

Über das Vorkommen eines Antiheparinfaktors in Thrombozyten und Geweben

II. Mitteilung: Antiheparinaktivität von Hirnextrakten*)

*Aus dem Zentralen Gerinnungslaboratorium der I. Med. Univ.-Klinik, Wien
(Vorstand: Prof. Dr. E. Lauda)*

E. Deutsch, E. Wawersich und G. Franke

Seit den grundlegenden Untersuchungen von Quick findet ein wäßriger Extrakt aus aceton-getrockneter grauer Hirnsubstanz als Thrombokinasen Verwendung. Dieser Extrakt hat auch eine gewisse gegen Heparin gerichtete Aktivität. Csefko, Gerendas und Udvardy konnten zeigen, daß sich eine durch Heparin metachromatisch violett gefärbte Toluidinblaulösung wieder blau färbt, wenn Thrombokinasen zugesetzt wird. Es soll sich zwischen Thrombokinasen, Heparin und Toluidinblau ein Gleichgewicht ausbilden. Deutsch wies bei der Untersuchung eines rohen Rinderhirnextraktes (Thrombokinasen-Schoch) eine deutliche Antiheparinwirkung nach und führte diesen Befund geradezu als ein Argument für den Thrombokinasencharakter des untersuchten Präparates an.

Wir haben bereits vor einiger Zeit auf Analogien der Gerinnungsaktivität von Thrombozyten- und Hirnextrakten hingewiesen. So konnten wir unter entsprechenden Bedingungen in beiden eine fibrinoplastische, thrombokinasenartige und eine Antiheparin-Aktivität nachweisen, während eine dem Plasmafaktor V entsprechende Aktivität in Hirnextrakten nicht gefunden werden konnte. Diese Aktivität der Thrombozyten erwies sich aber später als nicht autochthon, sondern nur als adsorbiert, wie Untersuchungen mit parahämophilen Thrombozyten zeigten (Deutsch u. a.). Wir haben vorgeschlagen, die entsprechenden Aktivitäten der Hirnextrakte in Analogie zu den Aktivitäten der Thrombozyten als Hirnfaktor 2, 3 und 4 zu bezeichnen, während eine Hirnfaktor-1-Aktivität fehlt. Über die Abtrennung von Hirnfaktor 4 und sein Verhalten wird im folgenden berichtet.

Material und Methoden

1. *Gewinnung des Hirnmaterials:* Menschliches Hirn wurde nach den Angaben von Quick zunächst blutfrei gewaschen, von den Hirnhäuten befreit und die graue Substanz abpräpariert. Diese wurde mehrmals mit Aceton digeriert, bis ein feines Pulver entstand, welches im Vakuum

*) Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Blood Research Foundation, Washington, fortgesetzt.

schnell trocknete. Dieses Pulver hat volle Gewebethrombokinas-Aktivität und kann zur Bestimmung des Quick-Testes verwendet werden.

2. *Herstellung eines Hirnfaktor-4-Rohpräparates:* Acetongetrocknetes Hirnmaterial wurde 3mal 30 Min. bei Zimmertemperatur auf der Schüttelmaschine mit 96⁰/oigem Alkohol extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das unlösliche Material im Vakuum getrocknet. 185 g desselben wurden bei Zimmertemperatur mit je 600 ml physiologischer Kochsalzlösung 2mal auf der Schüttelmaschine bei Zimmertemperatur 30 Min. lang extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und lyophilisiert. Man erhielt 25 g Trockenmaterial. Dieses löste sich ziemlich gut in 0,05⁰/oigem Ammonkarbonat und diente als Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen. Das Präparat wurde bei — 25° gelagert und besitzt auch jetzt nach 2 Jahren noch volle Aktivität.

3. Die *Bestimmung der Aktivität von Hirnfaktor 3 und 4* erfolgte unter Verwendung derselben Methoden wie die Bestimmung der entsprechenden Thrombozytenfaktoren in der vorangegangenen Mitteilung.

Ergebnisse

1. *Nachweis einer Antiheparinwirkung in der grauen Substanz menschlicher Cerebra:* 300 mg Aceton-dehydratisierte graue Substanz wurden in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und 30 Min. geschüttelt, wobei es gleichgültig war, ob die Extraktion bei Zimmertemperatur oder bei 37° erfolgte. Die Extrakte zeigten eine deutliche Wirkung, die jedoch erst nach einer Inkubation von 15 Min. nachweisbar wurde. In gleicher Weise wurden 1,2 g alkoholextrahiertes Hirnpulver mit 7 ml physiologischer Kochsalzlösung extrahiert und die festen Partikel durch Zentrifugieren entfernt. Auch dieser Extrakt erwies sich als wirksam (Tab. 1). Der Alkoholextrakt wurde im Vakuum im Stickstoffstrom getrocknet, der Rückstand in Chloroform aufgenommen, das Chloroform im Vakuum entfernt (Präparat 17 C) und der Rückstand in physiologischer Kochsalzlösung fein suspendiert. Diese Suspension zeigte keine Faktor-4-Aktivität. Hingegen enthielt sie eine große Faktor-3-Aktivität, während das alkoholextrahierte Hirnpulver keine Faktor-3-Aktivität mehr aufwies.

Tab. 1: Antiheparinaktivität von Hirnpulver und von alkoholextrahiertem Hirnpulver

| Material | Gerinnungszeit in Sek. | |
|--|------------------------|-------------------|
| | ohne Inkub. | 15 Min. inkubiert |
| Kontrolle 1 (ohne Heparin) | 16,2" | |
| Kontrolle 2 (mit Heparin) | 73" | |
| Hirnpulver bei 37° extrahiert | 59" | 30" |
| Hirnpulver bei Zimmertemperatur extrahiert | 55" | 30" |
| Alkoholextrahiertes Hirnpulver | 60" | 30" |
| alkoholextrahierter Hirnextrakt 17 C | 10 mg/ml > 90" | > 90" |
| | 1 mg/ml | 45" |
| Kontrolle 2 (mit Heparin) | 43" | |

2. *Einfluß der Inkubation:* Die Hirnextrakte unterscheiden sich insofern von den in gleicher Weise hergestellten Thrombozytenextrakten, daß die Antiheparinwirkung nicht sofort nachweisbar war, sondern erst nach einer Inkubation von etwa 15 Min. Es war hierbei gleichgültig, ob die Heparinlösung mit dem Hirnextrakt in Gegenwart des Testplasmas inkubiert wurde oder nicht, so daß angenommen werden kann, daß es sich um eine Reaktion zwischen Hirnextrakt und Heparin handelt, zu der keine weiteren Faktoren erforderlich sind (Tab. 2). Nach Alkoholfällung (s. u.) erwiesen sich die Hirnextrakte als sofort wirksam.

T a b. 2 : Inkubationseffekt

| Material | Gerinnungszeit (Sek.) |
|---|-----------------------|
| Kontrolle 1 (ohne Heparin) | 16,2 [“] |
| Kontrolle 2 (mit Heparin) | 73 [“] |
| 0,3 ml defibriniertes Plasma + + 0,1 ml Heparin + 0,1 ml Hirnextrakt 15 Min. inkubiert dann mit Fibrinogen und Thrombin versetzt | 27 [“] |
| 0,1 ml Heparin + 0,1 ml Hirnextrakt, 15 Min. inkubiert, dann + 0,3 ml defibriniertes Plasma + Fibrinogen + Thrombin | 25 [“] |

3. *Verhalten von Hirnfaktor 4 gegen Einwirkung von Temperatur und Lagerung:* Aceton-dehydratisiertes, alkohol-extrahiertes Hirnpulver wurde mit physiologischer Kochsalzlösung extrahiert. Die Extrakte wurden verschieden lange Zeit auf 50°, 60° und 80° erhitzt. Die Aktivität wurde bei 50° bereits nach 30 Min. zerstört (Tab. 3). Hingegen blieb das Faktor-4-Rohpräparat bei — 25° gelagert, über 2 Jahre voll aktiv.

T a b. 3 : Temperaturdenaturierung von Hirnfaktor 4

| Dauer und Art der Temperatureinwirkung | Gerinnungszeit nach 15 Min. Inkubation |
|---|---|
| Kontrolle 1 (ohne Heparin) | 14,8 [“] |
| Kontrolle 2 (mit Heparin) | 47,5 [“] |
| Kontrolle 3 (mit Heparin + und Hirnextrakt) | 27,4 [“] |
| 5 Min. 50° | 28,5 [“] |
| 30 Min. 50° | 55 [“] |
| 5 Min. 60° | 53 [“] |
| 5 Min. 80° | 55 [“] |

4. *Säurefraktionierung:* 200 mg Hirnfaktor-4-Rohpräparat wurden in 5 ml dest. Wasser suspendiert und vom Ungelösten abzentrifugiert. Die Lösung hatte

ein pH von 6,5. Nun wurde das pH mit 1%iger Essigsäure auf 5,5 und nach Abtrennen des Niederschlages (30 Min., + 2°, 5000 rpm) auf pH 4,85 gebracht. Jede Fällung blieb 12 Stunden bei + 4° stehen. Die Niederschläge wurden in 2 ml Veronalpuffer pH 7,3 suspendiert, das Ungelöste durch Zentrifugieren entfernt. Im Vergleich zu den in gleicher Weise aufgearbeiteten Thrombozytenextrakten waren die Niederschläge der Hirnextrakte viel schlechter löslich. Am besten bewährten sich leicht alkalische Lösungsmittel (m/20 Natriumtetraborat, 0,1%iges Ammonkarbonat). Über die Aktivität unterrichtet Tab. 4.

Tab. 4: Säurefraktionierung von Hirnfaktor-4-Rohpräparat

| Material | Gerinnungszeit in Sek. nach 15 Min. Inkubation |
|---------------------------------|---|
| Kontrolle 1 (ohne Heparin) | 17" |
| Kontrolle 2 (mit Heparin) | 80" |
| Ausgangslösung pH 6,5 | 33" |
| Niederschlag bei pH 5,5 | 84" |
| Überstehende Lösung bei pH 5,5 | 29" |
| Niederschlag bei pH 4,85 | 42" |
| Überstehende Lösung bei pH 4,85 | 80" |

5. *Alkoholfraktionierung*: 4 g des Hirnfaktor-4-Rohpräparates wurden in 400 ml dest. Wasser unter Zusatz von 2 ml 10%iger Ammonkarbonatlösung suspendiert und das Unlösliche durch Zentrifugieren entfernt. Diese stark verdünnte Lösung zeigte keine Aktivität. Die Lösung wurde mit Azetatpuffer auf pH 7,2 gebracht, auf 0 Grad abgekühlt und tropfenweise mit 53,3%igem Alkohol bei - 1° versetzt, bis die Konzentration 8% betrug. Die Mischung blieb bei - 1° mehrere Stunden stehen und wurde dann bei derselben Temperatur zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 10 ml 0,05%igem Ammonkarbonat gelöst; die überstehende Lösung wurde mit 53,3%igem Alkohol bei gleichem pH bis zu einer Konzentration von 15% versetzt, wobei die Temperatur allmählich auf - 4° gesenkt wurde. Die Fällung blieb wieder mehrere Stunden bei - 4° stehen und wurde schließlich bei derselben Temperatur zentrifugiert, der Niederschlag wie oben gelöst, die überstehende Lösung mit 96%igem Alkohol auf eine Konzentration von 40% gebracht, wobei die Temperatur auf - 7° gesenkt wurde. Mit dem Niederschlag wurde in gleicher Weise wie oben verfahren. Es zeigte sich, daß die bei 8- und 15%iger Sättigung erhaltenen Niederschläge (Tab. 5) aktiv waren, während der Niederschlag bei 40%iger Sättigung keine Aktivität aufwies. Die Tyrosinkonzentration in der bei 8%iger Sättigung erhaltenen Lösung war bei größerer Aktivität geringer als in der bei 15%iger Sättigung erhaltenen. Es ist daher anzunehmen, daß die Fraktion, die bei 8% ausgefallen war, reiner ist.

T a b . 5 : Alkoholfraktionierung von Hirnfaktor-4-Rohpräparat

| Material | Gerinnungszeit in Sek. | | Tyrosin mg ⁰ / ₀ |
|---|------------------------|-------|---|
| | ohne Inkubation | mit | |
| Kontrolle 1 | 17" | | |
| Kontrolle 2 | 78" | | |
| Ausgangslösung | — | 71" | |
| Fraktion bei 8 ⁰ / ₀ Alkohol gefällt | 21" | 19" | 12 |
| Fraktion bei 18 ⁰ / ₀ Alkohol gefällt | 19" | 18" | 58,5 |
| Fraktion bei 40 ⁰ / ₀ Alkohol gefällt | 42,5" | 35,5" | — |

6. *Fällung mit Ammonsulfat*: Eine bei 15⁰/₀iger Konzentration mit Alkohol erhaltene Fraktion wurde mit Ammonsulfat bis zu einer Konzentration von 50⁰/₀ gesättigt. Nach mehrstündigem Stehen bei + 4° wurde in der Kälte zentrifugiert und der Niederschlag in 1 ml 0,05⁰/₀igem Ammonkarbonat gelöst. Beide Fraktionen (der aufgelöste Niederschlag und die überstehende Lösung) wurden in der Kälte gegen fließendes Wasser dialysiert, das dialysierte Material im Vakuum getrocknet und der Rückstand in je 1 ml 0,05⁰/₀iger Ammonkarbonatlösung gelöst. Die überstehende Lösung erwies sich als aktiv (Tab. 6).

T a b . 6 : Ammonsulfatfraktionierung und Adsorptionsversuch

| Material | Gerinnungszeit in Sek. ohne Inkubation |
|--|---|
| Kontrolle 1 (ohne Heparin) | 17" |
| Kontrolle 2 (mit Heparin) | 55" |
| Ausgangslösung | 57,5" |
| Fraktion mit 15 ⁰ / ₀ Alkohol gefällt | 28" |
| diese mit 50 mg BaSO ₄ adsorbiert | 28" |
| mit 50 mg Al ₂ O ₃ adsorbiert | 31,5" |
| mit 50 mg Kaolin adsorbiert | 30,5" |
| Fällung bei 50 ⁰ / ₀ Ammonsulfat | 45" |
| Überstehende Lösung bei 50 ⁰ / ₀ Ammonsulfat | 25" |

7. Eine *Adsorption* der Faktor-4-Aktivität aus einer mit 15⁰/₀iger Sättigung mit Ammonsulfat erhaltenen Lösung an BaSO₄, Al₂O₃ oder Kaolin gelang nicht (Tab. 6). Durch dreistündiges Zentrifugieren bei 25 000 g und + 2° gelang es, die Aktivität im Sediment etwas anzureichern.

8. *Papierelektrophoretisch* erwiesen sich die Fraktionen nicht als einheitlich, doch gelang bisher noch keine befriedigende Auftrennung, da ein Großteil des Materials an der Auftragungsstelle liegen blieb, und auch sonst die Trennung nur unvollständig war.

Besprechung der Ergebnisse

Es ist möglich, auch in Hirnextrakten eine Antiheparinaktivität nachzuweisen und diese von der Thrombokinas-Aktivität der Extrakte zu trennen. Die Antiheparinaktivität, die in Analogie zu der entsprechenden Aktivität in den Thrombozyten als Hirnfaktor 4 bezeichnet wird, findet sich in wäßrigen Extrakten, nicht aber in solchen, die mit Lipoidlösungsmitteln erhalten werden. Sie ist thermolabil und wird schon bei 50° innerhalb von 30 Min. vollkommen zerstört, ist aber bei — 25° außerordentlich lagerungsstabil, so daß Rohpräparate auch noch nach 2 Jahren voll wirksam waren. Die Aktivität bleibt bei 50%iger Sättigung mit Ammonsulfat in Lösung, wird isoelektrisch zwischen pH 5,1 und 5,5 gefällt und findet sich bei Alkoholfraktionierung in den Fraktionen, die bei 8%iger und bei 15%iger Sättigung ausfallen. Wird nur bei 15%iger Sättigung mit Alkohol gefällt, so enthält diese Fraktion zwar die gesamte Aktivität, ist aber weniger rein, als die bei 8%iger Sättigung erhaltene Fraktion.

Es gelingt nicht, die Aktivität an BaSO₄, Al₂O₃ oder Kaolin zu adsorbieren. Die rohen Hirnextrakte entfalten ihre volle Wirkung nicht sofort, sondern bedürfen einer Inkubationszeit von etwa 15 Min., wobei es gleichgültig ist, ob die Inkubation von Hirnextrakt und Heparinlösung in Gegenwart des defibrierten Plasmas erfolgt oder nicht. Die durch Alkoholfraktionierung erhaltenen Präparate sind jedoch sofort voll wirksam.

Vergleicht man die Eigenschaften der Antiheparinaktivität der Hirnextrakte mit der der Thrombozytenextrakte, so findet man eine sehr weitgehende Übereinstimmung: beide sind thermolabil, aber bei niederen Temperaturen nach Lyophilisierung lagerungsstabil, beide werden durch 50%ige Sättigung mit Ammonsulfat nicht gefällt, fallen aber bei einem pH zwischen 5,5 und 5,1 aus. Die Löslichkeit der teilweise gereinigten Präparate des Hirnfaktor 4 scheint schlechter zu sein als die von Thrombozytenfaktor 4. Es scheint allerdings überhaupt möglich zu sein, daß die Aktivität nicht in echter Lösung vorliegt, sondern in Form einer relativ stabilen Suspension. Dies könnte die Schwierigkeiten bei der papierelektrophoretischen Untersuchung sowie die recht schlecht reproduzierbaren Ergebnisse, die bei Versuchen, die Aktivität zu sedimentieren, erhalten wurden, erklären. Ein Unterschied scheint darin zu bestehen, daß die Thrombozytenaktivität immer ohne Inkubation voll wirksam ist, während die Aktivität der Hirnextrakte erst nach einer Inkubationszeit von 15 Min. voll nachweisbar wird. Nach Alkoholfällung sind aber auch die Hirnpräparate sofort voll wirksam. Ein weiterer Unterschied wurde im Verhalten gegenüber Adsorbentien gefunden. Ob dieser Unterschied wirklich besteht, erscheint jedoch zweifelhaft, weil die Adsorptionsversuche mit Präparaten stark unterschiedlichen Reinheitsgrades durchgeführt wurden.

Zusammenfassung

Auch in wäßrigen Hirnextrakten konnte eine Antiheparinaktivität nachgewiesen werden, die von der Thrombokinas-Aktivität abgetrennt werden kann. Es wird vorgeschlagen, in Analogie zum Thrombozytenfaktor 4 von einer Hirnfaktor-4-Aktivität zu sprechen. Beide zeigen eine weitgehende Übereinstimmung ihrer Eigenschaften bezüglich Thermolabilität, Lagerungsstabilität, Löslichkeit und Fällbarkeit. Die Wirkung der Hirnextrakte bedarf jedoch zu ihrer vollen Entwicklung einer Inkubation, die bei den Thrombozytenextrakten nicht erforderlich ist. Allerdings verschwindet dieser Unterschied nach Alkoholfraktionierung der Hirnextrakte.

Summary

Aqueous extracts of acetone-dehydrated brains display an antiheparin activity which may easily be separated from thromboplastic activity. It is proposed to call this activity "brain factor 4-activity" in analogy to platelet factor 4-activity. Both factors are similar in their properties as to heat and storage stability, solubility and precipitability. The brain extracts are fully active only after a certain time of incubation, where as platelet extracts have full activity at once. This difference disappears, however after alcohol fractionation of brain extracts.

Résumé

Un extrait d'eau du cerveau a une activité antihéparine qui peut être facilement séparée par l'activité thromboplastinique. Analogiquement aux facteurs plaquettaires on peut parler d'un facteur du cerveau à activité 4. Les deux facteurs (plaquettaire et du cerveau) montrent la même stabilité, la même solubilité et la même précipitabilité. Le facteur du cerveau est actif après un temps d'incubation, tandis que le facteur plaquettaire l'est immédiatement. Après séparation par alcool le facteur est actif immédiatement.

Literatur

- Quick, A. J.: On the various properties of thromboplastin (Aqueous tissue extracts). *Amer. J. Physiol.* **114**: 282 (1936).
- Csefko, I., Gerendas, M., Udvardy, M. D. F.: Kinase-Heparin-Antagonism in vitro. *Arch. biol. Hung.* **18**: 186 (1948).
- Deutsch, E.: Der Wirkungsmodus von „Hämostyptikum 733 Schoch“. *Arzneimittelforsch.* **2**: 470 (1952).
- Deutsch, E., Wawersich, E. and Franke, G.: The relation of different platelet factors to brain thromboplastin. 6th International Congress of Hematology, Boston, 1956.
- Deutsch, E.: Über die Thrombokinasbildung und das Verhalten von Thrombozytenfaktor 1 bei Hypoproaccelerininämie (Parahämophilie). *Wien. Z. inn. Med.* **36**: 355 (1955).