

Über die Aktivitätssteigerung der Thrombokinese in Blutgefäßwänden durch Hyaluronidase

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen (Direktor: Prof. Dr. N. Hemming)

Siegfried Witte und Dietrich Bressel

In früheren Arbeiten (20, 21) fanden wir, daß die Blutgefäße eine erhebliche Thrombokineseaktivität besitzen. In wäßrigen Gewebsextrakten aus menschlichen Arterienrohren war die Aktivität im Durchschnitt höher als in Gefäßwandpräparaten aus Venen. Verglichen mit den besten Gewebsthrombokinasen aus Lunge oder Gehirn betrug die Gefäßwandkinase-Aktivität im Durchschnitt ca. 20%, wobei die aktivsten Gefäßpräparate 40 bis 80% Thrombokineseaktivität erreichten. Ähnliche Befunde wurden auch von A s t r u p (2) erhoben.

Nach diesen Ergebnissen kann das Blut bei Gefäßverletzungen schon in der Gefäßwand mit einer aktiven Gewebsthrombokinese in Kontakt kommen. Da bereits eine Läsion des Gefäßendothels allein den geschilderten Kontakt zu ermöglichen scheint, ergeben sich aus diesem vermuteten Mechanismus der Gerinnungsauslösung neue Aspekte für die Entstehung muraler Thromben und der damit in Verbindung stehenden Probleme der Arteriosklerosepathogenese.

In den Blutgefäßen als Organen des Bindegewebes kommen neben Eiweißkörpern saure Mucopolysaccharide vor (3, 5, 11, 12). Besonders Chondroitinschwefelsäure wurde in den Wänden von Arterien, Arteriolen und Venen nachgewiesen. Die Chondroitinschwefelsäure ist als „Kittsubstanz“ ein wichtiger Bestandteil des strukturierten mesodermalen Gewebes. Zusammen mit Hyaluronsäure, die allerdings in Blutgefäßen nicht nachgewiesen wurde, und dem beide Mucopolysaccharide angreifenden Ferment Hyaluronidase spielt sie eine wichtige Rolle bei den Stütz- und Transportfunktionen der mesodermalen Gewebe. So ist das System Hyaluronsäure — Hyaluronidase an Diffusions- und Permeabilitätsvorgängen im Bindegewebe beteiligt.

Um die Frage nach der Bedeutung der nachgewiesenen Thrombokineseaktivität der Blutgefäße weiter zu klären, erschien es von Interesse, mögliche Beziehungen zwischen der Thrombokineseeigenschaft und dem Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System in der Blutgefäßwand zu untersuchen.

Methodik

Aus blutleer gewaschenen, autoptisch gewonnenen menschlichen Blutgefäßabschnitten (Aorta, Vena iliaca communis) wurden durch Extraktion mit physiologischer Kochsalzlösung Gewebsthrombokinese-Präparate nach dem Vorgehen von D a m und G l a v i n d (8) hergestellt und

bei -20°C aufbewahrt. Als Maß der Thrombokinaseaktivität diente die Bestimmung der Prothrombinzeit nach Quick, wobei ein Teil der ca. 20%igen Suspension des Gefäßpräparates mit gleichen Teilen eines menschlichen Oxalatplasmas und $m/40$ CaCl_2 -Lösung versetzt wurde. Das Oxalatplasma vom Blut einer gesunden Versuchsperson war in kleinen Einzelportionen bei -20°C vorrätig. Es ergab mit einer optimal aktiven Lungenthrombokinase eine Prothrombinzeit von 14 Sek. Die Einzelheiten der Methodik wurden früher beschrieben (21).

Zur Prüfung der Hyaluronidasewirkung wurden 150 I.E. eines im Handel befindlichen Hyaluronidasepräparates (Kinetin-Schering, Luronase-Bayer) in 2 ml der frisch aufgetauten Gefäßthrombokinase gelöst und ebenso wie eine gleiche Menge ohne Fermentzusatz belassener Thrombokinasesuspension bei 37°C inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen erfolgte dann in beiden Ansätzen die Prüfung auf Thrombokinaseaktivität. Die angegebenen Gerinnungszeiten sind jeweils Mittelwerte von mindestens 2 Parallelbestimmungen.

Ergebnisse

In Abb. 1 sind die Meßergebnisse an 18 Thrombokinasepräparaten aus Aorta dargestellt. Man sieht, daß die meisten Präparate eine relativ kurze Gerinnungszeit ergeben. Die Thrombokinaseaktivität ist relativ hoch und ändert sich während der Beobachtungszeit von 90 Min. nach Auftauen der Präparate nicht sicher. Unter Zusatz von Hyaluronidase ergeben sich meist nur geringe oder ungerichtete Abweichungen im Vergleich zu denselben Präparaten ohne Fermentzusatz. An diesem Verhalten ändert sich während der Inkubationszeit von 90 Min. nichts.

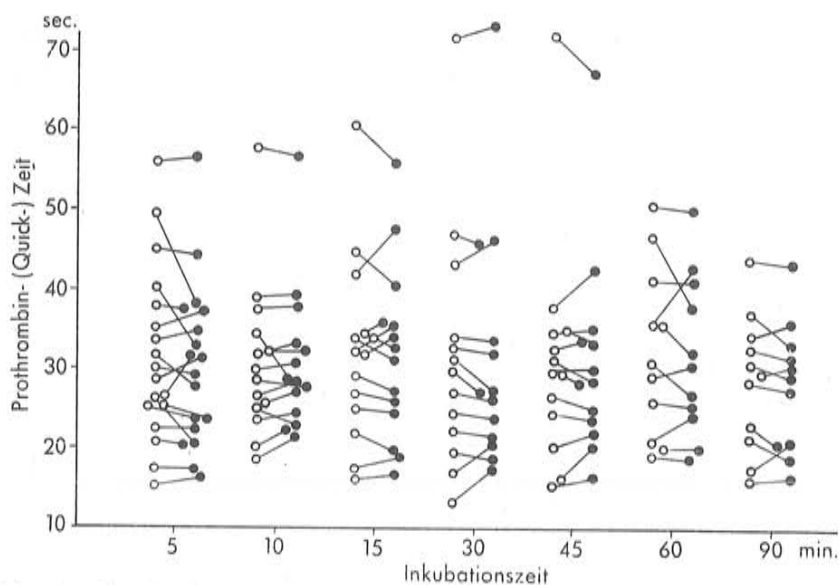


Abb. 1: Die Thrombokinaseaktivität von Aortenpräparaten (gemessen als Prothrombinzeiten eines Normalplasmas). Offene Kreise = ohne Hyaluronidasezusatz; geschlossene Kreise = bei Inkubation mit Hyaluronidase.

Abbildung 2 gibt die Befunde von 19 Thrombokinasepräparaten aus Venenwand wieder. Zum Unterschied von den Arterienkinasen schwankt hier die Aktivität von Präparat zu Präparat stärker. Auch ist sie meist geringer als bei den Arterienkinasen. Ferner macht sich eine gewisse Alterung der Präparate nach dem Auftauen bemerkbar, so daß einige Chargen nach 1- bis 2stündigem Stehen bei 37° C verlängerte Prothrombinzeiten ergaben. Unter Einwirkung von Hyaluronidase zeigt sich anscheinend eine Tendenz zu einer Verkürzung der Prothrombinzeiten, das heißt zu einer Aktivitätssteigerung der Gefäßthrombokinase.

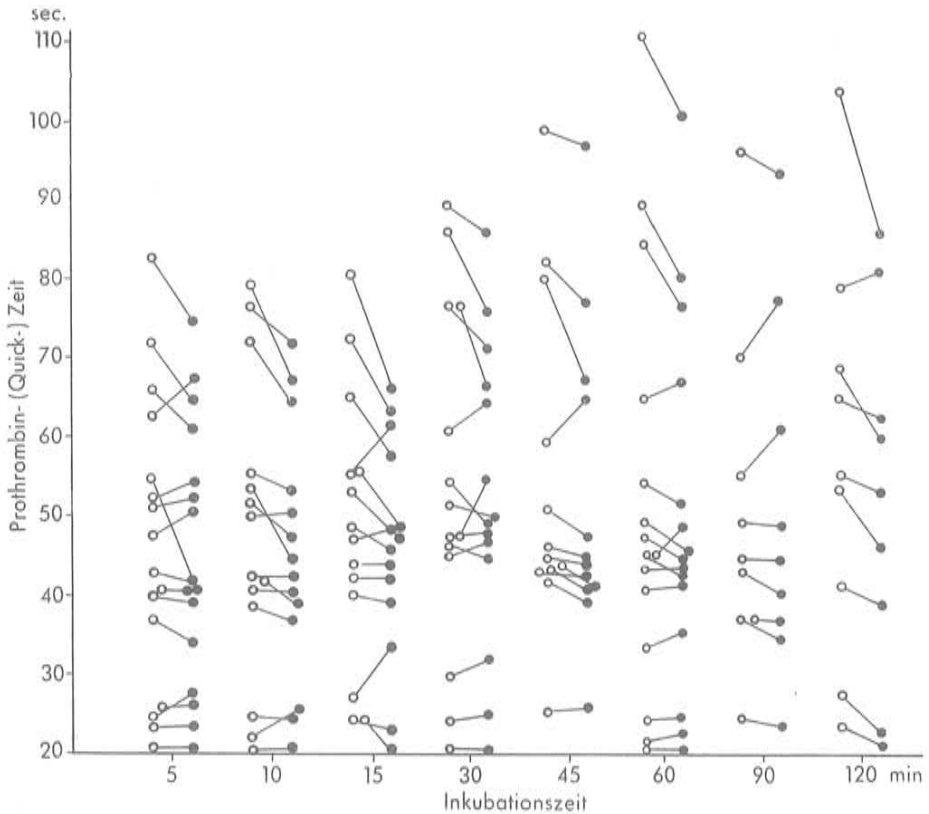


Abb. 2: Die Thrombokinaseaktivität von Venenpräparaten (gemessen als Prothrombinzeiten eines Normalplasmas). Offene Kreise = ohne Hyaluronidase; geschlossene Kreise = bei Inkubation mit Hyaluronidase.

Die Einzelbefunde zusammenfassend, sind in Tabelle 1 die Mittelwerte der Venen- und Aortenpräparate zu den verschiedenen Inkubationszeiten errechnet. Auch hierbei ergibt sich, daß die Thrombokinaseaktivität in der Aorta während der Beobachtung konstant ist und durch Hyaluronidase nicht beeinflusst wird. Die vergleichsweise geringere Thrombokinaseaktivität der Venen wird durch

Inkubation mit Hyaluronidase gesteigert. Die im Verlauf der Beobachtungszeit einsetzende Aktivitätszunahme der unbehandelten Venenkinasen verläuft unter Hyaluronidase deutlich verzögert. Daraus ergibt sich eine mit zunehmender Inkubationszeit größer werdende Differenz der Prothrombinzeiten mit unbehandelten und Hyaluronidase-behandelten Venenkinasepräparaten.

Inkubationszeit Min.	5	10	15	30	45	60	90	120
Aorta ohne Hyaluronidase	30,5	31,0	34,0	31,9	31,0	32,0	28,0	
Aorta mit Hyaluronidase	31,6	30,9	32,3	31,9	31,3	32,6	28,8	
Differenz	+ 1,1	- 0,1	- 1,7	± 0	+ 0,3	+ 0,6	± 0	
Vene ohne Hyaluronidase	46,6	48,0	48,6	51,0	55,2	51,1	60,0	66,9
Vene mit Hyaluronidase	45,1	45,1	45,5	50,8	53,0	49,8	51,3	59,9
Differenz	- 1,5	- 2,9	- 3,1	- 0,2	- 2,2	- 1,3	- 8,7	- 7,0

Tab. 1: Die Durchschnittswerte der Prothrombinzeiten (in Sek.) von 18 Aorten- und 19 Venenthrombokinase ohne und mit Inkubation mit Hyaluronidase.

Um die Ergebnisse statistisch zu prüfen, faßten wir die Meßwerte in 2 Gruppen zusammen und verglichen die während 5 bis 30 Min. und 45 bis 120 Min. Inkubationszeit gefundenen Mittelwerte. Wir rechneten jeweils die Differenz zwischen den Prothrombinzeiten ohne und mit Hyaluronidasezusatz in Prozent um (Tabelle 2). Die Venenpräparate ergaben 5 bis 30 Min. nach dem Auftauen ohne Zusatz durchschnittliche Prothrombinzeiten von 48 Sek. Setzt man diese Prothrombinzeiten = 100%, so erwiesen sich die unter Zusatz von Hyaluronidase gemessenen Prothrombinzeiten im Durchschnitt um 2,0% vermindert. Dieser Wert liegt innerhalb der Streuung der Untersuchungsserie. 45 bis 120 Min. nach Auftauen betragen die Gerinnungszeiten ohne Hyaluronidase im Durchschnitt 56,27 Sek., unter der Einwirkung des Fermentes 53,45 Sek. Die durchschnittliche prozentuale Verkürzung der Gerinnungszeiten lag bei 3,3%. Bei einer Standardabweichung des Mittelwertes von $\sigma_m = 1,315$ ist diese Differenz statistisch zu sichern. Unter Einwirkung von Hyaluronidase steigt also die Thrombokinaseaktivität von Venenwandpräparaten signifikant an.

Ansatz	m (Sek.)	%	Differenz		P
			σ_m	t	
5 bis 30 Min.					
Inkubation ohne Hyaluronidase	48,01				
Inkubation mit Hyaluronidase	45,58	- 2,0	2,051	0,97	
45 bis 120 Min.					
Inkubation ohne Hyaluronidase	56,27				
Inkubation mit Hyaluronidase	53,25	- 3,3	1,315	2,703	0,01—0,02

Tab. 2: Statistische Prüfung der Befunde an Venenpräparaten. m = Mittelwert der Prothrombinzeiten, Mittelwert und mittlere Abweichung der Differenz beider Versuchsansätze, t-Verteilung und Wahrscheinlichkeit P.

Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen nahmen ihren Ausgang von dem Nachweis einer deutlichen Thrombokinaseaktivität in den Blutgefäßwänden sowie von Beobachtungen über Hyaluronsäure-Hyaluronidase-Einflüsse auf die Thrombokinasefunktion.

Page und Mitarbeiter (1) beschrieben eine thromboplastische Aktivität von Hyaluronat. Nach Fiala und Mitarbeiter (10) sowie Pellegrini und Masoni (15) führt Hyaluronidase durch Einwirkung auf thromboplastische Komponenten zu einer Blutgerinnungshemmung. In gewissem Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von Baserga, de Nicola und Vahi (4), die nach Hyaluronidase *in vitro* und *in vivo* einen gesteigerten Prothrombinverbrauch im Consumptionstest nachwiesen.

In den Blutgefäßwänden kommt als saures Mucopolysaccharid Chondroitinschwefelsäure vor, die aus Glukuronsäure, N-Acetylaminogalaktose und Schwefelsäure aufgebaut ist und im Körper in nativer Form als Makromolekül von hochpolymeren Ketten vorliegt. Besonders enge Beziehungen bestehen zur Basalmembran des Endothels, zu den Kittsubstanzen der elastischen Membranen und zur Gefäßadventitia (18, 19).

An welche Gewebs- oder Zellstrukturen die Thrombokinaseaktivität (7) in der Gefäßwand gebunden ist, läßt sich bisher nicht entscheiden. Wir fanden, daß sowohl in der Adventitia als auch in den übrigen Wandschichten Thrombokinase nachzuweisen ist (21).

Wie kann man sich nun die Steigerung der Thrombokinaseaktivität in der Venenwand durch Hyaluronidase vorstellen? Es ist möglich, daß die Gewebs-thrombokinase zum Teil durch Mucopolysaccharide gebunden oder inaktiviert, maskiert ist, nachdem die Mucopolysaccharide als Anion mit Eiweiß (und Ca^{++}) im Gewebe kolloidchemisch als Trikomplex-Koazervate vorliegen (6). Eine Depolymerisation der Kohlenhydratgruppen könnte die Thrombokinase frei werden lassen. Diese Ansicht wird durch Beobachtungen von Kaliampetos (14) gestützt, der fand, daß es aus Hyaluronidase-infiltrierten thrombokinase-reichen Geweben weniger blutet. Er erklärte diese Erscheinung mit einer Freisetzung von Gewebsthrombokinase durch Hyaluronidase.

Eine zweite Möglichkeit der Wirkung läßt sich in einer Ausschaltung von Thrombokinasehemmstoffen durch Hyaluronidase suchen. Sie ergibt sich aus der Verwandtschaft der hier zur Diskussion stehenden Mucopolysaccharide mit Heparin. So ist von mehreren Autoren eine Heparin-inhibierende Wirkung von Hyaluronidase beschrieben worden (4, 13). Mit dem Vorkommen geringer Mengen von Heparin in den Blutgefäßwänden kann gerechnet werden (5).

In der Aorta ließ sich durch Hyaluronidase die Thrombokinaseaktivität nicht beeinflussen. Das kann mehrere Gründe haben. Entweder lagen in den Aortenpräparaten keine Hyaluronidase-angreifbaren Substanzen vor. Dem widerspricht der Befund von Chondroitinschwefelsäure C in der Aorta, die zum Unterschied von der daneben nachgewiesenen Chondroitin-

schwefelsäure B durch Testes-Hyaluronidase depolymerisiert wird (12). Es kann deshalb vermutet werden, daß in der Aorta die Gewebsthrombokinase nicht an Mucopolysaccharide gebunden vorkommt.

Aus den aufgefundenen Beziehungen zwischen der Gewebsthrombokinase und dem Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System in den Blutgefäßwänden ergeben sich einige pathophysiologische Fragen. Die bisher wichtigste Funktion der Gewebsthrombokinase wurde in der Auslösung der Hämostase bei Gefäßverletzungen gesehen (16). Sie wird nicht von allen Untersuchern für gesichert gehalten (R o s k a m, H u g u e s [17]). Daneben schreibt man der Gewebsthrombokinase eine Mitwirkung bei entzündlichen Fibrinausfällungen in Exsudaten zu (E h r i c h [9]). Bei entzündlichen Prozessen spielt eine Anreicherung von Hyaluronidase eine pathogenetisch wichtige Rolle. Da wir sahen, daß durch sie Gewebsthrombokinase aktiviert werden kann, ergibt sich hier eine Verbindung verschiedener Vorgänge der Entzündungspathologie, die für die Blutgefäße in erster Linie bei der Thromboseentstehung Bedeutung haben dürfte. Die Hyaluronidase kann hier nicht nur Mucopolysaccharide abbauen und damit die Permeabilität steigern, sondern auch Gewebsthrombokinase aktivieren, die wegen der vermehrten Durchlässigkeit in einem größeren Bereich wirksam wird.

Die gefundenen Zusammenhänge lenken so unsere Aufmerksamkeit von einer neuen Seite auf die Pathophysiologie der Blutgerinnung im Körper, über die wir bisher noch recht wenig wissen.

Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß von Hyaluronidase auf die Gewebsthrombokinase in Extrakten von menschlichen Blutgefäßen untersucht. Die lagerungsstabile Thrombokinaseaktivität aus Aorta wird durch Hyaluronidase nicht verändert. Dagegen erfährt die Thrombokinase aus Venenwand, die meist weniger aktiv und lagerungsstabiler ist, durch Inkubation mit Hyaluronidase eine signifikante Aktivitätssteigerung. Daraus ergeben sich Zusammenhänge zwischen Gewebsthrombokinase und dem Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System in der Blutgefäßwand, deren pathophysiologische Bedeutung diskutiert wird.

Summary

The influence of hyaluronidase on tissue thromboplastin obtained by extraction of the wall of blood vessels was investigated. The activity of aortic thromboplastin is not altered by hyaluronidase. On the contrary the labile and less active thromboplastin of the vascular wall of veins is activated by

incubation with hyaluronidase. The authors conclude that a connection exists between tissue thromboplastin and the system hyaluronic acid-hyaluronidase. The pathophysiological importance of this finding is discussed.

Résumé

L'action de la hyaluronidase sur la thrombokinase tissulaire extraite des parois des vaisseaux sanguins est étudiée. L'activité de la thrombokinase de l'aorte, qui est stable, n'est pas modifiée par la hyaluronidase. Par contre la thrombokinase extraite des parois des veines, qui est généralement moins active et plus labile, subit, au cours d'une incubation avec la hyaluronidase, une nette activation. L'auteur conclut à une relation entre la thrombokinase tissulaire et le système acide hyaluronique-hyaluronidase et on discute l'importance pathologique.

Literatur

- (1) Abul-Hay, S. K., Watson, J., Rinehart, J. F. and Page, E. W.: The thromboplastic activity of hyaluronate. *Science* 114: 237 (1951).
- (2) Astrup, T. and Claassen, M.: The fibrinolytic and the thromboplastic activities of the arterial wall. 6. europ. Hämat. Kongr. Kopenhagen 1957.
- (3) Bargmann, W.: Die Morphologie der Kapillaren und des Interstitiums. Kapillaren und Interstitium, S. 3. Georg Thieme, Stuttgart 1955.
- (4) Baserga, A., de Nicola, P. and Vahi, R.: Hyaluronidase and prothrombin consumption. *Experientia* (Basel) 6: 471 (1950).
- (5) Bassiouni, M.: The estimation of heparin and similar substances in human blood and tissues using a combined biological and colorimetric method with paper electrophoretic studies. *J. clin. Path.* 7: 330 (1954).
- (6) Bungenberg de Jong, H. G. and Booiij, H. L.: Biocolloids and their interaction (with special reference to coacervates and related systems). *Protoplasmatologia* I, 2. Springer, Wien 1956.
- (7) Chargaff, E.: Studies on thromboplastic proteins and lipids. *Thrombose und Embolie*, S. 1071. Benno Schwabe & Co., Basel 1955.
- (8) Dam, H. and Glavind, J.: The clotting power of human and mammalian blood in relation to vitamin K. *Acta med. scand.* (Stockh.) 96: 108 (1938).
- (9) Ehrlich, W. E.: Die Entzündung. Hb. allg. Path. 7, 1. Springer, Berlin—Göttingen—Heidelberg 1956.
- (10) Fiala, S., Meranze, D. R. and Roth, K.: The interaction of hyaluronidase with thromboplastic components of blood coagulation. *Science* 115: 600 (1952).
- (11) Gibian, H.: Das Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System. *Erg. Enzymforsch.* 13: 1 (1954).
- (12) Gibian, H.: Der Beitrag des Chemikers zur Struktur- und Funktionsaufklärung der mesenchymalen Grundsubstanz mit besonderer Bezugnahme auf die Hyaluronidase und ihre Substrate. Kapillaren und Interstitium, S. 107. Georg Thieme, Stuttgart 1955.
- (13) Husemann, E. and Pfannenmüller, B.: Vergleich der blutgerinnungshemmenden und hyaluronidasehemmenden Wirkung von Xylan-Schwefelsäureestern und Heparin. *Zschr. Naturforsch.* 106: 143 (1955).

- (14) K a l i a m p e t s o s, G.: Neue Wirkung der Hyaluronidase auf die Gewebsthrombokinase. *Klin. Wschr.* 1956: 438.
- (15) P e l l e g r i n i, P. e M a s o n i, A.: Effetto della ialuronidase sulla permeabilità e fragilità capillare nell'uomo. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 28: 962 (1952).
- (16) Q u i c k, A. J.: On the probable mechanism of intravascular clotting. *Angiology* 7: 419 (1956).
- (17) R o s k a m, J. et H u g u e s, J.: Hémostase spontanée, plaquettes sanguines et parois vasculaires. 1^{er} Sympos. Fondation V. Baldacci. *Omnia med.* Pisa 1955.
- (18) S c h w a r z, W.: Die Zwischensubstanz des Bindegewebes. Kapillaren und Interstitium, S. 29. Georg Thieme, Stuttgart 1955.
- (19) W a s s e r m a n n, F.: The intercellular components of connective tissue: Origin, structure and interrelationship of fibers and ground substance. *Erg. Anat.* 35: 240 (1957).
- (20) W i t t e, S.: Über die Beziehungen zwischen Thromboplastin und Hyaluronidase. 5. europ. Hämat. Kongr. Freiburg i. Br. 1955, S. 615. Springer, Berlin—Göttingen—Heidelberg 1955.
- (21) W i t t e, S. und B r e s s e l, D.: Über die Thrombokinase-Aktivität der Blutgefäße. *Fol. haemat. N. F.* 2: 236 (1958).