

Über das Vorkommen eines Antiheparinfaktors in Thrombozyten und Geweben*)

I. Mitteilung: Antiheparinaktivität der Thrombozyten

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

E. Deutsch, E. Wawersich und G. Franke

Die Thrombozyten greifen mit mehreren Faktoren in den Gerinnungsablauf ein. Ware, Fahy und Seegers konnten in den Thrombozyten zwei Aktivitäten nachweisen und voneinander trennen: Der eine Faktor beschleunigt die I. Phase der Gerinnung in gleicher Weise wie Plasmfaktor V und wurde später als Thrombozytenfaktor 1 bezeichnet. Der 2. Faktor übt eine fibrinoplastische Wirkung auf die II. Phase aus und erhielt die Bezeichnung Thrombozytenfaktor 2. Van Creveld und Paulsen konnten diese Befunde bestätigen und fanden noch einen dritten Faktor, dem sie eine Thrombokinase- und eine Antiheparinwirkung zuschrieben. Mit dem Thrombokinasefaktor beteiligen sich die Thrombozyten gemeinsam mit den Faktoren VIII und IX und wahrscheinlich noch anderen an der Bildung der Plasmathrombokinase. Ziemlich gleichzeitig gelang es Jürgens und Dialer sowie Deutsch, Johnson und Seegers mit Hilfe der Ultrazentrifuge, die Thrombokinasewirkung von der Antiheparinwirkung zu trennen und so zu zeigen, daß diese beiden Aktivitäten zwei verschiedenen Faktoren zukommen. Die Thrombokinasewirkung wurde als Faktor 3 und die Antiheparinwirkung als Faktor 4 bezeichnet.

Der Thrombozytenfaktor 3 läßt sich nach den Untersuchungen von Deutsch, Johnson und Seegers aus wässerigen Extrakten homogener Thrombozyten leicht sedimentieren. Wird die thrombozytenfreie überstehende Lösung der Ultrazentrifugation unterworfen, so findet sich Faktor 2 in der obersten Schichte, Faktor 4 in der Bodenschichte und Faktor 1 neben Resten von Faktor 3 im Sediment. Wie im folgenden gezeigt wird, ist es jedoch auch möglich, die Faktoren 3 und 4 ohne Anwendung der Ultrazentrifuge voneinander zu trennen.

Material und Methoden

Für die Untersuchungen wurden menschliche Thrombozyten verwendet: 1. *Gewinnung der Thrombozyten*: 100 ml menschlichen Blutes wurden in ein silikonisiertes Gefäß einfließen gelassen, das 7,5 ml einer 0,1 m Lösung von Sequestren enthält. Dann wurden 12 ml Compensan® (Heilmittelwerke, Wien) zugesetzt, gut durchgemischt und das Blut über Nacht bei

*) Herrn Prof. Lauda zum 65. Geburtstag gewidmet.

+ 4 Grad stehen gelassen, wobei sich die Erythrozyten sedimentieren. Das überstehende thrombozytenreiche Plasma wurde abgesaugt und 10 min. bei + 4° mit ca. 800 Umdrehungen per Minute auf einer Junior K III Kühlzentrifuge (Fa. Christ) zentrifugiert. Die Thrombozyten wurden dann in oxalathaltiger physiologischer Kochsalzlösung, die pro 10 ml 0,5 ml einer 2% (v/v) Lösung von Triton WR 1339 enthielt, suspendiert und nochmals zentrifugiert. Dieses Waschen wurde 3mal wiederholt. Für die letzte Waschung wurde nur physiologische Kochsalzlösung verwendet. Nach dem Zentrifugieren wurden die Plättchen eingefroren und bei 20 Grad minus gelagert oder lyophilisiert.

2. *Bestimmung der Aktivität von Thrombozytenfaktor 3:* Hierfür fand der Thromboplastin-Generation-Test nach Biggs und Douglas mit der Modifikation Anwendung, daß das Plasma mit BaSO₄ an Stelle von Al (OH)₃ adsorbiert wurde.

3. *Bestimmung der Aktivität von Thrombozytenfaktor 4:* Thrombozytenarmes menschliches Oxalatplasma wurde durch 5 min. langes Erhitzen auf 56 Grad defibriniert und in kleinen Portionen eingefroren. Dieses Plasma dient als Heparinkomplement. Bei jeder Bestimmungsserie müssen 2 Kontrollen gemacht werden: In der ersten Kontrolle wird die Aktivität der verwendeten Thrombinlösung getestet. Zu diesem Zweck werden 0,3 ml des defibrinierten Oxalatplasmas mit 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung und 0,1 ml 1%igem Fibrinogen (Behring) versetzt und die Thrombinlösung so eingestellt, daß die Gerinnungszeit ungefähr 15 sec. beträgt. Dies wird meist erreicht, wenn man 2 Ampullen Antithrombinreagens Roche in 3 ml bidest. Wasser löst. Mit der 2. Kontrolle wird die Heparinkonzentration eingestellt. Diese wird so gewählt, daß die Gerinnungszeit 60 bis 90 sec. beträgt, wenn 0,1 ml der physiologischen Kochsalzlösung in obigem Versuchsansatz durch 0,1 ml der Heparinlösung ersetzt wird. Zum eigentlichen Test ersetzt man weitere 0,1 ml der physiologischen Kochsalzlösung durch 0,1 ml der zu testenden Lösung und bestimmt die Gerinnungszeit. Dieser Test ist nur grob qualitativ.

Experimentelle Untersuchungen

1. *Nachweis einer Antiheparinwirkung in intakten und homogenisierten Thrombozyten.* Gewaschene Thrombozyten wurden in einer Konzentration von 1.000.000/mm³ in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und die Aktivität dieser Lösung getestet. Dann wurde die Lösung 3mal in einer Mischung von Aceton-Trockeneis eingefroren und bei 37 Grad im Wasserbad wieder aufgetaut, so daß die Thrombozyten weitgehend zerstört wurden. Diese homogenisierten Thrombozyten erwiesen sich als wesentlich aktiver als die nicht homogenisierten (Tab. 1).

Tab. 1: Antiheparinwirkung intakter und homogenisierter Thrombozyten.

Kontrolle 1 (ohne Heparin)	12,8 Sek.
Kontrolle 2 (mit Heparin)	70 Sek.
1 000 000/mm ³ frisch	55 Sek.
1 000 000/mm ³ homogenisiert	20 Sek.

2. *Abhängigkeit der Antiheparinwirkung von der Thrombozytenkonzentration.* Es ließ sich leicht zeigen, daß die Antiheparinwirkung von der Thrombozytenzahl abhängig ist. Eine Thrombozytensuspension, welche 1.000.000 Thrombozyten im mm³ enthielt, wurde homogenisiert und dann auf Konzentrationen

entsprechend 500.000, 250.000 und 125.000 Thrombozyten/mm³ verdünnt. Der heparinneutralisierende Effekt nimmt entsprechend ab (Tab. 2).

Tab. 2: Einfluß der Thrombozytenzahl auf die Antiheparinwirkung.

Material	Gerinnungszeit in Sek.
Kontrolle 1 (ohne Heparin)	16
Kontrolle 2 (mit Heparin)	92,5
1 000 000 homogenisierte Thrombozyten/mm ³	22
500 000 homogenisierte Thrombozyten/mm ³	32,7
250 000 homogenisierte Thrombozyten/mm ³	63
125 000 homogenisierte Thrombozyten/mm ³	95

3. Verhalten des Antiheparinfaktors gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln.

3 ml einer Thrombozytensuspension in physiologischer Kochsalzlösung mit 1.000.000 Thrombozyten/mm³ wurde wie oben angegeben homogenisiert und anschließend 30 min. bei + 4 Grad und 5000 rpm zentrifugiert. Die geringfügig trübe überstehende Lösung (erste Waschflüssigkeit) wurde dekantiert und getestet. Die Thrombozytenreste wurden nochmals in 3 ml destilliertem Wasser suspendiert, wieder unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, die überstehende Lösung (zweite Waschflüssigkeit) wieder dekantiert und getestet. Dasselbe wurde ein 3. Mal wiederholt. Dann wurde das Sediment neuerdings in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und ebenfalls getestet. Wie aus Tab. 3 hervorgeht, ist nur die erste Waschflüssigkeit aktiv; der Antiheparinfaktor ist also in physiologischer Kochsalzlösung löslich oder bildet zumindest sehr stabile Suspensionen. Die Thrombozytenreste sind inaktiv. Es kann sich daher bei der Antiheparinwirkung nicht um einen unspezifischen Adsorptionseffekt an die Thrombozytenleiber handeln.

Um eine ausreichende Thrombozytenmenge für die Extraktionsversuche mit organischen Lösungsmitteln zu gewinnen, wurden die gewaschenen Thrombozyten zahlreicher normaler Versuchspersonen in der Kälte scharf abzentrifugiert, die Waschflüssigkeit dekantiert und die Thrombozyten eingefroren. Die nächsten anfallenden Thrombozyten wurden zu diesen hinzugefügt, bis eine ausreichende Menge gesammelt war. Die Lagerung erfolgte bei — 25 Grad, wobei die Thrombozyten nicht an Aktivität verloren. Je 0,2 ml dieser gesammelten Thrombozyten wurde mit 2 ml 96%igem Alkohol, Chloroform oder Äther 3mal 30 min. bei Zimmertemperatur geschüttelt. Die Extrakte wurden jeweils gesammelt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung möglichst fein suspendiert. Die extrahierten Thrombozytenfragmente wurden ebenfalls im Vakuum getrocknet und dann in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und getestet. Wie aus der Tab. 3 hervorgeht, erwiesen sich die extrahierten Thrombozytenfragmente als aktiv, während

Tab. 3: Extraktion des Antiheparinfaktors mit physiologischer Kochsalzlösung und organischen Lösungsmitteln.

Material	Gerinnungszeit in Sek.	
Kontrolle 1 (ohne Heparin)	16,9	
Kontrolle 2 (mit Heparin)	66,5	
1 000 000 homogenisierte Thrombozyten/mm ³	20,5	
1. Waschwasser	25,5	
2. Waschwasser	60	
3. Waschwasser	62	
Sediment	52	
Kontrolle 1 (ohne Heparin)	16,5	
Kontrolle 2 (mit Heparin)	48	
Thrombozytenbrei 1 : 10 mit physiol. NaCl verdünnt	19	
Lösungsmittel	Rückstand, getrocknet, resuspendiert	Extrakt getrocknet, resuspendiert
96% Alkohol	19 Sek.	mehr als 60 Sek.
Chloroform	18,5 Sek.	mehr als 60 Sek.
Äther	22 Sek.	mehr als 60 Sek.

die mit organischen Lösungsmitteln erhaltenen Extrakte inaktiv waren. Eine Testung der Thrombozytenfaktor-3-Aktivität ergab hingegen volle Wirksamkeit der organischen Extrakte, während die Thrombozytenfragmente inaktiv waren

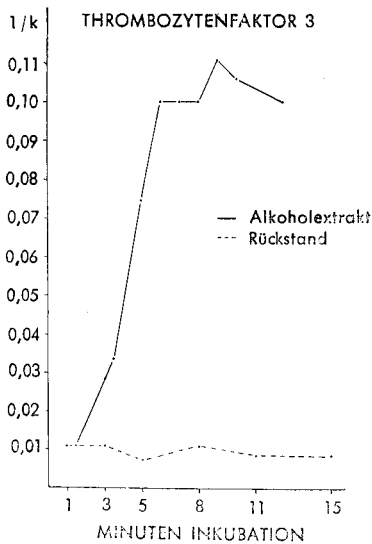


Abb. 1: Aktivität des Thrombozytenfaktor 3 in alkohol-extrahierten Thrombozytenresten (---) und im Alkoholextrakt (nach Verdampfen des Alkohols und Suspension des Rückstandes in physiologischer Kochsalzlösung (—)). Abszisse: Inkubationszeit in Minuten, Ordinate: Reziproker Wert der Gerinnungszeiten. (Bezüglich Thrombozytenfaktor 4 siehe Tab. 3).

(Abb. 1). Aus diesen Versuchen geht hervor, daß Thrombozytenfaktor 4 nicht lipidlöslich ist und durch organische Lösungsmittel nicht zerstört wird. Man kann daher ohne weiteres zunächst den Thrombozytenfaktor 3 extrahieren und das verbleibende Material zur Herstellung von Thrombozytenfaktor 4 verwenden.

4. *Inkubationseffekt.* Die Wirkung von Thrombozytenfaktor 4 manifestiert sich sofort. Eine Inkubation des heparinisierten, defibrinierten Plasmas mit dem Thrombozytenextrakt führt zu keiner Zunahme der Inaktivierung des Heparins.

5. *Adsorption.* Aus Thrombozyten mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellte aktive Extrakte wurden mit 50 mg/ml BaSO₄ bzw. Kaolin 10 min. bei 37 Grad adsorbiert. Nach Entfernen des Adsorbens durch Zentrifugieren waren die Lösungen vollkommen inaktiv. Es gelang jedoch nicht, die Aktivität mit 3,8%igem Natriumzitat oder m/20 Natriumborat aus den Adsorbentien zu eluieren (Tab. 4).

Tab. 4: Adsorption des Antiheparinfaktors.

Material	Gerinnungszeit in Sek.
Kontrolle 1 (ohne Heparin)	17
Kontrolle 2 (mit Heparin)	66
Kontrolle 3 (mit 1 Mill. Thromb.)	17,6
Thrombozytenextrakt	25,5
nach Adsorption mit BaSO ₄	82
nach Adsorption mit Kaolin	> 90
verschiedene Eluate	80—90

6. *Temperaturresistenz von Thrombozytenfaktor 4:* Eine Suspension von 1.000.000 Thrombozyten/mm³ wurde 10, 20 und 30 min. auf 50° bzw. 60° erhitzt und nach dem Abkühlen die verbleibende Antiheparinaktivität bestimmt (Tab. 5). Es zeigte sich, daß diese bei 50° innerhalb von 30 min. und bei 60° innerhalb von 20 min. vollkommen zerstört wurde.

Tab. 5: Temperaturdenaturierung des Antiheparinfaktors.

Material	Gerinnungszeit in Sek.
Kontrolle 1 (ohne Heparin)	11
Kontrolle 2 (mit Heparin)	45,5
1 000 000 homogenisierte Thrombozyten/mm ³	28,5
Inkubationsdauer und Temperatur:	
50° 10 Min.	38
20 Min.	33
30 Min.	43
60° 10 Min.	40
20 Min.	46,5
30 Min.	46

7. Säurefraktionierung: 1 ml des gelagerten Thrombozytenbreies (s. o.) wurde in 3 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, zur vollständigen Homogenisierung 3mal eingefroren und aufgetaut und schließlich bei 4° 30 min. mit 5000 rpm zentrifugiert. Die überstehende aktive Lösung wurde weiter verwendet. Sie hatte ein pH von 6,6 und wurde mit 1%iger Essigsäure auf pH 5,62, dann auf pH 5,08 und schließlich auf pH 4,60 gebracht. Jedes Mal blieb die Fällung eine Stunde bei + 4 Grad stehen und wurde dann 15 min. mit 5000 rpm bei 4 Grad zentrifugiert. Die Niederschläge wurden in je 1 ml Veronalpuffer pH 7,2 gelöst und getestet. Von den jeweils überstehenden Lösungen wurde eine kleine Menge neutralisiert und ebenfalls getestet. Es zeigte sich, daß der Thrombozytenfaktor 4 bei pH 5,62 in Lösung bleibt und bei pH 5,08 vollständig ausgefällt wird. Die einzelnen Fraktionen wurden auch auf die Aktivität an Thrombozytenfaktor 1 (Tab. 6) und an Thrombozytenfaktor 3 (Abb. 2)

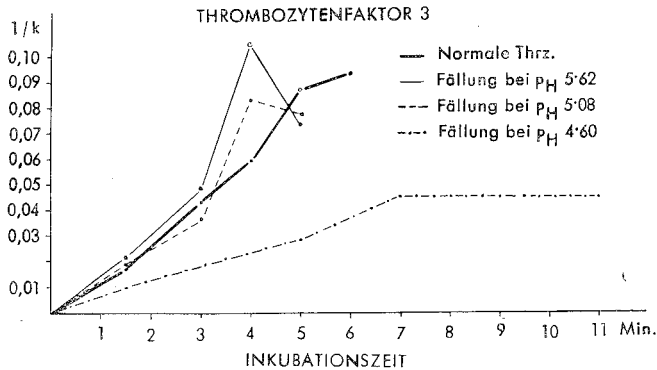


Abb. 2: Verhalten von Thrombozytenfaktor 3 bei Säurefällung. Thrombokinasenbildung mit homogenisierten Thrombozyten (—) und mit Thrombozytenextrakten nach Säurefällung: Niederschlag bei pH 5,62 (— — —), bei pH 5,08 (— — —) und bei pH 4,60 (— · — ·). Abszisse: Inkubationszeit in Minuten, Ordinate: Reziproker Wert der Gerinnungszeiten. (Bezüglich Thrombozytenfaktor 4 siehe Tab. 6).

Tab. 6: Säurefraktionierung des Thrombozytenfaktor 4.

pH	Thrombozytenfaktor 4		Thromb.-Fakt. 1 im aufgelösten Niederschlag	Thromb.-Fakt. 2
	in der überstehenden Lösung Gerinnungszeit in Sec.	im aufgelösten Niederschlag Gerinnungszeit in Sec.		
6,6	19	—	—	—
5,62	19,5	43,7	16%	—
5,08	44,5	18,7	65%	neg.
4,60	—	52	unter 10%	—

Kontrolle 1 (ohne Heparin)

15

Kontrolle 2 (mit Heparin)

50

Thrombozytensuspension vor Fraktionierung

17

untersucht. Die Aktivität dieser Faktoren geht nicht mit der Aktivität des Faktor 4 parallel, doch ist eine Trennung auf diesem Wege allein nicht zu erzielen. Thrombozytenfaktor 2 konnte in keiner Fraktion nachgewiesen werden.

8. *Ammoniumsulfatfraktionierung.* 0,6 ml des gelagerten Thrombozytenbreies wurden mit Alkohol extrahiert und getrocknet. Die Thrombozytenfragmente wurden dann mit 3 ml physiologischer Kochsalzlösung extrahiert und der Extrakt nacheinander mit Ammoniumsulfat bei 0 Grad zu 33% und dann zu 50% gesättigt. Die Fällungen blieben jeweils 30 Min. bei + 4 Grad stehen und wurden 10 Min. bei 4 Grad mit 3000 rpm zentrifugiert. Die jeweils gebildeten weißen Niederschläge lösten sich leicht in 1 ml destilliertem Wasser. Die so entstandenen Lösungen und der nach 50%iger Sättigung mit Ammonsulfat in Lösung gebliebene Rest wurden gegen physiologische Kochsalzlösung mit Zusatz von 0,1% Ammonkarbonat 24 Stunden dialysiert und im Vakuum auf 1 ml eingengt. Bei der Testung erwies sich nur die bei 50%iger Sättigung mit Ammonsulfat in Lösung gebliebene Fraktion als wirksam (Tab. 7). Sie enthielt keinen Thrombozytenfaktor 1 und 3.

Tab. 7: Ammonsulfatfraktionierung des Thrombozytenextraktes.

Material	Gerinnungszeit in Sek.
Kontrolle 1 (ohne Heparin)	14
Kontrolle 2 (mit Heparin)	58
Thrombozytenextrakt	26
33% Ammonsulfat gefällt	75
50% Ammonsulfat gefällt	80
bei 50% Ammonsulfat in Lösung	22

9. Durch Kombination beider Verfahren konnte eine weitere Reinigung erzielt werden. Während die durch Ammonsulfatfällung erhaltenen Fraktionen relativ gut löslich waren, waren die durch Säurefällung erhaltenen Fraktionen nur schlecht löslich, so daß eine stärkere Konzentrierung bisher nicht gelang. Vorangegangene Säurefällung veränderte das Verhalten bei folgender Ammonsulfatfällung nicht. Aber auch diese Fraktionen erwiesen sich bei der Papier-electrophorese noch nicht als einheitlich. Die Auftrennung war nur schlecht. Die aktiven Lösungen ergaben mit Sulfoalicylsäure einen deutlichen Niederschlag.

Besprechung der Ergebnisse

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Thrombozytenfaktoren 3 und 4 auch auf chemischem Wege voneinander getrennt werden können, was einen neuen Beweis dafür darstellt, daß beide Aktivitäten verschiedenen Substanzen zukommen. Thrombozytenfaktor 3 kann leicht mit Lipoidlösungsmitteln

aus den homogenisierten Thrombozyten extrahiert werden. Die Faktor-4-Aktivität bleibt unverändert in den Thrombozytenresten zurück und kann aus diesen mit destilliertem Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung extrahiert werden. Thrombozytenfaktor 4 scheint wasserlöslich zu sein, oder zumindest recht stabile Suspensionen in wäßrigen Lösungen zu bilden. Seine Löslichkeit scheint mit weiterer Reinigung abzunehmen. Thrombozytenfaktor 4 entfaltet seine Wirkung sofort. Er ist thermolabil und verliert seine Aktivität bei 50° in 30 Min. und bei 60° in 20 Min. vollkommen. Er ist bei -25° lagerungsstabil. Er kann an BaSO₄ oder Kaolin adsorbiert werden. Es ist uns aber nicht gelungen, die Aktivität wieder zu eluieren. Er bleibt bei 50%iger Sättigung mit Ammonsulfat in Lösung und wird bei einem pH, das zwischen 5,6 und 5,0 gelegen ist, ausgefällt. Er konnte durch Säurefraktionierung allein von Thrombozytenfaktor 1 und 3 nicht abgetrennt werden.

Zur Anreicherung der Faktor-4-Aktivität hat sich folgendes Vorgehen bisher am besten geeignet erwiesen: Lyophilisierte Thrombozyten werden zunächst 3mal 30 Min. bei Zimmertemperatur mit Alkohol extrahiert, der Rückstand im Vakuum getrocknet und anschließend 30 Min. mit destilliertem Wasser extrahiert. Inaktives Material wird zunächst bei pH 5,5 entfernt und die Aktivität bei pH 5,0 gefällt. Der Niederschlag wird wieder aufgelöst und die Lösung mit gleicher Menge gesättigtem Ammonsulfat versetzt, der inaktive Niederschlag entfernt, die überstehende Lösung 12 Stunden gegen physiologische Kochsalzlösung mit etwas Ammonkarbonatzusatz dialysiert und lyophilisiert.

Zusammenfassung

Die als Thrombozytenfaktor 4 bezeichnete Antiheparin-Aktivität der Thrombozyten kann auf chemischem Wege von den anderen bekannten Thrombozytenfaktoren abgetrennt werden. Diese Aktivität ist bei -25° lange stabil, ist hitzelabil, wird durch Ansäuern auf pH 5,0 gefällt und bleibt bei 50%iger Sättigung mit Ammonsulfat in Lösung. Sie ist nicht dialysabel. Es besteht die Möglichkeit, daß die Aktivität einem Eiweißkörper zukommt oder an einen solchen adsorbiert ist.

Summary

The antiheparin activity of human platelets is called platelet factor 4. It may be separated from other platelet activities by chemical methods. Platelet factor 4 is stabile when stored at -25° C, it is heat labile, and is precipitated when acidified to pH 5.0. It is soluble at 50% saturation with ammonium sulfate. It does not pass through dialyzing membranes. We believe that the activity is connected with a protein principle.

Résumé

L'activité antihéparine des plaquettes est nommée facteur plaquettaire 4. Il peut être séparé des autres par les méthodes chimiques. Le facteur plaquettaire 4 est stable à -25°C , il est instable à 50° , il est précipité, acidifié à pH 5.0 et est soluble à 50% de saturation avec sulfate d'ammonium. Il n'est pas dialysable. Il est possible que l'activité appartienne à quelque corps protéinique ou est adsorbée par lui.

Literatur

- Ware, A. G., Fahey, J. L. and Seegers, W. H.: Platelet extracts, fibrin formation and interaction of purified prothrombin and thromboplastin. *Amer. J. Physiol.* 154: 140 (1948).
- van Creveld, S. and Paulssen, M. M. P.: Significance of clotting factors in blood platelets, in normal and pathologic conditions. *Lancet* II, 242 (1951).
- van Creveld, S. and Paulssen, M. M. P.: Isolation and properties of the third clotting factor in blood platelets. *Lancet* I, 23 (1952).
- Jürgens, R.: Die Blutplättchen und ihre Bedeutung für Blutungsneigung und Thrombusbildung. *Dtsch. med. Wschr.* 77: 1265 (1952).
- Deutsch, E., Johnson, Sh. A. and Seegers, W. H.: Differentiation of certain platelet factors related to blood coagulation. *Circ. Res.* 3: 110 (1955).
- Biggs, R. and Douglas, A. S.: The thromboplastin generation test. *J. clin. Pathol.* 6: 23 (1953).