

UV-Spektrographische Untersuchungen über die Hemmung der Fibrinbildung durch Hexamethylenglykol.

Von

F. Seelich, E. Schauenstein und M. Hochenegger.

Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Universität Wien und dem Institut für theoretische und physikalische Chemie der Universität Graz.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 8. Dez. 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 11. Dez. 1952.)

Die spektrale Untersuchung des Systems: Fibrinogen—Thrombin—Hexamethylenglykol im mittleren Ultraviolett ergibt eine Zusatzabsorption in jenen Bereichen, in welchen die Fibrinogen-Fibrinumwandlung ihren Ausdruck findet; jedoch ist der bei Gegenwart von Hexamethylenglykol beobachtete Effekt wesentlich geringer als der bei normaler Fibrinbildung auftretende. Die Wirkung des Hexamethylenglykols wird auf Grund früherer Befunde als Hemmung der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen C=O- und NH-Gruppen gedeutet.

Die so zahlreichen Bemühungen um ein Verstehen des Reaktionsmechanismus der Blutgerinnung haben in jüngster Zeit einen wesentlichen Erfolg gebracht — die weitgehende Aufklärung des Reaktionsablaufes bei der Bildung von Fibrin aus Fibrinogen unter Einwirkung von Thrombin. Nachdem schon früher vermutet worden war, daß die Wirkung des Thrombins der eines Ferments entspricht, das die Struktur des Fibrinogens so verändert, daß letzteres imstande ist, zu einem Fibrincoagulum zu vernetzen¹, konnten 1951 *Bailey, Bethelheim, Lorand* und *Middlebrook*² und auch *Laki*³ über Versuchsergebnisse berichten,

¹ *A. Schmidt*, Weitere Beiträge zur Blutlehre. Wiesbaden: Verl. Bergmann. 1895. — *O. Hammarsten*, A Textbook of Physical Chemistry. New York: Verl. Wiley. 1914. — *E. Wöhlisch*, *Ergebn. Physiol.* **28**, 443 (1929). — *H. Eagle* und *T. Harris*, *J. Gen. Physiol.* **20**, 543 (1937). — *P. Nolf*, *Medicine* **17**, 381 (1938).

² *K. Bailey, F. R. Bethelheim, L. Lorand* und *W. R. Middlebrook*, *Nature* **167**, 233 (1951).

³ *Koloman Laki*, *Arch. Biochem. Biophys.* **32**, 317 (1951); *Nature (Paris)* **114**, 435 (1951).

die diese Annahme sehr wahrscheinlich machten. Seither wurden von *Lorand* Beobachtungen veröffentlicht⁴, die geeignet erscheinen, die letzten Zweifel bezüglich der Richtigkeit dieser Auffassung zu zerstreuen. Die „Denaturase“-Wirkung des Thrombins ist die Folge einer sehr spezifischen und beschränkten Aufspaltung von Glycyl-Peptidbindungen, wobei eine geringe Menge eines Peptids freigesetzt wird, das in anscheinend reinem Zustande isoliert werden konnte. Nach dieser Abspaltung sind die Moleküle des Fibrinogens bzw. des Profibrins, die allerdings noch rund 16% einer dem *Lorandschen* Peptid auffallend ähnlichen Komponente enthalten⁵, imstande, intermolekulare Vernetzungsreaktionen einzugehen. Wie man sich eine solche Vernetzung vorzustellen hat, ergibt sich aus den theoretischen Überlegungen von *Wirtz*⁶ und aus den Arbeiten von *Schauenstein*⁷, der auf Grund der UV-Absorption bei der fibrillären Denaturierung die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen C=O- und NH-Gruppen sehr wahrscheinlich machen konnte (siehe auch S. 83/84).

Die Fibrinogendenaturierung ist nun nicht allein für die Aufklärung der Bildung eines Fibringerinnsels bei der Blutgerinnung von Interesse, sondern auch für die Kenntnis der Faserproteinbildung in lebendem Gewebe. Histologische Beobachtungen führten zu der jetzt wohl allgemeinen Auffassung, daß die Faserproteinbildung, z. B. die von kollagenen Fasern, außerhalb der Zellen erfolgt — wenn auch unter deren aktiver Beteiligung. Es handelt sich hierbei sicher nicht allein um eine fermentativ induzierte Strukturumwandlung gelöster, „nativer“ Eiweißkörper, sondern um einen komplizierteren Vorgang unter Beteiligung weiterer Komponenten, wie etwa die fibrilläre Denaturierung durch gerichtete Adsorption an bereits bestehenden orientierten Faserpartikeln⁸, oder durch mechanische Eingriffe, wie Zug und Druck⁹. Insbesondere erscheinen auch höher molekulare Kohlehydrate an der Bildung der Faserproteine beteiligt zu sein. Von den zahlreichen, dieses Problem betreffenden Arbeiten können an dieser Stelle nur wenige

⁴ *L. Lorand*, *Nature* **167**, 992 (1951). — *L. Lorand* und *W. R. Middlebrook*, *Biochemic. J.* **52**, 196 (1952). — *L. Lorand*, *Fibrino-peptide*, *Biochemic. J.* **52**, 200 (1952).

⁵ *E. Schauenstein* und *M. Hochenegger*, *J. Polymer Sci.* (1953), im Druck.

⁶ *K. Wirtz*, *Z. Naturforsch.* **2 b**, 94, 314 (1947); **3 b**, 131 (1948); *Z. Elektrochem.* **54**, 47 (1950).

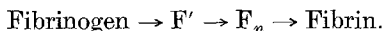
⁷ *E. Schauenstein*, *Mh. Chem.* **80**, 820 (1949). — *O. Kratky* und *E. Schauenstein*, *Z. Naturforsch.* **5 b**, 281 (1950). — *E. Schauenstein*, *M. Hochenegger* und *M. Walzel*, *Z. Biol.* **104**, 228 (1951). — *E. Schauenstein*, *Melliands Textilber.* **33**, 591 (1952).

⁸ *H. Druckrey* und *D. Schmähl*, *Z. Naturforsch.* **7 b**, 353 (1952).

⁹ *O. Kratky*, *E. Schauenstein* und *A. Sekora*, *Nature* **166**, 1031 (1950).

erwähnt werden, wie z. B. die von *Groß* und Mitarbeitern¹⁰, denen wir eine Analyse der Carbohydratkomponente des Kollagens verdanken. Wir verweisen auch auf die Beobachtungen von *Morrione*¹¹ und von *Randall* und Mitarbeitern¹². *Sacerdote de Lustig* und *Mancini*¹³ berichten, daß bei in vitro kultiviertem embryonalem Mesenchymgewebe Hodenhyaluronidase, die ein Gemisch verschiedener polysaccharidspaltender Fermente darstellt, die Bildung von Kollagenfasern stört, ohne das Zellwachstum zu beeinflussen.

Im Hinblick auf diese Probleme gewinnen jene Arbeiten an Interesse, die über eine Beeinflussung der Eiweißdenaturierung bzw. der Faserproteinbildung durch Kohlehydrate, durch Mucopolysaccharide oder durch mehrwertige Alkohole berichten. Beobachtet wurde eine Hemmung der Hitzekoagulation¹⁴ sowie auch der Fibrinbildung¹⁵. Die Arbeitsgruppe *Shulman* und *Ferry*¹⁵ verwendet unter anderem Hexamethylenglykol, welches, ohne das Thrombin oder die unmittelbare Vorstufe des Fibrins irreversibel zu verändern, eine Entstehung von Fibrinfasern verhindert. Nach diesen Autoren führt die Reaktion bei Gegenwart ausreichender Mengen von Hexamethylenglykol zu einer Vorstufe des Fibrins (F_n), die sich erst nach Wegdialysieren des Hexamethylenglykols spontan in Fibrin umwandelt:



F' dürfte wohl mit dem unvernetzten Profibrin identisch sein, das auf Grund der Befunde von *Laki*³ und von *Lorand*⁴ als primäres Reaktionsprodukt der Fibrinogen-Thrombinreaktion anzusehen ist. F_n repräsentiert nach *Shulman* und *Ferry* ein nicht einheitliches Polymerisat kettenförmig aneinander gelagerter F' -Moleküle, anscheinend hauptsächlich aus Dimeren dieser Vorstufe des Fibrins bestehend. Wir stellten uns nun

¹⁰ *J. Gross, J. H. Highberger* und *F. O. Schmitt*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **80**, 462 (1952). — *J. H. Highberger, J. Gross* und *F. O. Schmitt*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **37**, 286 (1951).

¹¹ *Th. G. Morrione*, J. Exp. Med. **96**, 107 (1952).

¹² *J. T. Randall, R. D. B. Fraser, S. Jackson, A. V. W. Martin* und *A. C. T. North*, Nature **169**, 1029 (1952).

¹³ *E. Sacerdote de Lustig* und *R. E. Mancini*, Rev. Soc. Argent. Biol. **26**, 234 (1950).

¹⁴ *R. Fischer*, Exper. **3**, 29 (1947). — *B. Drevon* und *R. Plan*, C. r. Soc. biol. Paris **144**, 21/22 (1523/24) (1950). — *H. Bergstermann*, Klin. Wschr. **30**, 392 (1952).

¹⁵ *J. D. Ferry* und *S. Shulman*, J. Amer. Chem. Soc. **71**, 3198 (1949). — *S. Shulman, W. C. Herwig* und *J. D. Ferry*, Arch. Biochem. Biophys. **32**, 354 (1951). — *S. Shulman*, Arch. Biochem. **30**, 353 (1951). — *S. Shulman* und *J. D. Ferry*, J. Physic. Coll. Chem. **55**, 135 (1951). — *J. D. Ferry*, Angew. Chem. **64**, 338 (1952). — *J. D. Ferry, S. Shulman* und *J. F. Foster*, Arch. Biochem. Biophys. **39**, 387 (1952).

zur Aufgabe, die UV-Absorption des Zwischenproduktes F_n zu untersuchen, um auf diesem Wege zu Vorstellungen betreffend den Charakter der Strukturumwandlung zu gelangen.

Die spektrale Untersuchung des Systems: Fibrinogen—Thrombin—Hexamethylenglykol erscheint auch im Hinblick auf vorangegangene Arbeiten¹⁶ von Interesse, in denen gezeigt werden konnte, daß bei der Aggregation von Eiweißpartikeln, besonders bei der fibrillären Denaturierung, eine neue Absorption im UV auftritt. Die bisherigen experimentellen Befunde sprachen mit größter Wahrscheinlichkeit dafür, daß diese „Zusatzabsorption“ dem Peptidgerüst zuzuschreiben ist. Auf Grund der Tatsache, daß die normale Peptidgruppe im Gebiet der beobachteten Zusatzabsorption praktisch durchlässig ist, und an Hand von entsprechendem Vergleichsmaterial, ergab sich als plausibelste Deutung die Zuordnung der neu auftretenden Banden zur Enolform der H-gebundenen Peptidgruppe.

Da nun nach der Theorie von *Wirtz*⁶ die Umlagerung in die Enolform nur auf Grund entsprechend ausgedehnter Systeme durch H-Brücken vernetzter Peptidgruppen möglich wird, läßt die Intensität der Zusatzabsorption gewisse Aussagen über das Ausmaß neu gebildeter oder aufgesprengter Wasserstoffbrücken zu.

Experimentelles.

Gemäß den Angaben von *Shulman* und *Ferry*¹⁵ wurde eine Fibrinogenlösung (1,2 bis 1,3 g/l) in 0,4 m NaCl und 0,05 m Phosphatpuffer (pH 6,25) bereitet, die 0,4 m Hexamethylenglykol enthielt. Zu 30 bis 50 ccm dieser Lösung wurden zirka 3 mg Thrombin gegeben, gut durchgemischt und die Lösung bei Zimmertemperatur unter Verschuß stehen gelassen. In bestimmten Zeitabständen wurde ein Spektrum unter Gegenschaltung einer bis auf den Fibrinogengehalt identischen Vergleichslösung aufgenommen. (Wasserstofflampe als Lichtquelle, Methode mit zentrisch rotierender Sektorblende und Vergleichsspektren¹⁷.) Insgesamt wurden drei Versuchsreihen angesetzt.

Ergebnisse.

Die Kurve 2 der Abb. 1 gibt die nach rund 40stündiger Reaktion gemessene Absorptionskurve wieder (Versuch I). Allgemein geht daraus hervor, daß im Zuge der Polymerisation tatsächlich eine wenn auch schwache, so doch eindeutige zusätzliche Absorption auftritt.

Um sich über das tatsächliche Ausmaß des Effektes zu orientieren, ist es notwendig, die Intensität der durch Streustrahlung vorgetäuschten Lichtabsorption zu bestimmen. Dieser Anteil kann an sich in unserem

¹⁶ *P. Csokán* und *K. Laki*, Z. physik. Chem., Abt. A **190**, 278 (1942). — *M. Hochenegger*, Dissertation Universität Graz (1952).

¹⁷ *H. v. Halban*, *G. Kortüm* und *B. Szigheti*, Z. Elektrochem. **42**, 628 (1936).

Falle nicht erheblich sein, da schon die *Tyndall*-Absorption des Monomeren im Verhältnis zur Eigenabsorption praktisch vernachlässigbar klein ist. Man erkennt dies am steil abfallenden Kurvenast 3300 ν' sowie an der Koinzidenz zwischen speziellem Extinktionskoeffizienten des Fibrinogens (Kurve 1) und einer entsprechend zusammengesetzten Modellösung von Tyrosin und Tryptophan (Kurve 1a), die ja bekanntlich in diesem Gebiet die praktisch einzigen absorbierenden Aminosäuren darstellen. Abgesehen von einer geringfügigen Abweichung von zirka 4200 ν' an, die auf die Absorption der „normalen“, das heißt freien, mesomeren Peptidgruppe zurückgeht, sieht man somit, daß das Fibrinogen als „quasi-globularer“¹⁸ Eiweißkörper keine nennenswerten Zusatzbanden aufweist.

Das besagt nun natürlich nicht, daß im Fibrinogenteilchen keine H-Brücken existieren, sondern läßt lediglich den Schluß zu, daß entweder an sich sehr wenig H-Brücken oder räumlich nicht genügend ausgedehnte Systeme von H-Brücken im Sinne der Theorie von *Wirtz* vorhanden sind.

Dies scheint bei vielen globularen Proteinen, wie Serumalbumin, Insulin, Grammicidin¹⁵, der Fall zu sein.

Im Laufe der Bildung des von *Ferry* und *Shulman* mit F_n bezeichneten Polymerisationsproduktes tritt nun eine Erhöhung des Minimums bei 4000 ν' sowie eine angegedeutete Vorbannde bei zirka 3000 ν' auf, genau in

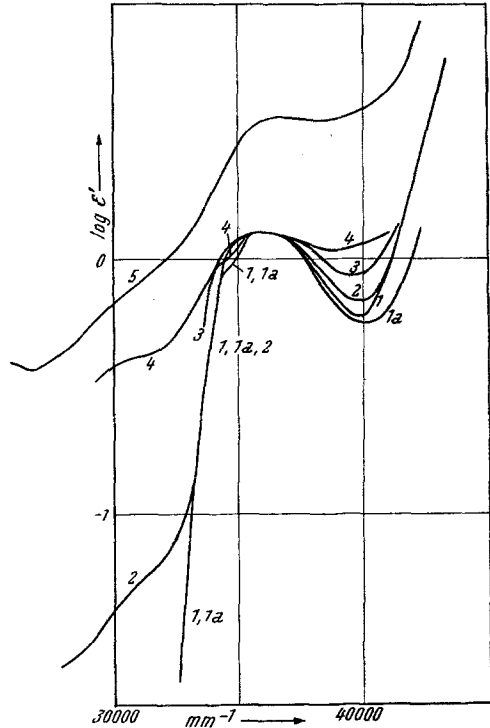


Abb. 1.

- Fibrinogen..... (1)
- Modellösung (1 a)
- Fibrinogen mit Thrombin + Hexamethylenglykol,
nach 45^b, auf Tyndall korrigiert (2)
- Fibrinfilin, ungedehnt (3)
- Fibrinfilin, 150% gedehnt (4)
- Fibrinfilin (5)

¹⁸ „quasi-globular“ bedeutet, daß Fibrinogen nicht die typischen Eigenschaften eines Faserproteins zeigt (Unlöslichkeit, Bildung elastisch dehnbarer Filme), sondern in seinen Eigenschaften eher den globularen Proteinen zuzuordnen ist, trotz seiner hohen axialen Asymmetrie.

jenen Spektralbereichen, in denen auf Grund der bisherigen Untersuchungen derartige Effekte erwartet werden müssen.

Eine Überprüfung der Meßfehler unserer Methode ist leicht durch die Ermittlung der Streuung der bei den drei Ansätzen ausgemessenen Absorptionsmaxima gegeben, wobei sich folgende Werte ergeben:

Tabelle 1.

| | m_{\max} | Mittel | Fehler in 1% m |
|----------------------|------------|--------|--|
| Fibrinogen | 1,778 | 1,806 | $\pm 1,05$ |
| Nach 0 Stdn. | 1,778 | | |
| „ 1 Std. | 1,905 | | $m = \frac{E}{d}; \quad E = \log \frac{I_0}{I};$ |
| „ 16 Stdn. | 1,778 | | |
| „ 24 „ | 1,820 | | $\varepsilon' = \frac{E}{c' \cdot d} \cdot (c' = g/e)$ |
| „ 44 „ | 1,779 | | |

Tabelle 2.

| Versuch | Fehler in m | Mittel |
|---------|---------------|--|
| I | $\pm 1,05\%$ | $\pm 1,14\%$ entsprechend $\pm 0,004 \log m$ |
| II | $2,02\%$ | |
| III | $0,34\%$ | |

Demgegenüber betragen die festgestellten Absorptionszunahmen:

Tabelle 3.

| Versuch | | $\Delta \log m$ bei 4000 | $\Delta \log m$ bei 3000 |
|---------|----------|-----------------------------|-----------------------------|
| I | 44 Stdn. | + 0,045 | |
| II | 44 „ | + 0,080 | |
| III | 39 „ | + 0,066 | + 0,4 |

Die gemessenen Effekte liegen somit eindeutig außerhalb der Versuchsfehler und sind als reell anzusehen. Wesentlich ist nun, wie bereits bemerkt, den durch *Tyndall*-Strahlung vorgetäuschten Absorptionsanteil zu ermitteln. Hierzu wäre es nötig, bis ins praktisch absorptionsfreie langwellige Gebiet zu messen, was mit unseren festgelegten Konzentrationen und Schichtdicken nicht möglich war. Um zu einer befriedigend genauen Abschätzung zu kommen, wurde folgende Überlegung angestellt: In den drei Versuchen wurde festgestellt, daß die Höhe des Maximums innerhalb der Meßfehler völlig konstant blieb. Der während dieser Zeit unter Umständen angestiegene *Tyndall*-Absorptionsanteil kann demnach bei 3600 ν' höchstens 0,60 bis 2 in $\log m$ betragen (Abb. 2). Legt man durch diesen Punkt eine *Tyndall*-

Kurve mit dem Wellenlängenexponenten $n = 2,5$, der auf Grund der Teilchenabmessungen hier zu erwarten ist, so kommt man bei $3950 \nu'$ zu einem Tyndall-Absorptionswert von 0,70 bis 2 in $\log m$. Zieht man diesen von der Gesamtabsorption ab, so resultiert eine Senkung des Minimums um maximal 0,015 in $\log m$. Somit verbleibt im Durchschnitt ein Absorption-zuwachs von mindestens 0,04 bis 0,05 $\log m$ -Einheiten bei $3950 \nu'$, der als konsumptive Lichtabsorption zu werten ist. Außerdem erscheint, wie erwähnt, im Endstadium eine sich gleichfalls sicher über die Tyndall-Absorption erhebende Zusatzbande bei zirka $3000 \nu'$, wie Abb. 1, Kurve 2, zeigt.

Diskussion.

Die Diskussion der festgestellten Effekte hat von der Kurve des Fibrinogens bzw. des Fibrins auszugehen, wie sie in Abb. 1, Kurven 1, 3, 4 und 5 dargestellt sind. Man erkennt die Zusatzbanden in den Gebieten

von 3000 und $4000 \nu'$, deren Intensitäten in der Reihenfolge: Fibrinogen < Fibrin, ungedehnt < Fibrin, gedehnt < Fibrin—Gel liegen.

Bedenkt man, daß die drei ersten Stadien durch eine in gleichem Sinne zunehmende dichtere Teilchenpackung bzw. Näherung polarer Gruppen und Ausbildung zusätzlicher H-Brücken zu kennzeichnen sind, so können die Versuchsergebnisse kaum überraschen und ihre Deutung erscheint nicht schwierig.

Das nach 44 Stdn. resultierende Spektrum bei den Versuchen mit Hexamethylenglykol läßt nunmehr die Aussage zu, daß im Falle der

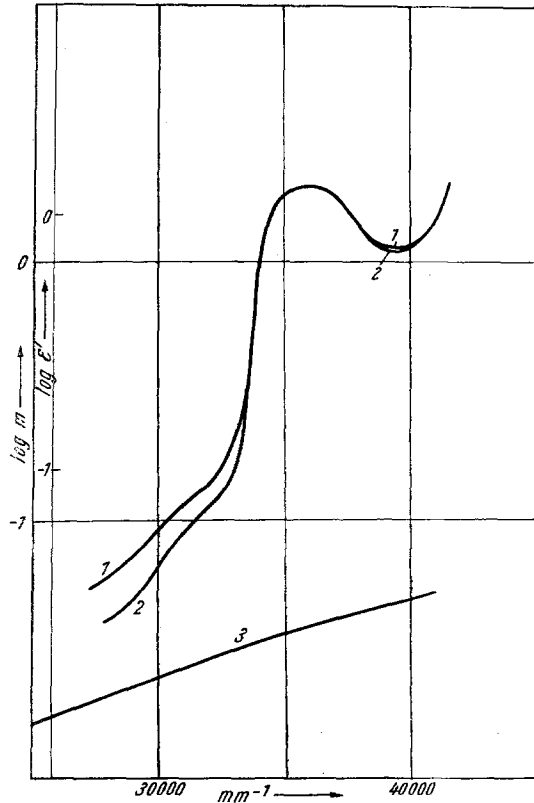


Abb. 2.

- Fibrinogen mit Thrombin + Hexamethylenglykol nach 45^h (1)
- Tyndall-korrigiert (2)
- Tyndall-Absorption (3)

gehemmten Polymerisation grundsätzlich der gleiche Vorgang eintritt, wie bei der Fibrinbildung, nämlich die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen C=O- und N—H-Gruppen. Das Ausmaß dieser Reaktion ist jedoch, wie auch nicht anders zu erwarten war, ganz erheblich kleiner. Im Endstadium unserer Versuche mit Hexamethylenglykol ergaben sich in den beiden Absorptionsgebieten der Zusatzbanden die in der folgenden Tabelle 4 und $\Delta\varepsilon_1'$ angeführten Werte. Die unter $\Delta\varepsilon_2'$ genannten Zahlen entsprechen den Zusatzeffekten, die bei der Umwandlung von Fibrinogen zum maximal gequollenen Fibringel unmittelbar in der Absorptionsküvette gemessen wurden¹⁶.

Tabelle 4.

| | $\Delta\varepsilon_1'$ | $\Delta\varepsilon_2'$ | % |
|---------------------|------------------------|------------------------|------|
| Bei 4000 ν' ... | 0,065 | 3,199 | 2,04 |
| „ 3200 ν' ... | 0,058 | 0,992 | 5,85 |

Man entnimmt der Tabelle 4, daß beim Glykolversuch langwellige und kurzwellige Zusatzbanden praktisch gleich stark auftreten und daß ihre Intensitäten im Mittel nur etwa

3% der Werte ausmachen, die beim Fibringel gemessen wurden. Im Hinblick auf die wahrscheinliche Abspaltung eines Bruchstückes aus dem Fibrinogenmolekül durch das Thrombin erscheint es wichtig festzustellen, daß sich eine solche Spaltung mit der von uns verwendeten photographischen Aufnahmemethodik auch in den allerersten Reaktionsstadien spektral nicht nachweisen ließ.

Auf Grund der letzten Ergebnisse von *Ferry*, *Shulman* und *Foster* dürften bei unseren Versuchen nach 40stündiger Reaktion zum überwiegenden Teil Teilchen mit einer mittleren Länge von etwa 1500 Å und einer Dicke von zirka 30 Å vorhanden gewesen sein. Da aber bezüglich der effektiven Teilchengrößen und die Anteile der Teilfraktionen nichts Sicheres bekannt ist, erscheint eine Zuordnung der festgestellten geringfügigen Zusatzbanden zu einer bestimmten Fraktion nicht möglich.

Man kommt somit zu der Feststellung, daß auch die durch Hexamethylenglykol weitgehend gehemmte Polymerisation des proteolytisch aktivierten Fibrinogens eindrucksvoll den Zusammenhang zwischen Zusatzabsorption und Eiweißpolymerisation demonstriert. Die nach *Shulman* und *Ferry* vorwiegend nur bis zum Dimeren verlaufende Reaktion führt erwartungsgemäß zu Zusatzbanden, deren Intensität nur einen Bruchteil der bei Fibrin gemessenen Werte ausmacht. Die beobachtete Beeinflussung der zwischenmolekularen Vernetzung scheint kein Sonderfall zu sein. Verschiedene Befunde lassen erwarten, daß höher molekulare Stoffe, wie z. B. lösliche Polysaccharide, bereits in geringerer Konzentration die Faserbildung des Fibrins beeinflussen. Wir erhoffen uns von der Untersuchung derartiger Systeme einige, für die Aufklärung der Faserbildung in vivo wertvolle Ergebnisse.