

# Production of thrombin at macroscopic surfaces

Citation for published version (APA):

Giesen, P. L. A. (1992). *Production of thrombin at macroscopic surfaces*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19920410pg>

## Document status and date:

Published: 01/01/1992

## DOI:

[10.26481/dis.19920410pg](https://doi.org/10.26481/dis.19920410pg)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Chapter 7

### Summary and Concluding Remarks



## SUMMARY AND CONCLUDING REMARKS

The prothrombinase complex consists of coagulation factors Xa and Va which, in the presence of calcium ions, are bound to a phospholipid surface. It functions as an enzyme, catalysing the formation of thrombin from prothrombin. Thrombin plays a central role in blood coagulation and stops bleeding in a number of ways. In order to make thrombin formation an efficient process, a surface is necessary that not only binds the factors Xa and Va, but also prothrombin, the substrate of the reaction. Prothrombin is provided from the solution and adsorbs onto the surface containing the prothrombinase complex. It is subsequently transported to this complex by lateral diffusion. At a successful collision with the enzyme, prothrombin will be converted. The surface functions as a funnel for this reaction. Since it restricts movement to two dimensions, the prothrombin molecules bound to the surface have a much higher chance of encountering the complex than prothrombin molecules in free solution. Up to a certain limit, a larger empty space surrounding the complex, that is a bigger funnel, will increase the possibility of collision. This model is called the bound-substrate model.

Chapter 2 describes a series of experiments demonstrating the role of surface area around the complex. A spherical vesicle surface of 20 nm diameter has little space surrounding a prothrombinase complex and needs a high concentration of free prothrombin to achieve a half maximal conversion rate ( $K_m = 170$  nM). Prothrombinase on vesicles of 80 nm diameter already converts prothrombin more easily ( $K_m = 40$  nM), while the prothrombinase complex bound to a macroscopic surface, being surrounded by lots of space, needs only 6 nM of prothrombin for half-maximal production of prothrombin. The theory of Smoluchovsky allowed us to calculate how many collisions take place between substrate molecules and vesicles of a certain diameter in free solution. From this it is concluded that nearly all successful collisions, with a prothrombinase containing vesicle result in conversion. It means that the rate of conversion of prothrombin in vesicle suspensions is not determined by the conversion capacity of the prothrombinase complex, but by the frequency of collisions of a vesicle with free prothrombin. It also implicates that the concentration of bound prothrombin on a prothrombinase containing vesicle is immeasurably low, since all supply is almost instantaneously converted. This was not the case on a macroscopic surface. We chose the adsorption rate of prothrombin such that it exceeded the conversion velocity. The collisional frequency of free prothrombin with bound prothrombinase was also calculated. It appeared that prothrombin conversion from free solution, i.e. without prior binding to the surface, could not explain the measured conversion rate. The question whether the prothrombinase complex converts bound prothrombin or prothrombin from free solution has been a matter of dispute in the literature for more than fifteen years, and now it seems to be answered.

Chapter 3 describes the prelude to prothrombin conversion. Prothrombinase consists of two proteins that have to assemble into a complex in order to enable fast prothrombin conversion. One protein, factor Xa, is the actual enzyme. The maximal conversion rate achieved by this enzyme (the  $k_{cat}$ ) is increased by a factor of 1000 after formation of a complex with the other protein, the cofactor protein factor Va. This assembly of factor Xa and factor Va occurs again on a phospholipid surface. A certain quantity of factor Va was bound to a macroscopic phospholipid surface and prothrombin was added. Thrombin formation does not occur at that moment because factor Xa is still lacking. After addition of factor Xa, thrombin started to be generated at a rate which increased as more factor Xa complexed with factor Va. From this increase of the thrombin generation rate, the velocity of complex formation could be determined. Similar experiments in vesicle suspensions revealed that the size of the surface surrounding the factor Va molecule, determined the assembly rate. As in Chapter 2 the surface functioned as a kind of funnel which collected free factor Xa from the solution and optimized its transport to bound factor Va. Moreover, these experiments showed that the concentration of factor Xa in free solution, necessary for saturating half the amount of the lipid-bound factor Va is only 1  $\mu\text{M}$ . This value is 10 to 100 fold less than reported in the literature.

The differences between experiments carried out in vesicle suspensions and those carried out on macroscopic surfaces, could entirely be explained by differences in the conditions of transport to a vesicle and a planar layer. In the literature, these discrepancies are often attributed to differences in binding affinities of proteins for macroscopic layers and vesicles. In order to explain them, various causes are mentioned. Vesicles are spherical, and the molecules in such a spherical surface have a different orientation. In addition, the inner and the outer monolayer of a vesicle could contain concentrations of specific phospholipids, differing from the concentrations in the overall mixture, which could influence the binding affinities of the proteins. Moreover, the techniques used to measure binding differ for vesicles and planar layers. It would therefore be useful to be able to measure on both kinds of surfaces using the same technique. In this thesis, ellipsometry was employed to measure binding on a planar bilayer. This is an optical technique, where light is reflected by a silicon plate covered with a phospholipid membrane to which proteins adhere. When protein is added to a cuvette containing such a plate, the binding of the protein to this surface can be followed in time using this technique. The rate of adsorption of proteins to the surface is dependent on the concentration of protein in the buffer, the diffusion constant of the protein, and the flow conditions. The latter are regulated by a rotating stirrer in front of the macroscopic surface. When binding of various concentrations of a certain protein is followed in time, the initial adsorption rate will be linearly dependent on the buffer concentration of protein. This phenomenon was used in the experiments described in Chapter 4. The constant describing the relationship between the concentration of a protein and its adsorption rate, can be determined by addition of

a known amount of protein to the buffer. If in addition to the protein, vesicles are present in the buffer as well, the amount of free protein will decrease as a consequence of their binding to the vesicles. Since the relation between adsorption rate and free concentration is known, measurement of that rate allows the free concentration to be calculated. Because the total added concentration of protein is also known, the amount of protein bound to the vesicles can be determined. The concentration of protein necessary for occupying half of the vesicle surface ( $K_d$ ) can be calculated after repetition of the experiment with various concentrations of protein. Chapter 4 demonstrates that, using this technique, the dissociation constant of factor Xa and prothrombin on vesicles, prepared from a mixture of 20% dioleoyl-phosphatidylserine and 80% dioleoyl-phosphatidylcholine could be measured. The values found hardly deviated from the values determined on a planar bilayer. It proved that the transport conditions, and not some changed binding properties, are the explanation for the differences between vesicles and planar bilayers, as found in Chapters 2 and 3.

Conversion of prothrombin present on a macroscopic surface, requires transport of prothrombin to the planar layer. Normal diffusion of proteins in a fluid is not sufficient to get measurable rates of thrombin formation. Therefore an artificially produced flow is necessary, for continuously mixing of the fluid. There are several techniques to realise this. A laminar flow profile, i.e. a fluid flowing through a tube, is closest to the physiological reality of blood flowing through a vessel. But this has a disadvantage. The concentration of the protein decreases downstream by conversion of the protein by enzyme bound to the wall. Since the rate of transport of proteins to the vessel wall is dependent on the protein concentration, the rate of transport to the wall becomes non-uniform. An adsorbing protein causes comparable problems because, due to depletion, its concentration also decreases downstream. Correlating enzyme activity with the free substrate concentration thus becomes a difficult task. Furthermore, the amount of enzyme present on the surface cannot be accurately controlled, which obscures the relation between surface activity and bound enzyme concentration. A solution to this problem is described in Chapter 5. A rotating disc in a fluid produces a flow profile with special properties. The component of the flow directed towards the surface is only dependent on the distance from the surface, and independent of the location of the site. As a consequence every site on the surface receives exactly the same amount of protein and we have a so called uniformly accessible surface. Protein transport is only dependent on the diffusion constant, the concentration of the protein, and the rotation velocity of the disc. A rotating disc was constructed running sufficiently smoothless to enable ellipsometric measurement of proteins adsorption. In this way it proved possible to determine the diffusion constants of factors Va and Xa, prothrombin, fibrinogen, and lysozyme. These being known, it was possible to adsorb a low quantity of factor Va on the surface, which could subsequently be saturated with factor Xa. In this way, a known quantity of prothrombinase was assembled on the surface, to which various concentrations of

prothrombin could be added. The  $K_m$  and  $k_{cat}$  of prothrombin conversion in this set-up could be measured and resulted in similar values as found in the experiments described in Chapter 2. It could furthermore be proven that by variation of the surface concentration of enzyme, the conversion rate changed from being enzyme-limited to transport-limited.

Only in the experiments of Chapter 5 a rotating disc was used as uniform accessible surface. The experiments described in the other chapters were carried out using a rotating stirrer in front of a macroscopic surface. Chapter 6 shows that a part of the surface opposite the stirrer can be considered as approximately uniform accessible. However, ellipsometric measurements of adsorption rates in areas not directly opposite the stirrer but above or next to it, showed that the transport velocity decreases considerably in those areas. The transport velocity inside the uniform accessible surface area turned out to be dependent on the stirring velocity and the diffusion constant of the protein, as was the case for the rotating disc. The experiments of the Chapters 2, 3 and 4, for that matter, were carried out with a surface only barely larger than this area. Still it is preferable to perform such experiments on a rotating disc.

It will be clear from this thesis that substrate conversion by enzymes bound to macroscopic surfaces differs from conversion in free solution. The influence of flow and lateral diffusion on this process could largely explain the differences found. This has consequences for the description of *in vivo* reality and the experiments should be repeated under more physiological conditions. As mentioned before, blood coagulation occurs on a vessel wall, and not on a rotating disc or a flat plate opposite a stirrer. It further occurs in the human body, and with human instead of bovine proteins. It finally does also not happen in 0.05 M Tris-HCl buffer containing 0.1 M NaCl and 3 mM  $CaCl_2$  and 0.5 g/l of albumin, but in whole blood containing all coagulation proteins. The conclusions from this thesis can therefore not be unconditionally projected onto the physiological reality. The chosen experimental conditions are nevertheless justifiable. Purified systems *in vitro* provide the opportunity to develop useful models, something that is not yet possible in the presence of the complete plasma content. In order to be able to say something about the flow conditions at the vessel wall, it is imperative to choose an experimental set-up that allows for the right techniques of measurement and keeps the data interpretable. This implies concessions to physiology. The ultimate aim of these experiments, a description of prothrombin conversion *in vivo*, has still to be achieved.

## Hoofdstuk 7

### Samenvatting en Slotopmerkingen





## SAMENVATTING EN SLOTOPMERKINGEN

Het protrombinase complex bestaat uit de bloedstollingsfactoren factor Xa en factor Va die in aanwezigheid van calcium gebonden zitten op een phospholipide-oppeervlak. Het is een enzym dat de vorming van trombine uit protrombine katalyseert. Trombine speelt een centrale rol in de bloedstolling. Het helpt op verschillende fronten een bloeding te stoppen. Om de vorming van trombine efficiënt te doen verlopen is een oppervlak nodig dat niet alleen factor Xa en Va bindt, maar dat ook het substraat protrombine adsorbeert. Protrombine wordt aangeleverd vanuit de oplossing en zal op het oppervlak, waarop het protrombinase complex zit, adsorberen en vervolgens over het oppervlak naar het complex toe getransporteerd worden via laterale diffusie. Bij het complex aangekomen zal het na een succesvolle ontmoeting worden omgezet. Het oppervlak fungeert hierbij als een trechter. De op het oppervlak gebonden protrombine-moleculen hebben door hun 2-dimensionale beweging veel meer kans om het complex te ontmoeten dan protrombine-moleculen die nog in vrije oplossing zijn. Hoe groter de lege ruimte rondom het complex - dus hoe groter de doorsnede van de trechter - des te groter deze invang-kans. Dit model is bekend onder de naam bound-substrate model.

Hoofdstuk 2 beschrijft een serie experimenten die de rol van die hoeveelheid oppervlak rondom het complex laten zien. Een bolvormig vesicle-oppeervlak met een diameter van 20 nm biedt weinig ruimte rondom een protrombinase-complex en heeft een hoge vrije protrombine-concentratie nodig om op halfmaximale omzettingssnelheid te komen ( $K_m = 170$  nM). Protrombinase op vesicles met een doorsnede van 80 nm komt al sneller op gang ( $K_m = 40$  nM), terwijl het protrombinase complex gebonden op een macroscopisch oppervlak, met als het ware een zee van ruimte rondom ieder complex, al genoeg neemt met nog geen 6 nM protrombine. Met behulp van de theorie van Smoluchovsky kon worden uitgerekend hoeveel botsingen van substraat in vrije oplossing er plaats vinden met een vesicle van een bepaalde doorsnede. Hieruit volgde de conclusie dat vrijwel iedere succesvolle botsing met een protrombinase-bevattende vesicle resulteert in een omzetting. Dit betekent dat in vesicle-suspensies de omzettingssnelheid van protrombine niet bepaald wordt door de omzettingcapaciteit van het protrombinase-complex maar door de botsingsfrequentie van het vesicle met vrij protrombine. Ook houdt dit in dat de gebonden concentratie protrombine op een protrombinase-bevattend vesicle onmeetbaar laag is. Alles wat wordt aangevoerd wordt immers bijna onmiddellijk omgezet. Op een macroscopisch oppervlak was dit niet het geval. De aanvoersnelheid van protrombine was hier zo gekozen dat die de omzettingcapaciteit te boven ging. Ook is er uitgerekend hoe groot de botsingsfrequentie was van vrij protrombine met gebonden protrombinase. Hieruit bleek dat omzetting vanuit vrije oplossing, dus zonder voorafgaande binding aan het oppervlak van protrombine, de gemeten

snelheden van omzetting niet konden verklaren. De vraag of het gebonden protrombine of het protrombine uit de oplossing door het protrombinasecomplex wordt omgezet is al meer dan 15 jaar een twistpunt in de literatuur en lijkt door deze experimenten definitief beantwoord.

Hoofdstuk 3 beschrijft hetgeen er voorafgaat aan de protrombine-omzetting. Protrombinase bestaat uit twee eiwitten die eerst een complex moeten vormen voordat een snelle omzetting plaats kan vinden. Het ene eiwit, factor Xa, is het eigenlijke enzym, de maximale omzettingssnelheid van protrombine (de  $k_{cat}$ ) die dit enzym haalt wordt met ongeveer een factor 1000 vergroot als het enzym met factor Va, de co-factor complexeert. Die assemblage van die twee eiwitten, factor Xa en factor Va, gebeurt ook op een phospholipide-opppervlak. Er werd een hoeveelheid factor Va op een macroscopisch oppervlak gebonden en vervolgens werd er een hoeveelheid protrombine bij gezet. Op dat moment zal er nog geen trombine gevormd worden aangezien het noodzakelijke factor Xa nog niet aanwezig is. Na toevoeging van Xa kwam er een trombinevormingssnelheid op gang die toenam naarmate er meer factor Xa met factor Va assembleerde. Uit die toename in trombinevormingssnelheid kon de snelheid van complexvorming worden bepaald. Soortgelijke experimenten in vesicle-suspensies wezen uit dat de grootte van het oppervlak rondom het molecuul Va bepalend was voor de assemblage-snelheid. Ook hier speelde het oppervlak de rol van een trechter die het vrije factor Xa uit de oplossing verzamelde en het transport van factor Xa naar het gebonden Va optimaliseerde. Bovendien wezen de experimenten uit dat de concentratie factor Xa in vrije oplossing benodigd om de helft van het factor Va te complexeren slechts 1 pM is. Dat is 10 tot 100 keer minder dan eerder werd gepubliceerd.

De genoemde verschillen tussen experimenten uitgevoerd in vesicle-suspensies en die op macroscopische oppervlakken konden volledig worden verklaard uit verschillen in transportcondities naar een vesicle in vergelijking met een vlakke laag. In de literatuur zijn deze discrepanties vaak toegeschreven aan verschillen tussen bindingsaffiniteiten van eiwitten aan een macroscopische laag en aan een vesicle. Allerlei oorzaken worden genoemd om deze verschillen te verklaren. Vesicles zijn rond, en de moleculen in zo'n bol oppervlak hebben een andere oriëntatie. Bovendien bestaan de phospholipide-mengsels waarmee de vesicles zijn gemaakt uit verschillende moleculen zodat de binnenste en buitenste schil van een vesicle verschillende concentraties van die moleculen zouden kunnen bevatten waarmee ook de bindingsaffiniteit van de vesicles beïnvloed wordt. De technieken waarmee de bindingen zijn gemeten verschillen ook voor metingen op vesicles en vlakke lagen. Het zou daarom nuttig zijn om met dezelfde techniek metingen te verrichten op beide soorten oppervlakken. In dit proefschrift is gebruik gemaakt van ellipsometrie om binding te meten op een vlakke laag. Dit is een optische techniek waarbij licht wordt gereflecteerd tegen een silicium plaatje dat bedekt is met een phospholipide-membraan waaraan eiwitten hechten. Als een eiwit wordt toegevoegd aan een cuvet met daarin

een macroscopisch oppervlak kan met behulp van deze techniek de binding in de tijd worden gevolgd. De snelheid van adsorptie van eiwitten aan het oppervlak is afhankelijk van de concentratie eiwit in de buffer, de diffusieconstante van het eiwit en de stromingscondities. De laatste worden geregeld met een draaiende roerboon tegenover het macroscopisch oppervlak. Als de binding in de tijd gevolgd wordt bij verschillende concentraties van een bepaald eiwit onder verder dezelfde condities, zal de initiële adsorptiesnelheid lineair afhankelijk zijn van de bufferconcentratie eiwit. Van dit fenomeen is gebruik gemaakt in de experimenten beschreven in hoofdstuk 4. Als er een bekende hoeveelheid eiwit aan de buffer wordt toegevoegd kan een constante worden bepaald die de relatie aangeeft tussen de concentratie eiwit en de adsorptiesnelheid. Als er nu behalve eiwit ook vesicles in de buffer aanwezig is zal de hoeveelheid vrij eiwit dalen tengevolge van binding aan de vesicles. Nu is de vrije concentratie eiwit niet bekend, maar omdat de relatie tussen adsorptiesnelheid en vrije concentratie dat wel is, kan toch door meting van die snelheid de vrije concentratie worden berekend. Doordat de totale toegevoegde concentratie ook bekend is kan de hoeveelheid aan de vesicles gebonden eiwit worden bepaald. Door dit bij verschillende eiwitconcentraties te herhalen kan de concentratie eiwit worden berekend die nodig is om de helft van het vesicleoppervlak te bezetten ( $K_d$ ). Dit is in hoofdstuk 4 gelukt, er is komen vast te staan dat de bindingsconstante van factor Xa en protrombine op vesicles bestaande uit een mengsel van 20% dioleoylphosphatidylserine en 80% dioleoylphosphatidylcholine nauwelijks afwijkt van de waarde gemeten op een vlakke laag. Het zijn dus inderdaad de transportcondities en niet de veranderde bindingseigenschappen die de verschillen in resultaten tussen vesicles en vlakke lagen, zoals gevonden in hoofdstuk 2 en 3, verklaren.

Om protrombine te activeren door een op een macroscopisch oppervlak aanwezige hoeveelheid protrombinase is er een transport van protrombine naar de vlakke membraan nodig. Om meetbare trombinevormingssnelheden te kunnen meten is de normale diffusie van eiwitten in een vloeistof niet toereikend. Er zal dus kunstmatig een stroming in gang moeten worden gezet die de vloeistof voortdurend mengt. Hiervoor zijn verschillende oplossingen mogelijk. Een laminair flowprofiel, d.w.z. een vloeistof die door een buisje gepompt wordt, komt het dichtst bij de fysiologische werkelijkheid van bloed dat door een vat stroomt. Hieraan kleeft echter een nadeel. Aangezien de transportsnelheid van eiwitten naar de wand van het vat afhankelijk is van de concentratie zal niet iedere plaats op de wand dezelfde transportsnelheid ontmoeten. Immers, de concentratie eiwit neemt stroomafwaarts, door omzetting van het eiwit door enzym wat op de wand zit, af. Een adsorberend eiwit geeft soortgelijke problemen, stroomafwaarts neemt de concentratie door depletie af. Dit maakt het lastig om de enzymactiviteit te correleren aan de concentratie vrij substraat. Ook de hoeveelheid op het oppervlak aanwezig enzym valt niet nauwkeurig te doseren zodat de relatie tussen oppervlakte-activiteit en gebonden enzymconcentratie niet helder is. Een oplossing voor dit probleem werd gevonden in

hoofdstuk 5. Een draaiende schijf in een vloeistof veroorzaakt een flowprofiel met bijzondere eigenschappen. De component van de flow die naar een plaats op het oppervlak toe gericht is, is enkel afhankelijk van de afstand tot het oppervlak en niet van die plaats. Dit heeft tot gevolg dat iedere plaats op het oppervlak exact evenveel eiwit uit de oplossing ontvangt. Het eiwittransport is dan alleen nog afhankelijk van de diffusieconstante en concentratie van het eiwit en de rotatiesnelheid van de schijf. Er werd een draaiend schijfje vervaardigd dat voldoende trillingsvrij is om ellipsometrische metingen mogelijk te maken, zodat de adsorptiesnelheden van eiwitten daarna konden worden gemeten. Op deze manier was het mogelijk de diffusieconstanten van factor Va, Xa, protrombine, fibrinogeen en lysozym te bepalen. Als die bekend zijn geeft dat de mogelijkheid een uitgebalanceerde hoeveelheid factor Va op het oppervlak te zetten die vervolgens kon worden verzadigd met factor Xa. Op deze manier werd een bekende hoeveelheid protrombinase op het oppervlak gezet waaraan verschillende concentraties protrombine konden worden toegevoegd. De  $K_m$  en  $k_{cat}$  van protrombine omzetting kon worden gemeten in deze opstelling, waarbij vergelijkbare waarden werden gevonden als beschreven in hoofdstuk 2. Bovendien kon worden aangetoond dat door variatie in de oppervlakte-concentratie enzym de omzettingssnelheid van enzym-gelimiteerde omzetting veranderde in transport-gelimiteerde omzetting. Hoofdstuk 5 is het enige hoofdstuk waar gewerkt werd met een draaiende schijf, het enige uniform toegankelijke oppervlak. De experimenten beschreven in de overige hoofdstukken werden uitgevoerd met een draaiende roerboon tegenover een macroscopisch oppervlak. Hoofdstuk 6 laat zien dat een fors gedeelte van het oppervlak tegenover een roerboon nog redelijk uniform toegankelijk is. Ellipsometrische metingen van de adsorptiesnelheid op een gebied dat niet recht tegenover de draaiende boon maar erboven of ernaast zijn gedaan lieten echter zien dat de transportsnelheid snel afneemt buiten dit gebied. Binnen het uniform toegankelijke oppervlak bleek de transportsnelheid net als bij de draaiende schijf afhankelijk te zijn van de draaisnelheid van de boon en de diffusieconstante van het eiwit. De proeven beschreven in de hoofdstukken 2-4 zijn overigens gedaan met een oppervlak dat qua grootte het omschreven gebied nauwelijks te buiten ging. Toch verdient het de voorkeur in de toekomst soortgelijke experimenten te verrichten met behulp van de draaiende schijf.

Het moge duidelijk zijn uit dit proefschrift dat substraat omzetting door een enzym dat gebonden zit aan een macroscopisch oppervlak verschilt van omzetting door ongebonden enzym. De invloed van stromingscondities op dit proces en het transport via laterale diffusie verklaren voor een groot deel de gevonden verschillen. Dat dit consequenties heeft voor de beschrijving van de *in vivo* realiteit is zeer waarschijnlijk. Het ligt dan ook voor de hand om het een en ander in meer fysiologische omstandigheden te verifiëren. Bloedstolling geschiedt immers op de wand van een bloedvat en niet op een draaiende schijf of een vlak plaatje tegenover een roerboon. Bovendien geschiedt het in het menselijk lichaam niet met eiwitten uit

het bloed van koeien maar met humaan eiwit. Ook gebeurt het niet in 0.05 M Tris-HCL buffer met 0.1 M NaCl en 3 mM Calcium en 0.5 g-liter albumine maar in vol bloed met alle stollingseiwitten aanwezig. Daarom zijn de conclusies uit dit proefschrift niet zondermeer toepasbaar op de werkelijke fysiologie en dienen slagen om de arm te worden genomen. Toch zijn de gekozen condities verdedigbaar. Een gezuiverd systeem in vitro geeft de mogelijkheid een model te ontwikkelen dat in aanwezigheid van de complete plasma-inhoud niet mogelijk is. Om iets te kunnen zeggen over de stromingscondities aan de wand van een bloedvat zal de proefopstelling moeten worden gekozen die de meettechnieken toelaat en de data interpreteerbaar houdt. Daarom moeten concessies worden gedaan aan de fysiologie. Het hogere doel achter deze proeven, een beschrijving geven van protrombine omzetting in vivo, is daarmee niet bereikt.