

## Blutgerinnung und Fibrinolyse

Von Norbert Heimburger und Heiner Trobisch<sup>[\*]</sup>

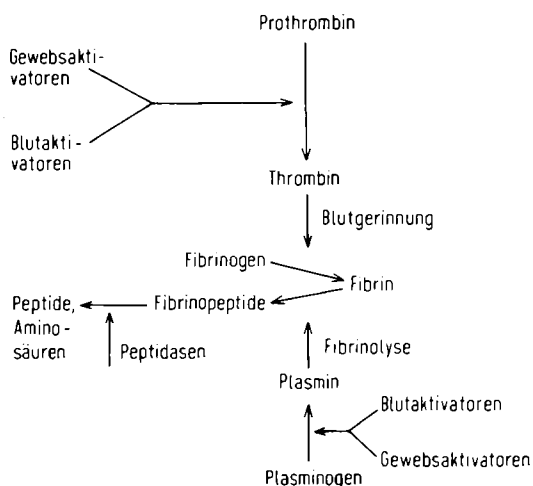
*Die moderne Proteinchemie führt zunehmend zu der Erkenntnis, daß die Gerinnung des Blutes über mehrere Reaktionsstufen abläuft, die den Charakter von Enzym-Substrat-Reaktionen haben und durch Phospholipide katalysiert werden. Das gilt auch für das kompensatorische System, die Fibrinolyse. Die in den beiden Systemen wirksamen Faktoren einschließlich der das Gleichgewicht regulierenden Inhibitoren haben sich als Proteine mit einem zum Teil hohen Gehalt an Kohlenhydraten erwiesen. Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für die moderne Diagnostik und Therapie.*

### 1. Einleitung

Eine der physiologisch wichtigsten Eigenschaften des Blutes ist, daß es gerinnen, ja völlig erstarren und sich auch wieder verflüssigen kann. Beide Phänomene sind im Prinzip auf die enzymatische Umsetzung eines Plasmaproteins, des Fibrinogens, zurückzuführen. So ist der Vorgang der Blutgerinnung dadurch gekennzeichnet, daß das lösliche Fibrinogen, das in einer Konzentration von 0.2–0.4 g% im Humanplasma vorliegt, zu einem unlöslichen, gut polymerisationsfähigen Derivat, dem Fibrin, abgewandelt wird. Die Fibrinolyse ist durch die Auflösung des vernetzten Fibrins charakterisiert. Unter physiologischen Bedingungen laufen Gerinnung und Fibrinolyse nacheinander ab. Ihr Zusammenspiel gewährleistet, daß sich zur Blutstillung Fibrin bildet und daß es bei der Wundheilung wieder abgebaut wird, wenn es seine biologische Funktion erfüllt hat. Daher kann man die Fibrinolyse auch als weitere Phase der Blutgerinnung betrachten.

Gerinnung und Fibrinolyse werden enzymatisch reguliert. So katalysiert Thrombin die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin und Plasmin die Hydrolyse des Fibrins. Beide Enzyme, die zu den Endopeptidasen gehören, sind nicht streng substratspezifisch. Daß sie unter physiologischen Bedingungen nicht in der aktivierten Form, sondern als Proenzyme im Blut zirkulieren, ist als Sicherungsmaßnahme des Organismus zu werten. Auch die Aktivierung der Proenzyme wird enzymatisch reguliert. Dazu gehört, daß die Enzymak-

tivatoren zum Teil nur als Vorstufen im Blutstrom kreisen und zur Umwandlung einer Induktion bedürfen. Die dafür bestimmten Faktoren sind vielfach durch eine Zell- oder eine Gewebebarriere vom Blutstrom getrennt. Das gilt auch für die Aktivatoren. So ist gewährleistet, daß sie erst bei Verletzungen des Gewebes oder Veränderungen der Zell- und speziell der Gefäßoberfläche gebildet und freigesetzt werden. Diese Folge von Vorgängen garantiert, daß Thrombin und Plasmin wirklich nur auf den physiologischen Bedarf hin entstehen, und zwar weitgehend lokal begrenzt.



Schema 1. Blutgerinnung und Fibrinolyse.

Wie Schema 1 zeigt, sind an Blutgerinnung und Fibrinolyse trotz entgegengesetzter Wirkungen sehr ähnliche Reaktionen beteiligt. Die biologische Aktivität ist jeweils an ein proteolytisches Enzym gebunden, nämlich

[\*] Dr. N. Heimburger und Dr. H. Trobisch  
Behringwerke AG  
355 Marburg/Lahn

Thrombin bzw. Plasmin. Beide Enzyme liegen im Blut als inaktive Proenzyme vor und werden durch Aktivatoren, die sowohl im Blut als auch im Gewebe lokalisiert sind, aktiviert. Im gesunden Organismus besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Gerinnung und Fibrinolyse. Ein Überschießen der Enzymreaktionen in der einen oder auch anderen Richtung kann fatale Folgen haben. Die biologische Konsequenz können Blutungen, Thrombosen und Gefäßerkrankungen sein; auch die Arteriosklerose dürfte die Folge eines gestörten dynamischen Gleichgewichts sein<sup>[1]</sup>.

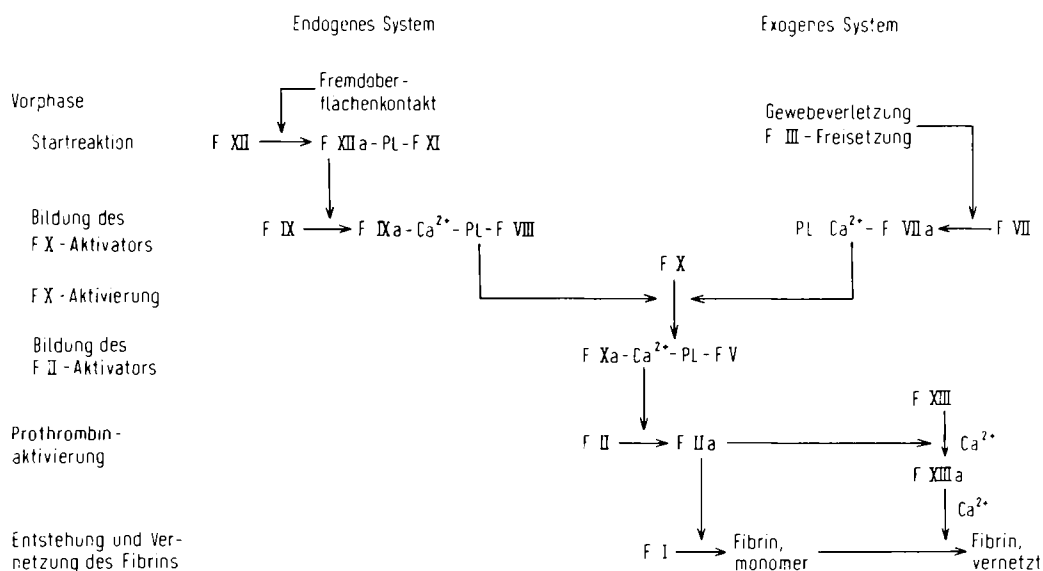
Die Gerinnungsforschung hat heute den Stand erreicht, Störungen im hämostatischen Gleichgewicht diagnostizieren und entsprechend behandeln zu können. Das bedeutet, daß man die Faktoren kennt und messen kann, die den Gerinnungs- und Fibrinolysestatus bestimmen.

## 2. Blutgerinnung

Am Gerinnungsvorgang, der über mehrere Reaktionsschritte abläuft, können bis zu zwölf plasmatische Faktoren und zusätzlich Thrombocyten- oder Zellelemente beteiligt sein. Die Plasmafaktoren sind vorwiegend Proteine, die z.T. Enzymcharakter haben und in Form inaktiver Vorstufen im Blut zirkulieren; sie lassen sich mit den in der Proteinchemie gebräuchlichen Methoden charakterisieren, wurden aber bisher nur vereinzelt

Der Vorgang der Blutgerinnung kann auf zwei unterschiedlichen Reaktionswegen eingeleitet werden, die beide zur Aktivierung des Faktors X und damit zur Bildung des Prothrombinaktivators führen (Schema 2)<sup>[7,8]</sup>. Die Reaktionsfolge richtet sich nach dem Reizort. Man unterscheidet danach zwischen einem exogenen<sup>[2]</sup> und einem endogenen Weg<sup>[3]</sup>. Das endogene System ist das kompliziertere; es läuft über mehrere Reaktionsstufen, ist mit vielen Sicherungen ausgestattet und arbeitet nicht zuletzt deswegen relativ träge. Im Gegensatz dazu reagiert das exogene System spontan. Es kann also im Notfall die Blutvolumenkonstanz gewährleisten; das dürfte seine wichtigste Funktion sein. Aktiv unterstützt wird das Gerinnungssystem dabei durch die Blutplättchen und Gefäße, die sich wechselseitig beeinflussen: Arterien kontrahieren bei traumatischer Reizung; sie sind zur Regulierung des Gefäßtonus mit einer ringförmigen Muskelschicht ausgestattet, deren Spannung über vasoaktive Peptide und biogene Amine reguliert wird. Diese Wirkstoffe, die eine Kontraktion oder Dilatation der Gefäße bewirken, entstehen in einer Art Nebenreaktion bei der Gerinnung und der Fibrinolyse.

Das verletzte Gefäß mit seiner für den Kreislauf fremden Oberfläche aktiviert das endogene Gerinnungssystem. Das gilt besonders für das Kollagen, das Stützgewebe der Gefäße, denn die Blutplättchen bleiben an den Kollagenfasern hängen, verformen sich an der unphysiologischen Oberfläche und verschmelzen zu einem viskosen, weißen Pfropfen, einem ersten mechanischen Wundver-



Schema 2. Der Verlauf der Gerinnung (schematisch; siehe dazu Tabelle 1). PL = Phospholipid.

in biologisch aktivem Zustand rein isoliert. Die gerinnungsaktiven Zellfaktoren gehören zur Klasse der Phospholipide, die als Bestandteil der Zellwände weit verbreitet sind. Diese Lipide haben sich als Katalysatoren wichtiger Enzym-Aktivierungsschritte beim Ablauf der Gerinnung erwiesen. Diese Tatsache könnte erklären, warum jeder Zellzerfall eine Hyperkoagulabilität schafft.

[1] T. Astrup, Lancet 271, 565 (1956).

schluß<sup>[4,5]</sup>. Die Plättchen-Aggregation wird durch ADP katalysiert, das von den Thrombocyten selbst gebildet wird und direkt an der Plättchenmembran angreift<sup>[6]</sup>.

[2] W. Staub u. F. Duckert, Thrombos. Diathes. Haemorrh. 5, 402 (1961).

[3] G. H. Müller, Thrombos. Diathes. Haemorrh. 14, 417 (1965).

[4] S. Karparkin u. R. M. Langer, J. Clin. Invest. 47, 2158 (1968).

[5] M. Corn, Nature 212, 508 (1966).

[6] H. Holmsen, H. J. Day u. H. Stormoken, Scand. J. Haematol., Suppl. Nr. 8 (1969).

Während der viskosen Metamorphose werden gerinnungsaktive Inhaltsstoffe frei. Die wichtigsten sind der Plättchenfaktor 3, ein Phospholipid, und das Antiheparin, der Plättchenfaktor 4<sup>[6]</sup>.

produkte des Prothrombins (F II). Die endgültige Klärung dieser Frage ist bis jetzt an der besonderen Labilität der Gerinnungsfaktoren gescheitert, die auch bei Anwendung der modernsten Isolierungsmethoden Ver-

Tabelle 1. Am Gerinnungsprozeß beteiligte Faktoren. Sie wurden auf Beschluß des Internationalen Nomenklaturkomitees nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit römischen Zahlen gekennzeichnet. F IV ist Ca<sup>2+</sup>, F VI ist kein selbständiger Faktor, sondern wahrscheinlich mit F V identisch. Aktivierte Faktoren sind am „a“ zu erkennen.

Faktor	Synonyma	dargestellt aus	elektrophoretische Beweglichkeit/Molekulargewicht	Funktion und bes. Eigenschaften	Plasma-konzentration	Bildungsort
I	Fibrinogen	Humanplasma	$\beta_2$ -Globulin 360 000 (q-Gipfel)	$\beta_2$ -Glykoprotein, das durch F IIa an zwei spezifischen Arginylsequenzen zu Fibrinmonomeren gespalten wird	200–400 mg/100 ml	Leber
II	Prothrombin	Humanplasma	$\alpha_2$ -Globulin 52 000	Proesterase, die durch F Xa zu einer Endopeptidase aktiviert wird, die relativ fibrinogen-spezifisch ist [32]	10–15 mg/100 ml	Leber, Vit.-K-abhängig [35, 36]
IIa	Thrombin		34 000 [55]			
III	Thromboplastin, Thrombokinas	menschlichen und tierischen Organen, bevorzugt Lunge und Hirn Rinderplasma [54]	bis $3 \times 10^6$	Gewebefaktor, wird zusammen mit Phospholipiden bei Verletzungen freigesetzt [29, 30]	normalerweise nicht im Plasma vorhanden	Zellen
V	Accelerin, Accelerator-Globulin, Labiler F.		$\beta$ -Globulin unbekannt	Sehr empfindliches Protein, das durch Ca <sup>2+</sup> stabilisiert wird. Katalysiert zusammen mit Phospholipiden und Ca <sup>2+</sup> die Prothrombinaktivierung durch F Xa [42, 43, 54]	unbekannt	Leber?
VII	Proconvertin	Rinderplasma [31]	$\beta$ -Globulin 63 000 [31]	Proenzym, Aktivierung durch Kontakt mit Zellfragmenten Cofaktor von F III, mit dem er den Aktivator von F X bildet [31]	unbekannt	Leber, Vit.-K-abhängig [31]
VIIa	Convertin		48 000 [31]			
VIII	Antihämophiles Globulin A AHG-A	Humanplasma Rinderplasma Schweineplasma Kaninchenplasma Humanplasma Rinderplasma	$\beta_2$ -Globulin unbekannt [23]	Enzymcharakter nicht bewiesen, wird durch Ca <sup>2+</sup> stabilisiert, Substrat von F IXa [24]	unbekannt	Milz/RES [a]
IX	Christmas-F, Antihämophiles Globulin B		$\beta_2$ -Globulin unbekannt		unbekannt	Leber, Vit.-K-abhängig
IXa			unbekannt	F IXa bildet im Komplex mit F VIII, Ca <sup>2+</sup> und Phospholipiden den Aktivator von F X [21]		
X	Stuart-Prower-F.	Rinderplasma [32]	$\alpha_2$ -Globulin 50 000	Proesterase, die durch endogen oder exogen gebildete Aktivatoren zur Arginin-Esterase wird [9, 32]	10 mg/100 ml	Leber, Vit.-K-abhängig
Xa			34 000 [32]			
XI	Plasma-Thromboplastin, Antecedent Hageman-F., Kontakt-F., [13, 14]	noch nicht	$\beta_2$ -Globulin unbekannt	Substrat von F XIIa; mit Phospholipiden bilden beide einen Komplex, der die Aktivierung von F IX katalysiert	unbekannt	RES? [a]
XII		Rinderplasma [16]	$\beta_2$ -Globulin [16]	Proesterase, Aktivierung durch Fremdoberflächen zur Arginin-Esterase (F XIIa) [16]	1 mg/100 ml	RES? [a]
XIIa			ca. 240 000 [14–16]			
XIII	Fibrin-stabilisierender F., Fibrinase	Humanplasma	$\beta_2$ -Globulin 290 000	Transglutaminase, die durch Thrombin aktiviert wird. Verknüpft die Fibrinmonomeren über Peptidbindungen zu einem festen Netz	1–2 mg/100 ml	Leber
XIIIa	Plasmatransglutaminase		unbekannt			

[a] RES = Reticuloendotheliales System.

Die am Gerinnungsvorgang beteiligten „Faktoren“ sind mit ihren wichtigsten Eigenschaften in Tabelle 1 zusammengestellt. Mehrere der Faktoren sind Enzyme. Thrombin (F IIa) und die aktivierten Faktoren X und XII (Xa bzw. XIIa) sind Esterasen, der aktivierte Faktor XIII (F XIIIa) ist eine Transamidase<sup>[8]</sup>. Die biochemische Natur der meisten Faktoren ist allerdings noch nicht geklärt. Es gibt Hinweise dafür, daß die Faktoren II, VII, IX und X miteinander verwandt sind. Nach Seegers<sup>[9]</sup> existieren sie gar nicht als Einzelproteine, sondern als Dissoziations- und Anlagerungs-

änderungen erfahren, die bis zu Denaturierung und Inaktivierung reichen. Diese ausgeprägte Empfindlichkeit der gerinnungsaktiven Proteine ist funktionsbedingt (siehe Abschnitt 2.1.1).

2.1. Das endogene System

2.1.1. Vorphase

In der Startreaktion wird der Gerinnungsvorgang durch den Kontakt des Blutes mit unphysiologischen Oberflächen wie Haut, Zellfragmenten, Kollagenfasern und arteriosklerotischen Beeten ausgelöst. Dabei wandelt sich der Hageman-Faktor (F XII), eine Proesterase, in die

[7] F. Jobin u. M. P. Esnouf, Biochemistry J. 102, 666 (1967).  
[8] W. H. Seegers, Annu. Rev. Physiol. 31, 269 (1969).  
[9] W. H. Seegers: Blood Clotting Enzymology. Academic Press, New York 1967, S. 129.

aktive Arginin-Esterase um <sup>[10-17]</sup>. Im Blut wird der Hageman-Faktor offenbar durch andere Proteine mit Schutzkolloidwirkung vor zufälliger Aktivierung bewahrt. Die hohe Affinität des Proenzym zu Fremdoberflächen wird für seine Anreicherung und Isolierung genutzt<sup>[17]</sup>. Allerdings erhält man so den aktivierten Hageman-Faktor (XIIa), der nur begrenzt stabil ist<sup>[18]</sup>; wohl deshalb ist der Hageman-Faktor physikalisch-chemisch noch nicht exakt charakterisiert. F XII-Mangel ist aber offenbar kein Blutungsübel, wie die Krankengeschichte des ersten Patienten mit erblichem F XII-Mangel, eines Herrn *Hageman*, gelehrt hat<sup>[22]</sup>. Die Aktivierung von F XII intra vitam führt zu einer ungezügelter intravaskulären Entgleisung der Gerinnung mit fatalen Folgen. Da der Hageman-Faktor auch die Umwandlung von Kallikreinogen in Kallikrein katalysiert, wird gleichzeitig mit dem endogenen Gerinnungssystem auch das Kallikrein-Kinin-System und dadurch wiederum indirekt die Fibrinolyse (Schema 4) aktiviert<sup>[19,20]</sup>.

Der aktivierte F XII (F XIIa) bildet in Gegenwart von Phospholipiden mit F XI einen Enzym-Substrat-Komplex. Die Entstehung dieses Komplexes kennzeichnet die Startreaktion. Er katalysiert die Aktivierung des Faktors IX, der wichtigsten Komponente des endogenen F X-Aktivatorsystems<sup>[21]</sup>.

Proteinchemisch ist der F XI so gut wie unbekannt: seine Isolierung ist bis jetzt nicht gelungen. Seine Existenz ist jedoch durch eine Mangel- oder auch Defektproteinämie belegt, die eine relativ seltene Blutungskrankheit bedingt.

Die Bildung des F X-Aktivators ist dadurch gekennzeichnet, daß der aktivierte F IX (F IXa) mit einem weiteren Plasmaprotein, dem F VIII, reagiert und mit diesem und Phospholipiden in Gegenwart von Calciumionen zu einem Komplex zusammentritt, der den F X aktiviert. Dieser Reaktionsschritt ist enzymchemisch noch nicht belegt, da der F IX bisher weder isoliert noch näher charakterisiert werden konnte.

Der F IX scheint weder Protease- noch Esterase-Eigenschaften zu haben: seine Wirkung wird durch Diisopropylfluorophosphat nicht beeinflußt, wie das für die Esterasen mit Serin im aktiven Zentrum charakteristisch ist. Die Aktivierung von F IX wird durch Calciumionen

katalysiert und durch Heparin blockiert. Der F IX wird in der Leber gebildet; seine Synthese ist Vitamin-K-abhängig. Mangel an F IX, der vererbt wird, kennzeichnet die Hämophilie B, die zweithäufigste angeborene Blutungs-erkrankung.

Der F VIII, das antihämophile Globulin A (AHG-A), ist einer der bekanntesten Gerinnungsfaktoren. Fehlen und Mangel dieses Faktors, die vererbt werden, sind die Ursache der häufigsten angeborenen Blutungs-erkrankungen: der Hämophilie A, die nur durch Substitution von AHG-A behandelt werden kann. Daraus leitet sich auch der Terminus „antihämophiles Globulin“ ab. Syntheseort dieses Globulins ist unter anderem die Milz. Das AHG-A gehört zu den  $\beta_2$ -Globulinen des Plasmas und ist relativ hochmolekular<sup>[23,24]</sup>.

Auch die Reindarstellung von AHG-A ist problematisch. Die Gründe dafür sind in der ausgeprägten Labilität des AHG-A zu suchen. Calciumionen-Entzug durch Komplexbildner führt zu einer irreversiblen Inaktivierung. Entweder stabilisieren die Calciumionen das AHG-A, oder aber der F VIII ist ein Komplex aus mehreren Proteinindividuen oder Untereinheiten. Bisher gibt es jedoch keinen Beweis für die eine oder andere Theorie. Für die Herstellung therapeutisch wirksamer Konzentrate hat sich das einfachste Verfahren als das brauchbarste erwiesen: die Kryopräzipitation, das Ausfrierverfahren, das auf der abgestuften Löslichkeit der Plasmaproteine nach Einfrieren und Auftauen beruht.

Die F X-Aktivierung ist der erste Reaktionsschritt innerhalb des kaskadenartigen Gerinnungsablaufs, der dem endogenen und exogenen System gemeinsam ist, aber noch von unterschiedlich aufgebauten Aktivatoren katalysiert wird (Schema 2). Die Umwandlung von FX wird enzymatisch katalysiert; dabei entsteht eine Arginin-Esterase (F Xa), die eine hohe Affinität für Calciumionen hat<sup>[28]</sup>, offenbar eine wichtige Voraussetzung für die Bildung des Prothrombinaktivators aus F Xa,  $\text{Ca}^{2+}$ , Phospholipiden und dem Plasmfaktor V.

Auf der Stufe der Bildung des Prothrombinaktivators vereinigen sich endogenes und exogenes System; Einzelheiten der Reaktion werden daher dort besprochen, weil sie für das Verständnis der sich daran anschließenden Prothrombinaktivierung wichtig sind.

## 2.2. Das exogene System

### 2.2.1. Vorphase

Bei Gewebsläsionen im Bereich des Kapillarnetzes strömt Blut aus den verletzten Gefäßen ins Gewebe.

[10] O. D. Ratnoff in E. B. Brown u. C. V. Moore: Progress in Hematology. Grune and Stratton, New York 1966, S. 204.

[11] H. L. Nossel, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122, 16 (1966).

[12] S. Niewiarowski, E. Bankowski u. J. Rogowicka, Thrombos. Diathes. Haemorrh. 14, 387 (1965).

[13] O. D. Ratnoff, J. Lab. Clin. Med. 44, 915 (1954).

[14] O. D. Ratnoff, E. W. Davie u. D. L. Mallet, J. Clin. Invest. 40, 803 (1961).

[15] C. Haanen u. I. G. G. Schoenmakers, Thrombos. Diathes. Haemorrh. 9, 557 (1963).

[16] I. G. G. Schoenmakers, R. Matu, C. Hannen u. F. Zilliken, Biochim. Biophys. Acta 93, 433 (1964).

[17] H. Temme, R. Jahrreis, E. Habermann u. F. Zilliken, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 519 (1969).

[18] J. G. G. Schoenmakers, R. M. Kurstjens, C. Haanen u. F. Zilliken, Thrombos. Diathes. Haemorrh. 9, 546 (1963).

[19] S. G. Jatridis u. J. H. Ferguson, Thrombos. Diathes. Haemorrh. 6, 411 (1961).

[20] R. W. Colman, Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 273 (1969).

[21] O. D. Ratnoff u. E. W. Cavie, Biochemistry 1, 677 (1962).

[22] O. D. Ratnoff u. A. G. Steinberg, J. Lab. Clin. Med. 59, 980 (1962).

[23] S. van Crefeld et al., Thrombos. Diathes. Haemorrh. 17, 188 (1967).

[24] E. J. Hershgold, L. Silverman, A. M. Davison u. M. E. Janszen, Selecta 9, Nr. 35, S. 2384 (1967).

[25] H. C. Hemker, A. C. W. Swart u. R. G. Macfarlane, Nature 215, 248 (1967).

[26] F. Jobin u. M. P. E. Esnouf, Biochem. J. 102, 666 (1967).

[27] M. P. E. Esnouf, Biochem. J. 115, P 1 (1969).

[28] M. P. E. Esnouf: Proc. 10. Congr. intern. Soc. Blood Transf. Stockholm 1964. Karger, Basel 1965, S. 1337.

Gleichzeitig werden aus den zertrümmerten Zellen Inhaltsstoffe unterschiedlichen chemischen Charakters mit gerinnungsfördernder Aktivität ausgeschwemmt, die z. T. noch an Zellbestandteile gebunden sind. Besonders reich an Substanzen, die das exogene System aktivieren, sind die Mikrosomen. Diese Zellfragmentfraktion wird als Gewebsthromboplastin oder FIII bezeichnet<sup>[29,30]</sup>; seine Freisetzung ist als Startreaktion anzusehen.

Die Bildung des FX-Aktivators verläuft über die Wechselwirkung des Gewebefaktors III mit einem plasmatischen Cofaktor, dem Proconvertin (F VII), das mit dem Blut in die Wunde gelangt. Die Aktivierung von F VII zu F VIIa, die beim Kontakt erfolgt, ist mit einer Verringerung des Molekulargewichts verbunden<sup>[31]</sup>, wie Untersuchungen an den isolierten Faktoren aus Plasma und Serum vom Rind ergaben<sup>[31]</sup>. Der Unterschied in den Molekulargewichten zwischen der inaktiven und aktivierten Form von F VII könnte für eine enzymatische Aktivierung charakteristisch sein. Bisher gibt es jedoch keinen Beweis dafür<sup>[33,34]</sup>.

Bei der Aktivierung von FX entsteht ein Enzym (FXa), das die Hydrolyse N-substituierter Argininester katalysiert<sup>[25-27]</sup>. Die Freisetzung aus der Proesterase erfolgt enzymatisch; sie kann in vitro durch Trypsin und das Gift der Russel-Viper katalysiert werden. In vivo wird die Aktivierung in vergleichbarer Weise durch die endogen oder exogen aufgebauten Aktivatoren katalysiert<sup>[9]</sup>.

Der FX konnte erstmals aus Rinderplasma mit hoher Reinheit gewonnen werden<sup>[32]</sup>. Die Isolierung gelingt über die Adsorption an BaSO<sub>4</sub> oder Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, fraktionierende Elution von den Adsorbentien, Chromatographie der Eluate an Cellulose-Ionenaustauschern und anschließende Molekularsiebtrennung. Ein einheitliches Präparat erhält man unter diesen Bedingungen jedoch nur bei Zusatz von Diisopropylfluorophosphat zu den Puffern<sup>[32]</sup>. Dieser Hemmstoff verhindert eine enzymatische Zersetzung und Inaktivierung während der Aufarbeitung. Die Aktivierung bewirkt eine Verkleinerung des Molekulargewichts und eine Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit<sup>[32]</sup>. Der FXa ist die enzymatische und wichtigste Komponente im Prothrombinaktivator-Komplex.

Der Prothrombinaktivator katalysiert die Umwandlung von Prothrombin (F II) in Thrombin (F IIa). An dieser Reaktion sind mehrere Komponenten beteiligt, die man als Prothrombinaktivator zusammenfaßt: FXa, F V, ein bisher nicht näher charakterisiertes Plasmaglobulin, Phospholipide und Calciumionen. Dabei bilden die Phospholipide die Reaktionsoberfläche, auf der die enzymatische Umsetzung des Prothrombins durch FXa abläuft. Die Geschwindigkeit der Reaktion wird durch F V

bestimmt, der daher als Accelerator-Globulin bezeichnet wird. Man nimmt an, daß die Faktoren V und Xa in den Lipidmicellen so fixiert sind, daß beide in engen Kontakt mit dem Prothrombinmolekül kommen<sup>[42-44]</sup> und damit eine wesentliche Voraussetzung für die Aktivierung, eine partielle Hydrolyse, schaffen.

## 2.2.2. Die Prothrombinaktivierung

Das Prothrombin (F II) gehört zu den Spurenproteinen im menschlichen Plasma. Man kann es jedoch mit den modernen Methoden der Elektrophorese als Substanz und auch biologisch im Plasma nachweisen.

So findet man nach der elektrophoretischen Auftrennung von Humanplasma auf einer fibrinogenhaltigen Agaroseplatte eine Trübung im  $\alpha_2$ -Globulinbereich, wenn man von einer parallel zur Trennungsrichtung liegenden Rille Gewebsthromboplastin (F III) und Calciumionen eindiffundieren läßt. Die Trübung bildet sich in der elektrophoretischen Position des Prothrombins, weil dort, ausgelöst durch das eindiffundierende Gewebsthromboplastin, Thrombin entstanden ist, erkennbar an der Trübung der Platte durch die Bildung von Fibrin. Der biologische Nachweis läßt sich auch mit dem immunologischen verknüpfen. Allerdings gelingt das nicht mit einem polyvalenten Antihumanserum, sondern nur mit einem spezifischen Antiserum gegen Prothrombin. Auf diese Weise kann man auch den Gehalt des Plasmas an Prothrombin quantitativ bestimmen. Mit 10–15 mg/100 ml liegt er in der Größenordnung des Humanplasminogengehalts<sup>[37]</sup>.

Prothrombin (F II) wird in der Leber Vitamin-K-abhängig zusammen mit den Faktoren VII, IX und X synthetisiert<sup>[35,36]</sup>. Diese vier Proteine werden als Faktoren des Prothrombinkomplexes zusammengefaßt. Bei schweren Lebererkrankungen ist ihre Synthese gestört. Das gilt auch für Vitamin-K-Mangelzustände, bedingt durch Schädigung oder Absterben der Darmflora, z. B. bei Diarrhoe, nach Behandlung mit nicht resorbierbaren Antibiotika oder beim Verschlukterus, bei dem die Fettresorption gestört und damit die Aufnahme von Vitamin K unterbunden ist.

Die Vitamin-K-Abhängigkeit der Synthese der Faktoren des Prothrombinkomplexes ist von großer pharmakologischer Bedeutung. Dicumarole und Indandione wirken nämlich als Vitamin-K-Antagonisten, die mit gutem Erfolg therapeutisch eingesetzt werden können, z. B. bei der Thrombose-Prophylaxe und der Behandlung des Herzinfarktes<sup>[35,36]</sup>. Die neuesten Ergebnisse über die Wirkung dieser Langzeitantikoagulantien widersprechen der ursprünglichen Vorstellung einer totalen Synthesehemmung. Die Therapeutica beeinflussen weniger die Synthesegeschwindigkeit des Prothrombinkomplexes als daß sie die Bildung eines biologisch nicht verwertbaren Prothrombinmoleküls induzieren, das zwar mit dem Prothrombinaktivator reagiert, aber dabei kein Thrombin bildet<sup>[35-38]</sup>.

[29] H. C. Hemker u. C. Haanen, Tijdschr. Geneeskunde 113, Nr. 5, S. 203 (1969).

[30] A. D. Bangham, Nature 174, 791 (1954).

[31] H. Prydz, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 17, Suppl 84, 78 (1965).

[32] C. M. Jackson u. D. J. Hanahan, Biochemistry 7, 4492, 4506 (1968).

[33] Y. Nemerson, Biochemistry 5, 601 (1966).

[34] W. J. Williams u. D. G. Norris, J. Biol. Chem. 241, 1847 (1966).

[35] H. C. Hemker, J. Van der Meer, R. Hodge u. E. A. Loeliger in J. Van der Meer: Pharmacological Aspects of Vitamin K 1. Schattauer-Verlag, Stuttgart 1968.

[36] E. F. Mammen, Internist 1, 2 (1969).

[37] P. O. Ganrot u. J. E. Nilén, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, 238 (1968).

[38] J. E. Nilén u. P. O. Ganrot, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 22, 17 (1968).

Für die Isolierung des Prothrombins verwendet man im Prinzip die gleichen Methoden wie für die Gewinnung von F X. Beide Proteine haben so ähnliche Eigenschaften, daß sie auch bei Verwendung der unterschiedlichsten Fraktionierungsmethoden nur schwer voneinander zu trennen sind. Auch hier muß einer autokatalytischen Inaktivierung während der Aufarbeitung vorgebeugt werden, und wohl deshalb ist es bisher noch nicht gelungen, ein nach allen Kriterien der Proteinchemie einheitliches Präparat zu gewinnen<sup>[39-41]</sup>.

Das Molekulargewicht von Prothrombin wurde zu 52000 bestimmt. Während der Aktivierung zerfällt das Molekül in mindestens drei Komponenten, von denen eine mit Thrombin (MG = 34000) identisch ist<sup>[25-27]</sup>. Die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin wird durch den Prothrombinaktivator katalysiert, den wir bereits als Komplex von Phospholipiden mit F Xa und F V sowie Calciumionen kennengelernt haben. Dabei handelt es sich dem Prinzip nach um eine gezielte proteolytische Hydrolyse, die auch von Trypsin katalysiert wird und die in 25proz. Na-Citratlösung autokatalytisch abläuft<sup>[9]</sup>. Allerdings katalysiert der F Xa allein die Reaktion nur ungenügend, obwohl er Argininester spaltet<sup>[32]</sup>. Im gereinigten System mit Prothrombin ist die Reaktion nur sehr träge. Die Zugabe von F V, Phospholipiden und Calciumionen erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 1000, ohne daß gleichzeitig die esterolytische Wirkung ansteigt. Das Ergebnis zeigt, daß F V sehr spezifisch die Prothrombinaktivierung beschleunigt, aber nur in phospholipid-haltigem Milieu. Aus diesem Grunde nimmt man an, daß sich die Prothrombinaktivierung an der Oberfläche der Lipidmicellen abspielt<sup>[42-44]</sup>. Diese Vorstellung würde auch die Wirkung der Langzeitantikoagulantien erklären: Das pathologisch abgewandelte Prothrombin blockiert kompetitiv den F Xa-F V-Lipid-Komplex (Prothrombinaktivator) und setzt dadurch die Umsatzgeschwindigkeit stark herab<sup>[35]</sup>.

Das Thrombin (F IIa) ist eine sehr spezifische Protease. Seine wichtigste Funktion ist die Gerinnung von Fibrinogen. Diese Eigenschaft verliert das Thrombin in zunehmendem Maß vom Augenblick seiner Bildung an, hingegen bleibt die esterolytische Aktivität relativ lange konstant<sup>[118]</sup>. Durch Acetylierung von Thrombin kann man ein Derivat herstellen, das nicht mehr die Gerinnung katalysiert, synthetische Ester aber wie Thrombin spaltet (Thrombin-E)<sup>[45]</sup>.

Prothrombin und F X haben viel gemeinsam; das gilt für den Bildungsort, die Isolierungsmethoden und die Eigenschaften, einschließlich der Enzymnatur. Somit könnte die Vorstellung gerechtfertigt sein, daß der F X

eine Untereinheit von Prothrombin ist, die milieuhabhängig neben Thrombin oder zusammen mit Thrombin aus dem Prothrombinmolekül gebildet wird<sup>[9]</sup>.

### 2.2.3. Die Entstehung und Vernetzung von Fibrin

Diese letzte Gerinnungsphase ist durch die Umwandlung von Fibrinogen (F I) in Fibrin und die anschließende Vernetzung der entstandenen Fibrinmonomeren charakterisiert; beide Reaktionen werden durch Enzyme katalysiert, nämlich durch Thrombin (F IIa) bzw. F XIIIa, eine Transglutaminase.

Die Gerinnung beginnt damit, daß Thrombin von den Fibrinogenmolekülen zwei relativ saure Peptide, die Fibrinopeptide A und B, abspaltet. Dabei entstehen die Fibrinmonomeren, die sich zu langen Polymersträngen mit dem Durchmesser eines Fibrinogenmoleküls zusammenlagern. Jeweils zwei Polymerstränge bilden Doppelstränge, aus denen durch seitliche Aggregation die Fibrinfibrillen entstehen<sup>[46]</sup>. Frisch gebildetes Fibrin ist nicht kovalent vernetzt, sondern durch Wasserstoffbrücken und hydrophobe Kräfte stabilisiert. Es ist daher in denaturierenden Agentien noch löslich. Die kovalente Vernetzung kommt erst unter der Einwirkung der Plasmatransglutaminase (F XIIIa) zustande, die aus F XIII durch Thrombin in Gegenwart von Calciumionen freigesetzt wird (vgl. Schema 2). Die Vernetzung erfolgt über Säureamidbindungen zwischen den  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins und Glutaminylresten, vorwiegend zwischen Fibrinmonomeren eines Doppelstranges (Abb. 1)<sup>[47-49,51]</sup>.

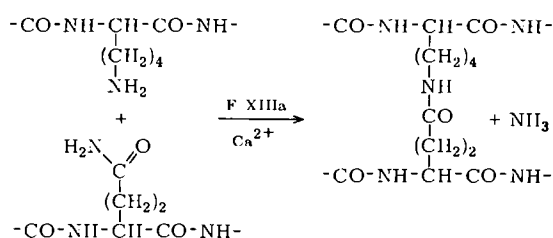


Abb. 1. Wirkungsweise der Plasmatransglutaminase (F XIIIa).

Mit der kovalenten Vernetzung ist die Gerinnung abgeschlossen. In das Gerinnsel wandern Fibroblasten ein, deren Wachstum durch F XIIIa gefördert wird<sup>[50]</sup>. Das von den Fibroblasten synthetisierte Kollagen ersetzt zunehmend das Fibrin, das nun nicht mehr notwendig ist und abgebaut wird. Damit ist die Wundheilung in ihre Endphase getreten<sup>[52,53]</sup>.

[39] D. Heene in H. Schröer: Biochemie und Aktivierung des Prothrombins. Schattauer-Verlag, Stuttgart 1968, S. 3.

[40] G. F. Lanchantin u. J. A. Friedmann, Vox Sanguinis 9, 228 (1964).

[41] W. H. Seegers et al., Texas Rep. Biol. Med. 23, 675 (1965).

[42] P. G. Barton u. D. J. Hanahan, Nature 214, 923 (1967).

[43] P. A. Owren: Coagulation of Blood, Investigation on a New Clotting Factor. J. Chr. Gundersen, Oslo 1947.

[44] M. P. Esnouf u. F. Jobin, Biochem. J. 102, 660 (1967).

[45] R. H. Landaburu u. W. H. Seegers, Can. J. Biochem. Physiol. 37, 1361 (1959).

[46] R. Gollwitzer, E. Karges, H. Hörmann u. K. Kühn: Biochim. Biophys. Acta 207, 445 (1970).

[47] R. Kriel, A. G. Loewy, K. Dunathau u. H. J. Wolfinger, J. Biol. Chem. 236, 2625 (1961).

[48] A. G. Loewy, S. Matacic u. H. J. Darnell, Arch. Biochem. Biophys. 113, 435 (1966).

[49] B. Blombäck in W. H. Seegers: Blood Clotting Enzymology. Academic Press, New York 1967, S. 628.

[50] E. Beck, F. Duckert, A. Vogel u. M. Ernst, Z. Zellforsch. 57, 327 (1962).

[51] K. Laki u. G. Lorand: Science 108, 280 (1948).

### 3. Fibrinolyse

Das fibrinolytische System ist einfacher und übersichtlicher als das Gerinnungssystem: Die Aktivatoren des Plasminogens liegen bereits als solche vor und müssen nicht erst aus mehreren Plasmafaktoren unter Einbeziehung zellulärer Einschlüsse aufgebaut werden. Alle an der Fibrinolyse beteiligten Faktoren sind Proteine, die sich mit den in der Proteinchemie gebräuchlichen Methoden charakterisieren lassen.

#### 3.1. Humanplasminogen (Proaktivator-Plasminogen<sup>[\*]</sup>) und Plasmin

Das Humanplasminogen besitzt eine Eigenschaft, die dem Plasminogen vieler Tierarten fehlt: Unter der Einwirkung eines Stoffwechselproduktes  $\beta$ -hämolisierender Streptokokken, der Streptokinase, wandelt es sich in Plasmin um. Bei dieser Reaktion entsteht als Intermediärprodukt ein Komplex, der die gleiche biologische Wirkung wie die körpereigenen Aktivatoren hat (siehe Abschnitt 3.2). Im Hinblick auf diese doppelte Funktion benutzen wir für Humanplasminogen auch den Terminus Proaktivator-Plasminogen (PP)<sup>[56]</sup>.

Das Plasmin ist die wirksamste Protease, die im Blut als inaktive Vorstufe zirkuliert. Die Konzentration des Proenzyms im Humanplasma liegt bei 15–20 mg/100 ml<sup>[57]</sup>. Da Humanplasma 7–8 g Protein in 100 ml enthält, setzt die Isolierung des Proenzyms, des Humanplasminogens, eine 350fache Anreicherung voraus. Die Isolierung aus Humanplasma gelingt dem Prinzip nach ausgehend von der Cohn-Fraktion III, einem Präzipitat, das man über eine stufenweise Alkoholfällung erhält, entweder durch Extraktion des Fällungsrückstandes mit Mineralsäuren<sup>[58]</sup> oder mit Lysin- und auch  $\epsilon$ -aminocapronsäurehaltigen Puffern<sup>[59]</sup> und anschließender Ionenaustauscherchromatographie, ebenfalls unter Verwendung dieser Aminosäuren als Verdrängungsmittel<sup>[60]</sup>.

Die Wirkung dieser basischen Aminosäuren, die die Löslichkeit des Humanplasminogens verbessern, gleichzeitig aber auch die Aktivierung hemmen, beruht auf

einer Wechselwirkung mit dem Plasminogenmolekül, wahrscheinlich auf Basis einer Salzbindung<sup>[56]</sup>. Da viele Plasminogen-Präparationen bei physiologischen Bedingungen relativ schlecht löslich sind, haben sich Zusätze dieser Aminosäuren zum Puffer oder auch zum Träger bei der Elektrophorese bewährt.

Hochgereinigtes Humanplasminogen sedimentiert im Schwerfeld der Ultrazentrifuge mit einer Sedimentationskonstanten von  $S_{20,w} = 4.1$ . Aus der Diffusionskonstanten  $D_{20,w} = 3.96$  und dem partiellen spezifischen Volumen von 0.72 läßt sich ein Molekulargewicht von annähernd 90000 errechnen. Im elektrischen Feld wandert das Humanplasminogen einheitlich mit der Beweglichkeit der  $\beta$ -Globuline des Humanplasmas. Durch Immunelektrophorese und Verwendung eines monospezifischen Antiserums gelingen der Nachweis und auch die quantitative Bestimmung direkt im Plasma.

In der Polyacrylamidgel-Elektrophorese, bei Bedingungen also, unter denen die Proteine zusätzlich zu ihrer Ladung auch nach ihrer Molekülform und Größe getrennt werden, wandert das Humanplasminogen in mehreren Banden (Abb. 5). Als Ursache kommen geringfügige Unterschiede in der Ladung oder in der Molekülgröße und Form in Betracht; diese wären darauf zurückzuführen, daß das Molekül bei pH-Verschiebungen seine Struktur ändert. Über die Reaktion des Humanplasminogens mit Aktivatoren und dem homologen Antikörper läßt sich beweisen, daß alle Banden die gleiche Spezifität haben: Wenn man nämlich ein ungefärbtes Pherogramm von Humanplasminogen mit einem dünnen Agarfilm überschichtet und gegen die vom Polyacrylamidgel in das Agar eindiffundierten Komponenten das Antiserum einwandern läßt, so bildet sich ein Immupräzipitat, das sich über den ganzen Bereich erstreckt, in dem die einzelnen Banden liegen. In der gleichen elektrophoretischen Position wandert Humanplasminogen auch im Serumverband, wie man mit derselben Technik demonstrieren kann.

Das Humanplasminogen ist vorwiegend aus Aminosäuren aufgebaut<sup>[61]</sup>; der Kohlenhydratgehalt beträgt nur 1.4%<sup>[60]</sup>. Die Bausteine sind in einer Polypeptidkette angeordnet, die durch 22 Disulfidbrücken zusammengehalten wird und Lysin als N- und Asparagin als C-terminale Aminosäure enthält<sup>[63]</sup>.

Das aktivierte Molekül, Plasmin, hat zwei zusätzliche Endgruppen: N-terminal Valin, C-terminal Arginin (Abb. 2). Der Aktivierungsvorgang ist also dadurch gekennzeichnet, daß sich das Humanplasminogen in zwei Ketten auflöst, die aber erst auseinanderfallen, wenn eine der 22 Disulfidbrücken reduziert wird. Größere Peptidanteile werden während der Aktivierung offenbar nicht abgespalten, wohl aber ändert sich die Form des Moleküls: der Sedimentationskoeffizient wird größer und der Reibungskoeffizient kleiner. Die Änderung dieser physikalischen Größen sowie das Auftreten von zwei zusätzlichen Endgruppen während der Aktivierung ist weitgehend unabhängig vom Aktivierungsmodus. Bewiesen ist sie für autokatalytisch aktiviertes Plasmin sowie für folgende Aktivatoren: Schweineherz-Aktivator, Urokinase, Streptokinase und Trypsin<sup>[64]</sup>.

[61] K. C. Robbins, L. Summaria, D. Elwyn u. G. H. Barlow, J. Biol. Chem. 240, 541 (1965).

[62] H. G. Schwick in: Verhandl. d. Dtsch. Arbeitsgemeinschaft f. Blutgerinnungsforsch., 9. Tagung, Freiburg 1965. Schattauer-Verlag, Stuttgart 1967.

[63] K. C. Robbins, L. Summaria, B. Hsieh u. I. Shah, J. Biol. Chem. 242, 2333 (1967).

[64] L. Summaria, B. Hsieh u. K. C. Robbins: J. Biol. Chem. 242, 4279 (1967).

[\*] Wir bevorzugen diesen funktionellen Terminus, da Humanplasminogen mit Streptokinase, einem Stoffwechselprodukt  $\beta$ -hämolisierender Streptokokken, sowohl Aktivator als auch Plasmin bildet (s. Abschnitt 3.2) und sich dadurch vom Plasminogen der meisten Säugetiere unterscheidet [56].

[52] E. Beck, F. Duckert u. M. Ernst, Thrombos. Diathes. Haemorrh. 6, 485 (1961).

[53] F. Duckert, Thrombos. Diathes. Haemorrh. Suppl. 13, 115 (1963).

[54] D. Papahadjopoulos, C. Hougie u. D. Hanahan, Biochemistry 3, 2 (1964).

[55] S. Magnusson, Arkiv Kemi 24, 367 (1965).

[56] N. Heimburger u. H. G. Schwick, Thrombos. Diathes. Haemorrh. 7, 444 (1962).

[57] H. G. Schwick u. N. Heimburger, Internat. Symposium über therapeut. u. experiment. Fibrinolyse. Ulm 1967, Schattauer-Verlag, Stuttgart 1969.

[58] D. L. Kline, J. Biol. Chem. 204, 949 (1953).

[59] N. Alkjaersig, P. Fletcher u. S. Sherry, J. Biol. Chem. 234, 832 (1959).

[60] P. Wallén u. K. Bergström, Acta Chem. Scand. 13, 1464 (1959).

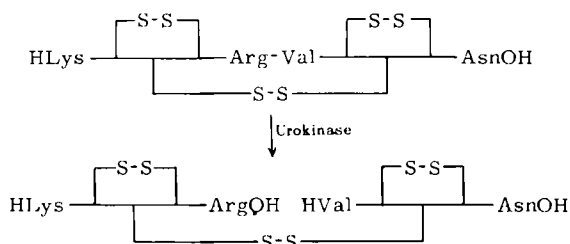


Abb. 2. Aktivierung von Plasminogen (oben) durch Urokinase zu Plasmin (unten), schematisch. Es sind nur drei der insgesamt 22 Disulfidbrücken eingezeichnet [63].

Das Plasmin ist eine Endopeptidase; daher zieht man zur Aktivitätsbestimmung die Hydrolysegeschwindigkeit von Fibrin und Casein oder auch von synthetischen Lysin- und Arginestern heran. Plasmin katalysiert aber nicht nur die Hydrolyse von Fibrin, sondern auch von anderen Plasmaproteinen. Dazu gehören auch bestimmte Gerinnungsfaktoren einschließlich des Fibrinogens (Schema 4). Das ist von besonderem physiologischem Interesse, da dieser Gerinnungsstatus symptomatisch für eine pathologisch gesteigerte Fibrinolyse ist.

### 3.2. Aktivierung des fibrinolytischen Systems

Das fibrinolytische System kann nach drei Prinzipien aktiviert werden:

1. durch direkte Umwandlung des Proenzym, wie sie physiologisch durch die körpereigenen Aktivatoren sowie durch einige Proteasen katalysiert wird;
2. über eine Zweiphasen-Reaktion, bei der als Intermediärprodukt ein Aktivator entsteht, der die gleichen biologischen Eigenschaften hat wie die körpereigenen Aktivatoren. Zu den relativ seltenen Proteinen mit diesem Wirkungsprinzip gehört die Streptokinase;
3. indirekt durch Verbindungen mit zum Teil sehr unterschiedlicher Struktur<sup>[62]</sup>.

#### 3.2.1. Einphasen-Aktivierung

Die natürlichen Aktivatoren sind im Organismus weit verbreitet. Enzymchemisch sind sie dadurch charakterisiert, daß sie die Hydrolyse synthetischer Lysin- und Arginester katalysieren, nicht aber die Hydrolyse hochmolekularer Proteine einschließlich des Fibrins<sup>[65]</sup>. Abgesehen davon, daß die Aktivatoren keine hochmolekularen Proteine spalten, haben sie offenbar eine ähnliche Substratspezifität wie Trypsin, das selbst auch in katalytischen Mengen das Humanplasminogen aktiviert. Diese Tatsache steht im Einklang mit dem Befund, daß die Aktivierung des Proenzym durch die Hydrolyse einer Arginyl-Valin-Bindung charakterisiert ist (Abb. 2)<sup>[64]</sup>.

Der Aktivatorgehalt der Gewebe ist recht unterschiedlich<sup>[66]</sup>. Aktivatorreich sind z. B. Uterus, Nebennieren,

Lunge und Prostata. Wenig Aktivator findet man in den Testis, der Milz und gar keinen in der Leber. Hohe Aktivatorkapazitäten gewährleisten eine gute Liquidität des Blutes in den betreffenden Organen. So ist auch das Flüssigbleiben oder die Wiederverflüssigung des Menstrualblutes zu verstehen.

Die Reindarstellung von Gewebeaktivatoren ist relativ problematisch, da das Wirkungsprinzip vielfach an strukturierte Elemente gebunden ist. Es läßt sich mit konzentrierter Thiocyanatlösung herauslösen, fällt aber dann in physiologischer Kochsalzlösung wieder aus. Bisher konnten zwei Aktivatoren aus tierischem Gewebe isoliert werden, der eine aus dem Herzmuskel<sup>[67]</sup>, der andere aus den Ovarien von Schweinen<sup>[65,68]</sup>; letzterer hat ein Molekulargewicht von 58000 und ähnliche protein- und enzymchemische Eigenschaften wie die aus menschlichem Urin gewonnene Urokinase. Beide Gewebeaktivatoren sind in physiologischem Milieu nur begrenzt löslich.

Zu den zellulären Elementen des Blutes, in denen Aktivatoren nachgewiesen wurden, gehören die Thrombocyten und Erythrocyten; das aktive Prinzip der Erythrocyten, eine Erythrokinase, konnte bereits hochgereinigt werden<sup>[69]</sup>. Relativ reich an Aktivatoren sind bestimmte Körperflüssigkeiten und Sekrete, z. B. der Urin (Urokinase), das Fruchtwasser und die Muttermilch, aber auch in der Tränenflüssigkeit, im Speichel und Sperma findet man Aktivatoren. Überall dort also, wo Körperflüssigkeiten und Sekrete kapilläre, verschlußgefährdete Röhrensysteme durchfließen, stellt der Organismus hohe Kapazitäten bereit.

Einer dieser gut löslichen Aktivatoren ist die Urokinase, die mit analytischem Reinheitsgrad aus menschlichem Urin gewonnen wurde. Aus 2300 Litern wurden 29 mg Substanz kristallin isoliert; die Ausbeute betrug 24%<sup>[70]</sup>. Die Urokinase, die in den Nierenzellen gebildet wird, hat ein Molekulargewicht von 53000<sup>[71]</sup>. Wie alle körpereigenen Aktivatoren ist sie eine Esterase, die Fibrin nicht hydrolysiert. Das läßt sich sehr anschaulich mit einer abgewandelten Immunoelktrophorese-Technik zeigen, die einen fibrinhaltigen Agarfilm als Träger verwendet<sup>[72]</sup>. Dieser opaleszente Träger ist ein empfindlicher Enzymindikator: Nach der Elektrophorese von enzym- oder aktivatorhaltigen Lösungen hellt sich die Fibrinplatte jeweils in den elektrophoretischen Bereichen auf, in denen Enzyme liegen oder gebildet werden. Urokinase und auch andere Aktivatoren lysieren den Fibrinfil selbst nicht. Läßt man jedoch senkrecht zur Trennungsrichtung der Aktivatoren Humanserum oder Plasminogen in den Fibrinfil eindiffundieren, so tritt im Bereich, in dem die Aktivatoren liegen und bei der anschließenden Diffusion auf das Proenzym stoßen und dieses aktivieren, eine bogenförmige Lysiszone auf. Ein solches Pherogramm veranschaulicht das ganze Prinzip, nach dem das fibrinolytische System organisiert ist: weder der Aktivator noch das Humanserum wirken spontan fibrinolytisch; die Bildung von Plasmin setzt die Freisetzung von Aktivatoren voraus (Abb. 3).

[67] F. Bachmann, N. Fletcher, N. Alkjaersig u. S. Sherry, *Biochemistry* 3, 1578 (1964).

[68] T. Astrup u. P. Kok, *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 13, 587 (1965).

[69] A. J. Johnson, 10. Kongr. Int. Ges. f. Haemat., Stockholm 1964.

[70] A. Lesuk, L. Terminillo u. J. H. Traver, *Science* 147, 3660 (1965).

[71] R. H. Painter in: Intern. Sympos. Anticoagulants and Fibrinolysis. Lea and Febiger, Philadelphia 1961, S. 351.

[72] N. Heimburger u. G. Schwick, *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 7, 432 (1962).

[65] P. Kok u. T. Astrup, *Biochemistry* 8, 79 (1969).

[66] O. K. Albrechtsen, *Acta Endocrinol.* 23, 207 (1956).



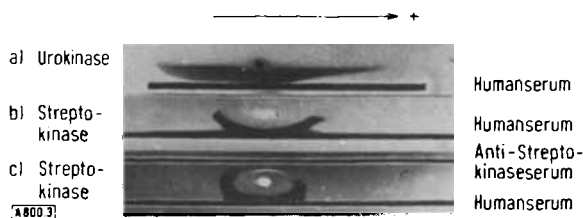


Abb. 3. Nachweis von Plasminogenaktivatoren mit der Fibrinagar-Elektrophorese über die Aktivierung des Humanplasminogens im Humanserum (a + b) bei gleichzeitiger immunologischer Darstellung (c).

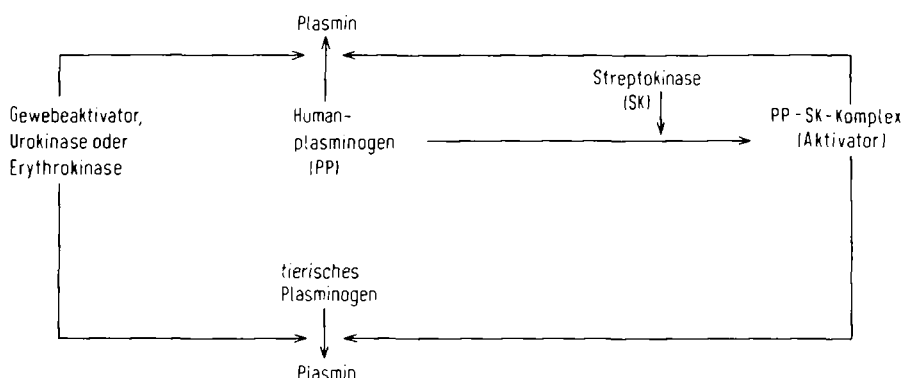
Daß auch Trypsin die Aktivierung von Humanplasminogen katalysiert und sich dieses auch autokatalytisch in Plasmin umwandelt<sup>[73]</sup>, sei des Aktivierungsprinzips wegen noch einmal erwähnt; biologisch dürfte es kaum von Interesse sein.

### 3.2.2. Zweiphasen-Aktivierung

Neben den körpereigenen Aktivatoren, die zu den Esterasen gehören und Plasminogen direkt in Plasmin umwandeln, gibt es Katalysatoren biologischer Herkunft, die aus Proaktivatoren erst Aktivatoren freisetzen, die dann in einer Sekundärreaktion die Bildung von Plasmin katalysieren.

### 3.2.3. Die Wirkungsweise der Streptokinase

Die Streptokinase ist offenbar kein Enzym, weder eine Esterase wie die körpereigenen Aktivatoren noch eine Protease. Im Gegensatz zu diesen wird sie durch Umsetzung mit Diisopropylfluorophosphat nicht inaktiviert<sup>[77]</sup>. Demnach wirkt sie anders als Urokinase oder andere körpereigene Aktivatoren. Damit in Einklang steht, daß tierisches Plasminogen, z. B. Rinderplasminogen, nicht durch Streptokinase aktiviert wird, sondern weitgehend spezifisch nur Humanplasminogen<sup>[78, 79]</sup>. Daher ist die Hypothese gerechtfertigt, daß die Aktivierbarkeit durch Streptokinase eine bestimmte Aminosäuresequenz und Konformation des Plasminogenmoleküls voraussetzt. Bei der Umsetzung von Humanplasminogen mit Streptokinase entsteht primär der Aktivator; in einer Sekundärreaktion bildet sich erst das Plasmin. Der Aktivator, der physikalisch-chemisch als Komplex aus Humanplasminogen und Streptokinase charakterisiert ist, katalysiert vergleichbar mit den natürlichen Aktivatoren die Umwandlung von menschlichem und tierischem Plasminogen<sup>[56, 57]</sup> (Schema 3). Aus diesem Grund haben wir für Humanplasminogen den Terminus Proaktivator-Plasminogen vorgeschlagen.



Schema 3. Aktivierung von tierischem und menschlichem Plasminogen mit körpereigenen Aktivatoren und mit Streptokinase.

Dieses Aktivierungsprinzip wird vom tierischen Organismus nur wenig verwendet und ist daher als Sonderfall der Plasminogen-Aktivierung zu betrachten, dem aber therapeutisch großes Interesse zukommt. Bisher wurde nur aus Asciteszellen eine Kinase mit diesen Eigenschaften isoliert<sup>[74]</sup>. Weit besser untersucht als die Wirkungsweise dieser Lysokinase ist die der Streptokinase, die eines der vielen Stoffwechselprodukte  $\beta$ -hämolisierender Streptokokken ist. Streptokinase wird bereits seit mehreren Jahren nach den Verfahren der modernen Fermentertechnik im industriellen Maßstab für die fibrinolytische Therapie hergestellt.

Die Streptokinase ist ein Protein und wurde mit den gebräuchlichen Methoden charakterisiert: Sie sedimentiert homogen in der Ultrazentrifuge und wandert wie ein  $\alpha_2$ -Globulin des Humanserums einheitlich in der freien Elektrophorese, in der Immunoelektrophorese und im Polyacrylamidgel. Das Molekül (Molekulargewicht = 47 000) besteht aus nur einer Peptidkette, in der die Aminosäuren mangels Cysteins ohne jede intramolekulare Stabilisierung durch Disulfidbrücken angeordnet sind<sup>[57, 75, 76]</sup>.

Aktivator und auch Plasmin werden über die Lysisgeschwindigkeit eines Fibringerinnsels bestimmt, das man durch Umsetzung einer Fibrinogenlösung mit Thrombin herstellt. Für die Aktivatorbestimmung verwendet man Gerinnsel aus Rinderfibrin, das im allgemeinen, d. h. wenn es mit den üblichen Methoden gewonnen wurde, relativ große Mengen Rinderplasminogen adsorbiert enthält. Wie bereits betont, wird es durch Aktivatoren, nicht aber durch Streptokinase in Plasmin überführt. Plasmin, das proteolytische Enzym, bestimmt man über die Hydrolyse von Casein oder Gerinnseln aus plasminogenfreiem Fibrinogen. Ein Maß für die Aktivator- bzw. Plasminaktivität ist dabei die Verdünnung, in der das Gerinnsel von der Testlösung in 15 min lysiert wird; sie geht als reziproker Wert in die Berechnung ein.

[73] J. H. Lewis u. J. H. Ferguson, Amer. J. Physiol. 170, 636 (1952).

[74] H. C. Kwaan, Thrombos. Diathes. Haemorrh. Suppl. 1 ad 6, 75 (1961).

[75] N. Heimburger, Behringwerk-Mitt. 41, 84 (1962).

[76] H. G. Schwick, Behringwerk-Mitt. 44, 103 (1964).

[77] F. Buck u. E. C. De Renzo, Biochim. Biophys. Acta 89, 348 (1964).

[78] S. Müllertz u. M. Lassen, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 82, 264 (1953).

[79] S. Müllertz, Biochem. J. 61, 424 (1955).

Das Verhältnis, in dem Aktivator und Plasmin unter der katalytischen Einwirkung von Streptokinase aus Humanplasminogen gebildet werden, läßt sich gut veranschaulichen<sup>[80]</sup>. Abbildung 4 zeigt die graphische Auswertung einer Versuchsreihe, in der jeweils eine konstante Menge Humanplasminogen (PP) mit abgestuften Mengen Streptokinase (SK) umgesetzt und die Aktivierungsansätze auf Aktivator- und Plasminaktivität geprüft wurden. Wie man sieht, genügt bereits eine relativ niedrige

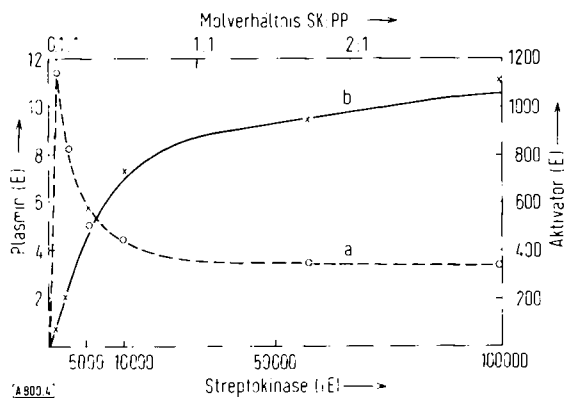


Abb. 4. Die Plasmin- und Aktivatorkapazität einer konstanten Menge Humanplasminogen als Funktion der für die Aktivierung verwendeten Einheiten Streptokinase, bestimmt an Gerinnseln aus reinem Rinderfibrinogen (a, Plasmin) und plasminogenhaltigem Rinderfibrinogen (b, Aktivator). E = Einheiten.

Streptokinase-Dosis, um maximal die Bildung von Plasmin zu katalysieren. Von besonderer Bedeutung ist, daß in demselben Maß wie mit höheren Streptokinase-Konzentrationen der Plasmingehalt abfällt, die Aktivatorkapazität ansteigt. Die quantitative stöchiometrische Auswertung der Versuche lehrt, daß bei einem Molverhältnis von PP:SK wie 1:0.1 optimal Plasmin gebildet wird, die maximale Aktivatorkapazität aber erst bei äquimolaren Verhältnissen erreicht wird. Schließlich bemerkt man, daß der Aktivator im Gegensatz zu Plasmin nur schwach proteolytisch wirksam ist. Damit in Einklang stehen die unter gleichen Bedingungen bei der Caseinolyse gemessenen Werte<sup>[80]</sup>. Aufgrund dieser Befunde entwickelten wir die Arbeitshypothese, daß der Aktivator ein an Streptokinase gebundenes Plasmin ist, das seine proteolytische Aktivität verloren, seine esterolytische Aktivität aber behalten hat<sup>[57,81]</sup>.

Für die Beweisführung ist wesentlich, daß auch Plasmin mit Streptokinase einen Aktivator-Komplex bildet. Das läßt sich anschaulich mit der Technik der Fibrinagar-Elektrophorese demonstrieren. Wenn man Streptokinase auf einer Fibrinagarplatte elektrophoretisch auftrennt und anschließend Plasmin – hergestellt aus Humanplasminogen (PP) und Streptokinase (SK) im Molverhältnis 1:0.2 – von einer parallel zur Trennungsrichtung gezogenen Rille in das Gel eindiffundieren läßt, dann beobachtet man im elektrophoretischen Wanderungsbereich

der Streptokinase eine Hemmung der fibrinolytischen Aktivität des Plasmins. Tropft man innerhalb der Hemmzone Rinderserum auf die Platte, das mit Streptokinase nicht reagiert, so bildet sich ein Lysishof um den Auftragsort. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da im Bereich, in dem das Plasmin (Molverhältnis PP:SK = 1:0.2) auf die Streptokinase stößt, das Molverhältnis PP:SK den Wert von 1:1 erreicht: Mithin liegen optimale Bedingungen für die Bildung eines Aktivators vor. Bei diesem Molverhältnis findet man auch an Casein und plasminogenfreiem Rinderfibrinogen als Substrat nur noch eine schwache proteolytische Restaktivität (Abb. 4), die nicht mit Sicherheit dem Aktivator selbst zuzuordnen ist, da dieser relativ labil ist und unter Freisetzung von Plasmin zerfällt.

Plasmin und Aktivator, die bei der Wechselwirkung zwischen Humanplasminogen und Streptokinase entstehen, lassen sich proteinchemisch mit den gebräuchlichen Methoden charakterisieren. Besonders anschaulich gelingt das mit der Polyacrylamidgel-Elektrophorese, die eine hohe Trennleistung hat (Abb. 5).

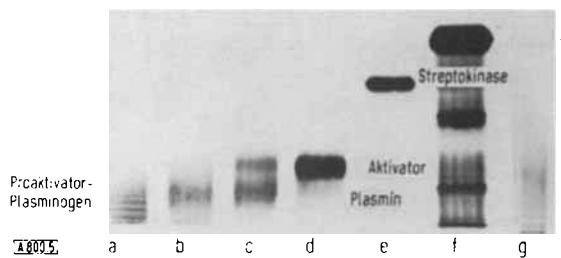


Abb. 5. Polyacrylamidgel-Elektrophorese. a) Humanplasminogen (Proaktivator-Plasminogen, PP); b) PP aktiviert mit Urokinase; c) PP aktiviert mit Streptokinase, Molverhältnis 1:0.2; d) PP aktiviert mit Streptokinase, Molverhältnis 1:1; e) Streptokinase; f) Humanserum; g) PP aktiviert mit Streptokinase, Molverhältnis 1:1, in 8M Harnstofflösung.

Die Beobachtung, daß Humanplasminogen in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese in mehreren Banden wandert, obwohl es in der Papier- und Immunelektrophorese und in der Ultrazentrifuge einheitlich ist, wurde bereits erwähnt. Im Gegensatz dazu wandert Plasmin, das durch Urokinase-Aktivierung von Humanplasminogen hergestellt wurde, nahezu homogen. Eine Komponente mit der gleichen Beweglichkeit findet man im elektrophoretischen Muster eines Aktivierungsansatzes aus Humanplasminogen und Streptokinase im Molverhältnis 1:0.2; zusätzlich tritt noch eine schnellere auf. Da wir wissen, daß Urokinase lediglich die Bildung von Plasmin katalysiert, erscheint es logisch, die langsame Bande dem Plasmin und die schnellere dem Aktivator zuzuordnen, zumal der Aktivierungsansatz aus äquimolaren Mengen der Bestandteile nur durch diese Komponente charakterisiert ist, die ziemlich genau zwischen Humanplasminogen und Streptokinase wandert. Mit immunologischen Methoden kann man in dieser Bande sowohl Plasminogen als auch Streptokinase nachweisen. Der Aktivator verhält sich also wie ein Komplex aus den beiden Reak-

[80] N. Heimbürger in: Sympos. d. Dtsch. Gesellsch. f. Angiologie, München. Schattauer-Verlag, Stuttgart 1967, S. 7.

[81] N. Heimbürger, 16. Annual Sympos. on Blood, Detroit, Wayne State Univ., Januar 1968; Thrombos. Diathes. Haemorrh. 19, 598 (1968).

[82] E. C. De Renzo, Thrombos. Diathes. Haemorrh., Suppl. 1 ad 6, 134 (1961).

tanden<sup>[56]</sup>. Aus der Sedimentationsanalyse des Aktivators läßt sich ein Molekulargewicht errechnen, das der Summe der Molekulargewichte von Plasminogen (oder Plasmin; vgl. Abb. 2) und Streptokinase entspricht<sup>[82]</sup>.

Der Aktivator ist ein relativ labiles Intermediärprodukt, offenbar deswegen, weil stets und unabhängig von der Zusammensetzung Spuren von Plasmin entstehen. So ist auch zu verstehen, daß der Komplex bei 0° C über mehrere Tage stabil bleibt, aber bei 37° C innerhalb weniger Stunden zerfällt<sup>[83]</sup>. Dabei entsteht progradient Plasmin, das über die Hydrolyse der Streptokinase auch den Zerfall des Aktivators katalysiert.

Der Komplex wird nur durch physikalische Kräfte zusammengehalten; er zerfällt in wasserstoffbrücken-sprengenden Medien, z. B. in hochkonzentrierten Harnstofflösungen (Abb. 5). Bei dieser chemischen Dissoziation bildet sich innerhalb kurzer Zeit relativ viel Plasmin, das zu totaler Hydrolyse der Streptokinase unter Bildung zahlreicher Spaltprodukte führt.

Alle bisher vorliegenden Befunde rechtfertigen folgende Vorstellung von der Wirkungsweise der Streptokinase: Als Intermediärprodukt der Aktivierung von Humanplasminogen entsteht ein Komplex, der durch Wasserstoffbrücken und hydrophobe Kräfte zusammengehalten wird. Dieser Komplex ist hinsichtlich seiner Spezifität mit den körpereigenen Aktivatoren zu vergleichen (Schema 3); er ist jedoch nicht stabil und zerfällt unter der katalytischen Einwirkung von Plasmin in einer temperaturabhängigen Reaktion. In der Kälte verbinden sich auch Plasmin und Streptokinase zu einem Aktivator. Ein mit Diisopropylfluorophosphat inaktiviertes Humanplasminogen bindet zwar Streptokinase, ist aber biologisch nicht mehr wirksam, d. h., sowohl das Plasmin als auch der Aktivator haben das gleiche aktive Zentrum, nämlich einen reaktiven Serinrest<sup>[84]</sup>. Demzufolge erweist sich der Aktivator als ein modifiziertes Plasmin, das durch die Anlagerung der Streptokinase seine breite proteolytische Wirkung verloren, aber gleichzeitig die Spezifität körpereigener Aktivatoren gewonnen hat. Ungeklärt ist noch, wie sich dieser Komplex aus dem Proenzym bilden kann, da die Streptokinase offenbar keine enzymatische Aktivität besitzt.

3.2.4. Indirekte Aktivierung

Es gibt eine Fülle chemisch definierter Substanzen mit zum Teil sehr unterschiedlicher pharmakologischer Wirksamkeit, die auch die Fibrinolyse stimulieren. Dazu gehören das Heparin und seine Abkömmlinge, aber auch die unterschiedlichsten Derivate der Salicyl- und Nicotinsäure, Hormone einschließlich der anabolischen Formen und auch bestimmte Antidiabetika<sup>[62]</sup>. Ihre Wirkungsweise ist noch weitgehend unbekannt. Da sie zum Teil in vitro unwirksam sind, rechnen wir diese Verbindungen zu den indirekten Fibrinolytika. Dazu zählen auch das Heparin mit seinen Derivaten, das sowohl für die Prophylaxe als auch für die Therapie thrombo-embolischer Erkrankungen viel verwendet wird. Wie der fibrinolytische Effekt des Heparins zustande kommt, ließ sich

bisher nicht nachweisen. Die Nicotinsäurederivate wirken über eine Mobilisierung endogener Faktoren. Zu den strukturell sehr unterschiedlichen Verbindungen mit auch in vitro meßbarer Aktivität gehören ganz besonders die Salicylsäurederivate, die zum Teil sowohl das Plasminogen aktivieren als auch die Antiplasmine blockieren<sup>[57, 85-87]</sup>. Die Wirkung der Hormone einschließlich der Anabole und auch der Antidiabetika<sup>[88-91]</sup> dürfte auf eine Anregung des Stoffwechsels und Verschiebung des Stoffwechselgleichgewichts zurückzuführen sein.

4. Die Inhibitoren der Blutgerinnung und Fibrinolyse

Blutgerinnung und Fibrinolyse werden von Inhibitoren gesteuert, die die Aktivierung auf verschiedenen Stufen blockieren können.

Nach einer nicht mehr zeitgemäßen Einteilung enthält das Humanserum sechs Antithrombine<sup>[116]</sup> (Tabelle 2), die alle Proteincharakter haben. Als Thrombininhibitoren im strengen Sinne sind jedoch nur zwei anzusehen. Aus der Nomenklatur der Antithrombine sind die funktionellen Beziehungen ersichtlich.

Tabelle 2. Antithrombine des Humanserums.

Antithrombin	Herkunft oder Wirkung
I	Fibrin (Adsorptionseffekt)
II	Heparin-Cofaktor
III	Progressiv-Antithrombin [a]
IV	Reaktionsprodukt aus der
	Prothrombin-Aktivierung
V	Pathologisch erhöhte Immunglobuline:
	Antikörper?
VI	Fibrinogenspaltprodukte

[a] Siehe auch Tabelle 3.

So erhielt das Fibrin die Bezeichnung Antithrombin I, weil es verhältnismäßig sehr viel Thrombin binden kann<sup>[92]</sup>. Die Spaltprodukte, die das Plasmin aus Fibrin und Fibrinogen freisetzt und die bei einer pathologisch gesteigerten Fibrinolyse auch im Blut zirkulieren und daher für die Diagnostik herangezogen werden, wurden als Antithrombin VI eingestuft<sup>[93]</sup>. Die Hydrolyseprodukte wirken über die Hemmung der Fibrin-Polymerisation. Die Tatsache, daß Plasmin aus Fibrin ein Spalt-

[83] N. Heimbürger, unveröffentlicht.  
[84] L. Summaria, B. Hsieh, W. R. Groskopf u. K. C. Robbins, J. Biol. Chem. 242, 5046 (1967).  
[85] K. N. von Kaulla: Chemistry of Thrombolysis: Human Fibrinolytic Enzymes. C. Thomas Publ., Springfield (USA) (1963).  
[86] K. N. von Kaulla, Arzneimittelforsch. 15, 246 (1965).  
[87] K. N. von Kaulla, Federation Proc. 25, 57 (1966).  
[88] G. R. Fearnly, Brit. Med. Bull. 20, 185 (1964).  
[89] G. R. Fearnly, R. Chakrabarti u. C. T. Vincent, Lancet II, Nr. 7151, 622 (1960).  
[90] R. Chakrabarti, G. R. Fearnly u. E. D. Hocking, Brit. Med. J. 534 (1964).  
[91] R. Holemans, Amer. J. Physiol. 208, 511 (1965).  
[92] W. H. Seegers, M. Nieft u. E. C. Loomis, Science 101, 520 (1945).  
[93] S. Niewiarowski, Z. Latallo u. J. Stachurska, Rev. Haemat. 13, 320 (1958).

produkt mit Antithrombinwirkung freisetzen kann, ist von besonderem physiologischem Interesse, denn über diese Reaktion sind Gerinnung und Fibrinolyse kompensatorisch miteinander verknüpft. Das Antithrombin IV wird während der Prothrombinaktivierung freigelegt<sup>[94]</sup>, und zwar offenbar in einer Konzentration, die in einer bestimmten Proportion zum entstandenen Thrombin steht. Dieses Prinzip der Thrombin-Neutralisation entspricht dem der Rückkoppelung. Das Antithrombin V<sup>[117]</sup> ist ein pathologischer Faktor und wahrscheinlich mit einem Antikörper gegen Thrombin identisch.

Die potentesten Hemmkörper des Blutes sind das Antithrombin III<sup>[95]</sup> und das  $\alpha_2$ -Makroglobulin<sup>[96]</sup>; sie wirken als Thrombininhibitoren im strengen Sinne. Sie konnten erst in den letzten Jahren isoliert und als Glykoproteine charakterisiert werden (Tabelle 3); in

wir zeigen konnten, daß Antithrombin II und III proteinchemisch identisch sind<sup>[95]</sup>.

Von den sechs Proteinaseinhibitoren des menschlichen Serums, die in Tabelle 3 mit ihren physikalisch-chemischen Daten zusammengestellt sind, wirken als Antiplasmin: das  $\alpha_1$ -Antitrypsin, das Antithrombin III, der C $\bar{1}$ -Inaktivator und das  $\alpha_2$ -Makroglobulin, so genannt nach ihren wichtigsten oder zuerst gefundenen biologischen Eigenschaften (Tabelle 4).

Die  $\alpha_2$ -Globuline tragen ca. 10% der Antiplasminkapazität des menschlichen Serums. Das wichtigste Antiplasmin ist also das  $\alpha_1$ -Antitrypsin, das Plasmin irreversibel nach Art eines Progressivinhibitors inaktiviert. Die Antiplasminkapazität des menschlichen Serums ist ca. 30mal größer als die potentielle Plasminkapazität.

Tabelle 3. Konzentration und Eigenschaften der Inhibitoren des Humanserums.

Inhibitoren	Konz. im Humanserum mg/100 ml	$\mu$ mol	Molekulargewicht	Peptidgehalt (%)	Kohlenhydratgehalt (%)
$\alpha_1$ -Antitrypsin	290.0 $\pm$ 45.0	54.0	54000	86	12.2
$\alpha_1$ -Antichymotrypsin	48.7 $\pm$ 6.5	7.0	69000	73	24.6
Inter- $\alpha$ -Trypsininhibitor	50.0	3.1	160000	90	8.4
Antithrombin III	29.0 $\pm$ 2.9	4.5	65000	85	13.4
C $\bar{1}$ -Inaktivator	23.5 $\pm$ 3.0	2.3	104000	65	34.7
$\alpha_2$ -Makroglobulin	260.0 $\pm$ 70.0	3.3	820000	92	7.7
	701.2				

Tabelle 2 werden sie noch als eine Substanz (Antithrombin III oder Progressiv-Antithrombin) ausgewiesen, da sie vorher nicht getrennt bestimmt werden konnten. Beide zusammen können die vier- bis fünffache Menge des potentiellen Thrombins im Blut hemmen<sup>[97]</sup>. Wie schon erwähnt, gehören diese Hemmkörper zum Typ der Progressivinhibitoren: Sie neutralisieren Thrombin

Von besonderem physiologischem Interesse ist, daß zwei der Plasmininhibitoren, das  $\alpha_2$ -Makroglobulin und das Antithrombin III, auch Thrombinspezifität haben. Demzufolge können diese beiden Proteine das Gleichgewicht zwischen Gerinnung und Fibrinolyse kompensatorisch regulieren: In dem Maß, wie sie z. B. bei einer gesteigerten Thrombinfreisetzung verbraucht werden, sind sie

Tabelle 4. Die Enzymspezifität der Inhibitoren.

Inhibitoren	Inhibierte Enzyme					
	Trypsin	Chymotrypsin	Plasmin	Thrombin	Kallikrein	C $\bar{1}$ -Esterase
$\alpha_1$ -Antitrypsin	+	+	+	—	+	—
$\alpha_1$ -Antichymotrypsin	—	+	—	—	—	—
Inter- $\alpha$ -Trypsininhibitor	+	schwach	—	—	—	—
Antithrombin III	+	—	+	+	—	—
C $\bar{1}$ -Inaktivator	schwach	schwach	+	—	+	+
$\alpha_2$ -Makroglobulin	+	+	+	+	+	—

nicht sofort, sondern progressiv bei einer in den ersten Minuten konstanten Inaktivierungsgeschwindigkeit. Die Neutralisation von Thrombin durch Antithrombin wird jedoch durch Heparin ganz erheblich katalytisch beschleunigt. Diese Wirkung ist in Tabelle 2 als Antithrombin II oder Heparin-Cofaktor bezeichnet; man hatte sie ursprünglich einem anderen Protein zugewiesen, bevor

als Antiplasmin nicht mehr verfügbar. Als biologische Konsequenz ergibt sich eine gesteigerte Fibrinolyse. Dieses Prinzip, das der Organismus auch für die Regulation anderer proteolytisch gesteuerter Reaktionsabläufe benutzt, basiert darauf, daß die Proteinaseinhibitoren des Blutes nicht streng spezifisch sind. Ihre Polyvalenz ist darauf zurückzuführen, daß die Proteina-

[94] W. H. Seegers, J. F. Johnson u. C. Fell, Amer. J. Physiol. 176, 97 (1954).  
[95] N. Heimburger, 1. Internat. Symp. on Tissue Factors in the Homeostasis of the Coagulation-Fibrinolysis System. Florenz 1967, S. 353.  
[96] M. Steinbuch, C. Blatrix u. F. Josso, Nature 216, 500 (1967).

[97] H. G. Schwick u. N. Heimburger, 12. Tagung d. Dtsch. Arbeitsgemeinschaft. f. Blutgerinnungsforsch., Deidesheim 1968.  
[98] H. G. Schwick, N. Heimburger u. H. Haupt, Z. inn. Med. 21, 1 (1966).  
[99] D. E. Koshland, Science 142, 1533 (1963).



Ausgehend vom Befund, daß der Thrombus ein Gefäßverschluß ist, der vorwiegend aus Fibrin besteht und daher der proteolytischen Hydrolyse unterliegt, gibt es folgende therapeutische Möglichkeiten: die lokale enzymatische Thrombolyse; die Infusionstherapie mit Enzymen; die Infusionstherapie mit Aktivatoren der Fibrinolyse.

Die lokale Applikation setzt voraus, daß der Thrombus gut lokalisiert und zugänglich ist, damit die Aktivator- oder Enzymlösung unter Ausschaltung der plasmatischen Inhibitoren per Katheter direkt an den Thrombus herangeführt werden kann. Aktivatoren allein sind deswegen so wirksam, weil die Thromben relativ viel Plasminogen adsorbiert an Fibrin enthalten. Für die enzymatische Hydrolyse kommt an erster Stelle das körpereigene Plasmin in Betracht, da artfremde Enzyme die Bildung von Antikörpern stimulieren.

Die Infusion von Proteasen zur Behandlung von Thrombosen am injektionsfernen Ort ist nicht aussichtsreich: Der Proteinaseinhibitorspiegel des Blutes ist zu hoch, und es ist biologisch nicht vertretbar, ihn zu überspielen. Da die Proteinasen nicht spezifisch genug sind, käme es zu einer generalisierten Proteolyse.

Klinisch gut eingeführt und auch bewährt hat sich hingegen die Infusionstherapie mit Aktivatoren, also das Prinzip, wie wir es im Organismus haben. Natürlich hat man zuerst versucht, die körpereigene Urokinase für die Therapie zu verwenden. Leider hat dann die Praxis gelehrt, daß man aus 400 Litern Urin nur eine Behandlungsdosis gewinnen kann. Die Herstellung von Urokinase erfordert also die Handhabung großer Urinmengen, die aus Gründen der Stabilität der Urokinase relativ schnell und mit komplizierten Methoden aufgearbeitet werden müssen. Abgesehen davon, daß die Urokinase durch diese Maßnahmen sehr teuer wird, ist sie bis heute nicht in der für eine Therapie ausreichenden Menge zugänglich. Es war daher nur vorteilhaft, daß gleichzeitig auch die Entwicklung der Streptokinase vorangetrieben wurde. Nach zehnjähriger Entwicklungszeit liegen nunmehr die für die Therapie notwendigen experimentellen und klinischen Erfahrungen vor<sup>[114]</sup>: Man kennt Indikationen und Kontraindikationen; die Dosierung konnte mit Ausnahme einiger spezieller Indikationen weitgehend standardisiert werden und gleichzeitig damit auch die Überwachung der Therapie.

Nachdem sich akute Arterien- und Venenverschlüsse schon frühzeitig als sichere Indikation erwiesen hatten, gibt es nunmehr auch Hinweise dafür, daß selbst mehrere Monate alte, sogenannte chronische Arterienokklusionen

der Thrombolyse zugänglich sind<sup>[115]</sup> (Abb. 6). Eine weitere wichtige Indikation verspricht der frische Herzinfarkt zu werden.

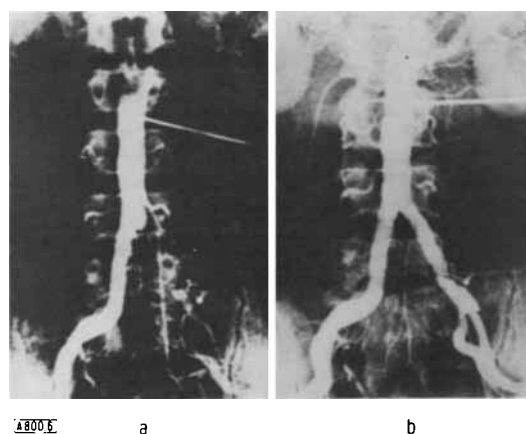


Abb. 6. Chronische Obliteration der *A. iliaca communis* und *A. femoralis* links, a) vor, b) nach Behandlung mit Streptokinase. (Aufnahme von Dr. M. Martin, Aggertalklinik in Engelskirchen.)

Die Dosis der Streptokinase ist so gewählt, daß vorwiegend Aktivator gebildet wird. Die Applikation erfolgt als Infusion im Dauertropf über mehrere Tage. Diese Dosierung hat den Vorteil, daß das hämostatische Gleichgewicht weitgehend gewahrt bleibt: Nur zu Beginn der Therapie kommt es zu einer kurzen Phase der Plasminämie, bis nämlich das äquimolare Verhältnis von Plasminogen und Streptokinase erreicht ist. Daher beobachtet man kurz nach Beginn der Thrombolyse eine Verlängerung der Plasmathrombinzeit, die auf die plasminolytische Freisetzung des Antithrombins VI aus Fibrinogen zurückzuführen ist. Die Normalisierung der Thrombinzeit nach 4–6 Stunden läßt erkennen, daß die Fibrinolyse ordnungsgemäß abläuft.

Die Tendenzen in der Fibrinolyse-Forschung weisen auf orale Thrombose-Prophylactica, die schließlich diese Entwicklung krönen würden.

Eingegangen am 8. Mai 1970 [A 800]

[114] Behringwerk-Mitteilungen, Heft 41 (1962), Heft 44 (1964), Heft 48 (1967).

[115] W. Schoop, M. Martin u. E. Zeitler, Dtsch. Med. Wschr. 93, 2321 (1968).

[116] C. N. Fell, N. A. Ivanovic, S. A. Johnson u. W. H. Seegers, Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 85, 199 (1954).

[117] A. Loclinger u. J. F. Hers, Thrombos. Diathes. Haemorrh. 1, 499 (1957).

[118] R. H. Landaburu u. W. H. Seegers, Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 94, 708 (1957).