

Beiträge zur Gewinnung von Hirudin, der Wirksubstanz des medizinischen Blutegels (*Hirudo medicinalis* L.)*

Von

Fr. Schremmer, II. Zoologisches Institut der Universität Wien

O. Hromatka, I. Chemisches Laboratorium der Universität Wien

E. Deutsch, I. Medizinische Klinik der Universität Wien, und

C. Csoklich, Forschungslabor. d. Arzneimittelfabrik Dr. Kutiaak u. Co.,

Wien

(Eingelangt am 29. Dezember 1955)

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde Hirudin, die blutgerinnungshemmende Wirksubstanz von *Hirudo medicinalis* L., dadurch gewonnen, daß man Blutegel physiologische Kochsalzlösung, mit oder ohne Zusatz von roten Blutkörperchen, saugen ließ und den Darminhalt künstlich entnahm. Außer dem Darminhalt enthält auch die Futterrestlösung Hirudin, wodurch bewiesen wurde, daß der Egel diesen Wirkstoff auch in die Bißwunde abgibt. Das angereicherte Rohhirudin wurde auf seine gerinnungshemmende Wirkung mit Kaninchenblut und Pferdeblut getestet und seine Antithrombinwirkung, Wirkung auf die Rekalzifikationszeit, Prothrombinzeit und Thrombingerinnungszeit von Oxalatplasma untersucht. Die Untersuchungen zeigen, daß die II. Phase der Blutgerinnung beeinflußt wird. Der Temperatureinfluß (100°, 70° und 37°) auf Lösungen der Wirksubstanz wurde untersucht, ebenso die Wirkung angereicherter Rohprodukte auf das lebende Kaninchen. Bei wiederholter Injektion trat kein anaphylaktischer Schock auf.

Die Reinigung des angereicherten Rohproduktes durch Papierelektrophorese wird beschrieben.

Obwohl das Hirudin als blutgerinnungshemmende Wirksubstanz der Blutegel seit langer Zeit eine oftmalige Bearbeitung in der chemischen und physiologischen Literatur gefunden hat, war seine chemische Zu-

* Herrn Prof. Dr. A. Wacek zum 60. Geburtstag mit den besten Wünschen gewidmet (O. H.).

sammensetzung unbekannt geblieben. Es ist ein Verdienst der Arzneimittelfabrik Dr. Kutiaak u. Co., eine neuerliche Bearbeitung dieses Problems durch Zoologen, Chemiker und Mediziner angeregt und ermöglicht zu haben. Während die Untersuchungen liefen, wurden die Arbeiten von *Marckwardt* [Naturwiss. 42, 537 (1955)] als vorläufige Mitteilung bekannt. Obwohl durch diese ausgezeichnete Untersuchung ganz wesentliche Aussagen über die chemische Natur des Hirudins gemacht werden konnten, sollen doch die von unserem Arbeitskreis erhaltenen Ergebnisse in der folgenden Untersuchung veröffentlicht werden, weil sie, wenn auch noch lückenhaft und unvollständig, doch interessierten Fachkollegen einige Anregungen für weitere Untersuchungen bieten könnten. Bei den in der Literatur bekannten Verfahren zur Isolierung von Hirudin, des die Blutgerinnung aufhebenden Bestandteiles der Blutegel, bedienten sich die Verfasser der zerkleinerten Köpfe oder der präparierten Schlundringe der getöteten Tiere¹⁻⁵. Die Ausbeuten an wirksamer Substanz zeigten sich von der Züchtung, der Fütterung und dem Alter der Blutegel abhängig.

A. Hirudingewinnung aus dem lebenden Egel

Der vorliegenden Arbeit wurde von zoologischer Seite der Gedanke zugrunde gelegt, eine Hirudingewinnung aus den *lebenden* Egel zu ermöglichen. Diese Problemstellung ließ die Möglichkeit offen, bei spezieller Züchtung und künstlicher Fütterung die Egel zu wiederholten Malen zum Saugakt und damit zur Hirudinabgabe zu bringen.

Während des Saugaktes gibt der Blutegel bekanntlich Hirudin in das aufgesaugte Blut ab. Die Versuche zur Isolierung der blutgerinnungshemmenden Substanz sollten daher an der aus dem Egeldarm gewonnenen Futterlösung durchgeführt werden. Aber auch die Restfutterlösung sollte in die Untersuchung einbezogen werden, um die bisherige Vermutung, daß der Blutegel Hirudin in die Saugwunde abgibt, exakt zu beweisen.

Es wurden zunächst Fütterungsversuche angestellt. Von Zecken (*Ixodes ricinus*) ist bekannt, daß sie physiologische Kochsalzlösung, die auf Körpertemperatur erwärmt ist und durch eine tierische Membran gesaugt werden muß, gerne annehmen. Ähnliche Versuche wurden auch mit Blutegeln angestellt⁶.

Bei den eigenen Versuchen wurde für den Saugakt eine im aufgeblasenen Zustand getrocknete und gespaltene Schweinsblase verwendet. Die Spaltung

¹ *J. Haycraft*, Arch. exper. Pathol. Pharmakol. 18, 209 (1884).

² *J. C. Bock*, Arch. exper. Pathol. Pharmakol. 41, 160 (1898).

³ *C. Jacobi*, D. R. P. 146103, Klasse 30 h, ausgegeben 21. 10. 1902.

⁴ *E. Sachse* u. Co., D. R. P. 147637, Klasse 30 h, ausgegeben 10. 12. 1903.

⁵ *E. Sachse* u. Co., D. R. P. 150805, Klasse 30 h, ausgegeben 11. 4. 1904.

⁶ *L. Löhner*, Biol. Zbl. 35, 385 (1915).

ist notwendig, da die unvorbereitete Schweinsblase im gequollenen Zustand von den Egel nicht durchschnitten werden kann. Die als Nährlösung verwendete physiologische Kochsalzlösung wurde in einer Epruvette auf 37 bis 40° erwärmt, mit der gespaltenen Schweinsblase verschlossen und die Versuchstiere angesetzt. Die Egel saugten meist bis zur maximalen Füllung des Darmes.

Die Versuche, gefütterte Egel durch chemische oder elektrische Reizung zum Erbrechen zu bringen, waren nicht ganz befriedigend. Die gereizten Tiere geben sehr viel schleimiges Hautsekret ab, und der erbrochene Darminhalt wird mit Stoffen vermengt, die bei der Isolierung des Hirudins nicht erwünscht sind. Die besten Erfolge wurden durch Bepinseln der satten Egel mit konzentrierter Kochsalzlösung erzielt.

Für die ersten Versuche zur Hirudinisolierung dienten auf diese Art erhaltene Proben. Für spätere Versuche bewährte sich die Methode der Punktion:

Die satten Tiere wurden auf ein feuchtes Tuch gelegt und mit einem breiten Streifen grober Müllergaze überspannt. Dadurch werden die Tiere festgehalten, wobei ihre Rückseite durch den Gitterstoff hindurch sichtbar bleibt. Die Egel wurden etwa im zweiten Körperdrittel in der dorsalen Mittellinie mit der Nadel einer Rekordspritze angestochen und der Darminhalt wurde abgesaugt.

Die in der Epruvette zurückbleibende Futterlösung wurde auf Grund der bereits erwähnten Überlegungen gleichfalls für Isolierungsversuche aufbewahrt.

Bei einem ersten Versuch wurden 8 Tiere mit physiologischer Kochsalzlösung gefüttert.

B. Gewinnung von Rohhirudin aus Darminhalt und Restfutterlösung

Die Isolierung des wirksamen Bestandteiles aus der aus dem Darm gewonnenen Futterlösung und aus der Futterrestlösung erfolgte getrennt, in Anlehnung an die Angaben von *Jacobi*³.

Die hirudinhaltigen Lösungen wurden auf 80 bis 85° erwärmt und zur Koagulation der fremden Eiweißstoffe mit 10%iger Essigsäure auf den pH-Wert 4,5 gebracht. Um Verluste an wirksamer Substanz zu vermeiden, darf die saure Lösung nur kurz erwärmt werden. Anschließend wurde rasch gekühlt und die Lösung durch tropfenweise Zugabe einer 10%igen Natriumkarbonatlösung neutralisiert. Bei langsamem Ansteigen des pH-Wertes wurde ein weiterer Teil der Proteine ausgefällt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, 2mal in wenig physiologischer Kochsalzlösung aufgeschlämmt und erneut zentrifugiert. Die schwach rosa gefärbten, klaren Lösungen wurden bis zum Verschwinden der Halogenreaktion dialysiert. Die Dialysierdauer ist von der Größe und Qualität der verwendeten Dialysiermembran abhängig und betrug zirka 16 Stdn. Sie wurde durch einige Versuche festgelegt, da bereits *Bodong*⁷ eine Abnahme an wirksamer

⁷ A. *Bodong*, Arch. exper. Pathol. Pharmakol. 52, 242 (1904).

Substanz bei größeren Dialysezeiten festgestellt hatte. Um während der Dialyse jede Fäulniserscheinung zu vermeiden, wurde in die zu dialysierende Lösung ein Thymolkristall gelegt.

Nach Beendigung der Dialyse wurde die Lösung im Vak. bei Zimmertemp. eingengt. Die Entfernung der letzten Wasserreste erfolgte im Vakuum-exsikkator über konz. Schwefelsäure und Ätznatron.

Diese Aufarbeitungsmethode zur Gewinnung der Rohsubstanz wurde bei allen weiteren Versuchen beibehalten. Versuche, die wirksame Substanz durch Einwirkung von Chloroformdämpfen oder durch Ausfällen mit Alkohol^{2,3} zu isolieren, verliefen unbefriedigend und unter Verlust der Hirudinaktivität.

Für eine grobe Abschätzung der gerinnungshemmenden Wirkung wurden bei den ersten Isolierungsversuchen die erhaltenen Substanzen mit frischem Kaninchenblut getestet. Bei den nachfolgenden Versuchen zur Reinigung des Rohhirudins wurde der Hirudingehalt durch den Nachweis der Antithrombinwirkung in einem geeigneten Gerinnungssystem, bestehend aus Thrombin und Fibrinogen, festgestellt.

Die nach der angeführten Methode aus dem Darm von 8 Egel gewonnene Futterlösung lieferte 22,3 mg Substanz (A), die Futterlösung 9,5 mg Substanz (B). Substanz A war in 0,6%iger Natriumchloridlösung größtenteils unlöslich, Substanz B hingegen wesentlich besser löslich.

Die für die Feststellung der gerinnungshemmenden Wirkung bereiteten Lösungen enthielten 2 mg Substanz A/ml (Lösung A) bzw. 1 mg Substanz B/ml (Lösung B).

Tabelle 1. Feststellung der gerinnungshemmenden Wirkung

Probe Nr.	Lösung A ml	Frisches Kaninchenblut, ml	Gerinnt nach Min.
1	2	1	nach 1 Std. 42 Min. noch flüssig, nach 17 Stdn. geronnen
2	1	1	27
3	1	3	1
4	1	5	1
	Lösung B		
1	2	1	nach 17 Stdn. noch flüssig
2	1	1	1
3	1	3	1
4	1	5	sofort

Bei einer Wiederholung des Versuches wurden aus 12 Egeldarmfüllungen 74,1 mg Rückstand (Substanz A) und aus 12 Futterröhrchen 25,4 mg Rückstand (Substanz B) gewonnen. Beide Substanzen wurden in 0,6%iger Natriumchloridlösung gelöst, und zwar so, daß jede Lösung

2 mg Substanz pro ml enthielt. Getestet wurde einmal mit Kaninchenblut, einmal mit frischem Pferdeblut. Das Ergebnis stimmte im wesentlichen mit dem ersten Versuch überein. Das Blut blieb nur in den Proben, und zwar über 24 Stdn. ungeronnen, die 1 ml Blut und 2 ml Lösung A oder B enthielten.

Bei einem weiteren Versuch wurde die aus dem Darm gefütterter Egel gewonnene Natriumchloridlösung und die Futterrestlösung unmitttelbar, also ohne weitere Aufarbeitung, geprüft.

Tabelle 2. Feststellung der gerinnungshemmenden Wirkung

Probe Nr.	Lösung A ml	Pferdeblut ml	Gerinnung	Anmerkung
0	2 ml 0,6%ige NaCl	2	sofort	Vergleichsprobe
1	2	2	8 Stdn. ungeronnen	
2	1	2	nach 2 Stdn. noch flüssig	nach 8 Stdn. koaguliert

Die Futterrestlösung erwies sich als etwas weniger wirksam: die der Probe Nr. 1 entsprechende Mischung war schon nach 1 Std. 35 Min. geronnen.

Alle Versuche zeigten, daß die aufgenommene Nahrung Hirudin enthält und der saugende Egel auch Hirudin in die Saugwunde hinein abgibt.

Damit wurde zum erstenmal der objektive Beweis erbracht, daß der Blutegel während des Saugaktes, zumindest aber zu Beginn desselben, hirudinhaltiges Sekret in die Saugwunde hinein abgibt. Dies wurde bisher nur indirekt aus der Tatsache geschlossen, daß Blutegelbisse relativ sehr lange Zeit nachbluten.

C. Methode zur mehrmaligen Hirudingewinnung aus demselben Versuchstier

Ein weiteres Ergebnis der Versuche ist die grundsätzliche Möglichkeit, Hirudin aus lebenden Egel zu gewinnen. Das Ziel der Untersuchungen war jedoch, den Egel mehrmals zur Hirudingewinnung verwenden zu können. Physiologische Kochsalzlösung stellt für den Egel, der sich vom Eiweißanteil des Hämoglobins der roten Blutkörperchen ernährt⁸, keine Nahrung dar. Es mußte versucht werden, den Egel mit Blut zu füttern und Hirudin aus dem Nahrungsblut zu isolieren. Die Versuchstiere wurden also mit defibriniertem und anschließend mittels Glaswolle filtriertem Pferdeblut gefüttert. Die Gewinnung einer hirudinhaltigen

⁸ T. Fukui, Z. vergl. Physiol. 4, 201 (1926).

Substanz aus dem durch Punktion gewonnenen Nahrungsblut war wesentlich erschwert. Mit der überwiegenden Menge fremder Eiweißstoffe wurde ein Großteil der wirksamen Substanz ausgefällt. Zur Vereinfachung der Aufarbeitung mußte eine Fütterung mit roten Blutkörperchen, ohne viel Ballasteiweißstoffe, versucht werden.

Dies wurde erreicht, indem defibriertes Pferdeblut mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und zentrifugiert wurde. Die überstehende Lösung wurde abgeseugt. Dieser Vorgang wurde noch 3mal wiederholt, bis die überstehende Lösung nicht mehr gelbstichig war. Auf diese Art konnten ziemlich reine Blutkörperchen gewonnen werden, die für die Fütterung im Verhältnis 1:15 bis 1:20 mit 0,6%iger Natriumchloridlösung verdünnt wurden.

Die Fütterung der Egel erfolgte nicht mehr aus Eprovetten, sondern die auf 37 bis 40° erwärmte Suspension roter Blutkörperchen wurde in einen getrockneten Schweinsdarm abgefüllt, der in Abständen von etwa 20 cm durch Abbinden in mehrere wurstartige Stücke zerlegt wurde. Dadurch war es möglich, 30 bis 40 Egel gleichzeitig zu füttern.

Die mechanische Blutentnahme (Punktion) wird von den Tieren gut vertragen, da sich die Einstichstelle sehr rasch schließt. Da bei der Punktion nur $\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{4}$ des aufgenommenen Blutes dem Egel wieder abgenommen werden können, verbleiben für seine Ernährung noch ausreichende Mengen von roten Blutkörperchen in seinem Darm zurück. Solche Tiere können nach wenigen Tagen wieder saugen, es wird aber eine längere Ruhepause notwendig sein, damit die Schlunddrüsen ihren Sekretgehalt wieder regenerieren können. Wie lange die volle Regeneration dauert, konnte noch nicht geprüft werden.

Die Gewinnung eines hirudinhaltenen Rückstandes aus dieser Futterlösung (Blutkörperchensuspension in 0,6%iger Natriumchloridlösung) war gegenüber der Anwendung von Vollblut als Futter wesentlich erleichtert.

Aus der durch Punktion gewonnenen Futterlösung aus 30 Egeln wurden 0,3174 g hirudinhaltige Substanz isoliert, die in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen wurde, so daß 1 ml Lösung 4,2 mg enthielt.

Tabelle 3. Feststellung der gerinnungshemmenden Wirkung an frischem Pferdeblut

Hi-Lösung ml	Pferdeblut ml	Gerinnung
1	7	wird nach 6 bis 7 Stdn. sehr zähflüssig
1	6	wird nach 6 bis 7 Stdn. leicht zähflüssig, aber durch leichtes Schütteln wieder flüssig
1	5	bleibt über 48 Stdn. flüssig

Die Lösung mit 4,2 mg Substanz pro ml verhindert also die Gerinnung von 5 ml Pferdeblut.

Nach den Angaben von *Bodong*⁷ liefert die Extraktion eines Egelkopfes 6 mg eines Hirudinpräparates, von dem 0,8 mg 5 bis 6 ml Kaninchenblut 48 Stdn. ungeronnen erhalten.

Mit dem Unsicherheitsfaktor, daß bei dem vorliegenden Testversuch die Gerinnungszeiten von Pferdeblut und Kaninchenblut gleichgesetzt wurden, und der weiteren Annahme, daß bei der Rohaufarbeitung das gesamte Hirudin erfaßt wurde, können die beiden Ergebnisse in Beziehung gebracht werden. Danach würde die aus dem Darm eines lebenden Egels erhaltene Menge Hirudin 2 mg und somit $\frac{1}{3}$ der aus dem Kopf eines toten Tieres gewonnenen Menge betragen. Wieviel Hirudin beim Saugakt in die Sauglösung abgegeben wird, wurde in diesem Versuch nicht bestimmt.

D. Physiologische Untersuchung des Rohhirudins und Temperatureinfluß auf den Wirkstoff

In diesem Versuchsstadium erschien neben der weiteren Reinigung der hirudinhaltigen Rohsubstanz die Ausarbeitung einer exakten physiologischen Untersuchungsmethode der Hirudinaktivität wünschenswert. Die neue Testmethode wurde an 0,9486 g eines Hirudinrohproduktes ausgearbeitet, das durch Aufarbeitung der aus dem Darm von 90 Egeln entnommenen Futterlösung erhalten worden war. Die in der Tabelle angegebenen Mengen dieses Hirudinrohproduktes wurden jeweils in 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Mit dem hirudinhaltigen Rohprodukt wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, deren Antithrombinwirkung an einem geeigneten Gerinnungssubstrat nachgewiesen wurde.

1. Nachweis einer Antithrombinwirkung mit Fibrinogen als Substrat

Die hirudinhaltigen Proben wurden an einem System, bestehend aus 0,1 ml 1%iger Fibrinogenlösung (hergestellt aus Rinderplasma nach *Deutsch* und *Schaden*⁹, 80% Reinheit), 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung und 0,1 ml Thrombin (Topostasin-Roche), getestet (Tab. 4).

Die Versuchsreihe zeigt, daß sowohl die Thrombinwirkung auf gereinigtes Fibrinogen als auch die Rekalzifikationszeit, die Prothrombinzeit und die Thrombingerinnungszeit von Oxalatplasma durch Hirudin gehemmt werden. Diese Hemmwirkung in den verschiedenen Gerinnungssystemen wird am leichtesten als Beeinflussung der II. Phase erklärt,

⁹ *E. Deutsch* und *W. Schaden*, zitiert nach *E. Deutsch*, Die Blutgerinnungsfaktoren. Wien: Deuticke-Verlag. 1955.

wobei wohl die Wirkung gegen das Thrombin gerichtet ist. Es erwies sich daher die isolierte II. Phase als das günstigste System für die weiteren Untersuchungen hirudinhaltiger Substrate.

Tabelle 4

Substrat	Gerinnungszeit
0,1 ml Fibrinogen + 0,1 ml 0,9% NaCl + 0,1 ml Thrombin	31,5 Sek.
0,1 „ „ + 1 mg Hirudin + 0,1 ml Thrombin	> 20 Min.
0,1 „ „ + 0,5 mg Hirudin	> 10 „
0,1 „ „ + 0,1 „ „	2 „
0,1 „ „ + 0,05 mg Hirudin	84 Sek.
0,1 „ „ + 0,01 „ „	45 „
0,1 „ „ + 0,005 mg Hirudin	43 „

2. Einfluß von Hirudin auf die Rekalzifikationszeit von Oxalatplasma

a) Tabelle 5

Substrat	Gerinnungszeit
0,1 ml Oxalatplasma* + 0,1 ml 0,9% NaCl + 0,1 ml m/40 CaCl ₂	3 Min. 50 Sek.
0,1 ml Oxalatplasma + 1 mg Hirudin + 0,1 ml m/40 CaCl ₂	> 35 „
0,1 ml „ + 0,1 mg Hirudin + 0,1 ml m/40 CaCl ₂	> 35 „
0,1 ml Oxalatplasma + 0,01 mg Hirudin + 0,1 ml m/40 CaCl ₂	5 „ 30 „

b) Einfluß von Hirudin auf die Prothrombinzeit von Oxalatplasma

Tabelle 6

Substrat	Gerinnungszeit
0,1 ml Oxalatplasma + 0,1 ml 0,9% NaCl + 1 Tropfen Thrombokinas + 0,1 ml m/40 CaCl ₂	16 Sek.
0,1 ml Oxalatplasma + 1 mg Hirudin + Thrombokinas + CaCl ₂	10 Min.
0,1 ml Oxalatplasma + 0,5 mg Hirudin + Thrombokinas + CaCl ₂	72 „
0,1 ml Oxalatplasma + 0,1 mg Hirudin + Thrombokinas + CaCl ₂	20 „
0,1 ml Oxalatplasma + 0,01 mg Hirudin + Thrombokinas + CaCl ₂	16 „

* Oxalatplasma: 9 Teile menschliches Blut wurden mit 1 Teil einer 1,33%igen Natriumoxalatlösung versetzt und 5 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert.

c) Einfluß von Hirudin auf die Thrombingerinnungszeit von Oxalatplasma

Tabelle 7

Substrat	Gerinnungszeit
0,1 ml Oxalatplasma + 0,1 ml 0,9% NaCl + 0,1 ml Thrombin (10 E/ml)	13,6 Sek.
0,1 ml Oxalatplasma + 1 mg Hirudin + 0,1 ml Thrombin...	52 Sek.

Zur Feststellung der Hitzeeinwirkung auf die hirudinhaltige Rohsubstanz wurde die Hirudinlösung 1, 3 bzw. 5 Stdn. auf 70° erhitzt, rasch abgekühlt und bei 4° gelagert. Die nachfolgende Testung ergab Aktivitätszunahme, so daß man annehmen muß, daß eine hemmende Verunreinigung zerstört wurde. Nach Erhitzen auf 100° durch 30 Min. trat dagegen eine Aktivitätsabnahme auf die Hälfte ein.

In der folgenden Versuchsreihe wurde die Wirkung der Inkubation von Thrombin und Hirudin untersucht. Dabei wurden 1,6 ml Thrombin mit 0,2 ml Veronalpuffer, pH 7,3, Ionenstärke 0,153 und 0,2 ml Hirudinlösung mit 0,001 mg, 0,01 mg, 0,1 mg und 1,0 mg Rohprodukt pro ml verschieden lange Zeit bei 37° im Wasserbad inkubiert. Wie die Tabelle 8 zeigt, scheint es durch Inkubation zu einer Aktivitätszunahme zu kommen.

Als Kontrolle wurde Thrombin mit physiologischer Kochsalzlösung inkubiert und keine Änderung der Aktivität beobachtet.

Tabelle 8

mg Hirudin im Substrat	0,001	0,01	0,1	1
Inkubationszeit	Gerinnungszeit mit Fibrinogen			
0 Min. . . .	21 Sek.	21 Sek.	23 Sek.	24 Sek.
1 „ . . .	21,5 „	21 „	25 „	45 „
3 „ . . .	22 „	23 „	27 „	46 „
5 „ . . .	24,5 „	24,5 „	27 „	48 „
10 „ . . .	25 „	27 „	28 „	50 „
15 „ . . .	25 „	27,5 „	30,5 „	51 „
20 „ . . .	28,5 „	29,3 „	31 „	53 „
25 „ . . .	31,4 „	30 „	32,5 „	53,4 „
30 „ . . .	34 „	32 „	34,5 „	55 „
60 „ . . .	36,8 „	36 „	38,5 „	60,5 „

Weitere Versuche befaßten sich mit der Wirkung des Hirudins auf die isolierte I. Phase der Gerinnung. Es wurden 0,1 ml fibrinogenfreies, 10fach verd. Plasma und 1,0 ml Puffer bzw. Hirudinlösung mit 0,5 ml Thrombokinaselösung und 0,5 ml Calciumchloridlösung inkubiert, zu bestimmten Zeiten ein aliquoter Teil entnommen und an Fibrinogen getestet.

Wie aus der Tabelle 9 ersichtlich, beeinflußt Hirudin die I. Phase der Gerinnung nicht. Die kürzeste Gerinnungszeit wird in allen Proben nach gleich langer Inkubationszeit erreicht.

Tabelle 9

Inkubationszeit	Puffer	Hirudin		
		0,001 mg	0,01 mg	0,1 mg
1 Min. . . .	40 Sek.	40 Sek.	47,5 Sek.	111 Sek.
3 " " . . .	21,7 "	25 "	33 "	95 "
5 " " . . .	17,6 "	19,4 "	29 "	90 "
10 " " . . .	18,2 "	24 "	32 "	105 "
15 " " . . .	23,8 "	30 "	41,8 "	133 "
20 " " . . .	38,5 "	41,4 "	57 "	173 "
25 " " . . .	54,5 "	56 "	77 "	230 "
30 " " . . .	75 "	82 "	117 "	175 "
40 " " . . .	135 "	145 "	174 "	—

Für den Nachweis einer möglichen Beeinflussung der durch Streptokinase ausgelösten Fibrinolyse durch Hirudin wurde die Lysezeit in Lösungen verschiedener Streptokinasekonzentration mit und ohne Hirudin-zusatz bestimmt. Es war keine Beeinflussung der Fibrinolyse zu verzeichnen.

Zur Überprüfung des Rohhirudins in vivo erhielten Kaninchen 10 mg (I), 28 mg (II) und 66 mg/kg (III) Hirudin i. v. Die Injektion wurde ohne wesentliche Nebenerscheinungen vertragen. Durch die Injektion wurden Prothrombin, Proaccelerin und Proconvertin nicht beeinflußt.

Tabelle 10

Zeit nach der Injekt.	Versuchstier		
	I	II	III
Rekalzifikationszeit			
Vor Injektion . . .	2 Min. 35 Sek.	2 Min. 5 Sek.	4 Min. 40 Sek.
5 Min. nach Inj..	2 " 55 "	4 " 15 "	7 " 10 "
15 " " " "	2 " 10 "	3 " 5 "	5 " 5 "
60 " " " "	—	1 " 20 "	3 " 30 "

Anmerkung: Kaninchen I nach Herzpunktion gestorben.

Die Versuchsserie ergab, daß eine Hemmung der Blutgerinnung in vivo erst durch verhältnismäßig hohe Hirudinmengen möglich ist. Es kommt zu einer nur kurz dauernden Verlängerung der Rekalzifikationszeit und zu einer Verlängerung der Thrombinzeiten bei Anwendung verdünnter

Thrombinlösungen. Etwa 1 Std. nach der Injektion ist die Gerinnungsfähigkeit gesteigert.

Eine intravenöse Reinjektion von Hirudin bei den Kaninchen wurde nach 10 Tagen vorgenommen. Es kam dabei zu keinem Zeichen eines akuten anaphylaktischen Schocks.

Tabelle 11

Thrombinzeiten bei Kaninchen II (mit 3 Konzentrationen von Thrombin)

Vor Injektion	21,5 Sek.	43 Sek.	64 Sek.
5 Min. nach Injektion ...	23 „	47 „	77 „
15 „ „ „ ...	22,8 „	46 „	73 „
60 „ „ „ ...	21 „	44 „	64 „

Thrombinzeiten bei Kaninchen III

Vor Injektion	20 Sek.	54 Sek.	69 Sek.
5 Min. nach Injektion ...	21 „	71 „	93 „
15 „ „ „ ...	16,5 „	62 „	74 „
60 „ „ „ ...	13,5 „	42 „	60 „

E. Anreicherung des Wirkstoffes durch Papierelektrophorese

Bei den Versuchen zur Anreicherung von Hirudin in der Rohsubstanz wurden die bisher bekannten Methoden, wie die Ausfällung unwirksamer Ballaststoffe durch fraktionierte Fällung mit Alkohol und Trichloressigsäure oder die Adsorption an Kaolin¹⁰, umgangen. Die Rohsubstanz wurde direkt einer elektrophoretischen Auftrennung unterworfen.

Die Versuche wurden an einer nach den Angaben von *Grassmann* und *Hannig*^{11, 12} gebauten Apparatur zur kontinuierlichen Elektrophorese auf Filtrierpapier durchgeführt.

Die Versuchsanordnung bestand aus einer Glaskammer (35 × 29 × 11 cm), in der an einem Kunststoffrahmen ein von der Pufferlösung durchströmtes Filtrierpapier (Schleicher u. Schüll 2040 b oder 2043 b) zwischen zwei Platinelektroden eingespannt wurde. Um ein schnelles Abströmen der an den Elektroden gebildeten Elektrolysenprodukte und weitgehend konstante pH-Verhältnisse im eigentlichen Gebiet der Auftrennung zu erreichen, ist an den Elektroden eine wesentlich raschere Strömung notwendig. Dies wurde durch Einhüllen der Elektroden in zwei Streifen einer Filterpappe (Seitz 40/068) erreicht, die eine hohe Saugfähigkeit besitzt. Die Filterpappe wurde zusammen mit dem oberen Teil des Filtrierpapiers in die mit Pufferlösung gefüllte Wanne getaucht. Das Nachfüllen der Pufferlösung in die Wanne erfolgte automatisch. Die Durchströmungszeit des Filtrierpapiers betrug 5 Stdn. Die Geschwindigkeit der Strömung durch die Filterpappe

¹⁰ *E. Waldschmidt-Leitz, P. Stadler und F. Steigerwald, Z. physiol. Chem.* **183**, 39 (1929).

¹¹ *W. Grassmann und K. Hannig, Naturwiss.* **37**, 397 (1950).

¹² *W. Grassmann und K. Hannig, Z. physiol. Chem.* **292**, 32 (1952).

entlang der Elektroden betrug 2 l Pufferlösung in 24 Stdn. Die in der Pufferlösung gelöste Hirudinrohsubstanz wurde in der Mitte der Glaskammer aus einem kleinen Vorratsgefäß über einen Filtrierpapierdocht kontinuierlich angesaugt. Das Auffangen der durch das Filtrierpapier geströmten Lösung erfolgte in 22 Epruvetten, in die der zackenförmig eingeschnittene untere Rand des Filtrierpapierbogens eingereiht wurde.

Für eine möglichst weitgehende Abtrennung der Ballasteiweißstoffe bei engem Wanderungsbereich der gerinnungshemmenden Substanz erwies sich der Veronal-Natriumacetat-Puffer nach *Michaelis* mit pH 8,4 am geeignetsten.

Bei einem Elektrophoreseversuch wurden 60 mg der Hirudin-Stammsubstanz in 2 ml Veronal-Natriumacetat-Puffer gelöst und über den Filtrierpapierdocht auf das mit Pufferlösung getränkte Filtrierpapier aufgetragen. An die Elektroden wurde eine Gleichspannung von 110 V angelegt, wobei ein Strom von etwa 20 mA fließt. Das kontinuierliche Ansaugen der Hirudinlösung über den Filterdocht erstreckte sich über 20 Stdn. Nach weiteren 5 Stdn. wurde die Elektrophorese beendet.

Die in den 22 Epruvetten aufgefangenen Fraktionen der elektrophoretischen Auftrennung wurden auf ihre Gerinnungsaktivität untersucht. Die Untersuchung erfolgte an einem System, bestehend aus 0,1 ml 1%iger Fibrinogenlösung, 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung und 0,1 ml Thrombin, indem die Kochsalzlösung gegen 0,1 ml Veronal-Natriumacetat-Puffer oder 0,1 ml einer Elektrophoresefraktion ausgetauscht wurde.

Eine Vergleichsprobe der zur Auftrennung gelangten Hirudin-Stammsubstanz in Veronalpuffer (5 mg/ml) wurde ebenfalls untersucht.

Tabelle 12

	Gerinnungszeit
Probe mit physiologischer Kochsalzlösung	15,5 Sek.
„ „ Veronalpuffer	15,5 „
Hirudin-Stammlösung in Veronalpuffer	69,5 „
Fraktion 1	20,0 „
„ 2	28,8 „
„ 3	127,0 „
Veronalpuffer	17,0 „
Fraktion 4	168,0 „
„ 5	79,0 „
„ 6	18,4 „
„ 7	65,0 „
„ 8	25,0 „
„ 9	33,0 „
Veronalpuffer	19,0 „
Fraktion 10	19,0 „
„ 11	19,0 „
Hirudin-Stammlösung in Veronalpuffer	76,0 „

Die Fraktionen 12 bis 22 zeigten keine Hirudinaktivität. Die geringfügige Veränderung der Gerinnungszeiten bei Zusatz der Pufferlösung bzw. der Hirudinstammlysis in Veronalpuffer zu Beginn und am Ende der Versuchsreihe erklärt sich durch die geringe Stabilität der Thrombinlösung. Die angegebenen Werte stellen Vergleichswerte dar, die bei Verlängerung der Gerinnungszeit im Sinne einer positiven Hirudinwirkung gedeutet werden können, wenn angenommen wird, daß die Ionenstärke und Wasserstoffionenkonzentration der einzelnen Fraktionen keinen wesentlichen Unterschied aufweist. Eine Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration oder der Ionenstärke wurde nicht durchgeführt.

Aus den physiologischen Untersuchungsbefunden geht eine Wanderung der Wirksubstanz im elektrischen Feld eindeutig hervor. Die Ablenkung erfolgt dabei in Richtung der Anode. Der Wanderungsweg der wirksamen Komponente konnte durch einen Parallelversuch sichtbar gemacht werden. Dabei wurde die Elektrophorese nach 20 Stdn., also nach Beendigung des Ansaugens der Rohhirudinlösung, abgebrochen. Das Filtrierpapier wurde getrocknet und der Wanderungsweg mit Amidoschwarz 10 B sichtbar gemacht¹³. Nach dieser Anfärbemethode führt die Bahn der eiweißhaltigen Komponente zu den Auffangeprouvetten 3 bis 8. Dieses Ergebnis stimmt mit dem physiologischen Untersuchungsbefund überein.

Es wurde der Versuch unternommen, die in den Fraktionen 3 und 4 enthaltene blutgerinnungshemmende Substanz durch Dialyse aus der Pufferlösung zu isolieren. Die Lösungen wurden in Dialysierschläuche gebracht und 16 Stdn. dialysiert. Die nachfolgende Überprüfung der Antithrombinwirkung ergab einen vollständigen Verlust der Aktivität.

Vergleichsweise wurde eine entsprechende Menge Rohhirudinlösung und eine Lösung von Rohhirudin in Veronal-Natriumacetat-Puffer 16 Stdn. dialysiert. Auch bei diesen Versuchen war ein teilweiser Wirkungsverlust zu verzeichnen.

Diese Dialysierversuche berechtigten zu der vorläufigen Annahme, daß die wirksame Substanz im Rohhirudin adsorptiv an größere Eiweißmoleküle gebunden ist und fast nicht durch die Dialysemembran diffundiert. Unter der Einwirkung des elektrischen Feldes wird diese adsorptive Bindung zerstört. Die in den Fraktionen 3 und 4 erhaltenen gerinnungshemmenden Eiweißmoleküle besitzen kleinere Molekülgröße und diffundieren innerhalb kürzerer Zeit durch die Membran, wodurch ein nahezu vollständiger Aktivitätsverlust der Restlösung hervorgerufen wird.

¹³ Z. Pucar, Z. physiol. Chem. 296, 62 (1954).