

Einfluss von Antikoagulantien auf Zellkernproteine

Neben seiner Wirkung im Blutgerinnungsmechanismus mit mehrfachen Angriffsstellen kommen dem Heparin weitere Eigenschaften zu. Antikomplementwirkung¹, antagonistische Beziehungen zu Hyaluronidase², Anwesenheit heparinartiger Substanzen im Magenmucin³, spezifische Wirkungen auf die Zelle⁴ und der temporäre Anstieg des Heparinspiegels im Gefolge des Schocks⁵ zeigen die mannigfache Beteiligung dieses Stoffes an Reaktionen des tierischen Organismus. Neuere Beobachtungen an den Zellen der Leber von Ratten haben gezeigt, dass Heparin auf Zellkerne *in vitro* eine auffallende Wirkung ausüben kann⁶. Eigene Untersuchungen mit Antikoagulantien an Suspensionen kernhaltiger Erythrozyten ergeben weitere, nach unserer Meinung interessante Befunde in diesem Zusammenhang.

Ausgehend von sedimentierten, in physiologischer NaCl-Lösung gewaschenen Hühnererythrozyten, lassen sich durch Überführen geringer Mengen des Sedimentes in Heparinlösungen Zellsuspensionen in stark hypotonischem Milieu herstellen. (Zum Beispiel 0,05 cm³ Erythrozytensediment auf 5 cm³ 1%ige Heparinlösung = 1 %ige Zellsuspension.) Diese Behandlung der Erythrozyten

führt nebst der «Lyse» der Zellen zu einer starken Viskositätsverhöhung. (Erythrozyten in heparinfreien, hypotonischen NaCl-Medien zeigen diese Erscheinung nicht oder nur andeutungsweise.) Während in Gegenwart von Heparin sowohl in hypo- wie auch in hypertönischem Milieu die Viskositätssteigerung auftritt, bleibt dieser Effekt in isotonischem NaCl-Medium aus. Dies könnte dafür sprechen, dass die Zellen erst in bestimmter Weise geschädigt werden müssen, damit dieser Heparineffekt zustande kommen kann. Viskositätssteigerungen im Gefolge verschiedener anderer, die Hühnererythrozyten aufschliessender Prozeduren sind aus früheren Arbeiten¹ bekannt.

Bei der mikroskopischen Beobachtung (vgl. Abbildungen) erkennt man im Anschluss an die osmotische «Lyse» der Blutkörperchen die Wirkung des Heparins daran, dass die Strukturen im Zellkern verblassen, während gleichzeitig eine allgemeine Quellung sowohl die Zellkerne etwas grösser werden lässt, als auch die Zwischenzellräume ausdehnt. Nicht selten gelingt es, an einzelnen Kernobjekten ein langsames Ausfliessen von Kerninhalt zu beobachten. Extrazellulär finden sich sodann zahlreiche feinste Granula.

Das solchermassen auftretende, die Viskosität bedingende «Material» ist mit Wasser verdünnbar, lässt sich durch Methylgrün² anfärben und wird von Desoxyribonuklease abgebaut. (Abgesehen vom Unterschied der Löslichkeit sind diese Eigenschaften ähnlich denjenigen einer gallertigen, in 5% NaCl-Lösung homogenisierbaren Fraktion, die bei osmotischer Hämolyse von Hühnererythrozyten unter genügend hohem pH [zum Beispiel 9; m/220 NaHCO₃] auch ohne Heparinzusatz entsteht.

¹ Literatur nach R. DOERR: *Die Immunitätsforschung*, II. Das Komplement (Springer, Wien 1947), S. 12.
² D. GLICK und B. SILVÉN, *Science* 113, 388 (1951).

³ H. SMITH, *Nature* 168, 563 (1951).
⁴ J. R. WARREN und F. GRAHAM, *J. Bact.* 60, 171 (1950). — L. V. HEILBRUNN und W. L. WILSON, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 70, 179 (1949); *Science* 112, 56 (1950).
⁵ O. WILANDER, *Scand. Arch. Physiol.* 81, Suppl. 15 (1938).
⁶ H. S. ROBERTS und N. G. ANDERSON, *Exp. Cell Research* 2 (2), 224 (1951). — N. G. ANDERSON und K. M. WILBUR, *J. gen. Physiol.* 34 (5), 647 (1951).

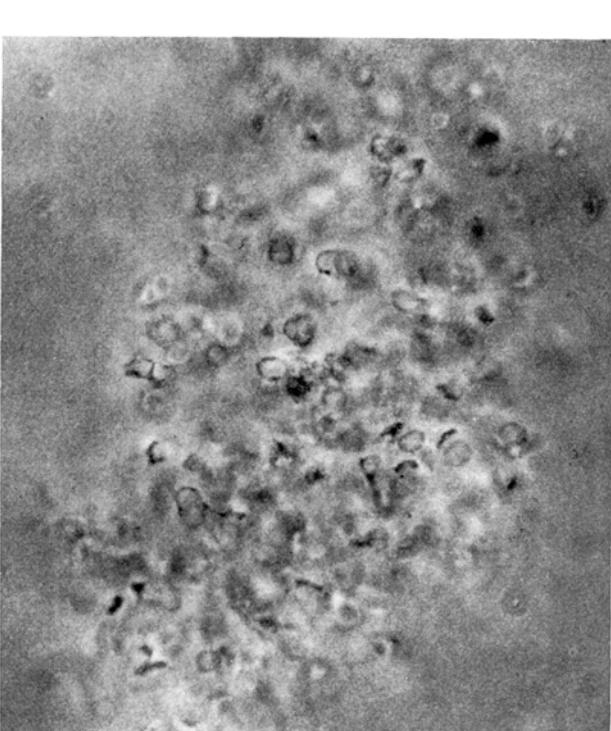


Abb. 1

Abb. 2

Dasselbe Konglomerat von Erythrozytenkernen. Abbildung 1 vor, Abbildung 2 bei Heparinkontakt (in H₂O hämolysierte Zellen, in physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt). Phasenkontrast-Öllimmersion. Vergrösserung: 700:1.

Gerinnungszeiten der verschiedenen Plasma-Thrombin-Heparin- (bzw. -Erythrolysat-)Gemische
Plasma: Zitrat-Rinderplasma. Variable Heparinzusätze zu konstanter Thrombinmenge (Heparin «Roche»)

Heparin	Erythrolysat								Heparinmengen verschiedener Verdünnungsstufen der Erythrolysat
	Heparingehalt der Erythrolysate								
1,0 %	1,0 %	1,2 %	1,4 %	1,8 %	2,4 %	3,0 %	4,0 %		
Gerinnungszeiten in Sekunden (Gerinnungszeit ohne Heparin: 18 s)									
26	24	25	26	26	25	26	33	0,10 mg	
31	29	29	32	37	35	34	38	0,15 mg	
49	36	41	39	52	46	42	45	0,20 mg	
60	44	47	66	59	61	54	50	0,25 mg	
>70	52	60	70	70	>70	62	59	0,30 mg	
SA-Titer der Erythrolysate									
	16	32	32	128	16	8	4		

Die Eigenschaften dieses letzteren «Stoffes» entsprechen denjenigen von Desoxyribonukleaten.)

Das Reaktionsverhältnis Heparin:Zellen:Viskositätssteigerung lässt sich in quantitativer Weise dadurch charakterisieren, dass bei konstanter Zellzahl und varierter Heparinmenge das viskositätsverleihende «Material» bestimmt wird. Zu diesem Zwecke benutzten wir eine Modifikation des ACRA-Testes¹, der bekanntlich auf mehrere hochpolymere Stoffe anwendbar ist. Wir bestimmten den Gehalt an «visköser Fraktion» in den Zellsuspensionen als diejenige Verdünnung, die im Säure-Alkohol-Test (SA-Titer) gerade noch ein zusammenhängendes Häutchen ergab. Wir stellten fest, dass die maximale Ausbeute an hochpolymerisiertem «Material» aus einer gegebenen Zellzahl an eine bestimmte Heparinmenge gebunden ist und dass dabei das Verhältnis der Erythrozyten- zur Heparinkonzentration innerhalb gewisser Grenzen ein konstantes bleibt.

Um Anhaltspunkte über die Reaktionsweise des Heparins bei diesen Vorgängen zu erhalten, prüften wir die gerinnungsverzögernde Wirkung von Erythrolysaten am Plasma-Thrombin-Gemisch im Vergleich zu reinen Heparinlösungen entsprechender Konzentration. (Wir benutzten hiezu im allgemeinen die Technik von STUDER und WINTERSTEIN².) In Erythrolysaten mit gewissem unterschwelligem Heparingehalt ist ein «Heparindefizit» nachweisbar (vgl. Tabelle). Auch in Erythrolysaten von höherer Heparinbeimischung ist eine Verminderung der Heparinaktivität erkennbar, jedoch nur bei den geringeren Verdünnungen des Gemisches. Erythrolysate bestimmter mittlerer Heparingehalte ergeben hingegen den entsprechenden blossen Heparindosen annähernd gleiche Gerinnungszeiten. Erythrolysate dieses Bereiches zeichnen sich außerdem durch maximale SA-Titer, das heisst durch optimale Ausbeute an «viskösem Material» aus.

Diese Versuchsergebnisse sprechen dafür, dass, abhängig von der Heparinkonzentration, Zellbestandteile in erhöhten Quellzustand geraten und dass dabei Heparin teilweise derart involviert wird, dass dessen Aktivität im Blutgerinnungsmechanismus erniedrigt erscheint. Auffallend bleibt die unterschiedliche Beeinflussung der Heparinaktivität bei niederen, mittleren und hohen Dosen, die dafür sprechen könnte, dass entweder mehrere verschiedene Komponenten oder Reak-

tionen involviert sind oder dass eine bestimmte, heparin-bindende Reaktion einem vom Verhältnis der Reaktionskomponenten abhängigen «Überschuss-Hemmungs-Mechanismus»¹ unterworfen ist. Diese Versuche geben somit keinen eindeutigen Aufschluss über die Reaktionsart des Heparins.

Preliminäre Versuche ergaben ein ähnliches Verhalten auch mit anderen, als Blutgerinnungshemmer bekannten Substanzen, zum Beispiel Germanin und Liquoid Roche. Weitere Untersuchungen mit analogen, aber nicht gerinnungshemmenden Stoffen sollten über die Spezifität der beschriebenen Reaktion Aufschluss geben können.

FR. KRADOLFER

Wissenschaftliche Laboratorien der Ciba Aktiengesellschaft, Basel, den 3. Dezember 1951.

Summary

During osmotic hemolysis in the presence of heparin there is a marked increase in the viscosity of the cell suspension, which reaches its maximum only at a certain, fixed ratio of cell quantity to heparin. The increase in viscosity is accompanied by modifications of the structure of the cell nuclei. This process appears to affect the anticoagulant activity of heparin in a certain manner.

¹ K. B. BJÖRNESJÖ und T. TEORELL, Arkiv Kemi, Min. Geol. 19A, Nr. 34, 12 (1945).

The Distribution of Carotenoids in the Eggs, Ovaries and Testicles of *Paracentrotus lividus*

Apart from the rôle of carotenoids as provitamins A¹ and their rôle in the visual cycle², very little is known of their biological function. The great accumulation of carotenoids in the gonads and eggs of a number of animals has led several workers to suppose that they may play some part in reproduction¹. In connection with an investigation on the changes of the carotenoid pigments during the development of the sea-urchin *Paracentrotus lividus*³ a parallel investigation has been undertaken to ascertain the quantitative ratio of the carotenoids in the

¹ T. W. GOODWIN, Biol. Rev. 25, 391 (1950).

² G. WALD, The Harvey Lect. Ser. 41, 117 (1945-46).

³ A. MONROY, A. MONROY-ODDO, and M. DE NICOLA, Exp. Cell Res. 2, 700 (1951).

1 C. L. OAKLEY und G. H. WARRACK, J. Path. Bact. 63 (1), 45 (1951). – F. M. BURNET, Austr. J. exp. Biol. 26, 71 (1948).

2 A. STUDER und A. WINTERSTEIN, Helv. physiol. acta 9, 6 (1951).