HAEMOPHYLBLUTGERINNUNG UND PLASMAKININ.

MIHÁLY GERENDÁS und LÁSZLÓ LÓRÁND.

Ungarisches Biologisches Forschungsinstitut, Tihany am Balaton
und
Biochemisches Institut, Universität Budapest.

(Mit einer Abbildung im Text.)

(Eingegangen am 1. September 1946.)

Die Erscheinung der Haemophylie wurde bis in unsere Zeit auf sehr verschiedene Weise erklärt. Im allgemeinen stehen die Auffassungen in schröffem Gegensatz zueinander, die meisten aber glauben die Thrombocyten für die Verspätung der Gerinnung verantwortlich machen zu dürfen. Nach dieser Auffassung soll eine Erhöhung der Resistenz auftreten, wodurch die Abgabe der Thrombokinase eine Störung erfährt.

Vor kurzem gelang es L a k i in der Phase I. der Blutgerinnung das Auftreten eines kinaseähnlichen Stoffes (Plasmakinin) und damit zusammenhängend die autokatalytische Bildung des Thrombins nachzuweisen. (Laki 1943.) Nach L a k i werden die Thrombinbildung, bzw. die Blutgerinnung durch die Thrombokinase lediglich in Gang gesetzt, für die autokatalytische Thrombinbildung ist dagegen das kinaseähnliche Plasmakinin verantwortlich, das gleichzeitig mit der Thrombinbildung entsteht oder aktiviert wird. Nach Untersuchungen von L a k i wurde weiterhin festgestellt, dass die Verzögerung der Gerinnung des Haemophylblutes auf den Wegfall der autokatalytischen Thrombinbildung zurückzuführen sei (Laki, 1944), allein die Frage blieb offen, ob unter dem Plasmakininmangel ein Fehlen der Prokinase, oder des aktivierenden Faktors zu verstehen sei.

Um dieses Problem zu entscheiden, haben wir die nachstehende Versuche ausgeführt.

Das Prinzip des Plasmakinasenachweises ist folgendes. Die Wirkung des aus dem Gerinnsel gewonnenen Pressaftes wird auf unrecalzinierten, bzw. recalzinierten Plasmen festgestellt. In ersten Falle kann

nur in dem Pressaft anwesendes Thrombin, im zweiten auch nebst Thrombin entstehende Kinase zur Geltung gelangen.

Bildung der Plasmakinase im Blute.

Versuchsanordnung:

0,5 ccm Rinderoxalatplasma
0,5 „ 0,9% NaCl-Lösung
0,5 „ m/40 $CaCl_2$-Lösung .....1.)
Gerinnungszeit cca 1 Min.

Die Aktivität des aus dem Gerinnsel gewonnenen Pressaftes wurde nach verschiedenen Incubationszeiten in folgenden beiden Testen festgestellt:

1.) Recalzinierter Test

0,2 ccm Oxalatplasma
0,15 „ 0,9% NaCl-Lösung
0,05 „ 1% $CaCl_2$-Lösung
0,1 „ Pressaft aus 1.) .....2.)

2.) Oxalat-Test:

0,2 ccm Oxalatplasma
0,2 „ 0,9% NaCl-Lösung
0,1 „ Pressaft aus 1.) .....3.)

Die aus den Gerinnungszeiten berechneten Aktivitätswerten sind in Abb 1. dargestellt. (Unter der Einheit der Aktivität wird diejenige Wirkungskraft verstanden, welche die Gerinnung des zu dem Test verwandten Plasma in 1 Minute bei einer Zimmertemperatur von 20° C hervorruft.)

Wie aus der Abb. 1. ersichtlich gibt der Oxalat-Test (Kurve 1.) niedrigere Werte als der recalzinierte Test, (Kurve 2.), da in ersterem nur das Thrombin, in letzterem aber auch die vorhandende Kinase ihre Wirkung ausübt. Die Differenz der beiden Kurven (Kurve 3.) ergibt also die Plasmakinasewirkung.

Untersuchungen mit Haemophylblut.

Um zu entscheiden, ob die Verspätung der Gerinnnug des Haemophylblutes auf den Mangel an Prokinase zurückzuführen sei, wurden folgenden Versuche angestellt:

Zunächst untersuchten wir die Wirkung des Thrombins auf Nor-

mal-, bzw .Haemophylblut, sodann die Wirkung der Recalzinierung auf beide Blutarten.

Gerinnung mit Thrombin.

0,1 ccm Normal Oxalatblut (Mensch)
0,2 „ 0,9% NaCl-Lösung
0,1 „ Thrombinlösung . . . . 4.)
Gerinnungszeit: 34 Sek.

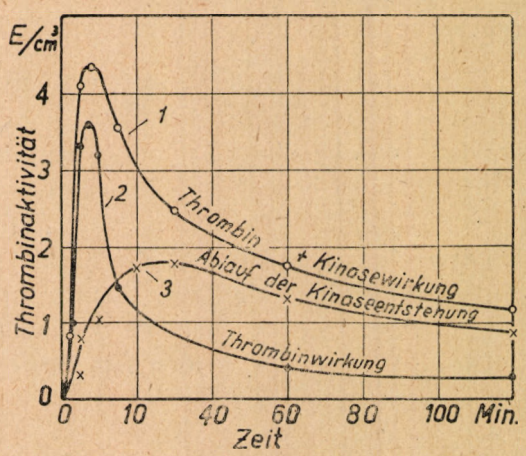
0,1 ccm Haemophyl Oxalatblut
0,2 „ 0,9% NaCl-Lösung
0,1 „ Thrombinlösung . . . . 5.)
Gerinnungszeit: 30 Sek.

Ergebnis: Mit Thrombin gerinnt Haemophylblut in gleicher weise wie Normalblut.

Gerinnungszeit mit Recalzinierung:

0,1 ccm Normal Oxalatblut (Mensch)
0,2 „ 0,9% NaCl-Lösung
0,1 „ m/40 $CaCl_2$-Lösung . . 6.)
Gerinnungszeit: 4 Min. 10 Sek.

0,1 ccm Haemophyl Oxalatblut
0,2 „ 0,9% NaCl-Lösung
0,1 „ m/40 $CaCl_2$-Lösung . . 7.)
Gerinnungszeit: 20 Min.



Ergebnis: Recalziniertes Haemophylblut gerinnt wesentlich schlechter als Normalblut.

Angenommen, dass die Gerinnungszeit des recalzinierten Blutes aus dem Grunde eine Verlängerung erfährt, weil zufolge Plasmakinin-

mangels die autokatalytische Thrombinbildung in Wegfall kommt, versuchten wir ob im Haemophylblut die Plasmakinase nachzuweisen wäre.

In parallellen Versuchsserien ist es möglich, die an Normal-, bzw. Haemophylblut erzielten Ergebnisse miteinander zu vergleichen.

0,5 ccm Normal Oxalatblut	0,5 ccm Haemophyl Oxalatblut
0,2 „ Thrombin cca 3 E/ccm 8.)	0,2 „ Thrombin cca 3 E/ccm 9.)
Gerinnungszeit: 20 Sek.	Gerinnungszeit: 20 Sek.

5. Min. nach Gerinnung wurde das Gerinnsel zerquetscht und ausgepresst.

a) Ohne Recalzinierung.

0,1 ccm Normal Oxalatblut	0,1 ccm Haemophyl Oxalatblut
0,2 „ 0,9% NaCl-Lösung	0,2 „ 0,9% NaCl-Lösung
0,1 „ Pressaft 8.) . . . . . 10.)	0,1 „ Pressaft 9.) . . . . . 11.)
Gerinnungszeit: 16 Min.	Gerinnungszeit 17 Min.

b) Recalziniert.

0,4 ccm Pressaft 8.)	0,4 ccm Pressaft 9.)
0,4 „ m/40 $CaCl_2$ . . . . . 12.)	0,4 „ m/40 $CaCl_2$ . . . . . 13.)

1 Min nach Recalzinierung wurde je eine Probe entnommen und die Wirkung auf recalziniertes Oxalatblut festgestellt:

0,1 ccm Normal Oxalatblut	0,1 ccm Normal Oxalatblut
0,1 „ 0,9% NaCl-Lösung	0,1 „ 0,9% NaCl-Lösung
0,1 „ m/40 $CaCl_2$	0,1 „ m/40 $CaCl_2$
0,1 „ recalz. Pressaft 12.) . 14.)	0,1 „ recalz. Pressaft 13 . . 15.)
Gerinnungszeit: 35 Sek.	Gerinnungszeit: 28 Sek.

Die Gerinnungswirkungen der Pressäfte beider Proben waren fast gleichen. Dies ist nur dann verständlich, wenn auch im Haemophylblut Kinase sich bildet.

Um die Möglichkeit einer Gerinnung durch Recalzinierung völlig auszuschalten, war es notwendig, die Wirkung der Pressäfte auch auf Haemophylblut zu untersuchen, indem recalziniertes Haemophylblut bestenfalls erst in 20 Min. zu gerinnen vermag. (S. Versuch 6.)

0,1 ccm Haemophylblut	0,1 ccm Haemophylblut
0,1 „ m/40 $CaCl_2$	0,1 „ 0,9% NaCl-Lösung
0,1 „ 0,9% NaCl-Lösung	0,1 „ m/40 $CaCl_2$
0,1 „ recalz. Pressaft 12.) . 16.)	0,1 „ recalz. Pressaft 13.) . 17.)
Gerinnungszeit: 30 Sek.	Gerinnungszeit: 30 Sek.

Die gleichen Gerinnungszeiten der Versuche 14, 15, 16, u. 17 beweisen, dass die in Normalblut nachgewiesene Proplasmakinase auch im Haemophylblut vorhanden ist, die durch das in den Test eingetragene fertige normale Thrombin aktiviert wurde. Dies bedeutet aber, dass die unregelmässige Gerinnung des Haemophylblutes nicht auf einem Proplasmakinasemangel beruht, sondern dass die Proplasmakinase im Haemophylblut zu Plasmakinase nicht aktiviert wird.

Die Rolle des Thrombins in der Aktivierung der Proplasmakinase.

Nach obigen Versuchen verfügt auch das Haemophylblut über Proplasmakinase. Trotzdem gerinnt das native Haemophylblut unregelmässig. Mann könnte also daran denken, dass das Thrombin des Haemophylblutes nicht imstande ist Proplasmakinase zu Plasmakinase zu aktivieren. Um diese Frage zu lösen, haben wir aus Haemophylblut durch Recalzinierung eine native Thrombinlösung hergestellt.

Mit dem so gewonnenen Pressaft als Thrombinlösung liessen wir Oxalatblut gerinnen um die Versuche 8.) u. 9.) zu reproduzieren.

0,4 ccm Norm. Oxalatblut	0,4 ccm Haemophyl Oxalatblut
0,2 „ 0,9% NaCl-Lösung	0,2 „ 0,9% NaCl-Lösung
0,4 „ m/40 $CaCl_2$ . . . . . 18.)	0,4 „ m/40 $CaCl_2$ . . . . . 19.)
Gerinnungszeit: 3 Min. 20 Sek.	Gerinnungszeit: 16 Min.

Beide Gerinnsel wurden nach 25 Min. zerquetscht. Die Pressäfte wurden als native Thrombinlösung verwendet, uzw. Normalblut mit Normal-Pressaft und Haemophylblut mit Haemophyl-Pressaft.

0,6 ccm Norm. Oxalatblut	0,6 ccm Haemophyl Oxalatblut
0,3 „ Pressaft 18.) . . . . . 20.)	0,3 „ Pressaft 19.) . . . . . 21.)
Gerinnungszeit: 2 Min. 40 Sec.	Gerinnungszeit: 3 Min. 20 Sec.

Die Gerinnung kann — wenigstens im Haemophylblut — nicht auf Recalzinierung zurückgeführt werden, weil das recalzinierte Haemophylblut — wie aus Versuch 19.) ersichtlich — erst nach 16 Min. gerinnt. Da im Versuch 19.) zweks Gerinnung kein fertiges Thrombin zugefügt wurde, so ist es klar, dass die in Versuch 21.) eingetretene Gerinnung ausschliesslich auf die Wirkung des während des Versuches entstandenen Haemophyl-Thrombins zurückzuführen ist.

Die nahezu gleichen Gerinnungszeiten in den Versuchen 20.) u.

21.) zeigen, dass in beiden Fällen in den Versuchen 18.) u. 19.) nahezu gleiche Thrombinmengen gebildet wurden.

Aus den Versuchen geht hervor, dass Haemophyl-Thrombin an Haemophylblut fast so schnell die Gerinnung bewirken könne, wie aus Normalblut entstandenes Thrombin an Normalblut. Es frägt sich nur, ob aus Haemophylblut auf die Wirkung des Thrombins hin Plasmakinase entstanden ist. Um dies zu entscheiden, übertrugen wir den Gerinnungswirkstoff des Gerinnsels auf neue Blutproben *a)* unrecalziniert, *b)* recalziniert.

Um die Gerinnungswirkung der Recalzinierung auszuschalten, werwandten wir hier Haemophylblut, wie in den Versuchen 16.) u. 17.)

a) Ohne Recalzinierung (Nur Thrombinwirkung).

Normalblut.	Haemophylblut.
0,1 ccm Normalblut	0,1 ccm Haemophylblut
0,2 „ 0,9% NaCl-Lösung	0,2 „ 0,9% NaCl-Lösung
0,1 „ Pressaft 20.) . . . . . 22.)	0,1 „ Pressaft 21.) . . . . . 23.)
Gerinnungszeit: 18 Min.	Gerinnungszeit: 16 Min.

Recalziniert:

0,2 ccm 20.) Pressaft	0,2 ccm 21.) Pressaft
0,2 „ m/40 $CaCl_2$ . . . . . 25.)	0,2 „ m/40 $CaCl_2$ . . . . . 24.)

b) 1 Min. nach Recalzinierung (Plasmakininwirkung).

0,1 ccm Haemophylblut	0,1 ccm Haemophylblut
0,1 „ 0,9% NaCl-Lösung	0,1 „ 0,9% NaCl-Lösung
0,2 „ recalz. Pressaft . . . 26.)	0,1 „ recalz. Pressaft . . . 27.)
Gerinnungszeit: 20 Sek.	Gerinnungszeit: 22 Min.

Die grossen Unterschiede in der Gerinnungszeiten zwischen 26.) u. 27.) beweisen, dass bei der Gerinnung mit Haemophyl-Thrombin keine Kinase entstanden ist, da in diesem Falle nach Recalzinierung — dem Kontrollversuche (26.)) ähnlich — eine wesentlich schnellere Gerinnung hätte eintreten müssen.

Während also auf die Wirkung des Normalblut-Thrombins oder auf die Wirkung einer seiner Faktoren die Kinasebildung vor sich gehen

kann, vermag dieser Prozess auf die Wirkung des Haemophylblut-Thrombins im Haemophylblut nicht einzutreten.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sprechen dafür, dass im Haemophylblut die Proplasmakinase vorhanden sei, dass aber der aktivierende Faktor darin fehle.

LITERATUR.

K. LAKI: Studies. from. the Inst. of Med. Chem. Univ. Szeged. **3**, (1943). 5.
K. LAKI: Schweiz. Med. Wschr. 74, (1944). 13.