

Studien über den lipoiden Aktivator der Blutgerinnung

Aus der Internen Klinik der Reichsuniversität Utrecht (Holland)

E. H e c h t

Bei dem durch Biggs und Douglas (2) eingeführten Thrombokinasenbildungstest (Thromboplastin generation test) können die Thrombozyten als Thrombokinasen aufbauende Komponente durch ein aus Blutplättchen (12), nach Bell und Alton (1) ein aus Menschenhirn extrahierbares Lipoid und unseren Untersuchungen zufolge durch den aus Schweinehirn bereiteten lipoiden Aktivator (12) ersetzt werden. Letzterer zeigt papierchromatographisch, gerinnungsphysiologisch und bezüglich seiner Reaktionen mit Sphingosin große Übereinstimmung mit dem Thrombozytenfaktor 3 („T 3“) nach Paulssen (19), von dem Deutsch und Mitarbeiter (4) die Heparin-neutralisierende Komponente als „T 4“ abtrennte. Nach de Vries, Kettenborg und v. d. Pol (23) bzw. Georgatsos, Hussey und Quick (7) kann T 3 auch durch lipoiden Bestandteile aus den Erythrozyten, nach Robinson und Poole durch solche aus dem Rattenschylus (21), aus menschlichem Urin nach v. Kulla (16) und nach Newlands und Wild (18) durch ein industriell hergestelltes Lecithinpräparat („Lecithin Emulgo No. 4“) vertreten werden. Nach Egli und Kessler (5) erfüllen auch Blutplättchen aus Kaninchenblut die Rolle der menschlichen Thrombozyten vollwertig.

Dementsprechend scheint der am Aufbau der Thrombokinasen mitwirkenden lipoiden Komponente wenig Spezifität zuzukommen.

Es war der Zweck der vorliegenden Untersuchung, eine Reihe lipoider Aktivatoren aus getrockneter Hirnsubstanz verschiedener Herkunft vergleichend zu studieren. Zum Nachweis ihrer eventuellen Identität wurde deren Einfluß auf die Gerinnung von Hühner- und menschlichem Plasma und ihr Verhalten anlässlich der papierchromatographischen Untersuchung studiert. Ebenso wurden die Funktionen der lipoiden Aktivatoren im Rahmen des Thrombokinasenbildungstests nach Biggs und Douglas (2) und deren Reaktionen mit Sphingosin untersucht. Die Klärung der Identitätsfrage der lipoiden Aktivatoren, die im Zusammenhang mit Howells Theorie wichtig wäre, stößt wegen unserer Unkenntnis über die chemische Natur derselben auf große Schwierigkeiten. Nach Howell (15) besitzen die thermolabilen Thrombokinasen das gleiche, lediglich an Eiweiß gebundene thermostabile aktive Prinzip: Kephalin. Die Annahme von der Identität der lipoiden Komponenten bzw. der lipoiden Aktivatoren mit dem Kephalin klassischer Prägung ist jedoch nicht wahrscheinlich (6, 9).

Methodik

A) Darstellung der lipoiden Aktivatoren

Bereitung größerer Mengen des lipoiden Aktivators aus Schweinehirn nach Fischer und Hecht (6). Zur Darstellung aus kleineren Mengen azetongetrockneten Hirnpulvers von Mensch, Pferd, Rind, Schwein, Kaninchen und Taube wurde im Prinzip nach Quick (20) verfahren.

Frisches, enthäutetes Hirngewebe wird im Mörser ungefähr 7mal mit jeweils neuem Azeton verrieben, auf dem Büchnertrichter filtriert, getrocknet und in geeigneten Mengen in Ampullen unter Vakuum eingeschmolzen. Dunkel und kühl bewahrt bleibt dieses Ausgangsmaterial, wie an einem 17 Jahre alten Trockenpulver aus Schweinehirn gesehen wurde, unbeschränkt haltbar. Zur Bereitung der lipoiden Aktivatoren wird die trockene Hirnsubstanz mit Petroläther im Dunkeln bei Zimmertemperatur unter gelegentlichem Umschütteln extrahiert. Von dem klaren gelben Extrakt werden die benötigten Mengen im gewogenen Röhrchen auf dem Wasserbad unter Einblasen von CO₂ bei 60 bis 70° C trocken gedampft, der Rückstand konstant gewogen und in physiologischer Kochsalzlösung emulgiert.

B) Darstellung der Thrombokinasen

Entsprechend I. A) erhaltenes Hirnpulver wird in physiologischer Kochsalzlösung (per 300 mg 5 ml) suspendiert, im Wasserbad unter häufigem Umrühren 15 Min. bei 56° C inkubiert, 2 Min. bei 2000 Touren zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit nötigenfalls durch eine dünne Lage Glaswolle filtriert.

C) Darstellung des Sphingosins

Einzelheiten der Darstellung aus Schweinehirn mit Sphingomyelin oder Cerebron als Zwischenprodukt siehe: Hecht (11). Über die Bereitung des synthetischen Produktes, das völlig analoge Resultate gibt, siehe Shapiro und Segal (22).

D) Bestimmung der Gerinnungszeiten

Apparatur und Methodik siehe Hecht (8).

1. Substrat: Hühnerplasma

Blutentnahme aus der Vena carotis nach Carrel (3). Das Plasma wird vor Gebrauch zur Hälfte mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt.

a) Aktivitätskurven der lipoiden Aktivatoren

120, 90, 60 bzw. 30 mm³ des lipoiden Aktivators (24 mg/1 ml NaCl) und gleiche Mengen von Verdünnungen desselben (1 : 8 und 1 : 64) werden mit NaCl jeweils auf ein Totalvolumen von 120 mm³ gebracht. Nach Zufügen von 150 mm³ Hühnerplasma (5 Tropfen à 30 mm³ aus kalibrierter Pasteurpipette), wobei Milieukonzentrationen von 1066 — 4 mg⁰/₁₀₀ an lipoidem Aktivator erhalten werden, erfolgt die Bestimmung der Gerinnungszeiten bei 39° C.

b) Aktivitätskurven der Thrombokinasen

Entsprechend den für die einzelnen Thrombokinasen schwankenden Konzentrationen (Trockengewicht: 6 bis 14 mg/1 ml NaCl) errechnen sich andere Milieukonzentrationen. Die Untersuchung erfolgt mit den Thrombokinasen ursprünglicher Konzentration und Verdünnungen derselben (1 : 5, 1 : 25 und 1 : 125) wie oben beschrieben.

c) Sphingosinreaktionen

Einzelheiten siehe Hecht (11) und am entsprechenden Ort Tabelle 1.

2. Substrat: menschliches Zitratplasma

9 ml Blut werden im silikonisierten Zentrifugierrohr mit 1 ml Natriumzitratlösung (3,8 g Natriumzitat · 5 H₂O in 100 ml H₂O) gemengt, 10 Min. zentrifugiert (2500 Touren) und das überstehende Plasma abpipettiert. Die Einleitung der Gerinnung erfolgt durch Zugabe gleicher

Mengen CaCl₂-Lösung ($\frac{m}{10}$ d. h. 1,12 g CaCl₂ wasserfrei in 100 ml H₂O).

a) Aktivitätskurven der lipoiden Aktivatoren

Von der ursprünglichen Emulsion (24 mg/1 ml NaCl) werden durch Zugabe geeigneter Mengen physiologische Kochsalzlösung 10 weitere Verdünnungen (19,2 bis 0,08 mg/1 ml) hergestellt.

Das Gerinnungsmilieu enthält jeweils 0,1 ml Zitratplasma, 0,1 ml lipoiden Aktivator und 0,1 ml CaCl_2 . Die Milieukonzentrationen an lipoidem Aktivator bestreichen einen Bereich von 800 bis 2,5 mg 0 / 0 .

Bestimmungen in dem Gerinnungsgerät bei 37° C.

b) *Aktivitätskurven der Thrombokinasen*

Verdünnungen und Technik analog 2a. Durch die geringeren Trockengewichte der Thrombokinasepreparate werden entsprechend niedrigere Milieukonzentrationen erhalten.

E) *Papierchromatographische Untersuchung*

Die Untersuchung der Ninhydrin-positiven Bestandteile erfolgte mit Phenol-Wasser als Laufflüssigkeit in Übereinstimmung mit Hecht und Mink (13).

F) *Plasmathrombokinasen-Bildungstest (Thromboplastin generation test)*

Die abweichenden Angaben über die Ausführung des Thrombokinasenbildungstestes in der Literatur regten eine ausführliche Beschreibung der von uns auch klinisch erprobten Technik an.

Nach den Urhebern dieses Tests (2) sind zur Bildung der Plasmathrombokinasen erforderlich:

1. antihämophiles Globulin AHG (syn. AHF, Faktor VIII, Thromboplastinogen, platelet cofactor I),
2. labiler Faktor (syn. Faktor V, Proaccelerin),
3. Christmasfaktor (syn. Faktor IX, platelet cofactor II),
4. stabiler Faktor (syn. Faktor VII, Proconvertin, Cothromboplastin, SPCA [serum prothrombin conversion accelerator]),
5. Faktor X und
6. Thrombozytenfaktor 3 (T 3).

Die Komponenten 1 und 2 werden in Form eines mit BaSO_4 adsorbierten Oxalatplasmas verwendet, 3, 4 und 5 in Form von Serum und 6 als Thrombozytensuspension.

Herstellung der Reagentien

A) *BaSO₄-adsorbiertes Plasma*

4,5 ml Blut werden mit 0,5 ml Na-Oxalat (1,34 0 / 0) gemischt und in silikonisiertem Material 15 Min. bei 3000 Touren zentrifugiert. 2 ml des überstehenden Plasmas werden mit 70 mg analysenreinem BaSO_4 (Handelspräparat oder selbst bereitet durch Füllen von BaCl_2 mit H_2SO_4 und Waschen bis zum Erhalt eines SO_4 -freien Waschwassers) im Zentrifugierrohr 5 Min. bei Zimmertemperatur intensiv gerührt und anschließend 5 Min. bei 3000 Touren abzentrifugiert. Die *Quick*-Prothrombinzeit des überstehenden Plasmas muß länger als 30 Min. sein. Zum Gebrauch wird 1 ml dieses Plasmas mit 4 ml physiol. NaCl-Lösung verdünnt.

B) *Serum*

3 ml Blut läßt man unter Bewegen mit ca. 3 Glasperlen gerinnen und zentrifugiert nach mindestens zweistündigem Stehen bei 37° C 15 Min. bei 3000 Touren. 1 ml des abpipettierten Serums wird mit 9 ml physiol. NaCl-Lösung verdünnt.

C) *Thrombozytensuspension*

9 ml Blut werden mit 1 ml einer 3,8 0 / 0 igen Lösung von Natriumzitrat (5 H_2O) in silikonisiertem Material gemengt und zur Entfernung der Erythrozyten 10 Min. bei 2000 Touren zentrifugiert. Das trübe überstehende Plasma wird mit silikonisierter Pasteurpipette in ein silikonisiertes Rohr überpipettiert und nunmehr 15 Min. bei 3000 Touren zentrifugiert. Das erhaltene Plasma dient als *Gerinnungssubstrat* und reicht für ungefähr 40 bis 45 Einzelbestimmungen aus.

Das nach Zentrifugieren zurückbleibende Thrombozytensediment wird 2mal in der Zentrifuge mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen und schließlich mit einem Holzstab in physiol. NaCl-Lösung (ein Drittel des Ausgangsvolumens) kräftig suspendiert.

Bestimmung

Zur Ausführung des Tests werden in 5 bis 6 Gerinnungsröhrchen (l = 33 bis 35 mm; d = 6 mm) je 0,1 ml Substrat im Thermostat bei 37° C bewahrt. In letzterem befinden sich

weiter in Reagenzrohren die unter A, B und C genannten Reagentien. In einem weiteren Reagenzrohr werden zusammengemischt:

- 0,3 ml A: BaSO₄-Plasma (1 : 5)
- 0,3 ml B: Serum (1 : 10) und
- 0,3 ml C: Thrombozytensuspension.

Zuletzt fügt man von einer gleichfalls im Thermostat befindlichen $\frac{m}{40}$ CaCl₂-Lösung (jeweils frisch bereitet durch Verdünnen einer $\frac{m}{10}$ Stammlösung mit 1,12 g wasserfreiem CaCl₂ in 100 ml Wasser) 0,9 ml hinzu, mischt und setzt gleichzeitig die Stoppuhr in Bewegung. Nach 1, 3, 5, 7 usw. Minuten werden jeweils zu einem der Substrat enthaltenden Röhrchen 0,2 ml obiger Mischung gefügt und während andauerndem Bewegen des Röhrchens im Gerinnungsapparat die Gerinnungszeit ermittelt.

Vergleichende Untersuchungen

A) Gerinnungsaktivität verschiedener lipoider Aktivatoren gegenüber Hühner- und menschlichem Plasma

Lipide Aktivatoren wurden, wie im methodischen Teil näher beschrieben, aus Hirnmaterial von Mensch, Pferd, Rind, Schwein, Kaninchen und Taube hergestellt und ihre Wirkung auf die Gerinnung von Hühnerplasma entsprechend den Angaben des 1. Abschnittes untersucht.

Wie aus Abb. 1 ersichtlich, ist der hierbei mit sechs verschiedenen lipoiden Aktivatoren erhaltene Kurventyp im Prinzip derselbe. Häufig beobachtete Unterschiede bzgl. der Weite der Bucht im Bereich optimaler Gerinnung konnten wir ebensowenig wie die Lage des Optimums mit dem Alter des als Gerinnungs-substrat dienenden Plasmas, oder mit dem der untersuchten Präparate in Zusammenhang bringen. Merkwürdig und ungeklärt sind zuweilen mehr oder weniger deutlich ausgeprägte Unregelmäßigkeiten der Kurven im annähernd gleichen Konzentrationsbereich. Im Fall der ausgewählten Beispiele sind diese verhältnismäßig gering. Wir sahen jedoch insbesondere mit Präparaten aus Gehirn von Mensch, Rind und Kaninchen bei den direkt dem Optimum folgenden höheren Konzentrationen des Aktivators gelegentlich eine enorme Verlängerung der Gerinnungszeit, die sich in einem nahezu senkrechten Ansteigen des Kurvenastes äußern kann. Bei weiterer Erhöhung der Milieukonzentrationen an lipoidem Aktivator kehren die Gerinnungszeiten wieder zu kürzeren, zum regelmäßigen Bild der Kurve passenden Werten zurück. Wir glauben, daß für diese wenig aktive Phase individuelle Eigenschaften des Plasmas verantwortlich zu machen sind.

Obige Befunde widersprechen der Annahme des Vorliegens identischer Substanzen nicht, ebenso wenig die Ergebnisse, die mit menschlichem Plasma als Gerinnungssubstrat erhalten wurden (Abb. 2).

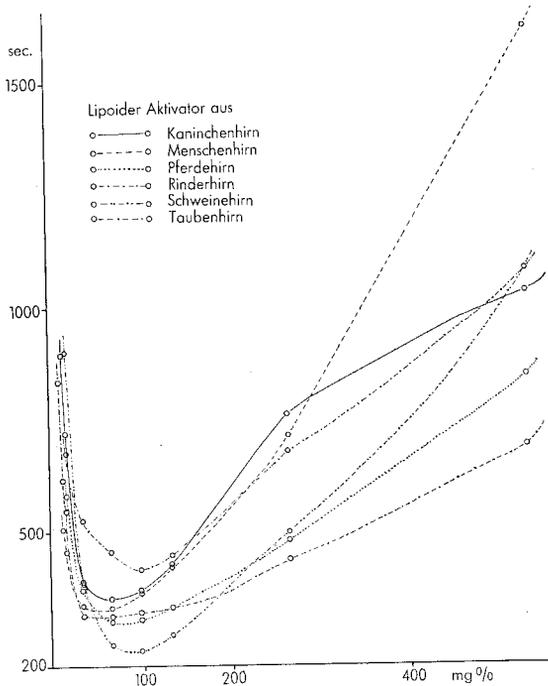


Abb. 1 : Einfluß verschiedener lipoider Aktivatoren auf die Gerinnung von Hühnerplasma

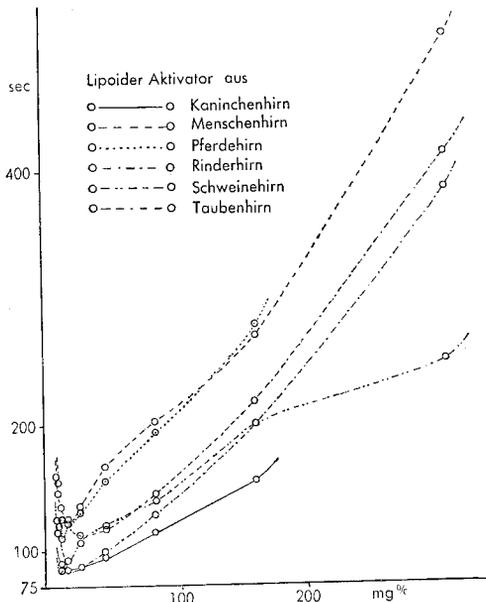


Abb. 2 : Einfluß verschiedener lipoider Aktivatoren auf die Gerinnung von menschlichem Zitratplasma

Alle untersuchten lipoiden Aktivatoren besitzen ein sehr schmales Aktivitäts-optimum. Mit Ausnahme des Präparates aus Taubenhirn zeigen die anderen, die Aktivatoren aus Pferde- und Rinderhirn meist weniger deutlich, die typische Abweichung der Gerinnungskurve.

Die Untersuchungen wurden vergleichsweise auch auf die aus Gehirnpulver durch Inkubation mit physiologischer NaCl-Lösung erhaltenen *Thrombokinasen* ausgedehnt. Wegen des geringeren Gehaltes der Thrombokinasen an Trockensubstanz wurden deuthlichkeitshalber die Konzentrationen derselben in größerem Maßstab dargestellt. Die Präparate aus Gehirn von Mensch, Schwein, Rind und Kaninchen gaben mit *Hühnerplasma* als Gerinnungssubstrat regelmäßige Kurven, während die aus Pferdehirn gelegentlich die bei den lipoiden Aktivatoren gegenüber Hühnerplasma häufig beobachtete Abweichung zeigten (Abb. 3). Ein

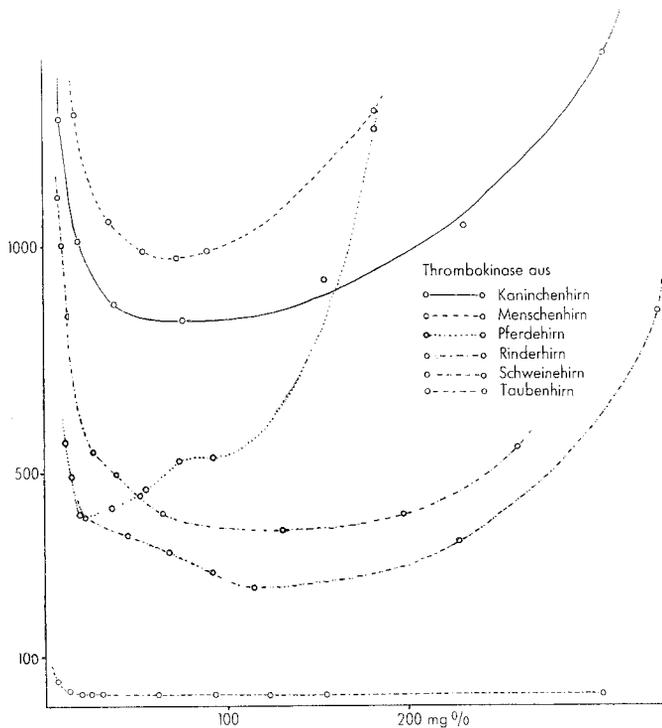


Abb. 3: Einfluß verschiedener Hirnthrombokinasen auf die Gerinnung von Hühnerplasma

völlig verschiedenes Bild gibt die Thrombokinasen aus Taubenhirn. Die Aktivitätskurve derselben weist die kürzesten und innerhalb des gesamten Konzentrationsbereiches nahezu gleiche Werte auf. Dieser typische und konstant beobachtete Unterschied zwischen dem aus Taubenhirn erhaltenen lipoiden Akti-

vator und der Thrombokinase bzgl. des Verhaltens ein und demselben Gerinnungssubstrat gegenüber ist umso erstaunlicher, da entsprechend der Darstellung der beiden Präparate weder von den lipoiden Aktivatoren, noch von den Thrombokinase ein Eiweißgehalt erwartet wird. Die Thrombokinase aus Taubenhirn ist übrigens auch die einzige der untersuchten Reihe, die mit menschlichem Plasma als Gerinnungssubstrat ein völlig verschiedenes Kurvenbild zeigt (Abb. 4). Das Aktivitätsoptimum derselben ist, verglichen mit den übrigen untersuchten Thrombokinase, außerordentlich schmal. Letztere zeigen, ebenso wie die Thrombokinase aus Taubenhirn mit Hühnerplasma, gegenüber menschlichem Plasma eine sich über den gesamten Konzentrationsbereich erstreckende hohe Aktivität.

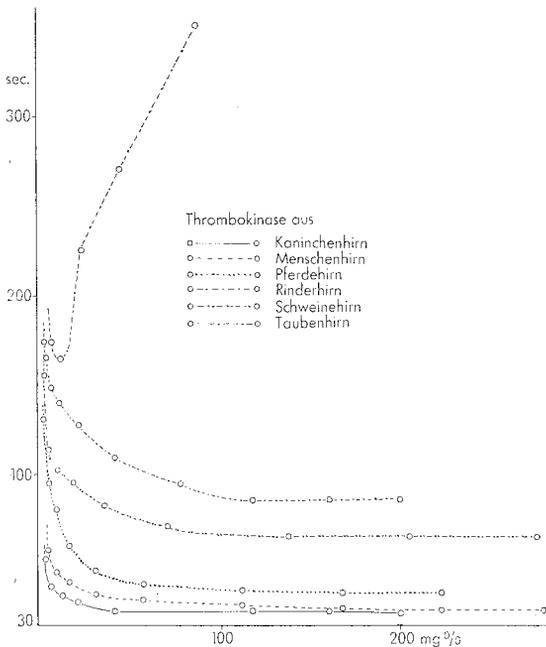


Abb. 4: Einfluß verschiedener Hirnthrombokinase auf die Gerinnung von menschlichem Zitratplasma

Das Vorliegen einer spezifischen Wirkung ist nicht zu leugnen. Übrigens kann mit der Thrombokinase aus Taubenhirn und menschlichem Plasma durch Zufügen von an sich inaktivem, jedoch nicht erhitztem Taubenserum das gleiche Kurvenbild wie mit Hühnerplasma erhalten werden. Wir können damit die Beobachtungen von Mann und Hurn (17) bestätigen, denzufolge jede Thrombokinase nach Zufügen von Serum des Thrombokinase-spendenden Tieres eine maximale Aktivität erwirbt.

B) *Chemische und papierchromatographische Untersuchungen*

Die Frage, ob die aus der trockenen Hirnsubstanz hergestellten lipoiden Aktivatoren und insbesondere die Thrombokinasen Eiweiß enthalten oder nicht, ist aus Spezifitätsgründen von besonderem Interesse.

Sämtliche lipoiden Aktivatoren geben in Mengen von 5 mg untersucht, von der unspezifischen Reaktion mit Sulfosalizylsäure abgesehen, negative Eiweißreaktionen (Kochprobe, Biuret, Xanthoprotein, Heller, Pauly, Adamkiewicz und Sakaguchi). Mit gleichen Konzentrationen der Thrombokinasen ist der Ausschlag der Sulfosalizylsäure- oder Biuretprobe und der Reaktion nach Pauly spurenhafte positiv. Wir möchten damit die Anwesenheit von Eiweiß jedoch noch nicht als bewiesen erachten.

Am Beispiel der Thrombokinasen aus Schweinehirn wurde beobachtet, daß unabhängig davon, ob das als Ausgangsmaterial dienende Hirnpulver lediglich in der Kälte, oder während 1¹/₂stündigem Kochen am Rückfluß mit Aceton vorbehandelt wurde, die gleichen positiven Eiweißreaktionen und die gleiche in Abb. 4 wiedergegebene Aktivitätskurve erhalten werden. Es ist fraglich, ob nach einer derartigen Hitzebehandlung mit physiologischer Kochsalzlösung anschließend noch intakte Eiweiße extrahiert werden können. Bei dem analogen Versuch mit Thrombokinasen aus mit Aceton vorerhitztem Pferdehirn wird, von einem gewissen Aktivitätsrückgang abgesehen, der Typ der erhaltenen Kurve gleichfalls nicht geändert.

In diesem Zusammenhang haben wir es unternommen, gleiche Konzentrationen sowohl der Thrombokinasen als auch des lipoiden Aktivators aus Pferdehirn eine Stunde bei 60 000 Touren (250 000 g) zu zentrifugieren. Aus den beobachteten Sedimentationsgeschwindigkeiten ging hervor, daß nur die Thrombokinasen im Gegensatz zum lipoiden Aktivator als polydisperses Gemisch mit einer kleinen Fraktion größerer Moleküle (M : ca. 9000) aufzufassen ist. Der lipoiden Aktivator und die Thrombokinasen aus Pferdehirn zeigen demnach einen prinzipiellen Unterschied. Es interessiert uns nunmehr die Beantwortung folgender Fragen:

1. Kommt den langsamer sedimentierenden Anteilen gerinnungsphysiologisch unterschiedliche Bedeutung zu?
2. Sind eben diese Anteile Träger der positiven Biuretreaktion?

Eine eingehende Beantwortung dieser Fragen muß einer eigenen Studie vorbehalten bleiben. Orientierenden Versuchen zufolge kommt den während des Versuches in der Ultrazentrifuge langsam sedimentierenden Anteilen größeren Moleküls keine gerinnungsfördernde Wirkung zu. Während die nach Ultrazentrifugieren überstehende Flüssigkeit die Gerinnung des menschlichen Plasmas ausgesprochen hemmt, besitzt das Sediment im Ausgangsvolumen physiologischer

Kochsalzlösung suspendiert eine höhere Aktivität als das ursprüngliche Präparat. Nach Mengen gleicher Teile der überstehenden Flüssigkeit und der Suspension des Sedimentes wird die ursprüngliche Gerinnungsaktivität wieder hergestellt. Die überstehende Flüssigkeit gibt ebenso wie das wieder suspendierte Sediment eine gleich stark positive Biuretreaktion. Nach einmaligem Auswaschen des Sediments mit physiologischer Kochsalzlösung wird die positive Reaktion jedoch allein noch von dem wieder suspendierten Sediment und nicht mehr von der Waschflüssigkeit gegeben. Die Intensität der Reaktion des Sediments bleibt nach noch zweimaligem Auswaschen während je 45 Minuten an der Ultrazentrifuge unverändert. Die positive Biuretreaktion scheint also lediglich den leicht abzuschleudernden festen Teilchen der Thrombokinasen, die auch Träger der typischen Aktivität sind, zuzukommen und nicht den größer molekulären Bestandteilen, die wir anlässlich des oben beschriebenen Versuches mit der Ultrazentrifuge beobachteten.

Die *papierchromatographische Untersuchung* der lipoiden Aktivatoren und Thrombokinasen erfolgte nach den Angaben von Hecht und Mink (13). Die R_F -Werte der ninhydrinpositiven Reaktionen, die mit den nicht hydrolysierten 6 lipoiden Aktivatoren anlässlich der Chromatographie mit Phenol-Wasser als Laufflüssigkeit erhalten werden, stimmen untereinander und mit den früher mit Präparaten aus Schweinehirn mitgeteilten 4 positiven Reaktionen vollständig überein. Mit den entsprechenden Thrombokinasen wurden gleichfalls 4 untereinander identische Ninhydrinreaktionen erhalten. Zum Unterschied zu den Lipoiden liegen die zwei niedrigen R_F -Werte der Thrombokinasen jedoch stets reproduzierbar niedriger als die der lipoiden Aktivatoren. Die beiden höheren R_F -Werte sind für beide Substanzgruppen die gleichen. Wegen Raummangel wird von einer Abbildung der Chromatogramme abgesehen. Eine Untersuchung nach den früher in dem lipoiden Aktivator aus Schweinehirn nach Hydrolyse festgestellten ninhydrinpositiven Komponenten (Colamin, Serin, Glutaminsäure und Sphingosin) fand mit den Präparaten der vorliegenden Arbeit vorläufig nicht statt.

C) Thrombokinasenbildungstest

Das Verhalten der lipoiden Aktivatoren anstelle der üblichen Thrombozyten-suspension im Thrombokinasenbildungstest wurde eingehend studiert.

Zur Ermittlung der jeweils optimalen Konzentrationen wurden von jeder Emulsion mit 24 mg/1 ml NaCl die Verdünnungen 1 : 40, 1 : 80, 1 : 200 und 1 : 400 vergleichend untersucht. Die Verdünnung 1 : 80 (0,3 mg/1 ml) erwies sich für die Zwecke des Thrombokinasenbildungstestes als besonders günstig. Im Hinblick auf den verfügbaren Raum wurde von einer Wiedergabe der Abbil-

dungen unserer Versuche zur Feststellung der geeignetsten Konzentrationen abgesehen. In den meisten Fällen liegen die mit den genannten Verdünnungen erhaltenen Kurven sehr nahe beisammen. Für die lipoiden Aktivatoren aus Schweine- und Pferdehirn ist dies etwas weniger der Fall und in noch geringerem Maß für das Präparat aus Taubenhirn.

Einer der mit gleichen Verdünnungen (1 : 80) aller lipoiden Aktivatoren angestellten Versuche ist in Abb. 5 wiedergegeben. Gleichzeitig wurde zum Vergleich das mit demselben Plasma und einer Thrombozytensuspension erhaltene Ergebnis aufgenommen.

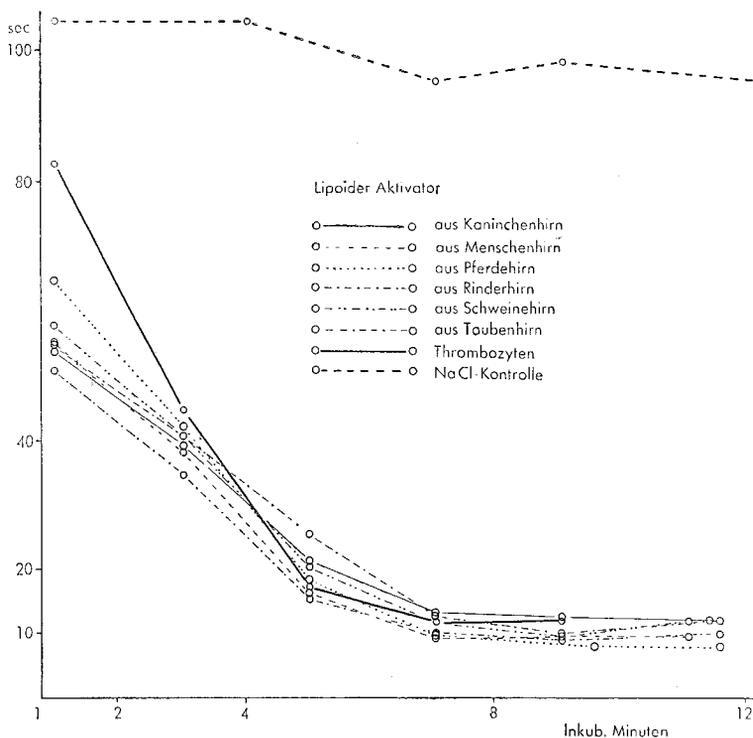


Abb. 5: Thrombokinasebildungstest mit verschiedenen lipoiden Aktivatoren und zum Vergleich mit Thrombozyten netzt Kontrolle

Aus Abb. 5 ist ersichtlich:

1. Von kleinen Aktivitätsunterschieden abgesehen, stimmen die mit den verschiedenen lipoiden Aktivatoren und mit einer Thrombozytensuspension erhaltenen Kurven im Prinzip überein.

2. Die Aktivität der lipoiden Aktivatoren aus Hirn von Rind, Mensch, Pferd, Schwein, Kaninchen und Taube fällt ungefähr in der angegebenen

Reihenfolge. Aus speziell hierauf gerichteten Untersuchungen zeigte sich, daß die ersten Petrolätherextrakte aus ein und demselben Hirnpulver wesentlich aktivere Präparate liefern als die nach wiederholter Zugabe von Petroläther erhaltenen späteren Extrakte. Es empfiehlt sich daher im Interesse hochaktiver Präparate das Hirnmaterial nicht zu erschöpfen.

3. Die mit Thrombozytensuspensionen erhaltenen Kurven zeigen steileren Verlauf als die der lipoiden Aktivatoren. Die Kurven der letzteren liegen flacher und die maximale Aktivität wird mit diesen demnach etwas später erreicht als mit den Thrombozytensuspensionen.

Falls zu dem Thrombokinasestest ein BaSO_4 -Plasma verwendet wird, das infolge ungenügender Adsorption eine verhältnismäßig kurze Quick-Prothrombinzeit aufweist, dann ist der Verlauf der mit Thrombozytensuspensionen und Emulsionen lipoider Aktivatoren erhaltenen Kurven gleich steil und wird somit das Aktivitätsoptimum gleich rasch erreicht. Wir glauben für das unverdünnte BaSO_4 -Plasma eine Quick-Prothrombinzeit von mindestens 30 Minuten fordern zu müssen.

4. Die erste, nach 1 Minute Inkubation erhaltene Gerinnungszeit ist mit den lipoiden Aktivatoren meistens kürzer als die analoge Gerinnungszeit mit frischen Thrombozytensuspensionen. Mit 1 bis 2 Tage alten Thrombozytensuspensionen, oder nach Einfrieren und anschließendem Auftauen derselben werden auch mit diesen die Gerinnungszeiten nach einer Minute gleich kurz. In eingefrorenem Zustand bleibt die Aktivität der Thrombozytensuspensionen im Gegensatz zu der des eingefrorenen BaSO_4 -Plasmas Monate lang unverändert.

Das Verhalten der lipoiden Aktivatoren im Thromboplastinbildungstest spricht gleichfalls zugunsten ihrer Identität. Es sei darauf hingewiesen, daß wir uns der analytisch-chemischen Kompliziertheit der reagierenden Komponenten des Thrombokinasestestes voll bewußt sind, womit der große praktische klinische Wert desselben nicht geschmälert werden soll. Ein früher bereits angestellter Vergleich des lipoiden Aktivators mit dem Thrombozytenfaktor 3 (12) suggerierte bereits deren Identität. Beide gaben mit Hühner- und menschlichem Plasma analoge Aktivitätskurven, zeigten gleiche Reaktionen gegenüber Sphingosin und ein übereinstimmendes Verhalten beim Thrombokinasestest. Ein Unterschied bestand hingegen bezüglich der Heparin neutralisierenden Fähigkeit des T 3. Die im Mai 1955 auf der Tagung der Niederländischen Hämatologenvereinigung ausgesprochene Vermutung (12), daß die Heparin neutralisierende Wirkung des T 3 nicht diesem, sondern einem anderen Bestandteil der Blutplättchen zukommt, erfuhr durch die kurz darauf von Deutsch, Johnson und Seegers (4) durchgeführte Abtrennung des, Heparin neutralisierenden Faktors T 4, ihre Bestätigung.

D) *Reaktionen mit Sphingosin*

Die Reaktionen des lipoiden Aktivators mit Sphingosin wurden erstmals 1951 (10) und ausführlich 1953 (11) beschrieben. Während kleine Mengen Sphingosin die Gerinnung von Hühnerplasma auf über 24 Stunden verlängern, wird bei gleichzeitiger Anwesenheit des lipoiden Aktivators aus Schweinehirn nicht nur die hemmende Wirkung des Sphingosins aufgehoben, sondern es werden meist sogar noch kürzere Gerinnungszeiten erhalten als mit der gleichen Menge des lipoiden Aktivators allein (*Sphingosin-Kompensation*). Wird hingegen die gleiche Menge lipoider Aktivator dem Hühnerplasma zugefügt, das vorher mit der gleichen Menge Sphingosin 1 Stunde bei 39° C inkubiert wurde, so werden Gerinnungszeiten erhalten, die nur $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{6}$ der mit lipoidem Aktivator allein zu erzielenden Werte betragen (*Inkubationseffekt*).

Es war naheliegend, auch dieses merkwürdige Verhalten zur Identifizierung der lipoiden Aktivatoren heranzuziehen. Die Technik dieser Untersuchungen wurde wiederholt beschrieben (11), so daß wir uns mit der Wiedergabe der mit den einzelnen lipoiden Aktivatoren erhaltenen Resultate in der Tabelle begnügen.

1. <i>Lipoider Aktivator</i>	2. <i>Sphingosin Kompensation</i>			3. <i>Inkubationseffekt (I. E.)</i>	
	aus Gehirn von	Gerinnungszeit mit 30 mm ³ lip. Aktivator			Gerinnungszeit m. 30 mm ³ lip. Aktiv.
	a) allein	b) + 30 mm ³ Sphs.	c) + 60 mm ³ Sphs.	a) + 30 mm ³ Sphs.	b) + 60 mm ³ Sphs.
Mensch	7'40"	5'20"	7'40"	1'30"	2'45"
Pferd	7'20"	5'00"	6'50"	1'37"	2'08"
Rind	10'00"	5'40"	6'25"	2'10"	3'30"
Schwein	9'10"	5'10"	5'40"	1'53"	2'10"
Kaninchen	6'00"	5'15"	8'00"	1'38"	1'38"
Taube	6'00"	6'30"	9'25"	2'50"	3'20"

Reaktionen der lipoiden Aktivatoren mit Sphingosin.

Die Gerinnungsmilieus der Gruppe 2 enthalten alle in duplo 30 mm³ lip. Aktivator und 30 mm³ NaCl, hierzu: bei a): 60 mm³ H₂O, bei b): 30 mm³ H₂O und 30 mm³ Sphs. und bei c): 60 mm³ Sphs. Alle Röhren erhalten dann 150 mm³ Plasma. Von Gruppe 3 erhalten in duplo a): je 30 mm³ NaCl, H₂O und Sphs., b): 30 mm³ NaCl und 60 mm³ Sphs. und anschließend 150 mm³ Plasma. Nach 1 Stunde Inkubation bei 39° C werden 30 mm³ lip. Aktivator zugefügt (Lip. Akt.: 6 mg/1 ml NaCl, Sphs.: 5 mg/1 ml H₂O).

Individuelle Eigenschaften des Plasmas, nicht jedoch dessen Alter und Selbstgerinnungszeit haben Einfluß auf die Höhe der erhaltenen Gerinnungszeiten. Es steht fest, daß an dem Zustandekommen der Sphingosinreaktionen ein Bestandteil des Plasmas mitwirkt, da nach vorhergehender Inkubation des lipoiden Aktivators mit Sphingosin kein Inkubationseffekt sondern die entsprechenden Gerinnungszeiten der Sphingosinkompensation erhalten werden. Das zu den Versuchen der obigen Tabelle verwendete Hühnerplasma hatte eine Selbstgerinnungszeit von 38'45". Die gleichen Aktivatoren ergaben mit einem anderen Hühnerplasma mit einer Selbstgerinnungszeit von 26'10" im Inkubationseffekt

die ungefähr nur halb so langen Gerinnungszeiten, während ein drittes Hühnerplasma mit einer Selbstgerinnungszeit von 41' 50" mit obigem lipoiden Aktivator aus Kaninchenhirn die gleichen kurzen Gerinnungszeiten im Inkubationseffekt gab.

Aus früheren Versuchen ist uns bekannt, daß durch Variieren der Konzentrationen des lipoiden Aktivators und des Sphingosins stets optimal kurze Gerinnungszeiten bei den Sphingosinreaktionen insbesondere beim Inkubationseffekt erzielt werden können.

Diskussion der Versuchsergebnisse

Die Thrombozyten können im Thrombokinasebildungstest nicht nur durch einen lipoiden Bestandteil derselben, den Thrombozytenfaktor 3 (T 3), sondern auch durch eine Anzahl anderer lipoider Substanzen verschiedenster Herkunft ersetzt werden. Eine Reihe derselben wurde in der Einleitung dieser Arbeit genannt. Von diesen interessierten im Rahmen dieser Arbeit insbesondere Lipidextrakte aus Hirnmaterial, da unserer früheren Feststellung (12) zufolge das Verhalten des lipoiden Aktivators aus Schweinehirn mit dem des T 3 große Ähnlichkeit zeigte. Beide Substanzen ersetzten im Thrombokinasebildungstest die Blutplättchen, zeigten Hühner- und menschlichem Plasma gegenüber gleiche Aktivität und gleiche Ninhydrin-positive Reaktionen bei der papierchromatographischen Untersuchung. Auch gegenüber dem Inhibitor Sphingosin gaben beide übereinstimmend die typischen Reaktionen. Beide Stoffe können im Verlauf der Vorphase des Blutgerinnungsprozesses beim Aufbau einer thrombokinaseartigen Aktivität eine essentielle Rolle spielen und infolge ihrer Lipoidnatur dürften sie einer chemischen Untersuchung leichter zugänglich sein als die komplizierteren eiweißartigen Komponenten des Gerinnungssystems. Im Hinblick auf die vielen bekannt gewordenen Substanzen gleicher Wirkung im Thromboplastinbildungstest kommt dem lipoiden Faktor vermutlich hierbei auch keine weitgehende Spezifität zu.

Im Interesse der so wünschenswerten chemischen Aufklärung eines Faktors des Gerinnungssystems wurden eine Reihe lipoider Aktivatoren vorläufig allein aus Hirngewebe verschiedenen Ursprungs (Mensch, Rind, Pferd, Schwein, Kaninchen und Taube) vergleichend untersucht. Ein eventueller Nachweis ihrer Identität wäre außerdem auch im Zusammenhang mit *Howells* Theorie (15) von Interesse. Dieser zufolge soll der lipoide Aktivator mit dem thermostabilen Kephalin identisch sein. Alle Thrombokinasen sollen als aktives Prinzip den gleichen Aktivator jedoch in eiweißgebundener Form enthalten, woraus sich die Thermolabilität der Thrombokinasen erklärte.

Die untersuchten lipoiden Aktivatoren geben mit Hühnerplasma und mit menschlichem Zitratplasma prinzipiell gleiche Aktivitätskurven. Die aus den Abb. 1 und 2 ersichtlichen geringen Unterschiede müssen Eigenschaften des Plasmas zugeschrieben werden. Alter und Selbstgerinnungszeit desselben sind hierfür jedoch nicht verantwortlich zu machen.

Papierchromatographisch untersucht zeigen die lipoiden Aktivatoren 4 Ninhydrin-positive Reaktionen, deren R_F -Werte genau übereinstimmen mit denen, die früher (13) bereits anlässlich der Untersuchung des lipoiden Aktivators aus Schweinehirn festgestellt wurden.

Ebenso sind die Ergebnisse mit den lipoiden Aktivatoren anstelle der Thrombozytensuspensionen beim Thrombokinasestest (Abb. 5) praktisch gleichlautend und dasselbe trifft auch für deren Reaktionen mit Sphingosin zu (Tab.).

Den genannten Resultaten zufolge werden den verschiedenen Trockenpräparaten aus Hirn mit *Petroläther* lipoide Aktivatoren mit identischen Leistungen entzogen. Für den Fall der lipoiden Aktivatoren scheint, soweit dies bis jetzt wenigstens für Präparate aus Hirnmaterial festgestellt wurde, die These von der Identität der aktiven Prinzipie berechtigt, nicht jedoch auf Grund früherer Untersuchungen, deren Identität mit dem Kephalin klassischer Prägung (6, 9).

Extrakte, die aus den gleichen Hirnpräparaten mit *physiologischer Kochsalzlösung* als Thrombokinasen erhalten werden, zeigen jedoch unleugbar spezifische Eigenschaften. Ein sprechendes Beispiel hierfür liefert die Thrombokinase aus Taubenhirn. Zum Unterschied von allen anderen Thrombokinasen zeigt diese gegenüber Hühnerplasma eine sehr große und innerhalb eines breiten Konzentrationsbereiches eine konstante Aktivität. Dieselbe Thrombokinase demonstriert aber auch gegenüber menschlichem Zitratplasma ein von allen anderen Thrombokinasen abweichendes Verhalten. Umgekehrt zeigt die Thrombokinase aus Kaninchenhirn nach *Quick* im Gegensatz zu allen anderen gegenüber menschlichem Zitratplasma eine hohe konstante Aktivität und verhält sich Hühnerplasma gegenüber als einzige prinzipiell abweichend.

Besonders auffallend ist das grundverschiedene Verhalten der eiweißfreien lipoiden Aktivatoren und Thrombokinasen aller Hirnpräparate, ausgenommen dem der Taube, gegenüber menschlichem Zitratplasma.

Orientierende Versuche, für diese Spezifitätserscheinungen eventuell Unterschiede bzgl. der lipoiden Bestandteile zu finden, ergaben einige Anhaltspunkte. Um Wiederholungen zu vermeiden, sei auf die Ausführungen des 2. Abschnittes unter B verwiesen. Eine gleichzeitig nebeneinander ausgeführte papierchromatographische Untersuchung der lipoiden Aktivatoren und Thrombokinasen ergab für beide Gruppen 4 Ninhydrin-positive Reaktionen, wovon zwei der Thrombokinasen reproduzierbar niedrigere R_F -Werte besaßen.

Zusammenfassung

1. Neben anderen angewandten Methoden wird eine ausführliche Beschreibung unserer Technik des Thrombokinasestestes gegeben.

2. Die lipoiden Aktivatoren aus Aceton-getrocknetem Gehirn von Mensch, Rind, Pferd, Schwein, Kaninchen und Taube wurden vergleichend untersucht.

3. Die lipoiden Aktivatoren zeigen ein identisches Verhalten

- a) bezüglich ihres Einflusses auf die Gerinnung sowohl von Hühnerplasma als auch von menschlichem Plasma,
- b) bezüglich des negativen Ausfalls der Eiweißreaktionen,
- c) hinsichtlich der R_F -Werte der papierchromatographisch erhaltenen vier Ninhydrin-positiven Reaktionen und
- d) bezüglich ihrer gleichwertigen Leistung, die Blutplättchen im Rahmen des Thrombokinasestestes zu ersetzen.

Die aus Hirnsubstanz erhältlichen lipoiden Aktivatoren scheinen demnach identisch zu sein.

4. Die Aktivitätskurven der aus den gleichen Aceton-getrockneten Hirnsubstanzen stammenden Thrombokinasen mit Hühner- und menschlichem Plasma als Gerinnungssubstrat weichen von den Aktivitätskurven der entsprechenden lipoiden Aktivatoren in spezifischer Weise ab.

5. An Hand orientierender Versuche, welche die Eiweißfreiheit der Hirnthrombokinasen suggerieren, wird erwogen, die unter 4. genannten Beobachtungen u. a. den Unterschieden in der lipoiden Zusammensetzung der Präparate zuzuschreiben.

Summary

1. The author's own modification of the thromboplastin generation test is described in detail as well as other methods used in this study.

2. Lipoid activators obtained from acetone-dried brain substances of man, cow, horse, pig, rabbit, and pigeon have been studied and the results compared.

3. The lipoid activators show identical behaviour regarding

- a) their influence on the coagulation of human as well as chicken plasma
- b) the negative results of albumin reactions
- c) R_F -values of the four ninhydrin-positive reactions obtained by paper chromatography

d) their equal capacity to replace blood platelets in the thromboplastin generation test.

The lipid activators of the brain substance, therefore, seem to be identical

4. Activity curves of thromboplastins obtained from the same acetone-dried brain substances, using chicken or human plasma as coagulation substrate, differ specifically from the activity curves of the corresponding lipid activators.

5. Based on some experiments suggesting the absence of albumin from brain thromboplastins, it is considered to ascribe the observations mentioned under 4., to the different lipid composition of the preparations.

Résumé

1) A côté d'autres méthodes, nous décrivons notre technique du test de la formation de la thrombokinasé.

2) Les activateurs lipoidiques, obtenus par extraction à l'acétone de cerveaux humains, de boeuf, cheval, porc, lapin ou pigeon, ont été comparés.

3) Ces activateurs lipoidiques se comportent d'une manière tout à fait semblable en ce qui concerne:

a) leurs effets sur la coagulation aussi bien du plasma humain que de celui des poules.

b) leurs réactions albuminiques négatives

c) les 4 réactions à la ninhydrin de la chromatographie sur papier furent positives dans les valeurs R_F .

d) ils peuvent tous remplacer les plaquettes dans le cadre du test de formation de la thrombokinasé.

Ils semble donc que les différents activateurs lipoidique extraits de substance cérébrale soient identiques.

4) Les courbes d'activité des thrombokinasés, extraites des mêmes cerveaux, différent d'une manière spécifique dans leur activité respective comme substance coagulante au sein du plasma humain ou de poule.

5) D'après les expériences mentionnées, qui suggèrent la nature non protéinique de ces thrombokinasés cérébrales nous avançons l'hypothèse que les faits mentionnés sous 4 pourraient être dûs à des différences dans la structure lipoidique de ces substances.

Literatur

- (1) Bell, W. N. and Alton, H. G.: A brain extract as a substitute for platelet suspensions in the thromboplastin generation test. *Nature (Lond.)* 174: 880 (1954).
- (2) Biggs, R. and Douglas, A. S.: The thromboplastin generation test. *J. clin. Path.* 6: 23 (1953).
- (3) Carrel, A.: siehe Fischer, A.: *Gewebezüchtung*, München 1927 und (oder) Demuth, F.: *Praktikum der Züchtung von Warmblütergewebe in vitro*, München 1929.

- (4) Deutsch, E., Johnson, S. A. and Seegers, W. H.: Differentiation of certain platelet factors related to blood coagulation. *Circulation* (N. Y.) 3: 110 (1955).
- (5) Egli, H. und Kessler, K.: Vergleichende Untersuchungen über die Blutthrombokinasebildung bei Kaninchen und Mensch. *Acta haemat. (Basel)* 14: 363 (1955).
- (6) Fischer, A. und Hecht, E.: Über die chemische Natur des Lipoidfaktors bei der Blutgerinnung. *Biochem. Z.* 269: 115 (1934).
- (7) Georgatsos, J. G., Hussey, C. V. and Quick, A. J.: Nature and action of a new clotting factor obtained from erythrocytes. *Amer. J. Physiol.* 181: 30 (1955).
- (8) Hecht, E.: Zur Kenntnis der Blutgerinnung 1. Mitt. Zur Methodik der Bestimmung der Blutgerinnungszeit. *Acta med. scand.* 102: 79 (1939).
- (9) Hecht, E.: Untersuchungen über die chemische Natur der Gerinnungsaktivatoren. *Sang* 21: 486 (1950).
- (10) Hecht, E.: New inhibitors of the first stage of the bloodclotting process. *Nature (Lond.)* 167: 279 und 633 (1951).
- (11) Hecht, E.: Eine systematische Untersuchung über die Bedeutung der Lipide für die Blutgerinnung 2. Mitt. Der Einfluß der Diaminophosphatide und deren Spaltungsprodukt Sphingosin. *Acta haemat. (Basel)* 9: 237 (1953).
- (12) Hecht, E.: Over de thrombocytenfactor 3 ("T 3"). *Niederl. Ver. Haemat.* 7. Mai 1955, *Ned. T. Geneesk.* 101: 429 (1957).
- (13) Hecht, E. und Mink, Chr.: Zur Methodik der Ninhydrinreaktion und Papierchromatographie im Zusammenhang mit Untersuchungen über gerinnungsphysiologisch interessierende Phosphatide. *Biochim. biophys. Acta* 8: 64 (1952).
- (14) Hecht, E. and Shapiro, D.: Sphingosine as an inhibitor of blood clotting. *Science* 125: 1041 (1957).
- (15) Howell, W. H.: The nature and action of the thromboplastic substance of the tissues. *Amer. J. Physiol.* 31: 1 (1912).
- (16) von Kaula, K. N.: Extraction and concentration of thromboplastic material from human urine. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 91: 543 (1956).
- (17) Mann, F. D. and Hurn, M. M.: Species specificity of thromboplastin: Role of the cothromboplastin reaction. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 79: 19 (1952).
- (18) Newlands, M. V. and Wild, F.: Sources of platelet factor for the thromboplastin generation test. *Nature (Lond.)* 176: 885 (1955).
- (19) Paulssen, M. M. P.: Stollingsfactoren aanwezig in thrombocyten. *Diss. Amsterdam* 1951.
- (20) Quick, A. J.: *The Hemorrhagic Diseases and the Physiology of Hemostasis*, Schering-field, Ill. 1942.
- (21) Robinson, D. S. and Poole, J. C. F.: The effect of dylomicra and of ethanolamine phosphatide on the generation of thrombin during blood coagulation. *Biochem. J., Proc. 345th Meeting* 19 Nov. 1955, 62: 4p Jan. 1956.
- (22) Shapiro, D. and Segal, K.: The synthesis of sphingosine. *J. Amer. chem. Soc.* 76: 5894 (1954).
- (23) de Vries, S. I., Kettenborg, H. K. en v. d. Pol, E. T.: Verband tussen een factor uit rode bloedcellen en de vorming van thromboplastine. *Ned. T. Geneesk.* 99: 2967 (1955).