

The anticoagulant activity of heparin : biochemical studies in purified systems

Citation for published version (APA):

Schoen, P. J. (1991). *The anticoagulant activity of heparin : biochemical studies in purified systems*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19910503ps>

Document status and date:

Published: 01/01/1991

DOI:

[10.26481/dis.19910503ps](https://doi.org/10.26481/dis.19910503ps)

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.

DE ANTISTOLLENDE AKTIVITEIT VAN HEPARINE Biochemische Studies in Systemen Bestaande uit Gezuiverde Bloedplasma Eiwitten

Bloedstolling is een strikt gereguleerd proces, waarin het plasmaeiwit antitrombine III (ATIII) een uitermate belangrijke rol speelt. ATIII remt geactiveerde stollingseiwitten waarbij de inaktivering van factor Xa en trombine het meest belangrijk is. De werking van ATIII berust op het feit dat het als substraat voor factor Xa en trombine dient, de katalytische cycli worden echter niet geheel doorlopen, maar eindigen in een toestand waarin ATIII covalent gebonden blijft aan factor Xa of trombine (acylenzym intermediair). De eerste stap tijdens de inaktiveringsreactie is de vorming van een dissocieerbaar, niet-covalent complex tussen ATIII en het enzym. Heparine katalyseert de ATIII-afhankelijke inaktivering van factor Xa en trombine door de vorming van het niet-covalente complex te stimuleren (Hoofdstuk 1).

Heparine bestaat uit glycosaminoglycanen die gesynthetiseerd worden in mestcellen. De gevormde heparinemoleculen zijn heterogeen met betrekking tot hun monosaccharide samenstelling, hun molecuulgewicht en hun ATIII-bindend vermogen. Deze heterogeniteit wordt, op zijn minst gedeeltelijk, veroorzaakt door niet-aflopende reacties tijdens de biosynthese. De binding van heparine aan ATIII is afhankelijk van de aanwezigheid van een specifieke pentasaccharide structuur in het heparine. Deze sequentie bevat een aantal specifiek gesulfateerde monosacchariden, waarvan de sulfatering geacht wordt de biosynthese van heparine af te sluiten (Hoofdstuk 1). Daar ook deze reacties niet-aflopend zijn lijkt het redelijk te veronderstellen, dat de niet-ATIII-bindende fractie van heparine een aantal moleculen bevat die, een of meerdere specifieke sulfaat groepen missen in een overigens correct pentasaccharide-domein.

Deze hypothese is onderzocht in Hoofdstuk 2. Een heparine preparaat zonder antistollende activiteit, dat een lage affiniteit voor ATIII had, werd chemisch overgesulfateerd en daarna gefractioneerd middels ATIII-affiniteits chromatografie. Door gebruik te maken van de intrinsieke fluorescentie van ATIII kon aangetoond worden dat het overgesulfateerde materiaal ATIII-bindings eigenschappen vertoonde. De affiniteit tussen het overgesulfateerde materiaal en ATIII ($K_D=6.4 \times 10^{-8}$ M) was 10 keer lager dan de affiniteit van natuurlijk heparine voor ATIII ($K_D=0.63 \times 10^{-8}$ M). Het overgesulfateerde materiaal was ook in staat om de inaktivering van trombine en factor Xa door ATIII te versnellen. Van het over-

gesulfateerde en het natuurlijke heparine waren de frakties met hoge affiniteit voor ATIII bijna even actief met betrekking tot de inactivering van trombine. Het natuurlijke heparine was echter ongeveer 3 maal actiever in de inactivering van factor Xa. Uit deze resultaten hebben wij geconcludeerd dat, alhoewel de interactie met ATIII niet volledig van eenzelfde kwaliteit was als met natuurlijk heparine, sulfatering van heparine met lage affiniteit voor ATIII leidt tot een **specifieke** wijziging (middels het vervolmaken van pentasaccharide-domeinen) van de eigenschappen van dit materiaal.

Heparine is een veel gebruikt middel voor de behandeling en profylaxe van trombotische en trombo-embolische aandoeningen, het gebruik echter, kan gepaard gaan met hemorrhagische incidenten. Het is sinds 1976 bekend dat laag molecuul gewicht (LMW) heparine frakties weinig invloed hebben in globale stolbepalingen zoals de APTT (KCCT), maar wel effectief zijn in anti-factor Xa bepalingen. In 1971 was het naar voren gebracht dat regulatie van de bloedstolling door ATIII, wel eens meer zou kunnen afhangen van de inactivering van factor Xa dan van de inactivering van trombine. Daarom werd de gedachte geopperd dat LMW heparine preparaten wel eens even effectief als niet-gefractioneerde (UF) heparine zouden kunnen zijn (het antitrombotisch effect zou afhangen van hun gehandhaafde anti-factor Xa activiteit), terwijl zij minder aanleiding tot bloedingen zouden kunnen geven (door hun verminderde activiteit op globale stolbepalingen). Door het bestuderen van de structuur-functie relatie van heparine werd het bekend, dat de pentasaccharide sequentie benodigd voor de interactie met ATIII, volstaat om de inactivering van factor Xa te katalyseren. De heparine-gekatalyseerde inactivering van trombine door ATIII vereist echter het gelijktijdig binden van beide eiwitten aan één en hetzelfde heparine molecuul. Dit mechanisme funktioneert slechts dan, wanneer de heparine keten minimaal 18 saccharides lang is. Omdat LMW heparine preparaten bestaan uit ketens met een lengte van 2 tot 30 saccharides, wordt algemeen gedacht dat hun lagere activiteit in APTT bepalingen veroorzaakt wordt door een lagere anti-trombine specifieke activiteit (Hoofdstuk 1).

Van LMW heparine preparaten is echter (vooralsnog) de verdeling van de ATIII-bindende fraktie onbekend. Bovendien is de anti-factor Xa en de anti-trombine activiteit gevoelig voor de aanwezigheid van Ca^{2+} -ionen. Voor de anti-factor Xa activiteit is de mate van gevoeligheid sterk afhankelijk van de heparine ketenlengte en de oorsprong van het factor Xa (humaan of bovine). Daarom hebben wij een aantal LMW heparine preparaten, bedoeld voor klinisch gebruik en standaardisering onderzocht op hun vermogen de inactivering van humaan factor Xa en trombine door humaan ATIII te katalyseren in de aanwezigheid van 4.0 mM CaCl_2 (Hoofdstuk 3).

Onder deze condities nemen zowel de anti-factor Xa als de anti-trombine activiteit af bij een afnemend gemiddeld molecuul gewicht van heparine. Het gevolg is, dat de verhouding tussen de anti-factor Xa en anti-trombine activiteit nogal onveranderlijk is. Deze verhoudingen waren 0.46 voor de 4^e Interna-

tionale Standaard voor (niet-gefractioneerde) heparine, 0.32 voor de 1^o Internationale Standaard voor LMW heparine, 0.42 voor CY216 (Fraxiparine) en 0.50 voor Enoxaparine. CY222, een ultra laag molecuul gewicht preparaat, had slechts een 2 keer hogere verhouding (0.98). Verdere analyse van CY216, en fracties hiervan verkregen middels gelfiltratie, toonde aan dat de heparine moleculen met een molecuul gewicht groter dan het gemiddelde verantwoordelijke zijn voor de anti-trombine, en voor een groot deel ook voor de anti-factor Xa activiteit. De resultaten suggereerden dat depolymerisatie van heparine niet leidt tot een toegenomen anti-factor Xa/anti-trombine verhouding, omdat in de aanwezigheid van 4 mM Ca²⁺-ionen de factor Xa afbraakconstanten verlaagd zijn in vergelijking met die van natuurlijk heparine.

Een ander aspect van de momenteel gebruikte laboratoriumbepalingen van heparine is, dat het verwaarloosd wordt dat bloedplaatjes een potente heparine antagonist bevatten, plaatjes factor 4 (PF4). PF4 bevindt zich in de α -granula, en komt vrij tijdens bloedplaatjes-aktivatie. Neutralisatie van heparine door PF4 is afhankelijk van de heparine ketenlengte: alleen die moleculen groter dan 18 sacchariden worden volledig en met hoge affiniteit door PF4 gebonden. Verschillen in neutralisatie patronen tussen LMW heparine preparaten kunnen leiden tot een verschillende beschikbaarheid in de aanwezigheid van geaktiveerde bloedplaatjes. Dit kan gevolgen hebben voor de werking (*in vivo*) en standaardisering (*in vitro*) van LMW heparine preparaten. Derhalve is de neutralisatie van (LMW) heparine preparaten door PF4 onderzocht; dit is eveneens beschreven in Hoofdstuk 3. De resultaten tonen aan dat bij een overmaat PF4 alle anti-trombine activiteit en minstens 85% van de anti-factor Xa activiteit van LMW heparine geneutraliseerd wordt. Omdat van LMW heparine preparaten hogere doseringen gebruikt moeten worden om afbraakconstanten te verkrijgen die vergelijkbaar zijn met die van UF heparine, is het mogelijk dat de hoeveelheid PF4 die vrijkomt bij maximale aktivering van een normale plaatjes dichtheid, niet voldoende is om alle LMW heparine te neutraliseren. Dit ligt in de lijn van bevindingen gedaan in dit laboratorium (Béguin & Hemker) en ondersteunt de veronderstelling dat trombinegeneratie in plaatjes rijk plasma voorlopig de beste voorspellende waarde heeft voor de *in vivo* effectiviteit van (LMW) heparine.

Of het therapeutisch effect van LMW heparine preparaten superieur is aan die van niet-gefractioneerde preparaten kan slechts beantwoord worden door uitputtend (toekomstig) klinisch onderzoek. Nochtans, fundamenteel biochemisch onderzoek kan het zoeken naar een heparine met een equivalent of verbeterd antitrombotisch potentieel en een gereduceerd hemorrhagisch risico ondersteunen. Allereerst is het daarom belangrijk de vraag te kunnen beantwoorden: Hoe werkt heparine?

Heparine katalyseert de inaktivering van trombine en factor Xa door ATIII. Veel van de huidige kennis en inzichten over heparine en zijn werking is verkregen uit studies met gezuiverde eiwitten in eenvoudige enzym/remmer

mengsels. Bloedstolling is echter een complex proces dat gepaard gaat met activiteiten van en interacties tussen de vaatwand, bloedplaatjes en het stollings-systeem. Enzymen, geactiveerde cofactoren en procoagulante oppervlakken worden gegenereerd in een heterogeen mengsel van velerlei componenten. Een van de essentiële stollingsreacties is de activering van protrombine door protrombinase, een enzymatisch complex bestaande uit het enzym factor Xa, een eiwit cofactor (factor Va) en een geschikt fosfolipide oppervlak. De meerderheid van de studies weergegeven in dit proefschrift werden ontworpen om de inactivering van trombine en factor Xa te onderzoeken in modelsystemen die reactieomstandigheden, zoals die zich voor kunnen doen tijdens het *in vivo* stollingsproces, nabootsen. Dat wil zeggen: de ATIII/heparine-afhankelijke inactivering van protrombinase-gevoerd trombine en van factor Xa tijdens protrombine activering werd onderzocht, zowel in reageerbuis experimenten als in een *in vitro* stollingsmodel waar het protrombinase gelokaliseerd was aan het oppervlak van een capillair bekleed met een fosfolipide bilaag.

In Hoofdstuk 4 is de inactivering van, door het protrombinase geactiveerde, protrombine beschreven. Gevonden is, dat protrombinase-gekatalyseerde protrombineactivering niet slechts leidt tot trombine vorming, maar dat ook meizotrombine(des fragment 1) ontstaat. In de afwezigheid van heparine waren de tweede orde reaktiekonstanten van inactivering van trombine en meizotrombine (des fragment 1) identiek, $k=3.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. De afbraakkonstante van gezuiverd trombine was $6.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. In de aanwezigheid van heparine was verdwijning van de amidolytische activiteit bi-exponentieel en kon beschreven worden door een 4-parameter vergelijking. Hierdoor konden de pseudo-eerste orde afbraakkonstanten van de heparine-gekatalyseerde inactivering van trombine en meizotrombine(des fragment 1) bepaald worden én de samenstelling van het reaktiemengsel met betrekking tot beide. Het bleek dat de verhouding tussen de hoeveelheden trombine en meizotrombine(des fragment 1) die gevormd werden afhankelijk van de initiële protrombine concentratie was. De afbraakkonstanten gaven aan dat de vorming van het ternair complex tussen heparine, ATIII en trombine verstoord is in het gebruikte reaktiemengsel, en dat de vorming van het ternair complex met meizotrombine(des fragment 1) zo goed als onmogelijk is.

Het is reeds sinds 1973 bekend dat factor Va en fosfolipide factor Xa beschermen tegen inactivering door ATIII (Hoofdstuk 1). In dit proefschrift is de kinetiek van de ATIII- en ATIII/heparine-afhankelijke inactivering van factor Xa tijdens protrombine activering onder verschillende omstandigheden onderzocht. Deze studies zijn gebaseerd op een model van protrombine activering in de aanwezigheid van ATIII, waarin de waargenomen trombinevormingssnelheid de resultante is van de snelheid waarmee protrombine geactiveerd wordt en de snelheid waarmee het gevormde trombine verdwijnt.

In Hoofdstuk 5 is het onderzoek beschreven waarin dit model ontwikkeld is met bovine stollingseiwit. De tweede orde snelheidskonstante van factor Xa inactivering door ATIII, bepaald met het chromogene substraat S2337, was

$1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Factor Xa tijdens protrombine aktivering in de aanwezigheid van verzadigende hoeveelheden factor Va of phospholipide (20 mol% PS/80 mol% PC) werd met eenzelfde tweede orde reaktiekonstante door ATIII geïnactiveerd: $k=1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. In de aanwezigheid van zowel factor Va als phospholipide was de reaktiekonstante van factor Xa voor ATIII 10 keer lager: $k=1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Tijdens protrombine aktivering in de aanwezigheid van factor Va en phospholipide was factor Xa zelfs meer beschermd tegen inaktivering door ATIII in de aanwezigheid van heparine. Genormeerd naar $1 \mu\text{g/ml}$ was de pseudo-eerste orde snelheidskonstante van factor Xa inaktivering door 200 nM ATIII, 0.33 min^{-1} in de aanwezigheid van factor Va en phospholipide en 9.5 min^{-1} in de afwezigheid hiervan. De pseudo-eerste orde inaktiveringskonstanten van protrombinase waren onafhankelijk van de protrombine concentratie. Omdat ook in dit reaktiesysteem meizotrombine (des fragment 1), in plaats van α -trombine, het voornaamste produkt is tijdens de initiële fase van protrombine aktivering had heparine nauwelijks invloed op de ATIII-afhankelijke inaktivering van het geactiveerde protrombine.

In Hoofdstuk 6 zijn heparine preparaten en heparine fragmenten, die liggen in een molecuul massa bereik van 1,700 tot 20,000 Da, onderzocht op hun katalyserend vermogen in de ATIII-afhankelijke inaktivering van humaan factor Xa en van protrombinase tijdens protrombine aktivering. De protrombinase reactie werd volgens het model beschreven in Hoofdstuk 5, geanalyseerd. Dit model leidde tot een 3-parameter vergelijking, die een functie was van de initiële snelheid van protrombine aktivering en de pseudo-eerste orde inaktiveringskonstanten van protrombinase en van het gevormde trombine. De specifieke katalytische activiteiten van de heparines in de reacties met zowel factor Xa als protrombinase namen toe met toenemende gemiddelde molecuul gewicht. In tegenstelling tot resultaten van andere onderzoeksgroepen vertoonden alle heparines een ongeveer 5 keer hogere specifieke activiteit in de reactie met factor Xa dan in de reactie met protrombinase, aangevende dat onder deze omstandigheden de factor Va/phospholipide-afhankelijke bescherming van factor Xa onafhankelijk van de heparine grootte is. Door onze oorspronkelijke aanpak werd bovendien een tot nu toe onbekend fenomeen waargenomen. Name-lijk bovenop het effect dat heparine heeft op de vorming van het inactieve factor Xa-ATIII complex, reduceren heparines met $M_r > 4,500$ de initiële snelheid van protrombine aktivering in de aanwezigheid van ATIII. De grootte van het effect is afhankelijk van de heparine concentratie. Onze hypothese is dat door de (snelle) vorming van het dissocieerbaar ATIII/heparine/factor Xa-complex de activiteit van factor Xa, ten opzichte van zijn natuurlijk substraat protrombine, (gedeeltelijk) verloren gaat.

Er zijn meerdere mechanismen voorstelbaar die verantwoordelijk zijn voor de bescherming van factor Xa tegen ATIII/heparine. Naar onze mening is het meest waarschijnlijke model, die waarin factor Xa gecomplexeed door factor Va (en/of phospholipide) ontoegankelijk geacht wordt voor ATIII. Inaktivering van

factor Xa treedt slechts dan op als het protrombinase dissocieert, en de "bescherming" wordt dus in feite veroorzaakt door de bijzonder ongunstige dissociatie van het protrombinase (Hoofdstuk 9).

Het meeste van onze huidige kennis inzake bloedstolling en de daarbij optredende reacties zijn verkregen uit studies in statische, gesloten systemen. Bloed, het medium waarin bloedstolling daadwerkelijk optreedt, is echter een dynamische vloeistof dat zich vrijelijk door het bloedvatenstelsel beweegt. Terwijl de rheologie van het bloed zelf uitputtend onderzocht is, is er weinig bekend over het verloop van bloedstollingsreacties aan een oppervlak tijdens stroming. Recentelijk is een eerste poging ondernomen om de aktivering van factor X door weefsel factor en factor VIIa in een open laminair stromingsmodel te beschrijven (zie Hoofdstuk 1). Vanwege het belang van een dergelijke aanpak hebben wij een soortgelijk stromingsmodel ontwikkeld om de aktivering van protrombine door protrombinase, en het effect van heparine en ATIII hierop te bestuderen.

In Hoofdstuk 7 is het onderzoek beschreven waarin het modelsysteem is ontwikkeld en gekarakteriseerd. De binnenzijde van glazen capillairen werden voorzien van een fosfolipide bilaag, en vervolgens geperfuseerd met factor Va. Bij perfusie van factor Xa en protrombine maakte het gebonden factor Va assemblage van protrombinase mogelijk. De snelheid waarmee protrombinase werd gevormd nam toe met toenemende factor Xa concentraties en stromings-snelheden, hetgeen verenigbaar is met een assemblage van protrombinase die afhangt van de flux van factor Xa vanuit de stromende vloeistof, door de stilstaande grenslaag naar het fosfolipide-gebonden factor Va. Mits factor Xa en protrombine aanwezig waren in de stromende vloeistof, was het protrombinase (schijnbaar) irreversibel; gedurende minstens 20 minuten trad geen verlies van protrombinase aktiviteit op. De snelheid van protrombine aktivering was lineair afhankelijk van de oppervlaktedichtheid aan protrombinase. In de aanwezigheid van $1.0 \mu\text{M}$ protrombine, bij een afschuifsnellheid ("shear rate") van 82 s^{-1} , was de gemiddelde snelheid van trombine vorming $870 \text{ mol/min per mol protrombinase}$. In tegenstelling tot hetgeen waargenomen is in reageerbuis experimenten bleek dat in dit stromingsmodel de vorming van α -trombine de voorkeur had boven de vorming van meizotrombine(des fragment 1).

In Hoofdstuk 8 werd de remming van protrombinase door ATIII en heparine in dit stromingsmodel onderzocht. Capillairen die met een fosfolipide bilaag bedekt waren en fosfolipide-gebonden factor Xa en factor Va bevatten werden geperfuseerd met $1.0 \mu\text{M}$ protrombine in de aanwezigheid van 0.50 nM factor Va (afschuifsnellheid 28 s^{-1}). Ook hier was de snelheid van protrombine omzetting rechtevenredig met de oppervlaktedichtheid van protrombinase. Vervolgens werd ATIII aan het perfusaat toegevoegd, ten gevolge waarvan de vrije trombine concentratie aan de capillair uitlaat drastisch gereduceerd werd: 50% remming werd verkregen in de aanwezigheid van $0.7 \mu\text{M}$ ATIII. Echter uit de perfusie van vervolgens enkel protrombine bleek dat de protrombinase-aktiviteit

nauwelijks geremd kon worden. Bij een plasma ATIII concentratie ($2 \mu\text{M}$) werd een lichte remming van protrombinase waargenomen: 10% van de activiteit verdween gedurende een 10 minuten durende perfusie. Als tijdens de perfusie met ATIII protrombine werd weggelaten uit het perfusaat, of als een specifieke en krachtige trombine remmer (hirudine; $2.0 \mu\text{M}$) werd toegevoegd aan het perfusaat, werd een meer uitgesproken remming van protrombinase waargenomen: 40% restactiviteit kon bepaald worden na een 10 minuten durende perfusie. Hieruit koncludeerden wij dat trombine, kontinu geproduceerd aan het oppervlak, het ATIII in de grenslaag consumeert. De 'echte' ATIII concentratie in de nabijheid van de enzymatische complexen is derhalve niet meer dan een fractie van de initiële ATIII concentratie in de vloeistofstroom. Niet-gefractioneerde heparine en pentasaccharide versnelden weliswaar de ATIII-afhankelijke inaktivering van protrombinase, doch in een geringere mate dan waargenomen met een protrombinase geassembleerd aan het oppervlak van kleine unilaminaire fosfolipide vesicles. Om meer inzicht te verkrijgen in het werkingsmechanisme van heparine onder fysiologisch relevante omstandigheden, zullen er meer studies, onder uiteenlopende omstandigheden in een dergelijk stromingsmodel uitgevoerd moeten worden.

De bevindingen weergegeven in dit proefschrift zijn in overeenstemming met het denkbeeld dat regulering van de bloedstolling door heparine, onder *in vivo* omstandigheden voornamelijk plaatsvindt tijdens de vorming van protrombinase en niet door een directe remming van eenmaal gevormd protrombinase. De vorming van protrombinase kan geremd worden door het wegvangen van trombine, dat benodigd is voor de activering van factor V en factor VIII, of door het wegvangen van het vrije factor Xa. Concluderend kunnen we stellen, dat het doel van antitrombotische therapie veelal het onderdrukken van trombinevorming lijkt dan het enkel wegvangen van reeds gevormd trombine. Het is precies deze activiteit die heparines gemeen hebben met een andere, gevestigde groep antitrombotica, namelijk die van de orale antistollingsmiddelen.