Versuche zur chemischen Identifikation und Synthese von Gerinnungsfaktoren

Aus der Internen Klinik der Reichsuniversität Utrecht (Holland) und The Weizmann Institute of Science, Rehovot (Israel)

E. Hecht und D. Shapiro

Einleitung

Unsere gegenwärtigen Auffassungen über den Mechanismus der Blutgerinnung haben das Skelett der klassischen Theorie beibehalten. Die Herkunft der Thrombokinase, die man um die Jahrhundertwende bereits mit den Thrombozyten glaubte in Zusammenhang bringen zu müssen, blieb jedoch bis heute ein umstrittenes Problem. Abgesehen davon, daß die Gerinnung in geeigneten Fällen durch verunreinigenden Gewebesaft bzw. Gewebsthrombokinase eingeleitet werden kann, ist unabhängig von dieser an dem Entstehen einer großen Gerinnungsaktivität in extravasiertem Blut oder Plasma nicht zu zweifeln. Die Bildung derselben wurde in eine der bekannten 1. Phase der Blutgerinnung vorausgehende komplizierte Vorphase verlegt, an der neben Calcium und Kontaktwirkungen eine Reihe mehr oder weniger bekannter Faktoren teilnehmen. Es sind dies F VIII (antihämophiles Globulin, AHG, [Patek-Taylor], AHF [Brinkhous], Thromboplastinogen [Quick], platelet cofactor I [Seegers]), F IX (Christmasfaktor [Biggs], PTC [Aggeler], platelet cofactor II [Seegers]), der Thrombozytenfaktor 3 (T 3, platelet factor 3 [Seegers]), F V (labile Faktor [Quick], Proakzelerin [Owren], Plasma Acceleratorglobulin: Ac. glob. [Seegers]), F VII (stabile Komponent [Stefanini], Prokonvertin [Owren], Co-Thromboplastin [Mann]), F XI (PTA [Rosenthal]), F XII (PTF-D [Aggeler]) und Kollers F X.

Da die Prognose einer chemischen Untersuchung eiweißfreier Komponenten günstiger ist, wurde zunächst der T 3 in der durch Paulssen (22) beschriebenen Form näher studiert. Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, daß der von Seegers und seiner Schule postulierte „platelet factor 3" eine eiweißhaltige Substanz ist, die den eben genannten T 3 als lipoide Komponente zu besitzen scheint. Die charakteristische Aktivität des T 3 innerhalb eines weiten Konzentrationsbereiches gegenüber Hühner- und menschlichem Plasma, die R_F-Werte seiner Ninhydrin-positiven Reaktion bei der papierchromatographischen Untersuchung mit Phenol-Wasser als Laufflüssigkeit, sein Verhalten im Rahmen der später zu besprechenden Sphingosinreaktionen stimmten mit den Eigenschaften

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

des lipoiden Aktivators aus Schweinehirn auffallend überein. Ein prinzipieller Unterschied war hingegen, daß der lipoide Aktivator nicht das Heparin-neutralisierende Vermögen des T 3 zeigte. Das suggerierte trotz des analogen Verhaltens beider Substanzen im Thrombokinasebildungstest nach Biggs und Douglas (1), daß die Antiheparinwirkung eventuell einem verunreinigenden Bestandteil des T 3 zugeschrieben werden muß (15). Diese Annahme erfuhr durch die Untersuchung von Deutsch, Johnson und Seegers (3), die von dem T 3 das Heparin neutralisierende Prinzip als T 4 abtrennten, ihre Bestätigung. Eine spätere Studie, wobei die lipoiden Aktivatoren aus Hirn von Mensch, Rind, Pferd, Schwein, Kaninchen und Taube eingehend untersucht wurden, zeigte, daß es sich bei diesen mit größter Wahrscheinlichkeit um identische Substanzen handelt (16). Damit wurde das Studium des eiweißfreien „T 3" zu einem des lipoiden Aktivators.

Howell (20) hielt den mit Lipoidlösungsmitteln extrahierbaren thermostabilen Aktivator für Kephalin. Derselbe Körper sei jedoch auch der essentielle Bestandteil der Thrombokinasen. Die Thermolabilität der letzteren sei lediglich durch die Bindung des Kephalins an Eiweiß vorgetäuscht, da beide dann bei Erhitzen zusammen ausfallen. Die Identität der lipoiden Aktivatoren an sich, auch mit den wenigstens aus Hirngewebe erhaltenen dürfte zutreffen, nicht jedoch deren Identität mit dem Kephalin klassischer Prägung. Frühere Untersuchungen wiesen aus, daß kein Zusammenhang zwischen der analytischen Reinheit präparativ aus physiologischem Material erhaltener Kephaline und deren Gerinnungsaktivität besteht (4, 19, 6). Außerdem können die freien Aminogruppen azetyliert oder nach v. Slijke ohne nennenswerten Verlust der Aktivität dieser Verbindungen desaminiert werden (19, 6). Das klassische, durch seine freie Aminogruppe charakterisierte Kephalin dürfte demnach das aktive Prinzip nicht sein. Chromatographisch erhaltene Fraktionen aus aktiven „Kephalinen", die keine positiven Ninhydrinreaktionen gaben, erwiesen sich gleichfalls als aktiv. Da diese jedoch nach Hydrolyse papierchromatographisch die gleichen ninhydrinpositiven Reaktionen zeigten wie die gewöhnlichen aktiven „Kephaline", besteht die Möglichkeit, daß sich unter diesen der lipoide Aktivator befindet. Wir konnten die Spaltungsprodukte, welche die Ninhydrinpositiven Reaktionen geben mit Colamin, Serin, Glutaminsäure und Sphingosin identifizieren (7) und halten aus diesen und anderen Gründen die Existenz und Anwesenheit ketten- und ringförmig aneinander gebundener Kephaline für möglich (17). Die chemische Natur des lipoiden Aktivators blieb uns jedoch eine terra incognita.

Die in den letzten Jahren allerorts ausgeführten Kephalinsynthesen veranlaßten uns, eine Reihe freundlicherweise zur Verfügung gestellter Präparate zu studieren (Abschnitt III).

Weiter wurde der Aufbau einer thrombokinaseartigen Wirkung in Hühner-

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

plasma mit Hilfe eines auch in menschlichem Gewebe und Blut vorkommenden Inhibitors untersucht. Derselbe wurde 1951 als Bestandteil des lipoiden Aktivators entdeckt (7, 8) und mit Sphingosin identifiziert. Der Aminoalkohol Sphingosin kommt gebunden in Cerebrosiden und Sphingomyelinen vor, begleitet letztere aber auch in freiem Zustand und verursacht so die gerinnungshemmende Wirkung der Sphingomyeline. Die Tatsache, daß Sphingomyeline nur dann eine gerinnungshemmende Wirkung zeigten, falls sie, was auf Grund ihrer chemischen Formel ganz unerwartet war, eine positive Ninhydrinreaktion gaben und daß sie nach mehrfachem Umkristallisieren mit dem Verlust derselben bezüglich der Gerinnung indifferent wurden, gab den Anstoß zur Entdeckung des Sphingosins. Einen weiteren Beitrag hierzu lieferte die Beobachtung, daß die papierchromatographisch mit Sphingomyelinen erhaltene Ninhydrinreaktion nach Hydrolyse mit Schwefelsäure verschwand. Von den 4 ninhydrinpositiven Reaktionen, die physiologische, gerinnungsaktive „Kephaline" vor Hydrolyse geben, verschwand nach Hydrolyse mit Schwefelsäure eine derselben, und zwar diejenige, die sich an gleicher Stelle befand wie die mit unreinen Sphingomyelinen erhaltene. Nach Behandlung der Hydrolyserückstände mit NaOH konnte eine ätherlösliche Substanz extrahiert werden, die wiederum eine positive Ninhydrinreaktion an der gleichen bekannten Stelle gab. Hiermit wurde unser Verdacht auf Sphingosin gelenkt, das sich als unlösliches Sulfat dem Nachweis mit Ninhydrin entzog. Unsere Annahme erwies sich auf Grund einer vergleichenden, mit 5 verschiedenen Laufflüssigkeiten ausgeführten papierchromatographischen Untersuchung mit präparativ aus Cerebron und Sphingomyelin hergestelltem Sphingosin als richtig (19, 8, 9).

Sphingosin, dessen freies physiologisches Vorkommen und dessen Biosynthese Z a b i n und M e a d (27) studierten, ist auch Bestandteil des lipoiden Aktivators und dürfte so dessen gerinnungshemmende Wirkung in hohen Konzentrationen erklären (14). Zudem scheint Sphingosin das essentielle Prinzip von Tocantins Antithromboplastin (26) zu sein (10), das in hämophilem Blut in abnormal hohen Konzentrationen vorkommen soll. Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund, daß in normalem Blut nach Zugabe von Tocantins Inhibitor oder von Sphingosin das antihämophile Globulin, das bei der klassischen Hämophilie fehlen soll, gleichfalls nicht mehr nachweisbar ist (21, 23).

Uns interessieren hier besonders die in vitro studierten Reaktionen des Sphingosins (11). Die Verzögerung der Gerinnung von Hühnerplasma auf 40 Stunden und mehr wird durch Zugabe von lipoidem Material aus Blutplättchen (T 3) oder von lipoiden Aktivatoren aus Hirn, gleichgültig welcher Herkunft (16), aufgehoben. Meist werden dabei Gerinnungszeiten erhalten, die sogar kürzer sind als die mit gleichen Mengen des lipoiden Aktivators allein („Sphingosin-Kompensation"). Wird Hühnerplasma mit Sphingosin jedoch *vor* Zufügen des lipoiden Aktivators während einer Stunde bei 39° C inkubiert, so

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

ergeben sich wesentlich kürzere Gerinnungszeiten; sie betragen meist 1/3 bis 1/6 der Zeiten, die mit dem lipoiden Aktivator allein erreicht werden können („Inkubationseffekt"). Dieselben kurzen Gerinnungszeiten sind aber auch ohne Inkubation zu erreichen falls dem Hühnerplasma neben Sphingosin und lipoidem Aktivator gleichzeitig sehr verdünnte, an sich kaum aktive Thrombokinase zugefügt wird (12, 13). Die Zugabe der letzteren ersetzt demnach direkt eine am Thrombokinaseaufbau beteiligte Reaktion, die sich sonst während der beschriebenen Inkubation vollzieht.

Die im Rahmen der Sphingosinreaktionen erhältlichen Gerinnungszeiten sind in hohem Maß von der geeigneten Wahl der Konzentrationen des Sphingosins und des lipoiden Aktivators abhängig. Da die Zugabe von einer während einer Stunde inkubierten Mischung von Sphingosin und lipoidem Aktivator zu Plasma keine kürzeren Werte als die der Sphingosinkompensation gibt, ist an dem Inkubationseffekt mindestens ein Bestandteil des Plasmas mitbeteiligt (11).

In Zusammenarbeit mit Shapiro (18) wurden diese Reaktionen mit synthetischem Sphingosin nebst Derivaten, Isomeren und Homologen desselben studiert. Die Resultate sind in Abschnitt IV wiedergegeben.

Methodik

a) *Bestimmung der Gerinnungszeiten*
mit Hilfe der 1939 (5) beschriebenen Apparatur. Weitere Einzelheiten jeweils bei den Versuchen.

Hühnerplasma wird nach Blutentnahme aus der vena carotis (Technik nach Carrel) gewonnen (2), in paraffinierten Röhrchen im Kühlschrank bewahrt und vor Gebrauch zur Hälfte mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Bestimmungen bei 39° C.

Menschliches Zitratplasma: 9 ml Blut mit 1 ml Natriumzitrat (3,8% der 5 Kristallwasser enthaltenden Verbindung) werden im silikonisierten Zentrifugierrohr 10 Min. bei 2500 Touren zentrifugiert und das Plasma abpipettiert. Gerinnungseinleitung durch Zugabe einer dem verwendeten Plasmavolumen gleichen Menge $\frac{m}{10}$ $CaCl_2$-Lösung (1,12 g der wasserfreien Verbindung in 100 ml Wasser).

b) *Bestimmung der Sphingosinkompensation und des Inkubationseffektes.*
Ausführliche Beschreibung (11) und am entsprechenden Ort.

c) *Ausführung des Thrombokinasebildungstestes.*
Einzelheiten und Bereitung der Reagentia siehe Hecht (16).

d) *Papierchromatographische Untersuchungen.*
Ausführung entsprechend den Angaben von Hecht und Mink (17).

e) *Herstellung des lipoiden Aktivators aus Schweinehirn.*
Zur Darstellung größerer Mengen nach Fischer und Hecht (4), kleinere im Prinzip nach den Angaben von Quick (siehe 16).

f) *Bereitung des Sphingosins.*
Präparativ aus Schweinehirn mit Sphingomyelin oder Cerebron als Zwischenprodukt (11) oder die synthetisch erhaltene DL-Verbindung aus Myristinsäure nach Shapiro und

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Segal (25). Weiter wurden untersucht die von Shapiro und Mitarbeitern (24) synthetisierten Präparate:

Triacetylsphingosin,
erythro- und threo-Dihydrosphingosin,
Benzoyl-dihydrosphingosin, sowie die Oxalate und freien
Basen von Threoninol und Allothreoninol.

g) *Synthetische Kephaline.**)

K_1: DL-dipalmitoyl-kephalin
K_2: DL-lysopalmitoyl-kephalin
K_3: L-α-dimyristinoyl-kephalin
K_4: 1, 3 dipalmitoyl-2-phosphatidyläthanolamin
K_5: 1 palmitoyl-3 linoleoyl- 2 phosphatidyläthanolamin.

Untersuchung synthetischer Kephaline

Um Wiederholungen zu vermeiden sei erwähnt, daß in Abschnitt I bereits auf die sehr wahrscheinliche Identität des eiweißfreien Thrombozytenfaktors 3 („T 3") mit dem lipoiden Aktivator hingewiesen wurde. Gleichfalls wurde die Hypothese Howells von der Identität des lipoiden Aktivators und des aktiven Prinzips der Thrombokinase mit dem klassischen Kephalin besprochen. Nachdem unsere Untersuchungsmethoden wesentlich erweitert und eine Reihe chemisch einwandfreier, auf synthetischem Weg bereiteter Kephaline zur Verfügung standen, wurde die Kephalinfrage neuerdings bearbeitet. Es wurde untersucht:

1. Der Einfluß der synthetischen Verbindungen K_1 bis K_5 in verschiedenen Konzentrationen auf die Gerinnung von Hühner- und menschlichem Plasma.
2. Das Sphingosin-Kompensationsvermögen dieser Verbindungen und deren Rolle im Rahmen des Inkubationseffektes.
3. Das Vermögen der synthetischen Kephaline die Rolle der Thrombozyten und des eiweißfreien T 3 bzw. der lipoiden Aktivatoren im Thrombokinasebildungstest zu ersetzen und
4. die nach Papierchromatographie mit Phenol-Wasser als Laufflüssigkeit erhaltenen Ninhydrin-positiven Reaktionen zum Vergleich mit denen der lipoiden Aktivatoren.

Bei allen Untersuchungen mit synthetischen Präparaten ist deren geringe Löslichkeit und Emulgierbarkeit ein erschwerender Umstand. Die in Abschnitt II unter g) genannten 5 Verbindungen sind, von dem gut löslichen K_2 abgesehen, in der Kälte in Wasser bzw. physiologischer Kochsalzlösung praktisch unlöslich, etwas besser nach Erwärmen. Nach Abkühlen fallen die Verbindungen jedoch größtenteils wieder aus. Zusatz einer geringen Menge Alkohol, die nachgewiesenermaßen das Resultat der Gerinnungsversuche nicht beeinflußt, brachte eine nur geringe Verbesserung der Löslichkeitsverhältnisse. Das etwas bessere Auflösungs-

*) Für die Überlassung der Präparate K_1 und K_2 möchte ich den Herren Dr. Bevan und Dr. Malkin, Bristol, für K_3 Herrn Professor Dr. Baer, Toronto, und für die Substanzen K_4 und K_5 Herrn Dr. Rose, Albany, auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank bezeugen.

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

vermögen in Äther und Petroläther und das vorzügliche in Chloroform und Pyridin konnte unseren Versuchen nicht nutzbar gemacht werden.

1. Einfluß auf die Gerinnung von Hühnerplasma

In dem Gerinnungsmilieu (vgl. IIa) der gleichzeitig nebeneinander ausgeführten Doppelbestimmungen befanden sich 120, 60 bzw. 30 mm^3 des zu untersuchenden Präparates (3 mg/1 ml), die beiden letzten Ansätze mit physiol. Kochsalzlösung auf 120 mm^3 ergänzt. Die gleichzeitig ausgeführten Kontrollen enthielten 120 mm^3 NaCl. Alle Röhrchen erhielten anschließend mit einer kalibrierten Pasteurpipette 150 mm^3 Plasma (5 Tropfen à 30 mm^3).

Die erhaltenen Werte erübrigen die Wiedergabe in Form einer Tabelle. Zusammenfassend sei mitgeteilt, daß K_1 und K_4 sicher inaktiv sind und K_2 mit zunehmender Konzentration die Gerinnung hemmt. K_3 verkürzte in der höchsten Konzentration die Selbstgerinnungszeit des Plasmas von 41'50" auf 22'55". Da nach Abzentrifugieren oder Filtrieren durch eine dünne Lage Glaswolle keine gerinnungsfördernde Wirkung mehr auftrat, möchten wir die beobachtete Aktivität jedoch ausschließlich auf die vor Filtrieren vorhandenen suspendierten Teilchen zurückführen. Bezüglich einer Emulsion von K_5 in H_2O oder NaCl müssen wir erwähnen, daß wir gelegentlich eine geringe Aktivität feststellten.

Einfluß auf die Gerinnung von menschlichem Zitratplasma. Das Gerinnungsmilieu der gleichzeitig nebeneinander ausgeführten Bestimmungen enthielt jeweils 0,1 ml des zu untersuchenden Kephalinpräparates (3 mg und 1,5 mg/1 ml NaCl), die Kontrolle 0,1 ml NaCl. Nach Zugabe von 0,1 ml Zitratplasma wurde die Gerinnung mit 0,1 ml $CaCl_2$-Lösung eingeleitet (siehe IIa).

Das Resultat war noch eindeutiger als das der Versuche mit Hühnerplasma. Keinem der 5 Kephalinpräparate kam eine auch nur spurenhafte Aktivität zu.

2. Sphingosinreaktionen

Zur Untersuchung des Inkubationseffektes wurden je 30 mm^3 Wasser, NaCl und Sphingosin (5 mg/1 ml H_2O) mit 150 mm^3 Hühnerplasma (zur Hälfte mit physiol. NaCl-Lösung verdünnt) 1 Stunde bei 39° C inkubiert und anschließend 30 mm^3 der Kephalinpräparate (3 mg/1 ml NaCl, suspendierte Teilchen enthaltend) zugefügt.

Die Präparate K_1 bis K_4 brachten innerhalb einer Stunde keine Gerinnung zustande, gaben also keinen Inkubationseffekt, während mit den lipoiden Aktivatoren verschiedenster Herkunft Gerinnungszeiten von ungefähr einer Minute und kürzer erzielt wurden. Wie zu erwarten, zeigten die synthetischen Kephaline auch keine „Sphingosin-Kompensation". Ein gegenüber Hühnerplasma spurenhaft aktives K_5-Präparat gab bei obiger Versuchsanordnung einen ebenfalls spurenhaften Inkubationseffekt.

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Nr.	Substanzen der Sphingosingruppe	Gerinnungszeiten des Plasmas				Gerinnungszeiten			
		allein	mit 30 mm³ lip. Aktivator	mit Subst. v. Spalte 1		Zugabe lip. Aktivator (30 mm³) direkt zu Subst. v. Spalte 1 + Plasma		Zugabe lip. Aktivator (30 mm³) nach Inkubation der Subst. v. Spalte 1 mit Plasma (1 h 39° C)	
				30 mm³	60 mm³	30 mm³	60 mm³	30 mm³	60 mm³
1	*Sphingosin (physiologisch)* 5 mg/1 ml	16' 05"	6' 10"	> 41 h	> 41 h	3' 40"	3' 00"	43"	65"
2	*DL-Sphingosin (synthetisch)* 1,25 mg/1 ml	16' 05"	6' 00"	> 41 h	> 41 h	3' 50"	2' 53"	42"	61"
3	*Triacethylsphingosin (synthetisch)* 3 mg/1 ml	25' 25"	6' 15"	22' 40"	22' 55"	6' 15"	6' 15"	Bestimmung unmöglich	
4	*erythro-Dihydrosphingosin (synthetisch)* 3 mg/1 ml	44' 25"	5' 40"	4 h	> 22 h	4' 00"	7' 35"	49"	4' 30"
5	*threo-Dihydrosphingosin (synthetisch)* 3 mg/1 ml	40' 15"	7' 35"	> 2 h	> 2 h	5' 25"	5' 40"	61"	1' 22"
6	*N-benzoyldihydrosphingosin (synthetisch)* 3 mg/1 ml	12' 45"	5' 15"	12' 45"	13' 15"	5' 05"	5' 10"	Bestimmung unmöglich	
7	*Threoninol (synthetisch)* 3 mg/1 ml	15' 50"	6' 40"	15' 15"	16' 45"	5' 00"	4' 50"	Bestimmung unmöglich	
8	*Allothreoninol (synthetisch)* 3 mg/1 ml	15' 30"	6' 15"	15' 30"	17' 50"	4' 40"	4' 50"	Bestimmung unmöglich	
9	*Threoninoloxalat (synthetisch)* 3 mg/1 ml	16' 05"	4' 00"	17' 00"	> 41 h	4' 08"	4' 05"	—	3 h
10	*Allothreoninoloxalat (synthetisch)* 3 mg/1 ml	13' 30"	3' 30"	14' 50"	> 41 h	3' 55"	4' 00"	—	3 h

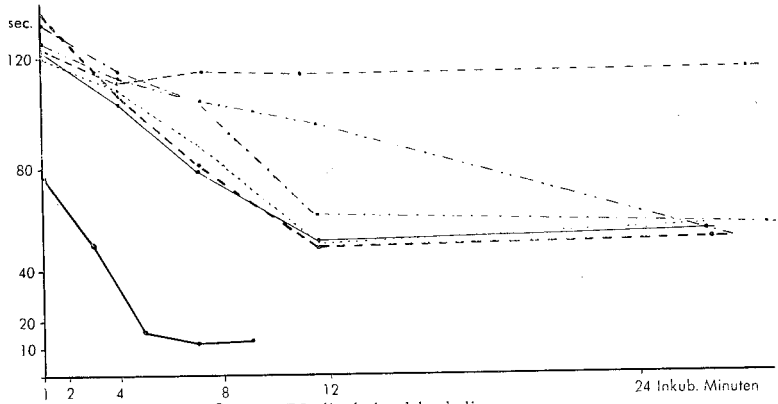
3. *Thrombokinasebildungstest*

Bezüglich der von uns geübten, auch klinisch erprobten Ausführung des Thrombokinasebildungstestes muß auf eine anderweitig bereits erfolgte Beschreibung desselben verwiesen werden (16). Die verwendeten Konzentrationen der Kephalinpräparate betrugen 3 mg/1 ml NaCl.

Die Abbildung zeigt neben der Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung die Inaktivität der Kephalinpräparate K_1 bis K_5 in NaCl-Lösung. K_2 zeigt auch hier, analog seiner gerinnungshemmenden Wirkung gegenüber Hühnerplasma eine den Thrombokinaseaufbau störende Wirkung. Die mit Blutplättchen üblicherweise erhaltene Aktivitätskurve wurde zum Vergleich in die Abbildung mit aufgenommen.

Die unter 1, 2 und 3 genannten negativen Befunde erachten wir als weitere Argumente gegen die Auffassung von der Kephalinnatur des lipoiden Aktivators und damit auch des eiweißfreien T 3.

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.



K1: DL-dipalmitoyl-kephalin
K2: DL-lysopalmitoyl-kephalin
K3: L-α-dimyristinoyl-kephalin
K4: 1,3 dipalmitoyl-2-phosphatidyläthanolamin
K5: 1 palmitoyl-3 linoleoyl-2 phosphatidyläthanolamin
Thrombozyten
NaCl-Kontrolle

Thrombokinasebildungstest mit synthetischen Kephalinen

4. *Papierchromatographische Untersuchungen*

Das Verhalten des lipoiden Aktivators anläßlich der papierchromatographischen Untersuchung wurde früher bereits mitgeteilt (17), ebenso das gleiche des T 3 (15). Zum Unterschied mit den stets erhaltenen 4 Ninhydrin-positiven Reaktionen zeigen die 5 Kephalinpräparate bei analoger Untersuchung mit der steigenden und fallenden Methode und Phenol-Wasser als Laufflüssigkeit lediglich eine und zwar für alle Präparate gleiche Reaktion mit sehr hohem R_F-Wert.

Untersuchung synthetischer Sphingosine, nebst Derivaten und Homologen

Bezüglich Entdeckung, Identifizierung und Reaktionen des physiologischen Inhibitors Sphingosin wurde in Abschnitt I referiert. Es war naheliegend, die Richtigkeit unserer Erhebungen mit Hilfe eines synthetisch bereiteten Sphingosins, dessen Aufbau aus Myristinsäure Shapiro und Segal (25) gelungen war, zu beweisen. Es zeigte sich, daß das synthetische Präparat bereits mit niedrigeren Konzentrationen, mit einer 1,25 mg/1 ml enthaltenden wässerigen Emulsion, gleich intensive Reaktionen gab wie eine 5 mg/1 ml physiologisches Sphingosin enthaltende. Die synthetische Verbindung ist in Wasser schwieriger löslich, gibt aber papierchromatographisch untersucht, die Ninhydrin-positive Reaktion an gleicher Stelle.

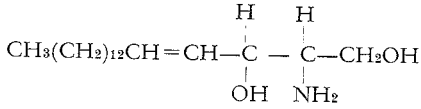
In Zusammenarbeit mit Shapiro (18), der den synthetischen Teil dieser Untersuchung übernahm (Shapiro und Segal (25) und Shapiro, Flo-

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

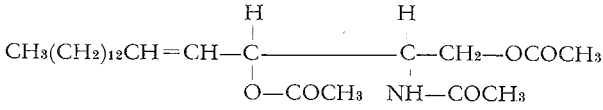
w e r s und H e c h t (24), konnte mit Hilfe verschiedener Derivate des Sphingosins und homologer Verbindungen ein Einblick bezüglich der konstitutionellen Erfordernisse für den positiven Ausfall der Sphingosinreaktionen gewonnen werden.

Zum Versuch gelangten folgende synthetische Verbindungen:

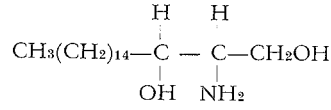
1. DL-Sphingosin:



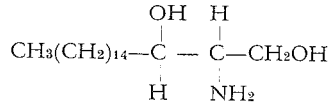
2. Triacetylverbindung von 1.:



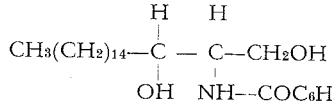
3. *erythro*-Dihydrosphingosin:



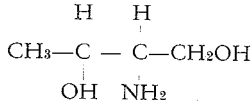
4. *threo*-Dihydrosphingosin:



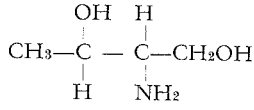
5. N-benzoyldihydrosphingosin:



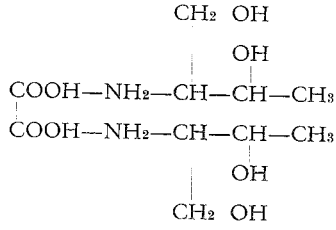
6. Allo-threoninol:



7. Threoninol:



8. und 9. Die den Threoninolen 6 und 7 entsprechenden Oxalate:



Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Die Formeln dieser Verbindungen weisen ohne weiteres darauf hin, welche Aufschlüsse von einer Untersuchung dieser Substanzen erwartet werden dürfen. Nachdem bereits die gleichwertige Leistung des physiologischen und synthetischen Produktes (Nr. 1) feststand, sollten die Studien mit Substanz Nr. 2 über den Wert der beiden freien OH- und der NH_2-Gruppe, Nr. 3 und 4 sowohl über den der Doppelbindung als auch der *Erythro- und Threo*-Konfiguration Aufschluß geben. Substanz Nr. 5 verfügt noch über die beiden freien OH-Gruppen, während die Doppelbindung aufgehoben und die NH_2-Gruppe durch den Benzoylrest blockiert ist. Die sich nach Einkürzung der Kohlenstoffkette zeigende Verwandtschaft des Spingosins mit der essentiellen Aminosäure Threonin veranlaßte außerdem die Untersuchung des niedrigsten Homologen, des Threoninols in beiden Konfigurationen (Nr. 6 und 7) nebst dessen Oxalaten (Nr. 8 und 9).

Die Tabelle gibt die erhaltenen Resultate wieder. Ergänzend sei mitgeteilt, daß die Intensität der Sphingosinkompensation (Spalte 5) und die dabei meist schon erreichte Verkürzung der dem lipoiden Aktivator bereits allein eigenen Gerinnungszeit (Spalte 3) von einigen uns bis jetzt bekannt gewordenen Faktoren abhängt. Das gleiche trifft auch für den Inkubationseffekt (Spalte 6) zu. Durch Variieren der Konzentrationen des lipoiden Aktivators und des Sphingosins können die Resultate stark beeinflußt werden. Die bis jetzt bei dem Inkubationseffekt beobachtete kürzeste Gerinnungszeit betrug 18 Sekunden.

Die Aktivität des lipoiden Aktivators gegenüber Hühnerplasma, aber auch die Selbstgerinnungszeit des letzteren läßt keinerlei prognostische Schlüsse bezüglich des Ausfalls der Sphingosinreaktionen zu. So konnten wir zum Beispiel mit einem lipoiden Aktivator, der in optimaler Konzentration Hühnerplasma erst nach 11' 55" zur Gerinnung brachte, für die Sphingosinkompensation und den Inkubationseffekt Gerinnungszeiten von 4' 10" und 55" erhalten. Mit demselben Plasma und einem anderen, Hühnerplasma gegenüber wirksameren lipoiden Aktivator gleicher Herkunft betrugen die entsprechenden Werte 4' 50", 5' 00" und 1' 08".

Zur *Ausführung der Versuche* dienen folgende Angaben:

Die Gerinnungsröhrchen erhielten zur Feststellung der Selbstgerinnungszeit des Plasmas (Spalte 2) mit unserer Technik und jeweils verrichteten Doppelbestimmungen je 60 mm^3 H_2O und NaCl und 150 mm^3 zur Hälfte mit physiologischer NaCl-Lösung verdünntes Hühnerplasma. Zur Ermittlung der Aktivität des lipoiden Aktivators (6 mg/l ml NaCl) wurden lediglich 30 der 60 mm^3 NaCl durch diesen ersetzt (Spalte 3). Bei Untersuchung des Einflusses der in Spalte 1 genannten Substanzen in wässeriger Lösung, die mit Ausnahme von Nr. 2 alle 3 mg/l ml enthielten, wurden anstelle der 60 mm^3 H_2O des Ansatzes zur Bestimmung der Plasmagerinnungszeit 30 bzw. 60 mm^3 der zu untersuchenden Substanzen verwendet (Spalte 4). Zur Feststellung des Kompensationseffektes (Spalte 5) wurden von den 60 mm^3 H_2O 30 bzw. 60 mm^3 durch die Substanzen der 1. Rubrik ersetzt, von den 60 mm^3 NaCl 30 durch den lipoiden Aktivator (6 mg/l ml NaCl) und anschließend direkt 150 mm^3 Plasma zugegeben. Zum Studium des Inkubationseffektes (Spalte 6) wurden die 60 mm^3 H_2O durch 30 bzw. 60 mm^3 der Substanzen von Spalte 1 ersetzt, 150 mm^3 Plasma zugefügt und anschließend erst während

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

einer Stunde bei 39° C inkubiert. Nach dieser Vorbehandlung erhielten die Röhrchen 30 mm^3 NaCl und die gleiche Menge lipoiden Aktivator. Die Röhrchen wurden bei den Versuchen der Spalte 6 zur Ermittlung der Gerinnungszeit alle 5 Sekunden im Apparat bewegt, bei den Versuchen der übrigen Spalten alle 10 Sekunden.

Die Versuche zeigten qualitativ die völlige Gleichwertigkeit des *physiologischen und synthetischen Sphingosins* (Substanzen Nr. 1 und 2). Die von beiden hervorgerufene starke Verlängerung der Gerinnungszeit des Plasmas wird in gleichem Maß von dem lipoiden Aktivator aufgehoben und beide Substanzen geben einen starken Inkubationseffekt. Von dem synthetischen Präparat werden hierzu geringere Mengen benötigt.

Bei Blockierung beider OH-Gruppen und der NH_2-Gruppe (Subst. Nr. 3), dem *Triacetylsphingosin,* geht trotz Erhaltung der Doppelbindung die Aktivität völlig verloren. Triacetylsphingosin beeinflußt weder die Gerinnungszeit des Plasmas, noch die Gerinnungsaktivität des lipoiden Aktivators, weshalb sich die Durchführung des Inkubationsversuches erübrigte.

Das Verhalten der beiden Isomere *Erythro- und Threo-Dihydrosphingosin* ist schwierig einwandfrei zu beurteilen. Nach Aufhebung der Doppelbindung werden weniger deutliche Sphingosinreaktionen erhalten. Sie scheinen unseren Beobachtungen zufolge in höherem Maß von individuellen Eigenschaften des Plasmas abzuhängen. Beide Dihydrosphingosine verlängern die Gerinnungszeit des Plasmas vermutlich infolge der geringeren Löslichkeit dieser Verbindungen sehr verschieden und unregelmäßig. Wird zur Erhöhung der Löslichkeit der Verbindungen stark erhitzt, dann können Resultate, wie in der Tabelle unter 4 und 5 angegeben, erhalten werden. Für starke Sphingosinreaktionen scheint die Anwesenheit der Doppelbindung notwendig zu sein.

Es ist nicht erstaunlich, daß bei der zudem auch noch blockierten NH_2-Gruppe des *N-benzoylhydrosphingosins* keine Spur einer Aktivität mehr zu beobachten ist.

Die beiden *Threoninole* zeigen keine Aktivität. Um so merkwürdiger ist jedoch das Verhalten der beiden *Threoninoloxalate.* Letztere verlängern in hoher Konzentration die Gerinnungszeit des Plasmas sehr stark. Während diese Verlängerung im Kompensationsversuch (Spalte 5) spielend aufgehoben wird, gelingt dies nach einstündiger Inkubation des Plasmas mit der gleichen Konzentration der Threoninoloxalate nicht mehr. Auf Grund dieses mehrfach beobachteten Tatbestandes glauben wir für die gerinnungsverzögernde Wirkung der Threoninoloxalate nicht einfach eine Oxalatwirkung annehmen zu dürfen.

In Kürze sei noch erwähnt, daß obige Sphingosinderivate einer gleichzeitig nebeneinander ausgeführten papierchromatographischen Untersuchung mit Phenol-Wasser als Laufflüssigkeit unterworfen wurden. Die R_F-Werte der ninhydrinpositiven Reaktionen waren mit einer gewissen Abhängigkeit von den zur Chromatographie gelangten Konzentrationen für die beiden Sphingosine

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

und die Dihydrosphingosine übereinstimmend (85—90). Dasselbe gilt auch für die beiden niedrigere R_F-Werte zeigenden Threoninole (65—69) und Threoninoloxalate (51—57). Triacethylsphingosin und N-benzoyldihydrosphingosin reagierten nicht mit Ninhydrin.

Diskussion

Mit Rücksicht auf den verfügbaren Raum und zur Vermeidung von Wiederholungen sei auf die ausführliche Einleitung zu dieser Arbeit verwiesen.

Es wurde getrachtet den Nachweis für die Identität einiger gerinnungsphysiologisch bedeutsamer Substanzen zu erbringen. Außerdem konnte der als Sphingosin erkannte physiologische Hemmstoff zum Beweis der Richtigkeit seiner Identifizierung vollwertig durch synthetisches Sphingosin ersetzt und mit Hilfe verschiedener synthetischer Derivate desselben ein Einblick bezüglich der konstitutionellen Erfordernisse der Inhibitorwirkung des Sphingosins gewonnen werden. Bei dem stets weiter zunehmenden Reichtum der Literatur an mehr oder weniger gerinnungswichtigen Substanzen erscheint uns im Augenblick jede kleinste, chemisch fundierte Vereinfachung wichtiger als die Postulate von laufend auftauchenden, chemisch nicht oder nur mangelhaft definierten Neuheiten.

Es war naheliegend, sich zu diesem Zweck den chemisch leichter zugänglichen lipoiden Körpern zuzuwenden. Einen, unseres Wissens ersten Versuch in dieser Richtung unternahm Howell mit seiner Annahme, daß der thermostabile lipoide Aktivator Kephalin sei und daß eben dieses Kephalin auch das essentielle Prinzip der Thrombokinase darstelle. Die Thermolabilität der letzteren sei lediglich eine Folge des Eiweißgehaltes derselben mit dem zusammen bei Erhitzen das an sich thermostabile Kephalin niederschlage. Es erübrigt sich, die früher bereits beigebrachten Beweise gegen die Kephalinnatur des lipoiden Aktivators neuerdings anzuführen (6). Wir halten Howells Ansicht von der Identität des essentiellen Prinzipes der Thrombokinasen — soweit es sich wenigstens um Präparate aus Hirngewebe handelt — für richtig, nicht hingegen die Identität desselben mit dem Kephalin klassischer Prägung. Wir unternahmen es in der vorliegenden Arbeit alle erreichbaren synthetischen Kephalinpräparate (siehe Abschnitt II., 9) einer vergleichenden Untersuchung zu unterziehen. Die studierten 5 Präparate besitzen dem äußerst empfindlichen Indikator Hühnerplasma gegenüber *keine* Aktivität. Es soll nicht geleugnet werden, daß das ungesättigte 1-Palmitoyl-3-linoleoyl-2-phosphatidyläthanolamin gelegentlich eine geringe Wirksamkeit zeigte. Gegenüber menschlichem Plasma war nie eine Spur von Aktivität festzustellen.

Bei dem Versuch die verschiedenen Kephaline im Rahmen des Thrombo-

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

kinasebildungstestes anstelle der Thrombozyten zu verwenden, konnten wir gleichfalls keine Aktivität beobachten. Die Rolle der Thrombozyten kann hingegen durch einen Lipoidextrakt aus denselben (dem T 3 nach Paulssen), alle lipoiden Aktivatoren und einer Reihe anderer Stoffe vollwertig übernommen werden. Wir halten auch den genannten lipoiden T 3 für identisch mit dem lipoiden Aktivator. Die 5 untersuchten Kephaline geben auch die für die lipoiden Aktivatoren und den Lipoidextrakt aus den Blutplättchen typischen Sphingosinreaktionen nicht. Eines der studierten Kephaline (K 2) zeigte im Gegenteil eine ausgesprochene Hemmung. Auch die nach Papierchromatographie erhaltenen ninhydrinpositiven Reaktionen der synthetischen Kephaline zeigten im Vergleich mit denen der lipoiden Aktivatoren ein völlig abweichendes Bild. Wir sehen in diesen Befunden und insbesondere in dem gänzlichen Versagen der synthetischen Kephaline im Rahmen des so anspruchslosen Thrombokinasebildungstestes neuerdings gewichtige Argumente gegen die Auffassung von der Kephalinnatur des lipoiden aktiven Prinzips.

In der Einleitung wurde weiterhin der physiologische Inhibitor Sphingosin und dessen Beitrag zum Aufbau einer thrombokinaseartigen Aktivität ausführlich besprochen. Wir konnten bei unseren Experimenten das physiologische Sphingosin durch niedrigere Konzentrationen des synthetisch erhaltenen Produktes vollwertig ersetzen. Weiter untersuchten wir eine Reihe synthetisch erhaltener Derivate des Sphingosins, bei denen beide OH- und die NH_2-Gruppe durch Essigsäurereste ersetzt waren, andere mit durch Hydrierung aufgehobener Doppelbindung (*Erythro-* und *Threo*-Form des Dihydrosphingosins), das am N substituierte Benzoylderivat und außerdem 2 Isomere des niedrigsten Homologen des Sphingosins, die der essentiellen Aminosäure Threonin nahestehenden Threoninole nebst deren Oxalaten. Dabei wurde festgestellt, daß mit Beseitigung der Doppelbindung sich die Sphingosinaktivität vermindert. Bei zudem erfolgter Einführung des Benzoylrestes in die NH_2-Gruppe geht dieselbe ebenso verloren wie bei dem die Doppelbindung noch besitzenden Sphingosin nach Blokkierung der beiden OH-Gruppen und der NH_2-Gruppe mit Azetylresten.

Auch die beiden Threoninole sind inaktiv. Die Oxalate derselben zeigen merkwürdigerweise eine sphingosinartige Kompensation, jedoch keinen Inkubationseffekt mit lipoidem Aktivator. Einzelheiten hierüber müssen in Abschnitt III nachgelesen werden.

Zusammenfassung

1. Mit Hilfe einer ausführlichen Einleitung wurde versucht, die Grundlage zum müheloseren Verständnis der vorliegenden Untersuchung zu schaffen.
2. Die Resultate einer Studie mit fünf verschiedenen synthetischen Kephalinen waren:

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

a) Die synthetischen Kephaline sind im Gegensatz zu den lipoiden Aktivatoren und dem von Paulssen untersuchten Lipoidextrakt aus den Blutplättchen gegenüber Hühnerplasma und menschlichem Plasma inaktiv.

b) Ebensowenig können die Kephaline die Rolle der sub a) genannten Substanzen im Rahmen der Sphingosinreaktionen übernehmen.

c) Die Kephaline sind nicht imstand im Thrombokinasebildungstest die Funktion der Thrombozyten zu erfüllen, wozu die Lipoidextrakte aus denselben und ebenso die lipoiden Aktivatoren befähigt sind.

d) Alle synthetischen Kephaline geben anläßlich ihrer papierchromatographischen Untersuchung andere Ninhydrin-positive Reaktionen wie Lipoidextrakte aus den Blutplättchen und die lipoiden Aktivatoren.

3. Die sub 2 genannten Befunde werden als weitere Argumente gegen die Auffassung von der Identität des lipoiden Aktivators mit dem Kephalin klassischer Prägung gedeutet.

4. Die typischen Reaktionen des aus physiologischem Material isolierten Inhibitors Sphingosin werden in noch stärkerem Maß von der synthetisch bereiteten Verbindung gegeben.

5. Die Untersuchung von 8 synthetischen Derivaten, Isomeren und Homologen des Sphingosins zeigte, daß zum Erhalt der maximalen Sphingosinreaktionen sowohl die Doppelbindung als auch die freien OH- und NH_2-Gruppen erforderlich sind.

Summary

1. An extensive introduction is meant to facilitate the understanding of this study.

2. The investigation of 5 different synthetic cephalins yielded the following results:

a) Synthetic cephalins, in contrast to the lipoid activators and to the lipoid extract of platelets as described by Paulssen, are inactive towards chicken and human plasma.

b) Neither can the cephalins replace the substances mentioned under a) in sphingosine reactions.

c) The cephalins are incapable to replace the function of platelets in the thromboplastin generation test, as lipoid extracts from platelets as well as lipoid activators are able to.

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

d) All synthetic cephalins yield ninhydrin-positive reactions differing from those of platelet lipoid extracts and of lipoid activators, as shown by paper chromatography.

3. The results mentioned under 2. are considered further arguments against the concept of the identity of the lipoid activator and the classically defined cephalin.

4. The reactions typical for the inhibitor sphingosine isolated from physiologic material, are even emphasized if the synthetically prepared compound is used.

5. The study of 8 synthetic derivatives, isomeres, and homologous of sphingosine revealed that in order to obtain optimal sphingosine reactions the double bond as well as free OH- and NH_2 groups are essential.

Résumé

1) Une introduction détaillée tente d'apporter les conaissances fondamentales permettant de suivre sans peine les recherches publiées dans ce travail.

2) Voici les résultats de l'étude se rapportant à 5 „céphalines" synthétiques:

a) les céphalines synthétiques sont inactives en présence de plasma humain ou de poule, contrairement aux activateurs lipoidiques et aux extraits lipoidiques de plaquettes, étudiées par Paulssen, N.

b) Les céphalines ne peuvent pas davantage remplacer les substances mentionnés sous a) dans le cadre des réactions à la sphingosine.

c) Dans le test de formation de la thrombokinase, les céphalines ne sont pas capables de remplir les fonctions des thrombocytes, ce dont s'acquittent fort bien, tant les extraits lipoidiques de plaquettes que les activateurs lipoidiques.

d) Toutes les céphalines synthétiques donnent, à la chromatographie sur papier, des réactions positives à la ninhydrine différentes de celles observées avec les extraits lipoidiques de plaquettes et les activateurs lipidiques.

3) Les résultats mentionnées sous chiffre 2 sont donc des arguments supplémentaires permettant de nier l'identité des activateurs lipoidiques avec la céphaline classique.

4) Les réactions typiques de l'inhibiteur sphingosine, isolé de substances physiologiques, se produisent avec un degré encore plus marqué lorsqu'on utilise la substance synthétique.

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

5) L'étude de 8 dérivés synthétiques, isomères ou homologues de la sphingosine, démontra la nécessité de la double liaison et de la prèsence de groupes OH- et NH_2 libres, afin de conserver au maximum les réactions à la sphingosine.

Literatur

(1) Biggs, R. and Douglas, A. S.: The thromboplastin generation test. J. clin. Path. **6:** 23 (1953).

(2) Carrell, A.: siehe Fischer, A.: Gewebezüchtung, München 1927 und (oder) Demuth, F.: Praktikum der Züchtung von Warmblütergewebe in vitro, München 1929.

(3) Deutsch, E., Johnson, S. A. and Seegers, W. H.: Differentiation of certain platelet factors related to blood coagulation. Circul. Res. **3:** 110 (1955).

(4) Fischer, A. und Hecht, E.: Über die chemische Natur des Lipoidfaktors bei der Blutgerinnung. Biochem. Z. **269:** 115 (1934).

(5) Hecht, E.: Zur Kenntnis der Blutgerinnung 1. Mitt. Zur Methodik der Bestimmung der Blutgerinnungszeit. Acta med. scand. **102:** 79 (1939).

(6) Hecht, E.: Untersuchungen über die chemische Natur der Gerinnungsaktivatoren. Sang **21:** 486 (1950).

(7) Hecht, E.: New inhibitors of the first stage of the blood-clotting process. Nature (Lond.) **167:** 279 and 633 (1951).

(8) Hecht, E.: Inhibitoren van de bloedstolling. Ned. T. v. Geneesk. **95:** 2371 (1951).

(9) Hecht, E.: Nieuwe remstoffen van de eerste phase van het bloedstollingsproces. Chem. Weekblad **47:** 905 (1951).

(10) Hecht, E.: Investigations on Tocantins's Antithromboplastin, Acta physiol. pharmacol. neerl. **2:** 134 (1951).

(11) Hecht, E.: Eine systematische Untersuchung über die Bedeutung der Lipoide für die Blutgerinnung. 2. Mitt. Der Einfluß der Diaminophosphatide und deren Spaltungsprodukt Sphingosin. Acta haemat. (Basel) **9:** 237 (1953).

(12) Hecht, E.: Wisselwerking tussen stollingsbevorderende en stollingsremmende stoffen, Ned. T. Geneesk. **98:** 1596 (1954).

(13) Hecht, E.: Wechselwirkungen zwischen fördernden und hemmenden Substanzen der Blutgerinnung, Experientia (Basel) **10:** 428 (1954).

(14) Hecht, E.: Bedeutung der Lipoide für die Blutgerinnung in Jürgens, R. und Deutsch, E., „Hämorrhagische Diathesen", Springer, Wien, S. 162, 1955.

(15) Hecht, E.: De thrombocytenfactor 3 ("T 3"). Vortrag Niederl. Haematologen Vereinigung, Amsterdam 7. Mai 1955, Ned. T. Geneesk. **101:** 429 (1957).

(16) Hecht, E.: Studien über den lipoiden Aktivator bei der Blutgerinnung. Diese Zschr. **1:** 380 (1957).

(17) 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).

(18) Hecht, E. and Shapiro, D.: Sphingosine as an inhibitor of blood clotting. Science **125:** 1041 (1957).

(19) Hecht, E., Jacobs, Ph., Harenberg, L. en Mink, Chr.: Verdelingschromatographie der phosphatiden in verband met de bloedstolling. Chem. Weekbl. **46:** 364 (1950).

(20) Howell, W. H.: The nature and action of the thromboplastic substance of the tissues. Amer. J. Physiol. **31:** 1 (1912).

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

(21) Koller, F.: persönl. Mitteilung, 20. April 1955.
(22) Paulssen, M. M. P.: Stollingsfactoren aanwezig in thrombocyten. Diss. Amsterdam, 1951.
(23) Seegers, W. H.: persönl. Mitteilung, 19. September 1955.
(24) Shapiro, D., Flowers, H. M. and Hecht, E.: Synthesis of DL-Threoninol. J. org. Chem. **22**: 461 (1957).
(25) Shapiro, D. and Segal, K.: The synthesis of sphingosine. J. Amer. chem. Soc. **76**: 5894 (1954).
(26) Tocantins, L. M. and Carroll, R. T.: Separation and assay of a lipid antithromboplastin from human brain, blood, plasma and plasma fractions, in "Blood Clotting and Allied Problems", 2d Conf. New York, S. 11, 1949.
(27) Zabin, I. and Mead, J. F.: The biosynthesis of sphingosine I. The utilization of carboxyl-labeled acetate. J. biol. Chem. **205**: 271 (1953) and The biosynthesis of sphingosine II. The utilization of methyl-labeled acetate, formate and ethanolamine. J. biol. Chem. **211**: 87 (1954).

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.