

HISTAMINASEFREISETZUNG DURCH HEPARIN UND PROTAMIN BEIM MEERSCHWEINCHEN*

F. HAHN, W. SCHMUTZLER, G. SESEKE, H. GIERTZ und W. BERNAUER

Pharmakologisches Institut der Universität, Freiburg i. Br., Germany

(Received 31 August 1965; accepted 20 September 1965)

Abstract—Injections of heparin have been shown to provoke very strong histaminase activity in the plasma of guinea pigs, but not in other species so far tested (rat, rabbit, dog, hen, man). The activity is much stronger than in anaphylactic shock, when more than 50 IU/kg of heparin is given. Like the anaphylactic histaminase the heparin induced plasma histaminase comes from the liver. This has been demonstrated by injections of heparin in different sections of the cardiovascular system as well as by studies of the effect of heparin on the heart-lung-preparation and heart-lung-liver-preparation. The histaminase activity of the plasma is completely abolished by aminoguanidine. Protamine (as sulphate), too, has a strong histaminase liberating effect on the liver, 5 mg being as effective as 50 IU heparin. Protamine and heparin, on the other hand, neutralize each other when given simultaneously by two different intravenous routes. In this case the dose relationship is 1 mg protamine sulphate to 50 IU heparin.

METHODIK

AN MEERSCHWEINCHEN von 250–660 g Gewicht beiderlei Geschlechts wurden folgende Versuche durchgeführt:

- (1) Injektionen von Heparin (zur Kontrolle NaCl):
 - (a) in die V. jugularis mit Blutabnahme (4–6 ml) 2 min später aus der A. carotis in Lokalanästhesie (mit 2 ml/kg 2% Novocain). Bei einigen Tieren wurde zum Zwecke mehrfacher Blutentnahme ein dünner Kunststoffkatheter in die linke A. carotis eingebunden.
 - (b) in die V. portae mit Blutentnahme (in der Regel 4–8 ml) aus der V. hepatica 2 min später. Die V. cava caudalis wurde dabei zwischen Nierenvenen und Leber sowie zwischen Leber und rechtem Vorhof abgeklemmt.
 - (c) in die V. cava caudalis zwischen Zwerchfell und Herz mit sofortiger Blutentnahme (4–5 ml) aus der Aorta ascendens. Gleichzeitig mit der Injektion wurde die Aorta vor den Gefäßabgängen ligiert.
 - (d) in die Aorta von der linken Carotis aus mit gleichzeitiger Unterbindung der Leberpforte (zur Leberausschaltung). 2 min später Blutentnahme (5–8 ml) aus der Pfortader distal der Ligatur (Mesenterialblut).
 - (e) in die Aorta von der linken Carotis aus, 2 min später Unterbindung der V. portae und Blutentnahme distal der Ligatur (Kontrollversuch zu d).

Die Tiere der Versuchsguppen (b)–(e) wurden in Narkose (Pentobarbitalnatrium 30 mg/kg i.p.) laparo- und thorako-tomiert und künstlich beatmet.

(2) Versuche am Herzlungenpräparat (HLP) und Herzlungenleber-Präparat: Die Präparation des HLP erfolgte in Urethannarkose (1,2 g/kg i.p.). Minutenvolumen

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

etwa 20 ml, Blutdruck 60–70 mm Hg. Temperatur 37° vor dem Einfluß in das Präparat. Zur Präparation des HLLP wurde die V. cava unterhalb der Leber abgebunden und die Zuflußkanüle in die V. portae eingebunden. Die Präparation erfolgte an Tieren (450–485 g), denen (abweichend von der üblichen Methode) kein Heparin zur Gerinnungshemmung injiziert wurde. Die Präparate wurden mit Spenderblut gespeist, dem (nach der Blutentnahme) Heparin 12,5 IE/ml zugesetzt waren. Menge des Spenderblutes: 20 ml, wozu noch die im Versuchstier vorhandenen heparinfreien Blutreste kamen (~ 3 ml im HLP und 5,5 ml im HLLP). 10 min nach Ingangsetzen des HLP bzw. HLLP wurde Blut zur Histaminasebestimmung entnommen. Zur Kontrolle diente eine Probe des Spenderblutes vor Zusatz zu den Präparaten.

Es wurden Heparin 'Novo' (in handelsüblicher Lösung mit 5000 IE/ml) oder 'Vetren' in Substanz (140 IE/mg) verwendet. Injektionsvolumen: 1 ml/kg.

(3) Injektionen von Protaminsulfat 'Novo' (in handelsüblicher 1% iger Lösung) nach Schema 1 a und b. Injektionsvolumen: 1–2 ml/kg.

(4) Injektionen von Heparin und Protaminsulfat entweder getrennt, aber gleichzeitig in je eine V. jugularis oder hintereinander in die rechte V. jugularis (1/2 min Abstand).

Bei den Heparinversuchen (außer bei den HLP- und HLLP-Versuchen) wurde allen Blutproben nach der Entnahme Heparin 7,5 IE/ml zugesetzt, bei den Protaminsversuchen 15 IE/ml. Die Bestimmung der Histaminaseaktivität erfolgte im Plasma in Anlehnung an die Methode Wicksell's.⁴ Die Aktivität in mE entspricht einem Umsatz von 1 m μ Mol Histamin/min. Sie wird im folgenden pro ml Plasma angegeben. Über Einzelheiten unseres Vorgehens siehe Schmutzler *et al.*⁵

ERGEBNISSE

Die Tab. 1 zeigt in Versuchsgruppe 1, daß das Auftreten der Histaminase im Plasma des Meerschweinchens nach intravenöser Heparininjektion in strenger Abhängigkeit von der Heparindosis steht. Schon 5 IE/kg haben einen Effekt, d.h. eine Dosis, die noch nicht zur kompletten Gerinnungshemmung ausreicht. Beide Heparinpräparate sind ohne Unterschied wirksam, weshalb wir die Ergebnisse in der Rubrik 'N + V' zusammengefaßt haben. Da die Steigerung der Heparindosis von 100 auf 500 IE/kg nur noch eine geringe Aktivitätszunahme bewirkt, scheint die Dosiswirkungskurve einem Maximalwert zuzustreben. Der mit Heparin erzielbare Effekt geht weit über den des anaphylaktischen Schocks hinaus. Hier beobachteten wir nur eine Aktivität von rund 1 mE/ml Plasma, wozu weniger als 50 IE Heparin/kg ausreichen.

Daß es sich bei dem histaminzerstörenden Faktor um Histaminase* handelt, geht daraus hervor, daß sich die Aktivität des Plasmas durch Zusatz von Aminoguanidinsulfat 2 μ g/ml in vitro komplett aufheben läßt. Intravenöse Injektion von Aminoguanidinsulfat 2 mg/kg 1/2 min vor Heparin blockiert ebenfalls die Histaminase vollständig. In 3 Versuchen wurde nur eine Aktivität von 0,007 ± 0,007 mE/ml im Mittel erzielt.

Eine gesteigerte Histaminaseaktivität läßt sich in vitro auch durch Zugabe von hohen Heparindosen (25 IE/ml) zum Blut nicht induzieren. Die Histaminase stammt also nicht aus Vorstufen im Blute. Sie wird vielmehr, wie Tab. 1 in Spalte 2–4 zeigt, ebenso wie die anaphylaktische Histaminase⁵ aus der Leber freigesetzt. Nach Heparininjektion in die V. portae finden sich im Lebervenenblut die höchsten Aktivitäten,

*(genauer: um eine carbonylreagensempfindliche Aminoxydase, vgl. Blaschko⁶; Zeller?)

TABELLE 1. HISTAMINASEAKTIVITÄT (mE/ml PLASMA) NACH HEPARININJEKTION. VERSUCHSZAHL IN KLAMMERN.

Nr.	Injektion in:	Blutentnahme aus:	NaCl		Heparin (HE/kg)			Heparin-präparat
			Ø	1 ml/kg	5	50	100	
I. In situ								
1	V. jugular.	A. carotis	0,018 ± 0,008	0,048 ± 0,023	0,265 ± 0,089 (3)	1,803 ± 0,674 (3)	14,540 ± 2,852 (3)	N
					0,135 ± 0,080 (3)	3,268 ± 0,143 (3)	10,938 ± 1,548 (4)	12,209 ± 3,125 (9)
					0,200 ± 0,061 (6)	2,389 ± 0,517 (5)	13,095 ± 2,408 (12)	N + V
					0,272 ± 0,058 (2)	5,050 ± 1,11 (1)	108,000 ± 4,000 (2)	N
2	V. portae	V. hepatica	0,043 ± 0,037	0,039 ± 0,020	0,554 ± 0,047 (2)	16,380 ± 4,458 (5)	47,400 ± 13,489 (6)	V
					0,412 ± 0,087 (4)	14,491 ± 2,795 (6)	63,612 ± 15,371 (8)	N + V
3	V. cava caudalis	Aorta					0,004 ± 0,003 (5)	V
4	Aorta	Vv. mesentericae mit Leberaus- schaltung ohne					0,052 ± 0,023 (4)	V
5	V. cava	Aorta			0,010* ± 0,010 (2)		0,008 ± 0,005 (3)	V
		III. HLLP					5,237 ± 0,627 (3)	V
6	V. portae	Aorta						

N = Heparin "Novo", V = Heparin "Vetren". * = Bestimmung im Spenderblut vor Zugabe zum HLP bzw. HLLP.

die quantitativ ausreichen, um die nach intravenöser Injektion im allgemeinen Kreislauf gemessenen Werte zu erklären. Alle übrigen Kreislaufbezirke (Lungenkreislauf oder allgemeiner Körperkreislauf mit Ausschaltung der Leber) steigern die Plasmahistaminase nicht meßbar. Auch die im Lebervenenplasma gefundene Histaminase ließ sich durch Aminoguanidinsulfat vollständig hemmen.

In Übereinstimmung mit den mitgeteilten Befunden tritt am HLP trotz der Durchströmung mit heparinhaltigem Blut (bei einer Heparinmenge von rund 500 IE/kg intaktes Tier) keine gesteigerte Histaminaseaktivität auf, wohl aber am HLLP. Allerdings ist im HLLP die Aktivität (5,9 mE/ml Plasma) nicht sehr groß, wenn man berücksichtigt, daß die Blutmenge im HLLP mit ~ 25 ml (Tiergewicht 450–485 g) um etwa 30% geringer ist als bei einem intakten Tier von gleichem Gewicht. Hier finden wir nach etwa der gleichen Heparindosis 13,1 mE/ml Plasma. Möglicherweise liegt die Ursache darin, daß die Leistung der Leber im HLLP nicht optimal ist.

Hierfür spricht folgende Beobachtung: Bei 7 Tieren von 315–715 g (Mittel 520 g) injizierten wir während der Präparation des HLLP bei noch intakter Zirkulation 500 IE/kg Heparin und speisten das HLLP mit ~ 15 ml Eigenblut ($+7,5$ ml Spenderblut). Die Histaminaseaktivität betrug, obwohl $\sim 2/3$ des histaminasehaltigen Eigenblutes nicht in das HLLP eingeflossen waren, im Mittel $5,163 \pm 0,933$ mE/ml Plasma, also fast so viel wie in den Versuchen, wo das Heparin erst bei geschlossenem HLLP zur Anwendung kam.

Ersetzen wir in den zuletzt genannten Versuchen das zirkulierende Blut mehrmals durch die gleiche Menge heparinhaltiges frisches Blut, so war nach 5 maligem Austausch, innerhalb 30–40 min vorgenommen, die Histaminase nahezu verschwunden (3 Versuche). Die gesamte, auf diese Weise 'herausgewaschene' Histaminasemenge war 50–90% höher als die im anfänglich zirkulierenden Blut vorhandene. Der Histaminasegehalt der Leber ist also erschöpfbar und schon durch die erste Gabe von Heparin zum größeren Teil freigesetzt.

Nach den in Tab. 2 niedergelegten Befunden erreicht die Histaminaseaktivität etwa 2 min nach der intravenösen Heparininjektion ihren Höhepunkt und sinkt dann nur langsam ab. Nach 120 min wurden noch 30–50% der maximalen Aktivität gefunden.

TABELLE 2. HISTAMINASEAKTIVITÄT (mE/ml PLASMA) VOR UND ZU VERSCHIEDENEN ZEITEN NACH INTRAVENÖSER HEPARININJEKTION ("VETREN")

Tier Nr.	Vor Injektion	Minuten nach Heparininjektion (500 IE/kg)							
		0,5	1	2	5	30	40	60	120
1	—	2,250		7,200		6,180		4,500	
2	—		3,080		6,440	5,020	5,020		
3	—			17,100		9,000		6,440	5,620
4	0,000				11,600			7,800	5,850

Die histaminaselibrierende Wirkung von Protaminsulfat in Dosen von 1–20 mg entspricht der Wirkung von 5–500 IE Heparin (Tab. 3). 5 mg Protamin sind etwa äquieffektiv mit 50 IE Heparin. Auch hier ist die Leber zum mindesten die Hauptquelle der Histaminase, wie die hohe Aktivität des Lebervenenplasmas nach intraportalen Protamininjektion beweist. Injektionen in andere Gefäßgebiete wurden

TABELLE 3. HISTAMINASEAKTIVITÄT (mE/ml PLASMA) NACH INJEKTION VON PROTAMINSULFAT

Nr.	Injektion in:	Blutentnahme aus:	Injektion von					
			NaCl 1 ml/kg	1	2	5	10	20
1	V. jugular.	A. carotis	0,019 $\pm 0,004$ (3)	0,115 $\pm 0,038$ (5)		2,398 $\pm 0,488$ (4)	7,940 $\pm 1,241$ (7)	12,255 $\pm 1,511$ (4)
2	V. portae	V. hepatica			1,074 $\pm 0,428$ (4)		12,985 $\pm 2,328$ (4)	

nicht vorgenommen. Die durch Protaminsulfat liberierte Histaminase war ebenfalls durch Aminoguanidinsulfat *in vitro* hemmbar.

Trotz der gleichartigen Wirkung von Heparin und Protaminsulfat kommt es bei gleichzeitiger intravenöser Injektion zu gegenseitiger Neutralisierung (Tab. 4). 1 resp. 10 mg Protamin neutralisieren 50 resp. 500 IE Heparin. Dieses Dosenverhältnis weicht deutlich von dem äquieffektiven Dosenverhältnis ab. Wird Protamin 1/2 min vor Heparin oder Heparin 1/2 min vor Protamin in diesem Dosenverhältnis injiziert, so kommt es nicht zur kompletten Neutralisierung. Beide Stoffe treten also relativ schnell in die Leber ein und vermögen sich nur in der Blutbahn gegenseitig zu neutralisieren.

TABELLE 4. HISTAMINASEAKTIVITÄT (mE/ml PLASMA) NACH SIMULTANER ODER SUCCESSIVER INJEKTION VON HEPARIN UND PROTAMINSULFAT

Protaminsulfat mg/kg:	1	10	10
Heparin IE/kg: gleichzeitig:	50 $0,073 \pm 0,073$ (4)	100 $8,428 \pm 1,714$ (4)	500 $0,317 \pm 0,250$ (4)
Heparin vor Protaminsulfat:			0,875 $\pm 0,144$ (4)
Protaminsulfat vor Heparin:			1,344 $\pm 0,549$ (4)

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß 2 Stoffe von gegenteiligem Charakter, die sich sogar gegenseitig in der Blutbahn zu neutralisieren vermögen, den gleichen Effekt einer Histaminaseliberation auf die Leber zeigen. Eine Parallel hierzu bietet lediglich die Beobachtung, daß Stoffe von anionischem und kationischem Charakter eine Fibrinolyseaktivierung im Meerschweinchenserum hervorrufen^{9, 10}. Neuere Untersuchungen, über die an anderer Stelle berichtet werden wird, haben gezeigt, daß außer Heparin und Protaminsulfat noch zahlreiche andere Stoffe polyanionischen und polykationischen Charakters die Histaminase aus der Meerschweinchlever freisetzen.¹¹ Daß es sich hierbei um eine Freisetzung handelt, folgt aus dem

hohen Histaminasegehalt der Meerschweinchenleber¹² und der Tatsache, daß nach ausreichenden Heparingaben in die V. portae die Leber nur noch Spuren von Histaminase aufweist.¹¹

Die Wirkung des Heparins wurde von uns auch an anderen Tierarten (Ratte, Kaninchen, Hund, Huhn) und am Menschen untersucht (bei der Ratte auch Protaminsulfat). Eine Histaminasefreisetzung wurde dabei nicht beobachtet. Es handelt sich also offenbar um eine für das Meerschweinchen spezifische Wirkung dieser Stoffe. Da beim Meerschweinchen auch im anaphylaktischen Schock eine so starke Histaminase wie bei keiner anderen Tierart auftritt, liegt natürlich der Gedanke nahe, daß Heparin und vielleicht noch ein basischer Eiweißkörper, die beide in den Mastzellen vorkommen, eine Rolle bei der anaphylaktischen Histaminaseliberation spielen. Bisher liegen unseres Wissens nur Befunde von Ungar u. Damgaard¹³ über eine Freisetzung von Heparin durch Antigen aus Leber- und Lungenschnitten und perfundierten Lungen von Meerschweinchen vor. Die Literatur über das Verhalten der Blutgerinnung ist widersprüchlich.¹⁴⁻¹⁷ Eine Hemmung der Blutgerinnung ist offenbar nicht die Regel. Vielleicht reichen aber die freigesetzten Mengen zur Histaminaseaktivierung in der Leber aus. Nach Garcia-Arocha⁸ ist auch zu berücksichtigen, daß Heparin außer beim Hund leicht vom Gewebe gebunden wird. Weitere Untersuchungen sind nötig, um dieses Problem abzuklären.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Verlauf unserer Untersuchungen über die Bluthistaminase im anaphylaktischen Schock¹⁻³ beobachteten wir, daß Heparininjektionen beim Meerschweinchen zum Auftreten einer sehr aktiven Histaminase im Plasma führen. Versuche über die Blockierbarkeit dieser Heparinwirkung durch Protaminsulfat führten zum Ergebnis, daß auch Protaminsulfat ein starker Histaminaseliberator ist. Über Herkunft und Aktivität dieser Histaminase wird berichtet.

LITERATUR

- W. BERNAUER, H. GIERTZ, F. HAHN, W. SCHMUTZLER, G. SESEKE u. B. U. SIEVERS: *Naturwissenschaften* **51**, 412 (1964).
- H. GIERTZ, F. HAHN u. W. SCHMUTZLER, *Int. Archs. Allergy* **25**, 343 (1964).
- H. GIERTZ, F. HAHN, W. SCHMUTZLER u. G. SESEKE, *Klin. Wschr.* **42**, 1034 (1964).
- F. WICKSELL, *Acta physiol. scand.* **17**, 359 (1949).
- W. SCHMUTZLER, F. HAHN, G. SESEKE u. W. BERNAUER, *Archs. exp. Path. Pharmak.*, im Druck.
- H. BLASCHKO, *The Enzymes*. 2nd ed., Vol. 8, p. 337 (1963).
- E. A. ZELLER, *The Enzymes*. 2nd ed., Vol. 8, p. 313 (1963).
- H. GARCIA-AROCHA, *Can. J. Biochem. Physiol.* **39**, 395 (1961).
- E. S. OLESEN, *Acta pharmac. toxicol.* **15**, 307 (1959).
- E. S. OLESEN, *Acta pharmac. toxicol.* **17**, 191 (1960).
- W. SCHMUTZLER u. O. GOLDSCHMIDT—, (in Vorbereitung).
- S. E. LINDELL and H. WESTLING, *Acta physiol. scand.* **30**, Suppl. 111, S. 202 (1953).
- G. UNGAR u. E. DAMGAARD: *J. exp. Med.* **101**, 1 (1955).
- S. S. ADAMS, *J. Pharm. Pharmac.* **5**, 580 (1953).
- H. H. DALE, *Lancet* **216**, 1285 (1929).
- C. A. DRAGSTEDT, *Physiol. Rev.* **21**, 563 (1941).
- H. EAGLE, C. G. JOHNSTON and I. S. RAVDIN: *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **60**, 428 (1937).