

Acta Medica Okayama

Volume 15, Issue 2

1961

Article 3

APRIL 1961

Der Einfluss von Ribonukleïnase auf die Thrombin-inaktivierung und auf die Anti-thrombinwirkung des Heparins im Serum in vitro

Henrik Gaertner*

Tomas Lisiewicz†

Endre Szirmai‡

*Marquette University,

†Akademie in Krakow,

‡Akademie in Krakow,

Der Einfluss von Ribonukleïnase auf die Thrombin-inaktivierung und auf die Anti-thrombinwirkung des Heparins im Serum in vitro*

Henrik Gaertner, Tomas Lisiewicz, and Endre Szirmai

Abstract

Die Ribonukleïnase allein ubt keinen charakteristischen oder wesentlichen Einfluss auf die Thrombininaktivierung in Inkubationsmischung (0.4 ml Serums, 0.1 ml der Ribonukleïnase von der Konzentration 0.025 mg/ml, 0.1 ml des destillierten Wassers und 0.4 ml der Thrombinlösung) aus. Heparin aber vergrössert die Thrombinaktivierung in der ähnlichen Inkubationsmischung (0.4 ml von Serum, 0.1 ml Heparinlösung in der Konzentration ungefähr 0.005 mg/ml, 0.1 ml des destillierten Wassers und 0.4 ml der Thrombinlösung. Wenn in der letzten Inkubationsmischung statt das destillierten Wasser die selbe Menge) 0.1 mg der (Ribonukleïnase) 0.025 mg/ml (gegeben wird, kann man feststellen, dass die Ribonukleïnase die spezifische, Antithrombin- und Anti-koagulationswirkung des Heparins ausdrücklich vermindert. Die Thrombinaktivierung wurde in Gegenwart des Bodens des 7.5/200.0 wasserigen Trockenplasmalösung, untersucht. Man veretzte 0.1 ml des Bodens mit 0.1 ml der Inkubationsmischung. Die Thrombinlösung hatte bestimmte Aktivität) 0.1 ml davon brachte in 10 Sek. 0.1 ml des Bodens in Gerinnung) Insgesamt wurden 34 dar Thrombinaktivierungsuntersuchungen gemacht, davon 7 Kontrollen, 7-mit Ribonukleïnase, 10-mit Heparin und 10-mit Ribonukleïnase+Heparin. Die Resultate (Tab. II, Abb. 1) zeugen, dass die Ribonukleïnase in vitro die spezifische Antithrombin (II)-Wirkung des Heparins hemmt. Wahrscheinlich modifiziert sie auch weitere biologische Eigenschaften des Heparins. Die Resultate eigener Untersuchungen und die Literaturangaben über den Heparineinfluss auf die Nukleïnasen sprechen für eine gegenseitige, charakteristische Reaktionen zwischen Nukleïnasen und Heparin. Diese Interaktionen beider Gewebe- und Blutsbstanzten kann eine grosse Bedeutung für viele Lebensvorgänge haben.

Acta Med. Okayama 15, 109—120 (1960)

DER EINFLUSS VON RIBONUKLEINASE AUF DIE THROMBIN- INAKTIVATION UND AUF DIE ANTITHROMBINWIRKUNG DES HEPARINS IM SERUM IN VITRO

Henrik GAERTNER*, Tomas LISIEWICZ und Endre SZIRMAI**

*Blutgerinnungslabor der III Klinik für Innere Krankheiten der Medizinischen
Akademie in Kraków, Polon, und Stuttgart, Westdeutschland*

Eingegangen am Juli 8, 1960

Die Rolle der Ribonukleïnase und Ribonukleïnasen bei den physiologischen und pathologischen Prozessen, besonders bei den neoplastischen Proliferationen, darunter auch bei den proliferativen Hämocytopathien, erweckte ein grosses Interesse. Deshalb man unterzog den Untersuchungen nicht nur die Desoxy- oder -Ribonukleïnasen, sondern auch deren Aktivatoren und Inhibitoren. Zu den letzten gehören einige gerinnungshemmenden Substanzen. Roth¹⁰ gab die Resultate der Untersuchungen des Einflusses von Heparin und ihr strukturell verwandter Körper (syntetische poly-galakturonsäure: Treburon-Hoffmann-La Roche; 5-, 6-Dimethylbenzimidazol) auf die Pankreasdesoxy- und -ribonukleïnasen bekannt. Die erwähnten Substanzen beeinflussen nicht die Fällbarkeit (Fällungsfähigkeit) der Desoxy und ribonukleïnsäuren, hemmen aber die spezifische Aktivität der Desoxy- und Ribonukleïnasen. Die grösseren Konzentrationen der Desoxy- und -Ribonukleïnsäuren beeinträchtigen diese Wirkung des Heparins und Treburons, was wahrscheinlich der Ausdruck einer Konkurrenz beider stark aziden Substanzen—Heparin und Nukleïnsäuren in der Reaktion mit der Nukleïnase bildet. Deshalb in der Anwesenheit von kleineren Konzentrationen der Nukleïnsäuren Heparin und Treburon stärker die Nukleïnase hemmen, als in der Anwesenheit der grösseren Nukleïnsäurenkonzentrationen. Die hemmende Wirkung des Heparins und Treburons auf die Nukleïnase ist nicht parallel zu ihrem antikoagulatorischen Einfluss. Treburon, welcher viel schwächer die Blutgerinnung hemmt, wirkt stärker auf die Nukleïnase, als Heparin in entsprechenden Mischungen. Auch die Heparinpräparate, weniger die Gerinnung hemmen, wirkten in den Untersuchungen von ROTH viel stärker auf die Nukleïnase, als die Präparate mit grösserer gerinnungshemmender Aktivität. Trotz der strukturellen Verwandtschaft mit dem Heparin Benzimidazol hemmte nicht, sondern aktivierte sogar die Wirkung der Ribonukleïnase, beeinflusste aber nicht die Wirkung der Desoxyribonukleïnase.

* Z. Z. Marquette University School of Medicine, Dept. of Biochemistry, Milwaukee 3, Wisconsin, U. S. A. (Dir.: Prof. A. Quick M. D.).

** Present address: Stuttgart, W. Klopstockstrasse 1, West Germany.

Die Resultate der Untersuchungen der Inaktivierung von Nukleinasen durch Heparin und andere saure Polymeren *in vitro*^{5,15,19} führten zur Annahme der Meinung von ROTH, dass das Heparin im Organismus den wichtigsten Inhibitor der Nukleinasen darstellt. Auf den Einfluss des Heparins auf Nukleinasen *in vivo* zeigen auch die Resultate der Experimente mit Gewebezüchtungen, mit Laboratoriumstieren, wie auch die klinische Beobachtungen.

Mit dem Einfluss von Heparin auf die Nukleinasen erklärt man seine hemmende Wirkung auf die Prozesse der Mitose und Proliferation. Über diesen Einfluss sprechen die Resultate der Untersuchungen des Zellenwachstums und -Mitose in Gewebezüchtungen^{7,13,14,18,24}. Im Zellenprotoplasma sammeln sich in grossen Mengen die Nukleinsäuren, die Zellen teilen sich langsamer, zahlreiche Zellen zeigen überhaupt keine Teilungsprozesse. Solcherweise beeinträchtigt Heparin das Wachstum und Differentiation der Zellen und der Gewebe, normal und pathologisch (neoplastisch). §

Das Heparin wirkt nicht nur auf die Nukleinasen, sondern auch auf andere Proteasen (HORWITT, GLAZKO, FERGUSON²¹, MANSFELD, HLADOVE⁸) und Fermente (JACOBSON, ZÖLLNER, FELLING, FISEHER, HERNANN^{8,21}). Man erforschte auch den ausgeprägten Einfluss von Heparin auf proteo- und fibrinolytische Prozesse und auf die Protein- und Lipidkörper^{8,21}. Das alles spricht für eine wichtige Beteiligung des Heparins am dem Metabolismus nicht nur der Zellen, Gewebe und, Blutes, sondern auch des ganzen Organismus.

De LAMIRANDE, WEBER und CANTERO⁶ injizierten subkutan den weissen Mäusen das Heparin ("Depot") in der Einzeldosis 30 Mikrogramm/pro 1 g des Körpergewichts und nach 1, 3, 6 und 12 Stunden bestimmten die Blutgerinnungszeit und die Aktivität der sauren und alkalischen Leberribonuklease. Nach 1 Stunde trat schon eine wesentliche Inaktivierung beider Leberribonukleinasen ein, welche später stufenweise parallel mit der anfangs verlängerten Blutgerinnungszeit zu normalen Werten zurückkam.

ALEKSANDROWICZ² behauptet, dass die Proliferation des leukozytären Systems im Knochenmark im der chronischen granulocytären Leukämie durch die im Blute angehäuften, aus den leukämischen Blutzellen entstammenden Nukleine, welche als "biogene Stimulatoren" wirken, verursacht ist. Die Nachforschungen von ALEKSANDROWICZ und Mitarbeiter bewiesen eine verminderte Leukocytenausscheidung aus dem Körper und eine verminderte Leukocytolyse im Verlaufe der chronischen Granulocytlenleukämie. Diese beide Prozesse führen dazu, dass die "sterbende" oder "tote" Zellen länger im kreisenden Blute verbleiben und die Leukocytosezahl dementsprechend erhöhen. Eine verminderte "Vitalität"

§) Heparin beeinflusst auch die Hyalinsäure, die Retikulin, wie auch den Pre- und Kollagen (22). ALBRIEUX und ROCCA (1) geben bekannt, dass der Heparinkofaktor eine hemmende Wirkung auf die Bindegewebe proliferationen ausübt.

der Leukocyten äussert sich u. a. mit der Verminderung ihrer Migrations-, Phagocytosefähigkeiten, ihres Metabolismus und der Vibrationen der intrazellulären Granulationen. Die Aktivität der Ribonuklease bleibt dieselbe bei den Gesunden Personen, wie auch bei den Inflammatorischen und leukämischen Leukocytosen. Die Aktivität der Urinribonuklease im Verlaufe der chronischen Granulocystenleukämie ist aber viel höher, als solche Aktivität bei den akuten und lymphatischen Leukämien und bei den gesunden Personen. Deshalb ALEKSANDROWICZ ist der Meinung, dass den pathogenetischen Hintergrund der chronischen Granulocystenleukämie eine Enzymopathie bildet. Diese Enzymopathie ist als eine Störung in dem Verhältnis der Blutribonuklease zur Blutleukocytose, also als ein relativer Mangel an der Blutribonuklease aufzufassen. Von dieser Hypothese kamen die Versuche der Therapie der chronischen Granulocystenleukämie mit Hilfe von intrasubkutan oder intravenös verabreichten Ribonuklease und die Untersuchungen über die Wirkung einiger Aktivatoren und Inhibitoren der Ribonuklease, u. a. des Heparins und Protamins- als Antiheparins². Nach der Verabreichung des Heparins (100 mg in einer Injektion oder als eine 3-stündige intravenöse Infusion) stellten wir eine Erhöhung des Blut heparinspiegels (3 Stunden nach der Injektion), welcher mittels der Methode von NIOWIAROWAKI¹¹ in unserer Modifikation¹⁷ in der Neutralisierungsreaktion zwischen Heparin und Toluidinblau bestimmt wurde, fest. Dieser Blutheparinspiegelanstieg war von der Verminderung der Ribonukleaseaktivität und einer Leukocytoseerhöhung begleitet. Nach der Protaminverabreichung bemerkten wir auch eine, wahrscheinlich hypokompensatorische, Hyperheparinämie (nach 3 Stunden von der Injektion), welche mit einer Verminderung der Blutribonukleaseaktivität und der Leukocytoseerhöhung zusammenging. Bei den Versuchen mit der Ribonukleaseverabreichung wurde eine erhöhte Aktivität dieses Fermentes im Blute und eine Verminderung des Heparin- und Leukocytosespiegels bemerkt. Die Harnribonukleaseaktivität benahm auch umgekehrt als die Aktivität im Blute, doch die Änderungen waren nicht charakteristisch.

GOERNER¹³, BALAZS, HOLMGREN⁸, KREISLER¹⁶, und TURNER²³ versuchten die Heparintherapie bei den Karzinomen, doch die Erfolge waren verschieden.

So viel das Interesse der Forscher dem Problem der Heparinwirkung auf die Nukleinasen galt, so die Probleme des Einflusses der Nukleinasen auf die gerinnungshemmende Wirkung des Heparins bleiben ungeklärt. Das solche Möglichkeiten bestehen können, zeugen einigermassen die Angaben von MANSFELD und HLADOVEC⁸, dass welchen eine andere Protease Trypsin mit Heparin einen Adduktionsprodukt bildet. Das Verhältnis der proteolytischen und gerinnungshemmender Aktivität dieses Produktes ist immer das gleiche und hängt nicht von dem quantitativen Verhältnis des Heparins und Trypsins ab. Die proteolytische Aktivität des Produkt schwächer, als solche des Trypsins, doch die

gerinnungshemmende Wirkung ist grösser, als sollte man Quantität des Heparins im Produkt zuschreiben. Beide Forscher erklären es dadurch, dass das Heparin, welches sich im Milieu im Überfluss befindet, von dem Nidderschlag des Adduktionsproduktes adsorbiert wird. Wenn das ganze Heparin verbraucht wird die gerinnungshemmende Aktivität unterliegt keinen weiteren Änderungen. BIELIK und CHODOROWA⁴ meinen, dass Trypsin das Heparin (Antithrombin II) inaktivieren und solcherweise die Thrombingenese fördern kann.

In der Reaktion zwischen Heparin und Proteinen kommt es manchmal zur Fällung (Reaktion mit Gelatine), zur Verschiebung des isoelektrischen Punktes (Reaktion mit Kasein), zur Verlierung der Dialysefähigkeit (Reaktion mit dem Eiweiss des Hühnereis) oder zur Beeinträchtigung der gerinnungshemmender Heparinwirkung (Reaktion mit Protamin: ASTRUP u. MITA., CHARGAFF und OLSON⁸). Endlich kann man zufügen, dass nicht nur die Proteasen (u. a. die Fibrinolyse), sondern auch die Preteine einen Einfluss auf die Heparin-befreiung und -Wirkung ausüben können.

Auf Grunde erwähnter Erwägungen beschlossen wir den beidseitigen Einfluss der Nukleïnase (als Protease und Protein) und des Heparins (als Antiribonukleïnase) auf die Thrombininaktivierung im Serum *in vitro* zu untersuchen.

METHODIK

Unsere Experimente stützten wir auf der Methode von GERENDÁS¹² und unserer eigener Modifikation^{9,25}, welche sich der Lösung des sogenannten Trockenplasmas als Boden bediente. Zu diesem Zwecke lösten wir 7.5 g des Trockenplasmas, im Blutspendedienst Krakow-Nowa Huta erzeugt, in 200 ml des destillierten Wassers. Die Inkubationsmischung hatte folgende Zusammensetzung (Tab. I a): 0.4 ml von Serum, 0.2 ml von destilliertem Wasser und 0.4 ml der Thrombinlösung. Diese Lösung wurde vom Thrombinpräparat (Thrombofort-Richter) erhalten. Wir verdünnten eine gewisse Menge des Thrombinpulvers im destillierten Wasser solcherweise, dass wir eine Thrombinlösung, deren 0.1 ml in 10 Sek. 0.1 ml der Trockenplasmalösung zur Gerinnung brachte, erhielten.

Die Inkubationsmischung bei den Experimenten mit Ribonukleïnase, welche im Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Akademie in Krakow vom Dr. W. OSTROWSKI erzeugt wurde, bestand aus (Tab. I b): 0.4 ml von

§) Da man die Heparinlösung *ex tempore* aus den verschiedenen Heparinpräparaten von der grossen Konzentration (5,000 E./ml) durch eine vielfache Verdünnung bekam, die Aktivität der Heparin in einzigen Bestimmungen war nicht immer gleich.

Zur Fussnote:

Doch die Menge von Heparin in den Reaktionsgruppen c und d war immer die selbe.

Serum, 0.1 ml der Ribonukleïnaselösung (in der Konzentration 0.025 mg/ml), 0.1 ml des destillierten Wassers und 0.4 ml der Thrombinlösung.

Bei den Experimenten mit Heparin (deren Lösung eine ungefähr 0.005 mg/ml Konzentration hatte[§]) die Inkubationsmischung hatte folgende Zusammensetzung (Tab. 1 c): 0.4 ml Serums, 0.1 ml der Heparinlösung, 0.1 ml destilliertes Wasser und 0.4 ml der Thrombinlösung.

Was die Inkubationsmischung bei den Experimenten mit dem gleichzeitigen Einfluss von Ribonukleïnase und Heparin betrifft, so wurde sie folgenderweise zubereitet (Tab. 1 d): 0.4 ml von Serum, 0.1 ml der Ribonukleïnaselösung (0.025 mg/ml), 0.1 ml der Heparinlösung (0.005 mg/ml) und 0.4 ml der Thrombinlösung.

Tablle 1. Die Zusammensetzung der Inkubationsmischungen bei den Kontrollen (a), in den Experimenten mit Ribonukleïnase (b), Heparin (c) und Ribonukleïnaseheparin (d).

Die Bestandteile der Inkubationsmischung in ml	a	b	c	d
Serum	0.4	0.4	0.4	0.4
Ribonukleïnaselösung	—	0.1	—	0.1
Heparinlösung	—	—	0.1	0.1
Destilliertes Wasser	0.2	0.1	0.1	—
Thrombinlösung	0.4	0.4	0.4	0.4

Das Serum für jede Experimentgruppe (a—d) stammte von einer Person und wurde durch Zentrifugieren nach 20 Min. von der Blutentnahme vom Blutkuchen abgetrennt. Gleich dem Zentrifugieren gaben wir destilliertes Wasser (a), Ribonukleïnaselösung und destilliertes Wasser (b), Heparinlösung und destilliertes Wasser (c) oder Ribonukleïnase-Heparinmischung und destilliertes Wasser (d) zu. Nach 1, 2, 3 und 5-minütiger Inkubation, von dem Momente der Thrombinzugabe rechnend, übertrugen wir je 0.1 ml der Inkubationsmischung zu den entsprechenden Vertiefungen einer Porzellanschale^{9,10,12}, in welcher befand sich schon je 0.1 ml des Bodens (Trockenplasmalösung). Mit Hilfe der Stoppuhr bestimmten wir die sogenannte Inaktivationszeit, deren Beginn auf den Moment des Kontaktes der Inkubationsmischungsprobe mit dem Boden, und das Ende auf den Moment der Gerinnung herausfiel. Die Gerinnung entdeckten wir mit einem Glashacken. Der Gerinnungszeitwert, also der Inaktivationszeitwert zeugt von der Aktivität der Thrombin, welche in der Inkubationsmischung, von der Serumantithrombin noch nicht neutralisiert, bleibt.

Die Anordnung der Experimente versicherte einerseits die gleichen Volumenverhältnisse in den Inkubations- und Inaktivationsmischungen (Tab. I) und

den Vergleich der Resultate, andererseits ermöglichte eine Erklärung der Mechanismen der gegenseitigen Einflüsse der in den Reaktionen aktiven Körper: Ribonukleïnase, Heparin, Antithrombin und Thrombin.

Insgesamt führten wir 34 Untersuchungen des Inaktivationsvorganges, darunter 7-Kontrollen, 7-mit Ribonukleïnase, 10-mit Heparin und die letzten 10-mit Ribonukleïnase-Heparinmischung (Tab. II).

RESULTATE UND FOLGERUNGEN

Die Resultate der Inaktivationszeitbestimmungen in den einzelnen Inkubationsminuten in verschiedenen Inkubationsmischungen (a~d) sind in der Tab. 2 zusammengestellt.

Table 2. Die resultate der kontrollen (a) und der experimente mit ribonukleïnase (b), heparin (c) und ribonukleïnase+heparin (d).

Probengruppe (1-11)	Inkubationsmischung (a-b)	Die Inaktivationszeitwerte in Sek. (A) und deren Zuwachs in Sek. Min. der Inkubation (B) nach :							
		1 Min.		2 Min.		3 Min.		5 Min.	
		A	B	A	B	A	B	A	B
1.	a	9	—	16	7	20	4	25	2.5
	b	13	—	14	1	15	1	20	2.5
	c	26	—	36	10	49	13	69	10
	d	24	—	32	8	42	10	59	8.5
2.	a	13	—	16	3	17.5	1.5	19	0.7
	b	13	—	18	5	19	1	26	3.5
	c	19	—	21	2	24	3	29	2.5
	d	17	—	19	2	22	3	25	1.5
3.	a	16	—	17	1	19	2	21	1
	b	16	—	18	2	20	2	24	2
	c	23	—	25	2	30	5	34	2
	d	20	—	21	1	22	1	26	2
4.	a	10	—	14	4	18	4	19	0.5
	b	12	—	14	2	15	1	17	1
	c	30	—	44	14	56	12	72	8
	d	20	—	23	3	26	3	35	4.5
5.	a	12	—	13	1	15	2	16	0.5
	b	10	—	13	3	15	2	16	0.5
	c	40	—	55	15	65	10	78	6.5
	d	21	—	34	13	44	10	55	5.5

6.	a	11	—	12	1	14	2	17	1.5
	b	13	—	14	1	15	1	16	0.5
	c	21	—	29	8	37	8	49	6
	d	15	—	22	7	27	5	37	5
7.	a	10	—	11	1	12	1	14.5	1.2
	b	10	—	10.5	0.5	11.5	1	14.5	1.5
8.	c	28	—	37	9	53	16	72	9.7
	d	24	—	34	10	47	13	58	10.5
9.	c	22	—	24	2	27	3	31	2
	d	17	—	22	5	25	3	29	2
10.	c	27	—	34	7	48	14	56	4
	d	23	—	30	7	40	10	47	3.5
11.	c	21	—	29	8	35	6	43	4
	d	17	—	22	5	27	5	37	5
Arithmetische Durchschnitts- werte aller Proben	a	11.6	—	14.1	2.6	16.5	2.3	18.8	1.1
	b	12.4	—	14.5	2.0	15.8	1.3	19.0	1.9
	c	25.7	—	33.4	7.7	42.4	9.0	53.5	5.5
	d	19.8	—	25.9	6.1	32.2	6.3	41.8	4.8

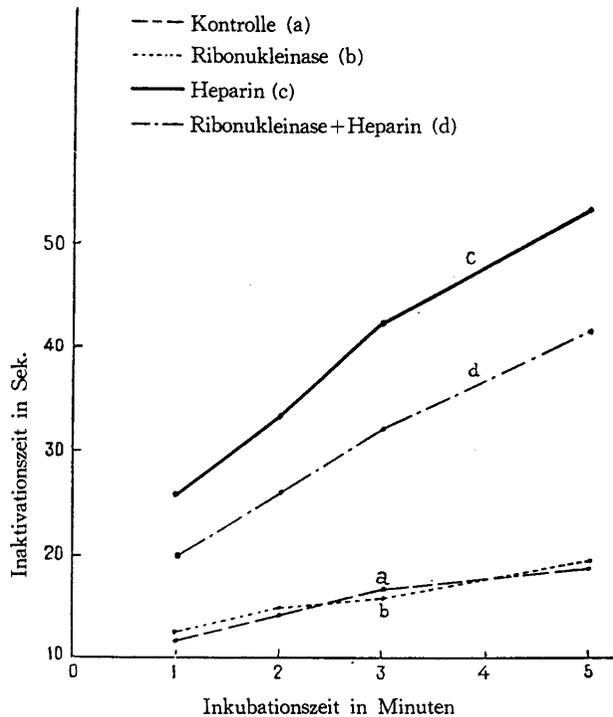
Die Tab. 2 veranschaulicht, dass die Ribonukleïnase allein in den Bedingungen unserer Experimente keine eindeutliche oder wesentliche Wirkung auf die Thrombinaïktivatiïon im Serum ausübt. Dafür sprechen nicht nur die einzelnen Inaktivationszeitwerte der Kontrollen (a) und der Experimente mit Ribonukleïnase (b), sondern auch die arithmetische Durchschnittswerte der Inaktivationszeitwerte (A) und deren Zuwachse (B) in beiden Bestimmungsgruppen.

Heparin aber übt in unseren Experimenten seine bekannte, spezifische Antithrombinwirkung (als Antithrombin II) aus. Es kommt zu der Verlängerung der Inaktivationszeit (A) und der Zeitzuwachse (B) in den einzelnen Proben (c, d) im Vergleiche mit den entsprechenden Werten der Kontrollen (a) und zu der Erhöhung der Durchschnittswerte der Inaktivationszeiten und deren Zuwachse in beiden Gruppen (c, d).

Die Ribonukleïnase in unseren Experimenten vermindert die gerinnungshemmende Antithrombinwirkung des Heparins. Wir stellen vor allem eine Verkürzung der Inaktivationszeiten (A) und eine häufige Verminderung deren Zuwachswerte in den nachfolgenden Inkubationsminuten (B) im Vergleiche der Resultate bei den Heparinexperimenten (c) zu denen bei den Ribonukleïnase + Heparin-experimenten (d), fest. Ähnlich benehmen sich die arithmetische Durchschnittswerte der Inaktivationszeiten und deren Zuwachse in beiden Experimentgruppen (c, d).

Den Verlauf der graphischen Kurven der arithmetischen Durchschnittswerte der Inaktivationszeiten in den 4 Experimentgruppen (a~d) sehen wir auf der Abbildung 1 a~d.

Abb. 1. Der einfluss von ribonuklelnase und heparin auf die thrombininaktivtion.



Unsere Folgerungen werden auch von der statischen Bearbeitung bestätigt. Diese Bearbeitung betraf zwei einfache Systeme, von welchen jeder sich aus zwei korrelierten, unter sich durch einen Merkmal verschiedenen, Gruppen zusammenstellte. Das erste System bestand aus zwei Zahlenreihen der Resultate von Inaktivationszeiten bestimmungen in den Kontrollon (a) und nach der Zugabe von Ribonuklelnase (b). Das zweite System ist von zwei Zahlenreihen der Resultate der Inaktivationsbestimmungen in Anwesenheit von Heparin (c) und Ribonuklelnase + Heparin (d) gebildet. In beiden Systemen der einzige Merkmal, der beide korrelierten Gruppen der Systeme unter sich unterscheidet das ist die An- oder Abwesenheit der Ribonuklelnase in der Inkubations- und Inaktivationsmischung. Bei der statistischen Bearbeitung der Resultate bedien ten wir uns des Kriteriums von Student (GOSSET²⁰, um den Wert der Differenz der ari-

arithmetischen Durchschnittswerte ($\bar{x}_1 - \bar{x}_2$) der beiden Gruppen (\bar{x}_1 und \bar{x}_2) bewerten zu können. Der Test von Student erlaubt festzustellen, ob die zwischen zwei Gruppen existierende Differenz statistisch als zufällige oder charakteristische Erscheinung aufzufassen sei. Die speziellen Tabellen ermöglichen von dem Werte des Koeffizienten t die Wahrscheinlichkeit (bei der gegebenen Zahlgrösse der Gruppen) des zufälligen Eintretens der erhaltenen Differenz der Durchschnittswerte der zwei Gruppen zu bestimmen. Der Test von Student stellt folgende Gleichung dar: der Koeffizient $t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_x}$, in welcher \bar{x}_1 und \bar{x}_2 die arithmetische Durchschnittswerte der Gruppen \bar{x}_1 und \bar{x}_2 und s_x den Durchschnittsfehler der Durchschnittswertedifferenz (die Berechnung siehe Arbeiten^{10,20} bezeichnen. Die Gleichung von Student-Gosset zeigt, dass desto kleiner die Differenz zwischen Durchschnittswerten beider Gruppen ist, desto kleiner der Koeffizient t und desto grösser die Wahrscheinlichkeit (p), dass die beiden Gruppen sich nicht wesentlich unter sich unterscheiden. Wenn die Differenz der Durchschnittswerte beider Gruppen grösser wird, steigt auch der Koeffizient t , sowie die Wahrscheinlichkeit, dass die beiden Gruppen sich unter sich wesentlich unterscheiden und dass der Unterschied weniger oder mehr statistisch charakteristisch ist.

Aus diesen Gründen für die Bewertung der Differenzen im Bereiche des ersten Systems zwischen den Resultaten der Kontrollen (a) und den Resultaten der Ribonukleïnaseexperimente (b) berechneten wir den Koeffizient t für die arithmetische Durchschnittswerte beider Zahlenreihen für die 1 Inkubationsminute, in welcher die Durchschnittswertedifferenz die grösste war. Der Durchschnittsfehler der Differenz der Durchschnittswerte beider Gruppen $s_x = 1.19$, die Differenz der Durchschnittswerte beider Gruppen $\bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 0.8$, also $t = 0.67$. Wir lesen von den Tafeln²⁰ die Wahrscheinlichkeit $P = 0.516$, (für $k = 12$; $k = n_1 + n_2 - 2$, wo n_1 und n_2 die Zahl der Observationen in Gruppen x_1 und x_2 bezeichnen) ab. Also die Wahrscheinlichkeit des zufälligen Eintretens solches Systems zweier Zahlenreihen ist gross (ungefähr 516/1000!) und wir können die Differenz zwischen beiden Zahlengruppen der Reaktionen a und b in der 1 Inkubationsminute als statistisch uncharakteristisch bezeichnen. Da in den weiteren Inkubationsminuten die Differenz $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ noch kleiner ist, die Wahrscheinlichkeit des zufälligen Eintretens des solchen Systems zweier Zahlengruppen für die 2, 3 und 5 Inkubationsminute noch grösser wird. Das zeugt für den Mangel der statistischen Wesenheit der Differenz zwischen den Zahlenreihen der Durchschnittswerte der Resultate von Inaktivationsbestimmungen in den Kontrollen (a) und in der Anwesenheit der Ribonukleïnase (b) auch in den übrigen Minuten der Inkubation. Die Statistik bestätigt solcherweise unsere Polgerung, dass die Ribonukleïnase keinen charakteristischen und wesentlichen einfluss auf die Thrombininaktivierung ausübt.

Bei der Bewertung der Differenzen im zweiten System, also in den Gruppen der Heparinexperimente (c) und der Ribonukleinasen + Heparinexperimente (d) berechneten wir den Koeffizient t für die 1 Inkubationsminute, in welcher die Differenz beider Durchschnittswerte die kleinste war. Der Durchschnittsfehler der Durchschnittswertedifferenz für beide Zahlenreihen $s_{\bar{x}} = 2,2$, die Differenz $\bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 5,9$ und $t = 2,7$. Die von den Tafeln abgelesene Wahrscheinlichkeit, für $k = 18$ ($P = 0,015$. Die Wahrscheinlichkeit des zufälligen Eintretens solches Systems beider Zahlengruppen ist minimal) kaum 15 (1000), und die Differenz der Durchschnittswerte für die 1 Minute der Inkubation ist statistisch charakteristisch. Da in den weiteren Inkubationsminuten die Differenzen noch grösser sind, als in der 1 Minute, die Wahrscheinlichkeit des zufälligen Eintretens solcher Systeme der Zahlengruppen ist noch kleiner. Das spricht für eine statistische Wesenheit der Differenzen zwischen den Resultaten der Heparinexperimente (c) und Ribonukleinasen + Heparinbestimmungen (d) auch in den weiteren Inkubationsminuten. Die Statistik bestätigte solcherweise auch unsere zweite Folgerung, dass die Ribonukleinasen einen charakteristischen hemmenden Einfluss auf die spezifische, Antithrombin- und Antikoagulationswirkung des Heparins ausüben.

Die Literaturangaben und die Resultate unserer Forschungen können zur Erkennung der gegenseitigen, sehr interessanten, Einflüsse zwischen beiden aktiven Gewebe- und Blutsstoffen-Heparin und Nukleinasen, beitragen. Die Folgerungen aus unseren Resultaten erlauben die Behauptung, dass nicht nur das Heparin auf die spezifische Rolle von Nukleinasen in Geweben und Blut wirkt, sondern auch, dass die spezifische Antithrombin (II)-wirkung des Heparins beeinflussen können. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Nukleinasen auch auf andere biologische Eigenschaften und Wirkungen des Heparins, als "Gewebehormons", wirken können. Dieses Problem bleibt den weiteren Untersuchungen offen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ribonukleinasen allein üben keinen charakteristischen oder wesentlichen Einfluss auf die Thrombinaktivierung in Inkubationsmischung (0,4 ml Serum, 0,1 ml der Ribonukleinasenlösung von der Konzentration 0,025 mg/ml, 0,1 ml des destillierten Wassers und 0,4 ml der Thrombinlösung) aus. Heparin aber vergrössert die Thrombinaktivierung in der ähnlichen Inkubationsmischung (0,4 ml von Serum, 0,1 ml Heparinlösung in der Konzentration ungefähr 0,005 mg/ml, 0,1 ml des destillierten Wassers und 0,4 ml der Thrombinlösung). Wenn in der letzten Inkubationsmischung statt des destillierten Wassers die selbe Menge) 0,1 mg der (Ribonukleinasenlösung) 0,025 mg/ml (gegeben wird, kann man feststellen, dass die Ribonukleinasen die spezifische, Antithrombin- und Anti-

koagulationswirkung des Heparins ausdrûcklich vermindert. Die Thrombininaktivatiôn wurde in Gegenwart des Bodens- des 7.5/200.0 wâsserigen Trockenplasmalôsung, untersucht. Man veretzte 0.1 ml des Bodens mit 0.1 ml der Inkubationsmischung. Die Thrombinlôsung hatte bestimmte Aktivitât) 0.1 ml davon brachte in 10 Sek. 0.1 ml des Bodens in Gerinnung) Insgesamt wurden 34 dar Thrombinaktivatiônuntersuchungen gemacht, davon 7-Kontrollen, 7-mit Ribonukleïnase, 10-mit Heparin und 10-mit Ribonukleïnase + Heparin.

Die Resultate (Tab. II, Abb. 1) zeugen, dass die Ribonukleïnase *in vitro* die spezifische Antithrombin (II)-Wirkung des Heparins hemmt. Wahrscheinlich modifiziert sie auch weitere biologische Eigenschaften des Heparins. Die Resultate eigener Untersuchungen und die Literaturangaben ûber den Heparin-einfluss auf die Nukleïnasen sprechen fûr eine gegenseitige, charakteristische Reaktionen zwischen Nukleïnasen und Heparin. Diese Interaktionen beider Gewebe- und Blutsubstanzen kann eine grosse Bedeutung fiûr viele Lebensvorgânge haben.

DANKSAGUNG

Die Verfasser bedanken Prof. Dr M. Gerendás (Haematologisches Institut in Budapest-Ungarn) fûr die Thrombinûberreichung, Dr J. Mostowski, dem Direktor des Blutspendendienstes in Kraków-Nowa Huta fûr die Erlaubnis die Untersuchungen bei den Blutspendern durchfûhren zu kônnen und fûr die Trockenplasmalieferung und Mgr. A. Zarnecki (Hôhere Agrarschule in Kraków) fûr don Beistand in der statistischen Bearbeitung der Resultate.

SCHIFFTUM

1. ALBRIEUX, A.S. und ROCCA, F.F. : Arch. Urug. Med. 1956, 49, 233.
2. ALEKSANDROWICZ, J. : Haematologica Polonica 1959, 3, 115.
3. BALAZS, E.A. und HOLMGREN H. : Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 1949, 72, 142.
4. BIELIK, J.W. uud CHODOROWA, E.L. : Biochimia swertywania krwi. Akademia Nauk Ukrainskoj S.S.R. Institut Biochimii Kiew 1957.
5. De LAMIRANDE, G., MLLARD, C., Da COSTA, H.C. und CANTERO, A. : Science 1954, 119, 351.
6. De LAMIRANDE, C., WEBER, G. und CANTERE, A. : Amer. Journ. Physiol. 1956, 184, 415.
7. FISCHER, A. : Protoplasma 1936, 26, 344.
8. GAERTNER, H. : Krzepnicie krwi-Fizjologia i Patologia ukkladu hemostatycznego (Die Blutgerinnung-Physiologie und Pathologie des hâmostatische Systems). Kraków 1960.
9. GAERTNER, H. und LISIEWICZ, J. : Die Resultate der Thrombininaktivatiônbestimmungen im Serum des gesunden Erwachsenen. Przeglâd Lekarski, im Druck,
10. GAERTNER, H. und LISIEWICZ, J. : Das Verhalten der Thrombininaktivatiôn durch das Serum der gesunden Erwachsenen abhângig vom Geschlecht und der Serumaufbewahrungsfrist. Przeglâd Lekarski, im Druck.
11. GAERMNER, H. und SZIRMAI, E. : Przeglâd Lekarski 1958, 14, 196; Folia Haematologica 1959, 76, 116.

12. GERENDAS, M. : *Annales Instituti Biologiae Pervestigandae Hungarici* 1949—1950, Fasc. 1.
13. GOERNER, A. : *Journ. Lab. Clin. Med.* 1930—1931, 16, 369.
14. HEILBRUNN, L. V. : *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* 1949, 70, 179.
15. HEYMANN, H., CULICK, Z. R., De Boer C. J., De STEVENS G. und MAYER R. L. : *Arch. of Biochem. & Biophys.* 1958, 73, 366.
16. KREXISLER, L. : *Science* 1952, 115, 145.
17. NIEWIAROWSKI, S. : *Krzepniecie krwi (Die Blutgerinnung)*. PZWL Warszawa 1954.
18. PAFF, C. H., SUGIURA, H. T., BOCHER, C. A. und ROTH, J. S. : *Annt. Record.* 1952, 114, 499.
19. ROTH, J. S. : *Arch. of Biochem. & Biophys.* 1953, 44, 265, dort das Schrifttum.
20. RUSZCZYC, Z. : Das Kapitel "Die Grundlagen der mathematischen Statistik in "Metodyka doświadczen zootechnicznych". PWRL Warszawa 1955, Seiten 177—294.
21. SCHMID, J. : *Die Blutgerinnung in Theorie und Praxis*. w. Maudrich Wien 1951.
22. STUDER, J. : *Experientia* 1954, 10, 148.
23. TURNER, F. C. : *Cancer Research* 1953, Suppl. 1, 85.
24. ZAKRZEWSKI, Z. : *Zschr. für Krebsforsch.* 1932, 36, 513; *Arch. für Exper. Zellforsch.* 1933, 13, 152; *Klin. Wschr.* 1933, 11, 113.
25. SZIRMAI, E. : *Vorträge. Haemat. Gesellsch. Kongr. Wissensch. Publ.* 1944—1960. Brosch. Stuttgart 1959.