

Zur Differenzierung und Kalzium-Abhängigkeit von Kontaktwirkungen benetzbarer Oberflächen. Ihr Einfluß auf die Blutthrombokinase-Bildung

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. K. Wachholder)

H. E g l i und H. B u s c h a

Die Kontaktwirkung benetzbarer Oberflächen auf den Blutgerinnungsvorgang ist seit langem bekannt. Sie findet ihren augenfälligen Ausdruck in der Abhängigkeit der Blutgerinnungszeit von der Wandbeschaffenheit der Teströhrchen, in denen Blut zur Gerinnung gebracht wird. Während nach der „Klassischen Gerinnungslehre“ die gerinnungsbeschleunigende Wirkung benetzbarer Oberflächen auf die Auslösung des Thrombozytenzerfalls zurückzuführen ist, sieht man heute in Kontakteinflüssen ein aktivierendes Moment für bestimmte plasmatische Gerinnungsfaktoren. Die Frage, welche Gerinnungsfaktoren als kontaktempfindlich anzusehen sind, ist noch umstritten. Die Mehrzahl der bisherigen Befunde deutet darauf hin, daß insbesondere die Bildung von Blutthrombokinase eine durch Oberflächenkontakt beeinflussbare Reaktion darstellt. Die im folgenden zu schildernde Methodik soll eine Analyse der dabei auftretenden Kontaktwirkungen ermöglichen.*)

Frühere Untersuchungen (E g l i und K l e s p e r [1958]) hatten gezeigt, daß die Blutthrombokinase-Bildung durch einen intensiven Glaskontakt des im Thrombokinase-Bildungstest (Biggs, D o u g l a s und M a c f a r l a n e [1953], Biggs und M a c f a r l a n e [1957]) zu verwendenden Serums beschleunigt werden kann. Eine Beschleunigung der Blutthrombokinase-Bildung war auch zu beobachten, wenn das mit Silikontechnik gewonnene Serum mit einer geringen Serummenge inkubiert wurde, die zuvor mit Glaswolle kontakt-aktiviert worden war. Dieser Befund läßt auf eine Kettenreaktion schließen, die lediglich für ihre Auslösung, nicht aber für ihren weiteren Verlauf einer Kontaktwirkung

*) Eine ausführliche Darstellung erfolgt im Rahmen der Inaugural-Dissertation von H. Buscha.

bedarf. Somit sind direkte und indirekte Kontaktwirkungen zu unterscheiden. Die indirekte Kontakt-Aktivierung einer mit Silikontechnik aufbereiteten Serumprobe war auch dann noch durch eine mit Glas in Kontakt gebrachte Serum- oder Plasmaprobe auslösbar, wenn diese vor dem Glaskontakt mit BaSO_4 adsorbiert und anschließend 30 Minuten auf 56°C erhitzt worden war. Eine so vorbehandelte Serum- oder Plasmaprobe enthält nach den derzeitigen Kenntnissen (Ratnoff und Colopy [1955]; Rosenthal, Dreskin und Rosenthal [1953]) lediglich noch den Hageman-Faktor und das Plasma-Thromboplastin-Antecedent (PTA), letzteres vermutlich durch die voraufgegangene Adsorption und das Erhitzen in einer verminderten Konzentration. Die direkte Kontakt-Aktivierbarkeit des Hageman-Faktors kann seit den Untersuchungen von Ratnoff und Rosenthal (1958), sowie Biggs, Sharp, Margolis, Hardisty, Stewart, Davidson (1958) und Soulier, Wartelle und Ménaché (1959) als gesichert gelten.

Die Auslösung einer Kontakt-Aktivierung durch eine lediglich den Hageman-Faktor und das PTA enthaltende Serum- oder Plasmaprobe eröffnet zugleich auch die Möglichkeit, direkte und indirekte Kontaktwirkungen getrennt zu untersuchen, worauf im folgenden näher eingegangen werden soll.

Der Kontakt-Aktivierungstest

Prinzip: Eine mit BaSO_4 adsorbierte und auf 56°C erhitzte, ausschließlich den Hageman-Faktor und das PTA enthaltende Serum- oder Plasmaprobe wird mit Glaswolle versetzt (direkte Kontakt-Aktivierung) und anschließend mit Silikon-Serum gemischt und inkubiert. Die dabei auftretende Aktivitätssteigerung des Silikon-Serums (indirekte Kontakt-Aktivierung) wird nach 15minütiger Inkubationsdauer mit Hilfe des Thrombokinase-Bildungstestes bestimmt.

Reagenzien

BaSO₄-Plasma: Oxalat-Blut (1 Teil Na-Oxalat, 1,34%, auf 9 Teile Blut wurde unter Verwendung innenpolierter Kanülen und silikonierter Spritzen gewonnen. Alle weiteren Manipulationen erfolgten unter Silikontechnik. Das durch Zentrifugieren abgetrennte Plasma (15 Min./4000 rpm) wurde mit 60 mg/ml BaSO_4 (Merck, reinst für Röntgenzwecke) versetzt, die Suspension 10 Minuten bei Zimmertemperatur mit einem silikonierten Glasstab gerührt und anschließend das BaSO_4 abzentrifugiert (10 Min./4000 rpm). Nachfolgend nochmalige BaSO_4 -Adsorption mit 30 mg BaSO_4 pro ml bei sonst gleichem Vorgehen.

Silikon-Serum: Nach Punktion mit innenpolierter Kanüle spontan ausfließendes Nativblut wurde in silikonierten Teströhrchen ($16 \times 100 \text{ mm}$) aufgefangen und bei 37°C inkubiert. Nach 35 Minuten wurde das bereits gebildete, meist wandständige Koagulum mit einem silikonierten

Glasstab kurz mobilisiert, wodurch innerhalb weiterer 2 bis 3 Minuten eine massive Fibrinbildung ausgelöst wird. Das neugebildete Koagulum wurde gleichfalls unter Silikontechnik mobilisiert und abzentrifugiert. Die in Serum und Blutgerinnsel getrennte Blutprobe verblieb für weitere 3 bis 4 Stunden im Wasserbad bei 37° C. Während dieser Zeit kam es zu einer erheblichen Steigerung des Prothrombinverbrauchs, so daß trotz der angewandten Silikontechnik der Serum-Prothrombingehalt unter 5% des Plasmagehaltes gesenkt werden konnte. Einzelheiten dieser Defibrinierungstechnik, die sich zu einer Standardisierung des Prothrombinverbrauchs für Untersuchungen mit dem Thrombokinase-Bildungstest als besonders geeignet erwies, werden an anderer Stelle ausführlicher beschrieben.

Die $BaSO_4$ -Adsorption des Serums erfolgte analog dem für die $BaSO_4$ -Adsorption des Plasmas beschriebenen Vorgehen, nachdem das Serum zuvor mit Na-Oxalat (1,34% — 1 Teil Na-Oxalat auf 9 Teile Serum) versetzt worden war.

Chloroform-Hirnextrakt: Als Äquivalent für den Thrombozytenfaktor 3 wurde ein nach der Technik von Geiger, Duckert und Koller (1956) aus azetongetrocknetem Kaninchenhirn aufbereiteter lipoidhaltiger Chloroform-Extrakt verwendet.

Kalzium: als m/40 $CaCl_2$ -Lösung.

Substratplasma zur Prüfung der Blutthrombokinase-Aktivität: (Dowex-Plasma). Seine Aufbereitung erfolgte unter Verwendung eines Kationen-Austauschers (Dowex 50) nach einer von Duckert, Flückiger, Isenschmid, Matter, Vogel-Meng und Koller (1954) angegebenen Methodik.

Verdünnungsmittel für alle Verdünnungen war Veronal-Natriumazetat-Puffer nach Michaelis, pH 7,4.

Zur *Silikonierung* wurde Silikon-Öl AK 350 der Firma Wacker, München, verwendet, das vor Gebrauch 2% in Chloroform DAB 6 gelöst wurde.

Glaswolle: Zur Kontakt-Aktivierung wurde sowohl handelsübliche Glaswolle als auch Glaswolle der Firma Merck, bleifrei, pro analysi, verwendet; 60 bis 70 mg Glaswolle pro ml Serum oder Plasma.

Durchführung

1. Direkte Kontakt-Aktivierung

2 bis 3 ml $BaSO_4$ -Serum oder $BaSO_4$ -Plasma werden 30 Minuten auf 56° C erhitzt und anschließend 5 Minuten mit Glaswolle bei 37° C versetzt (60 bis 70 mg Glaswolle pro ml Serum oder Plasma).

2. Indirekte Kontakt-Aktivierung

Unmittelbar nach erfolgtem Glaswollzusatz werden 0,2 ml des $BaSO_4$ -Plasmas oder $BaSO_4$ -Serums mit 1,8 ml Silikon-Serum gemischt und 15 Minuten im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Während dieser Inkubationsphase kommt es zu einer Aktivitätssteigerung des Silikon-Serums, die mit Hilfe der einstufigen Faktor-IX-Bestimmung nach Geiger, Duckert und Koller (1956) oder — wie im folgenden beschrieben — mit Hilfe des Thrombokinase-Bildungstestes bestimmt werden kann.

Die Aktivitätssteigerung des Silikon-Serums war besonders ausgeprägt, wenn das Silikon-Serum vor dem Zusatz des (unverdünnten) $BaSO_4$ -Plasmas oder $BaSO_4$ -Serums im Verhältnis 1 + 24 mit Puffer verdünnt worden war, wobei für die nachfolgende Durchführung des Thrombokinase-Bildungstestes auf eine weitere Verdünnung verzichtet wurde. Somit wäre dieser Testansatz dem ersteren mit unverdünntem Silikon-Serum vorzuziehen. In diesem Fall ist jedoch eine mehr oder weniger starke Spontanaktivierung des Silikon-Serums, die auch beobachtet werden kann, wenn das $BaSO_4$ -Serum oder $BaSO_4$ -Plasma durch Puffer ersetzt wurde, durch eine besonders sorgfältige Silikonierung der Teströhren und Pipetten auszuschließen.

3. Bildung von Blutthrombokinase

Nach beendeter Inkubation wird das Gemisch aus BaSO_4 -Plasma bzw. BaSO_4 -Serum und Silikon-Serum im Verhältnis 1 + 24 verdünnt (1 Teil des Inkubationsgemisches auf 24 Teile Puffer). Dem Prinzip des Thrombokinase-Bildungstestes folgend werden 0,3 ml dieser Serumverdünnung mit 0,3 ml BaSO_4 -Plasma (1 + 4 verdünnt), 0,3 ml Chloroform-Hirnextrakt (in einer als optimal ermittelten Verdünnung) und 0,3 ml einer m/40 CaCl_2 -Lösung gemischt und im Wasserbad bei 37°C inkubiert wird. — Es ist von besonderer Wichtigkeit, daß das im Thrombokinase-Bildungstest zu verwendende BaSO_4 -Plasma frisch mit Silikontechnik aufbereitet wurde. Bei -20°C gelagerte BaSO_4 -Plasmaproben sind ungeeignet, da durch das Einfrieren ein der direkten Kontakt-Aktivierung entsprechender Vorgang ausgelöst worden sein kann.

4. Bestimmung der Blutthrombokinase-Aktivität

Die Aktivität der sich in dem vorstehend angegebenen Inkubationsgemisch gebildeten Blutthrombokinase wird nach dem Prinzip des Thrombokinase-Bildungstestes (Biggs und Macfarlane [1957]) in Intervallen von 1 Minute an Dowex-Plasma getestet.

Auf welche Weise diese Folge direkter und indirekter Kontakt-Aktivierung die Blutthrombokinase-Bildung zu beeinflussen vermag, zeigt die Abb. 1. Wie daraus zu ersehen, erfolgt die Blutthrombokinase-Bildung in einer für den Thrombokinase-Bildungstest typischen Weise, wenn das im Bildungstest verwendete Silikon-Serum mit einem BaSO_4 -Serum inkubiert wurde, das zuvor mit Glaswolle in Kontakt gebracht worden war (Kurve II). Dagegen war die Blutthrombokinase-Bildung stark verzögert und vermindert, wenn das mit dem Silikon-Serum zu mischende BaSO_4 -Serum ohne Glaskontakt belassen wurde (Kurve I).

Gleiche Befunde konnten erhoben werden, wenn BaSO_4 -Plasma an Stelle von BaSO_4 -Serum verwendet wurde. Somit erscheinen der oder die direkter Kontakt-Aktivierung zugänglichen Gerinnungsfaktoren in Serum und Plasma nicht in unterschiedlicher Konzentration vorzuliegen.

Eichkurven

Führt man den Kontakt-Aktivierungstest mit steigend verdünntem BaSO_4 -Serum oder BaSO_4 -Plasma durch, so kommt es als Ausdruck einer zunehmend reduzierten indirekten Kontakt-Aktivierung zu einer zunehmend verminderten Blutthrombokinase-Bildung. Auf diese Weise werden unter Berücksichtigung bereits früher dargelegter Überlegungen (Egli und Klesper 1958) quantitative Angaben über die durch direkten Glaskontakt aktivierbaren Gerinnungsfaktoren ermöglicht.

Nachdem so das Prinzip und die Technik des Kontakt-Aktivierungstestes dargelegt wurde, sei im folgenden mit der Untersuchung der Bedeutung des Kalziums für die Kontaktwirkung benetzbarer Oberflächen zugleich eine seiner Anwendungsmöglichkeiten demonstriert.

Der Einfluß von Kalzium auf die Kontakt-Aktivierung

Zu den offenen Fragen über den Reaktionsmechanismus von Kontaktwirkungen gehört die nach der Beteiligung des Kalziums. Die Mehrzahl der Untersucher stimmt darin überein, daß Kalzium für eine Kontaktwirkung benetzbarer Oberflächen nicht erforderlich ist. In eigenen Untersuchungen konnte jedoch eine

deutliche Kalziumabhängigkeit der Kontakt-Aktivierung des Faktors IX (bestimmt nach der Methodik von Geiger, Duckert und Koller [1956]) gezeigt werden (Egli und Klesper [1958a]). Da die gleichen Untersuchungen es aber als fraglich erscheinen ließen, ob die Methodik von Geiger, Duckert und Koller als isolierte Faktor-IX-Bestimmung anzusehen ist oder vielmehr einen Komplex aus direkt und indirekt aktivierbaren Gerinnungsfaktoren erfaßt, lag es nahe, mit Hilfe des Kontakt-Aktivierungstestes den Einfluß von Kalzium auf die direkte und indirekte Aktivierungsphase zu untersuchen.

Der Einfluß von Kalzium auf die direkte Kontakt-Aktivierung

Zur Prüfung der Frage, ob die direkte Kontakt-Aktivierung der Mitwirkung von Kalzium bedarf, wurde die mit Glaswolle in Kontakt zu bringende Serumprobe nach vorheriger BaSO_4 -Adsorption und 30minütigem Erhitzen auf 56°C

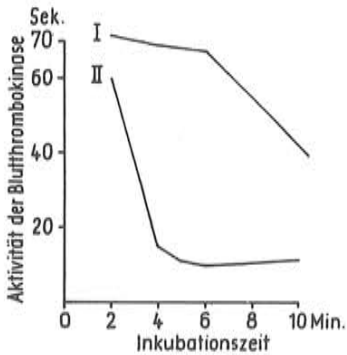


Abb. 1.

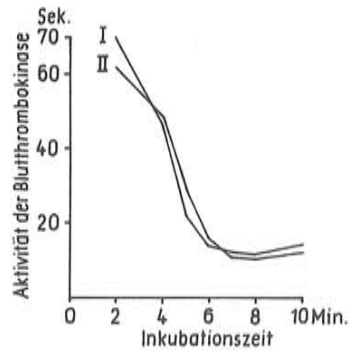


Abb. 2.

Abb. 1: Der Einfluß von BaSO_4 -Serum (30 Minuten auf 56°C erhitzt) auf die Aktivität von Silikon-Serum im Thrombokinase-Bildungstest. BaSO_4 -Serum (1 Teil) und Silikon-Serum (9 Teile) wurden gemischt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. — Kurve I: Das BaSO_4 -Serum war ohne Glaskontakt belassen worden. — Kurve II: Das BaSO_4 -Serum war vor Mischung mit dem Silikon-Serum 5 Minuten mit Glaswolle bei 37°C inkubiert worden.

Abb. 2: Der Einfluß von Kalzium auf die direkte Kontakt-Aktivierung.

Testgemisch I — Direkte Kontakt-Aktivierung bei Anwesenheit von Kalzium.

0,4 ml physiologische Kochsalzlösung wurden mit 1,6 ml BaSO_4 -Serum*) gemischt, 5 Minuten mit Glaswolle bei 37°C aktiviert und anschließend mit 0,4 ml Natriumzitratlösung (3,8%) versetzt. 0,2 ml dieser Mischung wurden mit 1,8 ml Silikon-Serum 15 Minuten bei 37°C inkubiert (indirekte Kontakt-Aktivierung). Nach beendeter Inkubation wurde dieses Gemisch im Verhältnis 1 + 24 mit Puffer verdünnt und als Serumkomponente im Thrombokinase-Bildungstest verwendet.

Testgemisch II — Direkte Kontakt-Aktivierung bei Abwesenheit von Kalzium.

0,4 ml Natriumzitratlösung (3,8%) wurden mit 1,6 ml BaSO_4 -Serum*) gemischt, 5 Minuten mit Glaswolle bei 37°C aktiviert und anschließend mit 0,4 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt. 0,2 ml dieser Mischung wurden mit 1,8 ml Silikon-Serum 15 Minuten bei 37°C inkubiert (indirekte Kontakt-Aktivierung). Weiteres Vorgehen entsprechend dem Testgemisch I.

*) Das BaSO_4 -Serum wurde zur Entfernung des Natriumoxalats 12 Stunden gegen mehrfach gewechselte physiologische Kochsalzlösung dialysiert, womit eine gegenseitige Beeinflussung von Ziträt- und Oxalatlösungen vermieden werden sollte. Die ausschließliche Verwendung von Oxalatlösungen ist wegen ihrer gegenüber Zitratlösungen verzögert eintretenden dekalzifizierenden Wirkung ungeeignet, da dadurch eine Ausschaltung des der Glaswolle anhaftenden Kalziums nicht rechtzeitig genug erfolgt, um kalziumabhängige Kontaktwirkungen sicher zu blockieren.

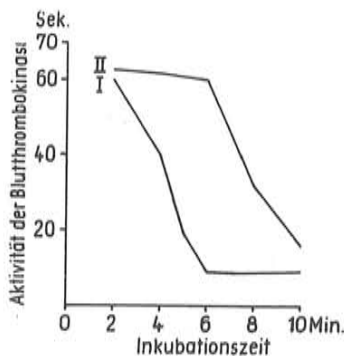
vor der Kontakt-Aktivierung mit Natriumzitrat (3,8%) oder, in einer Kontrollreihe, mit einer entsprechenden Menge physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Detaillierte methodische Angaben finden sich bei der Abb. 2. — Um eine von der Wirkung auf die direkte Kontakt-Aktivierung zu unterscheidende anderweitige Zitratswirkung sicher ausschließen zu können, wurde der Kontrollreihe nach beendeter Kontakt-Aktivierung ebenfalls ein gleiches Volumen Natriumzitratlösung zugesetzt. Die vor der Kontakt-Aktivierung bereits mit Natriumzitrat versetzte BaSO₄-Serumprobe erhielt zum Volumenausgleich eine entsprechende Menge physiologischer Kochsalzlösung.

Wie die Abb. 2 zeigt, führen beide Meßreihen zu einer gleich schnellen und gleich starken Blutthrombokinase-Bildung, so daß die direkte Kontakt-Aktivierung durch die erfolgte Dekalzifizierung nicht beeinflusst worden sein kann. Prüft man jedoch die thrombokinasebildende Aktivität zweier Serumproben im Thrombokinase-Bildungstest, die entsprechend der vorstehenden Versuchsanordnung vor und nach Glaskontakt mit einer Natriumzitrat- bzw. einer physiologischen Kochsalzlösung versetzt worden waren, so zeigt sich eine deutlich verzögerte und verminderte Bildung von Blutthrombokinase, wenn der Zitratzusatz vor der Kontakt-Aktivierung erfolgte (Abb. 3). Daraus ist zu folgern, daß die verwendeten Natriumzitratkonzentrationen für die Hemmung der Kontaktwirkung grundsätzlich ausreichend waren, die nach den bisherigen Ergebnissen somit für die indirekte Kontakt-Aktivierung erwartet werden sollte.

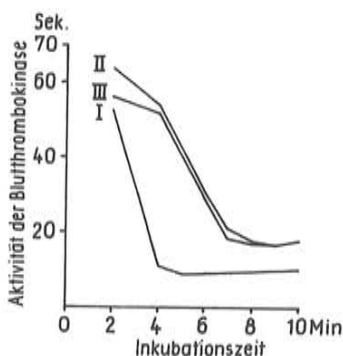
Der Einfluß von Kalzium auf die indirekte Kontakt-Aktivierung

Zur Klärung der Frage, ob die während der Inkubation eines Gemisches aus aktiviertem BaSO₄-Serum und nicht aktiviertem Silikon-Serum ablaufenden (indirekten) Aktivierungsvorgänge der Anwesenheit von Kalzium bedürfen, wurde die Inkubationsphase sowohl in kalziumfreiem als auch in kalziumhaltigem Milieu durchgeführt. Dazu mischten wir das erhitzte und in der für den Kontakt-Aktivierungstest beschriebenen Weise aktivierte BaSO₄-Serum mit einem Silikon-Serum, das zuvor durch Natriumzitratzusatz dekalzifiziert worden war (1 Teil Natriumzitrat, 3,8%, auf 4 Teile Silikon-Serum). In einer Kontrollreihe wurde die Natriumzitratlösung durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Um eine eventuelle Zitratswirkung auf die weitere Blutthrombokinase-Bildung und Bestimmung ausschließen zu können, wurde nach beendeter Inkubation dem kalziumfreien Inkubationsgemisch physiologische Kochsalzlösung, dem kalziumhaltigen Inkubationsgemisch des Kontrollversuchs ein entsprechendes Volumen Natriumzitratlösung zugesetzt. Wie aus der Abb. 4, bei der sich auch nähere methodische Angaben finden, ersichtlich, erfolgt die Blutthrombokinase-Bildung stark verzögert und vermindert, wenn die indirekte Aktivierungsphase

in Abwesenheit von Kalzium abläuft. Die Kontrollreihe, bei welcher der Zitratzusatz erst nach beendeter Inkubation, d. h. nach beendeter indirekter Kontakt-Aktivierung, erfolgte, war dagegen eine völlig normale, durch die zugesetzte Natriumzitratlösung unbeeinflusst bleibende Bildung von Blutthrombokinase zu beobachten.



A b b . 3



A b b . 4

A b b . 3 : Die Kalzium-Abhängigkeit der Kontakt-Aktivierung von Silikon-Serum. Die komplexe Aktivität des Silikon-Serums wurde im Thrombokinase-Bildungstest bestimmt.

Kurve I: Blutthrombokinase-Bildung unter Verwendung von Silikon-Serum, das in Anwesenheit von Kalzium kontakt-aktiviert wurde. (1,6 ml Silikon-Serum wurden mit 0,4 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und anschließend 5 Minuten mit Glaswolle bei 37° C inkubiert. Nach möglichst quantitativem Abtrennen der Glaswolle Zusatz von 0,4 ml Natriumzitratlösung [3,8%], Verdünnung 1 + 24 und Verwendung als Serumkomponente im Thrombokinase-Bildungstest).

Kurve II: Blutthrombokinase-Bildung unter Verwendung von Silikon-Serum, das bei weitgehendem Mangel an Kalzium kontakt-aktiviert wurde. (1,6 ml Silikon-Serum wurden mit 0,4 ml Natriumzitratlösung [3,8%] versetzt und anschließend 5 Minuten mit Glaswolle bei 37° C inkubiert. Nach möglichst quantitativem Abtrennen der Glaswolle Zusatz von 0,4 ml physiologischer Kochsalzlösung). — Weiteres Vorgehen wie bei Kurve I.

A b b . 4 : Der Einfluß von Kalzium auf die indirekte Kontakt-Aktivierung. Ein Vergleich der Kurven I und II läßt eine deutliche Kalziumabhängigkeit der indirekten Aktivierungsphase erkennen.

Testgemisch I — Indirekte Kontakt-Aktivierung bei Anwesenheit von Kalzium.

0,2 ml eines 5 Minuten bei 37° C mit Glaswolle aktivierten BaSO₄-Serums wurden 1,8 ml Kochsalz-Silikon-Serum (1 Teil physiologische Kochsalzlösung + 4 Teile Silikon-Serum) gemischt und 15 Minuten bei 37° C inkubiert (indirekte Kontakt-Aktivierung). Dieses Gemisch wurde nach beendeter Inkubation mit 0,36 ml Natriumzitratlösung (3,8%) versetzt, im Verhältnis 1 + 24 mit Puffer verdünnt und als Serumkomponente im Thrombokinase-Bildungstest verwendet.

Testgemisch II — Indirekte Kontakt-Aktivierung bei Abwesenheit von Kalzium.

0,2 ml eines 5 Minuten bei 37° C mit Glaswolle aktivierten BaSO₄-Serums wurden mit 1,8 ml eines Natriumzitratlösung-Silikon-Serums (1 Teil Natriumzitratlösung + 4 Teile Silikon-Serum) gemischt und 15 Minuten bei 37° C inkubiert (indirekte Kontakt-Aktivierung). Dieses Gemisch wurde nach beendeter Inkubation mit 0,36 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt, im Verhältnis 1 + 24 mit Puffer verdünnt und als Serumkomponente im Thrombokinase-Bildungstest verwendet.

Testgemisch III — Prüfung der Blutthrombokinase-Bildung ohne vorherige Kontakt-Aktivierung des BaSO₄-Serums. Übriges Vorgehen wie bei Testgemisch I.

Faßt man die Ergebnisse dieser Versuchsreihen zusammen, so muß die Mitwirkung des Kalziums für eine volle Kontaktwirkung benetzbarer Oberflächen als unentbehrlich angesehen werden, wenn unter dieser die Summe direkter und indirekter Aktivierungsvorgänge verstanden wird. Wie der Kontakt-Aktivierungstest zeigt, bedarf jedoch nur die indirekte Kontakt-Aktivierung der Mitwirkung von Kalzium.

Besprechung der Ergebnisse

Frühere Versuche haben gezeigt, daß hinsichtlich des Einflusses benetzbarer Oberflächen auf die Blutthrombokinas-Bildung zwischen direkten und indirekten Kontaktwirkungen unterschieden werden muß. In Anlehnung an den Thrombokinas-Bildungstest wird im vorstehenden eine Methodik angegeben, die es gestattet, zwischen direkten und indirekten Kontaktwirkungen zu differenzieren. Im Unterschied zu anderen, ebenfalls die Kontrolle von Kontaktwirkungen ermöglichenden Methoden, wie dem „glass activation test“ und der „kaolin clotting time“ von Margolis (1957 und 1958) oder der von Waaler angegebenen Methodik (1959) erfaßt der Kontakt-Aktivierungstest vornehmlich die an der Blutthrombokinas-Bildung beteiligten kontaktsensiblen Phasen. Das erscheint insofern von Wichtigkeit, als nach eigenen früheren Untersuchungen (Egli [1957]) die Kontaktwirkung „fremder“ Oberflächen als eine *Conditio sine qua non* für die Blutthrombokinas-Bildung anzusehen ist. Der in mehrere Stufen unterteilte Bestimmungsvorgang erlaubt insbesondere reaktionskinetische Untersuchungen, wobei je nach Fragestellung entsprechende Modifikationen möglich sind.

Beim Kontakt-Aktivierungstest werden nur der Hageman-Faktor und das PTA unmittelbarem Glaskontakt ausgesetzt, da nur diese beiden Faktoren weder an BaSO_4 adsorbiert noch durch 30minütiges Erhitzen auf 56°C zerstört werden (Ratnoff und Colopy [1955]; Rosenthal, Dreskin und Rosenthal [1953]). Für den Hageman-Faktor kann die direkte Kontakt-Aktivierbarkeit insbesondere seit den Untersuchungen von Ratnoff und Rosenblum (1958) sowie von Margolis (1957) als gesichert gelten. Für das PTA haben Rapaport, Ames und Mikkelsen (1958) gleichfalls eine Kontakt-Aktivierung beschrieben. Die Frage, ob es sich dabei um eine direkte oder indirekte Kontakt-Aktivierung handelt, wurde von den Autoren weder diskutiert, noch war sie auf Grund ihrer Versuchsanordnung zu entscheiden, da die verwendete Einstufenmethode nicht zwischen direkten und indirekten Aktivierungsvorgängen zu differenzieren gestattete. Auch der Kontakt-Aktivierungstest erlaubt in seiner vorliegenden Form zu dieser Frage keine Aussage, da in dem mit Glaswolle in Kontakt gebrachten BaSO_4 -Plasma oder BaSO_4 -Serum Hageman-Faktor *und* PTA enthalten sind. Die Frage nach der direkten Kontakt-Aktivierbarkeit des PTA wäre jedoch mit dem Kontakt-Aktivierungstest prinzipiell möglich, wenn er unter Verwendung von Blutproben durchgeführt würde, denen entweder der Hageman-Faktor oder das PTA fehlt. Auf Einzelheiten der dazu erforderlichen methodischen Modifikationen sei nicht näher eingegangen, zumal für eigene Versuche frische Blutproben dieser seltenen Mangelzustände bisher nicht verfügbar waren. Inwieweit durch stärkeres Erhitzen das

im BaSO_4 -Plasma oder BaSO_4 -Serum enthaltene PTA bei erhalten bleibendem Hageman-Faktor inaktiviert werden kann und somit mit dem Kontakt-Aktivierungstest eine isolierte Bestimmung des Hageman-Faktors ermöglicht würde, ist zur Zeit Gegenstand weiterer Untersuchungen.

An der zweiten, indirekten Aktivierungsphase dürfte vor allem der Faktor IX beteiligt sein. Verfolgt man nämlich die Faktor-IX-Aktivität in dem Gemisch aus aktiviertem BaSO_4 -Plasma oder BaSO_4 -Serum und Silikon-Serum während der Inkubationsphase, so findet sich ein kontinuierlicher Anstieg der Faktor-IX-Aktivität. Diese sicher indirekte Kontakt-Aktivierung des Faktors IX schließt aber die Möglichkeit seiner direkten Kontakt-Aktivierbarkeit nicht aus. Auf Grund von Versuchen mit isoliertem Faktor IX, über die an anderer Stelle berichtet werden soll, sind wir jedoch mit *W a a l e r* (1959) der Auffassung, daß eine direkte Kontakt-Aktivierung des Faktors IX nicht erfolgt.

Mit Hilfe des Kontakt-Aktivierungstestes war es weiterhin möglich, die umstrittene Bedeutung des Kalziums für die Gerinnungsvorphase zu klären. Es unterliegt keinem Zweifel, daß die Mitwirkung des Kalziums für eine volle Kontaktwirkung benetzbarer Oberflächen unentbehrlich ist, wenn unter dieser die Summe direkter und indirekter Kontaktwirkungen verstanden werden soll. Geht man von der Vorstellung aus, daß die unmittelbare Kontaktbeeinflussung des Hageman-Faktors zu einer Komplexbildung zunächst mit dem PTA und dann mit dem Faktor IX führt, so ist nach den vorliegenden Befunden Kalzium lediglich für das letzte Glied dieser Reaktionskette erforderlich. Dagegen ist Kalzium für die unmittelbare Kontakt-Aktivierung des Hageman-Faktors sicher entbehrlich, seine Mitwirkung an der Reaktion zwischen Hageman-Faktor und PTA auf Grund der vorliegenden Befunde nicht zu unterscheiden. Diese reaktionskinetischen Folgerungen stimmen mit denen von *Margolis* (1958), *Soulier*, *Wartelle* und *Ménaché* (1959) sowie *W a a l e r* (1959) überein.

Zusammenfassung

Es wird eine Methodik beschrieben, die eine differenzierte Bestimmung direkter und indirekter Kontaktwirkungen auf die Blutthrombokinase-Bildung ermöglicht. Dazu wird eine zuvor auf 56°C erhitzte Probe von BaSO_4 -Serum oder BaSO_4 -Plasma intensiv mit Glas in Kontakt gebracht (direkte Kontakt-Aktivierung) und mit einer unter Silikontechnik gewonnenen Serumprobe gemischt. Die danach auftretende Steigerung der thromboplastischen Aktivität des Silikon-Serums (indirekte Kontakt-Aktivierung) wird mit Hilfe des Thrombokinase-Bildungstestes von *Biggs*, *Douglas* und *Macfarlane* bestimmt. — Kalzium erwies sich lediglich für die indirekte Kontakt-Aktivierung als unent-

behrlich, in der vermutlich eine Reaktion zwischen dem Faktor IX (Christmas-Faktor) und einem, unter dem Einfluß direkter Kontaktwirkung gebildeten Komplex aus Hageman-Faktor und PTA erfolgt.

Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Summary

A method is described which allows a differentiation and estimation of contact effect on the thromboplastin generation test. For this purpose serum or plasma adsorbed on $BaSO_4$ and heated to $56^\circ C$ is treated with glass (direct contact activation). This activated serum is mixed with serum prepared by silicone technic. The latter is activated by the former (indirect contact activation) and assayed in the thromboplastin generation test of Biggs, Douglas and Macfarlane. Calcium is needed only for indirect contact activation, during which probably a reaction takes place involving Factor IX (Christmas Factor) and a complex of Hageman-Factor and PTA, formed during direct contact activation.

Résumé

Une méthode est décrite qui permet une détermination de l'action de contact directe et indirecte sur la formation de la thromboplastine sanguine. Dans ce but un sérum ou plasma adsorbé sur $BaSO_4$ et chauffé à $56^\circ C$ est activé par contact intensif avec le verre (activation par contact direct), puis mélangé avec un sérum obtenu en utilisant du matériel siliconé. L'activation résultante (activation de contact indirect) est mise en évidence au moyen du test de formation de la thromboplastine de Biggs, Douglas et Macfarlane. Le calcium est nécessaire seulement pour l'activation indirecte au cours de laquelle il y a réaction probable entre le facteur IX (Christmas Factor) et un complexe Facteur Hageman-PTA formé sous l'influence de l'activation de contact direct.

Literatur

- Biggs, R., Douglas, A. S. and Macfarlane, R. G.: The formation of thromboplastin in human blood. *J. Physiol.* 119: 89 (1953).
Biggs, R. and Macfarlane, R. G.: Human blood coagulation and its disorders. Oxford, 1957.
Biggs, R., Sharp, A. A., Margolis, J., Hardisty, R. M., Stewart, J. and Davidson, W. M.: Defects in the early stages of blood coagulation: a report of four cases. *Brit. J. Haemat.* 4: 177 (1958).

- Duckert, F., Flückiger, P., Isenschmid, H., Matter, M., Vogel-Meng, J. and Koller, F.: A modification of the thromboplastin generation test. *Acta haemat.* 12: 197 (1954).
- Egli, H.: Untersuchungen zur Bildung von Blutthrombokinase. *Pflügers Arch.* 266: 11 (1957).
- Egli, H. und Klesper, R.: Untersuchungen über den Thrombokinase-Bildungstest. (Ein Beitrag zur Methodik und zur Reaktionskinetik der Thrombokinase-Bildung). *Thromb. Diath. haem.* 2: 39 (1958).
- Egli, H. und Klesper, R.: Über den Einfluß von Glaskontakt auf den Faktor IX (Christmas Factor) und den Stuart-Prower-Faktor. VII. Int. Haemat. Kongreß Rom (1958).
- Geiger, M., Duckert, F. und Koller, F.: Quantitative Bestimmungen von Faktor VIII (antihämophilem Globulin) und Faktor IX (Christmas Factor, PTC) bei Blutersippen. Fünfter Kongreß der Europäischen Gesellschaft für Hämatologie, Berlin—Göttingen—Heidelberg, 1956.
- Margolis, J.: Initiation of blood coagulation by glass and related surfaces. *J. Physiol.* 137: 95 (1957).
- Margolis, J.: The kaolin clotting time. *J. Clin. Pathol.* 11: 406 (1958).
- Rapaport, S. J., Ames, S. B., Mikkelsen, S.: Evidence that glass increases plasma PTA activity. *J. Labor. Clin. Med.* 52: 624 (1958).
- Ratnoff, O. D. and Rosenblum, J. M.: Role of Hageman Factor in the initiation of clotting by glass. Evidence that glass frees Hageman Factor from Inhibition. *Amer. J. Med.* 35: 160 (1958).
- Ratnoff, O. D. and Colopy, J. E.: A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *J. Clin. Invest.* 34: 602 (1955).
- Rosenthal, R. L., Dreskin, O. H. and Rosenthal, N.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 82: 171 (1953), zitiert nach Deutsch, E.: Blutgerinnungsfaktoren, Wien, 1955.
- Soulier, J. P., Wartelle, O. and Ménaché, D.: Hageman trait and PTA deficiency; the role of contact of blood with glass. *Brit. J. Haemat.* 5: 121 (1959).
- Waaler, B. A.: Contact activation in the intrinsic blood clotting system. *Scand. J. Clin. Labor. Invest. Suppl. to vol. 11* (1959).