

GLEICHGEWICHTSBEDINGUNGEN DES THROMBININAKTIVIERUNGSVERMÖGENS DES BLUTES

VON

M. GERENDÁS und I. CSEFKO

Vom Ung. Biol. Forschungsinstitut, Tihany, und von Institut f. Allgemeine Pathologie
der Universität, Budapest

Mit 3 Abbildungen im Text

(Eingegangen am 31. Mai, 1949)

Bekanntlich verschwindet in frisch genommenem Blute entstehendes Thrombin alsbald aus dem Serum, desgleichen büsst auch Blut, Plasma oder Serum zugesetztes fertiges Thrombin binnen kurzem seine Wirkung ein. Wir haben nachgewiesen, dass diese mit der Zeit progressiv vor sich gehende Inaktivierung des Thrombins wie eine Reaktion I. Ordnung verläuft (1, 2). Die Grösse des nach der Gleichung $k = 1/t \cdot \log. nat. c_0/c$ berechneten Reaktionsgeschwindigkeitsfaktors (3.) fällt im allgemeinen zwischen 0,1 und 1,5, sein Wert ist jedoch auch je nach Herkunft des Blutes sehr verschieden. Bei Tauben beträgt er — wie wir beobachteten — 0,1—0,2, bei Ratten 0,3, beim Rinde 0,2—0,4 beim Kaninchen 0,4—0,6, beim Schwein 0,8—0,7, beim Meerschweinchen 0,8—1,5. Im allgemeinen konnte auch festgestellt werden, dass die Gerinnung umso rascher erfolgt, je geringer die Inaktivierung ist. Der Thrombininaktivierungsfaktor k des Blutes gesunder Menschen bewegt sich um 0,5 in pathologischen Fällen sind indessen sehr erhebliche Abweichungen zu beobachten, so beträgt er z. B. bei Sclerosis multiplex 0,22, (4.) bei Hämophilie 2,2 (5.) Dabei lag die Blutgerinnungszeit der Sclerosis-multiplex-Fälle um etwa 1 Min. herum, die der Hämophiliefälle bei ungefähr 20 Min.

Im Laufe unserer Versuche stellten wir auch fest, dass Heparin die Reaktionsgeschwindigkeit dieses Prozesses erhöht (6.), wogegen die Steigerungswirkung des Heparins und die Thrombininaktivierung durch Kinase überhaupt verhindert werden kann (7.).

Demzufolge führt das Erscheinen von Heparin im Blute zur Steigerung der Inaktivierung und somit zur Verminderung des Gerinnungsvermögens, das Auftreten von Kinase dagegen zur Reduktion der Inaktivierung und dadurch zur Erhöhung des Gerinnungsvermögens.

Da wir unsere bisherigen Versuche lediglich im Zeitpunkte des Zusetzens von Heparin bzw. Kinase durchführten, untersuchten wir in vorliegender Arbeit, auf welche Weise der Entwicklung von in vivo gegebenem Heparin ausgelöste Prozess sich im Laufe der Zeit abspielt, bzw. inwieweit dieser Prozess durch Untersuchung der Inaktivierung verfolgbar ist. Unsere Versuche vervollständigten wir des Vergleiches halber durch eine Untersuchung der Wirkung des dem Serum in vitro zugefügten Heparins bzw. von Kinase.

EXPERIMENTELLER TEIL

Das zu den Versuchen verwendete Heparin war ein Erzeugnis der Firma VITRUM (Stockholm), das Thrombin stammte das HOFFMANN-I. A ROCHE (Basel), als Kinase benützten wir von uns selbst hergestelltes, durch Aceton getrocknetes Kaninchenhirnpulver. Zu den Versuchen gebrauchten wir 1 Tag altes Kaninchenserum, zu den Gerinnungsproben nach dem Verfahren von LAKI (8, 9) hergestellte Fibrinogenlösung. Hinsichtlich der Versuchsmethode verweisen wir auf unsere bereits angeführten Veröffentlichungen (2., 3.).

I. IN-VITRO-VERSUCHE

a. Zunächst stellten wir fest, in welcher Weise das Inaktivierungsvermögen des Kaninchenserums der in-vitro-Untersuchung von der Konzentration des zugesetzten Heparins abhängt. Wir fanden dass der Grundwert der Inaktivierung (heparinloser Wert) $k=0,4$ beträgt. Der Wert des Reaktionsgeschwindigkeitsfaktors nimmt nach Zusatz von Heparin und Steigerung der Heparinkonzentration innerhalb des untersuchten Intervalles exponentiel zu (A b b. 1.).

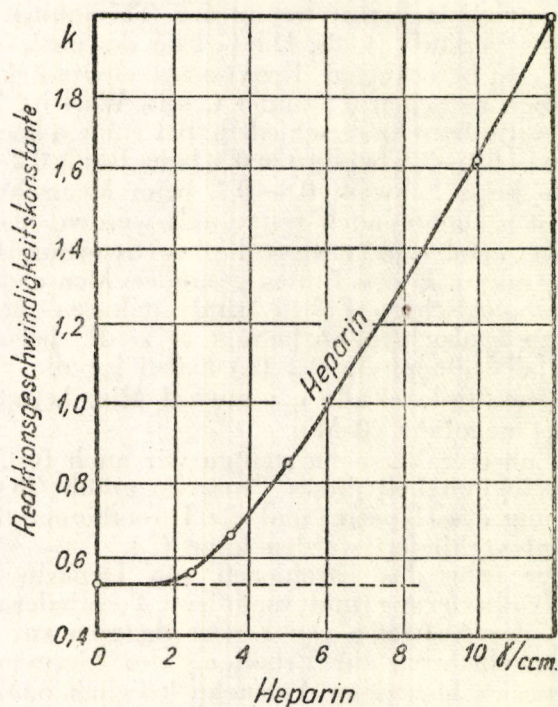


Fig. 1. Die Wirkung von Heparin auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Thrombininaktivierung. In vitro Versuch.

b. Sodann untersuchen wir, wie die inaktivierungssteigernde Wirkung des dem Serum in vitro zugesetzten Heparins sich im Verlaufe der Zeit verändert, d. h. wir bestimmten die Inaktivierung im Momente

der Vermengung von Heparin und Serum, sodann auch nach einer von da ab gerechneten Inkubationszeit von 5, 10, 20, 30 Min. und 1, 2, 4, 8 Stunden.

Aus den in A b b. 2 dargestellten Versuchsergebnissen geht hervor, dass die Inaktivierungsgeschwindigkeit im Augenblicke des Heparinzusatzes plötzlich emporschnellt, um dann anfänglich rascher, späterhin in nur allmählicher Senkung gegen den Ursprungswert hin zurückzukehren (Heparinkurve in A b b. 2.). Eine je grössere Heparinkonzentration wir anwandten, einen desto grösseren Sprung nach oben machte der Wert des Inaktivierungsfaktors, doch kehrte er auch desto rascher gegen den Ausgangswert hin zurück wobei jedoch, die Rückkehr auf den Ursprungswert erst nach Stunden erfolgte.

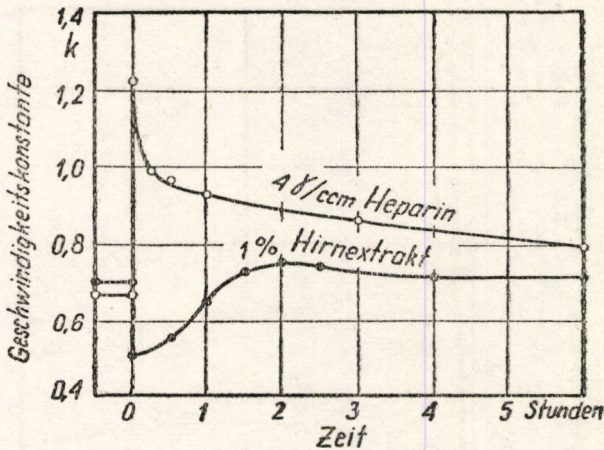


Fig. 2. Die zeitliche Veränderung der Wirkung von Heparin, bzw. Kinase. In vitro Versuch.

Es sei erwähnt dass die auf Heparinwirkung hin erhöhte Inaktivierung — wenn das Serum auch Blutzellen enthielt — rascher, ohne Blutzellen hingegen (reines Serum) langsamer auf den Originalwert zurückkehrte. Daraus kann gefolgert werden, dass die Blutzellen den die Heparinkompensation hervorbringenden Stoff in grösserer Menge enthalten.

c. Den zeitlichen Verlauf des Kinaseeffektes untersuchten wir auf die Weise, dass wir Kaninchenhirnpulver in dest. Wasser suspendierten und es dem Serum zusetzten. Nach dem Hinzufügen der Suspension verminderte sich sofort die Thrombininaktivierungsgeschwindigkeit, um dann allmählich wieder zuzunehmen (A b b. 2.). Der k -Faktor erreichte nach 1 Stunde bereits den Ausgangswert und weiter steigend nach etwa 2 Stunden sein Maximum. Von da ab fiel er wieder allmählich auf den Grundwert zurück.

II. IN-VIVO-VERSUCHE

Bei den in-vivo-Versuchen spritzten wir das Heparin in die Ohrvene der Kaninchen, entnahmen nachher Proben aus dem anderen Ohr und untersuchten deren Thrombininaktivierung. Beim Einspritzen lösten

wir soviel Heparin in 2 ccm dest. Wasser, dass es auf die annähernd berechnete Menge des kreisenden Blutes (1/12 des Körpergewichts) verteilt die gewünschte Konzentration ergab. An den erzielten Ergebnissen (Abb. 3.) lässt sich erkennen, dass die Inaktivierungsgeschwindigkeit — während sie in den in-vitro-Versuchen bei Heparinzusatz sofort hochgeht — bei in-vivo-Gabe erst in etwa 10 Min. ihr Maximum erreicht und dann sofort sehr stark zurückfällt, Bei der geringeren Konzentration (10 γ Heparin/ccm Blut) (Kurve a) sinkt die Inaktivierungsgeschwindigkeit sogar unter die Anfangskonzentration, selbst bei der Konzentration 20 γ /ccm (Kurve b) fällt sie auf den Ausgangswert. Sodann sieht man bei beiden Kurven eine neuere Steigung. Bei der höheren Heparinkon-

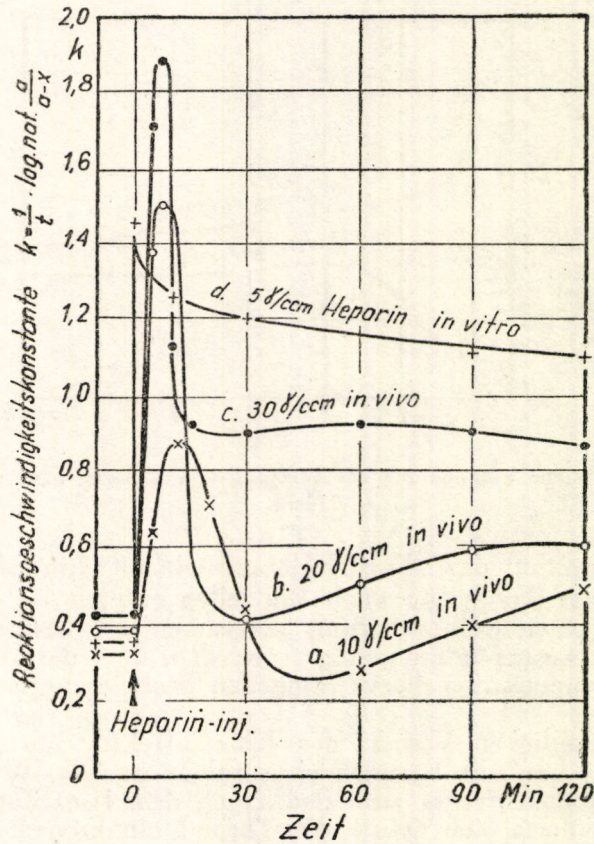


Fig. 3. Die zeitliche Veränderung der Wirkung von Heparin, In vivo Versuch.

zentration (30 γ /ccm) (Kurve c) ist der Spitzenwert Inaktivierung $k=1.9$. Nach dem Sinken kehrt die Inaktivierungskurve nicht bis zum Grundwerte zurück, sondern bleibt verhältnismässig hoch bei $k=0.9$ stehen und beginnt nach einer geringen Erhöhung sich aufs neue dem Ausgangswerte zu nähern.

Bei mehrmaligem Wiederholen der Versuche erhielten wir ähnliche Ergebnisse.

BESPRECHUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE

I. *In-vitro-Versuche*

Auf Grund der im Vorhergehenden besprochenen Versuche lässt sich feststellen, dass die durch Heparin *gesteigerte* Inaktivierung in den *in-vitro*-Versuchen im Laufe der Vermengung von Heparin und Serum fortgehend *abnimmt*, also gegen die *tieferen Gleichgewichtslage* hin verläuft. Infolgedessen ist es möglich festzustellen, dass der auf die Kompensation des Heparins gerichtete Prozess — wenn auch nur in geringem Masse — bereits im abgenommenen Blute selbst in Erscheinung tritt.

Zugleich beweisen unsere mit Kinase durchgeführten *in-vitro*-Versuche, dass die auf Kinasewirkung hin *verminderte* Inaktivierung nach einer gewissen Zeit fortlaufend *zuzunehmen* beginnt. Also rückt die Inaktivierung aus dem reduzierten Zustande der Gleichgewichtslage, in diesem Falle einem *höheren* Inaktivierungswert zu. Beachtenswerterweise erfolgt dies auch *in vitro*, also bereits bei der Untersuchung des vom Organismus separierten Blutes.

II. *In-vivo-Versuche*

Werden die in den *in-vivo*-Versuchen erhaltenen Inaktivierungswerte mit den *in-vitro*-Werten verglichen, so lässt sich in erster Linie feststellen, dass es in den *in-vivo*-Versuchen zur Erzielung des gleichen Inaktivierungsfaktors einer wesentlich stärkeren Heparinkonzentration bedarf als im *in-vitro*-Versuche. So kann im *in-vitro*-Versuche z. B. bei 5 γ /ccm Heparin die gleiche Inaktivierungssteigerung beobachtet werden, wie bei *in vivo* gegebenen 20 γ /ccm. Daraus lässt sich der schluss ziehen, dass der Organismus das in ihm auftretende Heparin auf irgendeine Weise stärker kompensiert und dass infolgedessen Wirkung nicht in vollem Masse zur Geltung zu kommen vermag.

Ein Ergebnis dieses Kompensationseffektes ist es auch, dass die Inaktivierungsstärke in den *in-vivo*-Versuchen plötzlich zurückstürzt, in gewissen Fällen sogar unter den Ausgangswert fällt. Dies bedeutet, dass das Blut gerinnbarer wird als es ursprünglich war, d. h. es kommt eine Überkompensation zustande. Dies kann sich im Tierversuche darin äussern, dass die Gerinnbarkeit des Blutes im Falle einer geringen Heparinabgabe — obgleich sie vorübergehend *abnimmt* — nach einer gewissen Zeit so sehr zunimmt, dass z. B. die eingebundenen Kanülen miteinkoagulieren. Dies ist eine sehr häufige Erscheinung und sie pflegt sich in der Regel 1/2—1 Stunde nach der Heparinabgabe zu melden, also zu dem Zeitpunkte, in dem die Überkompensationsphase an der Inaktivierungskurve wahrgenommen wird. Nunmehr kann die Erscheinung auf Grund der Kurve gut erklärt werden und aus dem erzielten Ergebnis kann die Nutzenanwendung gezogen werden, dass wenn die Heparinwirkung noch über 1/2—1 Stunde hinaus aufrecht erhalten werden soll, eine Heparinkonzentration anzuwenden ist, die die Inaktivierung auch nach erfolgter Kompensation auf einem Niveau erhält, das die Blutgerinnung noch zu verhindern vermag. Des weitern unterstreicht das erhaltene Ergebnis auch klar den Vorteil der Heparininfusion bei der Prophylaxe der Thrombose.

Im Laufe unserer älteren Versuche sahen wir einen ähnlichen, doch gegensätzlichen Kompensationseffekt auf die Wirkung intravenös gegebenem Thrombins hin (10.). Das allmählich eingespritzte Thrombin verursachte anstatt der erwarteten Gerinnungssteigerung oder intravasalen Gerinnungswirkung eine Erhöhung der Thrombininaktivierung und so eine Streckung der Gerinnungszeit. Somit kam auch hier eigentlich eine Überkompensation zustande, nach der die Inaktivierungsgeschwindigkeit sich schliesslich auf dem Ausgangsniveau retablierte. (Natürlich beobachten wir parallel mit dieser Erscheinung-ähnlich JÜRGENS u. STUDER (11.) — auch eine Verminderung des Blutfibrinogengehaltes).

Es kann also festgestellt werden, dass *der Organismus die Gerinnbarkeit des Blutes regelt*. Diese Regelung erfolgt durch die Inaktivierung, die eine Gleichgewichtszustand hervorruft den der Organismus mittels Kompensationsprozesse aufrechterhält. Natürlich bleibt das Blut durch überstarkes Heparin in ungeronnenem Zustande. Durch überstarkes Thrombin aber entsteht intravenöse Gerinnung und das Tier verendet. Wird dagegen nicht extrem hohe (also aphysiologische) Konzentrationen angewendet und die Blutgerinnung durch intravenöses Heparin verhindert oder soll dieselbe durch intravenöses Thrombin gesteigert werden, so ist in beiden Fällen eine Kompensation zu beobachten. Dies ist das Ergebnis der im Organismus vor sich gehenden, das Gleichgewicht aufrecht erhaltenden Abwehrprozesse, in deren Verlauf auch eine sehr erhebliche Überkompensation zustandezukommen vermag.

Es kann noch festgestellt werden, dass *das Gleichgewicht, also das Streben nach Zustandebringen eines normalen Inaktivierungsspiegels sich im Blute sowohl in vivo wie in vitro gleicherweise äussert. Dass Thrombininaktivierungsvermögen des Blutes stellt sich in jedem einzelnen Falle auf normales Niveau ein, gleichviel ob es im Laufe der Versuche in Richtung der gesteigerten oder verminderten Inaktivierung verschoben wird.*

Erwänt sei noch, dass wir unsere Versuche auch an Tieren durchführten, die einen extrem geringen (Taube $k=0,15$) oder extrem hohen (Meerschweinchen $k=1,2$) Inaktivierungswert aufweisen. Auch in diesen Fällen kehrte die durch Heparin gesteigerte bzw., Kinase verminderte Inaktivierung stets auf das für die betreffende Tiergattung charakterische Niveau zurück. Für diese Tiere bedeutet also dieser niedrige, bzw. hohe k -Wert das Gleichgewichtsniveau und ihr Organismus ist bestrebt, durch Kompensationsprozesse das für sie physiologische Niveau aufrecht zu erhalten, gleichviel ob dasselbe tief oder hoch liegt.

Demgegenüber bezweifeln wir auf Grund unserer Versuche nicht, dass beim Menschen in pathologischen Fällen gefundene, extreme Inaktivierungswerte auf Störungen dieses Gleichgewichtssystems zurückzuführen sind und diese Feststellung bezeichnet zugleich die weitere Richtung unserer Versuche.

LITERATUR

1. GERENDÁS M.: Inactivation of Thrombin. *Nature*, 157. (1946) 837.
2. GERENDÁS M.: Inactivation and Stabilisation of Thrombin. *Hung. Acta Physiol.* 1. (1948) 97.
3. GERENDÁS M.: Experimentelle Bestimmung des Thrombininaktivierungsprozesses. *Ann. Inst. Biol. Pervest. Hung.* 1. (1949—50). 169.
4. BÖSZÖRMÉNYI Z. und I. CSEFKÓ: Thrombininaktivierungserscheinung bei Sclerosis-Multiplex-Kranken. *Orvosi Hetilap*, 89. (1948) 529. (Ungarisch).
5. LÁNCOS F., E. TOMORY und M. GERENDÁS: Increased Thrombininactivation in a Case of Sporadic Haemophilia. *Pediatria Danubiana*, 3. (1948) N° 6.
6. GERENDÁS M., A. L. PÁLOS und I. CSEFKÓ: Heparin Effect and Thrombin Inactivation. *Ann. Inst. Biol. Pervest. Hung.* 1. (1949—50). 190.
7. HORN Z., M. GERENDÁS und L. BORSODY: Die Wirkung des Toluidinblaus und der Kinase auf den Vorgang der Thrombininaktivierung. *Experientia*, 4. (1948) 402.
8. LAKY K.: Isolierung und Krystallisierung des Fibrinogens aus Schweineblut. *HOPPE-SEYLER'S Zeitschr. f. physiol. Chem.* 273. (1942) 95.
9. LAK K.: Über die Fibrinogen-Fibrinumwandlung. *Studies from the Inst. Med. Chem. Univ. Szeged.* 2. (1942) 27.
10. GERENDÁS M. und A. CSAPÓ: Intravenöse Thrombinwirkung. *Arch. Biol. Hung.* 18. (1948) 181.
11. JÜRGENS R. und A. STUDER: Zur Wirkung des Thrombins. *Helv. physiol. Acta*, 6. (1948) 130.

УСЛОВИЯ РАВНОВЕСИЯ СПОСОБНОСТИ КРОВИ ИНАКТИВИЗИРОВАТЬ ТРОМБИН

Автор: МИХАЛЬ ГЕРЕНДАШ

РЕЗЮМЕ

1. Скорость инактивизирования тромбина увеличивается „in vitro“ посредством гепарина прибавленного сыворотке, а если оба вместе действуют, тогда скорость постепенно падает на исходную величину.

2. Через действие киназы прибавленной сыворотке „in vitro“ инактивизирование тромбина уменьшается и постепенно возвращается к нормальной величине.

3. Внутривенозный гепарин производит быстрый подъем инактивизирования, которому также следует быстрая и сильная компенсация, по действию которой скорость инактивизирования может и снижаться ниже исходной величины, т. е. имеется возможность возникновения перекомпенсации.

4. На основании наших опытов установлено, что способность крови инактивизирования тромбин, повышенная гепарином, или пониженная киназой, в опытах так in vivo как и „in vitro“, вследствие компенсационных процессов, по истечению определенного времени снова возвращается к нормальной величине.