

Studies on the influence of heparin and heparin derivatives on the generation of thrombin

Citation for published version (APA):

Baruch, D. (1986). *Studies on the influence of heparin and heparin derivatives on the generation of thrombin*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19860314db>

Document status and date:

Published: 01/01/1986

DOI:

[10.26481/dis.19860314db](https://doi.org/10.26481/dis.19860314db)

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

Heparin, a heterogeneous mucopolysaccharide existing in different molecular forms is widely used in antithrombotic therapy. The relationship between its in vivo antithrombotic and in vitro anticoagulant action is far from being understood. The aim of our work is to identify some reactions of blood coagulation that contribute to thrombus formation and that are sensitive to the action of heparin. In this respect thrombin has a central role in the blood coagulation process as it governs several positive feedback reactions. Heparin inhibits thrombin through two different mechanisms that are either dependent or independent of a plasma inhibitor, antithrombin III. Whereas the antithrombin III-mediated mechanism of heparin action has been extensively studied, the antithrombin III-independent one has been the subject of a very few investigations. These studies are reviewed in Chapter I.

The prothrombinase complex, which converts prothrombin into thrombin, consists of the enzyme factor X_a bound to the protein cofactor factor V_a , assembled on a phospholipid surface. Factor V_a is formed by the proteolytic action of thrombin on a biologically inactive procofactor, factor V, which is present in plasma and in the alpha-granules of platelets. Moreover, thrombin induces the release of platelet factor V. We were able to determine the kinetics of platelet factor V release and activation in thrombin-activated platelet suspensions by using a specific inhibitor of the release reaction, a semi-synthetic prostacyclin analogue (Chapter II). We found that the initial rate of factor V release is 10-fold faster than the rate of factor V activation which is the rate-limiting step of platelet factor V_a formation. The platelet factor V concentration is only 10% of the one in plasma. In this respect it can be questioned whether platelet factor V_a activity contributes to thrombin formation compared to plasma factor V_a activity. Although it may be important for the hemostasis and coagulation processes to obtain high factor V_a concentrations at the site of platelet activation, two arguments point to this contribution not being essential. First, factor V from plasma or platelets are functionally identical. Second, studies on platelets from patients with a hereditary alpha-granule deficiency revealed a factor V content which was about 1% of

their plasma factor V concentration. (Chapter III). Despite this platelet factor V deficiency these patients have a moderate bleeding disorder. In this case, plasma factor V which was found to be quantitatively and functionally normal, might account for a not severely impaired thrombin formation.

The inhibition of thrombin-catalyzed reactions such as plasma factor V activation and platelet factor V_a formation is a potential regulatory mechanism against thrombosis, as it results in an interruption of the amplification of thrombin formation. As a first step to study these complex reactions we showed that in the absence of antithrombin III, an inhibitory effect of heparin could be demonstrated on four thrombin-catalyzed reactions (Chapter IV). Besides the two previously mentioned reactions, plasma factor V activation and platelet factor V_a formation, thrombin converts plasma factor VIII:C to factor $VIII_a$ and, in the presence of collagen, induces the platelet prothrombin converting activity by providing a procoagulant phospholipid surface. This inhibitory action of heparin is due to the formation of a complex with thrombin, where the activity of thrombin towards its macromolecular substrates is impaired, but its enzymatic activity towards small synthetic peptide substrates is unaffected. We found that unfractionated heparin has a higher affinity for thrombin than the low molecular weight heparin fractions that we studied. The inhibitory action of heparin on platelet activation by thrombin was not due to an effect of heparin on platelet functions.

To better characterize the properties of heparin fractions involved in the inhibition of thrombin-catalyzed reactions in the absence of antithrombin III, we studied the effect of heparin fractions obtained by ion-exchange chromatography (Chapter V). We found that the affinity for thrombin increased with the charge density of heparin fractions, indicating an electrostatic type of interaction with thrombin. However, in parallel with the variation in charge density, the heparin fractions were found to differ in their percentage of antithrombin III-binding species. Furthermore, an antithrombin III low affinity fraction had no inhibitory effect on the thrombin-catalyzed platelet factor V_a formation. Our results suggest that in a heterogeneous heparin preparation no polysaccharide chains can be found which have exclusively an antithrombin III-independent action on thrombin.

It has been reported that the antithrombin III-dependent action of heparin on the inactivation of thrombin and factor X_a is modified by the presence of the components of the hemostatic system. However, the inhibitory mode of action of antithrombin III-heparin on factor X_a and thrombin during thrombin formation by the prothrombinase complex remained uncertain. Therefore we have developed a method in order to assess the effect of antithrombin III-heparin on the inactivation of factor X_a and thrombin during prothrombin activation by the prothrombinase complex. This inhibitory action was compared to the inactivation of each of the purified, free enzymes (Chapter VI). In the presence of phospholipid and factor V_a , factor X_a was protected from the inactivation by antithrombin III alone and in the presence of heparin. Moreover, independent of the composition of the prothrombinase complexes, the rate of disappearance of the amidolytic activity of the formed thrombin was considerably slower than the one of purified thrombin (alpha-thrombin). This was explained by the fact that, during prothrombin activation, the thrombin activity resulted mainly from the formation of meizothrombin and to a minor extent of alpha-thrombin. In contrast to thrombin, meizothrombin is virtually insensitive to the action of antithrombin III-heparin. Our conclusion is that the action of heparin on the antithrombin III-mediated inactivation of purified thrombin and factor X_a cannot be extrapolated to its effect in conditions that are more likely to reflect the in vivo situation.

RESUME

L'héparine, mélange de mucopolysaccharides sulfatés, est un agent antithrombotique largement utilisé en clinique humaine sous diverses formes moléculaires. Les relations existant entre son action antithrombotique in vivo et son action anticoagulante in vitro sont loin d'être entièrement élucidées. L'objectif de notre travail est de reconnaître, parmi les réactions de la coagulation qui sont importantes dans le développement de la thrombose, celles qui sont sensibles à l'action de l'héparine. A cet égard, on peut considérer que la thrombine occupe une position centrale dans la coagulation car elle contrôle plusieurs réactions conduisant à une amplification de sa propre formation. L'héparine peut inhiber la thrombine par deux mécanismes différents selon que son action est dépendante ou indépendante d'un inhibiteur plasmatique, l'antithrombine III. Alors que le mécanisme d'action de l'héparine médié par l'antithrombine III est le mieux connu, celui qui est indépendant de l'antithrombine III l'est beaucoup moins. Le chapitre I décrit l'état des connaissances sur l'effet inhibiteur de l'héparine sur la thrombine dans chacune de ces deux voies. Le complexe de la prothrombinase, qui permet la conversion de prothrombine en thrombine, est formé par un enzyme, le facteur X_a , associé à un cofacteur protéique, le facteur V_a , qui sont assemblés sur une surface phospholipidique. Le facteur V_a provient de l'action protéolytique de la thrombine sur un procofacteur biologiquement inactif, le facteur V, présent dans le plasma et dans les granules alpha des plaquettes. De plus la thrombine induit la sécrétion du facteur V plaquettaire. Ainsi après stimulation des plaquettes par la thrombine, deux réactions (sécrétion du facteur V, activation en facteur V_a) ont lieu simultanément. Nous avons pu déterminer séparément les cinétiques des deux réactions en ajoutant au cours du temps un inhibiteur spécifique de la réaction de sécrétion, un analogue semi-synthétique de la prostacycline (Chapitre II). Nous avons montré que la vitesse initiale de sécrétion du facteur V est 10 fois plus rapide que celle de son activation. Celle-ci représente donc l'étape limitante de la formation d'activité facteur V_a plaquettaire. De plus nous avons trouvé que la concentration du facteur V plaquettaire ne représente que 10 % de celle du plasma. Cela pose le problème de la contribution de l'activité facteur V_a plaquettaire par rapport à l'activité facteur V_a

plasmatique dans la formation de thrombine. Bien que l'obtention de concentrations élevées de facteur V_a au site même d'activation des plaquettes puisse avoir une importance dans les processus d'hémostase et de coagulation, deux arguments soulignent que cette contribution n'est pas essentielle. D'une part, sur le plan fonctionnel les facteurs V plasmatique et plaquettaire sont identiques. D'autre part, l'étude des plaquettes de patients présentant une absence congénitale en granules alpha a révélé qu'elles ne contiennent pas plus de 1% du facteur V présent dans leur plasma (Chapitre III). Malgré cette anomalie du facteur V plaquettaire, ces patients ne présentent qu'un syndrome hémorragique modéré. Ceci peut être attribué à la présence d'un facteur V plasmatique fonctionnellement et quantitativement normal.

L'inhibition des réactions catalysées par la thrombine, telles que l'activation du facteur V plasmatique et la formation du facteur V_a plaquettaire, représente un mécanisme régulateur potentiel de protection contre la thrombose car elle interrompt l'auto-amplification de la formation de thrombine. Notre première approche à l'étude de ces interactions complexes a été de démontrer qu'en absence d'antithrombine III, quatre réactions catalysées par la thrombine peuvent être inhibées par l'héparine (Chapitre IV). Outre les deux réactions décrites ci-dessus, l'activation du facteur V plasmatique et la formation d'activité facteur V_a plaquettaire, la thrombine active le facteur VIII:C plasmatique en facteur $VIII_a$ et, en présence de collagène, induit la formation d'une activité procoagulante de nature phospholipidique à la surface des plaquettes. L'action inhibitrice de l'héparine est due à la formation d'un complexe avec la thrombine, dans lequel l'activité de la thrombine vis-à-vis de ses substrats macromoléculaires est inhibée sans que son activité enzymatique sur des petits substrats peptidiques synthétiques soit modifiée. Nous avons observé que l'héparine non fractionnée a une affinité plus élevée pour la thrombine que ne l'ont les héparines de bas poids moléculaire étudiées. De plus l'action inhibitrice de l'héparine sur les réactions d'activation des plaquettes par la thrombine n'est pas due à l'inhibition des fonctions plaquettaires par l'héparine.

Pour préciser les caractéristiques de l'héparine et de ses dérivés intervenant dans l'inhibition des réactions catalysées par la thrombine en absence d'antithrombine III, nous avons étudié l'effect de fractions

d'héparine obtenues par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions (Chapitre V). L'affinité de fractions d'héparine pour la thrombine augmente avec leur densité de charge, indiquant la nature électrostatique de la liaison héparine-thrombine. Cependant la variation de densité de charge de ces fractions va de pair avec la variation du pourcentage d'espèces moléculaires possédant le site de liaison à l'antithrombine III. De plus une fraction d'héparine de faible affinité pour l'antithrombine III est dépourvue d'action inhibitrice sur la réaction de formation d'activité facteur V_a plaquettaire catalysée par la thrombine. Nos résultats suggèrent qu'à partir d'une préparation d'héparine hétérogène on ne peut isoler de(s) chaîne(s) polysaccharidique(s) ayant une action anti-thrombine qui soit exclusivement indépendante de l'antithrombine III.

Un effet modulateur des composés du système hémostatique a été décrit sur l'inactivation des enzymes de la coagulation par l'antithrombine III-héparine. Cependant le mode d'action inhibitrice de l'antithrombine III-héparine sur le facteur X_a et la thrombine lors de la formation de celle-ci par le complexe de la prothrombinase n'est pas clairement établi. C'est pourquoi nous avons développé une méthode qui nous permet de déterminer l'action de l'antithrombine III-héparine, d'une part sur le facteur X_a participant au complexe de la prothrombinase, d'autre part sur la thrombine formée par la prothrombinase. Cette action a été comparée à l'inactivation de chaque enzyme purifié, libre en solution (Chapitre VI). En présence de phospholipides et de facteur V_a , le facteur X_a est protégé de l'inactivation par l'antithrombine III seule et en présence d'héparine. Par ailleurs l'action inhibitrice de l'antithrombine III-héparine sur la thrombine formée est beaucoup moins importante que son action sur la thrombine purifiée (alpha-thrombine). Ce phénomène est observé quelle que soit la composition des complexes de la prothrombinase. L'explication peut en être trouvée dans l'étude des produits d'activation de la prothrombine. Il semble que l'activité de la thrombine ainsi formée résulte non seulement de la formation d'alpha-thrombine, mais surtout de la formation de meizothrombine. Contrairement à la thrombine, celle-ci est pratiquement insensible à l'action de l'antithrombine III-héparine.

En conclusion il est clair que l'action de l'héparine médiée par l'antithrombine III, sur l'inactivation du facteur X_a et de la thrombine purifiés, ne peut pas être extrapolée à son action étudiée dans des conditions reflétant mieux la situation physiologique.

SAMENVATTING

Heparine wordt veelvuldig toegepast bij de behandeling en preventie van veneuze trombose en trombo-embolisme. Het is bekend dat heparine een bloedstollings-remmende werking heeft. Echter, het verband tussen de antistollings- en antitrombotische werking van heparine is nagenoeg onbekend. In het onderzoek naar deze relatie staan twee vragen centraal: welke processen (bloedstollingsreacties) hebben een sleutelpositie in het ontstaan van trombose en op welke wijze werkt heparine in deze reacties. In hoofdstuk I wordt op deze vragen nader ingegaan.

Omdat trombine, gevormd in de voorlaatste stap van het bloedstollingsproces, middels positieve tegenkoppelingsreacties, een grote rol speelt in zijn eigen vorming, hebben we ons vooral gericht op het bestuderen van een aantal trombine-afhankelijke reacties en het effect van heparine daarop.

Trombine wordt gevormd uit prothrombine door het zogenaamde prothrombinase complex. Dit complex bestaat uit het enzym factor X_a en de eiwit cofactor factor V_a , gebonden aan een membraan, een fosfolipide oppervlak. Factor V_a wordt gevormd uit een biologisch inactieve procofactor onder invloed van trombine. De procofactor, factor V, is een plasma eiwit, maar het komt ook voor in de alpha-granula van de bloedplaatjes. Trombine is in staat factor V uit de plaatjes te laten treden (release-reactie) waarna factor V vervolgens door trombine wordt omgezet in zijn actieve vorm. Hoofdstuk II beschrijft de kinetiek van de plaatjes factor V release-reactie en de plaatjes factor V activeringsreactie. Deze twee, simultaan verlopende, reacties konden apart bestudeerd worden door het gebruik van een remmer, een semi-synthetische prostacycline analoog, van de release reactie. We vonden dat de activeringsreactie de snelheidsbeperkende stap in de plaatjes factor V_a vormingsreactie is.

De hoeveelheid factor V aanwezig in circulerende bloedplaatjes is slechts 10% van de hoeveelheid factor V aanwezig in plasma. Dit feit en de waarneming dat plaatjes factor V en plasma factor V in alle opzichten identiek zijn, roept de vraag op of plaatjesfactor wel een specifieke fysiologische betekenis heeft, zoals in de literatuur gesuggereerd wordt. Uit ons onderzoek naar de factor V_a vorming in plasma en suspensies van bloedplaatjes van patienten met een erfelijke alpha-granula deficiëntie

(Gray-platelet syndroom) blijkt dat hoeveelheid factor V_a die uit hun plaatjes vrijgemaakt kan worden hooguit 1% is van de hoeveelheid te vormen plasma factor V_a . Interessant is dat deze patienten desondanks geen ernstige bloedingsneigingen vertonen. Wellicht komt dit door een bijna normaal plasma factor V gehalte (Hoofdstuk III).

Het remmen van de trombine-gekataliseerde reacties zoals plasma en plaatjes factor V_a vorming, activeren van factor VIII en het activeren van bloedplaatjes, kan op het tromboseproces een belangrijke invloed hebben. Immers, op deze manier wordt de vorming van trombine gereguleerd. In plasma bevindt zich het antitrombine III, een belangrijke remmer van trombine. Heparine speelt bij deze reactie een catalytische functie. Echter, ook zonder antitrombine III is heparine in staat trombine te inactiveren. De antitrombine III-onafhankelijke antistollingseigenschap van heparine is nog nauwelijks bestudeerd. In hoofdstuk IV tonen wij aan dat een aantal trombine-afhankelijke reacties ook zonder antitrombine III door heparine geremd worden, zoals plasma factor V en plasma factor VIII activering en het induceren van een plaatjes procoagulant oppervlak. Deze heparine werking is het gevolg van de vorming van een complex tussen trombine en heparine, waarbij de trombine zijn activiteit t.o.v. natuurlijke, hoog moleculair gewicht, substraten verliest. We vonden dat niet-gefractioneerde, klinisch toegepaste heparine veel meer effect had dan gefractioneerde, laag moleculair gewicht heparines.

Nader onderzoek naar het effect van heparine fracties verkregen na scheiding op een ionenwisselaar, laat zien dat de affiniteit van deze heparine fracties voor trombine en dus hun remmende werking, toeneemt met de ladingdichtheid van de fracties (hoofdstuk V). Wij hebben tevens gevonden dat de fractionering naar ladingdichtheid gepaard gaat met een verrijking in antitrombine III-bindende heparine fracties. Omgekeerd, wanneer heparine gefractioneerd wordt op basis van affiniteit voor antitrombine III zien we dat de fracties met lage affiniteit voor antitrombine III niet in staat zijn trombine te inactiveren. Hierbij willen we benadrukken dat het antitrombine III en trombine ieder hun eigen specifieke bindingsplaats heeft op het heparine molecuul. Dit betekent dat met, in de trombine-remmende polysaccharide ketens van een heterogeen heparine preparaat, zowel de antitrombine III-afhankelijke als antitrombine

III-onafhankelijke remming van trombine gevonden kan worden. Met andere woorden, er bestaat geen heparine molecuul dat uitsluitend antitrombine III-onafhankelijk werkzaam is.

De rol van heparine in de inactivering van gezuiverd trombine en factor X_a is door veel onderzoekers bestudeerd. In een aantal studies werden hierbij enkele componenten van het hemostase systeem betrokken. Echter, de vraag wat is het effect van heparine op de inactivering van trombine en factor X_a door antitrombine III tijdens het proces van de protrombine activering bleef onbeantwoord. Wij hebben een methode ontwikkeld waarmee dit probleem zeer goed benaderd kan worden (hoofdstuk VI). We laten zien dat in tegenstelling tot het vrijkomen factor X_a , factor X_a als onderdeel van het protrombinase complex tijdens de omzetting van protrombine in trombine in aanwezigheid van therapeutische hoeveelheden heparine nagenoeg ongevoelig is voor de inactivering door antitrombine III. Bovendien vonden we dat de trombine activiteit die gevormd wordt niet gevoelig is voor de stimulerende werking van heparine in de inactivering door antitrombine III. We stellen vast dat gedurende de vroege fase van de protrombine activering meizotrombine het belangrijkste reactieproduct is. In tegenstelling tot trombine, is meizotrombine nauwelijks gevoelig voor de werking van antitrombine III/heparine. Waarschijnlijk is dit het gevolg van het feit dat meizotrombin een geringe of geen affiniteit heeft voor heparine. Onze conclusie is dat de werking van heparine op de antitrombine III-afhankelijke inactivering van gezuiverde trombine en factor X_a niet geextrapoleerd kan worden naar de meer in vivo situatie benaderende condities.