

On the structure-function relationship of heparins

Citation for published version (APA):

al Dieri, R. (2000). On the structure-function relationship of heparins. Maastricht: Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2000

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

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

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary and Conclusions

The ideal antithrombotic drug is a well-defined, orally available, chemical that has a stable and predictable antithrombotic action over 24 hours per day, that however is quickly reversible and shows no side effects. Because of the predictable action, it does not need to be controlled. The very fact that heparin needs to be injected makes it less than ideal. The fact that it is a natural product that possesses other biological activities than antithrombotic properties and the fact that it needs to be injected several times daily are so many more negative points.

Low molecular weight heparins apparently have less negative properties than unfractionated heparins do. They work when injected once daily in a standard dose and are reported to cause less bleeding. LMWHs have been found to exhibit a high anti-factor Xa activity relative to their anti-thrombin activity. It was concluded that this property per se was important.

A logical discrepancy appeared when Béguin *et al.* found, as early as 1988, that, *in vitro*, the anti-Xa activity as such does hardly contribute to its anticoagulant action (Béguin *et al.*, 1988; Béguin *et al.*, 1989). This was reinforced by studies in healthy volunteers by Bendetowitz *et al.* (Bendetowicz *et al.*, 1992; Bendetowicz *et al.*, 1994). In subsequent studies our group suggested partial solutions to this problem (ref. 5). In this thesis we report the final elements required for a rational approach. The main remaining problem will be to have this accepted in a field where habit and tradition remain forceful determinants of decision.

A rational approach in the first place requires a sharp distinction between a) How much heparin is circulating and b) How much is the clotting function inhibited by this circulating heparin. In short, between pharmacokinetics and pharmacodynamics.

The pharmacokinetic profile, i.e. the course of the plasma concentration after injection determines how much of the drug is available to interact with the biological target (AT, HCII, Proteases). The pharmacodynamics of heparin is the study of the effect of the interaction between the drug and the site of action, i.e. pharmacological response.

This narrowed the questions down to a) How to determine heparin concentration in a plasma sample and b) how to determine the effect of heparin in a plasma sample.

The traditional answers are: a) by measuring anti-factor Xa activity, and b) by measuring the activated partial thromboplastin time (aPTT) or another form of clotting time. If, however, anti-factor Xa activity does not contribute to the anticoagulant effect, then is it logical to use this activity to

measure active heparin? Also the aPTT and other clotting times have their important drawbacks, as exposed in chapter II. In the meantime Hemker *et al.* developed a new function test of the coagulation system, the Thrombogram, and a new parameter for anticoagulant action, the area under the thrombogram or the endogenous thrombin potential (ETP). There were good arguments to believe that the ETP was a useful alternative to the aPTT and other clotting tests.

The fact that the beneficial effect of heparins appeared to be related to the molecular weight, automatically posed the question of what properties of heparin vary with its molecular weight and how.

From these considerations we developed the program of this thesis:

- i) Prepare well-defined, narrow Mr fractions of unfractionated and low molecular weight heparins.
- ii) Determine the concentration of antithrombin-binding sequence (A-domain) in each fraction.
- iii) Determination of the catalytic activities of the fractions on the inactivation of thrombin and factor Xa in the presence of isolated, purified antithrombin (end-point measurement).
- iv) Determination of the catalytic activities of the fractions on the inactivation of thrombin and factor Xa in plasma.
- v) Determine the effect of the fractions on the overall anticoagulant potency of plasma, using the Thrombogram (i.e. determining the ETP) and compare this to the aPTT.

The outcome of this research for the first time, shows the relation between the number of active heparin molecules of a given molecular weight, their specific anti-thrombin and anti-factor Xa activities and their influence on the thrombogram and aPTT tests.

We found that the anticoagulant activity of a heparin molecule of a well-defined molecular weight is dependent upon that molecular weight and not on the origin of the heparin. LMWHs and unfractionated heparin are different because they are different MW subsets of the same family of active molecules.

Our studies (Chapters IV and V) in the purified system of the anti-factor Xa activity confirmed that the presence of a specific pentasaccharide, the A-domain (ref. 8) is required for the activity. It was shown that the activity increases with Mr because of the enhanced possibility of the enzyme to bind to heparin. After binding unidimensional diffusion of the enzyme brings it to the A-domain where antithrombin is bound. At Mr > 20 the activity of the heparin decreases because the binding of factor Xa to the heparin is too loose to ensure a net increase of antithrombin-enzyme collision via

unidimensional diffusion; i.e., the enzyme dissociates from the heparin before it reaches the antithrombin.

The association of thrombin and the AT-heparin complex appeared to be >10 times stronger than that of F.Xa. This can account for the fact that here the decay constant is virtually constant when expressed in terms of the pentasaccharide with 12 sugar units to its left end.

From these studies it follows that the anti-thrombin activity is completely determined by the presence within the molecule of this sequence. This is the heparin that recently has been synthesized by Petitou et al (ref. 8) and that, in honor of the late Jean Choay, we call the C-domain. Our model maintains the "sliding model" for thrombin, but introduces a modified sliding model for the mechanism of factor Xa inactivation.

The molecular weight, i.e. chain-length of an AT-binding heparin, not surprisingly also has a strong influence on its anticoagulant activity in plasma (Chapter VI). Increase of the monosaccharide number results in enhanced anti-thrombin activity between 4.5 and 7.5 kD and is practically constant above 7.5 kD. The differences with the purified system, i.e. a decrease of activity at kD > 10 we attribute to aspecific binding to plasma proteins. In contrast to the anti-thrombin activity, the aXa-activity increases between 3.5 and 4 kD, plateaus between 5 - and 7 kD and above that limit increases practically linearly.

There is a marked Ca^{2+} -dependency of factor Xa inhibition in plasma. This is at the basis of an overestimation of factor Xa-activity in standard practice. The International Standard heparin, being an unfractionated heparin, requires Ca^{2+} for its full activity, LMWH is less susceptible to this effect (Schoen et al, 1992. Hemker and Béguin, 1993). The LMWH standard, being defined against the UFH one, carries on the error. This is of no biological importance, because heparin in (patho-) physiology always acts in the presence of Ca^{2+} . It is of great practical importance, however, because potency estimations and the clinical surveillance of heparin therapy are usually done without Ca^{2+} being present. This means that LMWHs are in an artificially favorable position if they are compared to the international standards and hence will show a spuriously high anti-factor Xa activity.

Because the aXa activity is not the main pharmacological activity to influence the clotting system, the aXa measurement is at its best useful to indicate the presence of heparin in plasma, but it does not reflect the anticoagulant action (Chapter VI) and therefore does not give comparable results between different heparins at equipotent antithrombotic doses. In those terms, an anti-thrombin method may be expected to do better.

We propose (Chapter IV) a new method that can be carried out in the presence of Ca^{2+} and requires only a simple end-point measurement in a

microtiter plate reader. The amount of active heparin is estimated from the aIIa activity, the ratio aIIa/aXa gives an estimate of the MW distribution of circulating heparin.

The inhibition of the endogenous thrombin potential (ETP) is identical for LMWH and for UFH as long as fractions of the same MW are compared (Chapter VI). The same holds for the aPTT, which however is a much less sensitive test to pick up inhibition. The inhibition of the ETP at equimolar concentrations of HAM, increases with the molecular mass of the heparin between 5 and 7 kD and plateaus afterwards. The inhibition of ETP or aPTT is independent of the origin of the fraction (LMWH or UFH). Very high MW fractions tend to be less active in plasma, probably because of aspecific binding to other plasma proteins as AT.

In the end, the unquestioned superiority of LMWH over UFH must be explained by a) better bioavailability of the LMW species and b) absence of fractions with a Mr > 10 000 that probably are haemorrhagic (see ref. 3). The aPTT is used universally as a correlate to the clinical effect of heparin. It is generally recognized to be less than ideal for a number of reasons (Kher *et al.*, 1997). The recognition that the aPTT is of limited value, together with the fact that in clinical trials satisfying results are obtained with standard doses, has led to the shortcut that control is not required. This soothes the conscience but remains an unproven statement unless it has been demonstrated with an adequate method that it is true. According to our opinion: a) in all probability control is required in the young, the old, the fat, the sick and other patients that are not generally admitted to the population of clinical trials, and b) adjusted doses might ameliorate the preventive/therapeutic results even in the "standard" patient as admitted to trials. There are two approaches to amelioration. i) Make the aPTT more reliable by standardization etc. ii) Design an alternative and better test. The first approach has practically failed (see Kher *et al.* 1997), so the second one imposes itself.

Our proposition is to use the ETP, in view of the fact that the function of the coagulation system is best measured by the amount of active thrombin that appears in the blood when coagulation is triggered (99 % appears after the blood/plasma has clotted). The ETP can be routinely measured by adding an artificial thrombin substrate and measuring its end-level in the serum (Hemker *et al.*, 1993). The value obtained is increased in hypercoagulability and decreased to values of between 20 and 50% of normal in adequate anticoagulation of any type (oral or heparin or others, Wielders *et al.*, 1997). This suggests that it might not be another surrogate variable but assess the essential function involved.

In summary, in this thesis we demonstrate that the active species in natural heparins is always the same, i.e. the Choay sequence and that the activity of a natural heparin is determined by the concentration of that sequence. We present methods to determine the concentration of this, as well as the active pentasaccharide sequence and sensitive method for the pharmacological effect, the ETP measurement. Our studies on the mechanism of heparin action have led to an alternative to the current viewpoints, in that we maintain the "sliding" model for the inactivation of thrombin, but produce evidence that for factor Xa a similar model is valid, be it that, due to the easy dissociation of factor Xa, this does not favor the anti-factor Xa activity at higher Mr (>15 000) heparin molecules.

References

1. Béguin, S., Lindhout, T. & Hemker, H.C. The mode of action of heparin in plasma. *Thromb Haemost* 60, 457-62 (1988).
2. Bendetowicz, A.V., Pacaud, E., Béguin, S., Uzan, A. & Hemker, H.C. On the relationship between molecular mass and anticoagulant activity in a low molecular weight heparin (enoxaparin). *Thromb Haemost* 67, 556-62 (1992).
3. Bendetowicz, A.V., Béguin, S., Caplain, H. & Hemker, H.C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a low molecular weight heparin (enoxaparin) after subcutaneous injection, comparison with unfractionated heparin--a three way cross over study in human volunteers. *Thromb Haemost* 71, 305-13 (1994).
4. Béguin, S., Choay, J. & Hemker, H.C. The action of a synthetic pentasaccharide on thrombin generation in whole plasma. *Thromb. Haemost* 61(3), 397-401 (1989).
5. Hemker, H.C. & Béguin, S. The activity of heparin in the presence and absence of Ca⁺⁺ ions; why the anti-Xa activity of LMW heparins is about two times overestimated. *Thromb. Haemost* 70(4), 717-718 (1993).
6. Hemker, H.C., Weilders, S., Kessels, H. & Béguin, S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, Its use for the determination of thrombin potential. *1993* 70, 617-624 (1993).
7. Kher, A., Al Dieri, R., Hemker, H.C. & Béguin, S. Laboratory assessment of antithrombotic therapy: what tests and if so why? [editorial]. *Haemostasis* 27, 211-8 (1997).

8. Petitou, M. *et al.* Synthesis of thrombin-inhibiting heparin mimetics without side effects [see comments]. *Nature* 398, 417-22 (1999).
9. Wielders, S. *et al.* The routine determination of the endogenous thrombin potential, first results in different forms of hyper- and hypocoagulability. *Thromb Haemost* 77, 629-36 (1997).

Samenvatting en Conclusies*

Het ideale antitromboticum is een goed gedefinieerde chemische verbinding die oraal in standaarddosering kan worden toegediend en die een stabiele en voorspelbare antitrombotische werking heeft gedurende 24 uur per dag. Het effect op het haemostase en trombosemechanisme moet echter snel reversibel zijn. Bij-effecten zijn uiteraard ongewensd. Indien de werking voldoende voorspelbaar is, is controle van het effect in de praktijk niet nodig.

Het traditionele, ongefractioneerde heparine (UFH) voldoet aan weinig van deze eisen, het is een natuurlijk product van slecht gedefinieerde samenstelling dat behalve antitrombotische- ook andere, onvolledig bekende, biologische werkingen heeft. Het moet enkele malen per dag worden geïnjecteerd. Waarschijnlijk is controle van de individuele respons van de patient wenselijk maar er zijn geen routinemethoden beschikbaar die het heparine-effect betrouwbaar weerspiegelen. Van de bijwerkingen is, naast de bloeding, vooral de thrombopenie (Heparin induced thrombopenia, HIT) gevreesd.

Laag moleculaire gewicht heparines (LMWHs) hebben minder negatieve eigenschappen dan ongefractioneerde heparines. Zij kunnen één maal per dag in standaarddosering per injectie worden toegediend. Er worden minder bloedingen en minder HIT gerapporteerd dan bij UFH. LMWHs hebben, vergeleken met UFH, bij gelijke anti-trombine activiteit, een hoge anti-factor Xa activiteit. Dit leidde tot de aanname dat een anti-factor Xa activiteit van kritisch belang was voor een heparine met optimale farmacologische eigenschappen.

Hiermee in tegenspraak was de ontdekking, reeds in 1988, van Béguin *et al.*, dat *in vitro* de anti-factor Xa activiteit nauwelijks bijdraagt tot zijn antistollende werking (Béguin *et al.*, 1988; Béguin *et al.*, 1989). Dit werd bevestigd door studies bij gezonde vrijwilligers door Bendetowicz *et al.* (Bendetowicz *et al.* 1992; Bendetowicz *et al.* 1994). Vervolgstudies van onze groep lieten zien dat de hoge anti-factor Xa activiteit van LMWH in belangrijke mate aan een laboratoriumartefact kon worden toegeschreven (Hemker & Béguin, 1993). In het algemeen bleek dat laboratorium bepalingen van het heparine eerder gestoeld zijn op gewoonte en traditie dan op een rationele benadering.

In de eerste plaats vereist een rationele aanpak een scherpe scheiding tussen de vragen a) hoeveel heparine circuleert en b) in hoeverre remt deze heparine de stollings-functie. Kortweg, tussen farmacokinetiek en farmacodynamiek.

De heparine concentratie wordt gebruikelijk bepaald door de anti-factor Xa activiteit te meten. Als echter de anti-factor Xa activiteit niet bijdraagt tot het anti-stollende effect, dan lijkt het niet logisch om deze activiteit te gebruiken om heparine concentraties te meten (Hoofdstuk I).

Voor de bepaling van het heparine-effect maakt men algemeen gebruik van de geactiveerde partiële tromboplastine tijd (aPTT). Zoals wij in hoofdstuk twee aantonen kleven aan de aPTT belangrijke nadelen, evenals aan andere stoltijd-bepalingen.

Gedurende de laatste jaren ontwikkelden Hemker *et al.* een nieuwe functie test van het stollingsstelsel, gebaseerd op het meten van het verloop van de trombineconcentratie in stollend bloed: het trombogram. Zij vermoedden dat het oppervlak onder het trombogram, i.e. de endogene trombine potentiaal (ETP), een goede maat zou kunnen zijn voor de diepte van antistolling. Er zijn goede argumenten om aan te nemen dat de ETP een geschikt alternatief is voor de aPTT en andere stolttesten.

Het feit dat er essentiële verschillen lijken te bestaan tussen UFH en LMWH, leidt automatisch tot de vraag welke eigenschappen van heparine variëren met het molecuul gewicht en hoe. Op grond van deze overwegingen ontwikkelden wij het programma voor dit proefschrift:

- i) Het verkrijgen van heparine fracties van goed gedefinieerd moleculairgewicht (d.m.v. gelfiltratie).
- ii) Het bepalen van de molaire concentratie van actief, i.e. AT-bindend heparine (d.m.v. fluorescentietitratie).
- iii) Het bepalen van de katalytische activiteit van het heparine-AT complex t.o.v. trombine en factor Xa voor ieder van deze fracties.
- iv) Het bepalen van de katalytische activiteit van de fracties in plasma.
- v) Het bepalen van het antistollend effect van de fracties m.b.v. het trombogram (d.w.z. we meten de ETP).

De uitkomst van dit onderzoek toont voor het eerst de relatie aan tussen het aantal actieve heparine moleculen van gegeven molecuul massa, hun specifieke anti-trombine- en anti-factor Xa activiteit en hun invloed op het trombogram en de aPTT.

Het eerste resultaat is dat de biologische activiteit van een heparine molecuul van goed-gedefinieerde molecuul massa alleen bepaald wordt door deze massa en niet afhangt van de bron van de heparine. Het verschil tussen LMWHs en UFH wordt alleen bepaald door hun verschillend molecuulmassa-profiel.

Onze resultaten (Hoofdstukken IV en V) m.b.t. de invloed van heparine op de interactie tussen geïsoleerd AT en factor Xa, bevestigen dat een

specifieke pentasaccharide, het A-domein (ref. 8), deze interactie specifiek versnelt. Wij konden aantonen dat deze activiteit eerst lineair toeneemt met de molecuul massa, om bij hogere molecuul massa weer af te nemen. Dit wordt verklaard door een model waarin de mogelijkheid van het enzym om te binden aan de heparine toeneemt met de afmeting van het heparinemolecuul. Na binding brengt een-dimensionale diffusie het enzym naar het A-domein waar de AT is gebonden. Bij een molecuul massa boven de 20.000 daalt de activiteit van de heparine, omdat de factor Xa-binding aan het heparine molecuul te zwak is om een netto toename van botsing tussen AT en enzym (FXa) via een-dimensionale diffusie te verzekeren: het enzym dissocieert van de heparine voordat het de AT bereikt.

Uit deze studies blijkt verder dat de anti-trombine activiteit volledig bepaald wordt door de aanwezigheid in het molecuul van een fragment (het T-domein) van 12 suikereenheden met willekeurige volgorde aan het niet reducerende einde van de pentasaccharide. De combinatie van T- en A domein, die essentieel is voor de antithrombinewerking noemen wij C-domein. (Ter gedachtenis aan Jean Choay, de initiatiefnemer en drijvende kracht achter de chemische analyse en synthese van heparines.) Dit is de heparine die kort geleden gesynthetiseerd is door Petitou *et al.* (ref.8).

Het boven beschreven één-dimensionale diffusiemodel is ook van toepassing op trombine maar, omdat trombine tien maal sterker aan heparine bindt dan factor Xa speelt dissociatie een kleine rol en wordt de specifieke activiteit niet nadelig beïnvloed door grote ketenlengte. Dit model verschilt wezenlijk van de tot nu toe voorgestelde modellen, omdat het de diffusie langs het hele heparinemolecuul aanneemt voor beide enzymen en voor alle ketenlengtes. Het klassieke model gaat uit van diffusie langs het C-domein en alleen voor trombine, een mechanisme dat door onze experimenten niet wordt ondersteund.

Het verraste niet dat de molecuul massa, of wel de ketenlengte, van een AT-bindend heparine ook een sterke invloed heeft op zijn biologische activiteit in plasma (Hoofdstuk VI). Een toename van het aantal suikereenheden resulteert in een grotere anti-trombine activiteit tussen 4.5 en 7.5 kD, maar deze is daarboven vrijwel constant. Het verschil met het gezuiverde systeem is dat de activiteit boven de 10 kD daalt, hetgeen we toeschrijven aan specifieke binding aan plasma eiwitten. In tegenstelling tot de anti-trombine activiteit neemt de anti-factor Xa activiteit toe tussen 3.5 en 4 kD, vakt af tussen 5 en 7 kD en neemt boven deze limiet weer vrijwel lineair toe.

Er is een aanmerkelijke Ca^{2+} -afhankelijkheid van de factor Xa remming in plasma. Op grond hiervan wordt de anti-factor Xa activiteit in de standaard praktijk overschat. De Internationale Standaard heparine (ISH), is

een ongefractioneerde heparine, en vereist dus Ca^{2+} voor zijn volle activiteit; LMWH is minder gevoelig voor dit effect (Schoen et al, 1992. Hemker en Béguin, 1993). De gebruikelijke meting van de anti-factorXa activiteit introduceert een laboratorium artefact, omdat ze worden uitgevoerd in afwezigheid van Ca^{2+} . Onder fysiologische omstandigheden is Ca^{2+} echter altijd aanwezig. De activiteit van de LMWHs wordt zodoende systematisch overschat. Omdat de anti-factor Xa activiteit niet de belangrijkste farmacologische activiteit is die het stol-systeem beïnvloedt, is de anti-factor Xa meting op zijn best een indicator van heparine in plasma, maar is het geen goede maat voor de anti-stollende werking (Hoofdstuk VI). Daarom kunnen verschillende heparines bij gelijk antitrombotisch effect onvergelykbare testresultaten opleveren. De anti-trombine methode is hier waarschijnlijk te prefereren, maar er bestaat geen algemeen aanvaarde routinemethode om deze eenvoudig te bepalen. Wij ontwikkelden daarom een nieuwe methode (Hoofdstuk IV) die uitgevoerd kan worden in aanwezigheid van Ca^{2+} en die slechts een eenvoudige eindpuntsmeting in een micro-titerplaat-lezer vereist. De hoeveelheid actieve heparine kan worden berekend uit de anti-trombine activiteit, terwijl de ratio anti-trombine - anti-factor Xa activiteit een schatting geeft van de moleculaire massa verdeling van het circulerend heparine.

De remming van de endogene trombine potentiaal (ETP) is identiek voor LMWH en ongefractioneerde heparine, zolang we fracties van de zelfde molecuul massa vergelijken. Hetzelfde is waar voor de aPTT, die echter veel minder gevoelig is. De remming van de ETP bij gelijkblijvende molaire concentratie van HAM neemt toe met de molecuul massa van de heparine tussen 5 en 7 kD en vakt dan af. De remming van de ETP of de aPTT is onafhankelijk van de oorsprong van de fractie (LMWH of ongefractioneerde heparine). Zeer hoog moleculaire fracties tenderen naar lagere activiteit in plasma, waarschijnlijk omdat zij aspecifiek binden aan andere eiwitten dan AT.

De klinische voordelen van LMWH boven ongefractioneerde heparine kunnen verklaard worden door a) betere biologische beschikbaarheid van LMWH en b) afwezigheid van fracties met $\text{Mr} > 10000$ die waarschijnlijk een eigenstandig hemorragisch effect hebben (zie ref. 3).

De aPTT wordt universeel gebruikt om het klinisch effect van heparine vast te stellen. Standaardisering van de aPTT faalde bijna volledig en er zijn meer redenen om deze test te wantrouwen (Kher *et al.* 1997). De erkenning dat de aPTT slechts beperkte waarde heeft en het feit dat in klinische proefnemingen bevredigende resultaten worden verkregen met standaard doses maakt dat men in de praktijk heparine meestal geeft zonder controle van het bereikte antistollingsniveau. Dit bewijst niet dat m.b.v. een

geschikte testmethode "op maat" gedoseerde heparinetherapie niet betere klinische resultaten zou opleveren. In ieder geval lijkt controle noodzakelijk bij jonge, oude, dikke en ernstig zieke patiënten; in het algemeen bij die patienten die op grond van te verwachten afwijkende kenmerken worden uitgesloten van klinische trials. Verder blijft het goed mogelijk dat aangepaste doses de preventieve en therapeutische resultaten verbeteren zelfs bij de "standaard" patiënt, zoals die wel in klinische trials geaccepteerd wordt.

Verbetering van de bestaande controlepraktijk is dus wenselijk. De hoeveelheid werkzaam heparine in plasma wordt het beste bepaald via de hier beschreven anti-trombine eindpuntsbepaling. Wij stellen voor om de ETP te gebruiken als functietest voor het stollingssysteem, met name ook voor het meten van het heparine effect. Er zijn vele argumenten om aan te nemen dat de ETP de essentiële parameter is van het stolsysteem en niet een of andere surrogaat variabele.

Samenvattend hebben wij aangetoond dat de actieve vorm in heparine altijd dezelfde is, namelijk het Choay-fragment. De activiteit van ieder heparine op het stollingsmechanisme in plasma wordt bepaald door de concentratie van dit fragment. Wij ontwikkelden methoden om de concentratie van dit fragment en ook die van het actieve pentasaccharide te bepalen. Tevens presenteren wij de ETP-meting als een gevoelige test voor het farmacologisch effect van heparines zowel als van andere anticoagulantia.

Onze studies hebben geleid tot een nieuw model voor het werkingsmechanisme van heparine. In dit model wordt thrombine zowel als factor Xa eerst gebonden op een willekeurige plaats van het heparinemolecuul en bereikt het A-domein van het heparine via één-dimensionale diffusie. De verschillen tussen de inactivering van beide moleculen worden verklaard doordat a) factor Xa, in tegenstelling tot trombine, tijdens het diffusieproces gemakkelijk van heparine loslaat en b) trombine, in tegenstelling tot factor Xa, nauwelijks aan AT kan binden tenzij in aanwezigheid van het Choay-domein.

*De referenties zijn gelijk aan die van de engelstalige samevatting.

