
159. Lindahl AK, Jacobsen PB, Sandset PM, Abildgaard U. Tissue factor pathway inhibitor with high anticoagulant activity is increased in post-heparin plasma and in plasma from cancer patients. *Blood Coagulat Fibrinol* 1991; 2:713-721.
160. Lindahl U, Backstrom G, Thunberg L. The antithrombin-binding sequence in heparin. Identification of an essential 6-O-sulfate group. *J Biol Chem* 1983; 258:9826-9830.
161. Lindahl U, Bäckström G, Hook M, Thunberg L, Fransson LA, Linker A. Structure of the antithrombin-binding site of heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:3198-3202.
162. Lindblad B. Prophylaxis of postoperative thromboembolism with low dose heparin alone or in combination with dihydroergotamine. A review. *Acta Chir Scand Suppl* 1988; 543:31-42.
163. Ljungberg B, Beving H, Egberg N, Johnsson H, Vesterqvist O. Immediate effects of heparin and LMW heparin on some platelet and endothelial derived factors. *Thromb Res* 1988; 51:209-217.
164. Lorand L, Losowsky MS, Miloszewski KJM. Human factor XIII: fibrin-stabilizing factor. *Prog Hemost Thromb* 1980; 5:245-290.
165. Loscalzo J. Thrombolysis in the management of acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. *Drugs* 1989; 37:191-204.
166. Louache F, Debili N, Cramer E, Breton-Gorius J, Vainchenker W. Fibrinogen is not synthesized by human megakaryocytes. *Blood* 1991; 77:311-316.

- 
167. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964; 202:498-499.
168. Macgillivray RTA, Fung MR. Molecular biology of factor X. *Baillière's Clin Haematol* 1989; 2:897-917.
169. Mann KG, Lundblad RL. Biochemistry of thrombin. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*. 2nd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1987:148-161.
170. Mann KG, Tracy PB, Krishnaswamy S, Jenny RJ, Odegaard BH, Nesheim ME. Platelets and coagulation. In: Verstraete M, Vermynen J, Lijnen R, Arnout J, eds. *Thrombosis and hemostasis*. Leuven: Leuven University Press, 1987:505-523.
171. Mant MJ, Thong KL, Birtwhistle RV, O'Brien BD, Hammond GW, Grace MG. Haemorrhagic complications of heparin therapy. *Lancet* 1977; 1:1133-1135.
172. Mätzsch T, Bergqvist D, Hedner U, Nilsson B, Ostergaard P. Effects of low molecular weight heparin and unfragmented heparin on induction of osteoporosis in rats. *Thromb Haemost* 1990; 63:505-509.
173. McDonagh J. Structure and function of factor XIII. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*. 2nd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1987:289-300.
174. McLean J. The thromboplastic action of cephalin. *Am J Physiol* 1916; 41:250-257.
175. McLean J. The discovery of heparin. *Circulation* 1959; 19:75-78.
176. Messmore HL J, Griffin B, Fareed J, Coyne E, Seghatchian J. In vitro studies of the interaction of heparin, low molecular weight heparin and heparinoids with platelets. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 556:217-232.

- 
177. Meuleman DG, Hobbelen PMJ, van Dedem G, Moelker HCT. A novel anti-thrombotic heparinoid (Org 10172) devoid of bleeding inducing capacity: A survey of its pharmacological properties in experimental animal models. *Thromb Res* 1982; 27:353-363.
178. Meuleman DG, Hobbelen PMJ, Vandinther TG, Vogel GMT, Vanboeckel CAA, Moelker HCT. Antifactor-Xa Activity and Antithrombotic Activity in Rats of Structural Analogues of the Minimum Antithrombin-III Binding Sequence - Discovery of Compounds with a Longer Duration of Action Than of the Natural Pentasaccharide. *Semin Thromb Hemostasis* 1991; 17:112-117.
179. Michalski R, Lane DA, Pepper DS, Kakkar VV. Neutralization of heparin by platelet factor 4 and protamine sulphate. *Br J Haematol* 1978; 38:561-571.
180. Miller JL. von Willebrand disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4:107-128.
181. Monkhouse C. Physiological factors concerned with the removal of injected heparin from the circulating blood. *Am J Physiol* 1954; 178:223-232.
182. Morabia A. Heparin doses and major bleedings. *Lancet* 1986; 1:1278-1279.
183. Mosesson MW. Fibrin polymerization and its regulatory role in hemostasis. *J Lab Clin Med* 1990; 116:8-17.
184. Mosher DF. Cross-linking of fibronectin to collagenous proteins. *Mol Cell Biochem* 1984; 58:63-67.
185. Murray GDW, Best CH. The use of heparin in thrombosis. *Ann Surg* 1938; 108:163-173.
186. Nachman RL, Levine R, Jaffe EA. Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes. *J Clin Invest* 1977; 60:914-921.

- 
187. Nader HB, Dietrich CP. Natural occurrence, and possible biological role of heparin. In: Lane DA, Lindahl U, eds. Heparin. Chemical and biological properties, clinical applications. London: Edward Arnold, 1989:81-96.
188. Nader HB, Takahashi HK, Straus AH, Dietrich CP. Selective distribution of the heparin in mammals. Conspicuous presence of heparin in lymphoid tissues. *Biochim Biophys Acta* 1980; 627:40-47.
189. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem* 1974; 22:1084-1091.
190. Nawroth P, Stern D. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumour necrosis factor. *J Exp Med* 1986; 163:740-745.
191. Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood* 1988; 71:1-8.
192. Nemerson Y, Turitto VT. The Effect of Flow on Hemostasis and Thrombosis. *Thromb Haemost* 1991; 66:272-276.
193. Neri Serneri GG, Gensini GF, Poggesi L, et al. Effect of heparin, aspirin, or alteplase in reduction of myocardial ischaemia in refractory unstable angina. *Lancet* 1990; 335:615-618.
194. Neri Serneri GG, Rovelli F, Gensini GF, Pirelli S, Carnovali M, Fortini A. Effectiveness of low-dose heparin in prevention of myocardial reinfarction. *Lancet* 1987; 1:937-942.
195. Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG. The contribution of bovine factor V and factor Va to the activity of prothrombinase. *J Biol Chem* 1979; 254:10952-10962.
196. Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJJr. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood* 1988; 72:2020-2025.

197. Novotny WF, Palmier M, Wun TC, Broze GJ, Jr., Miletich JP. Purification and properties of heparin-releasable lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Blood* 1991; 78:394-400.
198. Nurmohamed MT, Fareed J, Hoppensteadt D, Walenga JM, Tencate JW. Pharmacological and Clinical Studies with Lomoparan, a Low Molecular Weight Glycosaminoglycan. *Semin Thromb Hemost* 1991; 17:205-213.
199. Nurmohamed MT, Rosendaal FR, Büller HR, et al. Low-molecular-weight heparin versus standard heparin in general and orthopaedic surgery: a meta-analysis. *Lancet* 1992; 340:152-156.
200. O'Brien DP. The molecular biology and biochemistry of tissue factor. *Baillière's Clin Haematol* 1989; 2:801-820.
201. Ockelford PA, Carter CJ, Mitchell L, Hirsh J. Discordance between the anti-Xa activity and the antithrombotic activity of an ultra-low molecular weight heparin fraction. *Thromb Res* 1982; 28:401-409.
202. Ockelford PA, Patterson J, Johns AS. A double-blind randomized placebo controlled trial of thromboprophylaxis in major elective general surgery using once daily injections of a low molecular weight heparin fragment (Fragmin). *Thromb Haemost* 1989; 62:1046-1049.
203. Ofosu FA, Gray E. Mechanisms of action of heparin: applications to the development of derivatives of heparin and heparinoids with antithrombotic properties. *Semin Thromb Hemost* 1988; 14:9-17.
204. Ofosu FA, Sie P, Modi GJ, et al. The inhibition of thrombin-dependent positive-feedback reactions is critical to the expression of the anticoagulant effect of heparin. *Biochem J* 1987; 243:579-588.

- 
205. Ogston D, Bennett B. Blood coagulation mechanism. In: Poller L, ed. Recent advances in blood coagulation. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1991:1-15.
206. Okwusidi JI, Anvari N, Kulczycky M, Blajchman MA, Buchanan MR, Ofofu FA. Fibrin moderates the catalytic action of heparin but not that of dermatan sulfate on thrombin inhibition in human plasma. *J Lab Clin Med* 1991; 117:359-364.
207. Olsson P, Lagergren H, Ek S. The elimination from plasma of intravenous heparin. An experimental study on dogs and humans. *Acta Med Scand* 1963; 173:619-630.
208. Ortel TL, Gockerman JP, Califf RM, et al. Parenteral anticoagulation with the heparinoid Lomoparan (Org 10172) in patients with heparin induced thrombocytopenia and thrombosis. *Thromb Haemost* 1992; 67:292-296.
209. Palm M, Mattsson C. Pharmacokinetics of fragmin. A comparative study in the rabbit of its high and low affinity forms for antithrombin. *Thromb Res* 1987; 48:51-62.
210. Palm M, Mattsson C. Pharmacokinetics of heparin and low molecular weight heparin fragment (Fragmin) in rabbits with impaired renal or metabolic clearance. *Thromb Haemost* 1987; 58:932-935.
211. Pannekoek H, Voorberg J. Molecular cloning, expression and assembly of multimeric von Willebrand factor. *Baillière's Clin Haematol* 1989; 2:879-896.
212. Parker KA, Tollefsen DM. The protease specificity of heparin cofactor II. Inhibition of thrombin generated during coagulation. *J Biol Chem* 1985; 260:3501-3505.
213. Platell CF, Tan EG. Hypersensitivity reactions to heparin: delayed onset thrombocytopenia and necrotizing skin lesions. *Aust N Z J Surg* 1986; 56:621-623.

214. Plow EF, Ginsberg MH. Cellular adhesion: GPIIb-IIIa as a prototypic adhesion receptor. *Prog Hemost Thromb* 1991; 10:117-156.
215. Plow EF, McEver RP, Collier BS, Woods VL Jr, Marguerie GA, Ginsberg MH. Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets. *Blood* 1985; 66:724-727.
216. Ponz E, Fernandez Sola J, Navarro M, Ingelmo M. Alteraciones de la biología hepática e hiperpotasemia inducida por heparina. *Med Clin Barc* 1986; 87:823-824.
217. Prandoni P, Lensing AWA, Büller HR, et al. Comparison of subcutaneous low-molecular-weight heparin with intravenous standard heparin in proximal deep-vein thrombosis. *Lancet* 1992; 339:441-445.
218. Preissner KT. Anticoagulant potential of endothelial cell membrane components. *Haemostasis* 1988; 18:271-300.
219. Pytela R, Pierschbacher MD, Ginsberg MH, Plow EF, Ruoslahti E. Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptors. *Science* 1986; 231:1559-1162.
220. Rao AK, White GC, Sherman L, Colman R, Lan G, Ball AP. Low incidence of thrombocytopenia with porcine mucosal heparin. A prospective multicenter study. *Arch Intern Med* 1989; 149:1285-1288.
221. Rapaport SI. The extrinsic pathway inhibitor: a regulator of tissue factor-dependent blood coagulation. *Thromb Haemost* 1991; 66:6-15.
222. Ratnoff OD, Busse RJ, Sheon RP. The demise of John Hageman. *N Engl J Med* 1968; 279:760-761.

- 
223. Rosenberg RD. Actions and interactions of antithrombin and heparin. *N Engl J Med* 1975; 292:146-151.
224. Rosenberg RD. Biochemistry of heparin antithrombin interactions, and the physiologic role of this natural anticoagulant mechanism. *Am J Med* 1989; 87:2S-9S.
225. Ruggeri ZM. Functional domains of von Willebrand factor involved in interactions with platelets and the subendothelium. *Prog Clin Biol Res* 1988; 283:219-224.
226. Ruggeri ZM, Ware J. The structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 1992; 67:594-599.
227. Saito H. Normal hemostatic mechanisms. In: Ratnoff OD, Forbes CD, eds. *Disorders of hemostasis*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1991:18-47.
228. Sakariassen KS, Aarts PA, de Groot PG, Houdijk WP, Sixma JJ. A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix, and purified components. *J Lab Clin Med* 1983; 102:522-535.
229. Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sixma JJ. Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII/von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature* 1979; 279:636-638.
230. Sakariassen KS, Nievelstein PF, Collier BS, Sixma JJ. The role of platelet membrane glycoproteins Ib and IIb- IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium. *Br J Haematol* 1986; 63:681-691.
231. Salomon F, Schmid M. Heparin. *N Engl J Med* 1991; 325:1585-1585.



- 
232. Salzman EW, Deykin D, Shapiro RM, Rosenberg R. Management of heparin therapy. Controlled prospective trial. *N Engl J Med* 1975; 292:1046-1050.
233. Sandset PM, Abildgaard U. Extrinsic pathway inhibitor - the key to feedback control of blood coagulation initiated by tissue thromboplastin. *Haemostasis* 1991; 21:219-239.
234. Sandset PM, Abildgaard U, Larsen ML. Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI). *Thromb Res* 1988; 50:803-813.
235. Schved JF, Gris JC, Eledjam ,J.J.. Circadian changes in anticoagulant effect of heparin infused at a constant rate. *Br Med J* 1985; 290:1286.
236. Sethi GK, Copeland JG, Goldman S, Moritz T, Zadina K, Henderson WG. Implications of preoperative administration of aspirin in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15:15-20.
237. Shands J. Macrophage procoagulants. *Haemostasis* 1984; 14:373-377.
238. Shattil SJ, Brass LF. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol Chem* 1987; 262:992-1000.
239. Sherman RA, Ruddy MC. Suppression of aldosterone production by low-dose heparin. *Am J Nephrol* 1986; 6:165-168.
240. Simonneau G. Subcutaneous fixed dose of Enoxaparin versus intravenous adjusted dose of unfractionated heparin in the treatment of deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1991; 65:754.(abstract)
241. Sixma JJ. The hemostatic plug. In: Poller L, ed. *Recent advances in blood coagulation*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1981:175-192.

242. Sixma JJ. Role of blood platelets, plasma proteins and the vessel wall in haemostasis. In: Bloom AL, Thomas DP, eds. Haemostasis and thrombosis. 2nd ed. London: Churchill Livingstone, 1987:283-302.
243. Smith JW, Dey N, Knauer DJ. Heparin binding domain of antithrombin III: Characterization using a synthetic peptide directed polyclonal antibody. *Biochemistry* 1990; 29:8950-8957.
244. Smith JW, Knauer DJ. A heparin binding site in antithrombin III. Identification, purification, and amino acid sequence. *J Biol Chem* 1987; 262:11964-11972.
245. Sobel M, McNeill PM, Carlson PL, et al. Heparin inhibition of von Willebrand factor-dependent platelet function *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 1991; 87:1787-1793.
246. Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD. Inducible secretion of large, biologically portent von Willebrand factors multimers. *Cell* 1986; 46:185-190.
247. Stemerman MB. Anatomy of the blood vessel wall. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. 2nd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1987:773-780.
248. Stenflo J. Vitamin K, prothrombin and carboxylglutamic acid. *N Engl J Med* 1977; 296:624-626.
249. Stern DM, Kaiser E, Nawroth PP. Regulation of the coagulation system by vascular endothelial cells. *Haemostasis* 1988; 18:202-214.
250. Suttie JW, Jackson CM. Prothrombin structure activation and biosynthesis. *Physiol Rev* 1977; 57:1-70.
251. Tamaki T, Aoki N. Cross-linking of  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor catalyzed by activated fibrin-stabilizing factor. *J Biol Chem* 1982; 257:14767-14772.

- 
252. Tantravahi RV, Stevens RL, Austen KF, Weis JH. A single gene in mast cells encodes the core protein of heparin and chondroitin sulfate proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:9207-9211.
253. Tardy B, Zeni F, Reynaud J, Tardyponcet B, Comtet C, Bertrand JC. Thrombocytopenia Associated with Low-Molecular-Weight Heparin. *Lancet* 1991; 338:1217-1217.
254. Teien AN. Heparin elimination in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 1977; 38:701-708.
255. Thomas DP, Merton R, Barrowcliffe TW, Thunberg L, Lindahl U. Effects of heparin oligosaccharides with high affinity for antithrombin III in experimental venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1982; 47:244-248.
256. Thomas DP, Merton RE, Gray E, Barrowcliffe TW. The relative antithrombotic effectiveness of heparin, a low molecular weight heparin, and a pentasaccharide fragment in an animal model. *Thromb Haemost* 1989; 61:204-207.
257. Tiefenbrunn AJ, Sobel BE. The impact of coronary thrombolysis on myocardial infarction. *Fibrinolysis* 1989; 3:1-15.
258. Tijburg PNM, IJsseldijk MJW, Sixma JJ, de Groot PG. Quantification of Fibrin Deposition in Flowing Blood with Peroxidase-Labeled Fibrinogen - High Shear Rates Induce Decreased Fibrin Deposition and Appearance of Fibrin Monomers. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:211-220.
259. Toulon P, Vitoux JF, Leroy C, et al. Circulating activities during constant infusion of heparin or a low molecular weight derivative (enoxaparine): failure to demonstrate any circadian variations. *Thromb Haemost* 1987; 58:1068-1072.
260. Tuddenham EGD. Factor VIII and haemophilia A. *Baillière's Clin Haematol* 1989; 2:849-877.

261. Tuneu A, Moreno A, de Moragas JM. Cutaneous reactions secondary to heparin injections. *J Am Acad Dermatol* 1985; 12:1072-1077.
262. Turitto VT, Baumgartner HR. Platelet interaction with subendothelium in a perfusion system. Physical role of red blood cells. *Microvasc Res* 1975; 9:335-344.
263. Turpie AGG. Prophylaxis of deep vein thrombosis. In: Poller L, ed. *Recent advances in blood coagulation*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1991:161-176.
264. Van Willigen G, Akkerman J-WN. Protein kinase C and cyclic AMP regulate reversible exposure of binding sites for fibrinogen on the glycoprotein IIB- IIIA complex of human platelets. *Biochem J* 1991; 273:115-120.
265. van Zanten GH, de Graaf S, Slootweg PJ, de Groot PG, Sixma JJ. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. The atherosclerotic plaque in coronary arteries is thrombogenic because it causes increased platelet adhesion and thrombus formation. Manuscript in preparation 1991;
266. Vane JR, Änggård EE, Botting RM. Mechanisms of disease: Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323:27-36.
267. Verhoeven AJ, Mommersteeg ME, Akkerman JW. Metabolic energy is required in human platelets at any stage during optical aggregation and secretion. *Biochim Biophys Acta* 1984; 800:242-250.
268. Vermylen J, Badenhorst PN, Deckmyn H, Arnout J. Normal mechanisms of platelet function. *Clin Haematol* 1983; 12:107-151.
269. Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol* 1982; 95:355-360.

270. Wagner WR, Hubbell JA. Local thrombin synthesis and fibrin formation in an in vitro thrombosis model result in platelet recruitment and thrombus stabilization on collagen in heparinized blood. *J Lab Clin Med* 1990; 116:636-650.
271. Walenga JM, Fareed J, Petitou M, Samama M, Lormeau JC, Choay J. Intravenous antithrombotic activity of a synthetic heparin pentasaccharide in a human serum induced stasis thrombosis model. *Thromb Res* 1986; 43:243-248.
272. Walker AM, Jick H. Predictors of bleeding during heparin therapy. *JAMA* 1980; 244:1209-1212.
273. Ware J, Dent JA, Azuma H, et al. Identification of a point mutation in type III von Willebrand disease illustrating the regulation of von Willebrand factor affinity for the platelet gp Ib-IX receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2946-2950.
274. Warkentin TE, Kelton JG. Heparin-induced thrombocytopenia. *Prog Hemost Thromb* 1991; 10:1-34.
275. Weibel ER, Palade GE. New cytoplasmic components in arterial endothelial cell. *J Cell Biol* 1964; 23:101-112.
276. Weinreich DJ, Burke JF, Pauletto FJ. Left ventricular mural thrombi complicating acute myocardial infarction: long-term follow-up with serial echocardiography. *Ann Intern Med* 1984; 100:789-794.
277. Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR. Role of shear rate and platelets in promoting fibrin formation on rabbit subendothelium. Studies utilizing patients with quantitative and qualitative platelet defects. *J Clin Invest* 1986; 78:1072-1082.
278. Weitz JI, Hudoba M, Massel D, Maraganore J, Hirsh J. Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin- antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors. *J Clin Invest* 1990; 86:385-391.

- 
279. Wesolowski J, Ault K, Houghton R, Parkman R. Heparin inhibition of antibody-dependent complement-mediated lysis. *Exp Hematol* 1984; 12:700-705.
280. White JG. Identification of platelet secretion in the electron microscope. *Series Haematol* 1973; 6:429-459.
281. White JG. Is the canalicular system the equivalent of the muscle sarcoplasmic reticulum? *Haemostasis* 1975; 4:185-191.
282. White JG. Platelet morphology and function. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, eds. *Hematology*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1983:1121-1135.
283. White JG. Platelet ultrastructure. In: Bloom AL, Thomas DP, eds. *Haemostasis and thrombosis*. 2nd ed. London: Churchill Livingstone, 1987:20-46.
284. White JG. Platelet membrane ultrastructure and its changes during platelet activation. In: Jamieson GA, ed. *Platelet membrane receptors: molecular biology, immunology, biochemistry and pathology*. New York: Alan R. Liss, 1987:1-32.
285. White JG, Escolar G. The Blood Platelet Open Canalicular System - A Two-Way Street. *Eur J Cell Biol* 1991; 56:233-242.
286. White JG, Leistikow EL, Escolar G. Platelet membrane responses to surface and suspension activation. *Blood Cells* 1990; 16:43-72.
287. Williams WJ. Production of plasma coagulation factors. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, eds. *Hematology*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1983:1222-1230.
288. Williams WJ. Biochemistry of plasma coagulation factors. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, eds. *Hematology*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1983:1202-1221.

289. Wilson JE, Bynum LJ, Parkey RW. Heparin therapy in venous thromboembolism. *Am J Med* 1981; 70:808-816.
290. Wilson JR, Lampman J. Heparin therapy: a randomized prospective study. *Am Heart J* 1979; 97:155-158.
291. Wilson SK, Heptinstall RH. The effects of heparin treatment on vascular permeability and vessel wall damage in acute hypertension in the rat. *Am J Pathol* 1983; 111:354-366.
292. Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EGD, Lawn RM. Distribution of factor VIII mRNA and antigens in human liver and other tissues. *Nature* 1989; 317:726-729.
293. Wun TC. Lipoprotein-Associated Coagulation Inhibitor (LACI) Is a Cofactor for Heparin - Synergistic Anticoagulant Action Between LACI and Sulfated Polysaccharides. *Blood* 1992; 79:430-438.
294. Yamamoto H, Fuyama S, Arai S, Sendo F. Inhibition of mouse natural killer cytotoxicity by heparin. *Cell Immunol* 1985; 96:409-417.
295. Yett HS, Skillman JJ, Salzman EW. The hazards of aspirin plus heparin. *N Engl J Med* 1978; 298:1092-1097.
296. Zimmerman TS, Fulcher CA. Factor VIII procoagulant protein. *Clin Haematol* 1985; 14:343-358.
297. Zwaal RFA. Membrane and lipid involvement in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 1978; 515:163-205.

298. Zwaginga JJ, Sixma JJ, de Groot PG. Activation of endothelial cells induces platelet thrombus formation on their matrix. Studies of new in vitro thrombosis model with low molecular weight heparin as anticoagulant. *Arteriosclerosis* 1990; 10:49-61.





(043)92

LO2 