

Einfluss von sulfatierten Hyaluronsäuren, natürlichen Huminsäuren und
synthetischen Huminsäure-ähnlichen Polymeren auf das Gerinnungssystem
in vitro

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Nicolle Mahr

geb. am: 07.11.1974 in: Sonneberg

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. habil. E. Krause
2. Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. H.-P. Klöcking
3. Prof. Dr. med. habil. G. Vogel

Halle (Saale), den 23. September 2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005714

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005714>]

M E I N E N E L T E R N

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	
1. Einleitung	1
2. Materialien	6
2.1. Prüfsubstanzen	6
2.1.1. Natürlich vorkommende Huminsäuren	6
2.1.2. Synthetische Huminsäure-ähnliche Polymere	7
2.1.3. Sulfatierte Hyaluronsäurederivate	8
2.1.4. Vergleichssubstanzen	9
2.2. Physiologische Enzyme, Substrate und Inhibitoren	9
2.3. Nichtphysiologische Inhibitoren und Aktivatoren	11
2.4. Chromogene Peptidsubstrate	11
2.5. Chemikalien und weitere Reagenzien	12
2.6. Geräte und Hilfsmittel	13
3. Methoden	15
3.1. Gerinnungsanalysen mit dem Koagulometer CL4	15
3.1.1. Thrombinzeitbestimmung in Humanplasma	15
3.1.2. Fibrinogengerinnungszeit	16
3.1.3. Plasmatische Gerinnungszeit nach Aktivierung der Gerinnung über den extrinsischen Gerinnungsweg	17
3.1.4. Antifibrinolytische Wirkung im Lysetest	18
3.2. Proteaseaktivitätsmessung mit chromogenen Peptidsubstraten	19
3.2.1. Anti-Thrombin Aktivität	21
3.2.2. Anti-Xa Aktivität	22
3.2.3. Untersuchungen am plasmafreien Protein-C-Antikoagulationssystem	22
3.2.4. Untersuchungen am Protein-C Antikoagulationssystem in Humancitratplasma	24
3.2.5. Unspezifische amidolytische Aktivität gegenüber chromogenen Substraten nach Inkubation von Humanplasma mit den Prüfsubstanzen	25
3.2.6. Aktivierung von Prothrombin im plasmafreien System	27
3.3. Statistische Auswertung	28

4.	Ergebnisse	29
4.1.	Einfluss auf die Thrombinzeit in Humanplasma	29
4.2.	Einfluss auf die Fibrinogengerinnungszeit	33
4.2.1.	Abhängigkeit von der Konzentration der Prüfsubstanzen	33
4.2.2.	Neutralisation mit Protaminsulfat	40
4.3.	Einfluss auf die plasmatische Gerinnungszeit nach Aktivierung der extrinsischen Gerinnungsweges	42
4.4.	Antifibrinolytische Wirkung	46
4.5.	Amidolytische Aktivität von Thrombin	48
4.5.1.	Abhängigkeit von der Konzentration der Prüfsubstanzen	48
4.5.2.	Einfluss von Antithrombin III	52
4.6.	Amidolytische Aktivität des Stuart Prower Faktors	57
4.6.1.	Abhängigkeit von der Konzentration der Prüfsubstanzen	57
4.6.2.	Einfluss von Antithrombin III	62
4.7.	Aktivierter Protein-C Aktivität im plasmafreien System	67
4.8.	Beeinflussung der Protac[®] Aktivierung von Protein-C im plasmafreien System	71
4.8.1.	Aktivierung von Protein-C	71
4.8.2.	Abhängigkeit von der Konzentration der Prüfsubstanzen	72
4.9.	Aktivierter Protein-C Aktivität in Humanplasma	75
4.10.	Beeinflussung der Protac[®] Aktivierung von Protein-C in Plasma	84
4.11.	Unspezifische amidolytische Aktivität gegenüber chromogenen Substraten nach Inkubation von Humanplasma mit den Prüfsubstanzen	90
4.12.	Aktivierung von Prothrombin im plasmafreien System	95
5.	Diskussion	96
6.	Zusammenfassung	143
7.	Literatur	150
	Selbstständigkeitserklärung	
	Erklärung	
	Lebenslauf	
	Danksagung	

Abkürzungen

Ala	Alanin
APC	aktiviertes Protein C
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
ATIII	Antithrombin III
ATU	<i>antithrombin unit</i> , Antithrombin-Einheit
BD	<i>Blackfoot disease</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
DMA	Dimethylarsenat
DS	Sulfatierungsgrad
E _A	maximal mögliche Aktivierung
E _{APC}	Mindestmenge enthaltenes APC
E _G	gemessene Extinktion abzüglich Eigenfarbe
F	Faktor
FHS	Fluoreszierende Huminsäuren
FI	Faktor I, Fibrinogen
FIIa	aktivierter Faktor II, Thrombin
FVa	aktivierter Faktor V, Proaccelerin
FVIIa	aktivierter Faktor VII, Proconvertin
FVIIIa	aktivierter Faktor VIII, Antihämophiles Globulin A
FXa	aktivierter Faktor Xa, Stuart Power Faktor
Gla	γ-carboxy-Glutaminsäure
GLCA	D-Glucuronsäure
GLCN	D-Glucosamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GZ	Gerinnungszeit
h	Stunde
HAH	<i>high affinity heparin</i>

HCII	Heparin Cofaktor II
HS	Huminsäure
HSÄP	Huminsäure-ähnliche Polymere
HSt	Huminstoff
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> , menschliche Nabelschnur-Endothelzellen
i.v.	intravenös
IC ₅₀	Halbmaximale Hemmkonzentration
IdoA	L-Iduronsäure
IE	Internationale Einheit
Ile	Isoleucin
IR	Infrarot
KH	Kohlenhydrat
LAH	<i>low affinity heparin</i>
LMWH	<i>low molekular weight heparin</i> , niedermolekulares Heparin
LW	Leerwert
Lys	Lysin
MMA	Monomethylarsenat
n	Anzahl
NaHS	NaHS I-IV/80
NHS	Natürlich vorkommende Huminsäuren
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i> , Plasminogenaktivator-Inhibitor-1
PC	Protein C
PCI	Protein C-Inhibitor
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
Phe	Phenylalanin
PNA	para-Nitroanilin
PPS	Pentosanpolysulfat
Pro	Prolin
PS	Polysaccharid
R1-R4	Reagenz 1-4
RL	Reagenzlösung
ROS	Refraktäre Organische Substanzen

SK	Streptokinase
tF	<i>tissue factor</i>
Thr	Threonin
TM	Thrombomodulin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
Tyr	Tyrosin
TZ	Thrombinzeit
UFH	Unfraktioniertes Heparin
Val	Valin

„Der Mensch hat nichts Kostbareres als sein Blut:
das Blut ist etwas viel Wärmeres, Röteres, Lebendigeres als
das Lüftchen, das seinem Munde ein- und ausgeht, ein ganz
besonderer Saft, wie ein Wesen bemerkt, das keines hat und
gleichsam flüssiges Leben – die purpurne Quintessenz des
Lebens, die im Tode vergossen wird und umkommt, nicht wie
Die Seele erhalten bleibt und mit dem Rest der Persönlichkeit
verfliegt.“ (Kleinpaul, 1898)

1. Einleitung

Das Blut ein „ganz besonderer Saft“ ist, wusste nicht nur Goethe. Blut hat zu allen Zeiten in allen Kulturen eine Bedeutung gehabt, die weit über die rein biologische und medizinische hinausgeht.

Als „Elixier des Lebens“ besitzt seine wissenschaftliche Erforschung eine Geschichte, die bis ins 4. Jh. v. Chr. zurückverfolgt werden kann, denn schon Hippokrates beobachtete, dass sich Blut, wenn man es im Messkolben stehen lässt, durch Senkung in 3 Schichten trennt (Schröder, 1974; Rothschild, 1978). Die Beschreibung von Physiologie und Pathologie der Blutgerinnung folgte in ihrem historischen Verlauf seit der griechischen Antike dem jeweils vorherrschenden Konzept der Medizin. Dementsprechend wurden unterschiedliche Hypothesen und Theorien über die vermutlichen Ursachen der Hämostase aufgestellt. Das interdisziplinäre Zusammenwirken vieler Wissenschaftler im Rahmen eines längerfristigen historischen Prozesses wird anhand des mehr als 200 Jahre dauernden mehrstufigen Forschungsweges von William Harvey (1578–1657) mit seiner Theorie des Blutkreislaufes (1628) und der Formulierung von Rudolf Virchows (1821-1902) Thrombose- und Embolie-Konzeptes (1856) deutlich (Virchow, 1910; Schipperges, 1974). V.a. Virchow schuf mit seinen Befunden erstmals die Möglichkeit zu einer wissenschaftlichen Therapie und Prophylaxe von thromboembolischen Erkrankungen (David, 1993). Doch klinisch verwendbare Gerinnungshemmer, die wichtiger Teil der antithrombotischen Behandlung sind, wurden erst im 20. Jahrhundert gefunden und in breitem Maße angewandt. Als therapeutisch bedeutendste Substanzklasse erwiesen sich die unfraktionierten Heparine, welche über ein halbes Jahrhundert Antikoagulantien der Wahl im Bereich der therapeutischen Anwendung waren (Koller, 1983).

Mit der Gruppe der Heparine wurde 1916 eine neue Klasse von Verbindungen, welche neben ihrer klinisch wichtigsten Wirkung, der Hemmung der Blutgerinnung, ein sehr vielfältiges Wirkungsspektrum besitzen, zur Verfügung gestellt. Um der Bedeutung ihrer chemischen Struktur bzgl. dieser komplexen klinischen, biologischen und chemischen Wirkungen gerecht zu werden, wurde für diese Stoffgruppe auch die Bezeichnung „lineare polyanionische Polyelektrolyte“ *geprägt*. V.a. in der polyanionischen Natur sucht man die Erklärung für die vielfältigen Wirkungen von Heparin (Jorpes, 1939; Jaques, 1979).

Bis heute ist kommerzielles Heparin Leitstruktur einer Vielzahl derartiger Verbindungen, welche in verschiedenen menschlichen Geweben, Tier- und Pflanzenspezies

gefunden wurden aber auch semisynthetische Abwandlungsprodukte dieser sein können (Alban, 1997; Barbucci et al., 1996; Mourao et al., 1999; Campbell et al., 1987; Dace et al., 1997). Doch trotzdem eine Vielzahl solcher Heparin-ähnlicher Verbindungen isoliert werden konnte, liegt das Hauptaugenmerk der Forschung, die antikoagulierende Wirkung, bei den meisten dieser Substanzen weit unter der von Heparin. Versuche über Carboxylierung, Sulfatierung und Einführung von Sulfonatgruppen eine Wirkungssteigerung zu erreichen, blieben bei den meisten Substanzen erfolglos (Alban, et al., 2000; Barbucci et al., 1994). Die Ursache dafür liegt in der hohen strukturellen Spezifität des Heparins, die als Summeneffekt aller chemisch-strukturellen und stereochemischen Parameter des Moleküls zu verstehen ist. Die gesuchte Substanz müsste die Forderung nach einem Polymer mit definierten funktionellen Gruppen, bestimmten Grad der Substitution und Stellung der Substituenten entlang einer sich regelmäßig wiederholenden Kohlenhydratsequenz erfüllen. Bei chemischer Modifizierung muss die Substanz strukturstabil sein.

Hyaluronsäure, wichtiger Bestandteil aller extrazellulären menschlichen und tierischen Gewebestrukturen, erwies sich als ein geeigneter Grundkörper. In seiner nativen Form besitzt das einzige unsulfatierte Mitglied der Glykosaminoglykanfamilie keine antikoagulierenden und antithrombotischen Eigenschaften. Erst durch Sulfatierung erhielt man Derivate mit einer antikoagulierenden Aktivität, die im Bereich von Heparin liegt (Barbucci et al., 1994; Magnani et al., 1996; Klöcking et al., 1998). Durch eine spezifische Reaktionsführung gelang es Verbindungen mit einstellbaren und reproduzierbaren Sulfatierungsgrad zu erhalten (Tan et al., 1990; Wada et al., 1994; Möller et al., 1998).

Störungen der Hämostase und thrombo-embolische Erkrankungen sind bis heute, insbesondere in den westlichen Industrienationen, die häufigste Todesursache. Nach wie vor kommt der Suche nach spezifischeren, effizienteren und sichereren Wirkstoffen zur Prophylaxe und Therapie dieser Erkrankungen eine große Bedeutung zu. Erste Untersuchungsergebnisse zur Cytotoxizität und Cytokompatibilität sulfatierter Hyaluronsäuren deuten auf eine gute Biokompatibilität hin (Abatangelo et al., 1997). Zusätzlich zur relativ starken antikoagulierenden Wirkung in-vitro lässt dies sulfatierte Hyaluronsäuren für weitergehende Untersuchungen zur Beeinflussung der Blutgerinnung interessant erscheinen.

Doch Schaden und Nutzen können in der Natur nah beieinander liegen.

Natürliche Huminsäuren (NHS) und synthetische Huminsäure-ähnliche Polymere (HSÄP) sind auf Grund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften wie das Antikoagulum <Heparin> zu den polyanionischen Verbindungen zu rechnen (Klöcking et al., 1986). Im Gegensatz zu Heparin gerieten sie jedoch jüngst in Verdacht durch Wechselwirkung mit einzelnen Komponenten des Gerinnungssystems einen thrombophilen Zustand auszulösen.

1986 beschrieben Lu und Liu die Eigenschaften einer aus dem Trinkwasser von in Taiwan gelegenen Bergdörfern isolierten Substanz, die man für eine mögliche Ursache der Blackfoot disease (BD) hält. Es handelt sich bei dieser Substanz um Organometallkomplexe mit großer struktureller Ähnlichkeit zu NHS. Auf Grund eines mehr oder weniger großen Anteils an fluoreszierenden Fraktionen werden sie als „fluoreszierende Huminsäuren“ (FHS) bezeichnet.

Erste Untersuchungen von Klöcking (1994b; 1991a; 1991b) zur Wirkung von NHS auf die Blutgerinnung in-vitro zeigten, dass diese im Vergleich zu FHS (Lu et al., 1990, 1992; Wu et al., 1993; Yang et al., 1996) völlig gegensätzliche Wirkungen im Hämostasystem besitzen. Die tägliche Aufnahme von FHS führt zum Krankheitsbild der BD, welches bereits vor über 60 Jahren beschrieben wurde. Es handelt sich um eine periphere Gefäßerkrankung, welche vorwiegend an den Füßen und gelegentlich an den Beinen auftritt und häufig eine Amputation der geschädigten Gliedmaßen erforderlich macht. Auf die Schwarzfärbung des betroffenen Fußes in der gangränösen Phase ist der Name der Erkrankung zurückzuführen. 1977 wurden mehr als 1455 Fälle registriert (Lu, 1990b).

Bislang ist ungeklärt, in welcher Beziehung FHS zu den bei uns vorkommenden NHS stehen. Besondere Brisanz erhält die Frage nach einer möglichen thrombophilen Wirkung der NHS aufgrund der ebenfalls geringfügig enthaltenen fluoreszierenden Fraktionen (Fooker, 1999).

NHS haben ihr natürliches Vorkommen in fossilen Brennstoffen wie Torfen und Braunkohlen, Gewässern und Ackerböden. Sie sind als Hauptinhaltsstoff in Hochmoortorfen enthalten, welche von alters her eine breite medizinische Anwendung finden. Bereits im Altertum wurde von Plinius dem Älteren und Galen die externe Anwendung der als Torfsuspensionen anzusehenden Moore in Bädern bei rheumatischen Erkrankungen empfohlen (Priegnitz, 1986; Kleinschmidt, 1988). Neben dem klassischen Moorbreibad haben sich auch Moorpackungen, Moorschwebstoffbäder, Moortrinkkuren und Moortamponaden, letztere zur Behandlung gynäkologischer Erkrankungen (Baatz, 1988; Kleinschmidt, 1988), bewährt. Während Moortrinkkuren v.a. bei Magen-, Darm- und

Leberleiden Anwendung finden (Kallus, 1962), werden mit balneologischen Anwendungen hauptsächlich Osteoarthrosen, Dermatosen (Neurodermitis, Ekzeme), Thrombophlebitiden, allergische Erkrankungen, gastrische Ulzera und Parodontitis behandelt (Siedeck et al., 1960; Taugner, 1963; Walther, 1981). Über Erfolge der oralen Applikation von Huminstoffen (HSt) ist auch aus der Tiermedizin berichtet worden. Hauptindikationsgebiete sind hier v.a. enteritische Krankheitssymptome (Zaribnicky, 1958; Kühnert et al., 1982, 1991). Grundlage der Einsetzbarkeit von HSt in Human- und Veterinärmedizin sind die adstringierenden, antiphlogistischen, adsorptiven und viruziden Eigenschaften (Klöcking et al., 1968, 1972, 1975, 1983; Thiel et al., 1977; Zsunshuj, 1988; Schewe et al., 1997) bei fehlenden toxischen Wirkungen nach oraler und subkutaner Verabreichung (Ferne Korn, 1989).

Jahrhundertlange, überwiegend positive Erfahrungen mit Moorbehandlungen zur Prophylaxe und Therapie zahlreicher Erkrankungen, sprechen gegen eine thrombophile, BD-auslösende Wirkung der bei uns vorkommenden NHS. Dennoch sind unsere Kenntnisse über die physiologischen und pharmakologisch-toxikologischen Wirkungen des Badetorfes und seiner Hauptinhaltsstoffe noch sehr begrenzt. Wenig weiß man über zugrundeliegende Wirkungsmechanismen. Untersuchungen zur Resorption der NHS beim Moorbad und der Anwendung als Trinkmoor stehen noch aus. Grundlegende Fragen zur chemischen Struktur und physikalisch-chemischen Eigenschaften von NHS sind nur unzureichend geklärt.

Der heutige Kenntnisstand über NHS und HSÄP erlaubt es, eine Reihe von Merkmalen zu benennen, anhand derer die Zuordnung von Stoffen vom Huminsäuretyp möglich ist. Untersuchungen an und mit sogenannten HSÄP könnten v.a. zur Aufklärung von z.T. noch unbekanntem Wirkungsmechanismen gute Dienste leisten und Aussagen darüber ermöglichen, welche Heilwirkung des Torfes NHS zuzuordnen sind. Damit gewinnen Untersuchungen an aus Moorwasser isolierten HS und HSÄP für die Aufklärung des pharmakologischen Wirkprofils zunehmend an Bedeutung.

Das Vorkommen von NHS wird als eine Ursache des Heilerfolges des Torfes bei verschiedenen Erkrankungen angesehen. Auch die Erfolge in der Behandlung von Thrombophlebitiden werden dem Vorhandensein von NHS zugeschrieben (Lachmann, 1964). Maßgeblich sind dabei die antikoagulierenden, fibrinolytischen und entzündungshemmenden Eigenschaften der NHS (Klöcking et al., 1994b). Für die fibrinolytische bzw. profibrinolytische Wirkung sowie die entzündungshemmenden Eigenschaften natürlicher Moorwasser-HS liegen ausreichende tierexperimentelle Studien vor (Klöcking et al., 1968; Klöcking 1990, 1991a, 1991d, 1994a; Klöcking, 1984, 1986; Klöcking et

al., 1992, 1994b; Zsunshuj et al., 1981). Mittels der Thrombelastographie, einem Globaltest, wurde ein Einfluss der Stoffe vom HS-Typ im Sinne einer Hypokoagulabilität nachgewiesen (Klöcking et al., 1994b, Navara, 2001). Diese Wirkung bedarf weiterer Untersuchungen zum Angriffsort in der Gerinnungskaskade und Abklärung der erhaltenen Befunde durch gezielte Bestimmung von Einzelfaktoren der Gerinnung.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, bisherige Befunde zur Hämostasestörung durch verschiedene polyanionische Verbindungen hinsichtlich ihres Mechanismus näher zu analysieren. Zu diesem Zweck wurde die antikoagulierende Wirkung von zwei biotechnologisch hergestellten und nachfolgend sulfatierten Hyaluronsäurederivaten verschiedenen Molekulargewichts mit der von Heparin und Pentosanpolysulfat als sulfatgruppentragende Vergleichssubstanzen aus dem Bereich der klinischen Anwendung verglichen. Verbindungen mit Carboxyl-, Carbonyl- und phenolischen Hydroxylgruppen als vorherrschenden anionischen funktionellen Gruppen wie eine aus Moorwasser und eine aus Braunkohle isolierte HS wurden, aufgrund struktureller Ähnlichkeit zu den in Taiwan vorkommenden FHS in die Testung einbezogen. Anhand der Untersuchungsergebnisse wurde die Fähigkeit in Deutschland vorkommender NHS beurteilt, thrombophile Zustände auszulösen. Die Wirkung der zwei NHS wurde mit der von sechs Huminsäure-ähnlichen Verbindungen verglichen, die damit auf ihre Eignung als Huminsäure-Modellsubstanzen für weitergehende Untersuchungen zu Struktur- und Struktur-Wirkungsbeziehungen von NHS geprüft wurden. Methodische Grundlage bildete die mittels Gerinnungsanalyse bestimmte Thrombinzeit in Humancitratplasma und in einem isolierten Thrombin-Fibrinogen-System. Die Bestimmung der Thrombinzeit lässt erkennen, ob die zu testenden Substanzen die Umwandlung des Fibrinogens zu Fibrin verzögern, indem sie das zugesetzte Testthrombin in seiner Aktivität hemmen. Ebenfalls mittels Gerinnungsanalyse wurde der Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Fibrinolyse im sog. Lysetest und auf die extrinsisch aktivierte Gerinnung (Hemmung von Faktor VIIa) untersucht. Durch die direkte Bestimmung der zentralen Einzelfaktoren IIa und Xa mittels chromogener Substrate im plasmafreien System sollte die festgestellte Hämostasestörung näher charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang wurde auch eine mögliche Abhängigkeit der Wirkung vom Cofaktor Antithrombin III untersucht. Mit einbezogen wurden Untersuchungen am Protein C Antikoagulationssystem in Humanplasma und im plasmafreien System, dem innerhalb der plasmatischen Blutgerinnung ein wichtige Rolle als „natürliches Antikoagulant“ zukommt.

2. Materialien

2.1. Prüfsubstanzen

Bei allen Prüfsubstanzen handelt es sich um polyanionische Verbindungen, welchen keine totale Molekularstruktur zugeordnet werden kann. Die untersuchten Makromoleküle sind Stoffe, die in Lösung einer Strukturwandlung bis hin zu Fragmentierungen unterliegen können. Dies ist ein Vorgang, der v.a. stark von Milieuänderungen abhängig ist und eine Erklärung für die relativ schwierige Molekulargewichtsbestimmung darstellt. Trotz ihres polydispersen Charakters besitzen alle Substanzen typische physikalische, chemische und z.T. biologische Eigenschaften. Für die chemische Reaktivität sind hauptsächlich sauerstoffhaltige Gruppen wie Carboxyl- und Phenolgruppen, schwefelhaltige Gruppen wie Sulfatgruppen und stickstoffhaltige Gruppen wie Aminogruppen verantwortlich.

Eine genaue Charakterisierung im Sinne einer umfassenden physikalisch-chemischen Stoffkenntnis ist aufgrund dieser polydispersen Struktur kaum möglich, ebenso wie die Angabe eines Molekulargewichtes bei einzelnen Substanzen. Der Schlüssel zum Verständnis der Reaktionen solcher Substanzen liegt deshalb eher in den physikalischen, chemischen und biologischen Funktionalitäten, die den einzelnen Strukturbereichen zukommen, als in der genauen Kenntnis der Molekularstruktur (Frimmel et al., 1990; Hayes et al., 1989).

2.1.1. Natürlich vorkommende Huminsäuren

Natrium-Humat (NaHS, Ch.B.: I-IV/80, MG 10100 Da) ist das Salz einer natürlich vorkommenden Huminsäure aus dem Küstenhochmoor (Dierhagen, Mecklenburg-Vorpommern). Sie wurde nach einer von Klöcking et al. (1977) beschriebenen Methode am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Akademie Erfurt isoliert. Es handelt sich um ein braunes, wasserlösliches Pulver.

Humussäure-Natriumsalz (Aldrich HS, Lot: 31620-099) ist eine dunkelbraun gefärbte und wasserlösliche Huminsäure, die von Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-89555 Steinheim, bezogen wurde. Die Isolierung dieser HS erfolgte aus Braunkohle.

2.1.2. Synthetische Huminsäure-ähnliche Polymere

Kaffesäureoxidaionsprodukt (NaKOP, Ch.B.: 409/85, MG 6500 Da) wurde hergestellt durch Lösen von Kaffeesäure in verdünnter NaOH, umsetzen mit Periodat bei pH 9,0, erwärmen auf 80°C und abkühlen über Nacht. Durch fällen mit einem Eisessig/Ethylacetat-Gemisch (1:5), filtrieren des Niederschlages und anschließendem Trocknen wurde ein sehr gut wasserlösliches Produkt erhalten. Die Synthese der Substanz fand am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Akademie Erfurt statt (Klöcking et al., 1983; Hänninen et al., 1987).

Melanoidine

Melanoidine sind synthetisch hergestellte polyanionische Verbindungen mit huminsäureähnlichen Eigenschaften. Zur Synthese bedient man sich der Melanoidinreaktion, die nach ihrem Erfinder auch „Maillard-Reaktion“ genannt wird und als eine Möglichkeit für die natürliche Bildungsweise von Huminsäuren angesehen wird (Pompe et al., 1996). Beide Substanzen wurden am Institut für Radiochemie des Forschungszentrums Rossendorf e.V. synthetisiert (Tab.1).

Tabelle 1: Synthese- und Analysendaten der Melanoidine Typ M1 und Typ M42

Typ	M1	M42
Synthesecharge	M100A	81
Zucker	Xylose	Xylose
Aminosäure	Glycin + Phenylalanin	Glutaminsäure
Analysendaten		
<i>Elementaranalyse: C/H/N (%)</i>	64,69/ 5,28/ 5,1	58,4/ 4,9/ 4,5
<i>COOH-Gruppen (meq/g)</i>	1,37	4,1
<i>phenolische OH-Gruppen (meq/g)</i>	2,45	2,3

ROS-Modellsubstanzen

Die durchgeführten Synthesen beruhen auf der Oxidation von Phenolen (Eller et al., 1920) wie Hydrochinon mit Aminosäuren im alkalischen Medium bei Raumtemperatur. Als Oxidationsmittel wurde bevorzugt Luftsauerstoff in Na₂CO₃-Lösung verwendet (Herdering, 1998). Genannte Methode ahmt die Bildungsbedingungen von natürlichen

Huminsäuren nach und vermeidet die Einführung unerwünschten Stickstoffs aus anderen Bereichen.

Die untersuchten Substanzen wurden vom Institut für Anorganische und Angewandte Chemie der Universität Hamburg bereitgestellt (Tab.2).

Tabelle 2: Synthese- und Analysendaten der ROS-Substanzen HS 5, HS 130 und HS 136

Typ	HS 5	HS 130	HS 136
Aminosäure	Glycin	L-Glutaminsäure	L Lysin
Phenolderivat	Hydrochinon	Hydrochinon	Hydrochinon
Elementaranalyse			
C/H/N (%)	54,9/ 3,26/ 3,67	57,18/3,5/2,54	50,99/4,68/6,55
O (%)	36,25	37,65	29,5
Cl (%)	0	0	7,33
Gesamtsäure (meq/g)	9,6	10,0	8,5
COOH-Gruppen (meq/g)	4,3	5,2	5,1

2.1.3. Sulfatierte Hyaluronsäurederivate

In die Versuche mit einbezogen wurden weiterhin zwei hochsulfatierte Hyaluronsäurederivate (**HYA DS 48** und **HYA PS 10A**) welche am Hans-Knöll Institut in Jena synthetisiert wurden (Tab.3).

Beide Substanzen wurden nach einem Verfahren hergestellt, dass es gestattet, vollständig homogene Sulfatierungsreaktionen durchzuführen. Die Prozessführung wurde durch die Wahl eines geeigneten Sulfatierungsreagenzes, dessen eingesetzter Konzentration, einer günstigen Reaktionstemperatur und der Reaktionszeit so gesteuert, dass der Sulfatierungsgrad wahlweise eingestellt werden konnte (Möller et al., 1998; Tan et al., 1990; Wada et al., 1994). Ziel dabei war es, einen Sulfatierungsgrad höher 3,5 pro Disaccharideinheit des Hyaluronsäuremoleküles zu erreichen. Der Schwefelgehalt wurde mittels elementaranalytischer und NMR-spektroskopischer Untersuchungen bestimmt.

Tabelle 3: Synthese- und Analysendaten der sulfatierten Hyaluronsäurederivate
HYA PS 10A und HYA DS 48

	HYA DS 48	HYA PS 10A
Molekulargewicht	62390 Da	18900 Da
Ammoniumhyaluronat-Herstellung aus	Tributylamin	Tributylamin
Sulfatierungsreagenz	SO ₃ /DMF	SO ₃ /Pyridin
Reaktionstemperatur	4h: 45min bei 0°C dann 3,15h bei RT	Eisbad (3-4°C)
Reaktionszeit	4,15h	4h
Schwefelgehalt (%)	9,68	12,24

2.1.4. Vergleichssubstanzen

Als Vergleichssubstanzen wurde zum einen unfraktioniertes **Heparin** und zum anderen **Pentosanpolysulfat** als sog. Heparinoid verwendet. Bei beiden Substanzen handelt es sich um Stoffe mit einem hohen Gehalt an negativ geladenen funktionellen Gruppen, die klinisch geprüft sind und therapeutisch zum Einsatz kommen. Die Versuche wurden mit den reinen Wirkstoffen durchgeführt.

- Heparin-Natrium Lot. 1652/47, Aktivität: 134E/m
ex-lung Pentapharm AG, CH-4002 Basel
- Pentosanpolysulfat (SP₅₄) bene-Arzneimittel GmbH,
als reiner Wirkstoff D-80331 München, CH.B.: B8

2.2. Physiologische Enzyme, Substrate und Inhibitoren

- Thrombin 240 NIH-U/FI, Ch.B.: 813002, MG 33000 Da, Feinchemie GmbH,
gefriergetrocknet vom Rind D-01855 Sebnitz
- Prothrombin 51,1 U/mg gefriergetrockneter Feststoff ICN Biomedical, 44202
(= 137 U/mg Eiweiß), MG 73000 Da, human Ohio
- Faktor Xa human, 71nkat/FI, Lot-Ch.B.:991256, Haemochrom Di-
agnostica GmbH,
MG 55000 Da D-45279 Essen

- Protein C human, MG 62000 Da, 0,10 mg/Fl.
lyophilisiertes Pulver, Lot: HPC 1590AL, Lot:
HPC 1740PAL

Haemochrom
Diagnostica GmbH,
D-45279 Essen

- Aktiviertes human, 0,10 mg/Fl. lyophilisiertes Pulver,
Protein C Lot: APC 1630PAL

Haemochrom Di-
agnostica GmbH,
D-45279 Essen

- STACLOT®
VII-rTF - Reagenz 1: konzentrierter Puffer (R1)
- Reagenz 2: gefriergetrocknetes Human-
plasma, Faktor VII- frei (R2)
- Reagenz 3: rekombinanter löslicher
tissue Faktor (rsTF) und Phospholipide,
gefriergetrocknet (R3)
- Reagenz 4: rekombinanter humaner
Faktor VIIa, gefriergetrocknet (R4)

Roche Diagnostics
GmbH, Mannheim

- Fibrinogen human, Ch.B.: 180789, MG 340000 Da,
1g Lyophilisat = 380mg Protein
(davon 325 mg Fibrinogen)

Impfstoffwerk Dessau-
Tornau

- Anti- 10 IU/Fl. Ch.B.: X2860, MG 58200 Da,
thrombin III gefriergetrocknet

Haemochrom Di-
agnostica GmbH,
D-45279 Essen

- Poolplasma Plasmapool von 6-9 Spendern,
aus
Human-
citratblut

DRK Blutspendedienst
Thüringen, Institut für
Transfusionsmedizin,
D-99089 Erfurt

- Protein C Ch.B.: 723/011, PC-Spiegel<1%, gefrierge-
Mangel- trocknet
plasma

Haemochrom
Diagnostica GmbH,
D-45279 Essen

2.3. Nichtphysiologische Inhibitoren und Aktivatoren

- | | | |
|-----------|---|---|
| • Hirudin | rekombinant, 13500 ATU/mL
(ATU= Antithrombin-Unit) | Sigma Aldrich Chemie GmbH,
D-82024 Taufkirchen |
|-----------|---|---|

- | | | |
|-------------|--|----------------------|
| • Aprotinin | Trasylol [®] , Ch.B.: TN 371, MG 6200 Da,
1 Ampulle=200000 KIE/5mL
(KIE= Kallikrein-Inhibierungs-Einheit) | Bayer AG/ Leverkusen |
|-------------|--|----------------------|

- | | | |
|------------------|----------------|------------------|
| • Protaminsulfat | Ch.B.: 3018972 | Merck, Darmstadt |
|------------------|----------------|------------------|

- | | | |
|----------------------------|---|-------------------------------|
| • Pefabloc [®] FG | Fibrin-Polymerisationsinhibitor,
Lot.: 970916, MG 485,5 Da, chemische Formel:
H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH·AcOH | LOXO GmbH, D-69215 Dossenheim |
|----------------------------|---|-------------------------------|

- | | | |
|-----------------------|--|---|
| • Protac [®] | MG 39000 Da, 1,2 U/Fl., Ch.B.: 996583, 3 U/Fl.,
Lot.: 401323/113-01 | Haemochrom Diagnostica GmbH, D-45279 Essen
Loxo GmbH, D-69221 Dossenheim |
|-----------------------|--|---|

- | | | |
|------------------------------------|--------------|--|
| • Echis Carinatus
Schlangengift | Lot: 65H0657 | Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-89555 Steinheim |
|------------------------------------|--------------|--|

- | | | |
|-----------------|--|--------------------------|
| • Streptokinase | MG 47000 Da, Ch.B.: 9210291,
250000IE/Ampulle | Arzneimittelwerk Dresden |
|-----------------|--|--------------------------|

2.4. Chromogene Peptidsubstrate

- | | | |
|--------------------------------|--|---|
| • S-2238
(thrombinselektiv) | MG 625,6 Da, Lot.: N0502312, chemische Formel:
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA·2HCl | Haemochrom Diagnostica GmbH,
D-45279 Essen |
|--------------------------------|--|---|

- Th-1 (thrombinselektiv) MG 624,7 Da, Lot.: TH03, chemische Formel: $2\text{AcOH}\cdot\text{H-D-CHG-Ala-Arg-pNA}$ Immuno GmbH, D-6900 Heidelberg
- S-2765 (FXa-selektiv) MG 714,6 Da, Lot.:N0301920, chemische Formel: $\text{N-}\alpha\text{-D-Arg-Gly-Arg-pNA}\cdot 2\text{HCl}$ Haemochrom Diagnostica GmbH, D-45279 Essen
- FXa-1 (FXa-selektiv) MG 622,7 Da, Lot.:FX02, chemische Formel: $\text{AcOH}\cdot\text{CH}_3\text{OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA}$ Firma Immuno GmbH, D-6900 Heidelberg
- S-2366 (APC-selektiv) MG 539 Da, Lot.:N0691100, chemische Formel: $\text{Glu-Pro-Arg-pNA}\cdot\text{HCl}$ Haemochrom Diagnostica GmbH, D-45279 Essen
- PK-1 (kallikreinselektiv) MG 652,8 Da, Lot.:PK01, chemische Formel: $2\text{AcOH}\cdot\text{H-D-But-CHA-Arg-pNA}$ Firma Immuno GmbH, D-6900 Heidelberg

2.5. Chemikalien und weitere Reagenzien

- Bovines Serum Albumin (BSA) Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
- Cephalinsuspension aus einem Testkit zur Bestimmung der aPTT Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Essigsäure (CH_3COOH) Laborchemie, Apolda
- Imidazol Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
- Natriumazid (NaN_3) Sprengstoffwerk, Schönebeck
- Natriumchlorid (NaCl) Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Natriumhydroxid (NaOH) Klinikumsapotheke, Erfurt

- pH- Meter CG840 Schott-Geräte GmbH, Jena
- Pipettenspitzen 100 μ L, 1000 μ L Eppendorf GmbH, Hamburg
- Pipettierhilfe „Sarpette“ Saarestedt, Nürnberg
- Reinraumwerkbank Elektromat Dresden, Dresden
- Zentrifugenröhrchen aus Polystyren
17x100mm, 14mL Becton-Dickinson, Heidelberg

3. Methoden

3.1. Gerinnungsanalysen mit dem Koagulometer CL 4

Allgemeines Meßprinzip für Gerinnungs- und Lyseuntersuchungen

Untersuchungen mit dem Koagulometer CL 4 erlauben eine halbautomatisierte Messtechnik, bei welcher pro Messansatz bis zu 4 Proben gemessen werden können. Dazu befindet sich der Gerinnungsansatz in einer Rundküvette, in welcher eine Kugel vor dem Eintritt der Gerinnung durch ein von außen angelegtes und genau definiertes Magnetfeld an exakt vorgegebener Stelle läuft. Die Kugel rotiert dabei mit 125 U/min und sorgt so gleichzeitig für eine schonende Durchmischung der Probe. Setzt der Gerinnungsvorgang ein, wird die Kugel durch die sich bildenden Fibrinfasern mitgenommen und löst so in einem magnetischen Sensor, bedingt durch ihre Lageänderung, einen Impuls aus, der zur Anzeige der Gerinnungszeit führt.

Alle verwendeten Reagenzien wurden vorher in einem im Gerät integrierten Thermoblock auf 37 °C temperiert.

3.1.1. Thrombinzeitbestimmung im Plasma

Versuchsprinzip

Nach Zusatz einer definierten Menge Thrombin wird die Polymerisation des im Citratplasma enthaltenen Fibrinogens durch Abspaltung der Fibrinopeptide A und B ausgelöst (Kolde et al., 1992). Verringert man die „Menge“ Thrombin (z.B. durch eine Aktivitätsminderung des Thrombins), wird bei sonst gleichem Ansatz eine verlängerte Thrombinzeit (TZ) beobachtet.

Messansatz

100 µL Citratplasma wurden für 2 min bei 37 °C mit 100 µL der zu untersuchenden Prüflösungen (Lösungsmittel: Puffer 3) inkubiert und anschließend zum Auslösen des Gerinnungsvorganges mit 50 µL Thrombin (3NIH/mL) versetzt. Der Leerwert wurde mit 100 µL Puffer 3 anstelle der Prübsubstanz bestimmt.

Zur Ermittlung der optimalen Thrombinkonzentration wurde vorher eine Eichkurve mit verschiedenen Thrombinkonzentrationen erstellt. Als optimal gelten TZ zwischen 15-50 sec.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte durch die Berechnung der Thrombinzeitverlängerung in % gegenüber dem Leerwert in Abhängigkeit von der Prüfsubstanzkonzentration sowie durch die Ermittlung derjenigen Substanzkonzentration, die eine Verdopplung der Thrombinzeit bewirkte. Die Abhängigkeit der TZ in sec von der untersuchten Prüfsubstanzkonzentration wurde graphisch dargestellt.

3.1.2. Fibrinogengerinnungszeit im plasmafreien System

3.1.2.1. Abhängigkeit von der Konzentration der Prüfsubstanzen

Versuchsprinzip

Das Versuchsprinzip entspricht dem der o.g. TZ-Bestimmung im Plasma mit dem Unterschied, dass bei diesem Versuchsaufbau mit isoliertem Fibrinogen gearbeitet wurde. Eine Abhängigkeit des Reaktionsmechanismus vom Vorhandensein an ATIII kann so bestimmt werden.

Messansatz

Ein Gemisch aus 100 µL Fibrinogen-Lösung und 100 µL abgestufter Konzentrationen an Prüflösung wurden nach 2-minütiger Inkubation bei 37 °C mit 50 µL Thrombin (3 NIH/mL) zum Auslösen des Gerinnungsvorganges versetzt. Der Kontrollansatz (ohne Prüfsubstanz) wurde mit Puffer 3 bestimmt. Zur Ermittlung der zu verwendenden Thrombinkonzentration wurde auch hier eine Eichkurve erstellt.

Auswertung

Aus den ermittelten Messwerten wurde zum einen die Verlängerung der GZ gegenüber dem Leerwert in % und zum anderen diejenige Konzentration, die eine Verdopplung der GZ bewirkt, berechnet. Auch hier wurde die Abhängigkeit der GZ in sec von der untersuchten Prüfsubstanzkonzentration graphisch dargestellt.

Setzt man die verwendeten 3 NIH/mL Thrombin gleich 100 % Thrombinaktivität (entspricht 100 % Aktivität) und rechnet nach diesem Schema alle x-Werte der Eichkurve (x-Achse: Aktivität von FIIa in %, y-Achse: Gerinnungszeiten in sec) von NIH/mL Thrombin in % Thrombinaktivität um, lässt sich mit Hilfe der daraus ermittelbaren Gleichung die (Rest-)Aktivität von Thrombin nach Inkubation mit den Prüfsubstanzen anhand der Gerinnungszeiten berechnen.

3.1.2.2. Antagonisierung mit Protaminsulfat

Versuchsprinzip

Eine mögliche Anti-Thrombinwirkung kann, wie im Fall von Heparin, durch Neutralisierung der v.a. negativ geladenen funktionellen Gruppen der Prüfsubstanzen durch die vorwiegend positiv geladenen Oberflächengruppen des Protaminsulfates aufgehoben werden (Racanelli et al., 1985).

Messansatz

50 µL Protaminsulfatlösung im Bereich von 0,01-80 µg/mL, 100 µL einer 1%igen Fibrinogenlösung und 50 µL Prüfsubstanzlösung in Puffer 3 wurden für 2 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 50 µL FIIa (3 NIH/mL) wurde der Gerinnungsvorgang ausgelöst.

Aus dem Versuch „Bestimmung der Fibrinogengerinnungszeit“ wurde diejenige Konzentration an Prüfsubstanz ausgewählt, bei deren Zusatz eine Thrombinzeitverlängerung stattfindet, die es ermöglicht, eine Verkürzung derselben bei Zusatz von Protaminsulfat zu erkennen. Die ausgewählten Thrombinzeitverlängerungen lagen zwischen 200 und 500%. Um eine Eigenwirkung von Protaminsulfat auf den Reaktionsansatz auszuschließen, wurde vorher eine Eichreihe mit steigenden Konzentrationen des Antidots erstellt.

Auswertung

Es wurde diejenige Konzentration an Protaminsulfat bestimmt, die nötig ist, um die antikoagulierende Wirkung der Testsubstanzen aufzuheben, d.h. eine Gerinnungszeit entsprechend dem Leerwert (Puffer 3 anstelle der Prüfsubstanz) zu erhalten.

3.1.3. Plasmatische Gerinnungszeit nach Aktivierung der Gerinnung über den extrinsischen Gerinnungsweg

Versuchsprinzip

Der rTF besitzt eine spezifische Cofaktor Funktion für FVIIa. In Gegenwart von FVIIa, PL und Ca^{2+} löst er im Plasma einen Gerinnungsvorgang aus. Die beobachtete Gerinnungszeit verhält sich umgekehrt proportional zur FVIIa-Aktivität der Probe, d.h. als Folge einer Verringerung der FVIIa-Aktivität werden längere Gerinnungszeiten gemessen (Morrissey et al., 1993).

Messansatz

25 µL FVIIa (82,5 mU/mL, RL4), 12,5 µL verschiedener Konzentrationen an Untersuchungslösung, 25 µL PL/rTF (RL3) und 25 µL FVII-Mangelplasma (RL2) wurden 3 min bei 37°C inkubiert. Nach Auslösung der Gerinnung durch Zusatz von 25 µL CaCl₂ (0,025 mol/L) wurde die Gerinnungszeit gemessen.

Zur Durchführung dieses Versuches wurde der Testkit Staclot® VIIa-rTF verwendet.

Auswertung

Aus den Messwerten wurde die Verlängerung der Gerinnungszeit gegenüber dem Leerwert (R 1 anstelle von Untersuchungslösung) in % berechnet. Mit Hilfe einer Eichkurve, in der die Abhängigkeit der Gerinnungszeiten von der „Menge“ vorhandenen FVIIa dargestellt wurde, konnte weiterhin anhand der gemessenen Gerinnungszeiten die (Rest)-Aktivität von FVIIa nach Inkubation mit den Testsubstanzen und der IC₅₀-Wert berechnet werden.

3.1.4. Antifibrinolytische Wirkung im Lysetest

Versuchsprinzip

Streptokinase (SK), ein indirekt wirkendes Fibrinolytikum, kann in einem bestimmten Konzentrationsbereich zuvor künstlich hergestellte Plasmagerinnsel auflösen (Markwardt et al., 1972). Durch Zusatz unserer Prüfsubstanzen sollte eine mögliche antifibrinolytische Wirkung derselben nachgewiesen werden.

Streptokinaseaktivitätskurve

Zu Beginn der Messungen wurde eine SK-Aktivitätskurve aufgestellt, um die zu verwendende Konzentration an SK zu bestimmen. Dies ist notwendig, da die gebildete Plasminmenge in besonderem Maße vom Mengenverhältnis SK : Plasminogen abhängig ist (Markwardt et al., 1972).

Messansatz

In ein Reaktionsröhrchen werden bei 37 °C nacheinander 100 µL Citratplasma, 50 µL verschiedener Konzentrationen an Testsubstanz in Puffer 1, 50 µL SK (1000 IE/mL) und 50 µL FIIa (5-100IE/mL) pipettiert. Es wurde die Zeit von der Thrombinzugabe bis zum Auflösen des zunächst entstehenden Gerinnsels gemessen. Eine antifibrinolytische Wirkung wird durch eine deutliche Verlängerung dieser Lysezeit erkennbar. Der Leerwert wurde mit Puffer 1 bestimmt.

Auswertung

Zum einen wurde die Verlängerung der Lysezeit gegenüber dem Leerwert in % und zum anderen diejenige Konzentration, die eine Verdopplung der Lysezeit bewirkt, berechnet.

3.2. Proteaseaktivitätsmessung mit chromogenen Peptidsubstraten

Chromogene Peptidsubstrate

Um 1970 begann man mit der Herstellung synthetischer Substrate zur Messung von Enzymaktivitäten. Diese sollten durch den Nachbau der Aminosäuresequenz eine ähnliche Selektivität wie die natürlichen Substrate eines Enzyms besitzen.

In Anlehnung an diese natürlichen Strukturvorbilder, durch stufenweise, racemisierungsfreie Synthese gewonnene und über eine Amidbindung mit einer chromogenen Gruppe versehene Peptidketten sind hochempfindliche, selektive Kleinmodelle (3-5 Aminosäuren) von natürlichen Proteasesubstraten (Svendsen et al., 1977).

Allgemeines Bestimmungsprinzip

Die chromogene Gruppe wird relativ spezifisch durch Proteasen abgespalten und kann als Substratumsatz anschließend photometrisch gemessen werden. Ein dabei häufig verwendetes Chromophor ist das p-Nitroanilin (pNA), dessen gelbe Farbe bei 405 nm messbar ist (Witt et al., 1991). Die Wellenlänge von 405 nm erwies sich als besonders geeignet, da in diesem Wellenlängenbereich das intakte Substrat keine Eigenabsorption aufweist, pNA jedoch stark absorbiert (Abb. 1).

Die amidolytische Abspaltung der chromogenen Gruppe verläuft dabei parallel zur proteolytischen Aktivität der betreffenden Enzyme. Da die Freisetzung des gefärbten Reaktionsproduktes direkt proportional zur Enzymaktivität ist, bieten künstliche, chromogene Substrate zuverlässige und einfache Möglichkeiten zur Aktivitätsbestimmung in Systemen, die Proteasen enthalten oder in welchen Proteasen entstehen oder verbraucht werden. Inhibitoren können nach dem Vorlegen bekannter Enzymaktivitäten ebenso mit dieser Methode bestimmt werden wie Zymogene nach vorheriger Aktivierung (Svendsen et al., 1977).

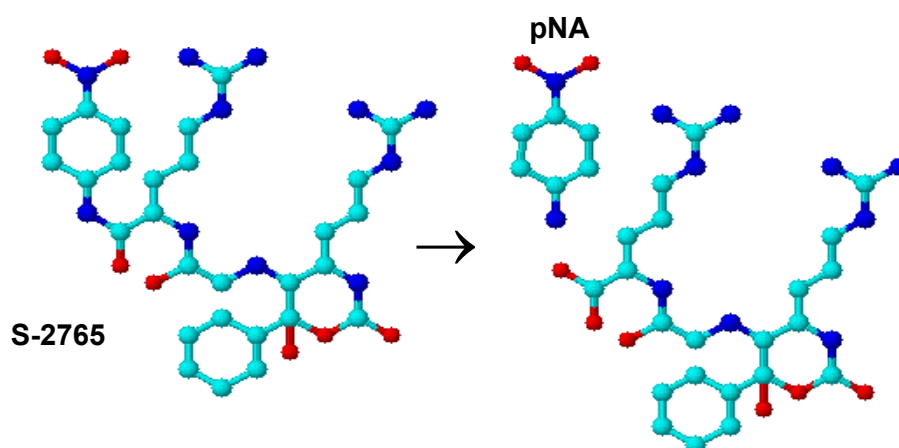


Abb. 1: Spaltung des chromogenen Substrates S-2765 (C = hellblau, N = dunkelblau, O = rot)

Der gemessene Substratumsatz wurde mittels selbst erstellter Eichkurven in Enzymaktivitäten umgerechnet. Die IC_{50} -Werte, d.h. die Werte oder die Konzentrationen, bei denen eine 50%ige Hemmung auftritt (Halbmaximale Hemmkonzentration), wurden berechnet.

Alle Versuche wurden als Endpunktbestimmung in Mikrotiterplatten nach Abstoppen der Reaktion mit Essigsäure durchgeführt. Der Bezugswert für 100% Aktivität (Leerwert) wurde durch Versetzen des Ansatzes mit dem jeweiligen Lösungsmittel anstelle der Testsubstanzen erhalten. Der Einfluss der Testsubstanzen wurde in allen Versuchen konzentrationsabhängig bestimmt.

Einfluss der Substratkonzentration

Die enzymatische Hydrolyse der Substrate muss dem Michaelis-Menten Gesetz folgen. Die bei der Hydrolyse entstehenden Produkte dürfen demnach weder eine aktivierende noch eine hemmende Wirkung auf die zu bestimmende Protease ausüben. Außerdem ist eine ausreichend hohe Substratkonzentration erforderlich.

Aus diesem Grund wurde zu Beginn der Versuche für jedes Enzym/Substrat System eine zeitabhängige Extinktionsmessung durchgeführt. Ergibt sich aus der graphischen Darstellung eine Gerade, d.h. wird das Substrat mit konstanter Geschwindigkeit gespalten, so folgt die Substrathydrolyse o.g. Gesetz (Svendsen et al., 1977). Die untersuchte Substratkonzentration konnte dann für die folgenden Versuche verwendet werden. Die Darstellung wird hier nur exemplarisch am Faktor Xa/S-2765 System gezeigt (Abb.2).

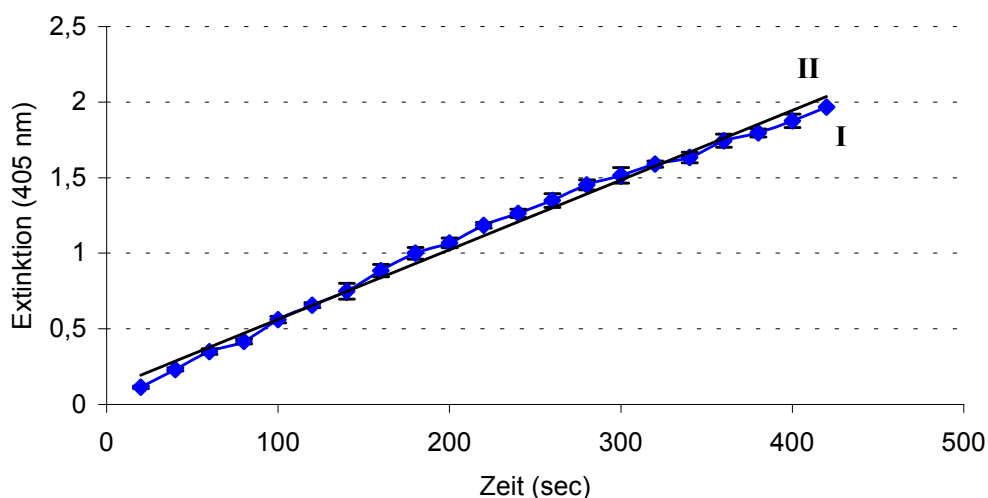


Abb. 2: (I) Verlauf der enzymatischen Spaltung von S-2765 (2mmolar) durch Faktor Xa (0,355 IU/mL), (II) Trendlinie; Testbedingungen: bidest. Wasser, 37°C,

Der Verlauf der enzymatischen Spaltung sollte möglichst über einen großen Extinktionsbereich der initialen Hydrolysegeschwindigkeit entsprechen, denn nur dann ist eine genaue Enzymbestimmung durch Abstoppen der Reaktion im linearen Bereich möglich.

3.2.1. Anti-Thrombin Aktivität

Versuchsprinzip

Die Aktivität von isoliertem Thrombin kann durch Spaltung des chromogenen Substrates S-2388 gemessen werden. Eine durch unsere Testsubstanzen allein oder in Verbindung mit ATIII verursachte geringere Aktivität von FIIa ergibt niedrigere Absorptionsmesswerte (< 100% Aktivität).

Messansatz ohne ATIII

50 μ L FIIa (3NIH/mL) und 50 μ L Testsubstanzlösung wurden für 3 min bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz von 50 μ L S-2388 (1 mmol/L) und einer Inkubationszeit von 7 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zusatz von 20 %iger Essigsäure abgestoppt und der Ansatz bei 405 nm gemessen.

Messansatz mit ATIII

In eine Mikrotiterplatte wurden hintereinander 50 μ L ATIII (0,66 ATU/mL) und 50 μ L Testsubstanzlösung pipettiert und 3 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 50 μ L

FIIa (3 NIH/mL), einer weiteren Inkubationszeit von 3 min bei 37 °C, wurde der Ansatz mit 50 µL S-2388 (1 mmol/L) versetzt und für 7 min bei 37 °C temperiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zusatz von 20%iger Essigsäure abgestoppt und der Ansatz bei 405 nm gemessen.

3.2.2. Anti-Xa Aktivität

Versuchsprinzip

Mit Hilfe des chromogenen Substrates S-2765 lässt sich die Aktivität des isolierten Faktors Xa bestimmen. Auch in diesem Versuch werden niedrigere Absorptionsmesswerte (<100% Aktivität) erhalten, wenn die Testsubstanzen allein oder in Verbindung mit ATIII die Aktivität von FIIa verringern.

Messansatz ohne ATIII

Nach 3minütiger Inkubation von 50 µL FXa (0,355 IU/mL) mit 50 µL Testsubstanzlösung bei 37 °C wurde der Ansatz mit 50 µL S-2765 (2 mmol/L) versetzt und für weitere 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 50%iger Essigsäure abgestoppt und der Ansatz photometrisch gemessen.

Messansatz mit ATIII

Um zu testen, ob eine Wechselwirkung zwischen unseren Testsubstanzen und ATIII, ähnlich der Reaktion ATIII-Heparin, stattfindet, wurden 50 µL ATIII (0,66 ATU/mL) mit 50 µL Testsubstanzlösung für 3 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 50 µL FXa (0,355 IU/mL) zugefügt. Die (Rest-) Aktivität des FXa wurde nach 3 min bei 37 °C durch Versetzen des Gemisches mit 50 µL S-2765 (2 mmol/L) für weitere 3 min/37 °C und abstoppen der Reaktion mit 20%iger Essigsäure bestimmt.

3.2.3. Untersuchungen am plasmafreien Protein C- Antikoagulationssystem

3.2.3.1. Aktivierte Protein C-Aktivität

Versuchsprinzip

Die Aktivität des isolierten Aktivierten Protein C (APC) kann durch Spaltung des chromogenen Substrates S-2366 gemessen werden. Eine durch unsere Testsubstanzen

verursachte geringere Aktivität von FIIa ergibt Absorptionsmesswerte, welche einer Aktivität kleiner 100% entsprechen.

Messansatz

In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden hintereinander 25 µL APC (2 µg/mL) und 50 µL an Testsubstanzlösung pipettiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zusatz von 50 µL S-2366 (1,55 mmol/L) und einer 40-minütigen Inkubation bei 37 °C wird dem Ansatz 50 µL 20%ige Essigsäure zugesetzt. Die Absorption bei 405 nm wurde gemessen.

3.2.3.2. Beeinflussung der Protac[®]-Aktivierung von Protein C

Versuchsprinzip

Isoliertes Protein C (PC) kann durch Protac[®], einen spezifischen Aktivator aus dem Gift der Kupferkopfschlange (*Agkistrodon contortrix contortrix*), direkt aktiviert werden. Die Aktivität des entstehenden APC kann mit dem chromogenen Substrat S-2366 (1,55 mmol/L) nachgewiesen werden. Setzt man dem Aktivierungsansatz unsere Testsubstanzen zu, so kann eine mögliche Beeinflussung des Aktivierungsvorganges von PC durch Selbige messbar gemacht werden.

Messansatz

25 µL PC (4 µg/mL), 25 µL Testsubstanzlösung, 50 µL Protac[®] (0,25 U/mL) und 50 µL S-2366 (1,55 mmol/mL) wurden 90 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zusatz von 50 µL 20%iger Essigsäure wurde der Ansatz photometrisch vermessen.

Als Bezugswert für eine 100%ige Aktivierung von PC galt die nach 90 min erzielte Absorption ohne Zusatz von Testsubstanzen.

Aktivierung von Protein C

Um auszuschließen, dass die Testsubstanzen selbst aktivierende Eigenschaften für PC besitzen, wurde ein Vorversuch durchgeführt, in welchem 25 µL PC (4 µg/mL) für 10 min bei 37 °C mit 50 µL Testsubstanzlösung versetzt wurden. Der Ansatz wurde nach Zugabe von 50 µL S-2366 (1,55 mmol/L) und weiteren 70 min Inkubation bei 37 °C mit 50 µL 20%iger Essigsäure abgestoppt.

3.2.4. Untersuchungen am Protein C- Antikoagulationssystem in Humancitratplasma

3.2.4.1. Besonderheiten des Untersuchungssystems Citratplasma

Bei dieser Methode der Aktivitätsmessung von Enzymen im Plasma als Mehrkomponentensystem lassen sich die Messergebnisse nur in dem Fall eindeutig auswerten, wo nur ein Enzym auf ein chromogenes Substrat wirkt. Voraussetzung dafür ist der Einsatz von Aktivatoren, die ebenfalls eine hohe Spezifität für nur ein Zymogen besitzen. Doch selbst in diesem Idealfall, in dem die maximale Umsatzgeschwindigkeit dank einer hohen Substratkonzentration gewährleistet ist, können andere Einflüsse wie Temperatur- oder pH-Schwankungen und/oder aufkommende Produkthemmung der Substratspaltprodukte die Messergebnisse verfälschen.

3.2.4.2. Aktivierte Protein C- Aktivität

Versuchsprinzip

Durch Einsatz von Protac[®], einem hochspezifischen und schnell wirkenden PC- Aktivator ist es möglich, eine spezifische Aktivierung von PC zu APC im Citratplasma durchzuführen. Die Aktivität des gebildeten APC kann dann mit dem chromogenen Substrat S-2366 gemessen werden. Ein hemmender Einfluss der Testsubstanzen auf die APC- Aktivität wird durch eine geringere Substrathydrolyse sichtbar.

Messansatz

25 µL einer Plasmaverdünnung (100 µL Plasma und 300 µL bidest. Wasser) wurden zur Aktivierung von PC für 10 min bei 37°C mit 50 µL Protac[®] (0,11 U/mL) inkubiert. Dem Ansatz wurden danach 25 µL Testsubstanzlösung zugesetzt und nach einer weiteren Inkubation von 10 min bei 37 °C wurde zur Messung der APC- Aktivität 50 µL S-2366 (1,55 mmol/L) hinzugefügt. Die Reaktion wurde nach 10 min/37°C mit 20%iger Essigsäure abgestoppt.

Aktivierung von Protein C

Um auszuschließen, dass die Testsubstanzen selbst aktivierende Eigenschaften für PC besitzen und deshalb auch ohne APC eine Substrathydrolyse stattfindet, wurden Vorversuche durchgeführt (siehe 3.2.5.). Ein positives Ergebnis muss bei der Zu-

sammensetzung der Blank-Werte und bei der Versuchsauswertung, auch im Versuch „Hemmung der Protac[®]-Aktivierung von Protein C im Plasma“, berücksichtigt werden.

3.2.4.3. Hemmung der Protac[®]-Aktivierung von Protein C

Versuchsprinzip

Setzt man dem Aktivierungsansatz, bestehend aus PC-Aktivator und Plasma als PC-Quelle, die Testsubstanzen zu, kann eine mögliche Beeinflussung des Aktivierungsvorganges von PC durch Selbige messbar gemacht werden.

Messansatz

25 µL einer Plasmaverdünnung (100 µL Plasma und 300 µL bidest. Wasser) und 25 µL Testsubstanzlösung werden 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 50 µL chromogenes Substrat S-2366 (1,55 mmolar) und 50 µL Protac[®] (0,11 U/mL) hinzugegeben. Der Ansatz wird 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 20%iger Essigsäure erfolgt das photometrische Messen der Mikrotiterplatte bei 405 nm.

3.2.5. Unspezifische amidolytische Aktivität gegenüber chromogenen Substraten nach Inkubation von Plasma mit den Prüfsubstanzen

Nach Inkubation des Mehrkomponentensystems „Plasma“ mit unseren Testsubstanzen und Zusatz des für APC selektiven chromogenen Substrates S-2366, wurde eine, durch die verschiedenen Testsubstanzen bewirkte, unterschiedlich stark ausgeprägte amidolytische Aktivität gegenüber S-2366 festgestellt, die anfangs zu der Annahme führte, dass eine Aktivierung von PC stattfand. Es wurden im Folgenden mehrere Versuche durchgeführt, die entweder Aufschluss darüber bringen sollten, ob es sich tatsächlich um die Bildung von APC handelt oder die Ansätze dafür liefern, welcher Herkunft die beobachtete amidolytische Aktivität sein könnte.

3.2.5.1. Abhängigkeit von der Temperatur

Liegt einer Reaktion ein *enzymatischer* Vorgang zu Grunde, dann steigt die Reaktionsgeschwindigkeit ähnlich wie bei chemischen Reaktionen mit der Temperatur (Lasch et al., 1987). Mit dem Einsetzen der thermischen Denaturierung des Enzymes, geht diese

wieder gegen Null. Aus diesem Grund wurden für 10 min 25 µL einer Plasmaverdünnung (100 µL Plasma und 300 µL bidest. Wasser) und 25 µL Testsubstanzlösung inkubiert. Anschließend wurden 50 µL bidest. Wasser hinzugefügt und für weitere 10 min inkubiert. Nach Zusatz von 50 µL S-2366 (1,55 mmol/L), 10 min Inkubationszeit wurden dem Ansatz 50 µL 20%iger Essigsäure zugegeben.

Dieser Versuch wurde bei 4 °C und bei 37 °C mit je einer Substanzkonzentration durchgeführt.

3.2.5.2. Spezifität von APC und Thrombin bezüglich verschiedener chromogener Substrate im Plasma

Die Spezifität ist eine Eigenschaft des Enzyms und beschreibt Einschränkungen bei der Spaltung unterschiedlicher Substrate. Ein völlig spezifisches Enzym spaltet demnach nur ein ganz bestimmtes Substrat. Sie ist abhängig vom Untersuchungsmedium und den jeweiligen Versuchsbedingungen.

Die Aktivität von APC, nach Aktivierung von PC mit Protac[®], und die Aktivität von Thrombin, nach Aktivierung des Prothrombins mit Ecarin, wurde mit verschiedenen chromogenen Substraten gemessen.

Als chromogene Substrate wurden dabei S-2366, S-Th, S-Xa und S-PK verwendet.

3.2.5.3. Bestimmung der amidolytischen Aktivität im Plasma mit verschiedenen chromogenen Substraten

Da mit dem chromogenen Substrat S-2366 allein eine Unterscheidung, um welches Aktivierungsprodukt es sich handelt, nicht möglich ist, da sowohl APC als auch FIIa bestimmt werden können, wurden zur weiteren Aufklärung die im Punkt 3.2.5.1.- *Abhängigkeit von der Temperatur* beschriebenen Versuche im Plasma mit verschiedenen chromogenen Substraten wiederholt.

Bei den chromogenen Substraten handelt es sich um: S-Xa, S-PK, S-Th und S-2366. Als Testsubstanzen wurden PPS und KOP 409/85 in je einer Konzentration ausgewählt.

Da bei den beschriebenen Versuchen eine starke amidolytische Aktivität auch gegenüber S-Th auftrat, wurden mehrere Versuche zur Aktivierung von Prothrombin durchgeführt (siehe Punkt: 3.2.6.).

3.2.5.4. Untersuchung in PC-Mangelplasma

Ausgehend von der Annahme, dass eine Aktivierung von PC im Plasma stattfindet, wurden die im Punkt 3.2.5.1.- *Abhängigkeit von der Temperatur* beschriebenen Versuche in PC- Mangelplasma durchgeführt. Eine nachweisbare amidolytische Aktivität würde eine alleinige Aktivierung von PC im Plasma ausschließen.

3.2.5.5. Einfluss verschiedener Inhibitoren auf das Aktivierungsprodukt

Enzyme, die in Enzym-Inhibitor-Komplexen gebunden werden, verlieren im allgemeinen ihre enzymatische Aktivität gegenüber ihren physiologischen Substraten. Dies gilt für viele Inhibitoren auch in Bezug auf die chromogenen Substrate. Der Zusatz von speziellen Enzymhemmern lässt sich ausnutzen, um selektiv und vollständig die Wirkung von Enzymen in einem Reaktionsansatz zu hemmen. Außerdem beweist das Verschwinden eines Signales, dass ein spezielles Enzym vor der Gabe des spezifischen Inhibitors aktiv war.

Wir setzten den im Punkt 3.2.5.1.- *Abhängigkeit von der Temperatur* beschriebenen Ansätzen Hirudin als hochspezifischen Thrombininhibitor und Aprotinin als Inhibitor für PK, APC und Plasmin zu.

3.2.6. Aktivierung von Prothrombin im isolierten System

3.2.6.1. ohne Zusatz von Phospholipiden

Einem Ansatz bestehend aus 25 µL Testsubstanzlösung, 25 µL bidest. Wasser und 50 µL FII (0,01%) wurden nach 20-minütiger Inkubation bei 37 °C 50 µL Th-1 (1mmol) zugesetzt. Nach weitere Inkubation über 10 min bei 37 °C wurden 50 µL Essigsäure (20%) als Stoppreagenz zugegeben.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Aktivierungsvorganges vom Vorhandensein von Calciumionen wurde der FII (a) in Puffer 2 und (b) in Puffer 3 gelöst.

3.2.6.2. unter Zusatz einer Cephalinsuspension

Dem unter 3.2.3.1. beschriebenen Ansatz wurden anstelle von 25 µL bidest. Wasser nur 12,5 µL desselben und 12,5 µL einer fertig bezogenen Cephalinsuspension zugesetzt.

3.3. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Messdaten wurde das Programm Microsoft Excel (Version 97) verwendet.

Für alle ermittelten Messwerte wurden die arithmetischen Mittelwerte \bar{x} und die Standardabweichung s berechnet. Die Mittelwerte setzen sich aus 3 voneinander unabhängigen Messreihen, die in dreifacher Ausfertigung durchgeführt wurden, zusammen.

Zur Berechnung der IC_{50} -Werte wurde die Trendlinie mit der zugrundeliegenden Formel aus der halblogarithmischen Darstellung für jede der drei unabhängigen Messreihen ermittelt. Es wurde jeweils die Konzentration „ x “ berechnet, bei welcher eine 50%ige Hemmung „ y “ stattfindet. Aus diesen drei Werten wurde der Mittelwert und dessen Konfidenzgrenzen bestimmt.

Die einzelnen Ergebnisse wurden statistischen Tests unterzogen, um zu entscheiden, ob die aus den Messwerten berechneten statistischen Kenngrößen sich von denen einer Grundgesamtheit nur zufällig oder aber systematisch unterscheiden.

Dabei wurden als erstes im „t-Test“ der Mittelwert mit dem einer Grundgesamtheit verglichen. Traten hier keine signifikanten Unterschiede auf, d.h. es lag kein systematischer Fehler vor, wurden anschließend im „F-Test“ (zufällige Fehler) die Standardabweichungen (Stichprobenstreuungen) verglichen. Dieser Test erlaubt es zu entscheiden, ob der zufällige Fehler signifikant größer oder kleiner ist als vorgeschrieben (Bernhardt, 1990). Bei den durchgeführten statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p = 0,05$) zu Grunde gelegt.

4. Ergebnisse

Alle im Folgenden angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die tatsächlichen Konzentrationen im Testansatz.

4.1. Einfluss auf die Thrombinzeit im Plasma

4.1.1. Natürlich vorkommende Huminsäuren

Der Einfluss von **NaHS I-IV/80** auf die Thrombinzeit (TZ) wurde im Konzentrationsbereich von 0,1- 200 µg/mL untersucht. Wie Abbildung 3 zu entnehmen ist, stiegen mit zunehmender Konzentration an NaHS I-IV/80 die Gerinnungszeiten (GZ) allmählich an. Bei 400 µg/mL lag die TZ über 600 sec. Eine Konzentration von 35 µg/mL bewirkte eine Verdopplung der TZ

(Leerwert (LW) $43,6 \pm 3,1$ sec).

Die **Aldrich HS** zeigte im Konzentrationsbereich von 0,1- 50 µg/mL eine allmähliche Verlängerung der TZ. Der Zusatz von 200 µg/mL bewirkte eine GZ, die über 600 sec lag. Eine 100%ige Steigerung, bezogen auf einen Leerwert von $47,8 \pm 1,1$ sec, wurde mit einer Konzentration von 19,5 µg/mL erreicht (Abb. 3).

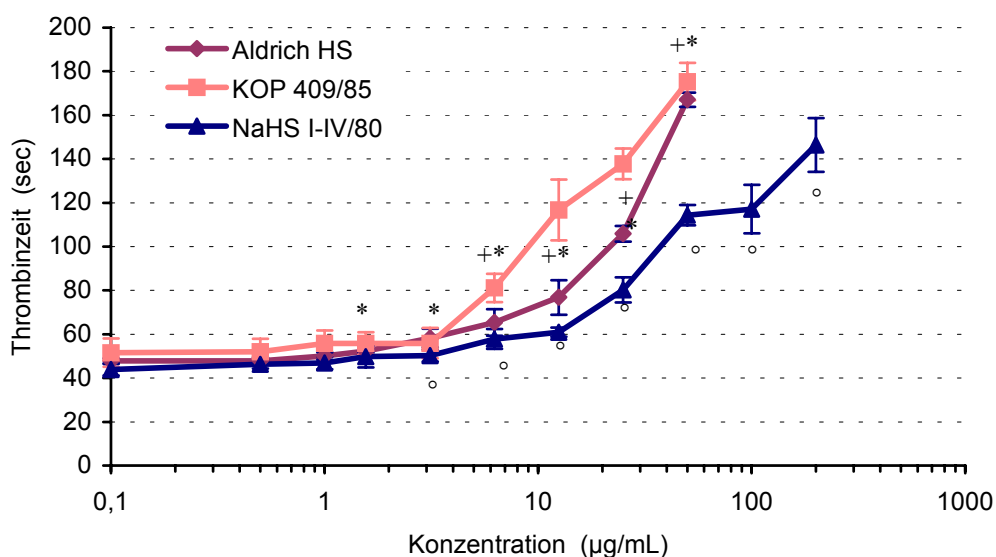


Abb. 3: Einfluss von NaHS I-IV/80 (°), Aldrich HS (*) und KOP 409/85 (+) auf die Thrombin-Humancitratplasma-Reaktion (n = 4)

°; *; + mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

4.1.2. Synthetische Huminsäure-ähnliche Polymere

Alle untersuchten synthetischen Huminsäure-ähnlichen Polymere bewirkten konzentrationsabhängig eine Verlängerung der TZ.

Als etwas stärker wirksam im Vergleich zu den natürlichen HS erwies sich **KOP 409/85**. Eine Verdopplung der TZ wurde hier schon mit 10,7 µg/mL erreicht.

Wie aus der in Abbildung 3 gezeigten Konzentrations-Zeit-Kurve zu entnehmen ist, erfolgte auch hier ein allmählicher Anstieg der GZ. Eine Konzentration von 100 µg/mL bewirkte GZ größer als 600 sec.

Eine deutliche Abhängigkeit der TZ-Verlängerung von der Struktur der untersuchten Substanzen ist am Beispiel der Melanoidine Typ M1 und M42 zu erkennen.

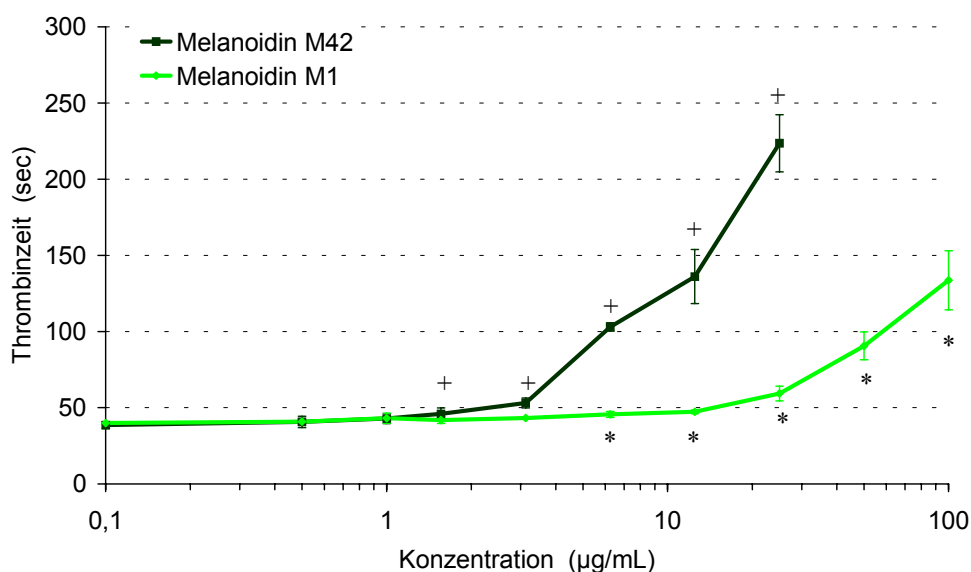


Abb. 4: Einfluss der Melanoidine vom Typ M1 (*) und M42 (+) auf die Thrombin-Humancitratplasma-Reaktion ($n = 4$)

*;+ mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Während das mit einer sauren Aminosäure hergestellte **Melanoidin M42** schon bei 6,9 µg/mL eine 100%ige Steigerung der TZ (LW = $38,9 \pm 3$ sec) bewirkte, sind zum Erreichen des gleichen Effektes bei dem mit einer basischen Aminosäure hergestellten

Melanoidin M1, 44,0 µg/mL (LW = 39,9 ± 0,6 sec) nötig, was einer ca. 6,4fach höheren Konzentration entspricht.

Die TZ stiegen mit zunehmender M42-Konzentration zunächst allmählich an (bis 6,3 µg/mL) und nahmen dann (ab 12,5 µg/mL) sprunghaft zu (Abb. 4). Bei 25 µg/mL wurde eine TZ von 223,6 ± 18,8 sec erreicht. Diese entspricht einer Verlängerung um 475,2 ± 87,7% bezogen auf einen LW von 38,9 ± 3 sec. Verglichen mit der durch M1 verursachten Verlängerung der TZ um 48,4 ± 13,3 % bei der gleichen Konzentration (25 µg/mL) ergibt sich ein Unterschied von ca. 425%.

Ein allmählicher Anstieg der Konzentrations-Zeit-Kurve war über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich (0,1-100 µg/mL) mit dem Melanoidin M1 zu beobachten. Im Messbereich von 0,1-3,1 µg/mL bewirkte M1 keine Verlängerung der TZ. Mit 100 µg/mL wurde eine Verlängerung der TZ um 234,8 ± 34,7 % (LW = 39,9 ± 0,6 sec) erreicht. 200 µg/mL ergaben TZ größer 600 sec.

Ein Vergleich der Chargen **HS 5**, **HS 130** und **HS 136** ergab erstens, dass alle untersuchten Modellsubstanzen konzentrationsabhängig die TZ verlängern.

Im Messbereich von 0,1-1,75 µg/mL wurden zweitens keine signifikanten Verlängerungen der TZ gegenüber den jeweiligen LW erreicht. Auch der Kurvenverlauf der Konzentrations-Zeit-Kurven ist in allen drei Fällen, wenn auch mit verschiedenen Konzentrationen, ähnlich. Zu Beginn erfolgt ein allmählicher Anstieg, welcher ein Plateau erreicht. Mit zunehmender Konzentration erfolgt dann ein sprunghafter steiler Anstieg. Als am stärksten wirksam erwies sich die mit Glycin hergestellte Substanz HS 5. Mit ihr wurde schon bei einer Konzentration von 19,9 µg/mL eine Verdopplung der TZ (LW = 44,8 ± 2,3 sec) erreicht, während bei den ROS-Modellsubstanzen HS130 (LW = 40,7 ± 2,1 sec) und HS 136 (LW = 42,1 ± 2,2 sec) 76,9 µg/mL bzw. 103,7 µg/mL nötig waren. Auch hier zeigte sich beim Vergleich der Substanzen HS 130 und HS 136 die mit einer sauren Aminosäure hergestellte Substanz HS 130 als stärker wirksam.

Die höchsten messbaren Konzentrationen ergaben für HS 5 bei einer Konzentration von 75 µg/mL eine Verlängerung der TZ um 214,2 ± 4,2% und für HS 130 bei einer Konzentration von 100 µg/mL eine Verlängerung der TZ um 133 ± 10,5%. 150 µg/mL verlängerten die TZ bei HS 136 um 451,6 ± 40,4%. Höhere Konzentrationen der Substanzen ergaben jeweils TZ die größer als 600 sec waren (Abb. 5).

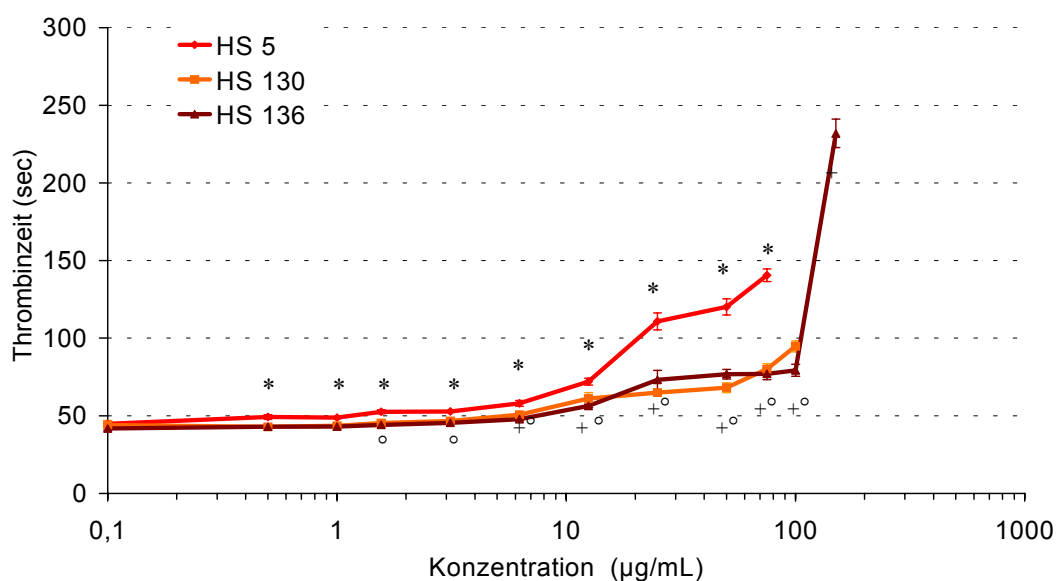


Abb. 5: Einfluss der ROS-Modellsubstanzen HS 5 (*), HS 130 (°) und HS 136 (+) auf die Thrombin-Humancitratplasma-Reaktion (n = 4)
 *;+;° mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

4.1.3. Sulfatierte Hyaluronsäurederivate, Vergleichssubstanzen

Die Messergebnisse aus der TZ-Bestimmung sind in Abbildung 6 gemeinsam mit denen der Vergleichssubstanzen dargestellt.

Die beiden sulfatierten Hyaluronsäurederivate sind von allen bisher vorgestellten Substanzen in Bezug auf die Verlängerung der TZ am stärksten wirksam. Ihre Wirkung kommt der von Heparin sehr nahe. Dies wird besonders deutlich durch den Vergleich der Werte zur Verdopplung der TZ, welche für Heparin 0,2 µg/mL, für HYA PS-10A 0,3 µg/mL und für HYA DS-48 0,4 µg/mL betragen.

Als geringfügig schwächer wirksam erwies sich PPS mit einem Wert von 2,2 µg/mL zur Verdopplung der TZ.

Der steilste Kurvenanstieg, mit einer Verlängerung der TZ um $75,3 \pm 9,8\%$, wird durch **Heparin** ab einer Konzentration von 0,1 µg/mL erreicht. Ebenfalls gekennzeichnet durch einen sehr steilen Anstieg ab einer Konzentration von 0,1 µg/mL (Verlängerung der TZ um $33 \pm 5,1\%$), ist der Kurvenverlauf von **HYA PS 10A**. Bei Erhöhung der Konzentration auf 0,5 µg/mL wurde hier die TZ um $854,8 \pm 52,2\%$ verlängert.

HYA DS 48 bewirkte im Bereich von 0,01-0,1 µg/mL zunächst eine allmähliche Verlängerung der TZ. Bei Erhöhung der Konzentration kam es dann zu einem steilen An-

stieg. Bei der höchsten messbaren Konzentration wurde eine TZ von $574,6 \pm 14,3$ sec (Verlängerung der TZ um $1312,4 \pm 59,2\%$) bestimmt.

PPS zeigt einen Kurvenverlauf mit einem über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich kontinuierlichen Anstieg der TZ. Es erfolgte eine Verlängerung der TZ von $69,7 \pm 13,4\%$ bei $1,6 \mu\text{g/mL}$ auf $215,1 \pm 30,5\%$ bei $3,1 \mu\text{g/mL}$.

Die vier in dieser Gruppe untersuchten Substanzen stellen damit die am stärksten wirksamen Verbindungen in Bezug auf die Verlängerung der TZ dar.

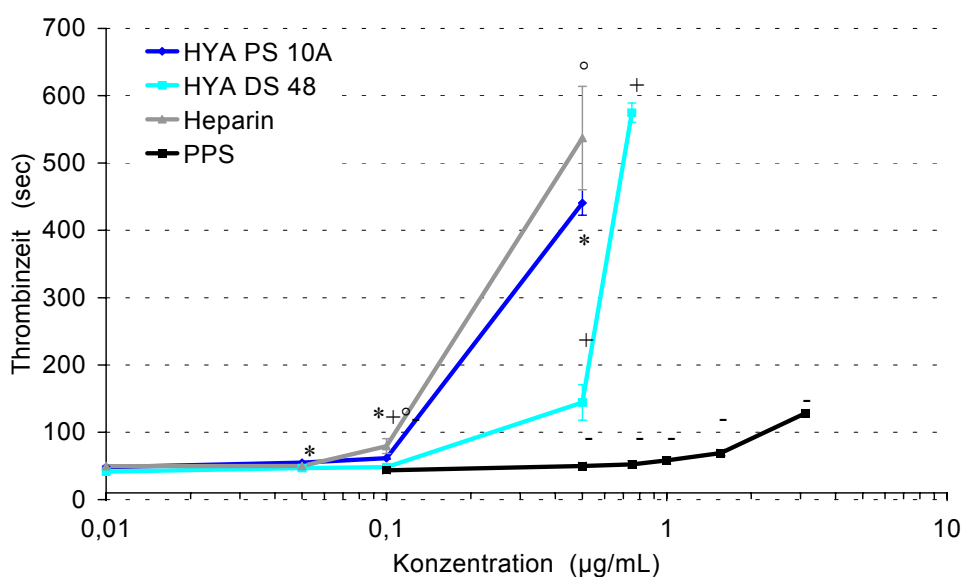


Abb. 6: Einfluss von HYA PS 10A (*), HYA DS 48 (+), Heparin (°) und PPS (-) auf die Thrombin-Humancitratplasma-Reaktion ($n = 4$)
 *;+;°;- mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

4.2. Einfluss auf die Fibrinogengerinnungszeit

4.2.1. Abhängigkeit von der Konzentration der Prüfsubstanzen

4.2.1.1. Natürlich vorkommende Huminsäuren

Der Einfluss von **NaHS I-IV/80** wurde im Konzentrationsbereich von $0,1$ - $130 \mu\text{g/mL}$ untersucht. Bis $50 \mu\text{g/mL}$ stieg die Konzentrations-Zeit-Kurve zunächst allmählich und ab $100 \mu\text{g/mL}$ steil an (Abb. 7). Eine Verdopplung der GZ fand bei $85,7 \mu\text{g/mL}$ statt. Bei der höchsten messbaren Konzentration von $130 \mu\text{g/mL}$ wurde die TZ um $1070 \pm 34\%$ verlängert. Dies entspricht einer TZ von $472,1 \pm 18,8$ sec ($\text{LW} = 40,3 \pm 1,8$ sec).

Bei derselben Konzentration beträgt die Aktivität von FIIa noch $91,9 \pm 0,3\%$ (Abb.9). Eine 50%ige Hemmung von FIIa (IC_{50}) findet bei einer Konzentration von 76,3 (71,7-81,3) $\mu\text{g/mL}$ statt.

Bei der aus Braunkohle gewonnenen **Aldrich HS** ergab sich über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich (0,1-75 $\mu\text{g/mL}$) eine langsam ansteigende Verlängerung der GZ. Bei 75 $\mu\text{g/mL}$ wurde die GZ um $282,2 \pm 21,9 \%$ verlängert (Abb. 7). Dies entspricht einer FIIa-Aktivität von $24,6 \pm 2\%$ (Abb.8). Der IC_{50} -Wert wurde mit 19,9 (17,5-22,7) $\mu\text{g/mL}$ bestimmt.

Bei einer Konzentration von 28,9 $\mu\text{g/mL}$ findet eine Verdopplung der GZ statt.

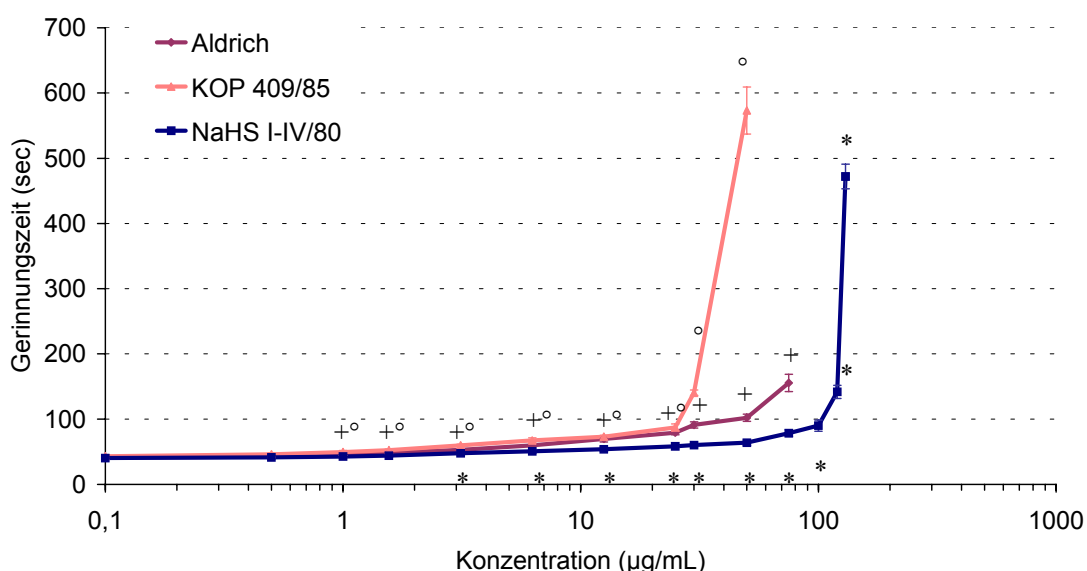


Abb. 7: Einfluss von NaHS I-IV/80 (*), Aldrich HS (+) und KOP 409/85 (°) auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion, ($n = 6$)
* ; + ; ° mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

4.2.1.2. Synthetische Huminsäure-ähnliche Polymere

Auch im isolierten System verlängerten alle untersuchten Substanzen konzentrationsabhängig die GZ.

Das untersuchte Kaafeesäureoxidationsprodukt **KOP 409/85** verursachte zunächst im Bereich von 0,1- 12,5 $\mu\text{g/mL}$ eine allmähliche Verlängerung der GZ. Ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$ stiegen die GZ sprunghaft an (Abb. 7). So fand bei der höchsten

untersuchbaren Konzentration (50 $\mu\text{g/mL}$) eine Hemmung von FIIa bis auf eine Restaktivität von $6,7 \pm 0,5 \%$ statt (Abb.8). Dies entspricht bei einer GZ von $573,2 \pm 36,1 \text{ sec}$ (LW = $43,1 \pm 2,6 \text{ sec}$) einer Verlängerung von $1265,3 \pm 112,9 \%$.

Eine 100%ige Verlängerung der GZ wurde durch $22,5 \mu\text{g/mL}$ KOP erreicht.

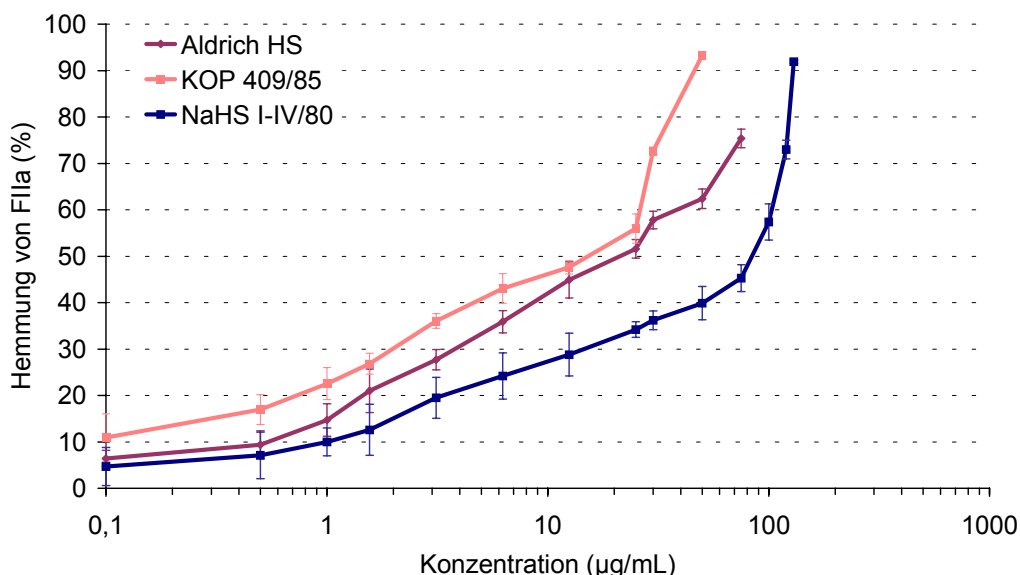


Abb. 8: Hemmung von FIIa durch NaHS I-IV/80, Aldrich HS und KOP 409/85 in % ($n = 6$)

Eine Abhängigkeit der Wirkungsintensität von der Struktur der untersuchten Substanzen konnte im Fall der Melanoidine auch im isolierten System beobachtet werden. Auch hier zeigte sich das mit einer sauren AS hergestellte **Melanoidin M42** beim Vergleich der Konzentrations-Zeit-Kurven als stärker wirksam (Abb. 9). Es wurde im untersuchten Konzentrationsbereich (1,56-25 $\mu\text{g/mL}$) eine kontinuierlich ansteigende Kurve erhalten. Bei der höchsten messbaren Konzentration wurde eine Verlängerung der GZ um $305,6 \pm 74,5 \%$ bewirkt. Dies entspricht einer Hemmung von FIIa mit $76,6 \pm 6,5\%$. Höhere Konzentrationen ergaben GZ über 600 sec. Der IC_{50} -Wert wurde mit 5,2 (3,3-8) $\mu\text{g/mL}$ bestimmt.

Als schwächer wirksam erwies sich das **Melanoidin M1**. Deutlich erkennbar wird dies beim Vergleich der Konzentration zur Verdopplung der GZ, die für das Melanoidin M1 106,4 $\mu\text{g/mL}$ und für das Melanoidin M42 nur 7 $\mu\text{g/mL}$ beträgt.

Nach der in Abbildung 9 gezeigten Konzentrations-Zeit-Kurve stieg die GZ im Bereich von 1,56-50 $\mu\text{g/mL}$ allmählich an. Ab 100 $\mu\text{g/mL}$ kam es dann zu einem steilen Anstieg. Bei 200 $\mu\text{g/mL}$ wurde der FIIa um $85,3 \pm 2,1\%$ in seiner Aktivität gehemmt. Die-

ser Wert entspricht einer Verlängerung der GZ um $578,5 \pm 103,1\%$. Der IC_{50} -Wert beträgt $101,6 (92-112,2) \mu\text{g/mL}$.

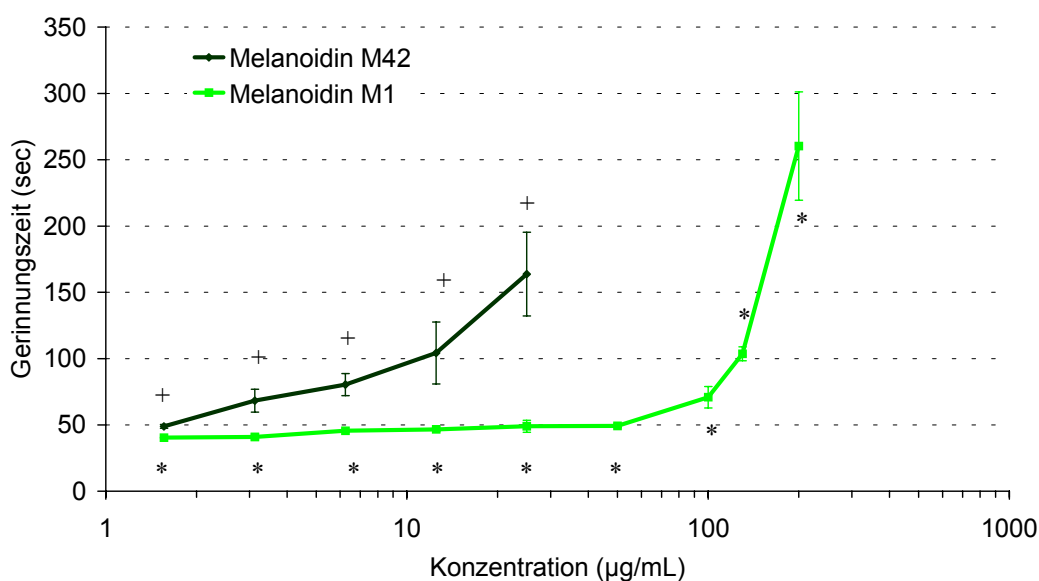


Abb. 9: Einfluss der Melanoidine vom Typ M42 (+) und Typ M1 (*) auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion (n= 6)

*;+ mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

In Abbildung 10 sind die Messergebnisse der ROS-Modellsubstanzen als Konzentrations-Zeit-Kurven graphisch dargestellt. Eine Gegenüberstellung der Konzentration zur Verdopplung der GZ ergibt für HS 5 mit $27,2 \mu\text{g/mL}$ und für HS 130 mit $24,9 \mu\text{g/mL}$ deutlich kleinere Werte als für HS 136 mit $135,6 \mu\text{g/mL}$.

Auch der Kurvenverlauf ist für **HS 5** und HS 130 ähnlich. Beide Substanzen bewirken bis zu einer Konzentration von $25 \mu\text{g/mL}$ einen allmählichen und ab 40 bzw. $30 \mu\text{g/mL}$ einen steilen Anstieg der GZ-Konzentrations-Kurve. Bei einer Konzentration von $50 \mu\text{g/mL}$ betrug die GZ für HS 5 $537,3 \pm 16,7 \text{ sec}$ (LW = $41,4 \pm 2,5 \text{ sec}$), was einer Verlängerung der GZ um $1202 \pm 142,2 \%$ entspricht. Bei dieser Konzentration hatte der FIIa eine Restaktivität von $7,1 \pm 0,2 \%$. Der IC_{50} -Wert betrug $26,2 (25,2-27,3) \mu\text{g/mL}$.

HS 130 verlängerte bei der höchsten messbaren Konzentration von $50 \mu\text{g/mL}$ die GZ um $1293,9 \pm 52,2 \%$. Bei einer GZ von $554,1 \pm 18 \text{ sec}$ (LW = $44,9 \pm 3,5 \text{ sec}$) entsprach dies einer Restaktivität FIIa von $6,9 \pm 0,2 \%$. Die Konzentration, bei der eine 50%ige Hemmung von FIIa stattfand, betrug $23,3 (22,8-23,8) \mu\text{g/mL}$. Verglichen mit dem IC_{50} -Wert von HS 136 mit $133,4 (132,7-134,3) \mu\text{g/mL}$ liegt dieser deutlich niedriger.

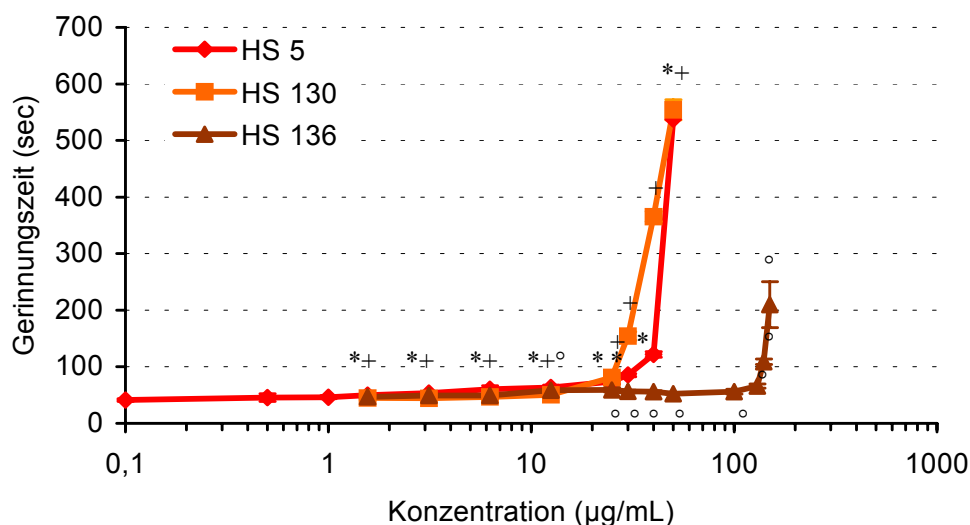


Abb. 10: Einfluss der ROS-Substanzen HS 5 (*), HS 130 (+) und HS 136 (°) auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion (n = 6)
 *;+;° mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Betrachtet man den Kurvenverlauf von **HS 136** in Abbildung 10, so ergibt sich auch hier im Bereich von 1,56-100 µg/mL eine allmähliche und ab einer Konzentration von 130 µg/mL steiler ansteigende Kurve. Bei 150 µg/mL betrug die GZ $209,5 \pm 40,6$ sec (LW = $46,7 \pm 2,8$ sec). Mit dieser Konzentration wurde der FIIa zu $81,7 \pm 4,1$ % gehemmt. Dieser Wert entspricht einer Verlängerung der GZ um $377,8 \pm 108,1$ %. Bei 200 µg/mL lag die GZ über 600 sec.

4.2.1.3. Sulfatierte Hyaluronsäurederivate, Vergleichssubstanzen

Beide sulfatierte Hyaluronsäurederivate, HYA DS 48 und HYA PS 10A, bewirkten auch im isolierten System schon bei sehr niedrigen Substanzkonzentrationen eine relativ lange GZ.

HYA PS 10A zeigte im Bereich von 0,1-0,5 µg/mL einen Anstieg in der GZ-Verlängerung von $91,0 \pm 9,9$ % auf $1089,4 \pm 133,3$ % (Abb. 11). Zuletzt genannter Wert entspricht einer GZ von $432 \pm 23,5$ sec (LW = $38,3 \pm 3,1$ sec). Eine 50%ige Hemmung des vorhandenen FIIa findet bei einer Konzentration von 0,11 (0,09-0,12) µg/mL statt. Dieser Wert entspricht hier derjenigen Konzentration, die eine Verdopplung der GZ verursacht. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 0,5 µg/mL wurde die Aktivität von FIIa auf $8,9 \pm 0,5$ % gesenkt.

Etwas schwächer wirksam im Vergleich zu HYA PS 10A ist das zweite untersuchte Hyaluronsäurederivat **HYA DS 48**. Die halbmaximale Hemmkonzentration beträgt 0,31 (0,28-0,35) $\mu\text{g}/\text{mL}$ und liegt damit ca. dreifach höher als bei HYA PS 10A. Im Konzentrations-Zeit-Diagramm ergibt sich ab einer Konzentration von 0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eine allmählich ansteigende Kurve mit einer GZ von $230,3 \pm 18,6$ sec. Bei Verdopplung dieser Konzentration lag die GZ über 600 sec. Mit 0,37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ liegt auch hier die IC_{50} (s.o.) nahe beim Konzentrationswert zur Verdopplung der GZ (Abb. 11).

Vergleicht man die Abbildung 6 und Abbildung 11 hinsichtlich Konzentration und Wirkung für die Substanzen PPS und Heparin miteinander, so erkennt man einen deutlich höheren Substanzbedarf hinsichtlich der GZ-verlängernden Wirkung im isolierten System gegenüber dem Mehrkomponentensystem Humanplasma. Im Konzentrationsbereich von 0,01-800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ erhält man im Konzentrations-Zeit-Diagramm für **Heparin** eine allmählich ansteigende Kurve mit einem Höchstwert bei 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und einer GZ von $126,5 \pm 35,7$ sec (LW = $43,9 \pm 3,8$ sec). Diese GZ entspricht einer Verlängerung der GZ um $186,3 \pm 56,8\%$ (Abb. 11).

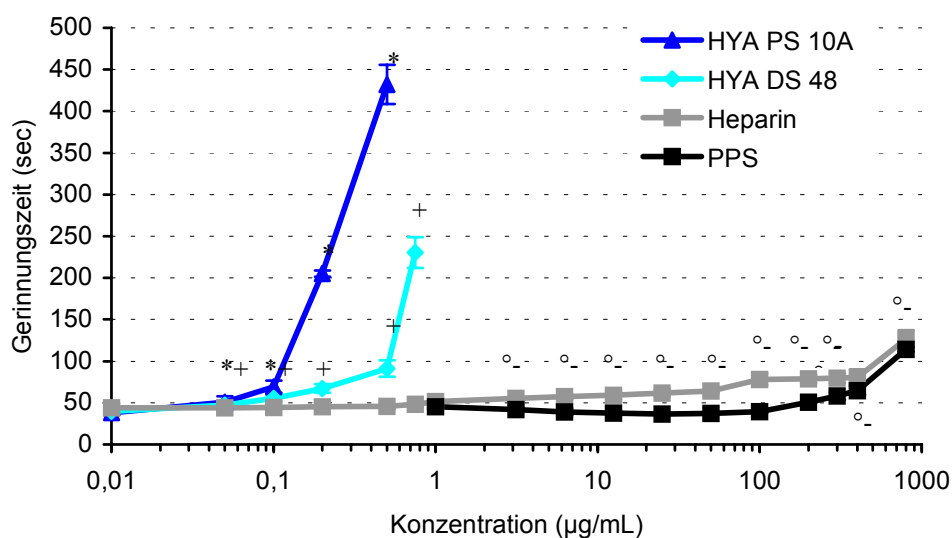


Abb. 11: Einfluss von HYA PS 10A (*), HYA DS 48 (+), Heparin (°) und PPS (-) auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion, ($n = 6$)

*;+;°;- mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Ähnlich wie bei Heparin ist der Kurvenverlauf in Abbildung 11 für **PPS**. Von 0,1-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kommt es zunächst zu einem Anstieg der GZ auf $45,52 \pm 1,5$ sec (LW = $40,4 \pm 1,6$ sec). Bis 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sinkt die GZ anschließend auf einen Wert von $36,7 \pm 0,2$ sec ab und in einer allmählich ansteigenden Kurve wird bei 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eine GZ von $114,2 \pm 6,7$ sec erreicht, was einer Verlängerung um $201,1 \pm 12,2\%$ entspricht. Für Heparin

und PPS liegen deshalb auch die Werte zur Verdopplung der GZ mit 391,9 µg/mL für Heparin und 559,4 µg/mL für PPS deutlich höher. Mit beiden Substanzen wird bei der höchsten untersuchten Konzentration von 800 µg/mL keine vollständige Hemmung von FIIa erreicht. So bewirken 800 µg/mL Heparin eine Hemmung von $69,7 \pm 8,2\%$ und 800 µg/mL PPS eine Hemmung von $66,4 \pm 2\%$. Auch die errechneten halbmaximalen Hemmkonzentrationen liegen mit 126,2 (88,1-180,9) µg/mL für Heparin und 494,2 (483-505,7) µg/mL für PPS deutlich über denen der restlichen Untersuchungssubstanzen.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Untersuchungen aller Prüfsubstanzen im isolierten Thrombin-Fibrinogen-System denen in Humanplasma gegenübergestellt.

Tabelle 4: Verlängerung der TZ in Humanplasma und im isolierten Thrombin-Fibrinogen-System, Halbmaximale Hemmkonzentrationen (IC₅₀) der Prüf- und Vergleichssubstanzen im Thrombin-Fibrinogen-System

Prüfsubstanz	Konzentration (µg/mL) zur Verdopplung der Thrombinzeit		IC ₅₀ (µg/mL)
	Humanplasma	Thrombin-Fibrinogen-System	
NaHS I-IV/80	35,0	85,7	76,3 (71,7-81,3)
Aldrich HS	19,5	28,9	19,9 (17,5-22,7)
KOP 409/85	10,7	22,5	15,0 (13,3-16,8)
Melanoidin Typ M1	44,0	106,4	101,6 (92-112,2)
Melanoidin Typ M42	6,9	7,0	5,2 (3,3-8)
HS 5	19,9	27,2	26,2 (25,2-27,3)
HS 130	76,9	24,9	23,2 (22,8-23,8)
HS 136	103,7	135,6	133,4 (132,7-134,3)
HYA PS 10A	0,3	0,1	0,11 (0,09-0,12)
HYA DS 48	0,4	0,4	0,31 (0,28-0,35)
PPS	0,2	391,9	126,2 (88,1-180,9)
Heparin	2,2	559,4	494,2 (483,0-505,7)

4.2.2. Neutralisation mit Protaminsulfat

Zu Beginn der Untersuchungen wurde der Einfluss von Protaminsulfat (PS) auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion geprüft (Abb. 12).

Dazu wurden die Gerinnungszeiten unter Zusatz von 0,01-100 µg/mL PS bestimmt. Wie in Abbildung 12 zu erkennen, bleiben die GZ, bezogen auf einen LW von $39,0 \pm 0,6$ sec, im Bereich von 0,01-7 µg/mL annähernd konstant. Ab einer Konzentration von 10 µg/mL werden die GZ kürzer, d.h. PS besitzt in diesem Konzentrationsbereich selbst prokoagulierende Eigenschaften.

Genannter Konzentrationsreihe wurde anschließend, wie unter Punkt 3.1.2.2. beschrieben, je eine ausgewählte Konzentration Prüfsubstanz zugesetzt und die GZ bestimmt. Im Ergebnis konnte für alle Prüfsubstanzen festgestellt werden, dass sich ihre antikoagulierende Wirkung mit PS aufheben lässt. In Tabelle 5 ist für alle Prüfsubstanzen die jeweils untersuchte Konzentration und das durch den Versuch bestimmte Verhältnis Prüfsubstanz : Protaminsulfat, bei dem eine Neutralisierung der antikoagulierenden Wirkung stattfindet, zusammengefasst.

Tabelle 5: Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung von polyanionischen Verbindungen durch Protaminsulfat

Prüfsubstanz	untersuchte Konzentration (µg/mL)	Verhältnis Prüfsubstanz : Protaminsulfat
NaHS I-IV/80	120,0	1 : 0,3
Aldrich HS	75,0	1 : 0,4
KOP 409/85	30,0	1 : 0,8
Melanoidin Typ M1	130,0	1 : 0,3
Melanoidin Typ M42	25,0	1 : 0,7
HS 5	40,0	1 : 1,3
HS 130	30,0	1 : 0,6
HS 136	140,0	1 : 0,2
HYA PS 10A	0,2	1 : 3,3
HYA DS 48	0,75	1 : 1,2
Heparin	0,5	1 : 1,8
PPS	3,13	1 : 1,2

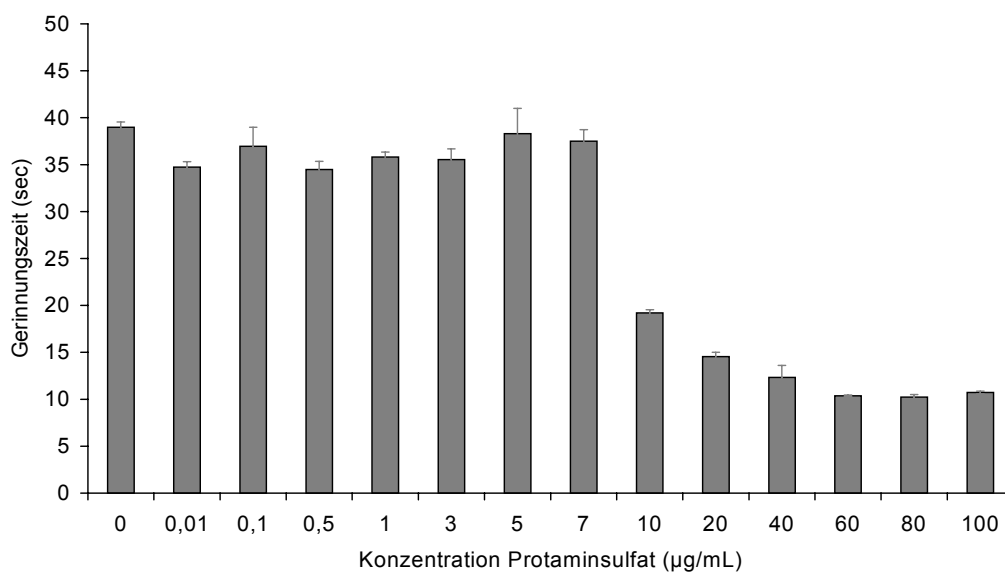


Abb. 12: Einfluss von Protaminsulfat auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion ($n = 4$)

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse exemplarisch am Beispiel von **HYA PS 10A** dargestellt.

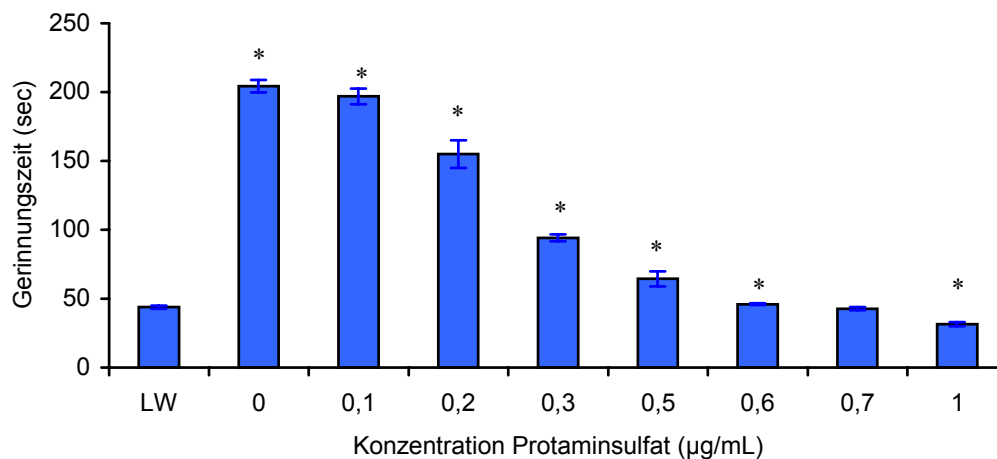


Abb. 13: Neutralisation der antikoagulierenden Wirkung von HYA PS 10A (0,2 µg/mL) durch Protaminsulfat ($n = 4$)
* mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Die erste Säule zeigt den Leerwert (LW = $43,8 \pm 1,2$ sec), der durch Zugabe von Pufferlösung bestimmt wurde. Durch Zusatz von 0,2 µg/mL HYA PS 10A wurde die GZ auf $204,3 \pm 4,6$ sec verlängert (Säule 2). Bei der geringsten Konzentration Protaminsulfat (0,1 µg/mL) lag die GZ bei $196,9 \pm 5,7$ sec. Mit zunehmender Konzentration an

PS wurde die GZ kontinuierlich niedriger. Bei einer Konzentration von 0,7 µg/mL PS wurde ein Mischungsverhältnis erreicht, mit dem die antikoagulierende Wirkung von HYA PS 10A aufgehoben wurde. Die GZ lag hier bei $42,7 \pm 1,2$ sec und erreichte damit annähernd den LW.

4.3. Einfluss auf die plasmatische Gerinnungszeit nach Aktivierung des extrinsischen Gerinnungsweges

4.3.1. Natürlich vorkommende Huminsäuren

Abbildung 14 zeigt, dass zunächst ausgehend von einem LW mit $89,0 \pm 2,1$ sec eine Verkürzung der GZ stattfindet, d.h. **NaHS I-IV/80** übt im Bereich von 1,56-25 µg/mL eine prokoagulierende Wirkung auf den Reaktionsansatz aus. Bei 25 µg/mL wird eine minimale GZ von $70,3 \pm 1,7$ sec erreicht. Durch allmähliche Erhöhung der Konzentration wird ab 50 µg/mL eine Verlängerung der GZ erreicht, die bei 100 µg/mL 50,0% beträgt. Die gemessene GZ ($137,2 \pm 7,9$ sec) entspricht bei dieser Konzentration einer Restaktivität an FVIIa von $25,4 \pm 6,8\%$. Die IC_{50} wurde mit 84,2 (81,4-87,1) µg/mL bestimmt.

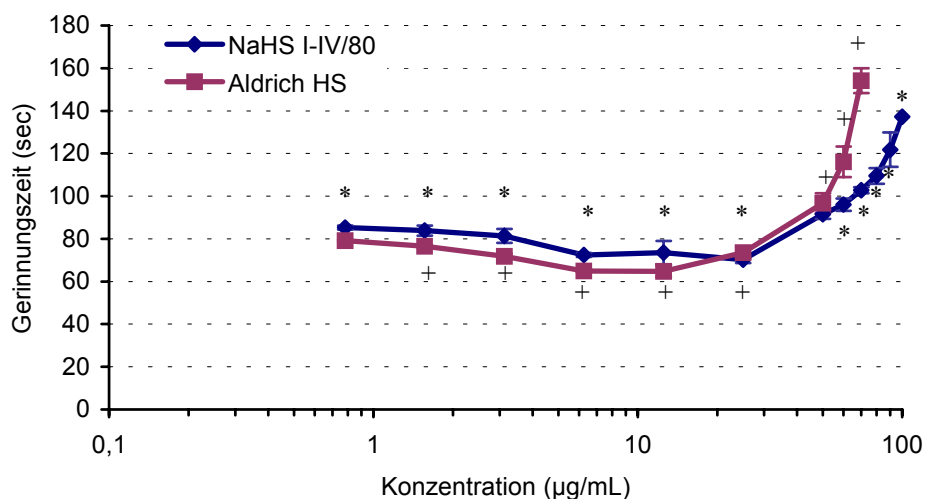


Abb. 14: Einfluss von NaHS I-IV/80 (*) und Aldrich HS (+) auf die plasmatische Gerinnung nach Aktivierung der Gerinnung über den extrinsischen Gerinnungsweg (n = 6)

*,+ mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Verglichen mit NaHS besitzt die natürliche **Aldrich HS** eine etwas stärker inhibierende Wirkung auf FVIIa. Der IC_{50} -Wert beträgt hier 51,9 (50,5-53,4) $\mu\text{g/mL}$. Durch eine Konzentration von 12,5 $\mu\text{g/mL}$ wird die anfängliche GZ von $80,1 \pm 2,1$ sec auf $64,8 \pm 2,7$ sec verringert. Dies entspricht einer Verkürzung der GZ auf 80,9% bezogen auf o.g. LW. In Abbildung 14 ist dies am allmählichen Abfallen der Konzentrations-Zeit-Kurve erkennbar. Ab 25 $\mu\text{g/mL}$ kam es dann zu einem Anstieg der GZ auf einen Höchstwert bei 70 $\mu\text{g/mL}$. Die hier gemessene GZ entspricht mit $154,2 \pm 5,8$ sec einer Verlängerung des LW um 92,5%. Die Aktivität von FVIIa betrug dabei $12,2 \pm 1,9\%$.

4.3.2. Synthetische Huminsäure-ähnliche Polymere

Auch **KOP 409/85** zeigt den für NaHS und Aldrich HS beschriebenen Kurvenverlauf (Abb. 15). Ausgehend von einem LW mit $84,6 \pm 3,3$ sec wird durch Zusatz von 1,56-6,25 $\mu\text{g/mL}$ KOP die GZ bis auf einen Wert von $64,3 \pm 3,8$ sec verkürzt. Ausgedrückt als Verringerung in % gegenüber dem LW ergibt dies einen Wert von 24%. Eine anschließende Erhöhung des Substanzeinsatzes bewirkte eine Verlängerung der GZ, welche bei der höchsten untersuchten Konzentration von 30 $\mu\text{g/mL}$ $133,3 \pm 2,7$ sec (Verlängerung um 57,6%) betrug. Der FVIIa hatte bei dieser Konzentration noch eine Aktivität von $25,0 \pm 2,6\%$. Eine Restaktivität von 50% wurden durch 27,6 (26,4-28,9) $\mu\text{g/mL}$ erreicht.

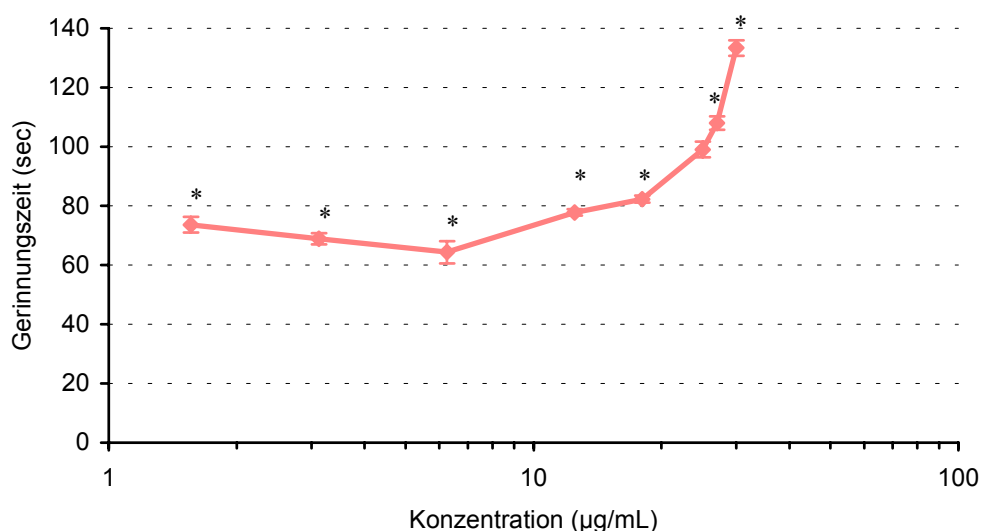


Abb. 15: Einfluss von KOP 409/85 auf die plasmatische Gerinnung nach Aktivierung der Gerinnung über den extrinsischen Gerinnungsweg ($n = 6$)

* mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Von den beiden Melanoidinen wurde in diese Untersuchung nur das **Melanoidin vom Typ M1** einbezogen.

Im Konzentrationsbereich von 0,39-25 $\mu\text{g/mL}$ fand zunächst eine Verringerung der GZ statt. Die in Abbildung 16 gezeigte Konzentrations-Zeit-Kurve fällt dementsprechend bis zu einer Konzentration von 12,5 $\mu\text{g/mL}$ allmählich ab, steigt ab 25 $\mu\text{g/mL}$ wieder an und erreicht bei 60 $\mu\text{g/mL}$ eine GZ von $160,4 \pm 3,6$ sec (Verlängerung um 102,0%) bei einer Restaktivität von FVIIa mit $10,0 \pm 0,9\%$. Die IC_{50} beträgt 52,2 (52,0-52,4) $\mu\text{g/mL}$. Das bei 12,5 $\mu\text{g/mL}$ erreichte Minimum in der GZ entspricht einer Verkürzung des LW ($79,4 \pm 2,8$ sec) auf 76,3%.

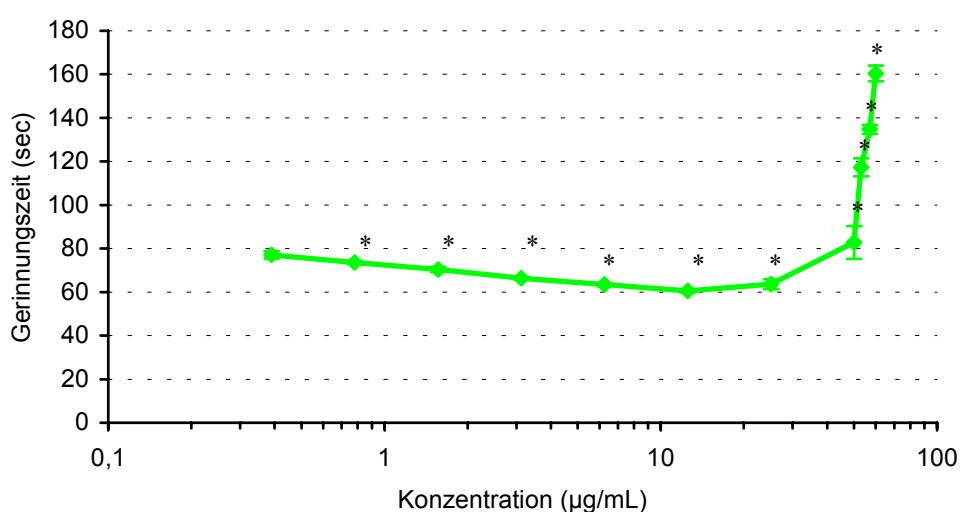


Abb. 16: Einfluss des Melanoidins vom Typ M1 auf die plasmatische Gerinnung nach Aktivierung der Gerinnung über den extrinsischen Gerinnungsweg ($n = 6$)
* mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Eine Darstellung der Ergebnisse der ROS-Substanzen **HS 130** und **HS 136** als Konzentrations-Gerinnungszeit-Kurven wird in Abbildung 17 gezeigt.

Abweichend von den bisher vorgestellten Ergebnissen bewirkten beide Prüfsubstanzen keine Verringerung der GZ und hatten damit keine prokoagulierende Wirkung auf den Reaktionsansatz.

Die GZ wurden mit zunehmender HS 130-Konzentration immer mehr verlängert. 75 $\mu\text{g/mL}$ verlängerten die GZ um 190,5%. Dies entsprach bei einer Restaktivität an FVIIa von $5,9 \pm 0,8\%$ einer GZ von $131,0 \pm 3,3$ sec.

Im Vergleich mit HS 130 erwies sich die mit Lysin hergestellte Substanz HS 136 ähnlich in ihrer Wirkung. Die höchste untersuchte Konzentration von 65 $\mu\text{g/mL}$ verlängerte die GZ um 130,2% (GZ = $108,1 \pm 9,6$ sec). Die gleiche Konzentration bewirkte bei HS

130 eine GZ von $109,9 \pm 18,6$ sec. Dieser Wert entspricht einer Verlängerung der GZ (LW = $45,1 \pm 1,8$ sec) um 143,7%. Betrachtet man die Aktivitätswerte von FVIIa nach Zugabe von $65 \mu\text{g/mL}$ Prüfsubstanz, dann fand bei HS 130 eine Hemmung von $94,1 \pm 0,8\%$ und bei HS 136 eine Hemmung von $86,7 \pm 5,2\%$ statt. Auch die beiden IC_{50} liegen mit $40,0$ ($36,0$ - $44,5$) $\mu\text{g/mL}$ für HS 130 und mit $43,6$ ($42,9$ - $44,3$) $\mu\text{g/mL}$ für HS 136 nahe beieinander.

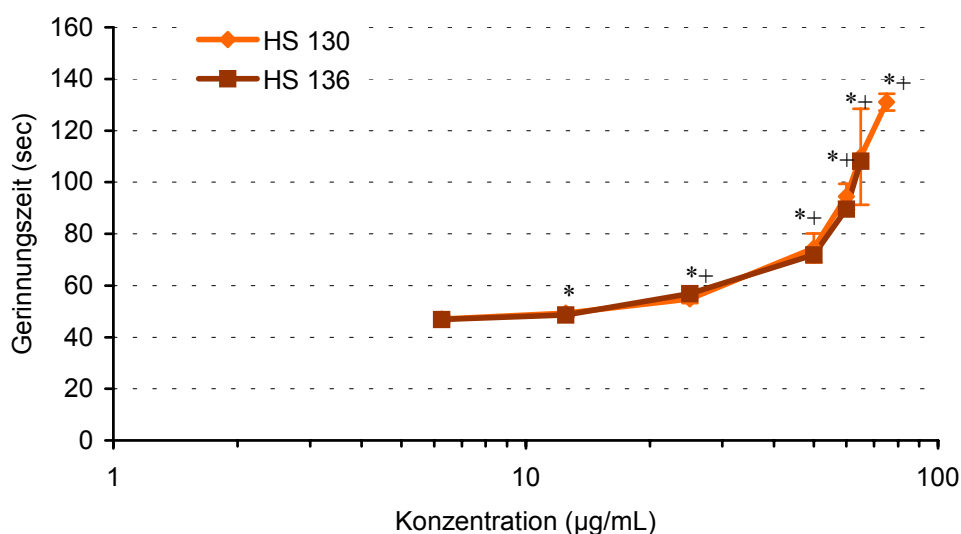


Abb. 17: Einfluss von HS 130 (*) und HS 136 (+) auf die plasmatische Gerinnung nach Aktivierung der Gerinnung über den extrinsischen Gerinnungsweg ($n = 6$)
* ; + mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

4.3.3. Sulfatierte Hyaluronsäurederivate

HYA DS 48 erwies sich in diesem Versuch als die am stärksten wirksame Substanz. Hier wurde schon mit einer Konzentration von $4 \mu\text{g/mL}$ eine Verlängerung der GZ um 92,6% erreicht. Die IC_{50} beträgt $2,1$ ($2,0$ - $2,1$) $\mu\text{g/mL}$. Abbildung 18 zeigt eine im Bereich von 0 - $0,1 \mu\text{g/mL}$ auf $70,8 \pm 0,7$ sec zunächst abfallende Konzentrations-Zeit-Kurve (LW = $83,4 \pm 2,1$ sec), die bei $0,1 \mu\text{g/mL}$ mit einer Verkürzung der GZ auf 84,9% ihr Minimum erreicht. Ab $0,78 \mu\text{g/mL}$ steigt die Kurve allmählich an. Die höchste gemessene Konzentration von $4 \mu\text{g/mL}$ bewirkte eine GZ von $160,6 \pm 18,0$ sec, verursacht durch eine Hemmung des FVIIa von $88,8 \pm 5,7\%$.

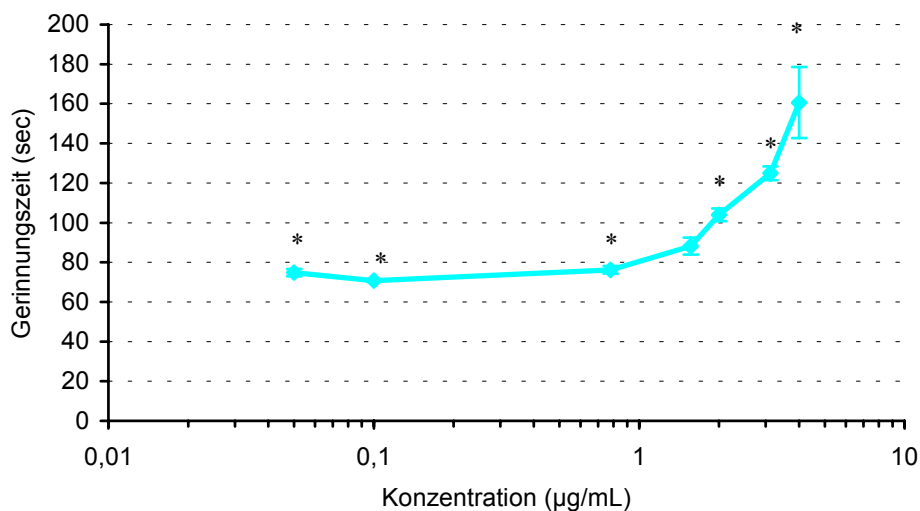


Abb. 18: Einfluss von HYA DS 48 auf die plasmatische Gerinnung nach Aktivierung der Gerinnung über den extrinsischen Gerinnungsweg (n = 6)

* mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

4.4. Antifibrinolytische Wirkung

4.4.1. Streptokinase-Aktivitätskurve

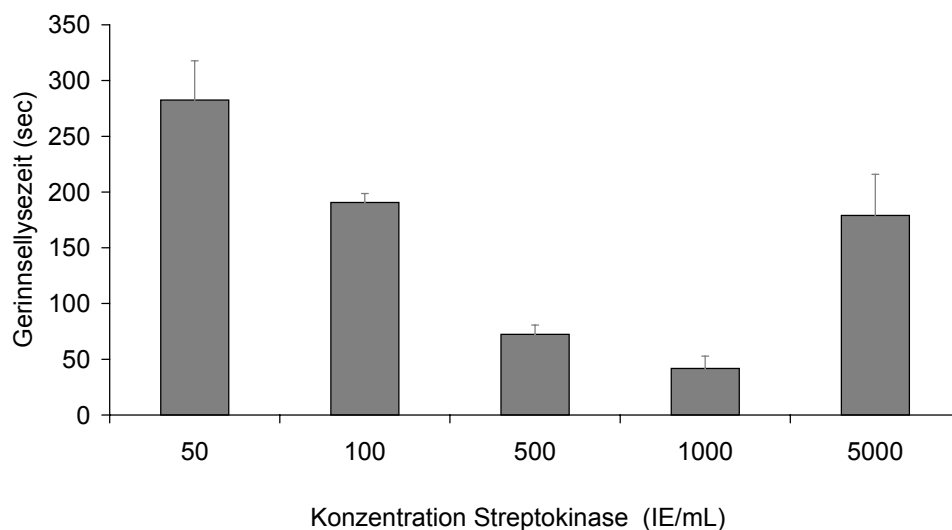


Abb. 19: Konzentrations(Aktivitäts)-Wirkungskurve von Streptokinase (n = 6)

Zunächst wurde durch Aufstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve von Streptokinase (SK), in der die Lysezeiten von künstlich hergestellten Plasmagerinnseln dargestellt wurden, die für den Versuch optimale Konzentration an SK ermittelt.

Abbildung 19 zeigt, dass die Lysezeiten durch Erhöhung der Konzentration an SK im Bereich von 50-500 IE/mL kürzer werden. Bei einer Konzentration von 1000 IE/mL SK durchläuft die Kurve mit $41,8 \pm 11$ sec ein Minimum. Erhöht man die Konzentration an SK verlängert sich die Lysezeit bis auf $179 \pm 36,9$ sec bei 5000 IE/mL SK. Es wurde für unsere Versuche die SK-Konzentration ausgewählt, die die geringste Lysezeit bewirkt (1000 IE/mL SK).

4.4.2. Antifibrinolytische Wirkung der Prüfsubstanzen

Im Lysetest zeigte mit Ausnahme von **Melanoidin Typ M1** im Konzentrationsbereich von 0,01-200 $\mu\text{g/mL}$ keine der Prüfsubstanzen eine antifibrinolytische Wirkung. Die gemessenen Lysezeiten unterschieden sich nicht signifikant vom jeweiligen Leerwert, welcher mit Humanplasma, Puffer1, SK und FIIa bestimmt wurde.

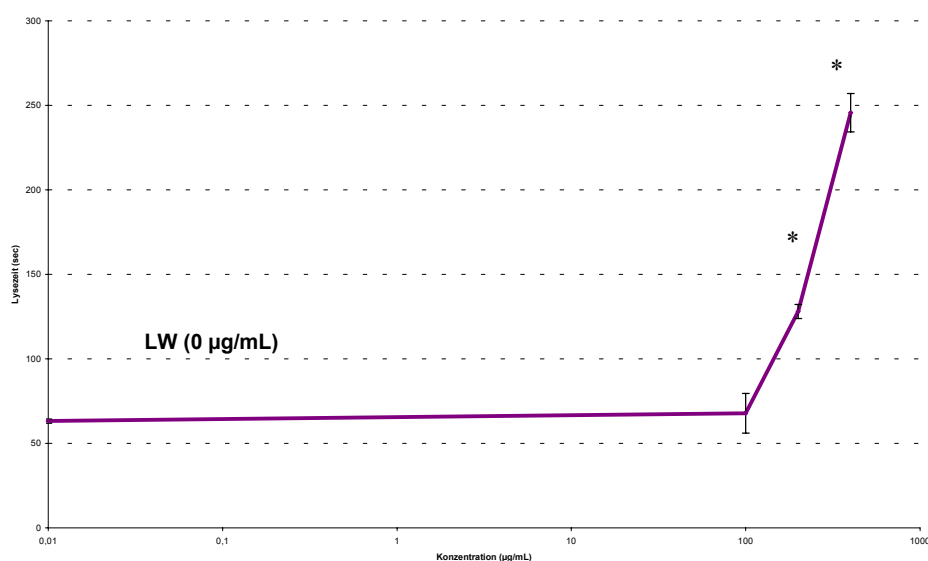


Abb. 20: Antifibrinolytische Wirkung des Melanoidins Typ M1 im Lysetest ($n = 6$);
LW = Leerwert

* mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Auch das Melanoidin Typ M1 zeigte erst in relativ hohen Konzentrationen eine antifibrinolytische Wirkung (Abb. 20). Ein signifikanter Unterschied gegenüber dem Leerwert ($63,2 \pm 1,2$ sec) wurde bei einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/mL}$ mit einer Lysezeit

von $128,0 \pm 4,1$ sec erreicht. Die höchste untersuchte Konzentration ($400 \mu\text{g/mL}$) verlängerte die Lysezeit um 288,8%.

4.5. Amidolytische Aktivität von Thrombin

4.5.1. Abhängigkeit von der Konzentration der Prüfsubstanzen

Die amidolytische (Rest-)Aktivität von FIIa wurde nach dem Einwirken der Prüfsubstanzen mit Hilfe des chromogenen Substrates S-2238 bestimmt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser konzentrationsabhängigen Untersuchung vorgestellt.

4.5.1.1. Natürlich vorkommende Huminsäuren

Die natürlich vorkommende Huminsäure **NaHS I-IV/80** verringert konzentrationsabhängig die Aktivität von FIIa im Bereich von $3,1$ - $800 \mu\text{g/mL}$. Abbildung 21 zeigt, dass erst bei relativ hohen HS-Konzentrationen eine nahezu vollständige Hemmung von FIIa stattfindet. So bewirken $400 \mu\text{g/mL}$ NaHS eine Hemmung von $79,0 \pm 8,2\%$. Bei Verdopplung dieser Konzentration auf $800 \mu\text{g/mL}$ bleibt noch eine Restaktivität von $4,8 \pm 3,8\%$ erhalten. Dies entspricht $0,14 \text{ NIH/mL}$ Thrombin. Der IC_{50} -Wert von NaHS beträgt $60,8$ ($48,6$ - $76,2$) $\mu\text{g/mL}$.

Abbildung 21 zeigt die Konzentrations-Aktivitäts-Kurve der **Aldrich HS**. Die Thrombin-inhibierende Wirkung ist hier geringer ausgeprägt als bei der natürlichen Moorwasser-Huminsäure NaHS. Ausgehend von $3,1 \mu\text{g/mL}$ wird die FIIa-Aktivität zunächst verringert, mit einem Minimum von $66,8 \pm 2,4\%$ Aktivität bei $25 \mu\text{g/mL}$. Ab einer Konzentration von $50 \mu\text{g/mL}$ nimmt die FIIa-Aktivität allmählich wieder zu, d.h. die inhibierende Wirkung der Aldrich HS wird geringer und erreicht bei $800 \mu\text{g/mL}$ mit $91,8 \pm 6,7\%$ nahezu den Ausgangswert von 100% Aktivität.

Ein IC_{50} -Wert konnte für diese HS nicht bestimmt werden.

4.5.1.2. Synthetische Huminsäure-ähnliche Polymere

Das synthetische Huminsäure-ähnliche Polymer **KOP 409/85** hatte von allen untersuchten Substanzen die stärkste Thrombin inhibierende Wirkung. Eine 50%ige Aktivitätshemmung wurde durch $11,6$ ($11,0$ - $12,4$) $\mu\text{g/mL}$ KOP bewirkt. Im Bereich von $3,1$ -

800 µg/mL wurde die FIIa-Aktivität von anfänglich $65,2 \pm 1,9\%$ auf $2,8 \pm 0,6\%$ bei 200 µg/mL verringert. Ab 400 µg/mL wurde der FIIa zu 100% gehemmt (Abb. 21).

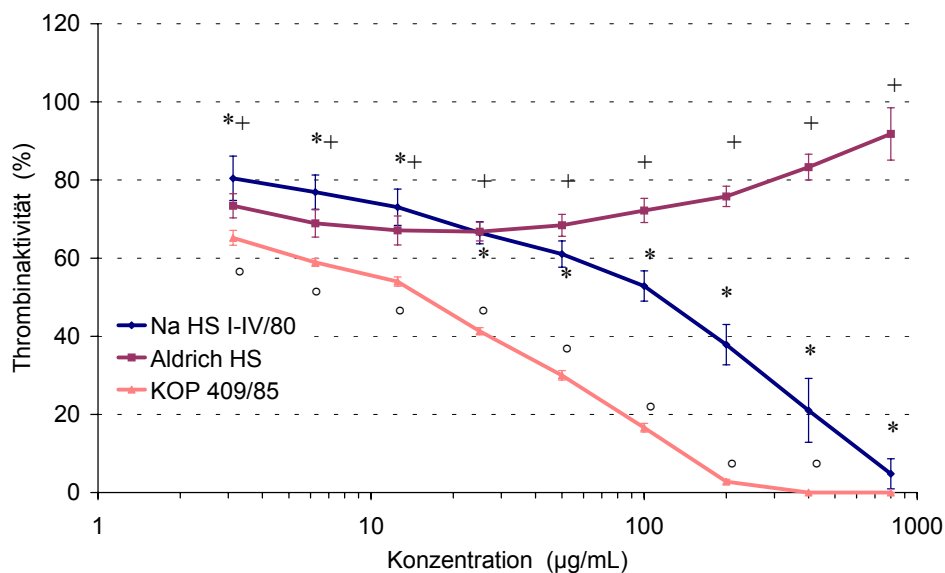


Abb. 21: Einfluss von NaHS I-IV/80 (*), Aldrich HS (+) und KOP 409/85 (°) auf die amidolytische Aktivität von Thrombin ($n = 9$)

*;+;° mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Einen sehr geringen Einfluss auf die Aktivität von FIIa besaßen die beiden Melanoidine (Abb. 22).

Lediglich in niedrigen Konzentrationen bewirkten sie eine Aktivitätsminderung, die für das **Melanoidin Typ M1** bei $12,5 \mu\text{g/mL}$ $21,2 \pm 1,5\%$ und für das **Melanoidin Typ M42** bei $3,1 \mu\text{g/mL}$ $18,3 \pm 3,3\%$ ihren Maximalwert erreichte. Eine Erhöhung der Substanzkonzentration führte in beiden Fällen zu einer Wirkungsabnahme bzgl. der Thrombininhibierenden Wirkung. Bei Zusatz von $50 \mu\text{g/mL}$ Typ M1 und $200 \mu\text{g/mL}$ Typ M42 blieb die FIIa-Aktivität unbeeinflusst. Die FIIa-Aktivität betrug hier nahezu 100%. Bei weiterer Substanzerhöhung wurden Extinktionswerte erreicht, die deutlich über den Werten für eine 100%ige Thrombinaktivität liegen. Die höchsten gemessenen Konzentrationen bewirkten Extinktionen, welche beim Typ M1 einer FIIa-Aktivität von $116,4 \pm 3,9\%$ ($800 \mu\text{g/mL}$) und beim Typ M42 einer FIIa-Aktivität von $142,3 \pm 4,8\%$ ($200 \mu\text{g/mL}$) entsprechen würden. IC_{50} -Werte konnten für beide Substanzen nicht berechnet werden.

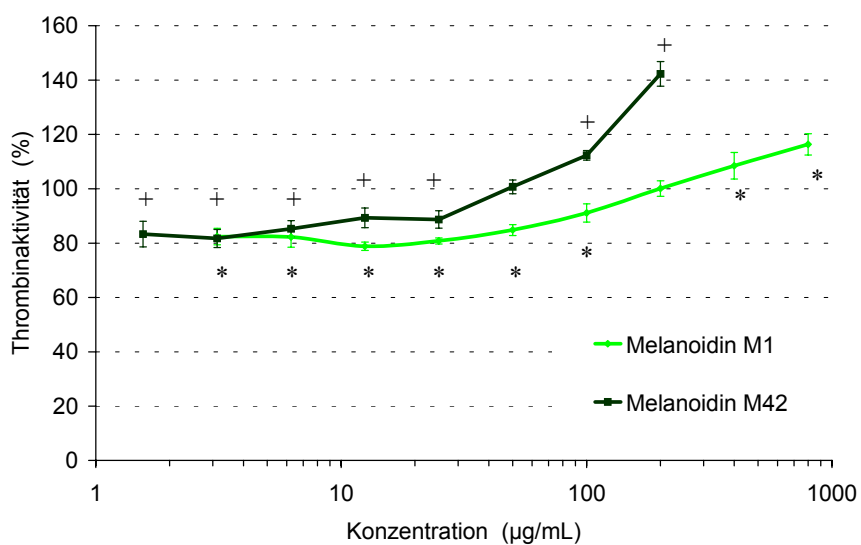


Abb. 22: Einfluss der Melanoidine vom Typ M1(*) und M42 (+) auf die amidolytische Aktivität von Thrombin ($n = 9$)

*;+ mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Eine deutliche Abhängigkeit der Wirkung auf FIIa von der Struktur wird am Beispiel der ROS-Substanzen HS 130 und HS 136 (Abb. 23) deutlich.

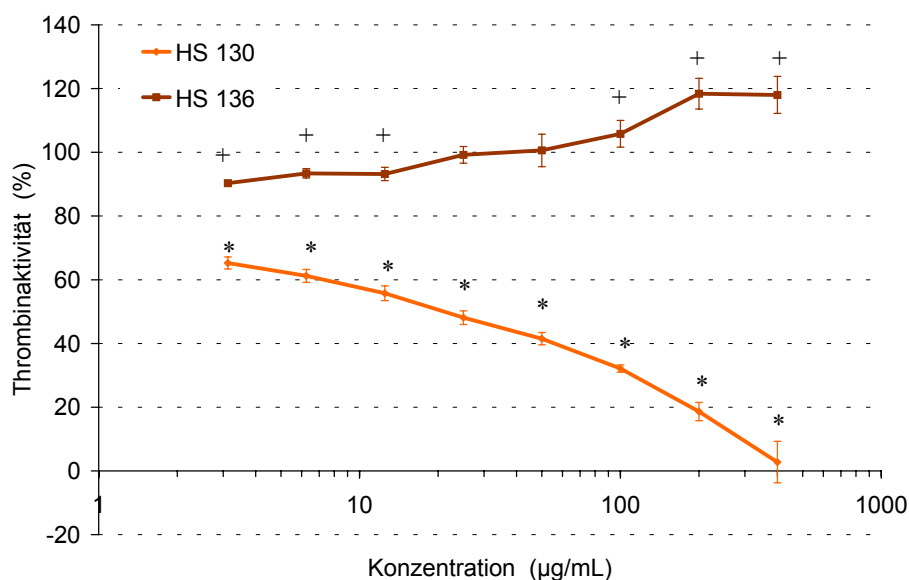


Abb. 23: Einfluss von HS 130 (*) und HS 136 (+) auf die amidolytische Aktivität von Thrombin ($n = 9$)

*;+ mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Die mit der sauren AS <Glutaminsäure> synthetisierte Substanz **HS 130** minderte konzentrationsabhängig die FIIa-Aktivität. 3,1 µg/mL reduzierten die Aktivität um $34,7 \pm 1,9\%$. Die Konzentration für eine 50%ige Hemmung wurde mit 16,7 (15,1-18,5) µg/mL bestimmt. Die höchste untersuchte Konzentration (400 µg/mL) führte zu einer fast vollständigen Inhibierung von FIIa.

Der Einsatz von Lysin an Stelle von Glutaminsäure in der Synthese (**HS 136**) führte in diesem Versuch zu einer Aufhebung der Thrombin hemmenden Wirkung. Lediglich in niedrigen Substanzkonzentrationen (3,1-25 µg/mL) wird die FIIa-Aktivität um bis zu $9,7 \pm 0,8\%$ bei 6,25 µg/mL reduziert. Mit Erhöhung der Substanzkonzentration wurde der inhibierende Einfluss geringer. Bei 100 µg/ml wurden wieder 100% FIIa-Aktivität erreicht. Konzentrationen größer 100 µg/mL bewirkten, ähnlich wie bei den Melanoidinen, Extinktionsmeßwerte, die einer FIIa-Aktivität von mehr als 100% entsprechen. Ein IC_{50} -Wert konnte nicht bestimmt werden.

4.5.1.3. Sulfatierte Hyaluronsäuren, Vergleichssubstanzen

Beide sulfatierte Hyaluronsäurederivate bewirkten im untersuchten Konzentrationsbereich (3,1-800 µg/mL) dosisabhängig eine Aktivitätsminderung von FIIa (Abb. 24).

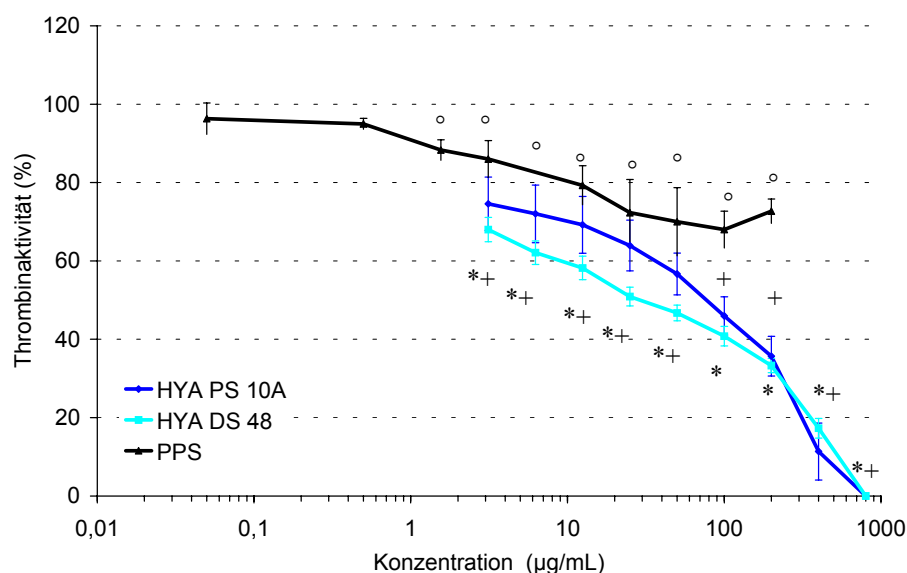


Abb. 24: Einfluss von HYA PS 10A (*), HYA DS 48 (+) und PPS (°) auf die amidolytische Aktivität von Thrombin (n = 9)

*;+;° mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

3,1 µg/mL **HYA PS 10A** inhibierte die Aktivität um $25,4 \pm 6,8$ %. Ein ähnlicher Wert wurde bei der gleichen Konzentration mit $32,0 \pm 3,1$ % für **HYA DS 48** erhalten. Jeweils 800 µg/mL bewirkten eine vollständige Inhibierung von Thrombin, d.h. es fand keine Substrathydrolyse statt.

Für beide Substanzen wurde der IC_{50} -Wert berechnet. Er beträgt für HYA PS 10A 48,0 (35,8-64,4) µg/mL und für HYA DS 48 26,0 (21,1-32,1) µg/mL.

Als relativ schwach wirksam in Bezug auf seine FIIa-inhibierende Wirkung im isolierten System erwies sich **PPS**. Unter Zusatz von 1,6 µg/mL PPS betrug die FIIa-Aktivität $88,3 \pm 2,6$ %. Durch Erhöhung der Konzentration auf 100 µg/mL wurde die Aktivität auf $68,0 \pm 4,66$ % verringert (Abb. 24). Bei Verdopplung dieser Konzentration wurde der inhibierende Einfluss wieder geringer ($72,7 \pm 3,1$ % FIIa-Aktivität). Dieser Wert unterschied sich mit $p < 0,05$ signifikant vom vorherigen. Ein IC_{50} -Wert konnte nicht berechnet werden.

4.5.2. Einfluss von Antithrombin III

Im Folgenden werden die Ergebnisse des unter 3.2.1. geschilderten Versuches unter Zusatz von ATIII beschrieben. In den jeweiligen graphischen Darstellungen sind oben rechts die Diagramme der entsprechenden Versuchsreihe ohne ATIII (siehe 4.5.1) zu sehen. Sie sollen der besseren Vergleichbarkeit beider Versuchsanordnungen dienen.

4.5.2.1. Natürlich vorkommende Huminsäuren

Wie Abbildung 25 zu entnehmen ist, hat der Zusatz von ATIII keinen Einfluss auf die Wirkung der natürlich vorkommenden Huminsäure **NaHS I-IV/80**. 12,5 µg/mL bewirkten eine Aktivitätsminderung um $23,1 \pm 1,7$ % ($27,0 \pm 4,7$ % ohne ATIII). Eine weitere Erhöhung der NaHS-Konzentration führte zu einer stärkeren Inhibierung der FIIa-Aktivität. Da bei 200 µg/mL eine etwas höhere Extinktion (Hemmung von FIIa $52,7 \pm 1,6$ %) gemessen wurde als im entsprechenden Versuch ohne ATIII ($62,2 \pm 5,2$ % Inhibierung), liegen die berechneten IC_{50} -Werte weiter auseinander als aufgrund des Kurvenverlaufes zu erwarten ist. Der alleinige Zusatz von ATIII zum Reaktionsansatz minderte die FIIa-Aktivität um $17,2 \pm 1,6$ %. Der IC_{50} -Wert betrug in diesem Versuch 144,2 (130,8-158,9) µg/mL.

Für die **Aldrich HS** wurde unter Zusatz von ATIII keine Wirkungsverstärkung beobachtet (Abb. 25). Die Kurve zeigt einen ähnlichen Verlauf wie in Abwesenheit von ATIII. ATIII allein verringerte die Aktivität von Thrombin um $13,8 \pm 2,1\%$.

Ausgehend von einer Hemmung von $20,5 \pm 2,8\%$ bei $3,1 \mu\text{g/mL}$ wird die FIIa-Aktivität mit zunehmender HS-Konzentration weiter vermindert. Bei $100 \mu\text{g/mL}$ findet eine maximale Inhibierung von $36,7 \pm 2,8\%$ statt. Durch Verdopplung dieser HS-Konzentration wird der inhibierende Einfluss auf FIIa wieder geringer. Die Kurve steigt geringfügig an. $200 \mu\text{g/mL}$ bewirken eine FIIa-Aktivität von $67,2 \pm 1,2\%$ (Abb.26). Ein IC_{50} -Wert konnte nicht berechnet werden.

4.5.2.2. Huminsäure-ähnliche Polymere

Abbildung 25 zeigt die mit **KOP 409/85** erhaltenen Ergebnisse in graphischer Darstellung. Mit zunehmender KOP-Konzentration wird die Aktivität von FIIa geringer. Die Kurvenverläufe sind, wie durch Vergleich der Abbildungen 25 und 21 zu erkennen ist, ähnlich. Die Konzentration für eine 50%ige Hemmung der FIIa-Aktivität beträgt hier $35,9$ ($34,2$ - $37,8$) $\mu\text{g/mL}$ ($11,6$ ($11,0$ - $12,4$) $\mu\text{g/mL}$ ohne ATIII). Der Zusatz von ATIII allein bewirkte eine um $17,7 \pm 2,3\%$ geringere FIIa-Aktivität.

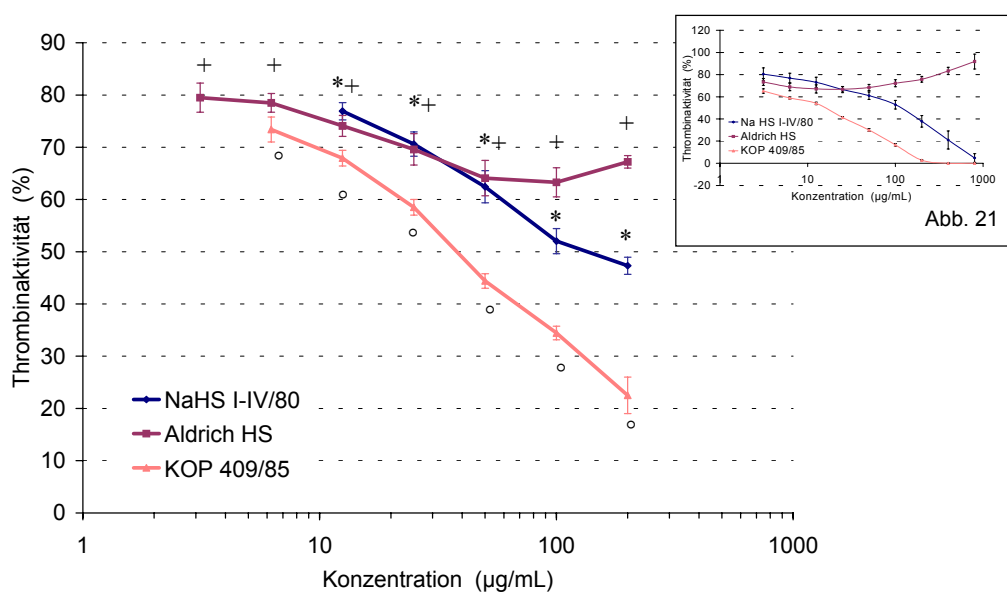


Abb. 25: Einfluss von NaHS I-IV/80 (*), Aldrich HS (+) und KOP 409/85 (°) auf die amidolytische Aktivität von Thrombin in Anwesenheit von ATIII ($n = 9$), zum Vergleich oben rechts die Wirkung ohne ATIII (Abb. 21)
 *,+,° mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Die in niedrigen Substanzkonzentrationen schwach ausgeprägte Anti-Thrombinwirkung beider Melanoidine wurde durch Zusatz von ATIII nicht verstärkt. Der Einfluss beider Substanzen auf die Aktivität von Thrombin ist sehr gering. Auch in diesem Versuchen wurden der Abbildung 21 entsprechende Kurvenverläufe erhalten. Für die Melanoidine vom Typ M1 und M42 konnten keine IC_{50} -Werte berechnet werden.

6,23-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ **Melanoidin Typ M1** verursachten zunächst eine Aktivitätsabnahme, die bei 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ihr Minimum mit $70,4 \pm 2,2\%$ Aktivität erreichte. Eine weitere Substanzerhöhung führte zu einem Anstieg der FIIa-Aktivität bis zu $98,0 \pm 5,5\%$ bei 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Abb. 26). ATIII allein erniedrigte die FIIa-Aktivität um $13,7 \pm 3,1\%$.

Eine ähnliche Konzentrations-Wirkungsbeziehung wie für das Melanoidin Typ M1 wurde für das **Melanoidin Typ M42** gefunden (Abb. 26). 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hemmen die FIIa-Aktivität um $11,0 \pm 3,0\%$. Durch Erhöhung der Substanzkonzentration nimmt die Thrombin-Aktivität weiter ab und erreicht bei 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mit $73,3 \pm 3,7\%$ ihr Minimum. Bis 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ steigt die FIIa-Aktivität wieder auf $83,3 \pm 4,0\%$ an. Durch ATIII allein wurde eine $8,0 \pm 2,7\%$ ige Hemmung verursacht.

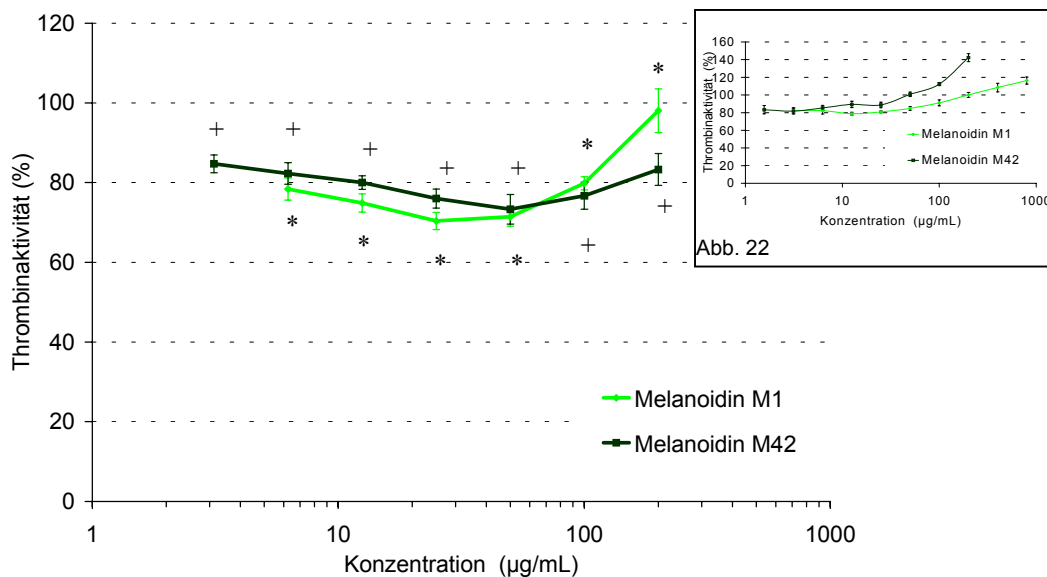


Abb. 26: Einfluss der Melanoidine vom Typ M1(*) und M42 (+) auf die amidolytische Aktivität von Thrombin in Anwesenheit von ATIII ($n = 9$), zum Vergleich oben rechts die Wirkung ohne ATIII (Abb. 22)

*;+ mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Während **HS 130** im ATIII-freien System konzentrationsabhängig die Aktivität von Thrombin verminderte, führte die Zugabe von ATIII zu einer fast vollständigen Wirkungsaufhebung (Abb. 27). ATIII allein bewirkte eine Hemmung von $15,2 \pm 2,3\%$. Bei $50 \mu\text{g/mL}$ wurde eine maximale Hemmwirkung erreicht. Die Thrombin-Aktivität betrug hier noch $76,9 \pm 4,1\%$. Durch Verdopplung der Konzentration wurde der hemmende Einfluss auf FIIa wieder geringer, so dass mit $96,0 \pm 3,3\%$ Aktivität fast der Ausgangswert von 100% erreicht wurde. Eine Berechnung der IC_{50} -Werte war nicht möglich.

Durch ATIII unverändert blieb die Wirkung von **HS 136**. Eine maximale Hemmwirkung von $27,7 \pm 1,5\%$ wurde mit $50 \mu\text{g/mL}$ erreicht. Eine weitere Substanzerhöhung hatte eine Wirkungsabnahme zur Folge.

So stieg bei $200 \mu\text{g/mL}$ die FII-Aktivität wieder auf $82,8 \pm 1,5\%$ an (Abb. 27). Auch für diese Substanz konnte aufgrund der geringen Wirkung kein IC_{50} -Wert bestimmt werden.

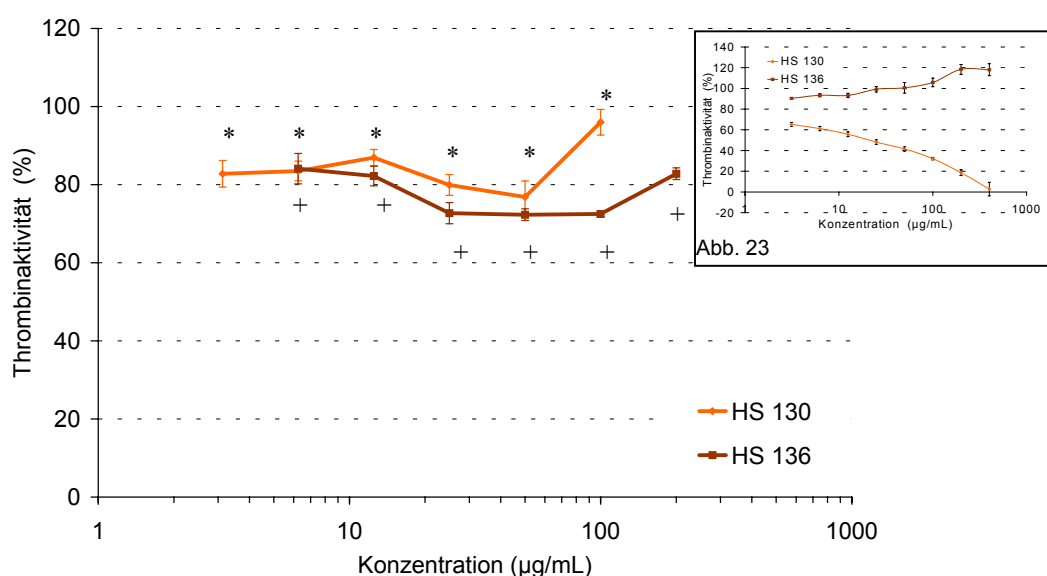


Abb. 27: Einfluss von HS 130 (*) und HS 136 (+) auf die amidolytische Aktivität von Thrombin in Anwesenheit von ATIII ($n = 9$), zum Vergleich oben rechts die Wirkung ohne ATIII (Abb. 23)
;+ mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

4.5.2.3. Sulfatierte Hyaluronsäuren, Vergleichssubstanzen

In Abbildung 28 sind die Ergebnisse der Untersuchungen der Substanzen HYA PS 10A, HYA DS 48 und Pentosanpolysulfat graphisch dargestellt.

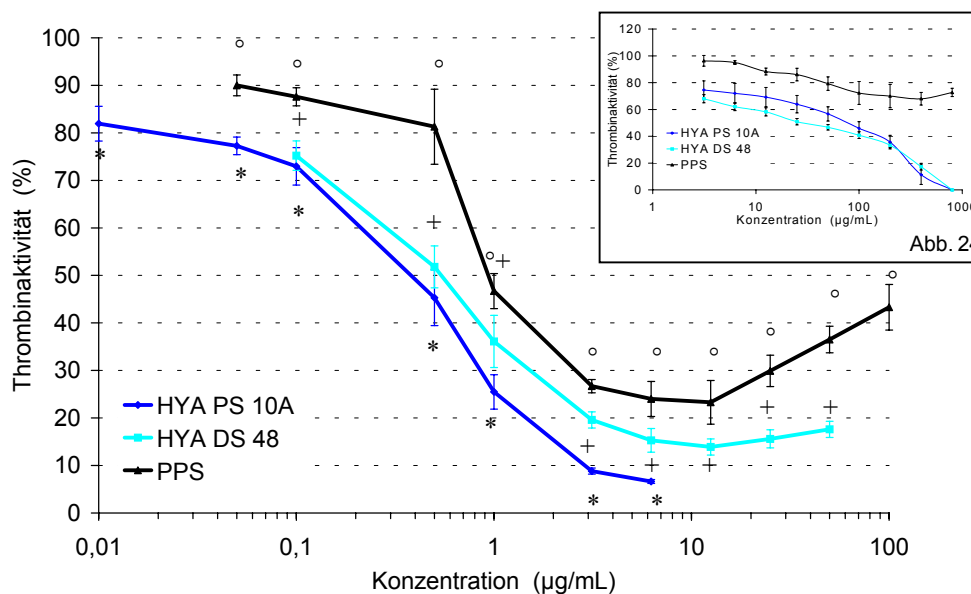


Abb. 28: Einfluss von HYA PS 10A (*), HYA DS 48 (+) und PPS (°) auf die amidolytisch Aktivität von Thrombin in Anwesenheit von ATIII (n = 9), zum Vergleich oben rechts die Wirkung ohne ATIII (Abb. 24)
 *;+;° mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Der Zusatz von ATIII zu den jeweiligen Reaktionsansätzen hatte für alle 3 Testsubstanzen eine deutliche Wirkungsverstärkung zur Folge.

HYA PS 10A wurde im Konzentrationsbereich von 0,01-6,25 µg/mL untersucht. 0,01 µg/mL reduzierten die FIIa-Aktivität um $18,1 \pm 3,7\%$. Die mit 3,1 µg/mL erreichte Hemmung von $91,2 \pm 0,6\%$ entspricht in etwa der Wirkung von 400 µg/mL Substanz im ATIII-freien System. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 6,25 µg/mL wurde die Thrombin-Aktivität auf $6,6 \pm 0,4\%$ erniedrigt. Die Wirkungsverstärkung durch ATIII wird auch durch den Vergleich der IC_{50} -Werte deutlich, der für das ATIII-freie System 48,0 (35,8-64,4) µg/mL und für den Versuch mit ATIII 0,24 (0,21-0,28) µg/mL beträgt.

Ein ähnlicher Effekt konnte auch für **HYA DS 48** beobachtet werden. Waren im ATIII-freien System 25 µg/mL Substanz nötig, um eine Hemmung von $49,1 \pm 2,4\%$ zu erreichen, konnte der Substanzeinsatz auf 0,5 µg/mL für eine Hemmung von $48,2 \pm 4,4\%$ reduziert werden. Eine 50%ige Aktivitätshemmung wurde mit 0,5 (0,39-0,65) µg/mL erreicht. Abbildung 28 zeigt eine mit zunehmender Konzentration zunächst abfallende Kurve, die bei 12,5 µg/mL mit $13,9 \pm 1,7\%$ Aktivität ein Minimum hat. Im anschließenden Verlauf steigt die Kurve allmählich wieder an. Die höchste gewählte Konzentration

von 50 µg/mL hat mit $17,6 \pm 1,7\%$ Aktivität wieder einen geringeren Einfluss auf die Thrombin-Aktivität. Dieser Wert unterscheidet sich signifikant mit $p < 0,05$ vom Minimumwert bei 12,5 µg/mL. Der Zusatz von ATIII allein reduziert die FIIa-Aktivität um $17,8 \pm 0,9\%$.

Eine Abhängigkeit der Wirkung vom Vorhandensein an ATIII wurde als Ergebnis der Versuche für **PPS** festgestellt. Im ATIII-freien System lag das Wirkungsmaximum mit $32,0 \pm 4,7\%$ Inhibierung bei einer Konzentration von 100 µg/mL. Eine weitere Substanzerhöhung verursachte eine Wirkungsabnahme.

Durch Zusatz von ATIII wurden durch wesentlich geringere Konzentrationen größere Hemmeffekte erzielt. Das Wirkungsmaximum lag hier mit $76,7 \pm 4,6\%$ Hemmung bei 12,5 µg/mL. Abbildung 28 zeigt eine abfallende Kurve mit einem Minimum bei 12,5 µg/mL. Im weiteren Verlauf steigt die Kurve allmählich wieder an, d.h. der inhibierende Einfluss auf Thrombin wird geringer. Der IC_{50} -Wert betrug 2,2 (1,6-2,9) µg/mL. Für das ATIII-freie System konnte dieser Wert nicht ermittelt werden. Der alleinige Zusatz von ATIII bewirkte eine 5%ige Aktivitätshemmung.

4.6. Amidolytische Aktivität des Stuart Prower Faktors

4.6.1. Abhängigkeit von der Konzentration der Prüfsubstanzen

Der Einfluss der Prüfsubstanzen auf Faktor Xa im plasmafreien System wurde mittels chromogener Substrate bestimmt. In allen Versuchsreihen wurden verschiedene Konzentrationen untersucht. Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen vorgestellt.

4.6.1.1. Natürlich vorkommende Huminsäuren

Abbildung 29 zeigt in graphischer Darstellung die Ergebnisse für die natürlich vorkommende Huminsäure **NaHS I-IV/80**, welche im Konzentrationsbereich von 1,56-400 µg/mL untersucht wurde.

Schon im niedrigen Konzentrationsbereich (3,1 µg/mL) findet eine Inhibierung des FXa statt, die mit $5,2 \pm 3,2\%$ gegenüber dem Leerwert signifikant ist. Durch weitere Erhöhung der eingesetzten Konzentration wird der hemmende Einfluss stärker. 67,0 (50,1-89,7) µg/mL verursachen eine 50%ige Aktivitätsminderung des FXa. Bei der höchsten

untersuchten Konzentration von 400 $\mu\text{g/mL}$ wurde die FXa-Aktivität um $80,8 \pm 4,9\%$ reduziert.

Ein der Moorwasser-HS sehr ähnlicher Kurvenverlauf wurde für die 2. natürliche HS von **Aldrich** gefunden (Abb. 29).

Eine signifikante Hemmung von FXa ($9,76 \pm 8,0 \mu\text{g/mL}$) fand hier ab $12,5 \mu\text{g/mL}$ statt. 400 $\mu\text{g/mL}$ bewirkten eine Aktivitätsminderung von $75,4 \pm 4,2 \mu\text{g/mL}$. Der berechnete IC_{50} -Wert liegt mit $83,7 (67,0-104,5) \mu\text{g/mL}$ ebenfalls nahe bei dem der Moorwasser-HS.

4.6.1.2. Synthetische Huminsäure-ähnliche Polymere

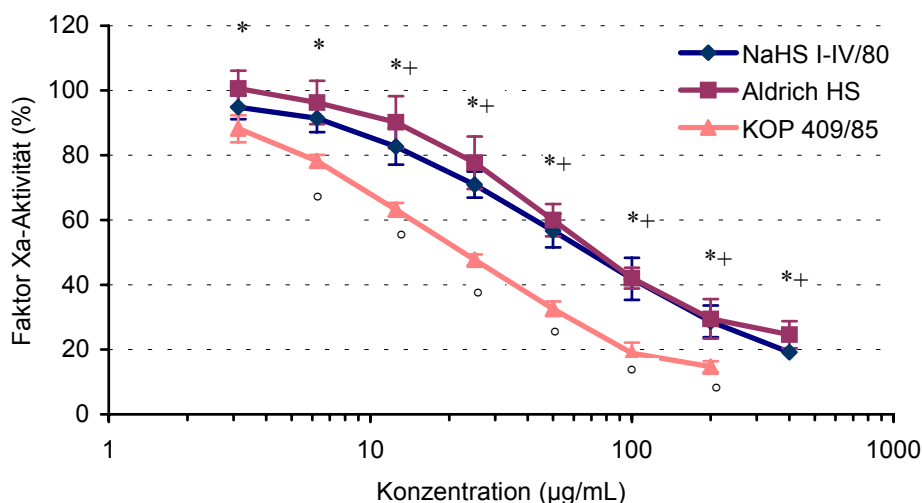


Abb. 29: Einfluss von NaHS I-IV/80 (*), Aldrich HS (+) und KOP 409/85 (°) auf die amidolytische Aktivität von Faktor Xa ($n = 9$)

*;+;° mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Mit einem IC_{50} -Wert von $45,1 (44,3-46,0) \mu\text{g/mL}$ erwies sich **KOP 409/85** in Bezug auf die FXa-hemmende Wirkung als relativ stark wirksam. Abbildung 29 zeigt eine im Konzentrationsbereich von $3,1-400 \mu\text{g/mL}$ abfallende Kurve. Eine Inhibierung von $11,8 \pm 4,2\%$ wurde mit $6,3 \mu\text{g/mL}$ erreicht. Bei einer Konzentration von $200 \mu\text{g/mL}$ besaß der FXa noch eine Restaktivität von $18,9 \pm 3,3\%$. Durch Verdopplung dieser Konzentration wurde nur eine geringfügige Wirkungssteigerung um $5,4 \%$ auf $85,4 \pm 1,7\%$ Inhibierung erreicht.

Einen ebenfalls von der Konzentration abhängigen hemmenden Einfluss auf die FXa-Aktivität besaßen die beiden **Melanoidine M1** und **M42**. Abbildung 30 zeigt für beide Substanzen fast parallel verlaufende und mit zunehmender Konzentration abfallende Kurven.

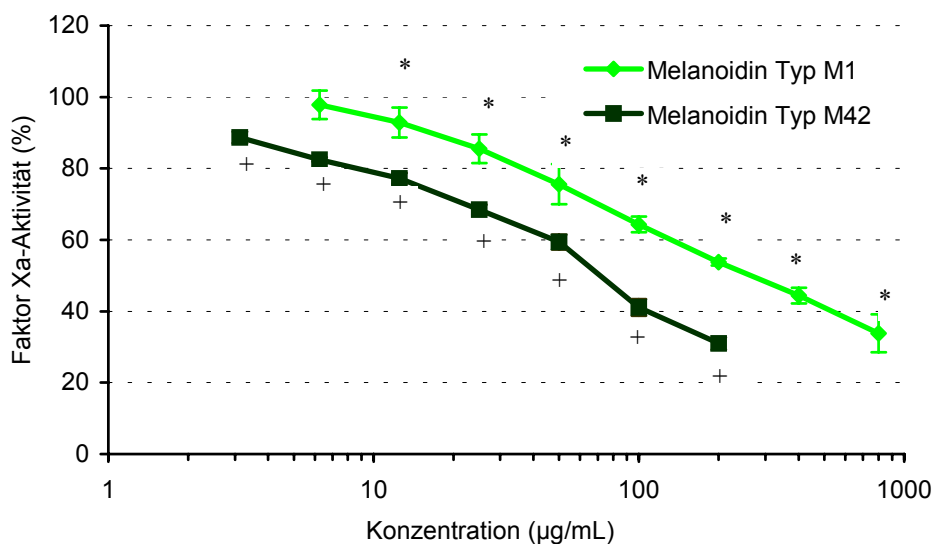


Abb. 30: Einfluss der Melanoidine vom Typ M1 (*) und M42 (+) auf die amidolytische Aktivität von Faktor Xa (n = 9)

*,+ mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Ein Vergleich der IC_{50} -Werte macht die Abhängigkeit der Wirkung von der Struktur deutlich. Durch Verwendung von Glutaminsäure als Ausgangsstoff zur Synthese des Melanoidins M42 wurde ein IC_{50} -Wert von 70,2 (62,0-79,4) µg/mL gegenüber 274,8 (253,2-298,3) µg/mL bei Verwendung der AS Glycin und Phenylalanin erhalten.

50 µg/mL M1 bewirkten eine Hemmung von $24,4 \pm 5,6\%$. Um den gleichen Effekt bei M42 ($22,8 \pm 1,5\%$) zu erzielen, ist mit 12,5 µg/mL nur ein Viertel der Substanz nötig. Diese Struktur-Wirkungsabhängigkeit findet man auch im höheren Konzentrationsbereich. 800 µg/mL M1 reduzieren die FXa-Aktivität um $66,2 \pm 5,3\%$. Die gleiche Wirkung ($69,0 \pm 1,7\%$ Hemmung) wird bei M42 schon mit 200 µg/mL erreicht. Das Melanoidin vom Typ M42 ist damit stärker wirksam.

Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen für die ROS-Substanzen HS 130 und HS 136.

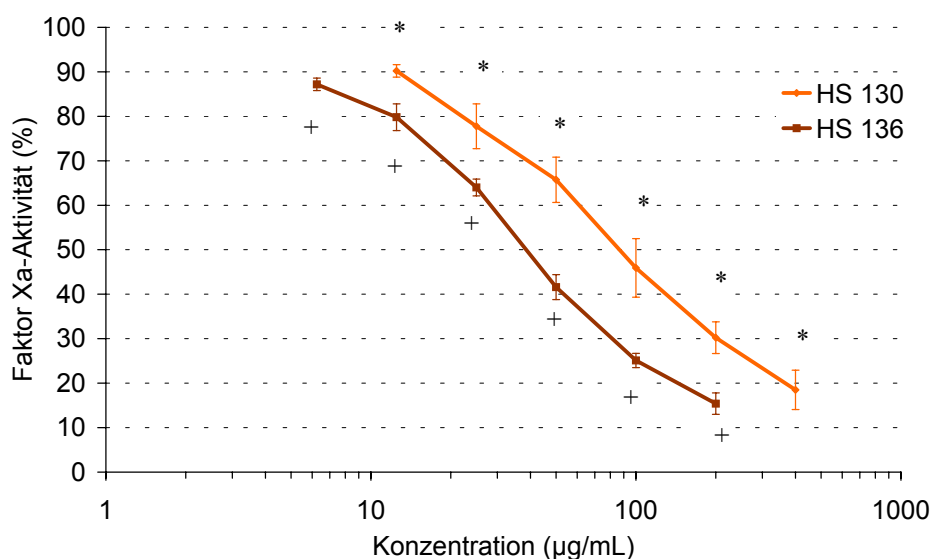


Abb. 31: Einfluss der ROS-Substanzen HS 130 (*) und HS 136 (+) auf die amidolytische Aktivität von Faktor Xa (n = 9)
 *;+ mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Beide Substanzen hemmen in Anhängigkeit von der eingesetzten Konzentration die Aktivität von FXa. Ihre Wirkungsstärke ist, wie an den beiden parallel verlaufenden Kurven zu erkennen, abhängig von der Struktur und der Konzentration.

Für **HS 130** wurde ein IC_{50} -Wert von 88,4 (75,9-102,9) µg/mL berechnet. Damit ist dieser Wert ca. doppelt so hoch wie für die Substanz HS 136 mit 36,5 (35,8-37,3). Ausgehend von einer Inhibierung mit $9,8 \pm 1,4\%$ bei 12,5 µg/mL nimmt die FXa-hemmende Wirkung mit steigender Konzentration zu. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 400 µg/mL besitzt der FXa noch eine Aktivität von $18,5 \pm 4,4\%$.

Vergleicht man diese Konzentrationen mit denen der Substanz **HS 136**, so erkennt man die deutlich stärkere Wirkung von HS 136. 12,5 µg/mL reduzieren die FXa-Aktivität um $20,2 \pm 3,0\%$. Bei 200 µg/mL wird mit $15,4 \pm 2,4\%$ Restaktivität annähernd die Wirkung von 400 µg/mL HS 130 erreicht.

4.6.1.3. Sulfatierte Hyaluronsäuren, Vergleichssubstanzen

HYA PS 10A stellte in dieser Versuchsreihe die am stärksten wirksame Substanz aller untersuchten Prüfsubstanzen dar. Eine 50%ige FXa-Aktivitätshemmung fand schon bei einer Konzentration (IC_{50} -Wert) von 27,4 (22,5-33,2) µg/mL statt. 3,1 µg/mL bewirkten eine FXa-Hemmung von $16,3 \pm 6,4\%$. Eine Konzentrationserhöhung verursachte eine

zunehmende Aktivitätsminderung. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 100 µg/mL besaß der FXa noch eine Restaktivität von $29,6 \pm 4,0\%$ (Abb. 32).

Ein, durch eine im Vergleich zu HYA PS 10A schwächer abfallende Konzentrations-Aktivitätskurve (Abb.32) bedingter, wesentlich höherer IC_{50} -Wert wurde für **HYA DS 48** bestimmt. Der IC_{50} -Wert lag für diese Substanz mit 159,0 (117,3-215,5) µg/mL ca. 6fach höher als für das o.g. sulfatierte Hyaluronsäurederivat. 3,1 µg/mL verursachten hier mit $9,1 \pm 3,8\%$ eine um 7,2% geringere Hemmwirkung gegenüber FXa verglichen mit HYA PS 10A. Eine Konzentrationserhöhung auf 200 µg/mL bewirkte eine Aktivitätshemmung von $53,4 \pm 5,1\%$.

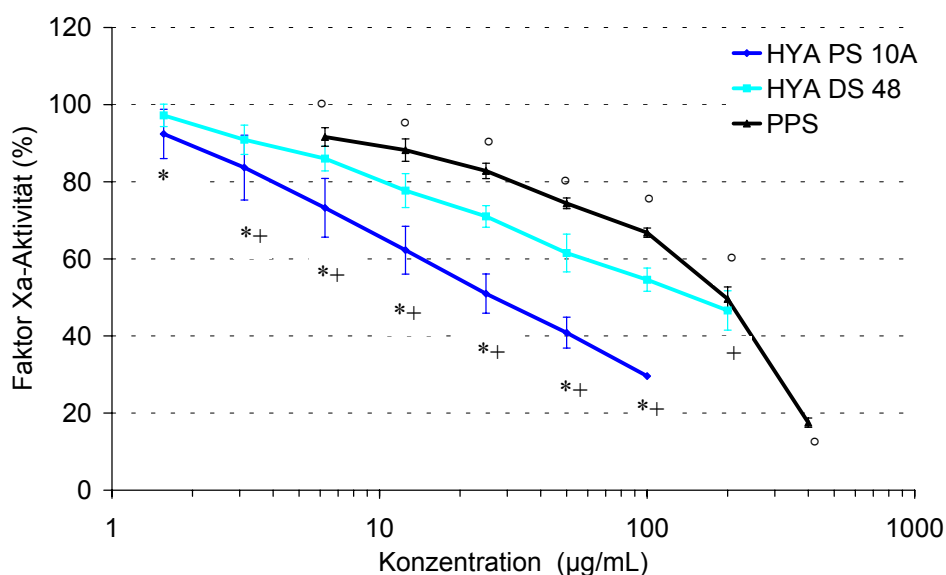


Abb. 32: Einfluss von HYA PS 10A (*), HYA DS 48 (+) und Pentosanpolysulfat (°) auf die amidolytische Aktivität von Faktor Xa (n = 9)

*;+;° mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Die dritte sulfatierte Substanz < **PPS** > zeigte im niedrigen Konzentrationsbereich (bis 50 µg/mL) nur eine allmählich zunehmende Hemmwirkung gegenüber FXa, in Abbildung 32 als langsam abfallende Kurve zu erkennen. Ab 100 µg/mL nahm die inhibierende Wirkung sprunghaft zu, so dass bei 200 µg/mL die FXa-Aktivität schon auf $49,6 \pm 3,1\%$ reduziert wurde. Eine Verdopplung dieser Konzentration führte zu einer nochmaligen Abnahme der Aktivität auf $17,5 \pm 1,2\%$.

Es wurde ein IC_{50} -Wert von 171,7 (166,7-177,0) µg/mL berechnet. Damit stellt PPS eine der am schwächsten wirksamen Substanzen in Bezug auf die FXa-inhibierende Wirkung dar.

4.6.2. Einfluss von Antithrombin III

Dem unter 3.2.2. genannten Versuchsansatz wurde ATIII zugesetzt, um eine Abhängigkeit der Wirkung vom Vorhandensein an ATIII als möglichen Cofaktor zu erkennen. Auch hier wurden zur besseren Vergleichbarkeit beider Versuchsreihen oben rechts in stark verkleinerte Darstellung die unter 4.6.1. beschriebenen Diagramme eingebildet.

4.6.2.1. Natürlich vorkommende Huminsäuren

Aus den Ergebnissen für **NaHS I-IV/80** geht hervor, dass die Wirkung dieser natürlich vorkommenden HS nicht von ATIII abhängig ist. ATIII allein verursachte eine Hemmung von $10,9 \pm 2,6\%$. Addiert man diesen Betrag auf die bestimmten FXa-Restaktivitäten auf, liegen die so erhaltenen Werte im Bereich derer, die ohne Zusatz von ATIII erhalten wurden. Ohne Berücksichtigung dieses Effektes wurde die in Abbildung 33 gezeigte Kurve erhalten. $3,1 \mu\text{g/mL}$ erniedrigen die FXa-Aktivität um $22,0 \pm 4,6\%$. Eine Erhöhung der Konzentration führt zu einer zunehmenden Aktivitätsminderung. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von $50 \mu\text{g/mL}$ wurde die Aktivität um $54,7 \pm 2,1\%$ erniedrigt.

Auch der bestimmte IC_{50} -Wert zeigt, dass mit ATIII keine Wirkungssteigerung erreicht wurde. Er betrug in diesem Versuch $58,7 (44,4-77,6) \mu\text{g/mL}$.

Ebenfalls durch ATIII unbeeinflusst blieb die Wirkung der **Aldrich HS**. Der IC_{50} -Wert entspricht demjenigen Wert, der im ATIII-freien System bestimmt wurde und beträgt $80,0 (76,6-83,5) \mu\text{g/mL}$. In Abbildung 33 ist eine bis $25 \mu\text{g/mL}$ langsam und in Richtung höherer Konzentrationen hin stärker abfallende Kurve zu erkennen. Bis $25 \mu\text{g/mL}$ unterschieden sich die Werte nicht signifikant von dem bei $3,1 \mu\text{g/mL}$ bestimmten Wert. $100 \mu\text{g/mL}$ hemmen den FXa um $60,4 \pm 1,3\%$. ATIII allein verursachte eine Aktivitätsminderung um $12,9 \pm 1,6\%$.

4.6.2.2. Synthetische Huminsäure-ähnliche Polymere

Auch **KOP 409/85** zeigt den für die beiden zuletzt genannten Substanzen typischen Kurvenverlauf. Auch diese Substanz benötigt kein ATIII als Cofaktor.

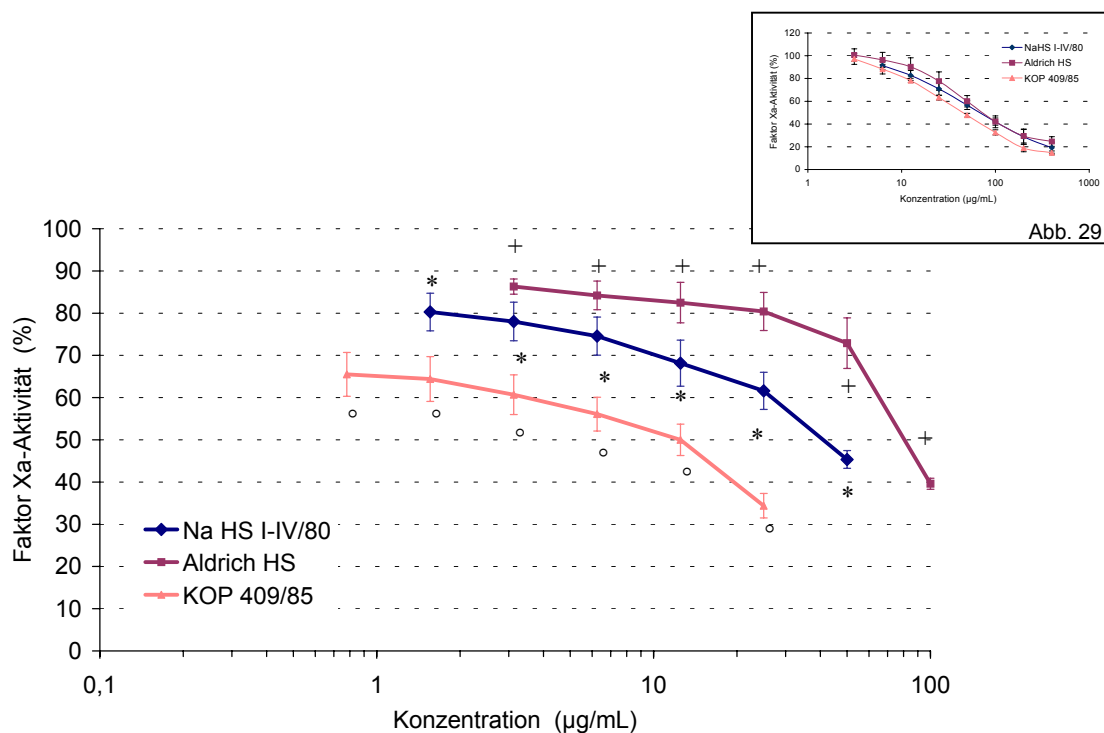


Abb. 33: Einfluss von NaHS I-IV/80 (*), Aldrich HS (+), KOP 409/85 (°) auf die amidolytische Aktivität von Faktor Xa (n = 9), zum Vergleich oben rechts die Wirkung ohne ATIII (Abb. 29)
;;* mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Bis 3,1 µg/mL fällt die Kurve in Abbildung 33 allmählich und ab 6,3 µg/mL stärker ab. Bis zu 3,1 µg/mL unterscheiden sich dabei die Werte nicht signifikant von dem bei 0,5 µg/mL bestimmten Wert. An den Ergebnissen ist weiterhin zu erkennen, dass sich die Einzelwirkungen von KOP und ATIII addiert haben. Die Aktivität von FXa wurde durch ATIII allein schon um $30,1 \pm 3,2\%$ gemindert. Addiert man diesen Wert auf die im Folgenden genannten Werte, erhält man annähernd die Ergebnisse aus der Versuchsreihe ohne ATIII. Das bedeutet im Einzelnen, dass bis zu einer Konzentration von 3,1 µg/mL trotz einer inhibitorischen Gesamtwirkung von $39,3 \pm 4,7\%$ die tatsächliche Hemmwirkung (ca. 9,3%) nur gering ist. Erst in etwas höheren Konzentrationen (25 µg/mL) wird der inhibierende Einfluss stärker. Bei dieser Konzentration besaß der FXa eine Restaktivität von $34,4 \pm 2,9\%$. Der IC_{50} -Wert wurde mit 8,2 (4,5-15,1) µg/mL bestimmt.

Betrachtet man die Ergebnisse der Versuche für die Melanidine Typ M1 und Typ M42 so ist zu erkennen, dass sich auch hier die Gesamtergebnisse additiv aus den Einzel-

wirkungen der Prüfsubstanzen und ATIII allein zusammen setzten. Die Wirkung beider Substanzen ist nicht von ATIII abhängig.

Auch in diesem System erweist sich Typ **M42**, hergestellt mit Glutaminsäure, als die stärker wirksame Verbindung. Der IC_{50} -Wert wurde mit $9,3 (4,2-20,5) \mu\text{g/mL}$ bestimmt. Bei $1,6 \mu\text{g/mL}$ wurde die FXa-Aktivität bereits um $43,9 \pm 4,1\%$ gemindert. Untersuchungen im weiteren Konzentrationsbereich bis $50 \mu\text{g/mL}$ ergaben eine zunehmende Wirkungssteigerung in Richtung höherer Konzentrationen (Abb. 34). Bei $50 \mu\text{g/mL}$ lag die Aktivität von FXa bei $34,1 \pm 2,5\%$. Bei der Ergebnisbetrachtung zu berücksichtigen ist der Betrag von $32,4 \pm 4,4\%$ Inhibition, welcher durch ATIII allein verursacht wurde.

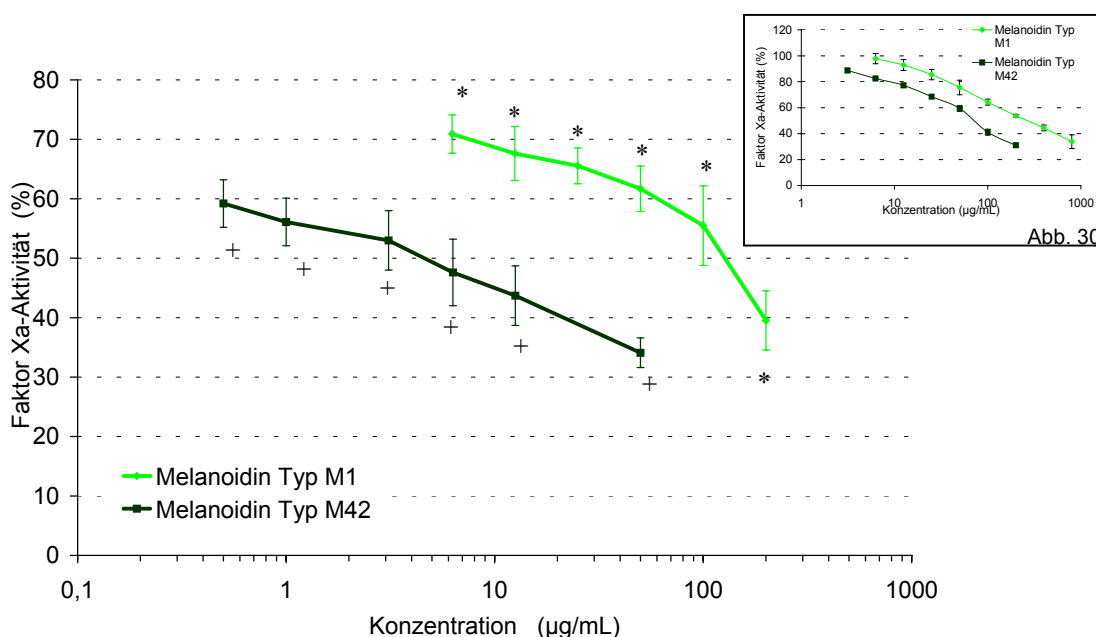


Abb. 34: Einfluss der Melanoidine vom Typ M1 (*) und M42 (+) auf die amidolytische Aktivität von Faktor Xa ($n = 9$, zum Vergleich oben rechts die Wirkung ohne ATIII (Abb.0)
* ; + mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Mit einer etwas schwächeren Gesamtwirkung stellen sich die Ergebnisse des Melanoidines vom Typ **M1** dar (Abb. 34). Der IC_{50} -Wert beträgt $118,6 (87,0-161,7) \mu\text{g/mL}$. Auch hier wurde im Bereich von $6,3-50 \mu\text{g/mL}$ durch eine Konzentrationserhöhung nur eine allmähliche Wirkungssteigerung erreicht. $100 \mu\text{g/mL}$ reduzierten die FXa-Aktivität um $44,5 \pm 6,7\%$. Durch Verdopplung dieser Konzentration wurde eine Hemmung von $60,5 \pm 5,0\%$ erreicht. Auch hier ist ein Betrag von $17,2 \pm 2,8\%$ Hemmung als Eigenwirkung von ATIII bei der Ergebnisbetrachtung zu berücksichtigen.

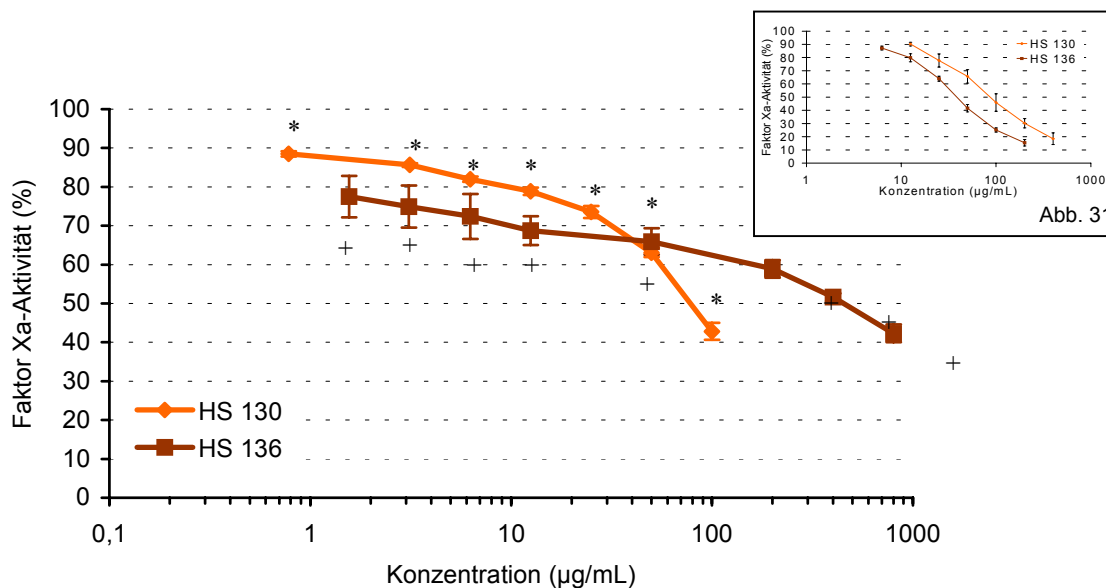


Abb. 35: Einfluss der ROS-Substanzen HS 130 (*) und HS 136 (+) auf die amidolytische Aktivität von Faktor Xa ($n = 9$), zum Vergleich oben rechts die Wirkung ohne ATIII (Abb. 31)
* ; + mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Für **HS 130** konnte, wie für die anderen Huminsäure-ähnlichen Polymere auch, keine Wirkungsverstärkung durch Zusatz von ATIII erreicht werden. Unter Zusatz von ATIII allein wurde der FXa um $9,0 \pm 0,1\%$ in seiner Aktivität gehemmt. Die in Abbildung 35 dargestellten Ergebnisse setzten sich auch hier additiv aus den Einzel-Inhibierungswerten zusammen. Ähnlich wie bei den anderen untersuchten Huminsäure-ähnlichen Substanzen stellt sich hier der Kurvenverlauf in Abbildung 35 dar. Bis $25 \mu\text{g/mL}$ bewirkte die Verdopplung der Konzentration ausgehend von $0,8 \mu\text{g/mL}$ nur einen geringen Anstieg der hemmenden Wirkung. Durch weitere Konzentrationserhöhung kommt es dann zu einem stärkeren Abfall der Kurve, so dass bei $100 \mu\text{g/mL}$ eine Inhibierung von $57,2 \pm 2,2\%$ verursacht wird. Der bestimmte IC_{50} -Wert liegt mit $78,1$ ($73,8$ - $82,7$) $\mu\text{g/mL}$ im Bereich des im ATIII-freien System bestimmten.

Ein etwas anderes Ergebnis wurde für die zweite ROS-Modellsubstanz **HS 136** erhalten. Der Zusatz von ATIII verursachte hier eine Wirkungsverminderung, die am deutlichsten durch den Vergleich der IC_{50} -Werte zu erkennen ist [$36,5$ ($35,8$ - $37,3$) $\mu\text{g/mL}$ ATIII-freies System; $426,7$ ($382,2$ - $476,3$) $\mu\text{g/mL}$ unter Zusatz von ATIII]. Der hier bestimmte Wert liegt ca. 12x höher. Relativ stark sind dabei die Messwerte im höheren Konzentrationsbereiches (ab $50 \mu\text{g/mL}$) betroffen. $200 \mu\text{g/mL}$ reduzierten die FXa-Aktivität um $41,1 \pm 2,3\%$. Damit liegt dieser Wert um die Hälfte niedriger als der entsprechende im ATIII-freien System. Die höchste untersuchte Konzentration von 800

$\mu\text{g/mL}$ bewirkte eine Hemmung von $42,3 \pm 2,3\%$. Ein Vergleich aller bestimmter IC_{50} -Werte lässt HS 136 als die am schwächsten wirksame Substanz bezüglich der FXa-inhibierenden Wirkung erkennen.

4.6.2.3. Sulfatierte Hyaluronsäuren, Vergleichssubstanzen

Abbildung 36 zeigt in graphischer Darstellung die Ergebnisse für HYA PS 10A, HYA DS 48 und PPS.

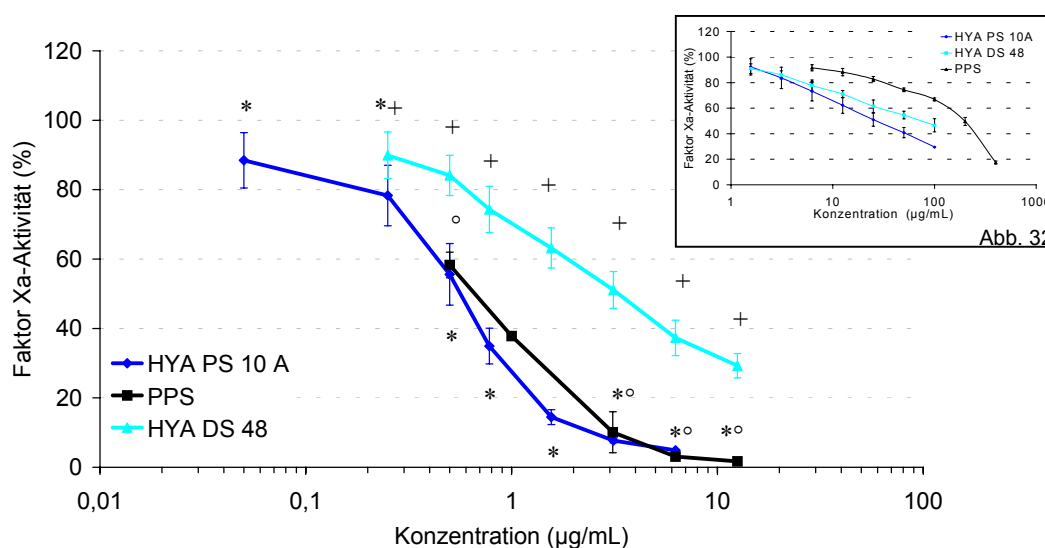


Abb. 36: Einfluss von HYA PS 10A (*), HYA DS 48 (+) und Pentosanpolysulfat (°) auf die amidolytische Aktivität von Faktor Xa ($n = 9$), zum Vergleich oben rechts die Wirkung ohne ATIII (Abb. 32)
;+;° mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Die Wirkung der drei sulfatierten Verbindungen wurde durch ATIII-Zusatz im Sinne einer additiv synergistischen Wirkung verstärkt. In Tabelle 6 sind die ermittelten IC_{50} -Werte aufgelistet.

Tabelle 6: IC_{50} -Werte im ATIII-freien System und unter Zusatz von ATIII

Substanz	ATIII-freies System IC_{50} -Werte in $\mu\text{g/mL}$	unter Zusatz von ATIII IC_{50} -Werte in $\mu\text{g/mL}$
HYA PS 10A	27,4 (22,5-33,2)	0,5 (0,4-0,6)
HYA DS 48	159,0 (117,3-215,5)	3,3 (2,5-4,3)
PPS	171,7 (166,7-177,0)	0,67 (0,61-0,73)

Um in dieser Versuchsreihe 50% der FXa-Aktivität mit **HYA PS 10A** zu hemmen, war ein ca. 55fach niedrigerer Substanzeinsatz nötig. 0,25 µg/mL reduzierten die FXa-Aktivität um $21,7 \pm 8,7\%$. Eine Erhöhung der Konzentration auf 1,6 µg/mL bewirkte eine Aktivitätsminderung um $85,5 \pm 2,2\%$.

Als etwas schwächer wirksam erwies sich auch hier **HYA DS 48**. 0,25 µg/mL verursachten eine Aktivitätshemmung von $10,1 \pm 6,7\%$. Eine Inhibierung von $36,8 \pm 5,8\%$ wurden mit 1,6 µg/mL Substanz erreicht. Die höchste untersuchte Konzentration von 12,5 µg/mL minderte die Aktivität von FXa um $70,7 \pm 3,5\%$. Zur Erreichung der gleichen Wirkung wurde von der Prüfsubstanz HYA PS 10A eine ca. 8fach geringere Konzentration benötigt.

Eine deutliche Verstärkung der inhibierenden Wirkung wurde auch für **PPS** als drittes sulfatiertes Derivat erreicht. Der IC_{50} -Wert beträgt hier ca. 0,39% des im ATIII-freien System bestimmten Wertes. Nur 0,5 µg/mL reduzierten die Aktivität von FXa schon um $41,7 \pm 3,7\%$. Eine $10,1 \pm 5,9\%$ ige Aktivität wurde durch 3,1 µg/mL bewirkt.

4.7. Aktivierte Protein C Aktivität im plasmafreien System

4.7.1. Natürlich vorkommende Huminsäuren

In einem plasmafreien System wurde im Konzentrationsbereich von 3,1-800 µg/mL der Einfluss der natürlich vorkommenden Huminsäure **NaHS I-IV/80** auf APC untersucht. In Abbildung 37 sind die Ergebnisse der Untersuchung graphisch dargestellt, welche zeigen, dass NaHS I-IV/80 in Abhängigkeit von der Konzentration die Aktivität von APC minderte. Erhalten wurde eine eher allmählich abfallende Kurve. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 800 µg/mL fand eine $48,1 \pm 2,8\%$ ige Inhibierung statt. Verglichen mit der durch 3,1 µg/mL bewirkten Aktivitätsminderung von $9,2 \pm 3,7\%$ entspricht dies einer Wirkungszunahme von ca. 38,9%.

Ein ähnlicher Kurvenverlauf wie für NaHS I-IV/80 wurde für die **Aldrich HS** erhalten. Jedoch erwies sich diese Substanz v.a. im niedrigen Konzentrationsbereich als etwas stärker wirksam (Abb. 37).

3,1 µg/mL minderten das APC um $25,9 \pm 2,1\%$ in seiner Aktivität. Eine 8fach höhere Konzentration bewirkte eine Zunahme der inhibierenden Wirkung um $7,3 \pm 1,8\%$. Auch

hier wurde eine langsam abfallende Konzentrations-Wirkungskurve erhalten. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 800 µg/mL besaß das APC noch eine Restaktivität von $50,4 \pm 3,3\%$. Die Aldrich HS lag damit im Wirkungsbereich von NaHS I-IV/80.

4.7.2. Synthetische Huminsäure-ähnliche Polymere

Mit einem IC_{50} -Wert von 145,5 (75,3-180,9) µg/mL stellt das Kaffeesäureoxidaionsprodukt **KOP 409/85** eine der stärker wirksamen Verbindungen in dieser Versuchsreihe dar (Abb.37).

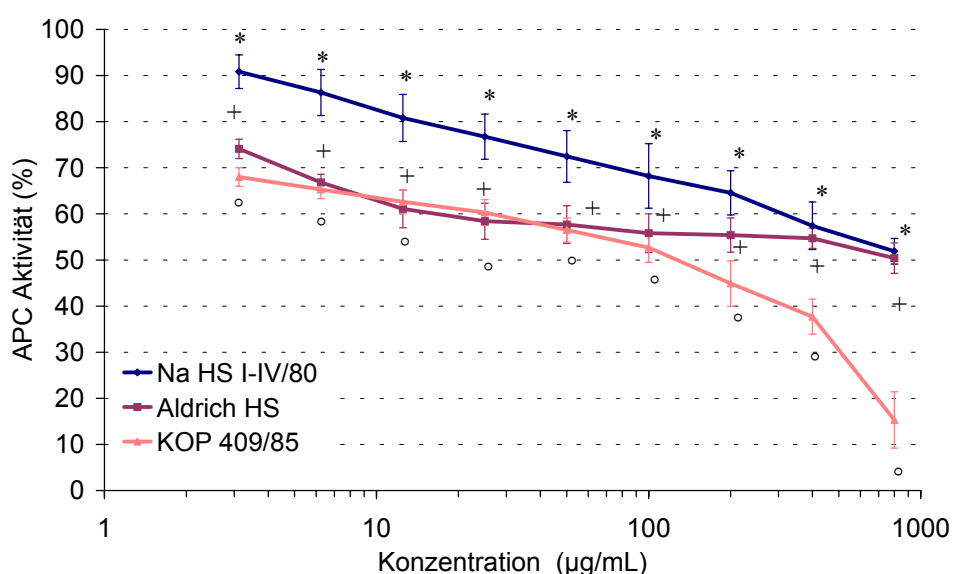


Abb. 37: Einfluss von NaHS I-IV/80 (*), Aldrich HS (+) und KOP 409/85 (°) auf die amidolytische Aktivität von APC im isolierten System (n = 9)
*,+;° mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

3,1 µg/mL bewirkten eine APC-Hemmung von $32,0 \pm 2,0 \%$. Eine anschließende Erhöhung der Konzentration bis 100 µg/mL führte nur zu einer allmählichen Wirkungssteigerung, erkennbar an der flach abfallenden Kurve. Ab einer Konzentration von 200 µg/mL kommt es dann zu einem steileren Kurvenabfall. 800 µg/mL verursachten eine APC-Restaktivität von $15,3 \pm 6,1\%$.

Einen sehr geringen Einfluss auf APC besaß das **Melanoidin Typ M1**. Eine signifikante Hemmung von APC ($4,4 \pm 1,6\%$) fand ab einer Konzentration von 12,5 µg/mL statt. Bis 50 µg/mL fand durch Substanzerhöhung eine Wirkungssteigerung auf $18,1 \pm$

2,9% statt. Im weiteren untersuchten Konzentrationsbereich bis 800 $\mu\text{g/mL}$ wich die inhibierende Wirkung nicht mehr signifikant vom letztgenannten Wert ab (Abb. 38). Ein anderes Konzentrations-Wirkungsverhältnis wurde für das **Melanoidin Typ M42** erhalten. Im Bereich von 1,56-200 $\mu\text{g/mL}$ wurde durch eine Konzentrationserhöhung eine zunehmende Aktivitätsminderung des vorhandenen APC erreicht. 3,1 $\mu\text{g/mL}$ reduzierten die APC-Aktivität um $7,9 \pm 0,4\%$. Eine ca. 7fach stärkere Wirkung wurde mit 200 $\mu\text{g/mL}$ erhalten ($54,7 \pm 0,7\%$ Inhibierung). Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 400 $\mu\text{g/mL}$ bewirkte eine gegenüber dem letztgenannten Wert signifikante Abnahme der hemmenden Wirkung auf $47,3 \pm 2,8\%$. Der IC_{50} -Wert wurde mit 166,8 (162,0-171,9) $\mu\text{g/mL}$ berechnet.

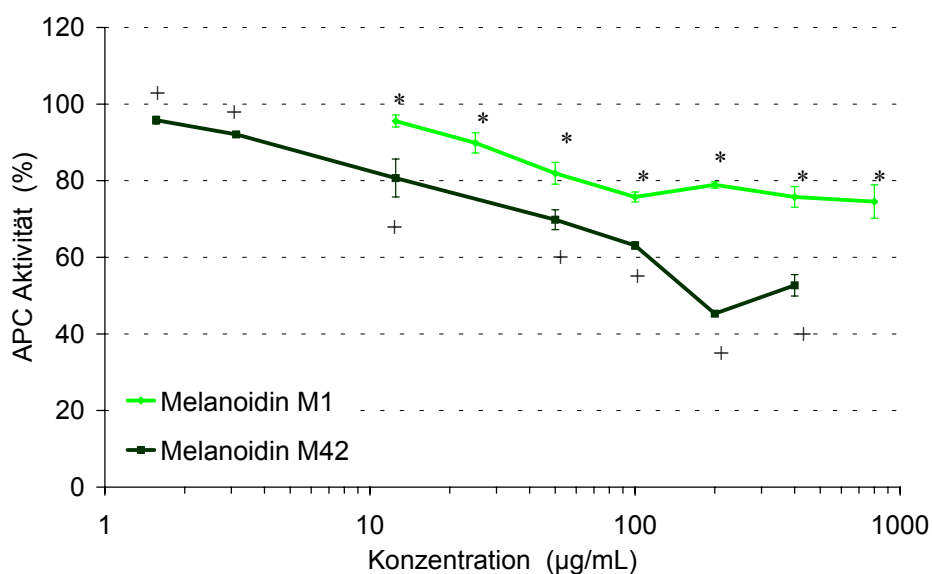


Abb. 38: Einfluss der Melanoidine vom Typ M1 (*) und M42 (+) auf die amidolytische Aktivität von APC im isolierten System ($n = 9$)
 *;+ mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Der Einfluss der ROS-Substanzen **HS 136** und **HS 130** auf APC wird in Abbildung 39 graphisch dargestellt.

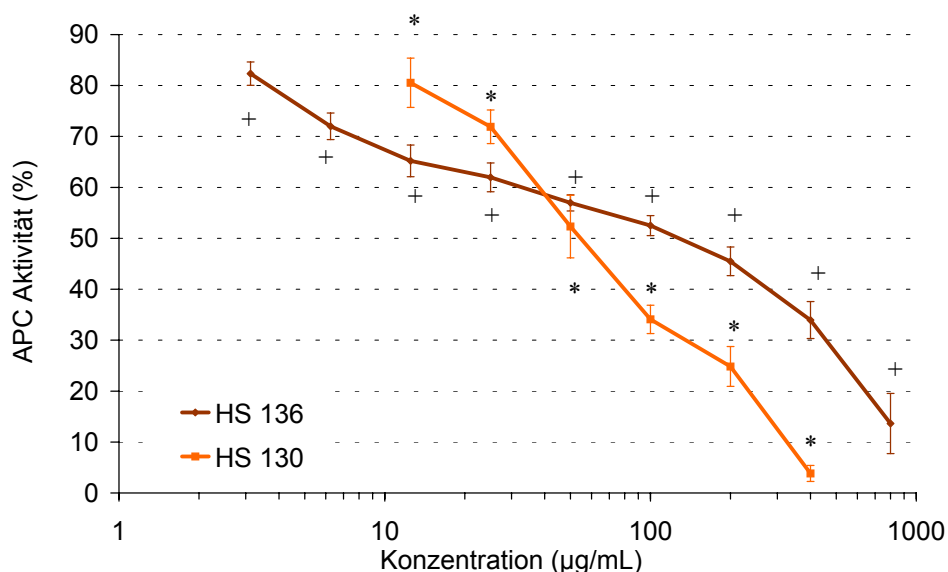


Abb. 39: Einfluss von HS 130 (*) und HS 136 (+) auf die amidolytische Aktivität von APC im isolierten System (n = 9)
 *;+mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Beide Substanzen minderten konzentrationsabhängig die Aktivität von APC. Als stärker wirksam erwies sich dabei HS 130. Ihr IC_{50} -Wert wurde mit 58,8 (49,4-70,0) $\mu\text{g/mL}$ bestimmt. Bereits 12,5 $\mu\text{g/mL}$ reduzierten die APC-Aktivität um $19,5 \pm 4,9\%$. Eine nahezu vollständige Inhibierung wurde mit 400 $\mu\text{g/mL}$ Substanz erreicht. APC besaß hier noch eine Restaktivität von $3,8 \pm 1,6\%$.

Im Vergleich zu HS 130 wurde für HS 136 im Konzentrations-Wirkungsdiagramm eine schwächer abfallende Kurve erhalten. Der IC_{50} -Wert wurde mit 123,1 (96,4-157,3) $\mu\text{g/mL}$ berechnet und liegt damit ca. doppelt so hoch wie für HS 130. Eine signifikante Aktivitätsminderung wurde bereits durch 3,1 $\mu\text{g/mL}$ Substanz bewirkt. 400 $\mu\text{g/mL}$ minderten die Aktivität um $66,1 \pm 3,6\%$. Durch Verdopplung dieser Konzentration wurde eine Wirkungszunahme um 20,3 % erreicht. Dies entsprach einer APC-Restaktivität von $13,6 \pm 5,9\%$.

4.7.3. Sulfatierte Hyaluronsäurederivate, Vergleichssubstanzen

In die Versuche mit einbezogen wurden die 3 sulfatierten Verbindungen **HYA PS 10A**, **HYA DS 48** und **PPS**.

Abbildung 40 zeigt 3 nahezu parallel verlaufende und nur sehr schwach abfallende Kurven. Ein IC_{50} -Wert konnte im untersuchten Konzentrationsbereich für keine der 3 Verbindungen bestimmt werden.

Die beiden sulfatierten Hyaluronsäurederivate durchlaufen jeweils ein Wirkungsmaximum, welches für HYA DS 48 mit $70,0 \pm 6,5\%$ bei $100 \mu\text{g/mL}$ und für HYA PS 10A mit $69,1 \pm 1,6\%$ bei $200 \mu\text{g/mL}$ liegt. Ausgehend von $1,56 \mu\text{g/mL}$ und einer Aktivitätsminderung von $13,9 \pm 1,8\%$ für HYA DS 48 und $88,5 \pm 3,1\%$ für HYA PS 10A findet bei Erhöhung der Konzentration nur eine Annäherung auf diese Maximalwerte statt. Im weiteren Kurvenverlauf nimmt die inhibierende Wirkung ab.

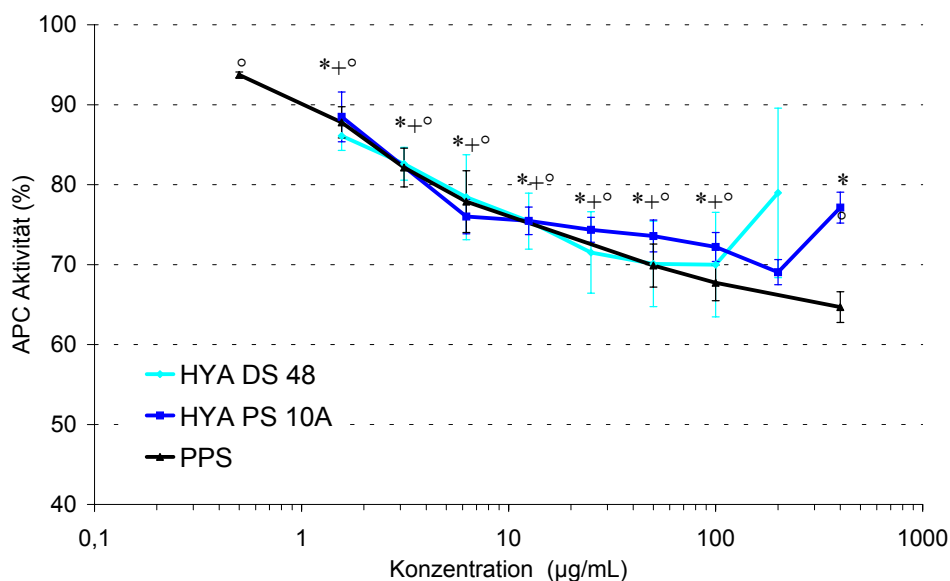


Abb. 40: Einfluss von HYA PS 10A (*), HYA DS 48 (+) und PPS (°) auf die amidolytische Aktivität von APC im isolierten System ($n = 9$)
 *;+mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Ähnlich ist die Wirkung bei PPS. Bereits $0,5 \mu\text{g/mL}$ bewirkten signifikante Verminderungen der APC-Aktivität ($6,3 \pm 0,4\%$). Durch Erhöhung der Konzentration bis auf $400 \mu\text{g/mL}$ wurde eine Wirkungszunahme von $29,0\%$ bewirkt. Dies entspricht einer Restaktivität von $64,7 \pm 1,9\%$.

4.8. Beeinflussung der Protac[®] Aktivierung von Protein C im plasmafreien System

4.8.1. Aktivierung von Protein C

Der Einfluss der Prüfsubstanzen auf PC wurde im plasmafreien System untersucht, um auszuschließen, dass die Prüfsubstanzen selbst PC aktivieren. Eine derartige Eigen-

schaft der Prüfsubstanzen müsste bei dem unter Punkt 3.2.3.2. genannten Versuch berücksichtigt werden.

Im Ergebnis wurde in diesem Untersuchungssystem für keine der Verbindungen eine aktivierende Wirkung nachgewiesen.

4.8.2. Abhängigkeit von der Konzentration der Prüfsubstanzen

4.8.2.1. Natürlich vorkommende Huminsäuren

Abbildung 41 zeigt, dass **Na HS I-IV/80**, in Abhängigkeit von der untersuchten Konzentration, die Aktivierung von PC durch Protac[®] beeinflusst. Mit zunehmender Konzentration wurde der Anteil an entstandenen APC geringer. 6,25 µg/mL verringern den Anteil entstehenden APCs um $17,3 \pm 1,6\%$. Nach Zusatz von 59,3 µg/mL HS wurden nur noch 50% PC aktiviert (IC_{50} -Wert = 59,3 (55,8-63,0) µg/mL). Eine fast vollständige Hemmung der Aktivierung wurde durch 400 µg/mL erreicht. Bei dieser Konzentration wurden noch $11,6 \pm 0,5\%$ APC gebildet.

Ein der Moorwasser HS <Na HS> ähnliches Konzentrations-Wirkungsprofil wurde mit der **Aldrich HS** erhalten (Abb. 41). Der IC_{50} -Wert beträgt 23,0 (17,1-30,8) µg/mL. Mit 200 µg/mL wurde die APC-Aktivität nahezu vollständig aufgehoben (APC-Restaktivität: $8,8 \pm 5,0\%$).

4.8.2.2. Synthetische Huminsäure-ähnliche Polymere

KOP bewirkte eine mit zunehmender Konzentration geringer werdende Bildung von APC. Der IC_{50} -Wert wurde mit 14,4 (12,7-16,3) µg/mL bestimmt. Eine nahezu vollständige Aufhebung der PC-Aktivierung wurde durch KOP schon mit 100 µg/mL (APC-Restaktivität: $9,1 \pm 0,5\%$) bewirkt.

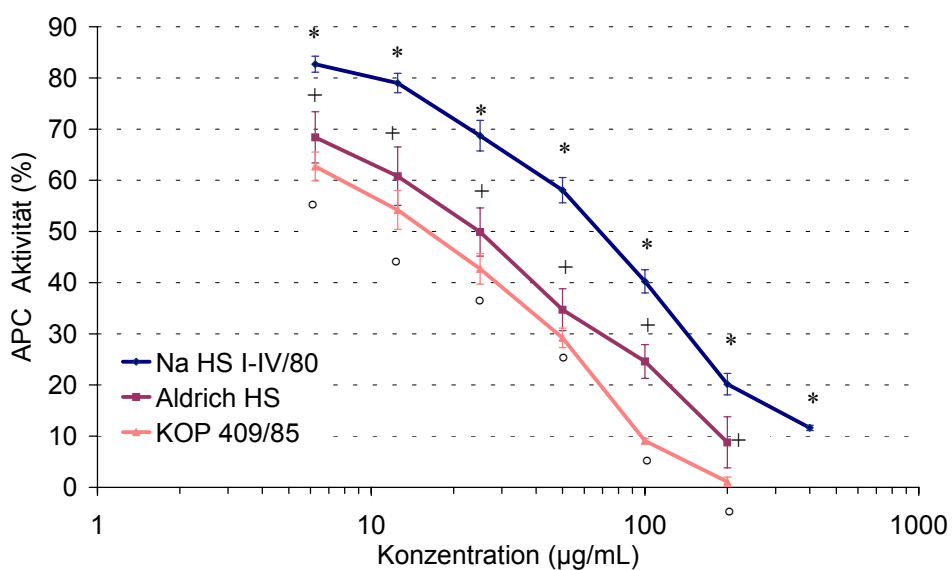


Abb. 41: Einfluss von NaHS I-IV/80 (*), Aldrich HS (+) und KOP 409/85 (°) auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC im isolierten System (n = 9)
 *;+;° mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Eine ebenfalls schon in geringer Konzentration auftretende und die Aktivierung hemmende Wirkung besaßen die beiden **Melanoidine M1** und **M42** (Abb.42).

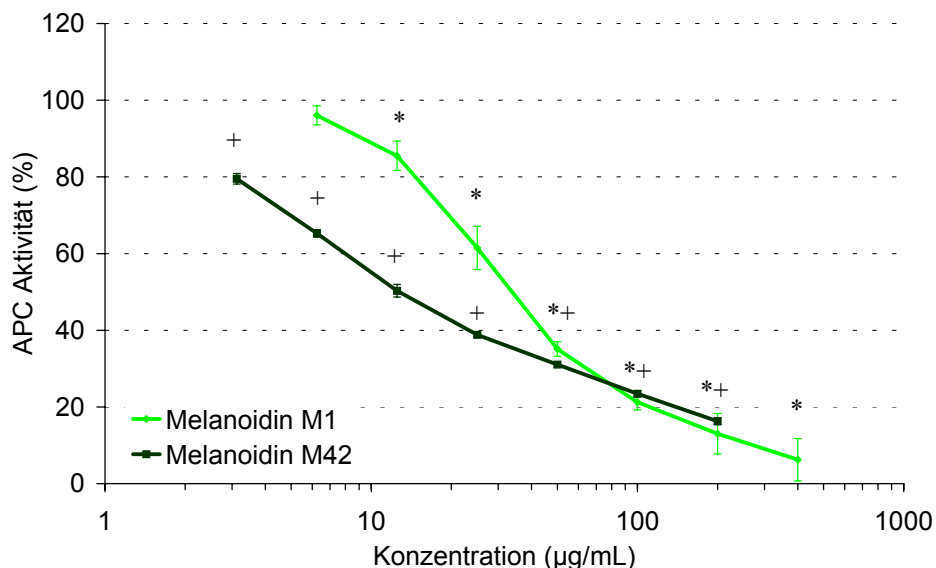


Abb. 42: Einfluss der Melanoidine vom Typ M1 (*) und Typ M42 (+) auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC im isolierten System (n = 9)
 *;+ mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

Dabei erwies sich das mit der sauren AS hergestellte Melanoidin im niederen Konzentrationsbereich bis 50 µg/mL als stärker wirksam. Ab 50 µg/mL verlaufen anschließend beide Konzentrations-Wirkungskurven annähernd parallel. So wurde durch die Zugabe von 200 µg/mL Prüfsubstanzlösung die Aktivierung von PC bei M1 um $87,0 \pm 5,3\%$ und bei M42 um $83,7 \pm 0,8\%$ reduziert. Die berechneten IC_{50} -Werte betragen für M1 $33,5$ ($30,9-36,2$) µg/mL und für M42 $25,2$ ($16,6-38,3$) µg/mL.

Untersucht wurde der Einfluss der ROS-Substanzen **HS 130** und **HS 136**.

Auch hier wurde für beide Substanzen eine die PC-Aktivierung hemmende Wirkung gefunden (Abb. 43).

HS 130 erwies sich anfänglich im Bereich bis 25 µg/mL im Vergleich zu HS 136 als stärker wirksam. Bereits 12,5 µg/mL minderten die Aktivierung um $23,2 \pm 6,1\%$. Im weiteren Konzentrationsverlauf ergab sich jedoch eine für HS 136 stärker abfallende Kurve. Eine Konzentration von 100 µg/mL verringerte die Bildung von APC um $87,4 \pm 2,6\%$. Für HS 136 lag dieser Wert bei der gleichen Konzentration ca. 13% niedriger. Der IC_{50} -Wert beträgt für HS 130 $28,6$ ($26,8-30,6$) µg/mL. Für HS 136 wurde er mit $35,2$ ($31,4-39,5$) µg/mL berechnet.

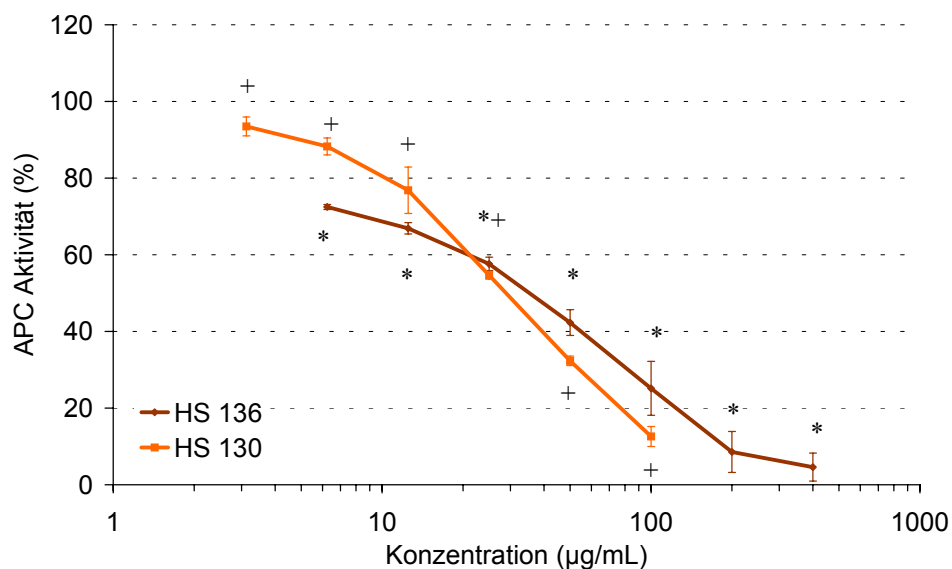


Abb. 43: Einfluss der ROS-Substanzen HS 136 (*) und HS 130 (+) auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC im isolierten System (n = 9)
 *;+ mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

4.8.2.3. Sulfatierte Hyaluronsäurederivate, Vergleichssubstanzen

Ein von den bisher vorgestellten Substanzen abweichendes Konzentrations-Wirkungsprofil wurde für die sulfatierten Verbindungen HYA PS 10A, HYA DS 48 und PPS erhalten.

Im Konzentrationsbereich von 0,5-400 µg/mL wurde für alle Verbindungen eine nur allmählich abfallende Kurve erhalten. Bei der größten untersuchten Konzentration von 400 µg/mL wurde durch HYA PS 10A die Aktivierung von PC um $34,1 \pm 0,2\%$, durch HYA DS 48 um $22,9 \pm 2,7\%$ und durch PPS um $39,2 \pm 1,9\%$ verringert.

Im Vergleich zu der natürlich vorkommenden HS und den Huminsäure-ähnlichen Substanzen ist die Wirkung der sulfatierten Verbindungen in Bezug auf die aktivierungshemmende Wirkung gering (Abb. 44).

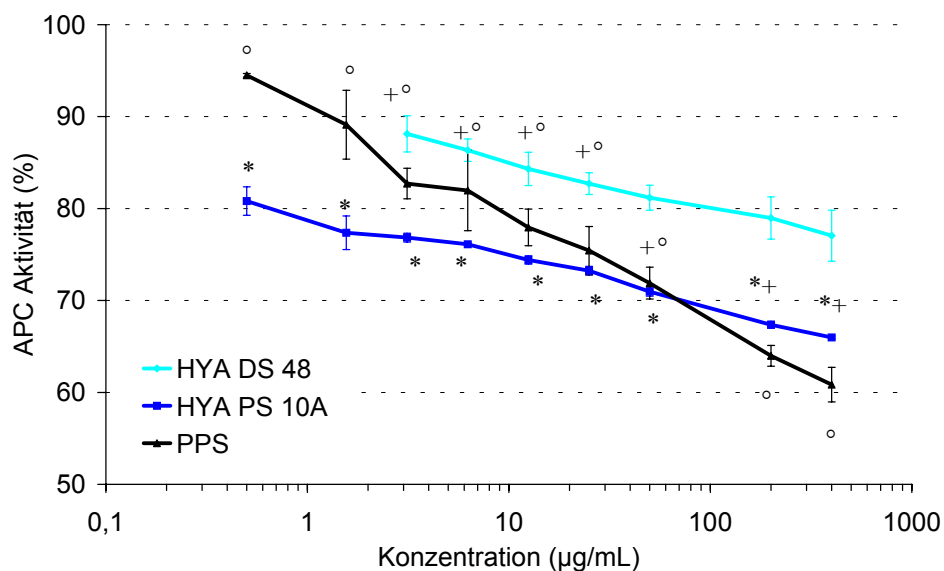


Abb. 44: Einfluss von HYA PS 10A (*), HYA DS 48 (+) und PPS (°) auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC im isolierten System (n = 9)

*;+;° mit $p < 0,05$ signifikant gegen den Leerwert

4.9. Aktivierte Protein C Aktivität im Humanplasma

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Untersuchungen am PC-Antikoagulationssystem in Humanplasma vorgestellt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte, als bei 405 nm gemessene Extinktion und als „% Gesamtzymaktivität“. Die in der Ergebnisbeschreibung vorgenommene Angabe als „% APC-Aktivität“, wurde nur für einzelne auswertbare Messwerte verwendet. Sie bezieht sich auf 100% Protac[®]-

Aktivierung von PC. Auf eine generelle Darstellung der Ergebnisse als „% APC-Aktivität“ in den Diagrammen wurde verzichtet, da eine durch die Testsubstanzen verursachte unspezifische Aktivität eine zusätzliche Substratspaltung bewirkte, die zu einer Fehlinterpretation führen würde.

In den Diagrammen wurden sowohl die bei 405 nm gemessenen Extinktionen als auch die daraus errechneten Gesamtzymaktivitäten in % gegen die Testsubstanzkonzentrationen aufgetragen. Dabei wurden pro Substanz 2 Graphen erstellt (Abb. 45). Die gestrichelte Linie stellt die *tatsächlich gemessene* Extinktion (E_G) abzgl. der Eigenfarbe der Testsubstanzen dar. Sie setzt sich zusammen aus der *Mindestmenge an im Reaktionsansatz enthaltenem APC* (E_{APC}) und der *maximal möglichen* unspezifischen Aktivierung (E_A). Die durchgehende Linie ist die um die Eigenfarbe der Testsubstanzen und den Anteil an maximal möglicher Aktivierung, ermittelt aus den Blankwerten, *geminderte* Extinktion E_{APC} .

Der Reaktionsverlauf lässt sich grob in 3 Bereiche aufteilen (Abb. 45).

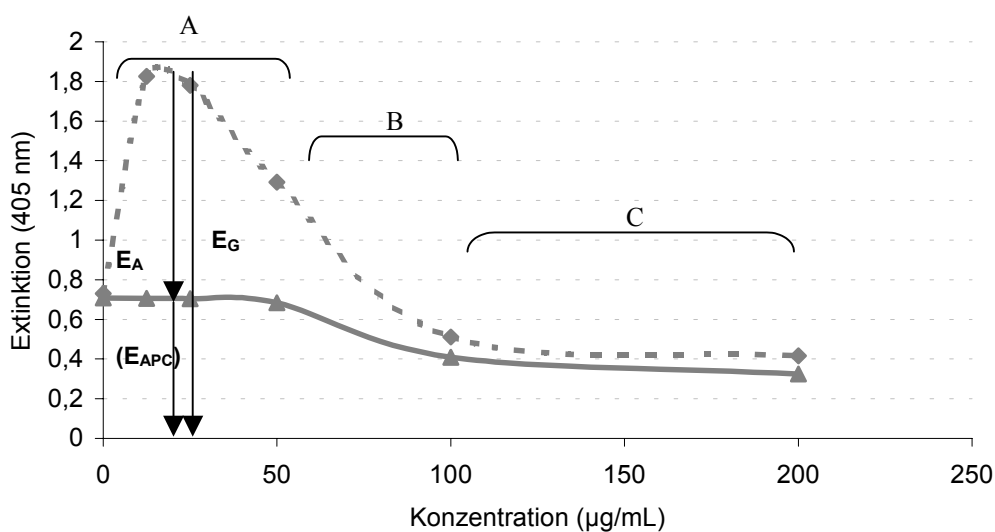


Abb. 45: Einfluss der Testsubstanzen auf APC in Humanplasma – schematische Darstellung eines möglichen Kurvenverlaufes, E_G : tatsächlich gemessene Extinktion, E_{APC} : Mindestmenge an im Reaktionsansatz enthaltenem APC, E_A : maximal möglicher Anteil an unspezifischer Aktivierung,
 A) Die unspezifische Aktivierungswirkung der Testsubstanzen überwiegt gegenüber der die APC-Aktivität hemmenden Wirkung. Auch unter der Annahme, dass die Testsubstanzen eine maximal mögliche Aktivierung bewirken, bleibt eine Restaktivität von 70-100% APC.
 B) In diesem Bereich ist eine Aussage, welche Wirkung überwiegt, nicht möglich
 C) Die unspezifische Aktivierungswirkung der Testsubstanzen ist sehr gering gegenüber der APC hemmenden Wirkung. Die APC-Aktivität bewegt sich

zwischen E_{APC} für den Fall einer gleichzeitig stattfindenden unspezifischen Aktivierung und E_G für den Fall einer ausschließlich APC hemmenden Wirkung.

Aussagekräftig sind zum einen Bereiche, für welche eine tatsächliche APC-Aktivität von 70 bis 100% erhalten wurde, da diese Grenzen aus diagnostischer Sicht dem sog. Normalbereich entsprechen und zum anderen Konzentrationsbereiche geringer unspezifischer Aktivierung, in welchen von einer überwiegenden Hemmung ausgegangen werden kann.

Diese allgemeinen Aussagen sind sowohl für die Versuche „Hemmung von APC in Plasma“ als auch für die Untersuchung der „Beeinflussung der Protac-vermittelten PC-Aktivierung in Plasma“ gültig.

4.9.1. Natürlich vorkommende Huminsäuren

Der Einfluss beider natürlicher HS auf APC in Plasma ist gering.

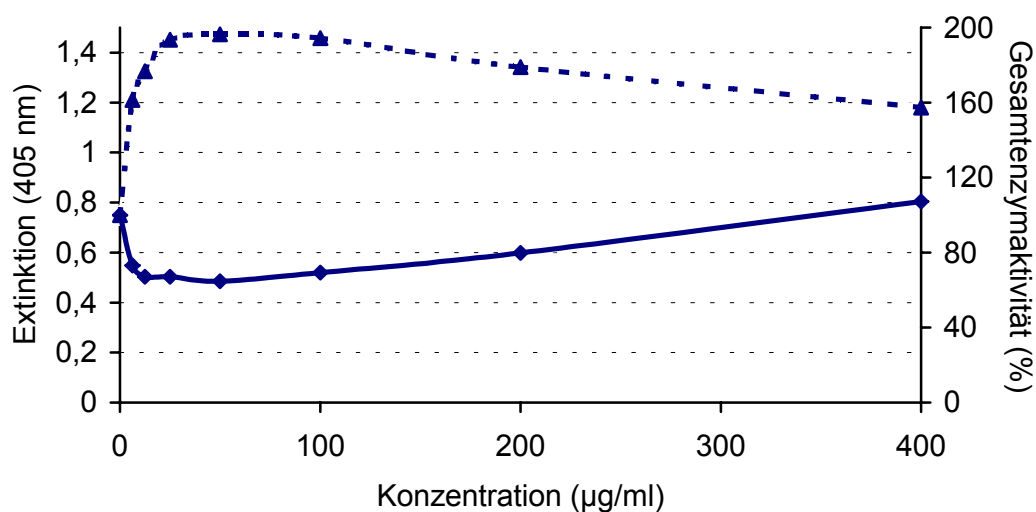


Abb. 46: Einfluss von NaHS I-IV/80 auf die Hemmung von APC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=9$))

Bis zu einer Konzentration von 6,3 µg/mL **NaHS I-IV/80** liegt die APC-Aktivität mit mindestens 73% noch im Normalbereich. Bis 50 µg/mL nimmt die APC hemmende Wirkung bis auf einen Wert von maximal 35% Inhibition zu. Eine weitere Konzentrationserhöhung auf 400 µg/mL hatte keine stärker inhibierende Wirkung zur Folge. Nahezu 100% APC-Aktivität blieben erhalten. Da auch die unspezifische Aktivierung

bei 50 µg/mL ihr Maximum erreicht, ist von einer eher geringer als angegebenen inhibierenden Wirkung der NaHS auszugehen (Abb. 46).

Einen geringeren Einfluss als NaHS auf die APC-Aktivität besaß die **Aldrich HS** (Abb.47). Bis 100 µg/mL blieb die APC-Aktivität nahezu unbeeinflusst. Die unspezifische Aktivierung war in diesem Bereich stärker als die inhibierende Wirkung. Auch durch Erhöhung der Konzentration auf 200 µg/mL blieb eine Restaktivität von mindestens 84% APC erhalten. Mit zunehmender Konzentration nahm dann der Anteil an unspezifischer Aktivierung ab. 800 µg/mL hemmten APC um 35-50%. Verglichen mit NaHS besaß die Aldrich HS im Konzentrationsbereich von 6,3-50 µg/mL deutlich stärker aktivierende Eigenschaften.

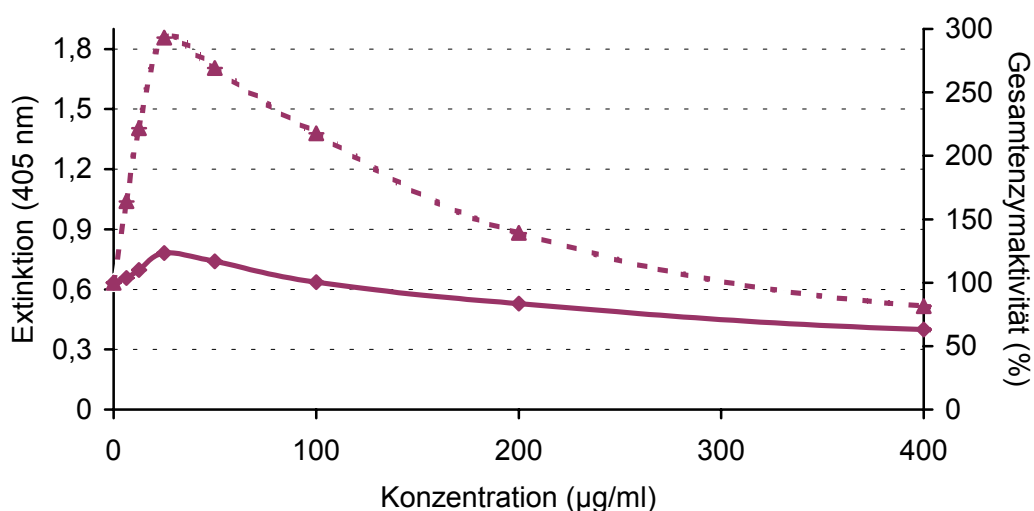


Abb. 47: Einfluss von Aldrich HS auf die Hemmung von APC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), (n=9)

4.9.2. Huminsäure-ähnliche Polymere

Durch **KOP 409/85** blieb die APC-Aktivität bis zu einer Konzentration von 100 µg/mL nahezu unbeeinflusst. 200 µg/mL minderten die Aktivität um maximal 20%. Der Anteil an unspezifischer Aktivierung wurde ab dieser Konzentration deutlich geringer. Bei 400 µg/mL lag die inhibierende Wirkung zwischen 26 und 38%. Durch Erhöhung der Konzentration auf 800 µg/mL wurde die Inhibition auf Werte zwischen 55 und 60% gesteigert (Abb. 48).

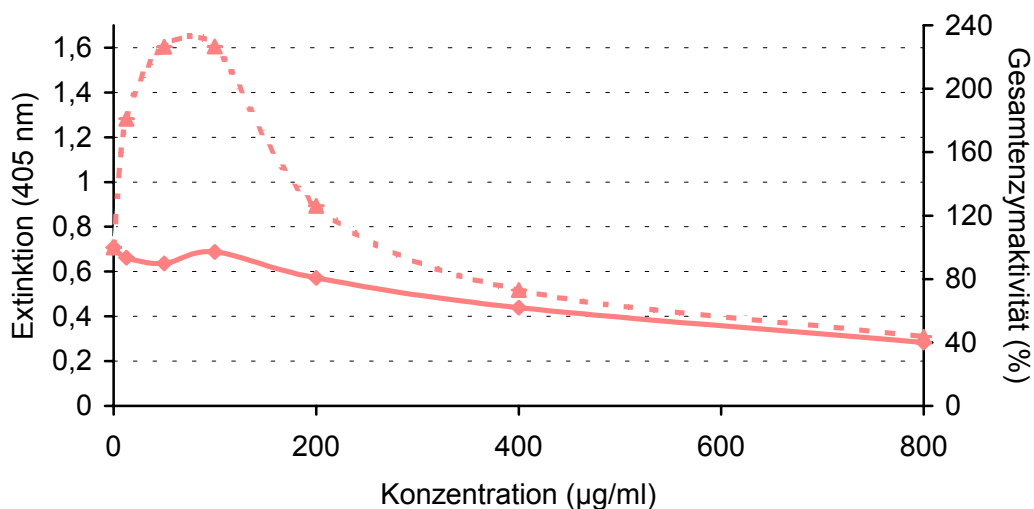


Abb. 48: Einfluss von KOP 409/85 auf die Hemmung von APC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=9$))

Die Abbildungen 49 und 50 zeigen die Diagramme für die Melanoidine vom Typ M1 und M42.

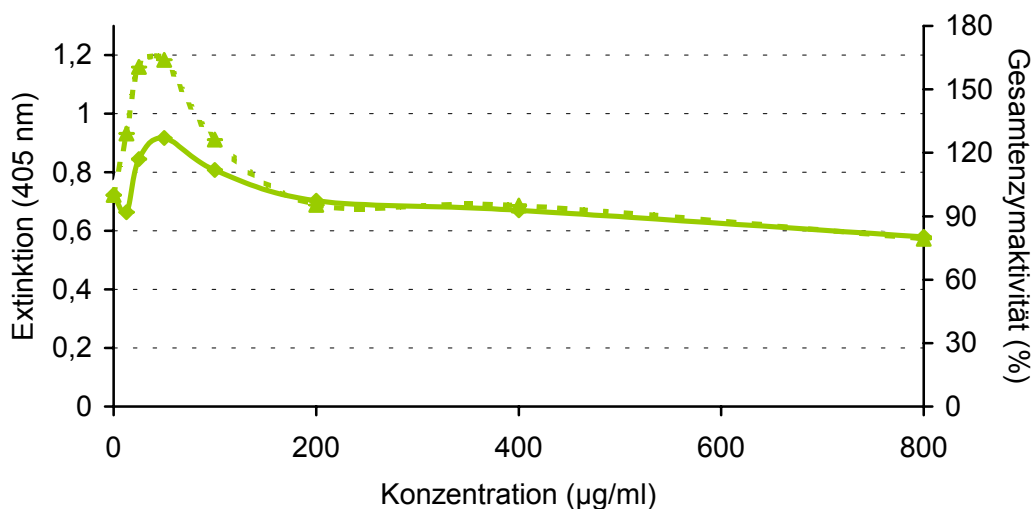


Abb. 49: Einfluss des Melanoidins vom Typ M1 auf die Hemmung von APC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=9$))

Das **Melanoidin Typ M1** zeigte einen sehr geringen Einfluss auf APC. Bis 200 µg/mL überwog die unspezifische Aktivierungswirkung. Die APC-Aktivität wurde nicht gemin-

dert. Auch die höchste untersuchte Konzentration von 800 µg/mL zeigte nur eine inhibierende Wirkung zwischen 18 und 20%. Ab 100 µg/mL nahm der Anteil unspezifischer Aktivierung deutlich ab (Abb.49).

Eine stärker aktivitätsmindernde Wirkung besaß das mit der sauren AS hergestellte **Melanoidin vom Typ M42** (Abb.50). Bis 50 µg/mL konnte keine APC hemmende Wirkung gemessen werden. Mit dem geringer Werden der aktivierenden Eigenschaften nahm dann ab 100 µg/mL die inhibierende Wirkung zu. Die Aktivität von APC wurde bei dieser Konzentration um 28-42% verringert. Die Verdopplung der Konzentration führte zu einer Erhöhung der inhibierenden Wirkung auf 41-54%. Verglichen mit dem Melanoidin Typ M1 besitzt das Melanoidin M42 im Konzentrationsbereich von 6,3-50 µg/mL wesentlich stärker aktivierende Eigenschaften.

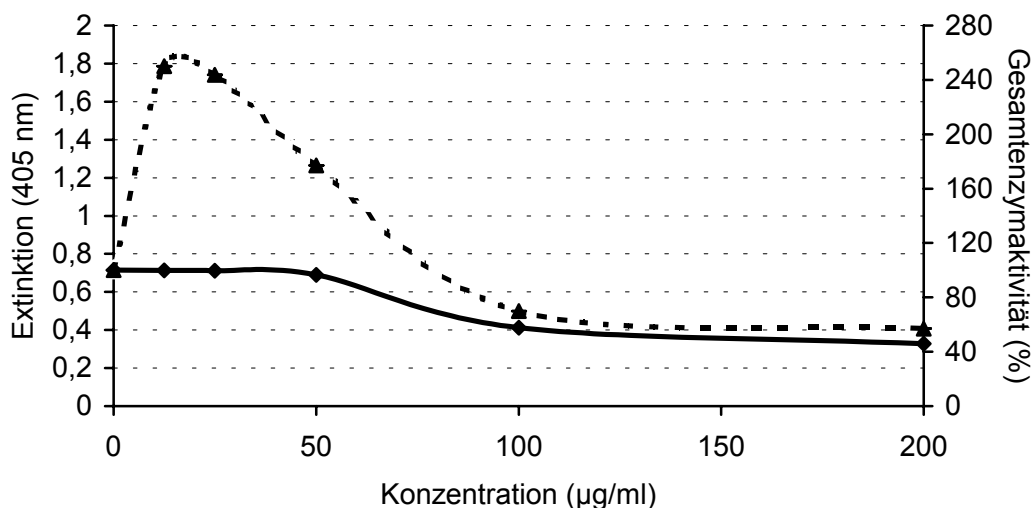


Abb. 50: Einfluss des Melanoidins vom Typ M42 auf die Hemmung von APC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=9$))

Auch bei den beiden untersuchten ROS-Substanzen besaß die mit der sauren AS hergestellte Verbindung **HS 130** die stärker APC inhibierende Wirkung (Abb. 51). Bis 50 µg/mL blieb die APC-Aktivität nahezu unbeeinflusst. Mit ab 100 µg/mL abnehmenden Anteil an unspezifischer Aktivierung nahm die APC inhibierende Wirkung zu. Die bei 100 µg/mL gemessene Restaktivität APC lag mit 74-83% noch im Normalbereich. Eine Konzentrationserhöhung auf 200 µg/mL führte zu einer APC-Inhibierung von 54-59%.

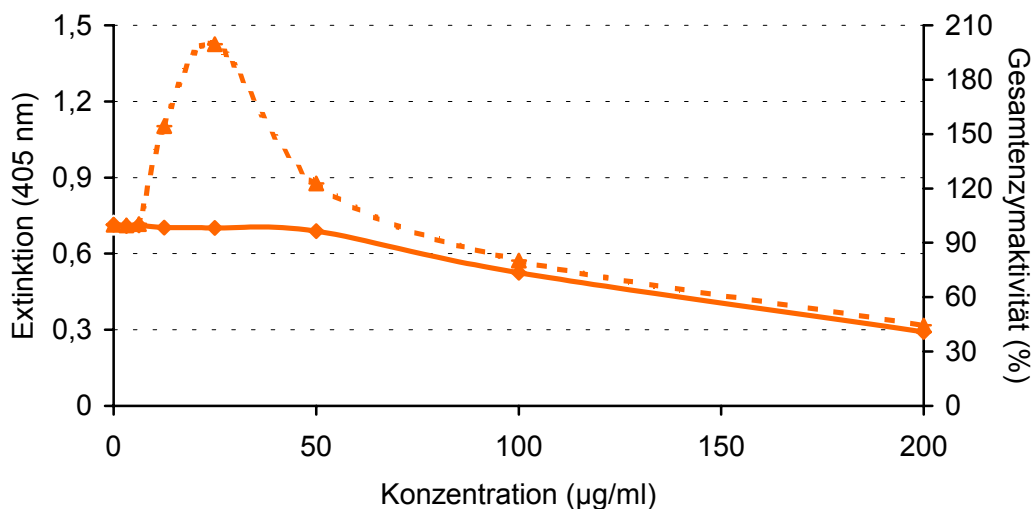


Abb. 51: Einfluss von HS 130 auf die Hemmung von APC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=9$))

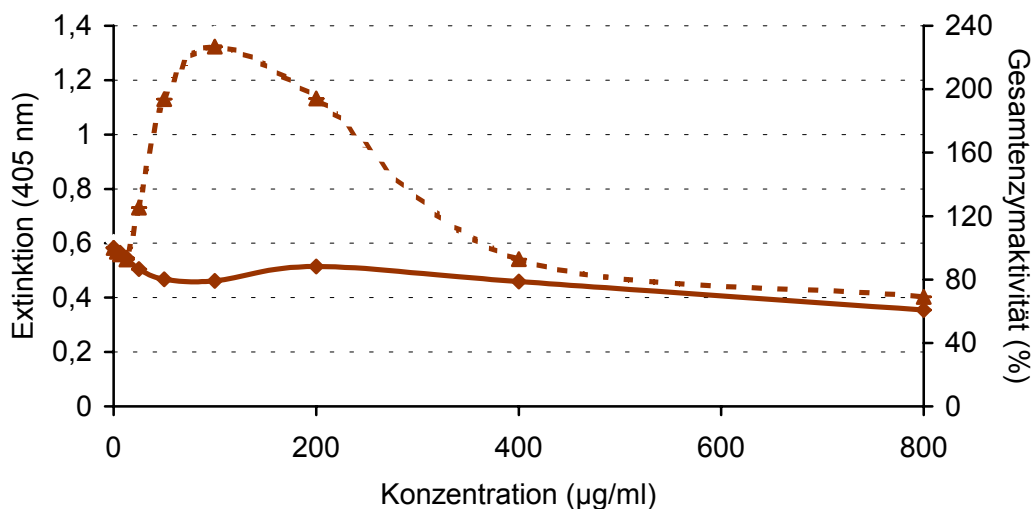


Abb. 52: Einfluss von HS 136 auf die Hemmung von APC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=9$))

HS 136 hatte einen deutlich geringeren Einfluss auf APC (Abb. 52). Bis 200 µg/mL nahm die APC-Aktivität auf maximal 88% ab. Auch bei 400 µg/mL lag die APC-Restaktivität mit mindestens 79% noch im Normalbereich. 800 µg/mL verursachten eine Inhibition zwischen 29 und 39%.

Beide Verbindungen besaßen quantitativ gleichermaßen stark aktivierende Eigenschaften, die für HS 130 im Konzentrationsbereich zwischen 12-50 µg/mL und für HS 136 zwischen 25 und 200 µg/mL lagen.

4.9.3. Sulfatierte Hyaluronsäurederivate, Vergleichssubstanzen

Der Einfluss der untersuchten sulfatierten Verbindungen auf APC ist gering. Alle 3 Substanzen zeigten über einen breiten Konzentrationsbereich starke aktivierende Eigenschaften. Bei HYA PS 10A konnte auch bei 400 µg/mL noch keine Abnahme dieser beobachtet werden.

Durch den Zusatz von **HYA DS 48** zum Reaktionsansatz wurde die APC-Aktivität durch stufenweise Konzentrationserhöhung auf 400 µg/mL um maximal 24% gemindert (Abb.53).

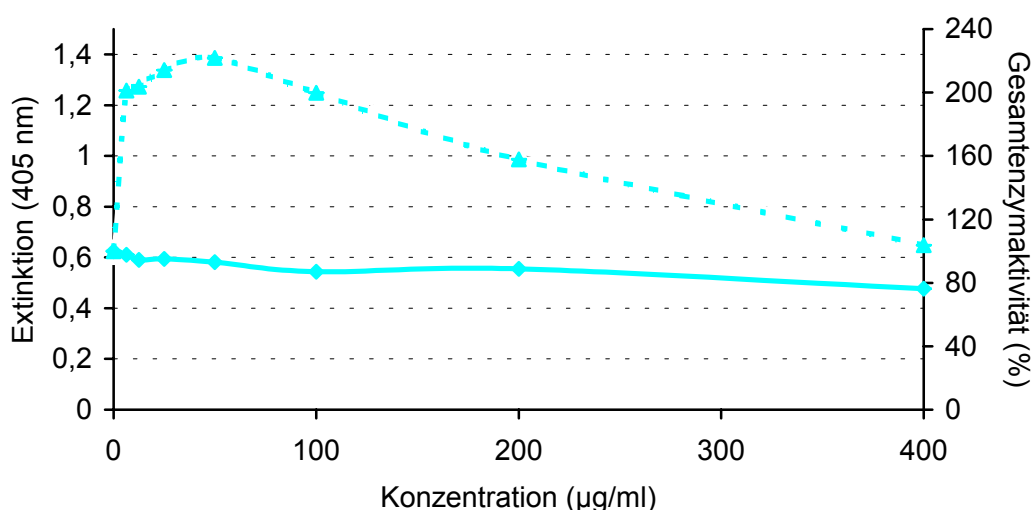


Abb. 53: Einfluss der sulfatierten Hyaluronsäure HYA DS 48 auf die Hemmung von APC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamttextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=6$))

Bis zu einer Konzentration von 100 µg/mL lagen die Werte für die APC-Aktivität bei **HYA PS 10A** mit mindestens 73% noch im Normalbereich. Auch bei Erhöhung der Konzentration auf 400 µg/mL wurde die Aktivität um maximal 35% verringert. Da bei dieser Verbindung auch in diesem Konzentrationsbereich noch eine starke aktivierende Wirkung gemessen wurde, ist davon auszugehen, dass der tatsächliche Anteil an APC höher als 65% liegt (Abb.54).

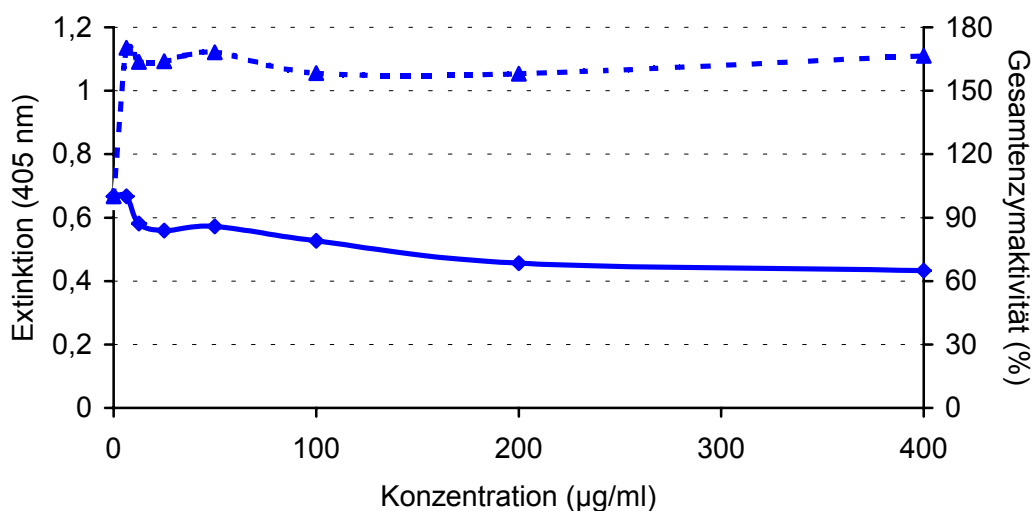


Abb. 54: Einfluss der sulfatierten Hyaluronsäure HYA PS 10A auf die Hemmung von APC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=6$))

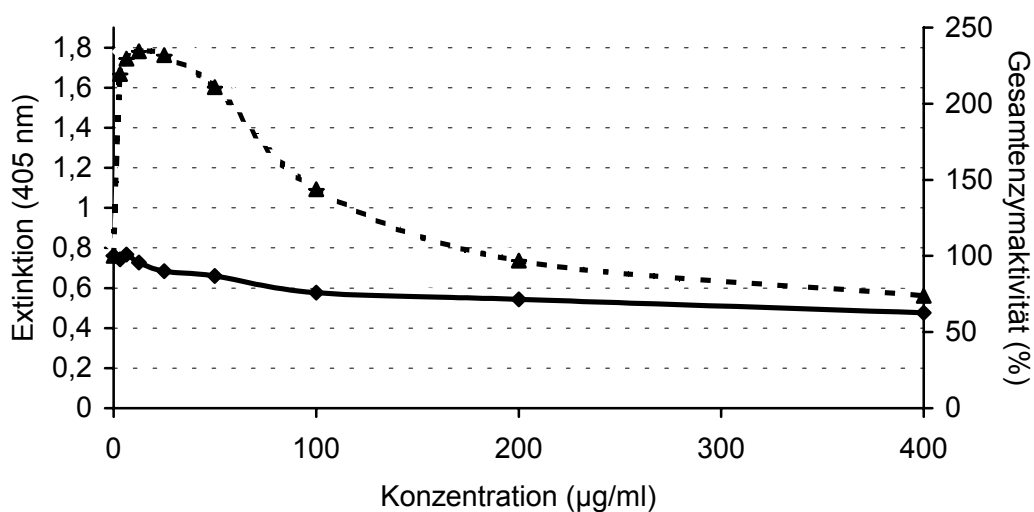


Abb. 55: Einfluss von PPS auf die Hemmung von APC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=6$))

Auch bei der 3. Verbindung dieser Substanzgruppe **PPS** bewegt sich die APC-Aktivität über einen breiten Konzentrationsbereich im Normalbereich. Bei 200 µg/mL beträgt die APC-Restaktivität noch mindestens 72%. Eine Verdopplung dieser Konzentration verursachte eine APC-Inhibition von 37-43% (Abb.55).

4.10. Beeinflussung der Protac[®] Aktivierung von Protein C in Humanplasma

4.10.1. Natürlich vorkommende Huminsäuren

Der Einfluss der natürlich vorkommenden HS auf die Protac[®]-vermittelte PC-Aktivierung scheint größer zu sein, als auf die APC-Aktivität. Die für die beiden natürlichen HS und KOP angegebenen Aktivitäten sind *Minimalwerte* APC. Eine Aussage darüber, ob diese eventuell höher liegen, kann nicht getroffen werden, da der Anteil an unspezifischer Aktivierung über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich relativ groß ist.

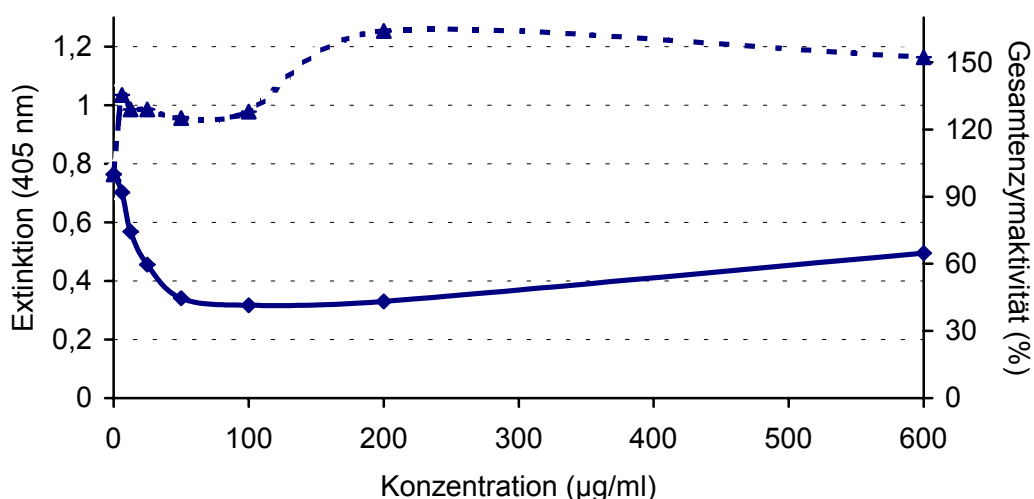


Abb. 56: Einfluss von NaHS I-IV/80 auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die entstandene APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=9$))

Nach Zusatz von jeweils 6,3 und 12,5 µg/mL **NaHS I-IV/80** zum Aktivierungsansatz wurden mindestens 92% bzw. 74% PC aktiviert. Durch Zugabe von 25 µg/mL NaHS wurde der Aktivierungsvorgang um maximal 40% minimiert (Abb. 56).

Ein ähnliches Konzentrations-Wirkungsverhältnis wurde auch für die **Aldrich HS** erhalten (Abb. 57). 12,5 µg/mL reduzierten die PC-Aktivierung um maximal 12%. Nach Verdopplung der Konzentration wurden noch mindestens 57% PC aktiviert.

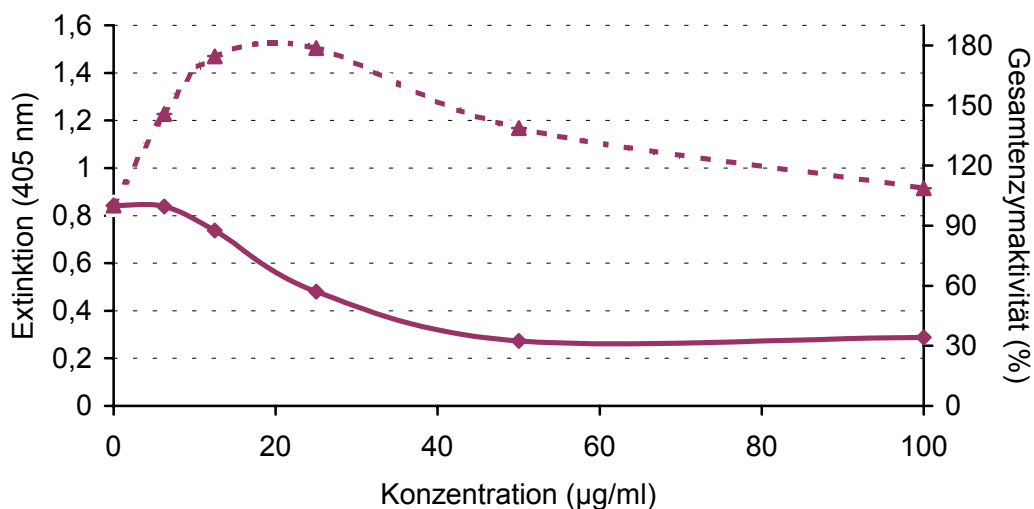


Abb. 57: Einfluss von Aldrich HS auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die entstandene APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), (n=9)

4.10.2. Huminsäure-ähnliche Polymere

Der Zusatz von 6,3 µg/mL **KOP 409/85** hatte eine um maximal 42% geminderte PC-Aktivierung zur Folge. 12,5 µg/mL minderten den Aktivierungsvorgang um maximal 52%. Mindestens 30% APC wurden bei Zugabe von 25 µg/mL KOP aktiviert (Abb. 58).

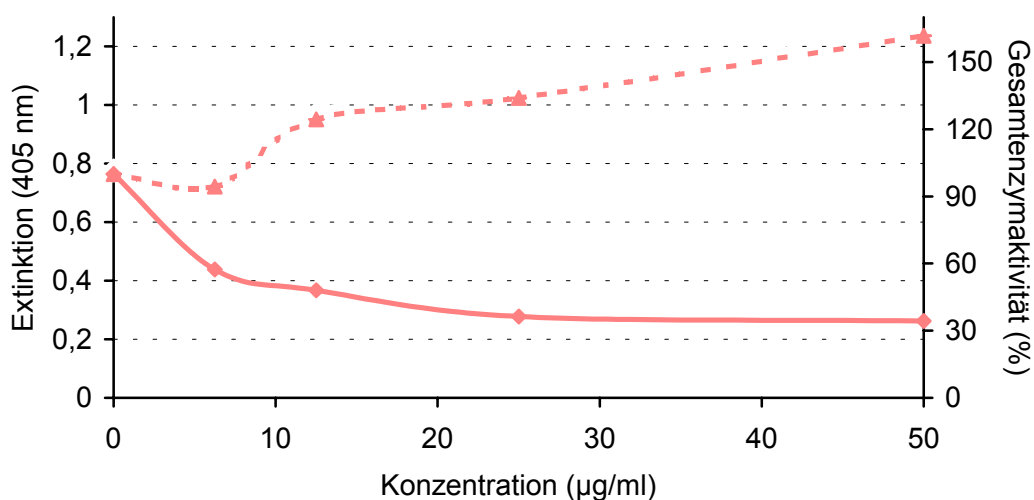


Abb. 58: Einfluss von KOP 409/85 auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch

die entstandene APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=9$)

In den Abbildungen 59 und 60 ist der Einfluss der Melanoidine vom Typ M1 und M42 auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC dargestellt.

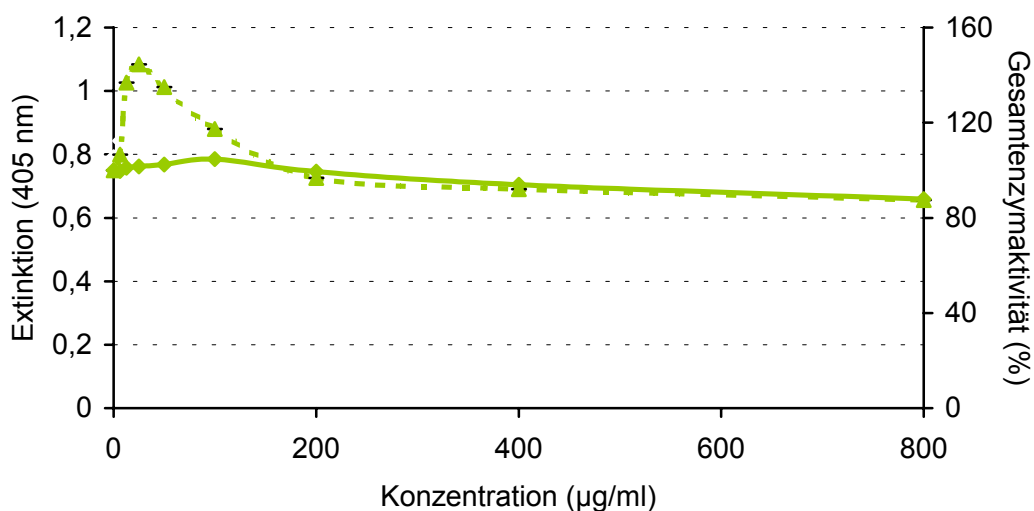


Abb. 59: Einfluss des Melanoidins vom Typ M1 auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die entstandene APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=9$))

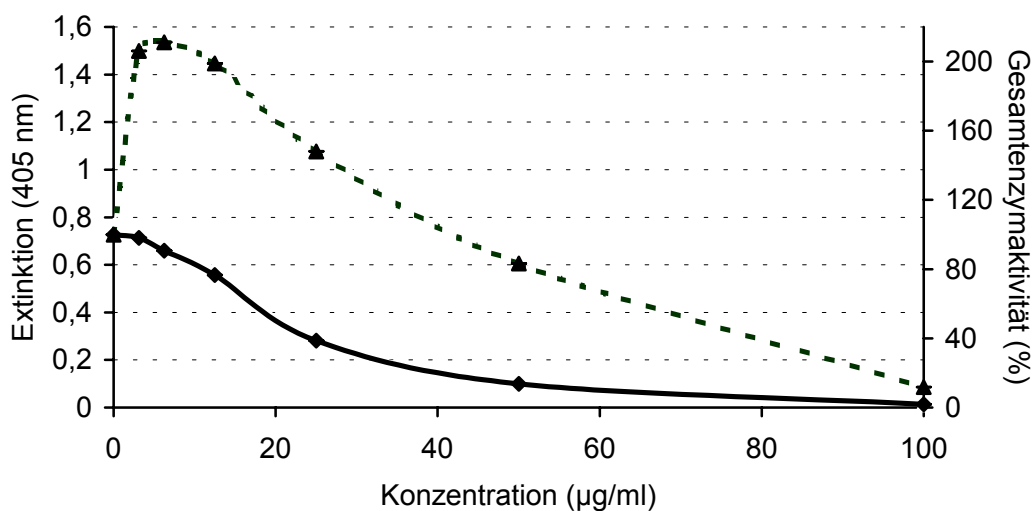


Abb. 60: Einfluss des Melanoidins vom Typ M42 auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die entstandene APC- und unspezifische Ak-

ktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=9$)

Während das **Melanoidin Typ M1** keinen Einfluss auf den Aktivierungsvorgang hatte (Abb.59), wurde durch 100 $\mu\text{g/mL}$ des **Melanoidins M42** eine 90 bis 100%ige Hemmung verursacht (Abb.60). Im unteren Konzentrationsbereich von 6,3-12,5 $\mu\text{g/mL}$ wurden mindestens 91 bzw. 76% PC aktiviert.

Die ROS-Substanz **HS 130** hatte bis zu einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/mL}$ keinen Einfluss auf den PC-Aktivierungsvorgang. Durch Verdopplung dieser Konzentration wurde eine maximale Hemmung von 60% verursacht. Ab 100 $\mu\text{g/mL}$ nahm der Anteil an unspezifischer Aktivierung deutlich ab. Durch 200 $\mu\text{g/mL}$ wurde die PC-Aktivierung um 84-87% gehemmt (Abb. 61).

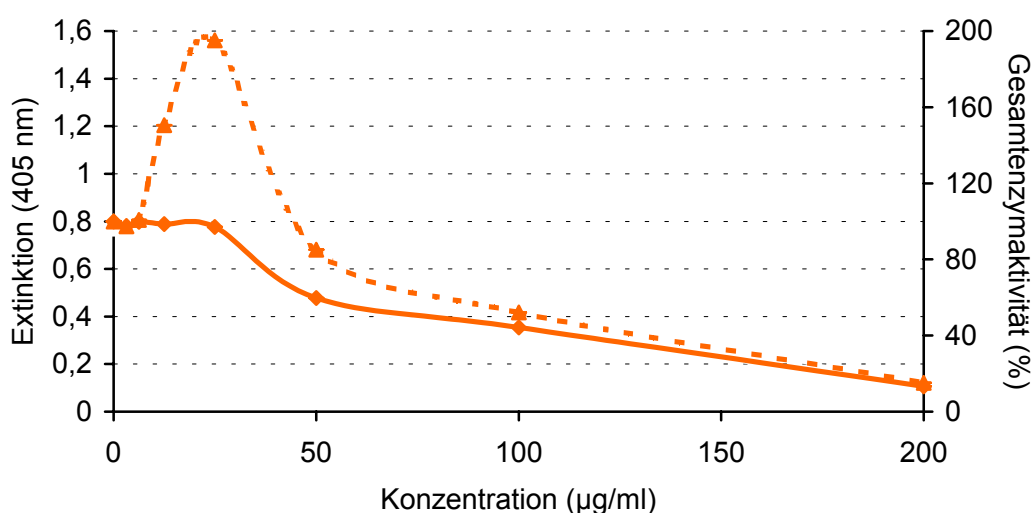


Abb. 61: Einfluss von HS 130 auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die entstandene APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=9$))

Einen etwas geringeren Einfluss als HS 130 auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC hatte die ROS-Substanz **HS 136**. Bis zu einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$ wurde die PC-Aktivierung um maximal 25% gemindert. Durch Erhöhung der Konzentration nahm die aktivierungshemmende Wirkung zu. Nach Zugabe von 400 $\mu\text{g/mL}$ wurden noch 10-30% PC aktiviert (Abb. 62).

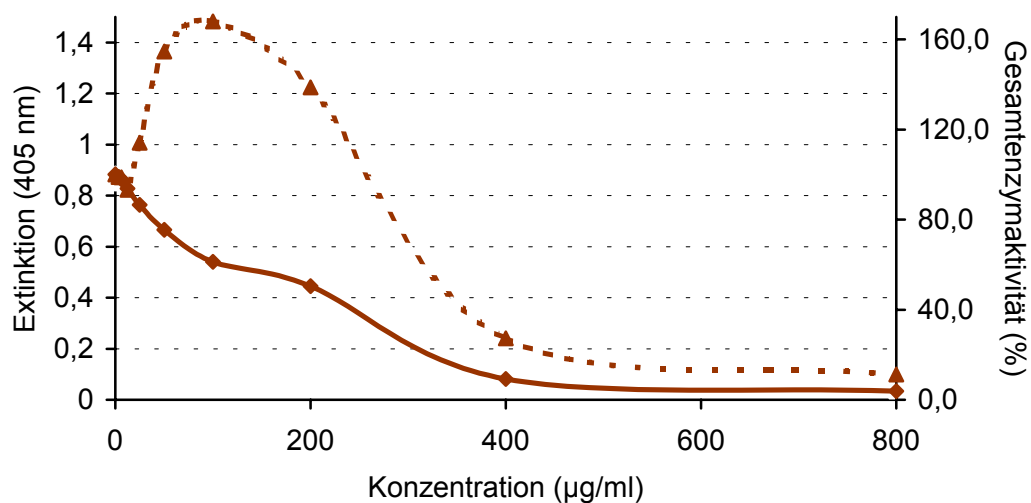


Abb. 62: Einfluss von HS 136 auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die entstandene APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=6$))

4.10.3. Sulfatierte Hyaluronsäuren, Vergleichssubstanzen

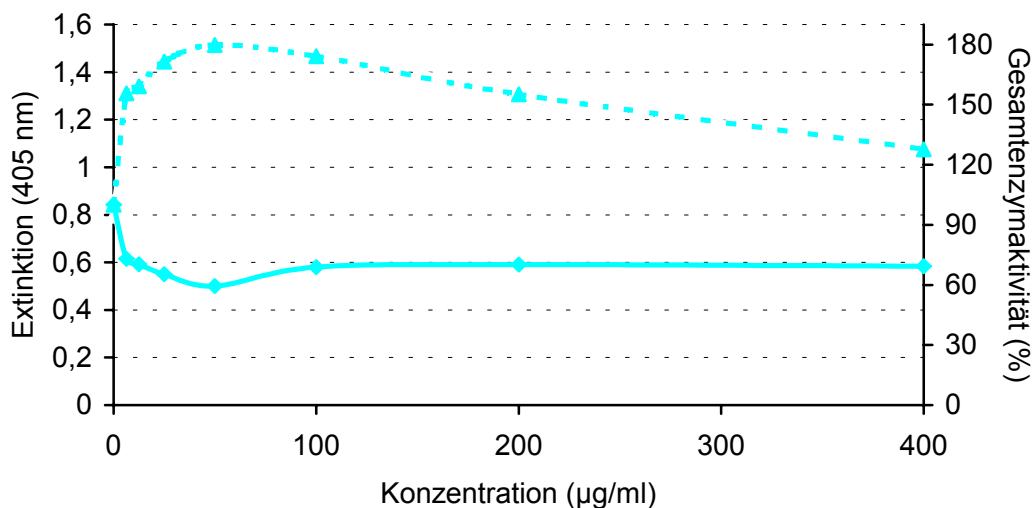


Abb. 63: Einfluss der sulfatierten Hyaluronsäure HYA DS 48 auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die entstandene APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=6$))

Die sulfatierte Hyaluronsäure **HYA DS 48** hemmt bis 12,5 µg/mL den PC-Aktivierungsvorgang um maximal 30%. Durch stufenweise Konzentrationserhöhung nimmt der inhibierende Einfluss auf einen Maximalwert von 40% bei 50 µg/mL zu. Im weiteren Konzentrationsbereich von 100 bis 400 µg/mL wurden mindestens 70% PC aktiviert (Abb. 63).

Im Bereich von 3,1-12,5 µg/mL **HYA PS 10A** wird die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC um maximal 30% gehemmt. Ähnlich wie bei HYA DS 48 sinkt der Anteil an APC nach stufenweiser Erhöhung der Konzentration auf 400 µg/mL auf einen über diesen Bereich konstanten Wert von 60% ab (Abb. 64).

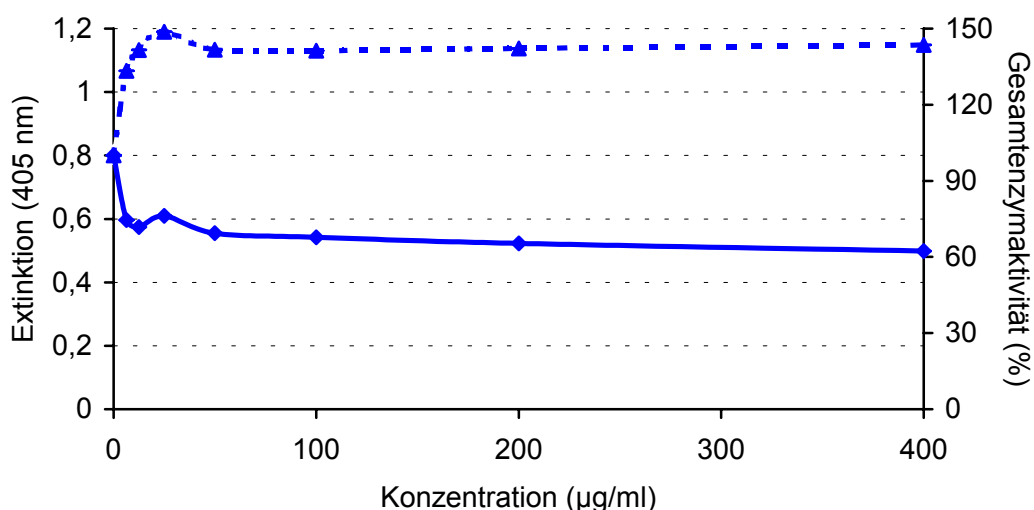


Abb. 64: Einfluss der sulfatierten Hyaluronsäure HYA PS 10A auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die entstandene APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), ($n=6$))

Einen etwas stärker inhibierenden Einfluss als die sulfatierten Hyaluronsäuren auf die PC-Aktivierung hatte **PPS** (Abb. 65). 3,1 µg/mL minderten den Aktivierungsvorgang um 23% und 6,3 µg/mL um 37%. Nach Erhöhung der Konzentration auf 100 µg/mL wurde keine Wirkungszunahme beobachtet.

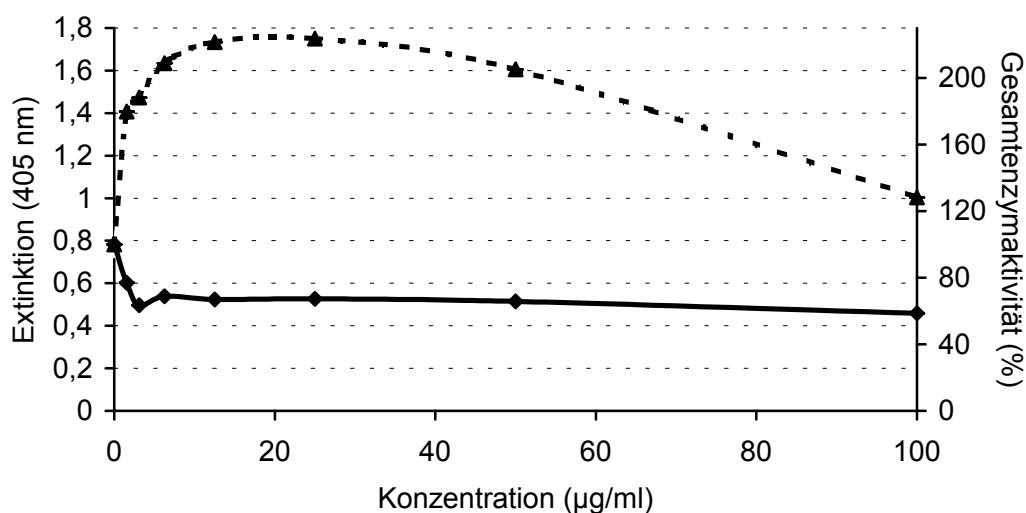


Abb. 65: Einfluss von PPS auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC in Humanplasma (gestrichelte Linie = Summe der Extinktionen verursacht durch die entstandene APC- und unspezifische Aktivität (E_G); durchgehende Linie = Gesamtextinktion abzüglich des Anteils der unspezifischen Aktivität (E_{APC}), (n=6)

4.11. Unspezifische amidolytische Aktivität gegenüber chromogenen Substraten nach Inkubation von Plasma mit den Prüfsubstanzen

4.11.1. Abhängigkeit von der Temperatur

Enzymatische Abläufe weisen eine starke Abhängigkeit von der Temperatur auf. Zum Nachweis, ob o.g. amidolytischer Aktivität ein enzymatischer Vorgang zu Grunde liegt, wurden die Versuche bei 4°C mit je einer ausgewählten Konzentration wiederholt. Die jeweils ermittelten Extinktionsänderungen bezogen auf den LW sind in Abbildung 66 im Vergleich zu den bei 37°C gemessenen Extinktionen dargestellt. Die Zahlenwerte auf den Balken entsprechen den untersuchten Konzentrationen in µg/mL.

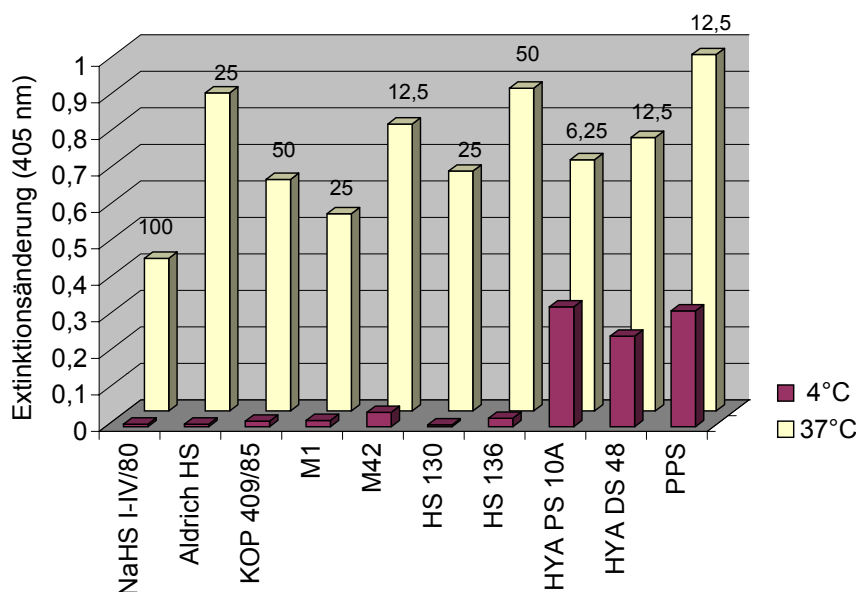


Abb. 66: Temperaturabhängigkeit der amidolytischen Aktivität gegenüber S-2366 nach Inkubation von Humanplasma mit den Prüfsubstanzen (n = 9)

Abbildung 66 ist zu entnehmen, dass die bei 4°C gemessenen Extinktionen signifikant niedriger liegen als bei 37°C.

4.11.2. Spezifität von APC und Thrombin bezüglich verschiedener chromogener Substrate im Plasma

Nach Aktivierung der im Humanplasma vorhandenen Menge PC mit dem hochspezifischen PC-Aktivator Protac[®] wurde dessen Aktivität mittels verschiedener chromogener Substrate gemessen. Dazu wurde die mit S-2366 (APC-spezifisches Substrat) gemessene Extinktion als 100% APC Aktivität angenommen. Ausgehend davon fand eine Umrechnung der mit den weiteren chromogenen Substraten ermittelten Extinktionen statt. Dementsprechend betrug die Aktivität von APC gegenüber S-PK 20,1%, S-Th 19,9% und S-Xa 1,2%.

Nach der gleichen Methode wurde auch die Aktivität von FIIa nach Aktivierung mit Ecarin bestimmt. Als 100% FIIa Aktivität wurde hier die mit dem für FIIa spezifischen Substrat S-Th ermittelte Extinktion angenommen. Die Aktivität von FIIa gegenüber S-2366 betrug hier 133,8%, 65,6% gegenüber S-Xa und 12,0% gegenüber S-PK.

4.11.3. Bestimmung der amidolytischen Aktivität im Plasma mit verschiedenen chromogenen Substraten

Exemplarisch für alle Prüfsubstanzen wurden in dieser Versuchsreihe jeweils 100 µg/mL KOP 409/85 und PPS untersucht.

In Tabelle 7 sind die in Abhängigkeit von der Spezifität des amidolytischen Enzyms, gegen-über den verschiedenen chromogenen Substraten, gemessenen Extinktionsänderungen gegen den LW dargestellt.

Tabelle 7: Extinktionsänderungen gegen den LW nach Inkubation von Plasma mit KOP 409/85 und PPS und Nachweis der amidolytischen Aktivität mit verschiedenen chromogenen Substraten

chromogenes Substrat	KOP 409/85	PPS
S-2366	0,568 ± 0,025	0,976 ± 0,141
S-Th	0,272 ± 0,039	0,983 ± 0,01
S-PK	0,172 ± 0,032	0,736 ± 0,01
S-Xa	0,048 ± 0,025	0,481 ± 0,02

4.11.4. Untersuchung in PC-Mangelplasma

Der Einfluss der Prüfsubstanzen auf in PC-Mangelplasma vorhandene Bestandteile wurde konzentrationsabhängig untersucht. Die Bestimmung der amidolytischen Aktivität erfolgte mit S-2366, einem für APC spezifischen Substrat, mit dem auch vorhandenes Thrombin und PK nachgewiesen werden können.

Da dieser Versuch hauptsächlich Aufschluss darüber bringen sollte, ob die in Humanplasma gemessene amidolytische Aktivität von gebildeten APC herrührt, aber eine ausschließliche Aktivierung desselben nicht angenommen werden kann, konnte keine Eichkurve zum Berechnen von Enzymaktivitäten in (%) erstellt werden. Die Zahlenangaben stellen deshalb reine Extinktionsänderungen bezogen auf den LW dar.

Bis auf HS 130 bewirkten **alle Prüfsubstanzen** in Abhängigkeit von der untersuchten Konzentration eine erhöhte amidolytische Aktivität gegenüber S-2366. Die Konzentrations-Extinktions-Kurven zeigen, exemplarisch durch das Melanoidin M42 in Abbildung 67 dargestellt, dabei für alle Verbindungen einen ähnlichen Verlauf. Beginnend im nie-

drigen Konzentrationsbereich kommt es zunächst zu einem steilen Kurvenanstieg, der einen Maximalwert erreicht. Im weiteren Verlauf fällt die Kurve allmählich wieder ab.

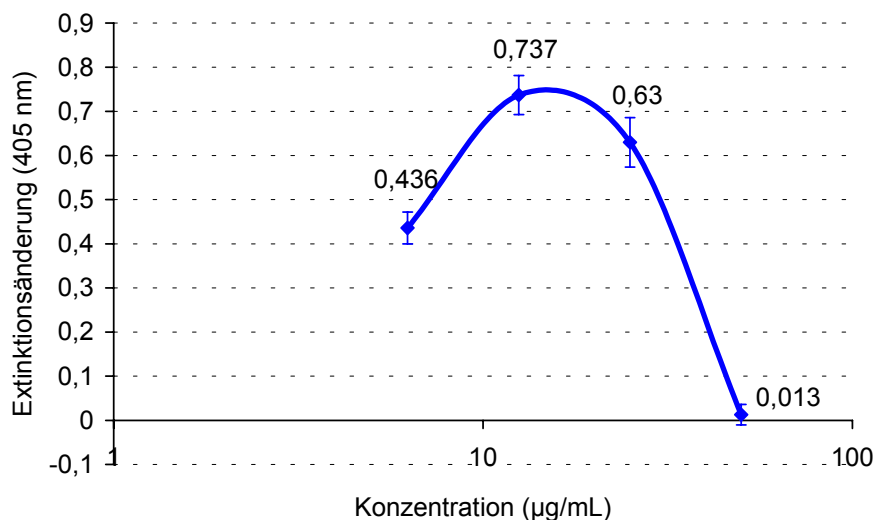


Abb.67: Melanoidin M42 - maximale Extinktionsänderung im PC-freien System gegenüber dem Leerwert

HS 130 wurde im Bereich von 0,01-100 µg/mL untersucht. Ausgehend von einem LW mit einer Extinktion von $0,300 \pm 0,01$ wurde durch Zusatz der Prüflösungen die Extinktion im weiteren Verlauf erniedrigt. Bei 100 µg/mL betrug die gemessene Extinktion $0,044 \pm 0,005$.

In Tabelle 8 sind die erreichten maximalen Extinktionsänderungen bezogen auf den jeweils bestimmten LW mit den dazugehörigen Konzentrationen angegeben.

Tabelle 8: Maximale Extinktionsänderungen gegenüber dem Leerwert im PC-freien System

Prüfsubstanz	Konzentration (µg/mL)	maximale Extinktionsänderung
NaHS I-IV/80	50,0	0,577
Aldrich HS	25,0	0,586
KOP 409/85	12,5	0,353
Melanoidin Typ M1	25,0	0,298
Melanoidin Typ M42	12,5	0,737
HS 136	25,0	0,586

HYA PS 10A	6,25	0,241
HYA DS 48	12,5	0,391
PPS	25,0	0,889

4.11.5. Einfluss verschiedener Inhibitoren auf das Aktivierungsprodukt

In einem Vorversuch wurden in Humanplasma zu durch Protac[®]-Aktivierung entstandenem APC und zu einem FIIa enthaltenden plasmafreien System Hirudin bzw. Aprotinin gegeben.

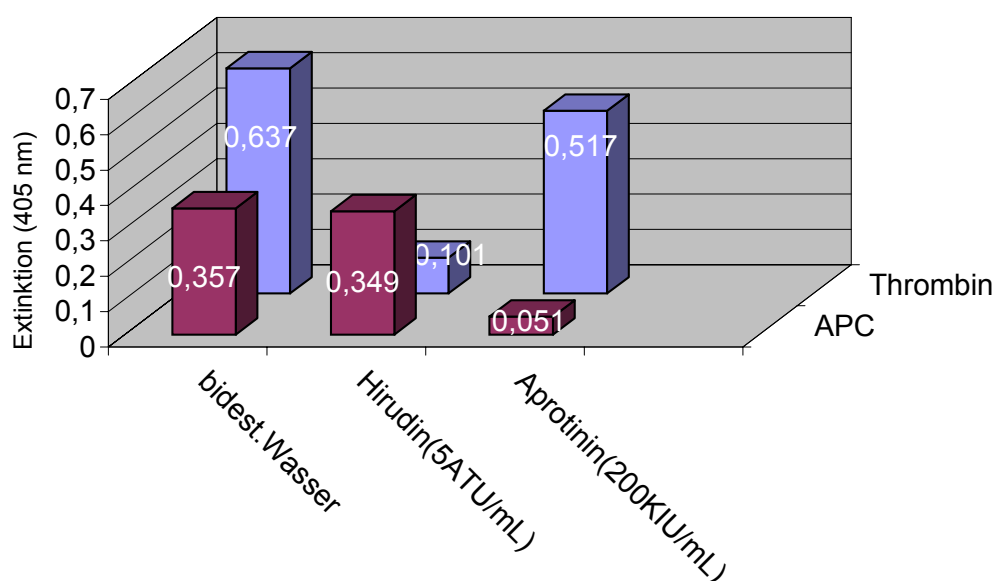


Abb. 68: Einfluss von Hirudin und Aprotinin auf APC und Thrombin (n = 9)

Die Abbildung 68 zeigt, die durch die beiden Inhibitoren verursachten Extinktionserniedrigungen gegenüber einem LW, welcher durch Zusatz von bidest. Wasser erhalten wurde.

Der Zusatz von Hirudin minderte die Aktivität von FIIa um 84,14%. Bezüglich APC wurde durch Hirudin keine signifikante Aktivitätserniedrigung bewirkt. Eine um 85,71% geringere Aktivität von APC wurde im Reaktionsansatz mit Aprotinin verursacht. Ebenfalls signifikant war die durch Aprotinin verursachte um 18,84% geringere FIIa Aktivität.

Der Einfluss der Inhibitoren auf die amidolytische Aktivität des nach Zusatz der Prüfsubstanzen zu Humanplasma entstandenen Aktivierungsproduktes gegenüber S-2366 wurde untersucht.

In Tabelle 9 sind die durch die Inhibitoren verursachten Aktivitätserniedrigungen in Prozent bezogen auf den mit bidest. Wasser bestimmten LW (100% Aktivität) aufgelistet.

Tabelle 9: Einfluss von Hirudin und Aprotinin auf die amidolytische Wirkung des Aktivierungsproduktes (n = 9) gegenüber S-2366

Prüfsubstanz (Konzentration in µg/mL)	Aktivitätserniedrigung in % durch	
	Hirudin	Aprotinin
NaHS I-IV/80 (100)	21,10	60,97
Aldrich HS (6,25)	8,72	40,27
KOP 409/85 (3,13)	19,56	48,44
Melanoidin Typ M1 (6,25)	4,17	61,76
Melanoidin Typ M42 (3,13)	12,24	25,31
HS 130 (6,25)	12,79	93,60
HS 136 (50)	2,65	85,93
HYA PS 10A (0,5)	6,70	88,27
HYA DS 48 (1)	5,04	76,89
PPS (25)	0,08	11,03

4.12. Aktivierung von Prothrombin im plasmafreien System

4.12.1. ohne Zusatz von Phospholipiden

Im plasmafreien System wurde der Einfluss der Prüfsubstanzen auf Prothrombin in An- und Abwesenheit von Calciumionen untersucht. Bei keiner der Verbindungen konnte mit dem chromogenen Substrat S-Th eine amidolytische Aktivität nachgewiesen werden.

4.12.2. unter Zusatz einer Cephalinsuspension

Auch nach Zusatz einer Cephalinsuspension zu dem unter 3.2.3.1. genannten Ansatz wurde keine amidolytische Aktivität gegenüber S-Th gemessen. Auch die Anwesenheit von Calciumionen hatte keinen Einfluss auf den Reaktionsansatz.

5. Diskussion

5.1. Sulfatierte Hyaluronsäuren

5.1.1. Notwendigkeit der Suche nach neuen Antikoagulantien

Mit dem 1916 im Laboratorium des Physiologen Howell von dem Medizinstudenten Mc Lean aus der Leber eines Hundes isolierten gerinnungshemmenden Stoff, welcher später von Howell und Holt ausführlicher untersucht und nach dem Herkunftsorgan Heparin benannt wurde, steht seit über 60 Jahren einer der wichtigsten und am stärksten wirksamen antithrombotisch und antikoagulatorisch aktiven Verbindungen zur Verfügung (Duckert, 1983; Markwardt et al., 1979). Obwohl es eine große klinische Bedeutung besitzt, stellt auch Heparin ebenso wie die Gruppe der Heparinoide, bezüglich bestimmter stofflicher Eigenschaften und Anwendungen, keine idealen und universell einsetzbaren Antithrombotika dar.

Ein erheblicher Nachteil besteht zum einen in seiner unübersichtlichen räumlichen Heteropolysaccharidnatur. Die Wiedergabe einer exakten chemischen Formel ist auf Grund des uneinheitlichen Molekülaufbaus nicht möglich (Hoffmann et al., 1979). Handelsübliches Heparin besteht aus einem Spektrum 21 verschiedener Heparine, deren MG mit einer Spanne von 3000-37500 Da eine relativ große Schwankungsbreite und wechselnde antikoagulierende Aktivitäten aufweisen (Barbucci et al., 1995). Eine Ursache dieser schwankenden Aktivitäten ist der verschieden hohe Sulfatierungsgrad (Roka et al., 1982). So bindet nur eine bestimmte Fraktion des unfraktionierten Heparins (ca. 1/3) mit hoher Affinität an ATIII und stellt in diesem Fall den eigentlichen antikoagulatorisch-wirksamen Anteil dar (Thunberg et al., 1980). Trotz der Aufklärung der Konstitution ist es noch nicht möglich, Heparin synthetisch herzustellen.

Kommerziell hergestelltes Heparin wird meistens aus Rinderlunge, besser aus der Darmmukosa vom Rind oder Schwein isoliert. Zur therapeutischen Verwendung muss es vollständig vom menschenfremden Eiweiß getrennt werden (Duckert, 1983). Auch hier findet sich ein weiterer Nachteil, denn die Struktur der so gewonnenen Heparine ist von Tierspezies zu Tierspezies und Gewebeart zu Gewebeart verschieden (Duckert, 1983). Für das aus Rinderlunge gewonnene Heparin stellt die Rinderkrankheit BSE ein besonderes Problem dar, da sie zu infizierten Produkten führen kann.

Auch die Pharmakokinetik der Substanz bietet Anlass zur Suche nach optimaleren Strukturen, denn wie viele polymere Verbindungen wird es im Organismus schnell ab-

gebaut. Heparin besitzt eine HWZ von 90 min. So wird ein Teil des applizierten Heparins vor der renalen Ausscheidung metabolisiert. Eine wichtige Rolle spielt dabei das in der Leber vorkommende Enzym Heparinase, durch welches ein Abbau zu kleineren Spaltprodukten stattfindet (Abatangelo et al., 1997). Ein weiterer Nachteil von Heparin beruht zum großen Teil darauf, dass es als negativ geladenes Polysaccharid an viele Plasmaproteine bindet und mit Endothelzellen, Makrophagen und Plättchen interagiert. Dies äußert sich in einer Bioverfügbarkeit von nur 15 bis 30% nach s.c. Injektion (Hirsh et al., 1998).

Ein in der Praxis bekanntes Problem stellt auch die Resistenz gegenüber Heparin dar. Während zum einen die Ursachen für eine solche Resistenz in den individuellen Vorerkrankungen der Patienten zu suchen sind, stellt ein weiteres, wenn auch selten vorkommendes Problem der Mangel an ATIII und ein damit verbundenes erhöhtes Thromboserisiko mit geringer Ansprechbarkeit auf eine Heparintherapie dar (Coon et al., 1978; Pabinger et al., 1992).

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie ist eine der schwerwiegendsten Arzneimittel-induzierten, immunologisch bedingten Nebenwirkungen. Durch Bindung von Heparin an den Plättchenfaktor 4 entsteht ein Neoantigen, welches zusammen mit Antikörpern durch Bildung großer Immunokomplexe die Thrombozyten aktiviert, woraus der charakteristische Thrombozytenabfall resultiert. Die trotz Antikoagulation auf thrombotischen Komplikationen basierende Mortalitäts- und Morbiditätsrate liegt in diesen Fällen bei 20 bis 30% (Greinacher et al., 1992; Mc Ginnis, et al., 1991).

Auch die Beschichtung künstlicher Materialien wie Polyurethan mit Heparin und die Anwendung bei kardiopulmonären Bypässen, Herz-Lungen-Maschinen oder Haemodialysen ist nicht unproblematisch. Ausnutzen möchte man dabei allein die antikoagulierende Wirkung. Da aber das immobilisierte Heparin eine stark negativ geladene Oberfläche darstellt, wurde in einigen Fällen eine Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems und des Komplementsystems festgestellt, die im schlimmsten Fall zur Shuntthrombose führen kann (Abb. 69).

Ob die antikoagulierende oder thrombogene Wirkung überwiegt, hängt vom verwendeten Heparin ab. Bei Heparinen mit geringer Affinität zu ATIII (LAH) wird ebenso wie bei Heparinen mit hoher Affinität zu ATIII (HAH) bei Durchfluss von Patientenblut FXIa gebildet, der aber nur im Fall von LAH zu einer sofortigen Bildung von FIIa führt, welches aufgrund der geringen ATIII Bindungskapazität von LAH nicht neutralisiert wird und so den Gerinnungsvorgang auslöst. Die thrombogene Wirkung überwiegt.

Die sulfatierten Hyaluronsäuren zeichnen sich als Natriumsalze durch eine gute Wasserlöslichkeit aus und besitzen bessere rheologische Eigenschaften als die unsulfatierten Verbindungen. Im pH-Bereich von 2 bis 7,5 erwiesen sich die Verbindungen im wässrigen Medium nach IR-spektroskopischer Auswertung als stabil. Durch Absenken des pH-Wertes verringert sich anfänglich die Viskosität geringfügig. Nach Neutralisation der $-\text{COO}^-$ Gruppen bleibt sie dann aber auf einem konstanten Wert (Barbucci et al., 1994, Barbucci et al., 1995).

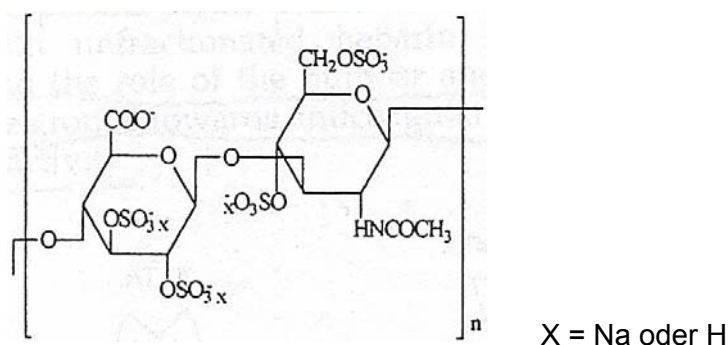


Abb. 70: Strukturformel von sulfatierter Hyaluronsäure

Bezüglich biologischer Eigenschaften weisen die Substanzen eine gute Biokompatibilität auf. Die Ergebnisse der Cytotoxizitäts-, Zellverträglichkeits-, Haemolyse-, und Proliferationsuntersuchungen zeigten deutlich, dass die Substanzen keine nachteilige Wirkung auf Mausfibroblasten, Endothel- und Blutzellen ausüben. In niedrigen Konzentrationen fördern sie die Zellproliferation (Inoue et al., 1993; Barbucci et al., 1994; Abatangelo et al., 1997; Kessler, 2000).

Durch Einführung von Sulfatgruppen entlang der Hyaluronsäureketten wurde eine Resistenz gegenüber dem enzymatischen Abbau durch Hyaluronidase und Chondroitinase erzeugt (Barbucci et al., 1994; Abatangelo et al., 1997).

Nach Immobilisierung von HYA-S an Polyethylenterephthalat (PET)-Oberflächen konnte eine reduzierte Plättchenadhaesion beobachtet werden. Die Thrombusbildung war deutlich verringert (Chen et al., 1997).

Sulfatierte Hyaluronsäuren verlängern die TZ. Barbucci et al., (1998) und Magnani et al. (1995) fanden, dass die Hemmung der Thrombinaktivität mit zunehmenden MG und DS zunimmt. Aufgrund letztgenannter Eigenschaften stellen diese Verbindungen eine denkbare Alternative zu Heparin bzgl. der Oberflächenbeschichtung von künstlichen Materialien dar.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten könnten sich aus der wundheilenden und entzündungshemmenden Wirkung ergeben. Chang et al. fand 1994 eine Tumornekrosefaktor (TNF) α und β hemmende Wirkung.

5.1.3. Einfluss auf das Blutgerinnungssystem

5.1.3.1. Antikoagulierende Wirkung

Mit dem Ziel neue Heparin-ähnliche Verbindungen zu erhalten, wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl sulfatierter Substanzen mit natürlich vorkommenden Polysaccharid-Grundkörper entwickelt oder isoliert und auf eine mögliche therapeutische Anwendung hin untersucht (Walenga et al., 1991; Casu, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurden 2 durch Sulfatierung von Hyaluronsäure gewonnene Verbindungen in ihrer Wirkung auf den Blutgerinnungsvorgang zunächst im Gruppentest untersucht. Anschließend wurde, um eine etwas differenziertere Aussage zum Wirkungsmechanismus dieser neuen Substanzklasse zu ermöglichen, der Einfluss auf zentrale Einzelfaktoren der Gerinnungskaskade bestimmt.

Gruppentest

Frühere Untersuchungen ergaben, dass sulfatierte Hyaluronsäuren sowohl die Thrombinzeit (TZ), die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) als auch die Prothrombinzeit (PT) konzentrationsabhängig verlängern und damit im Humanplasma eine antikoagulatorische Aktivität besitzen. Durch einen Vergleich der erhaltenen GZ konnte abgeleitet werden, dass der Hauptangriff im endogenen und schwächer im exogenen Gerinnungssystem stattfinden muss und die Endstufe der Gerinnung, die Thrombinvermittelte Fibrinogenspaltung, gehemmt wird (Klöcking et al., 1998).

HYA PS 10A und HYA DS 48 wurden als Modellsubstanzen einer neuen Gruppe antikoagulatorisch aktiver Verbindungen ausgewählt, um ihre Wirkung auf die TZ im *Plasma* und im *isolierten System* zu untersuchen.

Bezüglich dieses GZ-verlängernden Einflusses erwiesen sich die Substanzen, verglichen mit Heparin und PPS, in beiden Versuchen als relativ stark wirksam. Ihre antikoagulierende Wirkung ist abhängig von der eingesetzten Konzentration. Entgegen Studien von Barbucci et al. (1998), in denen eine Zunahme der antikoagulierenden

Wirkung mit ansteigendem MG nachgewiesen wurde, erwies sich HYA PS 10A als Derivat mit einem ca. um 2/3 geringerem MG und 1,3fach höheren Schwefelgehalt gegenüber HYA DS 48 als stärker wirksam.

Die Plasma-TZ spiegelt die Inaktivierung von FIIa in Gegenwart vorhandener Cofaktoren (ATIII, HCII) wieder. Eine Aussage darüber, welcher Cofaktor an dieser Wirkung beteiligt ist oder ob eine direkte Wechselwirkung mit FIIa oder Fibrinogen stattfindet, kann mit Hilfe dieses Tests nicht getroffen werden. Deshalb wurde in Abwesenheit von Cofaktoren die Fibrinogen GZ bestimmt. Die ermittelten Werte entsprachen bei beiden Substanzen annähernd denen im Plasma, was darauf schließen lässt, dass die Hemmung von FIIa nicht durch Cofaktoren vermittelt oder verstärkt wird, sondern hauptsächlich durch eine direkte Hemmung der Proteasen verursacht wird. Einen Hinweis darauf, dass die TZ-verlängernde Wirkung durch eine *direkte* Wechselwirkung mit FIIa und weniger mit FI verursacht wird, liefert die Bestimmung der IC₅₀-Werte, durch eine aus Verdünnungen eines Testthrombins ermittelten Eichkurve und deren Vergleich mit den Konzentrationen, die eine Verdopplung der GZ im isolierten System bewirken. Bei beiden Verbindungen waren diese Werte annähernd identisch, was die Vermutung nahe legt, dass bei der doppelten TZ eine Aktivitätsminderung des FIIa um 50% stattfand. Dieser Zusammenhang existiert nur im Fall einer direkten Wechselwirkung. Im Fall von Heparin, wo der antikoagulierenden Wirkung keine direkte sondern eine ATIII-vermittelte Inhibierung von FIIa zu Grunde liegt, stimmen diese Werte nicht überein.

Bestimmung der Einzelfaktoren

Zur Verifizierung der Vermutung, dass die über die verlängerte TZ bestimmte, antikoagulierende Wirkung hauptsächlich durch eine direkte Wechselwirkung mit FIIa verursacht wird, wurde der Einfluss der sulfatierten Hyaluronsäuren auf Thrombin in An- und Abwesenheit von ATIII untersucht.

Im Gegensatz zur relativ starken „Antithrombin-Wirkung“ in den Messungen der FGZ, ist der direkte Einfluss auf FIIa im ATIII-freien isolierten System deutlich geringer. Eine Wiederholung des Versuches in Gegenwart von ATIII bewirkte, verglichen an den IC₅₀-Werten, für HYA PS 10A eine Wirkungsverstärkung um das 200fache und für HYA DS 48 um das ca. 50fache. Damit liegen die ermittelten IC₅₀-Werte im Bereich derer über die FGZ bestimmten. Die Werte zeigen weiterhin, dass eine direkte, ATIII unabhängige Hemmung von FIIa stattfindet, die aber durch ATIII verstärkt werden kann. Auch hier

erwies sich die Verbindung mit geringeren MG und höherem Schwefelgehalt unter Zugabe von ATIII als stärker wirksam.

PPS welches in dieser Versuchsreihe als Vergleichsubstanz herangezogen wurde, zeigte im ATIII-freien System eine deutlich geringere Hemmwirkung. Das Wirkungsmaximum lag mit 68% Inhibition bei 100 µg/mL. Ein IC_{50} -Wert konnte nicht ermittelt werden. Nach Zugabe von ATIII wurden hier mit schon 2,2 µg/mL Substanz 50% der FIIa Aktivität gehemmt. Verglichen an PPS waren die sulfatierten Hyaluronsäuren (HYA DS 48, HYA PS 10A) 4-9 x stärker wirksam.

Zwischen den Ergebnissen aus den Gruppen- und Einzeltests scheint bezüglich der Wirkungsstärke eine Diskrepanz zu bestehen. Die wesentlich schwächere Anti-Thrombinwirkung im Einzelfaktortest wurde über die geringere amidolytische Aktivität von FIIa gegenüber einem bzgl. der Molekülgröße sehr kleinen chromogenen Substrat bestimmt. Dieses Ergebnis schließt jedoch eine direkte HYA-Thrombin Wechselwirkung, als deren Folge, die FIIa-Aktivität bzgl. der Spaltung des relativ großen Fibrinogenmoleküls vermindert ist, nicht aus. Die stärkere Wirkung der sulfatierten Hyaluronsäuren in der TZ-Bestimmung unterstützen diese Annahme. Ähnliche Befunde wurden von Hogg et al. (1997) für Heparin gefunden.

In einem weiteren Versuch wurde die Anti-FXa Aktivität bestimmt. Der FXa stellt ebenso wie Thrombin einen zentralen Faktor der Blutgerinnung dar. Im Komplex mit FVa, PL und Ca^{2+} , dem Prothrombinasekomplex, führt er zur eigentlichen Aktivierung von FII.

Zu beobachten war ein relativ deutlicher Unterschied in der Anti-Xa Wirkung der beiden Substanzen. Die durch die Gruppentests vermutete, geringere Hemmwirkung gegenüber FXa konnte, gemessen am IC_{50} -Wert nur für HYA DS48 bestätigt werden. Ähnlich wie in der Bestimmung der TZ erweist sich die Verbindung mit niedrigerem MG aber höherem Schwefelgehalt <HYA PS 10A> mit einem ca. 6fach geringeren IC_{50} -Wert in Abwesenheit von ATIII gegenüber HYA DS 48 als stärker wirksam. Während bei HYA PS 10A der aktivitätsmindernden Wirkung eher eine direkte Wechselwirkung mit FXa zu Grunde zu liegen scheint, wurde bei HYA DS 48 erst durch Zugabe von ATIII eine stärkere FXa-Hemmung erreicht. Aufgrund der fehlenden strukturellen Voraussetzungen im HYA DS 48-Molekül für eine heparinähnliche Wechselwirkung mit ATIII kann nicht zwangsläufig von einer Cofaktorfunktion des ATIII ausgegangen werden. Ähnliche Ergebnisse erhielten Fischer et al. (1982) für PPS. Mittels Immunelektrophorese konnten sie aufklären, dass trotz des wirkungssteigernden Einflusses von ATIII die

beobachteten Effekte eher durch einen Angriff an der Protease als an ATIII verursacht werden.

PPS zeigte im ATIII-freien System eine ebenfalls eher schwächere FXa-hemmende Wirkung, die mit einem IC_{50} -Wert von 171,7 (166,7-177,0) $\mu\text{g/mL}$ im Bereich von HYA DS 48 lag. Durch Zusatz von ATIII waren zum Erreichen der gleichen Wirkung nur 0,7(0,6-0,7) $\mu\text{g/mL}$ Substanz nötig.

Durch Zusatz von ATIII wurde die Anti-Xa Aktivität bei HYA PS 10A um das 55fache verstärkt. Auch bei HYA DS 48 nahm die Anti-Xa Wirkung in Gegenwart von ATIII zu. Eine Wirkungssteigerung um das ca. 50fache wurde erreicht.

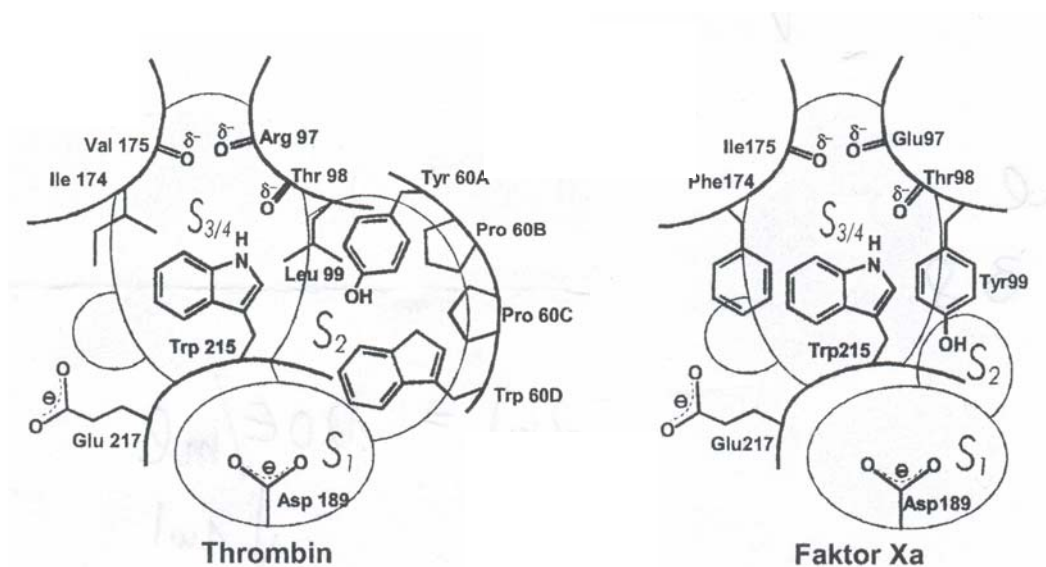


Abb. 71: Schematische Darstellung der aktiven Zentren (S_1 , S_2 , $S_{3/4}$) von Thrombin und FXa (nach Renatus et al., 1998)

S_1 : Wechselwirkung über Ausbildung einer Salzbrücke zur negativ geladenen Carboxylgruppe des Asp 189 am Boden der relativ tiefen S_1 -Tasche möglich,

S_2 : v.a. bei FIIa große lipophile Tasche durch den aus Tyr 60A, Pro 60B, Pro 60C, Trp 60D bestehenden „60-Insertion-Loop“;

$S_{3/4}$: große hydrophobe Tasche, an deren Ende sich ein elektronegativer Hohlraum befindet, welcher bei FXa von Glu 97 und den Carbonylsauerstoffen von Ile 175 und Thr 98 (Val 175 und Thr 98 bei FIIa) gebildet wird; durch die räumliche Nähe von Arg 97 ist die $S_{3/4}$ -Region von FIIa deutlich geringer hydrophob als bei FXa,

In Abbildung 71 sind die aktiven Zentren der Serinproteasen FIIa und FXa schematisch dargestellt (Renatus et al., 1998). Die Unterschiede in dieser Primärstruktur sind, bei sonst identischer Sekundär- und Tertiärstruktur, für die Selektivität der einzelnen trypsin-ähnlichen Proteasen verantwortlich. Eine genaue Betrachtung der aktiven Zent-

ren zeigt, dass aufgrund der stark negativ geladenen funktionellen Gruppen und der Molekülgröße ein direkter und spezifischer Angriff der HYAs an diesen eher hydrophoben Bindungsstellen unwahrscheinlich ist.

Thrombin besitzt neben diesen apolaren, aktiven Zentren weitere für physiologische Wirkungen bedeutsame Bindungsstellen. Neben einer Heparin- und Fibrinbindungsstelle existiert benachbart zu den aktiven Zentren eine außen liegende basische Region „anion binding exosite“, welche möglicherweise für eine Wechselwirkung mit den HYAs bedeutsam ist. Hortin et al. (1991) wies einen Angriff von Hirudin an dieser AS-Sequenz nach, der 1. eine verminderte Reaktivität gegenüber Fibrinogen zur Folge hatte und 2. die Affinität von FIIa zu chromogenen Substraten erhöhte. Verantwortlich ist die aus 12 sauren AS bestehende Region 54-65 im Hirudinmolekül, welche nach kompetitiver Hemmung der Fibrinogenbindungsstelle im FIIa allosterisch eine Konformationsänderung im FIIa-Molekül bewirkt (Zhong et al., 1993). Durch die Einführung von Sulfatgruppen in Hirudin wurden diese Wirkungen verstärkt. Die Affinitätssteigerung gegenüber chromogenen Substraten könnte eine weitere Erklärung für die geringere „Antithrombin“-Wirkung der HYAs im isolierten System sein.

Ein Vergleich der Ergebnisse aus der Einzelfaktorbestimmung mit den Werten der TZ (und aPTT), lässt einen für beide Substanzen verschiedenen Wirkungsmechanismus innerhalb der Gerinnungskaskade, eventuell resultierend aus den verschiedenen MG und Schwefelgehalten, vermuten. Während im isolierten System bei HYA DS 48 der direkte Einfluss auf bereits gebildetes Thrombin größer ist, als auf FXa, kommt bei HYA PS 10A die GZ-verlängernde Wirkung hauptsächlich über eine FIIa-Bildungshemmung, resultierend aus der größeren Inhibierung von FXa, zustande. Für HYA PS 10A konnten damit die Vermutungen von Klöcking et al. (1998) bzgl. eines stärkeren Angriffs der Substanzen im intrinsischen System resultierend aus der größeren Wirkung in der aPTT gegenüber der PT bestätigt werden. In der TZ-Bestimmung erwiesen sich jedoch beide Substanzen als annähernd gleich stark wirksam. Ähnliche Befunde existieren auch für Heparin. Während Heparine mit höherem MG (>20000 Da) einen stärkeren Einfluss auf Thrombin als auf FXa besitzen, liegt der antikoagulierenden Wirkung niedermolekularer Heparine (<10000 Da) eher eine FXa Inaktivierung zu Grunde (Barbucci et al., 1996).

Einfluss von Antithrombin III

Wie aus den Ergebnissen der TZ-Bestimmung abgeleitet, wurde außer für HYA DS 48 in seiner Wirkung auf FXa, keine Abhängigkeit von ATIII als Cofaktor gefunden. Der Inaktivierung von FIIa und FXa muss demnach hauptsächlich eine direkte aber unspezifische elektrostatische Wechselwirkung zwischen den sauren Oberflächengruppen des Polysaccharids und den Serin Proteasen zu Grunde liegen.

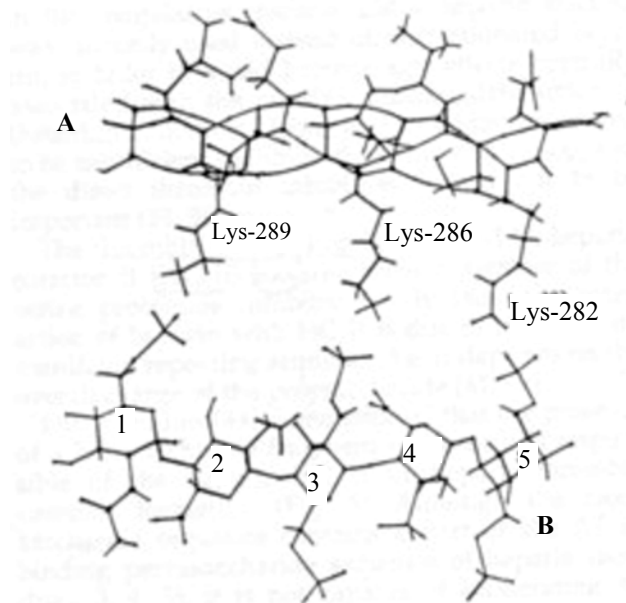


Abb.72: 3-dimensionales Modell der ATIII-Heparinpentasaccharid Wechselwirkung (Villanueva 1984); (A) Heparinbindungssequenz des ATIII-Moleküles, (B) ATIII-Bindungssequenz im Heparin

Im isolierten System wurde aber durch Zugabe von ATIII eine Wirkungszunahme erreicht. Auch hier ist von einer unspezifischen, elektrostatischen Wechselwirkung auszugehen. Die Fähigkeit der sulfatierten Hyaluronsäuren über ihre negativen Oberflächengruppen mit ATIII zu interagieren, schließt dabei nicht automatisch die Eigenschaft ein, eine optimale Konfiguration zu besitzen, die für eine spezifische Wechselwirkung wie im Fall von Heparin, nötig wäre (Villanueva, 1984, Abb.72).

Doch auch für diese unspezifische Wechselwirkung gilt laut Magnani et al. (1996) eine strenge Abhängigkeit der Wechselwirkung von der Anzahl und Position der Sulfatgruppen entlang der HYA-Molekülkette und dem Aufbau der Pentasaccharideinheit.

Die Heparin Bindungseinheit des ATIII Moleküls enthält in Position 289, 286 und 282 die basische AS Lysin. Über diese AS wird das Heparin-Pentasaccharid (Abb. 73) in Position 1 (6-O-Sulfat), 3 (2-N-Sulfat) und 5 (2-N-Sulfat) gebunden.

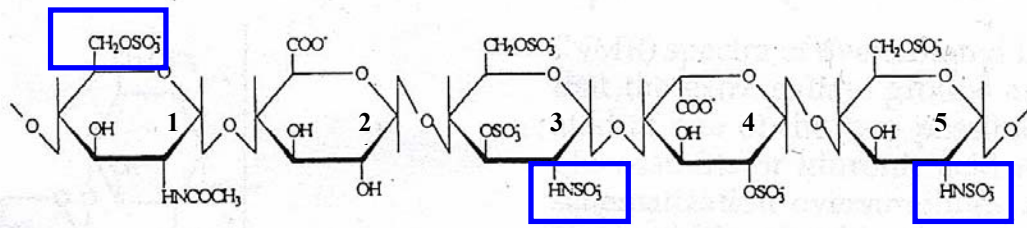


Abb. 73: ATIII-Bindungssequenz in Heparin; die markierten Gruppen sind an der Bindung mit Heparin beteiligt

In Abbildung 74 ist der Pentasaccharideinheit von Heparin ein Ausschnitt aus der Molekülkette der Hyaluronsäuren gegenübergestellt.

- A) **GLCN - GLCA - GLCN - IdoA - GLCN**
 B) **GLCN - GLCA - GLCN - GLCA - GLCN**

Abb. 74: Pentasaccharideinheiten von Heparin (A) und Hyaluronsäure (B); D-Glucosamin (GLCN); D-Glucuronsäure (GLCA); L-Iduronsäure (IdoA)

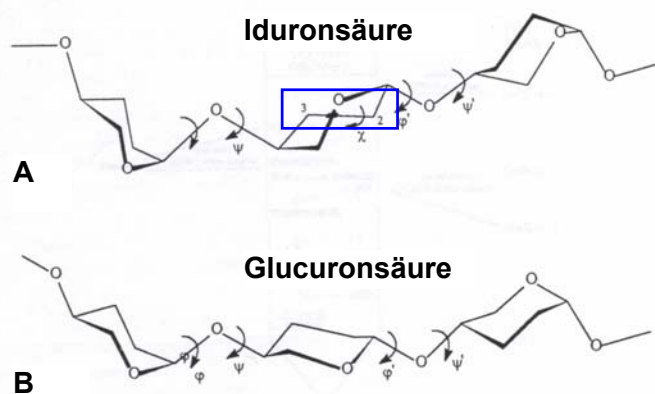


Abb. 75: Vergleich von Iduronsäure (A) und Glucuronsäure (B); die Möglichkeit der Drehung des Moleküles um die C2 - C3-Bindung verleiht Iduronsäure ein hohes Maß an Flexibilität

Das Fehlen der IdoA im Hyaluronsäuremolekül könnte eine Ursache für die fehlende Spezifität gegenüber dem ATIII-Molekül sein. Ein Vergleich von Iduronsäure mit Glucu-

ronsäure zeigt, dass die Iduronsäuremoleküle 2 energetisch gleiche Konformationen innerhalb der Glucosaminoglykankette annehmen können. Diese Möglichkeit verleiht ihr eine größere Flexibilität bzgl. der Wechselwirkung zwischen der Carboxylatgruppe und den positiv geladenen Oberflächengruppen im ATIII-Molekül (Abb. 75).

Betrachtet man die durch ATIII-Zugabe verursachte Wirkungssteigerung der inhibitorischen Aktivität gegenüber FIIa und FXa, so scheint HYA PS 10A den für die Wechselwirkung mit ATIII günstigeren Molekülaufbau zu besitzen. Die Anti-Thrombin und Anti-Xa Aktivität scheint die Summe, der sich aus einer direkten, unspezifischen Wechselwirkung mit den Serin-Proteasen und einer ebenfalls direkten, unspezifischen Wechselwirkung mit ATIII ergebenden Wirkung zu sein. Anders als bei Heparin, ist die Fähigkeit, die Konformation von ATIII nach dem Binden desselben zu ändern und als Folge davon die Inaktivierung der Faktoren IIa und Xa zu beschleunigen, deutlich geringer ausgeprägt.

Antagonisierung der antikoagulierenden Wirkung durch Protaminsulfat

Protamine sind eine Gruppe niedermolekularer Proteine, welche reich an Prolin, Arginin (2/3 des Moleküls) und anderen basischen Aminosäuren sind. Aufgrund der hohen Dichte basischer Oberflächengruppen sind sie in der Lage über die Sulfatgruppen der Heparine Komplexe zu bilden, wodurch Heparine ihre antikoagulierende Aktivität verlieren (Racanelli et al., 1985). Aufgrund dieser Eigenschaft werden sie als chemische Antagonisten eingesetzt, um Überdosierungen mit Heparin zu neutralisieren.

Der Einfluss von Protaminsulfat auf die TZ-verlängernde Wirkung einer ausgewählten HYA-Konzentration wurde untersucht. Ähnlich wie für Heparin stellt Protaminsulfat auch für die beiden sulfatierten Hyaluronsäuren einen Antagonisten dar, mit dem die verlängerten TZ verkürzt werden können. Da auch die sulfatierten Hyaluronsäuren, bedingt durch die große Anzahl an Sulfatgruppen, eine hohe Dichte negativer Ladungen aufweisen, ist auch hier davon auszugehen, dass die Bildung eines Komplexes zum Verlust der antikoagulierenden Aktivität führt. Protaminsulfat kann dabei entweder die freie Substanz direkt komplexieren oder die Substanz aus einem vermutlich leichtdissoziierbaren Gleichgewicht mit der Serinprotease verdrängen und anschließend inaktivieren.

Die sulfatierten Hyaluronsäuren werden im Verhältnis 1:3,3 (HYA PS 10A : PS) und 1:1,2 (HYA DS 48 : PS) neutralisiert.

Plasmatische Gerinnungszeit nach Aktivierung der Gerinnung über den extrinsischen Gerinnungsweg

Als Teil der sekundären Hämostase stellt das extrinsische Gerinnungssystem mit aktiviertem Proconvertin (FVIIa) als zentralen Faktor einen wichtigen Bestandteil innerhalb der Blutgerinnung dar. Die Aktivierung dieses Gerinnungssystems geschieht innerhalb von Sekunden als Folge von Gefäßverletzungen, z.B. auch postoperativ.

Desweiteren kann die Aktivierung von FVII außer über den „klassischen“ extrinsischen Weg auch über die Faktoren IXa und Xa erfolgen. In beiden Fällen steht am Ende der Aktivierung die Bildung von prokoagulatorischem Thrombin. FVIIa kommt damit eine bedeutende Rolle bei thrombogenen Prozessen zu.

Um den antikoagulierenden Mechanismus der sulfatierten Hyaluronsäuren weiter aufzuklären, wurde deren Einfluss auf FVIIa exemplarisch am Beispiel von HYA DS 48 untersucht. Mit Hilfe des gewählten Versuchsaufbaus ist es möglich im Falle einer Verlängerung der GZ von einer direkten Hemmung des FVIIa auszugehen, denn nach Gerotziapas et al. (1996) und Morrissey et al. (1993) kann eine Beeinflussung des Versuches durch eine Hemmung von FXa und FIIa ausgeschlossen werden.

Die Verbindung zeigte eine relativ starke ($IC_{50} = 2,1 (2,0-2,1) \mu\text{g/mL}$), konzentrationsabhängige Anti-VIIa Aktivität, die zu einer deutlichen Verlängerung der GZ führte. Diese inhibierende Wirkung könnte zwar durch Cofaktoren wie ATIII vermittelt oder verstärkt worden sein, da diese im Reaktionsansatz enthalten waren, jedoch gilt auch hier zu bedenken, dass HYA DS 48 nicht die notwendigen strukturellen Voraussetzungen für eine derartige Wechselwirkung besitzt. Auch Heparin u.a. sulfatierte Verbindungen zeigten sowohl in In-vitro- als auch in In-vivo-Studien eine FVIIa-mindernde Aktivität, die ATIII-vermittelt ist (Pernerstorfer et al., 1999, 1996; Gerotziapas et al., 1999). Neben dieser direkten Beeinflussung wurde für diese Verbindungen auch eine indirekte Hemmung der Aktivierung von FVII beschrieben, welche durch eine Inhibierung von FXa und FIXa erfolgt (Gerotziapas et al., 2000). Ein Eingriff in diesen Weg der FVII-Aktivierung wäre auch für die sulfatierten Hyaluronsäuren als FXa-Inhibitoren denkbar. Im Rahmen einer antithrombotischen Behandlung könnte, im Fall einer Bestätigung o.g. Ergebnisse durch In-vivo-Versuche, die durch die sulfatierten Hyaluronsäuren ver-

ursachte FVIIa-Aktivitätsminderung einen positiven Einfluss auf das Gerinnungsverhalten des Patientenblutes haben.

Einfluss auf das PC-Antikoagulationssystem

Dem PC-Antikoagulationssystem kommt innerhalb der Blutgerinnung eine zweifache Rolle zu. Zum einen kann es über eine Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa antikoagulierend wirken (Abb. 76) zum anderen über die Inaktivierung von PAI-1 und PAI-3 (PCI) und über die Stimulierung der t-PA-Freisetzung aus Endothelzellen mit einer profibrinolytischen Wirkung in den Gerinnungsvorgang eingreifen.

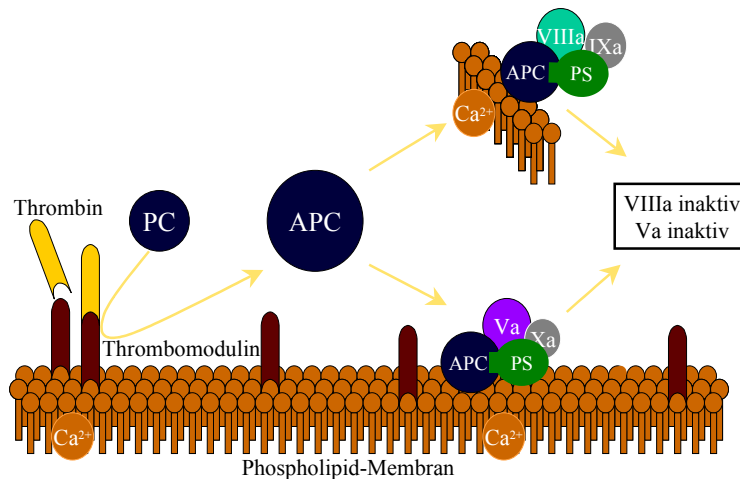


Abb. 76: Schematische Darstellung des Protein C-Antikoagulationssystems.
An Thrombomodulin gebundenes Thrombin verliert die meisten seiner prokoagulatorischen Funktionen und wird in Anwesenheit von Ca²⁺ zum potenten Aktivator von Protein C (PC), Aktiviertes PC (APC) spaltet spezifisch die membrangebundenen Faktoren Va (FVa) und VIIIa (FVIIIa), die APC-Aktivität wird durch Protein S (PS) und FV verstärkt

Die physiologische Bedeutung dieses PC-Pathway wird besonders deutlich am Beispiel der lebensbedrohlichen Erkrankung <Purpura fulminans> und dem hohen Risiko thrombotischer Komplikationen bei Patienten mit heterozygoten PC-Mangel (Griffin, 1981; Dreyfus, 1991).

Gerade im Hinblick auf einen möglichen Einsatz der sulfatierten Hyaluronsäuren unterstützend zu einer thrombolytischen Therapie ist es von großer Bedeutung, dass die Funktionalität dieses Regulationssystems nicht beeinträchtigt wird. Verschiedene di-

rekte, spezifische Thrombininhibitoren (Efigatran[®], DuP 714) zeigten bei der Behandlung von Koronararterienerkrankungen einen geringeren Nutzen im Vergleich zu UFH und LMWH, der eventuell auf einen Eingriff in das PC-Antikoagulationssystem zurückzuführen ist (Callas et al., 1995).

Im *plasmafreien System* wurde der Einfluss der Prüfsubstanzen auf APC und auf die Protac[®]-vermittelte PC-Aktivierung untersucht. Als Vergleichssubstanz wurde PPS herangezogen.

Der Einfluss der beiden sulfatierten Substanzen auf APC ist gering. Lediglich in höheren Konzentrationen wird mit 200 µg/mL durch HYA PS 10A eine 30,9%ige Hemmung der Aktivität erreicht. Die gleiche Wirkung wird durch HYA DS 48 mit der Hälfte der Substanzkonzentration verursacht. Die genannten Werte entsprechen den in-vitro maximal erreichbaren Inhibitionen („optimalste Hemmkonzentration“), denn die Konzentrations-Wirkungskurve durchläuft bei diesen Konzentrationen ein Maximum in der inhibierenden Wirkung. Trotz geringeren Schwefelgehaltes stellte HYA DS 48 die stärker wirksame Verbindung dar.

PPS hatte den geringsten Einfluss auf APC. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 400 µg/mL minderte es die APC-Aktivität um 35,3%.

Auch die Protac[®]-vermittelte Aktivierung wird bei allen 3 Verbindungen erst in Konzentrationen außerhalb des zu erwartenden therapeutischen Konzentrationsbereiches (400 µg/mL) gehemmt. Aber auch hier führt die um 20-30% verminderte APC-Aktivität zu Werten die noch innerhalb des Normbereiches (70-120% Aktivität) liegen. Die gemessenen Effekte dürften jedoch kaum von klinischer Relevanz sein, da die bisherigen Untersuchungen, v.a. die der TZ im Plasma, im Falle eines therapeutischen Einsatzes der Substanzen, wesentlich geringere Konzentrationen erfordern sollten.

Genannte Versuche sollten in *Humanplasma* als Mehrkomponentensystem wiederholt werden. Um die Genauigkeit der Messungen zu erhöhen, wurde ein „APC-selektives“ Substrat <S-2366> verwendet. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten von APC mit Thrombin (36% gemeinsame Strukturmerkmale (Stenflo, 1984) ist diese Selektivität aber nur relativ, so dass bei Anwesenheit von Thrombin und Plasmakallikrein auch diese mit erfasst würden. Aus diesem Grund wurde zur Aktivierung von PC der spezifische Aktivator Protac[®] verwendet.

Wie unter Punkt 4.9 beschrieben, führte jedoch schon allein der Zusatz der sulfatierten Hyaluronsäuren und PPS zu Humanplasma zum Entstehen einer enzymatischen Aktivität, welche mit S-2366 nachweisbar war. Trotz zahlreicher Versuche konnte nicht eindeutig geklärt werden, welcher Herkunft diese ist (siehe Punkt 5.1.3.2.). Da sie aber bei der Auswertung der Versuche in Humanplasma berücksichtigt werden muss, kann die tatsächliche Wirkung der Prüfsubstanzen nur anhand der Extinktionsmesswerte abgeschätzt werden. Wie im Ergebnisteil dargestellt, scheint der Einfluss der Substanzen auf APC und auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC gering zu sein. Die Extinktionswerte größer 100% APC-Aktivität stellen wahrscheinlich die Summe der Aktivierung durch Protac und durch die Prüfsubstanzen dar. Im Konzentrationsbereich außerhalb dessen eine unspezifische Aktivierung stattfand, wurde die APC-Aktivität durch die Prüfsubstanzen nicht gemindert.

Dieser relativ geringe Einfluss auf APC wurde auch für andere sulfatierte Verbindungen wie Heparin gefunden (Callas et al., 1995). Betrachtet man die Struktur von APC näher, so wird deutlich, dass sowohl die leichte als auch die schwere Kette einen großen Anteil an Asparaginsäure z.T. in hydroxylierter Form und neutraler AS wie Glyin, Leucin und Isoleucin enthalten. Ein direkter Angriff sulfatierter Verbindungen in diesen Strukturbereichen ist also unwahrscheinlich. Das APC-Molekül enthält in der schweren Kette mehrere aktive Zentren. Während ein Angriff in Position 99, 201, 360 <Serin> und Pos. 102, 189, 257 <Asparaginsäure> unwahrscheinlich erscheint, könnten die basischen AS in Position 56 und 211 <Histidin> ein möglicher Angriffspunkt sein (Stenflo, 1984).

Das APC-Molekül teilt sich dabei in mehrere Domänen mit unterschiedlichen Struktur- und Funktionseigenschaften auf (Abb.77). Der γ -carboxy-Glutaminsäure (Gla)-Domäne folgen 2 EGF-ähnliche Abschnitte, die wahrscheinlich zusammen mit der Gla-Domäne für die Bindung von PC an den Thrombin-Thrombomodulin-Komplex essentiell sind (Hogg et al., 1992). Aufgrund des Aufbaus dieser Domäne v.a. aus sauren und neutralen Aminosäuren ist ein Eingriff der sulfatierten Hyaluronsäuren, der möglicherweise darüber zu einer Hemmung der Aktivierung von PC führen könnte, unwahrscheinlich. An diesen Abschnitt des APC-Moleküls schließt sich die Protease-Domäne mit der sog. „katalytischen Triade“ an, die aus den o.g. AS His, Asp und Ser in Pos. 211, 257 und 360 gebildet wird.

ATIII und HCII, die in den Versuchen in Humanplasma enthalten waren, scheinen ähnlich Heparin (Callas et al., 1995) bei der APC-Inhibierung keinen synergistischen Einfluss zu haben.

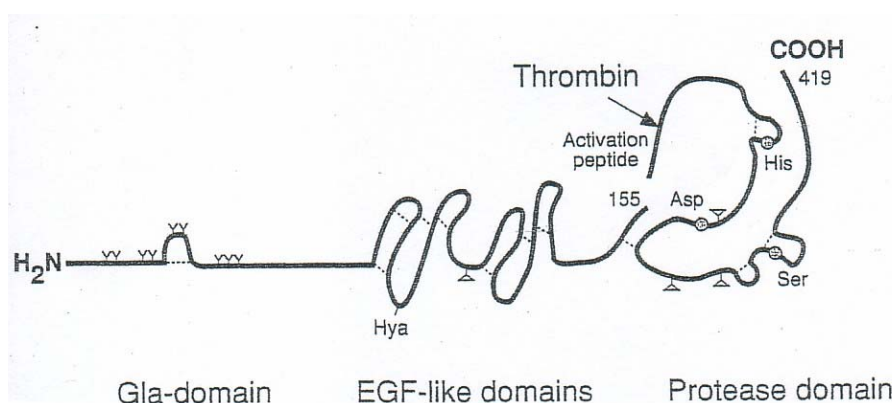


Abb. 77: Domänenstruktur von Protein C.

Abkürzungen: Y= Gla-Reste (Glutaminsäure), HYA= Erythro- β -hydroxy-Aspartat-säure, O= katalytische AS (katalytischen Triade) des aktiven Zentrums in Pos. 211, 257 und 360, Δ = N-Glykosilierungsstellen, EGF= epidermaler growth faktor

Der Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung ist relativ gering. Die Versuchsdurchführung mit dem nichtphysiologischen PC-Aktivator Protac[®] stellt dabei einen Kompromiss dar. Unter physiologischen Bedingungen wird PC durch einen Komplex aus Thrombin-Thrombomodulin aktiviert. Der Nachteil dieser Aktivierung ist das dadurch im Reaktionsansatz enthaltene Thrombin, das durch die Prüfsubstanzen in der Aktivität gemindert worden wäre (Linder et al., 1999) und eine Spaltung von S-2366 verursacht hätte (Weitz et al., 1990; Gast et al., 1994). Der Zusatz von Hirudin als spezifischen FIIa-Inhibitor führt nach Linder et al. (1999) in Humanplasma zu einer gesteigerten APC-Aktivität, die falsch positive Ergebnisse geliefert hätte. Zum anderen muss gewährleistet sein, dass die vollständige Aktivierung von PC in kurzer Zeit stattfindet, da sonst durch den frei im Plasma vorkommenden PCI eine Inaktivierung von APC stattfindet, welche durch die Prüfsubstanzen beschleunigt werden könnte. Ähnliche Befunde existieren für Heparin u.a. sulfatierte Verbindungen (Aznar et al., 1996; Kazama et al., 1987). Heparin bindet dabei über eine elektrostatische Wechselwirkung direkt an den PCI und beschleunigt so die APC-Inaktivierung. Da die für die Bindung an ATIII notwendige Pentasacharideinheit, im Fall des PCI keine strukturelle Voraussetzung ist und der PCI eine relativ große Zahl basischer AS wie Arginin und Lysin enthält (Suzuki, 1984), konnte eine heparinähnliche Wechselwirkung nicht ausgeschlossen werden.

Die Forderungen nach einer schnellen und vollständigen Aktivierung von PC werden von Protac[®] erfüllt. Protac[®] ist ein einkettiges Glykoprotein, welches 1986 erstmals von Stocker et al. aus dem Gift der Copperhead Schlange *Agkistrodon contortrix* isoliert wurde. Es handelt sich um einen schnell wirkenden Protein C Aktivator, der aufgrund seiner hohen Spezifität für Protein C v.a. für Untersuchungen im Plasma gut geeignet ist. Die Aktivierung geschieht innerhalb 3-5 min vollständig und spezifisch (Stocker et al., 1987). Protac[®] verursacht keine Fibrinogengerinnung und interagiert nicht mit Hirudin und ATIII (Orthner et al., 1988).

Zur Beurteilung der auf diesem Weg gefundenen Ergebnisse ist eine genaue Betrachtung des Wirkungsmechanismus von Protac[®] erforderlich. Während Eigenschaften wie Unempfindlichkeit gegenüber großen Temperatur- und pH-Wertschwankungen, stöchiometrische Umsätze mit APC (1:1) auf einen nicht-enzymatischen Mechanismus schließen lassen (Stocker et al., 1986), haben Mc Mullen et al. (1989) eine katalytischen Stelle im Aktivatormoleküls identifiziert, die entsprechend den Serinproteasen von Säugetieren in Pos. 40 His, Pos. 85 Asp und Pos. 177 Ser enthält, was das Vorhandensein enzymatischer Eigenschaften bedeuten könnte, gefunden. Das Molekül enthält einen Asp-Rest in Pos. 171, welcher bei Enzymen der Trypsinfamilie Bestandteil der Substratbindungstasche ist, die v.a. Arginyl- und Lysylbindungen spaltet.

Entscheidend ist weiterhin, dass die *funktionelle* Fähigkeit von APC gegenüber S2366 (Glu-Pro-Arg-pNA HCl) und seinem natürlichen Substrat FVa (Pos. 306 und 506 Arg der schweren Kette) durch diese Art der Aktivierung nicht verloren geht (Kemkes-Matthes et al., 1999; Nicolaes et al., 1995; Kraus et al., 1995).

Doch auch chromatographische Untersuchungen konnten den Wirkungsmechanismus von Protac[®] nicht eindeutig klären. Momentan geht man von einem Komplex bestehend aus Protac[®] und PC, von dem ein Teil abgespalten worden ist, aus, der ähnlich dem SK-Plasminogen- und Staphylokoagulase-Prothrombinkomplex enzymatische Aktivität besitzt (Martinoli et al., 1981, Markwardt et al., 1972).

Damit können die Ergebnisse des Einflusses der HYAs auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung nicht ohne weiteres auf In-vivo-Verhältnisse übertragen werden. Während die sulfatierten Hyaluronsäuren als direkte aber unspezifische Thrombininhibitoren keinen Einfluss auf bereits gebildetes APC ausüben, könnten sie dennoch indirekt endogene antikoagulierende Prozesse beeinflussen, in dem sie in den PC-Aktivierungsvorgang eingreifen. Auszuschließen ist dabei ein Eingriff, der eine Bindung zwischen der Gla- EGF-ähnlichen Domäne des PC-Moleküls und dem Throm-

bin/Thrombomodulinkomplex verhindert (s.o.). Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch eine Wechselwirkung mit dem Thrombin/Thrombomodulin des membranständigen Aktivierungskomplexes, da sowohl HYAs als auch Thrombomodulin an der „anion-binding exosite“ von FIIa binden können. In diesem Fall spielt die Affinität, mit welcher die Substanzen mit Thrombomodulin um die Bindungsstelle konkurrieren eine entscheidende Rolle. Thrombomodulin bindet mit einer Dissoziationskonstante von ca. 1nm an Thrombin und besitzt damit eine sehr hohe Affinität zu Thrombin (Hortin et al. 1991).

5.1.3.2. Unspezifische amidolytische Aktivität gegenüber chromogenen Substraten nach Inkubation von Humanplasma mit den Prüfsubstanzen

Alle untersuchten Prüfsubstanzen verursachten nach Zugabe zu Humanplasma eine konzentrations- und strukturabhängige amidolytische Aktivität gegenüber dem chromogenen Substrat S-2366. In zahlreichen Einzelversuchen wurde versucht, sie nach Art und Herkunft näher zu charakterisieren.

Sicher ist zum einen, dass der Substratspaltung ein *enzymatischer* Vorgang zu Grunde liegt, da die bei 4°C gemessene Aktivität zwar vorhanden ist aber in einem deutlich geringeren Ausmaß. Während sich bei 37°C auch HSÄ-Substanzen als relativ stark wirksam erwiesen, ist deren amidolytische Aktivität im Vergleich zu den sulfatierten Verbindungen bei 4°C nur noch gering. Zum anderen lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass Sulfatgruppen keine notwendige strukturelle Voraussetzung für eine Aktivierung sind.

Eine Verunreinigung der Prüfsubstanzen und anderer verwendeter Bestandteile mit proteolytisch aktiven Verbindungen kann durch Herstellerzertifikate ausgeschlossen werden.

Die weiteren durchgeführten Versuche führten zu z.T. widersprüchlichen Ergebnissen. Die starke Aktivität von Thrombin gegenüber S-2366 legte einerseits die Vermutung einer thrombinähnlichen Aktivität nahe. Andererseits war diese nicht mit Hirudin hemmbar. Auch Aktivierungsversuche von Prothrombin in verschiedenen Medien blieben ohne Ergebnis. Eine mögliche Erklärung wäre die Bildung eines enzymatisch aktiven Komplexes zwischen den Prüfsubstanzen und Plasmabestandteilen. Ein derartiger Komplex muss nicht zwingend durch Proteaseinhibitoren hemmbar sein.

Die 2. Vermutung, welche die Erklärung für die amidolytische Aktivität im PC-Antikoagulationssystem sucht, konnte ebenfalls nur zum Teil bestätigt werden. Grundlage dieser Annahme bildeten Arbeiten von Petäjä et al. (1997) und Fernandez et al. (1999), die einen synergistischen Einfluss von Heparin auf die APC-induzierte FV-Hemmung beschrieben. Man vermutet, dass Heparin dabei als Cofaktor oder Template fungiert, an welches der FV und APC in Gegenwart von Phospholipiden und Ca^{2+} anbinden. Im Ergebnis dessen, wird die Spaltung von FV in Pos. 306 Arg beschleunigt. Dieser Vorgang ist dabei unabhängig von Protein S, ATIII, FVIII, FVIIIa und HCII. Für diese Vermutung spricht, die starke Substratspaltung von S-2366 und S-Th durch das Aktivierungsprodukt. Nach Zusatz des APC-Inhibitors Aprotinin wurde die amidolytische Aktivität deutlich gesenkt. Das oben beschriebene Templatemodell könnte sich in diesem Fall aus Prüfsubstanz, PC und S-2366 zusammensetzen. Allerdings fand bei der Durchführung der Versuche in PC-Mangelplasma ebenfalls eine, wenn auch geringere, Substratspaltung statt, so dass die alleinige Aktivierung von PC oder das alleinige Vorliegen von PC in einem Komplex mit enzymatischer Aktivität nicht angenommen werden kann.

Durch die durchgeführten Versuche konnte nicht eindeutig geklärt werden, welcher Herkunft die amidolytische Aktivität ist. Ähnliche Befunde wurden auch für das therapeutisch als Thrombin-Inhibitor genutzte Hirudin, schon von Linder et al. (1999) beschrieben, die im Ergebnis ihrer Einzelversuche die amidolytische Aktivität als unspezifischen Effekt beschrieben.

Auswirkungen dieser „unspezifischen Aktivierung“ im Sinne einer hyperkoagulierenden Wirkung bei Anwendung sulfatierter Hyaluronsäuren in-vivo müssten in weiteren Versuchen abgeklärt werden. In der Bestimmung der TZ, welche ebenfalls im Mehrkomponentensystem Humanplasma durchgeführt wurde, konnte keine Verkürzung der GZ nachgewiesen werden. Auch die im niedrigen Konzentrationsbereich bei der extrinsisch aktivierten Gerinnung verursachte Hyperkoagulation entspricht in Ihrem Ausmaß nicht dem, welches aus den Versuchen mit chromogenen Substraten zu erwarten gewesen wäre.

Gerade für die Anwendung von HYAs im Bereich der Antikoagulation ist die Abklärung dieses Befundes von großer Bedeutung. Aber auch für NHS, welche im Verdacht stehen thrombophile Zustände auszulösen, ist die Untersuchung der Auswirkung dieser Aktivierung in-vivo von Relevanz. V.a. eine Beteiligung des PC-Antikoagulations-

systems, dem v.a. taiwanische Forschungsgruppen eine bedeutenden Rolle bei der Entstehung der BD zuzuschreiben, muss näher untersucht werden.

5.1.3.3. Einfluss auf das Fibrinolyse-System

Durch die Fibrinolyse (Abb. 78), dem Gegenstück der Blutgerinnung, werden Fibringerinnsel gespalten und damit aufgelöst. Fibrinolytische Vorgänge spielen zum einen innerhalb der Hämostase eine wichtige Rolle, da damit der physiologischerweise im Blutkreislauf stattfindenden Fibrinbildung entgegengewirkt und dadurch einer intravasalen Thrombenbildung vorgebeugt wird. Besondere Bedeutung kommt diesem System v.a. in Bereichen der Mikrozirkulation zu (Mutschler, 1996). Zum anderen spielen fibrinolytische Vorgänge bei Gabe von (indirekten) Fibrinolytika wie Streptokinase (SK) bei bestehenden Gefäßthromben eine wichtige Rolle.

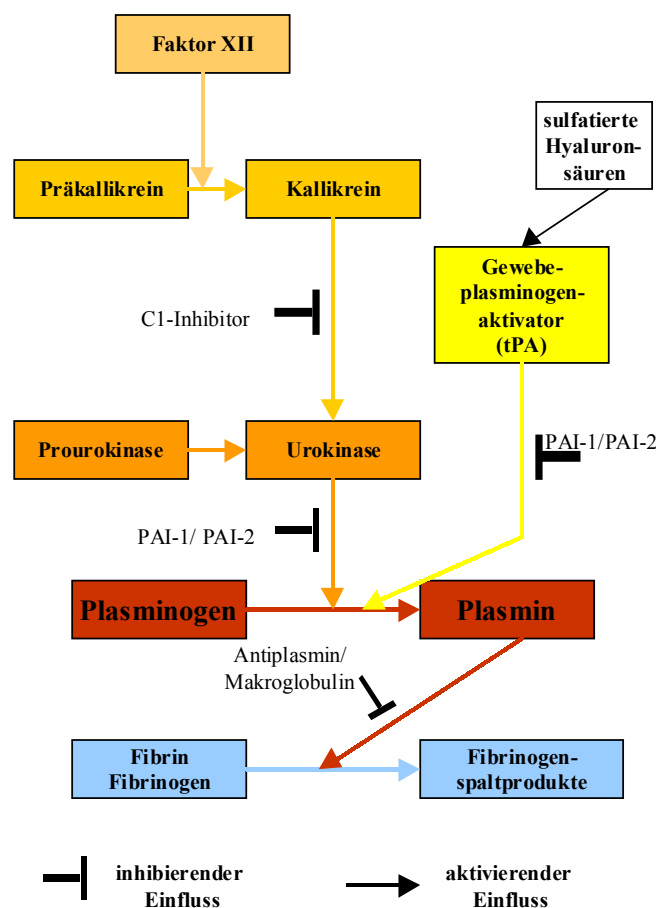


Abb. 78: Fibrinolyse-System (PAI=Plasminogenaktivatorinhibitor), tPA-Freisetzung in Gegenwart von Gefäßendothel durch sulfatierte Hyaluronsäuren

Die beiden sulfatierten Hyaluronsäuren zeigten ebenso wie PPS im „Lysetest“ keine antifibrinolytische Aktivität.

Dieses Ergebnis ist zum einen bedeutsam, da mit ihm eine nachteilige Beeinflussung einer thrombolytischen Therapie wie sie auch im Falle einer zeitgleichen SK-Behandlung auftreten könnte, ausgeschlossen werden kann.

Bezüglich dieses Einsatzgebietes sind möglicherweise die Prüfsubstanzen Heparin in seiner Wirkung überlegen. Denn Klöcking et al. (1998) fanden, dass sulfatierte Hyaluronsäuren (Bsp.: HYA DS 41) zwar nicht direkt fibrinolytisch wirksam sind aber über die vermehrte Freisetzung von Gewebelplasminogenaktivator (t-PA) in Gegenwart von Gefäßendothel eine profibrinolytische Wirkung entfalten, die im Vergleich zu Heparin (UFH) und PPS deutlich stärker ist (Tab. 10).

*Tabelle 10: Prozentuale t-PA-Freisetzung während der Durchströmung am isolierten Gefäßpräparat (Schweineohr)
Substanzkonzentration: 100 µg/mL; Kontrolle: reine Tyrodelösung*

Substanz	MW	SO ₃ /COO ⁻	t-PA-Aktivität (%)	n
HYA DS 41	65000	3,6	317±19	3
UFH	15-20000	2,2	131±27	9
PPS	4800	1,9	118±10	5
Kontrolle			103±5	8

Ein anderer interessanter Untersuchungspunkt wäre in diesem Zusammenhang der Einfluss der Prüfsubstanzen auf Clot-gebundenes Thrombin, denn aufgrund seiner noch vorhandenen enzymatischen Aktivität ist es weiterhin am Fortschreiten thrombotischer Prozesse beteiligt. Eine Inaktivierung dieses gebundenen Thrombins wäre denkbar, da die sulfatierten Hyaluronsäuren, anders als Heparin, ATIII-unabhängig freien FIIa hemmen. ATIII besitzt gegenüber Clot-gebundenen Thrombin nur eine begrenzte Aktivität (Gast et al., 1994; Weitz et al., 1990).

Auch für die physiologischerweise permanent im Blut ablaufende Fibrinolyse ist die fehlende antifibrinolytische Wirkung von Vorteil. Eine Unterfunktion der physiologischen Fibrinolyse durch eine verminderte Plasminogenaktivatorkonzentration oder -aktivität bzw. durch eine zu hohe Konzentration an in diesem Prozess eingreifenden Inhibitoren kann die Ursache thromboemolischer Erkrankungen sein (Markwardt et al., 1972).

5.2. Natürlich vorkommende Huminsäuren

5.2.1. Genese und chemische Charakterisierung

Nach Ziechmann (1996) sind Huminstoffe (HSt) eine Stoffklasse „sui generis“, da sowohl für ihre Einordnung in den Bereich der Naturstoffe als auch für ihre Beschreibung besondere Bedingungen gelten. Die Ursache dafür liegt in den zahlreichen Genesemöglichkeiten und den sich daraus ergebenden molekularen Gegebenheiten (Abb. 79).

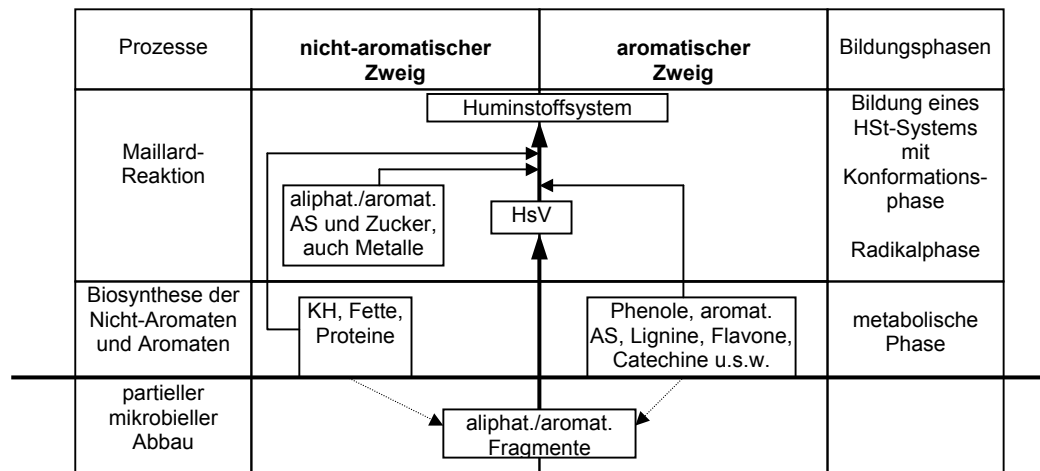


Abb. 79: Genese der Huminstoffe (nach Ziechmann, 1996).

—→ Abbau, —→ Aufbau, KH: Kohlenhydrate, AS: Aminosäuren, HsV: Huminstoffvorstufen

Nach Oden (1919) werden HSt entsprechend ihrer Löslichkeit und Färbung in Wasser, Alkohol und wässrigem Alkali in Fulvosäuren, Hymatomelansäuren, Huminsäuren und Humuskohle eingeteilt. HS stellen die mengenmäßig wichtigste Fraktion dar. Als HSt-Bildungsmechanismus werden zwei Modellreaktionen angenommen. Beide Reaktionen dürfen nicht als HSt-Bildungsmechanismus missverstanden werden, jedoch lassen sich aus ihnen wichtige Aspekte für die Bildung von HSt aus aromatischen und nichtaromatischen Ausgangsstoffen herleiten (Ziechmann, 1988).

a) *Maillard-Reaktion* (HSt-Genese aus nicht-aromatischen Ausgangsstoffen)

Grundlage bildet die Umsetzung der Carbonylgruppen von Zuckern mit den Aminogruppen von Eiweißen. Die Reaktion ist abhängig von der Temperatur und kann Säure- oder Basekatalysiert sein (Heimann, 1969; Maillard, 1912).

- b) *Autoxidation von Polyphenolen* (HSt-Genese aus aromatischen Ausgangsstoffen)
 Bildungsmechanismus, der auf der Oxidation von mehrwertigen Phenolen basiert. Die Reaktion kann enzymatisch oder in alkalischer Lösung unter Vorhandensein von Sauerstoff gestartet werden (Eller et al., 1920). Auch eine säurekatalysierte Reaktion unter anaeroben Bedingungen, wie sie für das Sphagnumtorf angenommen wird, ist möglich (Painter, 1983).

Als Ausgangsstoffe der Huminstoffbiosynthese kommen organischen Substanzen wie aliphatische/aromatische Aminosäuren, Heterozyklen wie Melanin, Kohlenhydrate, Phenole, Alkohole, Carbonsäuren und Lignine in Frage.

Durch die Besonderheiten der Genese ist keine definierte chemische Konstitution erkennbar. Eine bestimmte Konstitution entspricht nur einem vorübergehenden Zustand und schon benachbarte Partikel können abweichende Konstitutionen aufweisen (Engel, 1998). Mit Hilfe eines Strukturmodells versuchen Ziechmann und Wakil (1972) den allgemeinen Status eines HSt-Systems wiederzugeben (Abb. 80). Jedoch gilt es zu beachten, dass alle Theorien über mögliche Strukturen nur einen Hypothesencharakter besitzen.

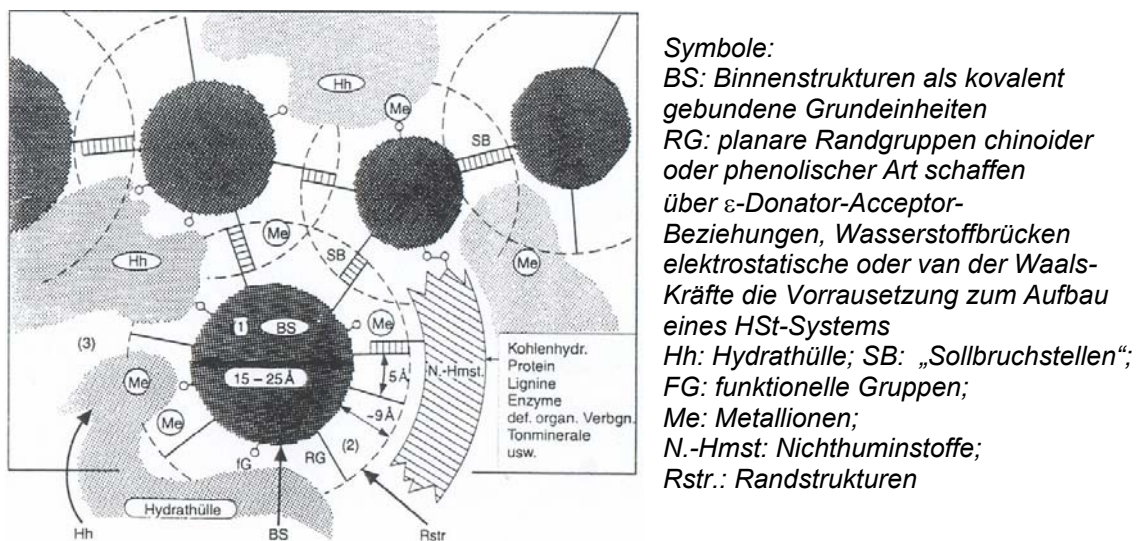


Abb. 80: Strukturmuster eines Huminstoffsystems (nach Ziechmann 1996)

Wesentlich als HSt-Baustein sind die sog. Kern- oder Binnenstrukturen, die mit verschiedenen Randgruppen in zwischenmolekularer Wechselwirkung stehen und zusätzlich noch N-Hmst, Metallionen und Wasser integriert haben. Die Bindungsverhältnisse sind verschiedenartig. Für das HSt-Skelett werden C—C- oder C—O-Bindungen angenommen. Die peripheren Randgruppen werden durch relativ schwache Kräfte wie

Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waalskräfte und π -Bindungen in das HSt-System eingebaut (Ziechmann, 1972, 1996; Wakil, 1972; Fernekorn, 1989)

Das Gerüst von HSt besteht aus aromatischen Ringen, die durch langkettige Alkylstrukturen zu einem flexiblen Netzwerk verknüpft sind (Schulten et al., 1991, Abb. 81).

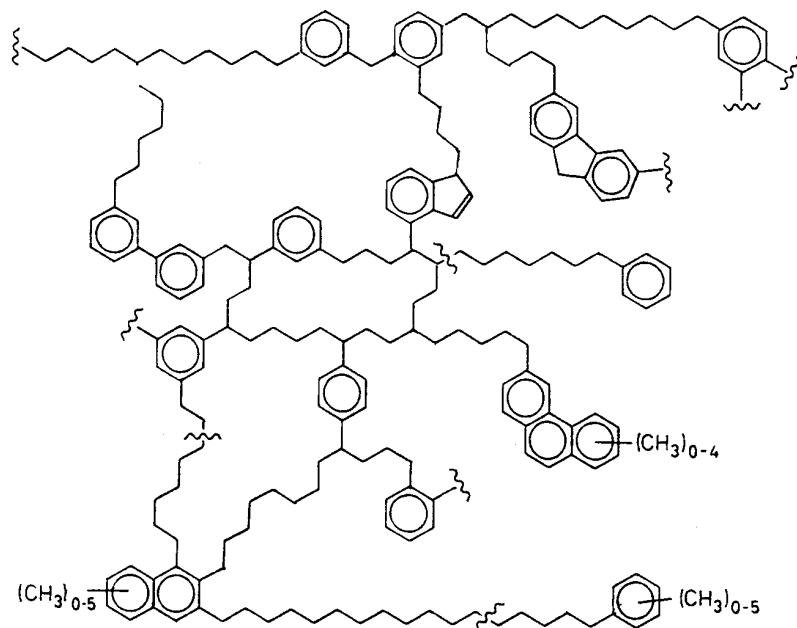


Abb. 81: Modell eines Huminsäure-Grundgerütes nach Schulten et al. (1991)

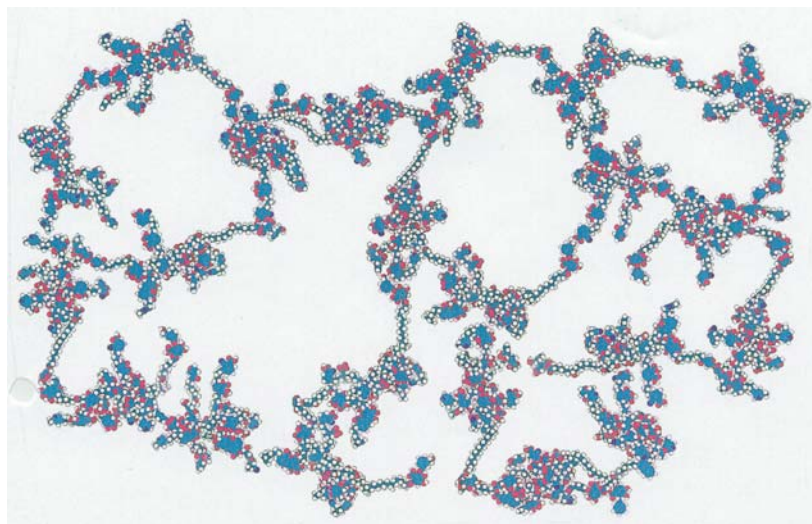


Abb. 82: Huminsäuremodell nach Schulten et al. (2000), MG 124000 Da, schwarz: Kohlenstoff, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff

HS zählen auf Grund ihrer großen Anzahl ionisierbarer Gruppen zu den Polyelektrolyten. Als wesentliche funktionelle Gruppen wurden –OH, –COOH, –C=O, –OCH₃, –C–O–R und –NH₂ nachgewiesen (Klöcking et al., 1994).

Nach Frimmel et al. (1989) gelten die folgenden durchschnittlichen chemisch-analytischen Daten zur Elementarzusammensetzung:

C-Gehalt:	54%	H-Gehalt:	4,5%
O-Gehalt:	33%	N-Gehalt:	2,7%

Die in den HSt enthaltenen HS besitzen je nach Bildungsort (Oberflächengewässer, Moore, humushaltige Böden oder Braunkohle) unterschiedliche Teilchenmassen und verschiedene Gehalte an O- und N-haltigen funktionellen Gruppen (Abb. 82).

5.2.2. Die Blackfoot Disease

Bei der Blackfoot Erkrankung (BD) handelt es sich um eine vorwiegend bei Bewohnern der Südwestküste von Taiwan auftretenden, epidemieartigen Erkrankung der peripheren Gefäße im Bereich der unteren Extremität (Abb.83), welche zu gangränösen und nekrotischen Veränderungen führt (Yu, 1984). Die klinischen Merkmale der BD sind ähnlich der Bürger Erkrankung. Der pathologische Befund entspricht dem der Arteriosklerosis und Thromboangiitis obliterans (Chen et al., 1990). Klinische Untersuchungen an Betroffenen ergaben neben einem erniedrigten Hämatokrit- und Hämoglobinwert eine reduzierte Erythrozytenzahl (Cheng et al., 1999).

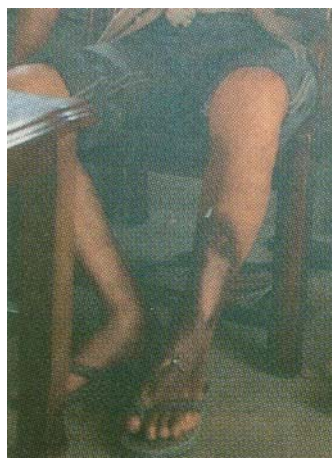


Abb. 83: Gangränöse und nekrotische Veränderung mit Dunkelfärbung der betroffenen Gewebe bei der Blackfoot Disease (Lu, 1990b)

Die Etiologie der Erkrankung ist bislang nicht eindeutig geklärt. Jedoch konnte ein Zusammenhang zwischen dem langjährigen Konsum von Quellwasser der BD-betroffenen Regionen Taiwans und dem Auftreten der BD nachgewiesen werden (Tseng, 1988). Eine Analyse der Quellwasserzusammensetzung ergab erhöhte Konzentrationen verschiedener anorganischer und organischer Bestandteile (Wang, 1996), von welchen neben Arsen (>600 ppb) und Ergotalkaloiden (Mak, 1986) v.a. die sog. fluoreszierenden Huminsäuren (FHS) den Mittelpunkt der laufenden Studien bilden (Lu, 1990b).

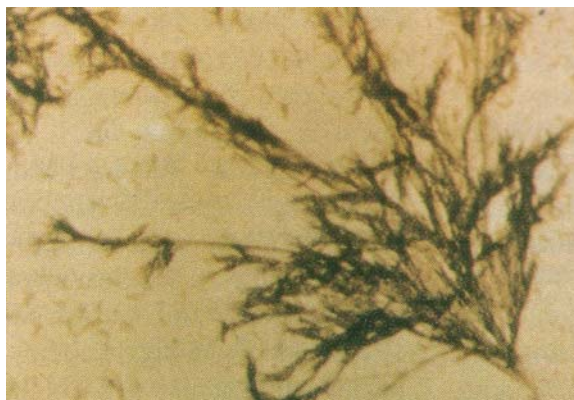


Abb. 84: Kristalle von fluoreszierenden Huminsäuren isoliert aus dem Quellwasser der mit Blackfoot Erkrankung betroffenen Gebieten (Lu, 1990b)

Bei genannten FHS (Abb.84) handelt es sich nach Lu et al. (1990a) um ein Gemisch hochpolymerer Verbindungen mit Molekulargewichten im Bereich von 10^4 - 10^6 Da (Chen et al., 1994), in dem Arsen als 3- und 5-wertige Verbindung komplexartig gebunden vorliegt (Lu et al., 1988). Betrachtet man diese Verbindungen unter UV-Licht ist eine blau-grüne Fluoreszenz zu erkennen (Lu, 1979). FHS sind temperatur-, säure- und basenstabil. Sie erhielten ihre Bezeichnung aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit natürlich vorkommenden HS, wie z.B. phenolischen Grundkörpern und $-COOH$ und $-C=O$ als vorherrschenden funktionellen Gruppen (Lu, 1990b; Lu, 1988; Yang et al., 1994). Die durchschnittliche tägliche orale Aufnahme beträgt in den betroffenen Regionen ca. 400 mg (Huang et al., 1994).

In der Pathogenese der BD werden derzeit 2 Mechanismen diskutiert.

Mechanismus 1 gründet auf Untersuchungsergebnisse, in welchen ein nachteiliger Einfluss der FHS auf das Endothel von Gefäß- und Blutzellen nachgewiesen wurde, als Folge dessen, es zu einer erhöhten Membrandurchlässigkeit, veränderten Funktion und verminderten Lebensfähigkeit dieser Zellen und Zellmembranen kommt.

- 1.) Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt in-vitro bei menschlichen Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC) (Chen et al., 1990) zu einer erhöhten Membranpermeabilität auf Grund derer es intrazellulär zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration kommt. Ca^{2+} -Ionen übernehmen bei der Aktivierung verschiedener Enzyme eine second-messenger Funktion, sind aber auch ursächlich für Prozesse, die ausgehend von einer verminderten Funktion und Lebensfähigkeit zum Zelltod der betroffenen Zellen führen können (Yang et al., 1996). Betroffen sind weiterhin Erythrozyten und Enzyme wie die Superoxid-Dismutase, Katalase und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase als zelluläre Abwehrsysteme. In den roten Blutkörperchen wurde (a) in Folge einer erhöhten Lipidperoxidation eine Deformation der Membranen mit Hämolyse (Cheng et al., 1999) und (b) die Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin nachgewiesen (Cheng et al., 1999; Hseu, 2000).
- 2.) Eine Untersuchung von Blutproben BD-betroffener Patienten ergab erhöhte Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1)- und erniedrigte tissue Plasminogenaktivator (tPA)-Spiegel, welche zu einer geringeren Fibrinolysekapazität führen können. Beide Bestandteile spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation fibrinolytischer Abläufe (Wu et al., 1993). PAI-1 inhibiert die Bildung von Plasmin aus Plasminogen durch Bildung eines inaktiven 1:1-Komplexes mit tPA. Yang et al. wies 1996 nach Zusatz von FHS zu HUVEC eine erhöhte Sekretion von PAI-1 und eine erniedrigte Bildung von tPA nach.
- 3.) Der tissue Faktor (TF) ist ein transmembranes Glycoprotein, welcher als Cofaktor bei der Aktivierung von FVII eine wichtige Rolle spielt. Die in-vitro unter dem Einfluss von FHS in Folge des Ca^{2+} -Einstroms an HUVEC nachgewiesene erhöhte Sekretion von TF, als Folge der gesteigerten TF-mRNA Synthese, kann über die Aktivierung des extrinsischen Gerinnungsweges zu einer erhöhten Gerinnungsbereitschaft führen (Yang et al., 1996).
- 4.) Konzentrationen bis 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FHS führten als Folge einer vermehrten mRNA-Synthese in HUVEC zu einer gesteigerten Produktion und Sekretion von Endothelin-1. Das normal im Gefäßendothel gebildete Polypeptid ist der stärkste Vasokonstriktor des Organismus (Chiu et al., 1993).
- 5.) Unter dem Einfluss von FHS findet eine dosisabhängige Reduktion der Thrombomodulin (TM)-Aktivität an der Zelloberfläche von HUVEC statt, die nach Yang et al. (1998) zu einer verminderten Aktivierung von PC führt. Diese inhibierende Wirkung wird dabei nicht über die Produktion oder Freisetzung von PCI verursacht, sondern durch eine irreversible nicht-kompetitive Hemmung der Thrombinbindung an TM.

Durch erhöhten Ca^{2+} -Einstrom kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C, welche zusammen mit den FHS eine Down-Regulation von TM bewirkt.

Mechanismus 2 geht von einer direkten Wechselwirkung zwischen FHS und Blutgerinnungsfaktoren aus.

1.) FHS und HSÄP führten im Konzentrationsbereich von 0,5-5 mg/mL zu einer Verkürzung und im Bereich von 10-20 mg/mL zu einer Verlängerung der PT, TZ und APTT. Diesen konzentrationsabhängigen Unterschied führt man auf eine mögliche Bildung höherpolymerer Strukturen bei zunehmenden Konzentrationen zurück (Lu, 1990b; Lu, 1990c). FHS können in 4 Fraktionen unterschiedlichen MGs aufgeteilt werden. Die Fraktion mit dem höchsten MG zeigte den stärksten antikoagulierenden Effekt in der PT und APTT (Lu, 1990a). Welche Gerinnungsfaktoren im einzelnen gehemmt werden, ist Gegenstand der laufenden Untersuchungen.

Auf Grund ihrer gefäßverengenden Wirkung und prokoagulatorischen Wirkung im niederen Konzentrationsbereich sowie ihrer Potenz zur Erzeugung eines thrombophilen Zustandes (Thrombosebereitschaft ohne manifeste Thrombose) besteht die Gefahr der Ausbildung eines Gefäßverschlusses bei vorliegender Gefäßwandschädigung (Mak, 1988).

2.) Nach einer Studie von Lu und Lee (1992) hemmen FHS die Aktivität von Plasmin in Humanplasma und beeinflussen damit das Fibrinolyse-System. Mit steigenden MG nimmt die inhibierende Wirkung zu.

3.) FHS hemmen im plasmafreien System konzentrationsabhängig die Aktivität von APC und hemmen die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC (Yang et al., 1994).

In verschiedenen Arbeiten wurde der Einfluss von Arsen auf die Entstehung der BD untersucht. Während organische Arsenverbindungen wie Monomethylarsenat (MMA) und Dimethylarsenat (DMA) in kaum nachweisbarer Konzentration im Quellwasser enthalten sind, könnte das erhöhte Vorkommen von As(III) eine Rolle bei der Entstehung der BD spielen (Chen et al., 1995).

In der Bestimmung der PT und APTT hatte der Zusatz von As_2O_3 zur Synthese der HSÄP eine 1,5-2,3fache Wirkungssteigerung gegenüber den HSÄP zur Folge, während As_2O_3 allein keinen Einfluss auf die Gerinnungszeiten hatte.

As_2O_3 steigerte dosisabhängig die Aktivität von PC und die Aktivierung von PC. In Gegenwart von HS ist dieser Effekt aufgehoben und es kommt zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der APC-Aktivität (Yang et al., 1994).

Unter dem Einfluss von As_2O_3 auf HUVEC konnte auch nach längerer Einwirkzeit (5h) kein cytotoxischer Effekt nachgewiesen werden. Im Bereich von 0,1-1000ng/mL hemmt As_2O_3 die Proliferation von HUVEC. Konzentrationen $>100\text{ng/mL}$ führten zu einer geringeren Glykoprotein Synthese (Chen et al., 1990).

1988 konnte Mak eine, als Folge der verlangsamt ablaufenden Prostaglandin I_2 (PGI_2)-Synthese im Endothel bei gleichbleibendem Thromboxan A_2 -Spiegel (TXA_2), erhöhte Plättchenaggregation und Vasokonstriktion nachweisen. Dieser Effekt war nur unter Zusatz von Ergotaminalkaloiden zu HUVEC zu beobachten. As_2O_3 hatte keinen Einfluss auf die PGI_2 -Synthese.

5.2.3. Einfluss der NHS auf das Blutgerinnungssystem

5.2.3.1. Antikoagulierende Wirkung

Global-und Gruppentests

Mit der Thromelastographie wiesen Klöcking et al. schon 1986 eine gerinnungszeitverlängernde Wirkung natürlich vorkommender HS in-vitro nach. Die Thrombelastographie erlaubt als sog. Suchtest eine globale Aussage über den Einfluss von Testsubstanzen auf das intrinsische Gerinnungssystem (Faktor I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII), den Faktor XIII sowie die Thrombozytenzahl und- funktion (Hartert, 1948, 1952). Die Untersuchung der PT und aPTT lieferte Hinweise darauf, dass wegen der stärkeren Wirkung auf die PT als auf die aPTT der Eingriff der NHS eher im extrinsischen als im intrinsischen System stattfinden muss (Klöcking et al., 1986; Klöcking, 1994b). Als Hauptwirkung wird eine Hemmung von FIIa angenommen (Klöcking, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Moorwasser- und einer aus Braunkohle gewonnenen HS auf die Blutgerinnung in-vitro untersucht.

Dazu wurde zunächst eine Bestimmung der TZ *in Humanplasma* und *im isolierten System* durchgeführt. Beide Substanzen verlängerten konzentrationsabhängig die TZ in beiden Testsystemen. Die Aldrich HS besitzt gegenüber NaHS stärker antikoagulierende Eigenschaften. Im isolierten System wurde mit einer 65% geringeren Konzentration als NaHS eine Verdopplung der TZ bewirkt. Jedoch sind beide Substanzen im isolierten System verglichen am Parameter <Konzentration zur Verdopplung der TZ> schwächer antikoagulatorisch wirksam als in Humanplasma. Besonders deutlich wird dieser Unterschied am Beispiel der NaHS, bei welcher erst eine ca. 2,5fach höhere

(Aldrich HS ca. 1,5fach) Konzentration zur gleichen Wirkung führte. Vergleicht man diese Werte mit denen anderer polyanionischer Verbindungen wie Heparin, für welche eine ca. 2000fach höhere Konzentration erforderlich ist, scheint die Schlussfolgerung zulässig, dass die TZ-verlängernde Wirkung der NHS in Humanplasma nicht Cofaktorvermittelt ist.

Weiterhin kann abgeleitet werden, dass die antikoagulierende Wirkung nicht durch eine Wechselwirkung der NHS mit FI verursacht wird, denn auch hier liegen, ähnlich den HYAs, die im isolierten System bestimmten IC_{50} -Werte im Bereich der Konzentrationen zur Verdopplung der TZ im plasmafreien System.

Die Ergebnisse aus der TZ-Messung sprechen dafür, dass der TZ-verlängernden Wirkung der NHS eine direkte Wechselwirkung mit FIIa zu Grunde liegen muss. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für die HYAs gefunden. Ein Vergleich der beiden polyanionischen Substanzklassen zeigt, dass zum einen HYAs als sulfatierte Polysaccharide den NHS in der Stärke der antikoagulierenden Wirkung überlegen sind und zum anderen aufgrund der stärkeren Wirkung der HYAs in der aPTT als in der PT ein Eingriff in das intrinsische System stattfinden muss (Klöcking et al., 1998).

Antagonisierung der antikoagulierenden Wirkung durch Protaminsulfat

Die Untersuchungen zur Interaktion der polyanionischen NHS mit Protaminsulfat haben ergeben, dass die verlängerten TZ von NHS durch Protaminsulfat verkürzt werden können. Die natürlich vorkommenden HS wurden im Verhältnis 1:0,3 (NaHS : PS) und 1:0,4 (Aldrich HS : PS) neutralisiert.

Einzelfaktorbestimmung

Der Einfluss der NHS auf FIIa und FXa als zentrale Faktoren der Blutgerinnung wurde mit einer chromogenen Substratmethode in An- und Abwesenheit von ATIII im plasmafreien System bestimmt.

Abweichend zu den Ergebnissen aus der TZ-Bestimmung konnte nur für NaHS eine direkte FIIa-hemmende Wirkung beobachtet werden, welche mit Erhöhung der Konzentration zunahm. Die bis 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ messbare Anti-Thrombin Wirkung der Aldrich HS wurde nach Konzentrationserhöhung wieder geringer. Im Unterschied dazu besitzen beide NHS, gemessen an den IC_{50} -Werten und unter Beachtung der Schwankungsbreite dieser, eine annähernd gleich starke FXa-inhibierende Wirkung.

Die nachgewiesene Anti-IIa und Anti-Xa Wirkung der NHS wird im Gegensatz zu den HYAs wie in der TZ-Bestimmung bereits vermutet, nicht durch ATIII vermittelt oder verstärkt. Die scheinbare Wirkungsverstärkung der FXa-Hemmung ist ein aus Anti-Xa- der NHS und ATIII-Wirkung zusammengesetzter, additiver Effekt. Die Bindungsstelle der NHS an der Protease kann damit nicht mit der ATIII-Bindungsstelle identisch sein.

Auf molekularer Ebene sind 2 Wechselwirkungsmechanismen denkbar. Aufgrund der sehr heterogenen Zusammensetzung der NHS bei relativ ähnlicher Wirkstärke in der TZ und der FXa-Einzelbestimmung kann zum einen eine unspezifische Wechselwirkung zwischen den vorwiegend negativ geladenen Oberflächengruppen der NHS und den positiven funktionellen Gruppen der Serinproteasen FIIa/FXa angenommen werden. Zusätzlich könnte auch eine Wechselwirkung mit der „anion binding exosite“ im Thrombinmolekül in Frage kommen. Eine derartige Wechselwirkung wäre wie unter Punkt 5.1.3.1. beschrieben v.a. für die Wechselwirkung der Aldrich HS aber auch für die der NaHS eine Erklärung der danach nur als „scheinbar“ schwächer anzusehenden Anti-Thrombin Wirkung der NHS im isolierten System im Vergleich zur TZ (Hortin et al., 1991; Gan et al., 1993). Doch auch diese Wechselwirkung wäre verglichen mit den HYAs eher eine unspezifische Wechselwirkung mit dem v.a. aus basischen AS aufgebauten Bereich des Thrombinmoleküls.

Im Falle einer Hemmung konnten nach Ziechmann (1996) bisher allgemein drei Einwirkungsmöglichkeiten von NHS auf Enzyme nachgewiesen werden. So kann es neben einer kompetitiven Hemmung zu einer irreversiblen Blockade des Enzyms durch nicht-kompetitive Hemmung kommen. Weiterhin können NHS beide Eigenschaften besitzen. Neben den vorwiegend sauren funktionellen Gruppen als wirkende Größen, kann auch ein Einfluss der mittleren Teilchenmasse vorliegen, welcher jedoch auch auf die Teilchenzahl zurückgehen kann. Anlass zu Wechselwirkungen können auch ϵ -Donator und ϵ -Akzeptor-Zentren im Huminstoffpartikel sein. Denkbar sind elektrostatische und Dipol-Beziehungen, die zu Raumorientierungen der Systeme führen können.

Eine Aussage zur Abhängigkeit der Anti-Proteasewirkung der Prüfsubstanzen vom MG kann nur bedingt getroffen werden, da auf Grund des molekularen Aufbaus dieser Substanzen, ihrer Genese und den daraus resultierenden physikalisch-chemischen Eigenschaften von einem sich in wässrigen Medium und mit steigender Konzentration veränderlichen System ausgegangen werden muss, welches v.a. in höheren Konzentrationen zur Polymerisation neigt (Lu et al., 1990a). Allgemein wurde eine Zunahme der inhibierenden Eigenschaften mit Erhöhung der Konzentration NHS beobachtet.

Plasmatische Gerinnungszeit nach Aktivierung der Gerinnung über den extrinsischen Gerinnungsweg

Für beide NHS konnte in-vitro eine Beeinflussung der extrinsisch aktivierten Gerinnung nachgewiesen werden. Dabei wurde im niedrigen Konzentrationsbereich (1,6-25 $\mu\text{g/mL}$) eine Verkürzung und im höheren (25-100 $\mu\text{g/mL}$) eine Verlängerung der GZ beobachtet. Beide Wirkungen waren bei der Aldrich HS stärker ausgeprägt. Die genaue Ursache der prokoagulatorischen Wirkung im niedrigen Konzentrationsbereich ist nicht geklärt, wurde jedoch von anderen Forschungsgruppen bei Untersuchungen zum Einfluss der FHS auf die PT und aPTT ebenfalls beobachtet. Man vermutet die Ursache in den physikalisch-chemischen Eigenschaften der HS und geht von einer in höheren Konzentrationen stattfindenden Polymerisation aus, die eine Umkehr der prokoagulierenden in eine antikoagulierende Wirkung zur Folge hat (Lu et al., 1990a, 1990b). Da weder NHS noch FHS selbst enzymatische Eigenschaften besitzen, könnte eine Erklärung der prokoagulierenden Wirkung eine Affinitätserhöhung zwischen den Proteasen und dem jeweiligen natürlichen Substrat sein, welche durch eine target-Funktion der NHS (FHS) vermittelt wird. Die in höheren Konzentrationen beobachtete antikoagulierende Wirkung kann nach Gerotziapas et al. (1996) und Morrissey et al. (1993) auf eine Hemmung des FVIIa zurückgeführt werden. Verglichen mit HYA DS 48 ist diese Wirkung bezogen auf die bestimmten IC_{50} -Werte um das ca. 25fache (Aldrich HS) bzw. das 40fache (NaHS) geringer.

Die FVIIa-inhibierende Wirkung kann auf Grund der Zusammensetzung des Untersuchungsmediums <Humanplasma> Cofaktor-vermittelt sein. Jedoch dürften die durch Villanueva (1984) und Magnani et al. (1996) nachgewiesenen, erforderlichen strukturellen Voraussetzungen für eine derartige Wechselwirkung nicht erfüllt sein.

Der aus der Bestimmung der PT und aPTT vermutete Eingriff der NHS in das extrinsische Gerinnungssystem konnte durch den Nachweis der Hemmung der Faktoren IIa, Xa und VIIa bestätigt werden. Der antikoagulierenden Wirkung der NHS liegt sowohl eine FIIa-Bildungshemmung als auch im Fall der Moorwasser HS eine direkte Hemmung von FIIa zugrunde. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, eine Gerinnungsaktivierung durch den Gewebefaktor im extrinsischen Gerinnungssystem abzufangen und eine Aktivierung im intrinsischen Gerinnungssystem (über FIX/FIXa durch den Komplex von FVIIa/Gewebefaktor) zu verhindern.

Einfluss auf das PC-Antikoagulationssystem

Der Einfluss der NHS auf die APC-Aktivität im isolierten System ist ähnlich den HYAs gering. Die durch 25 µg/mL Aldrich HS verursachte Hemmung der APC-Aktivität um 40% war auch durch Konzentrationserhöhung bis 800 µg/mL nicht steigerbar. Im Vergleich dazu erwies sich NaHS als noch schwächer wirksam. 25 µg/mL minderten die APC-Aktivität um 23%. Demgegenüber wurde die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC deutlich stärker gehemmt. Hier führten schon Konzentrationen von 20,0 µg/mL (Aldrich HS) bzw. 60,0 µg/mL zu Aktivitätsminderungen, welche mit 50% außerhalb des Normbereiches der APC-Aktivität (70-120% Aktivität) liegen können.

Trotz der ungünstigen Auswertbarkeit der Versuche in Plasma wurde eine gute Korrelation der Messwerte mit denen des isolierten Systems gefunden. Im Mehrkomponentensystem Humanplasma ist der Einfluss der NHS auf die APC-Aktivität ebenfalls sehr gering. Ähnlich wie bei den HYAs sind auch hier die Voraussetzungen für eine Wechselwirkung zwischen den v.a. negativ geladenen funktionellen Gruppen der NHS mit den AS des APC-Moleküls im Sinne einer elektrostatischen- oder Dipolwechselwirkung ungünstig. Im Gegensatz dazu wird der Vorgang der Protac[®]-vermittelten Aktivierung von PC stärker inhibiert. Beide Substanzen minderten die Aktivierung bei einer Konzentration von 25 µg/mL um ca. 40%.

NHS besitzen nur einen geringen direkten Einfluss auf das PC-Antikoagulationssystem. Indirekt könnten sie aber durch eine Hemmung der APC-Generation thrombogene Prozesse nachteilig unterstützen. Auf die Problematik der Versuchsdurchführung und Auswertung sowie auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf In-vivo-Verhältnisse wurde bei den sulfatierten Hyaluronsäuren näher eingegangen.

5.2.3.2. Einfluss auf das Fibrinolysesystem

Die Fibrinolyse ist der Hauptabwehrmechanismus gegen Ablagerungen von Fibrin an den Gefäßwänden. Eine Unterfunktion dieses Systems kann ursächlich für thromboembolische Erkrankungen sein (Collen, 1987; Bachmann, 1987; Klöcking et al., 1992).

Beide NHS zeigten im „Lysetest“ keine antifibrinolytische Aktivität. Eine nachteilige Beeinflussung der Fibringerinnselauflösung durch die NHS kann damit ebenso wie für die HYAs ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurde von Klöcking (1991a) eine profibrinolytische Wirkung der NaHS I-IV/80 gefunden. Sowohl am isoliert durchströmten Schweineohr (Klöcking et al., 1984) als auch nach i.v. Gabe von 10 mg/kg KG bei Ratten (Klöcking, 1990, 1991a, 1991c, 1991d) konnte eine deutliche Freisetzung von tPA aus Gefäßendothelzellen gemessen werden (Klöcking et al., 1994a). Die Freisetzung von tPA als Folge einer direkten Wechselwirkung mit dem Gefäßendothel führt in-vivo zu einer Aktivierung der Fibrinolyse. Die gemessene profibrinolytische Wirkung ist dabei geringer als die von Heparin oder den HYAs (Markwardt et al., 1977).

5.2.3.3. NHS als mögliche Ursache der Blackfoot disease?

Als Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen konnte eine vorwiegend antikoagulierende Wirkung der Moorwasser- und Braunkohle-HS (Hemmung der Faktoren VIIa, Xa und IIa), festgestellt werden. Mit diesen In-vitro-Untersuchungen kann z.T. der Mechanismus der in-vivo nach i.v. Applikation bei Kaninchen thrombelastographisch festgestellten, gerinnungszeitverlängernden Wirkung (Klöcking et al., 1994a, 1994b) von NHS erklärt werden. Durch ihre FIIa hemmende Aktivität verfügen Stoffe von HS-Typ über die Potenz, die Thrombenbildung bzw. das Wachsen von Thromben zu verhindern sowie die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten zu verhindern (Klöcking et al., 1997). In den Bestimmungen der TZ, PT und aPTT konnte über den gesamten Konzentrationsbereich keine prokoagulatorische Aktivität festgestellt werden (Klöcking et al., 1986; Klöcking, 1994a, 1994b). Zusätzlich könnten beide NHS, bei fehlender antifibrinolytischer Aktivität im „Lysetest“, durch eine gesteigerte tPA-Freisetzung (70% Steigerung mit 50 µg/mL NaHS) in der Lage sein, den thrombotischen Abwehrmechanismus zu stimulieren. Die genannten Ergebnisse, die z.T. in-vivo bestätigt werden konnten, sprechen zusammen mit einer nachgewiesenen antiphlogistischen Wirkung (Klöcking et al., 1968; Kühnert et al., 1982) nicht dafür, dass durch Natrium-Humat eine Blackfoot-Disease ausgelöst werden kann. Jedoch wäre hierfür ein Tierexperiment mit wiederholter täglicher Aufnahme von Natrium-Humat notwendig, wie es Lu (1990b) mit FHS an Mäusen durchgeführt hat.

In aktuellen Untersuchungen zu den Ursachen der BD wird eine nachteilige Beeinflussung des PC-Antikoagulationssystems durch FHS diskutiert (Yang et al., 1994). Verminderte APC-Spiegel sind eine häufige Ursache von Venenentzündungen (Mitchell et

al., 1987; Griffin et al., 1981) und wiederkehrenden Venenthrombosen, von welchen häufig v.a. die untere Extremität betroffen ist (Nizzi et al., 1999). Der direkte Einfluss der untersuchten NHS auf APC reduziert dessen Aktivität mit einer maximalen Inhibition von ca. 35% (NaHS) und ca. 40 % (Aldrich HS) auf Werte die an der Grenze des Normbereiches (70-120% Aktivität) für die APC-Aktivität liegen. Yang et al. fand für FHS eine Aktivitätsminderung von ca. 20% mit 25 µg/mL und ca. 50% mit 200 µg/mL. Ein stärker inhibierender Einfluss wurde sowohl für NHS als auch für FHS auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC gefunden. Lassen sich diese Ergebnisse in In-vivo-Versuchen bestätigen, könnten sie möglicherweise mit zum Entstehen und Verlauf der BD beitragen. Auch der Einfluss von an NHS gebundenen Metallionen wie As³⁺ bedarf weiterer Untersuchungen, da es sich bei den im Trinkwasser der BD Epidemiegebiete vorkommenden FHS scheinbar um Komplexe aus NHS mit Metallen handelt, welche in Bestimmungen der PT und aPTT zu einer stärker prokoagulierenden Wirkung führen und die APC-Aktivität im isolierten System effektiver inhibieren. Diese Untersuchungen sind um so wichtiger, da für die NHS außer in der Bestimmung des Einflusses auf die FVIIa-Aktivität im Konzentrationsbereich von 1,6-25 µg/mL keine prokoagulatorische Wirkung in der PT und aPTT (Klöcking et al., 1986; Klöcking, 1994a, 1994b) sowie keine verminderte tPA-Freisetzung (Klöcking, 1991 a-d; Klöcking et al., 1984) und erhöhte Thrombozytenaktivierung und -aggregation (Klöcking et al., 1997) wie bei Untersuchungen zur Wirkung von FHS (Wu et al., 1993; Lu, 1990b-c; Shen et al., 1983) gefunden wurde. Weiterhin stellt sich auch die Frage nach der Resorption dieser hochpolymeren Verbindung nach oraler Aufnahme. Lu et al. wies 1994 an Ratten nach, dass nach Fütterung mit ¹²⁵I-HS-Lösung aus synthetischer HS eine Resorption und anschließende Verteilung in verschiedene Organe und Gewebe stattfindet (genaue Ergebnisse unveröffentlicht). Allerdings geht aus Studien anderer Forschungsgruppen hervor, dass nach oraler Applikation von NHS 1. deren Resorption mit 0,2-2% (Rochus, 1977) sehr gering ist und 2. eine schleimhautabdeckende und adstringierende Wirkung, bedingt durch die makrokolloidale Struktur, die zu einer filmartigen Abdeckung der Oberfläche der Magen-Darm-Schleimhaut, peripheren Kapillaren und geschädigter Mukosazellen führt, hervorgerufen wird (Siedeck et al., 1960; Kovarik, 1988). Auch Eichhorn et al. (1982) konnte in-vivo nach Fütterung einer Maus mit ¹⁴C-markierter HS keine orale Resorption nachweisen. Auch die geringe östrogene Aktivität nach oraler im Vergleich zur s.c.-Applikation von NaHS I-IV/80 führt Fernekorn 1989 auf eine geringere Resorption zurück.

Die akute Toxizität von HS gegenüber Warmblütern bei oraler Applikation ist praktisch nicht zu ermitteln ($LD_{50} > 11500$ mg/kg KM, Kühnert et al., 1982). Sie werden somit im Sinne der Gefahrstoffverordnung als nicht giftig eingestuft (Hörath, 1995). Auch in Verbindung mit Schwermetallen, lassen die bis heute vorliegenden Erkenntnisse den Schluss zu, dass NHS die Wirkung von Schwermetallen nach oraler Applikation entgiftend beeinflussen können. Die Werte für die LD_{50} per os applizierter Metallhumate (Blei (II)-humat > 2400 mg/kg) bei Mäusen weisen auf eine deutliche Erniedrigung der Toxizität im Vergleich zum Standard (Blei (II)-acetat 1462 mg/kg) hin (Klöcking 1967, 1980; Klöcking et al., 1974).

5.3. Huminsäure-ähnliche Polymere: KOP 409/85, Melanoidine und Refraktäre organische Säuren als Modellsbstanzzen für NHS

5.3.1. Notwendigkeit der Suche nach Modellsbstanzzen für NHS

Seit fast zwei Jahrzehnten gehören Huminsäuren zu den Themen, die international zunehmendes Interesse gewinnen. Die medizinischen Wissenschaftsdisziplinen befassten und befassen sich mit HS, vornehmlich in Bereichen der Balneologie, die HS in Moor- und Brunnenwässern, Torfen und Erden als erwiesenen Heilfaktor ansieht (Klöcking et al., 1991; Klöcking, 1994) sowie der Virologie, die virostatische Eigenschaften von HS nachweisen konnte (Klöcking et al., 1989).

In jüngster Zeit werden HS zunehmend auch zum Objekt der ökochemischen Forschung (Schnitzer et al., 1972; Aiken et al., 1985; Hayes et al., 1989). Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens und ihrer chemischen Reaktivität misst man HS eine bedeutende Rolle im globalen Wechselwirkungsgeschehen der Stoffe bei. Technologisch bedeutsam sind HS im Bereich der Trinkwasserversorgung und Abwasserbehandlung wegen der Vehikelfunktion für Schadstoffe und als Präkursoren für toxikologisch relevante Substanzen. Die Wechselwirkung mit Schwermetallen und Xenobiotika, wie z.B. Pestiziden, sind für Transportvorgänge in Gewässern und aus umweltschutztechnischen Aspekten besonders wichtig (Frimmel et al., 1988; Perdue et al., 1990). V.a. auf die Ausbreitung von Schwermetallen in der Biosphäre können HS einen entscheidenden Einfluss ausüben. So ist die Untersuchung der Wechselwirkung von HS mit Actinidionen zum einen (Abb. 85) und Radium, Uran und deren Folgeprodukten zum anderen unbedingt erforderlich, z.B. für die Erstellung von Langzeitsicherheitsabschätzungen potentieller Endlager für nuklearen Abfall sowie für unter- und oberirdische Einrich-

tungen des früheren Uranerzbergbaus in Sachsen und Thüringen (Pompe et al., 1999; Mansel et al., 1999).

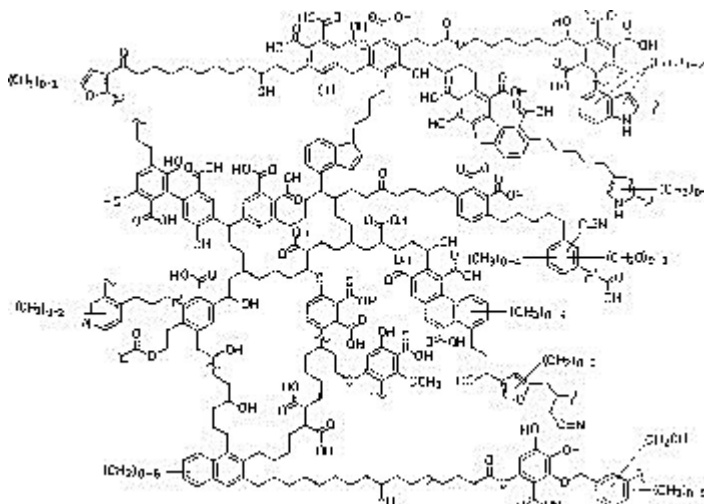


Abb. 85: Strukturvorschlag für einen Huminstoff nach Mansel et al. (1999)

Sowohl für den Einsatz von Huminstoffen als auch Isolaten von HS im medizinischen und ökochemischen Bereich sind breite und genaue Kenntnisse der chemisch-biologischen Eigenschaften notwendig. Von zunehmender Bedeutung ist dabei die Bestimmung derjenigen Stoffe, von denen nach neueren Erkenntnissen die entscheidenden biochemischen Wirkungen ausgehen. Doch bei Untersuchungen an natürlich vorkommenden HS trifft man auf eine Vielzahl von Schwierigkeiten, die v.a. auf die Tatsache zurückführbar sind, dass HS im natürlichen Stoffwandlungsprozess keineswegs stabile Endzustände darstellen. Schon geringe Milieuänderungen sind imstande, durch die Lösung von Ester- oder Wasserstoffbrückenbindungen strukturelevante, innermolekulare Veränderungen einzuleiten. Das einem Wollknäuel gleichende Makromolekül kann sich dadurch soweit entfalten, dass vorher sterisch gehinderte oder gebundene funktionelle Gruppen freigesetzt werden können oder die Fragmentierung des HS-Moleküls eingeleitet werden kann (Engel, 1998; Frimmel et al., 1990). Aus diesem Sachverhalt lässt sich ableiten, dass Isolate von HS aus natürlichen Vorkommen niemals identisch mit den natürlichen HS „vor Ort“ sind.

Desweiteren bereitet die komplexe Entstehung der HS in der Natur, sowie deren bisher ungeklärte chemische Zusammensetzung aus einer Vielzahl von Bausteinen bei Untersuchungen der Struktur- und Struktur-Wirkungsbeziehungen Schwierigkeiten. Unterschiedliche Eigenschaften der aus verschiedenen Vorkommen gewonnenen HS sind nach Ansicht von Kumada et al. (1961) aus der Zusammensetzung ihrer Binnenstruktu-

ren erklärbar. Hatcher (1981) konnte zeigen, dass aromatische und aliphatische Strukturen auf die Herkunft der HS aus Böden oder Gewässern schließen lassen.

Es ist daher erforderlich, geeignete HS-Modellsubstanzen zu untersuchen, um Gesetzmäßigkeiten ihrer Struktur und Wirkung aufzudecken. Mit der Forderung nach „geeigneten synthetischen Modellsubstanzen“ wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von Verbindungen bereitgestellt. Durch an mögliche natürliche HS-Bildungsbedingungen angelehnte Synthesen, variabel einstellbare Stickstoff- und Schwefelgehalte bei „unveränderlicher Matrix“ versucht man dieser Forderung gerecht zu werden. Modellsubstanzen können jedoch nicht das gesamte Struktur-Wirkungsspektrum dieser Naturstoffklasse wiedergeben, sind aber für die Lösung einzelner Fragestellungen von Bedeutung (Fernekorn, 1989).

Vertreter von drei nach unterschiedlichen aber an natürliche Bildungsbedingungen von NHS angelehnten Synthesewegen (Punkt 5.1.1.) gewonnenen HSÄP wurden auf ihren Einfluss auf Gerinnungsabläufe und Einzelfaktoren der Gerinnung untersucht. Ihre Wirkung wurde mit der von zwei natürlich vorkommenden HS aus Moorwasser und Braunkohle (NaHS I-IV/85; Aldrich HS) verglichen.

Das Melanoidin M42 dient dabei als Modell-HS mit *nichtaromatischen Verbindungen* als Ausgangsstoff der Synthese. Für das Melanoidin M1 wurden *nichtaromatische und aromatische Ausgangsstoffe* verwendet, wie Xylose, Glycin und Phenylalanin als typische in der Natur vorkommende Zerfallsprodukte von Holz bzw. Eiweißen. Durch Verwendung der sauren AS Glutaminsäure sollte der Anteil an Carboxylgruppen im Endprodukt erhöht und die Auswirkung untersucht werden.

KOP und die ROS-Substanzen stehen als Beispiele für HSÄP mit *aromatischen Verbindungen* als Syntheseausgangsstoff. Die Herstellungswege der beiden Substanzgruppen unterscheiden sich durch die Wahl des Oxidationsmittels und der Reaktions-temperatur. Während das für seine starke antivirale Aktivität bekannte (Klöcking et al., 1983; Hils et al., 1986; Eichhorn et al., 1984) Kaffeesäureoxidationsprodukt (KOP) aus einem o-Diphenol synthetisiert wurde, bildeten die Ausgangsstoffe der ROS-Synthese neben Hydrochinon als p-Diphenol die AS Glycin, Lysin als basische und Glutaminsäure als saure AS.

5.3.2. Einfluss auf das Blutgerinnungssystem - Vergleich mit natürlich vorkommenden Huminsäuren

5.3.2.1. Antikoagulierende Wirkung

Gruppentest

Der Einfluss der HSÄP auf die Blutgerinnung in-vitro wurde mit Hilfe des Gruppentests <Thrombinzeit> in Humanplasma überprüft. Für alle untersuchten HSÄP wurde ebenso wie für die NHS eine TZ-verlängernde Wirkung in Abhängigkeit von der Konzentration gefunden. Die antikoagulierende Aktivität nimmt mit steigender Konzentration in ihrer Stärke zu.

Auch im plasmafreien System wurden die GZ durch die Prüfsubstanzen verlängert. Zur Verdopplung der GZ waren wie bei NHS 1,3-2,5-fach (HS 136 und Melanoidin Typ M1) höhere Konzentrationen HSÄP als in Humanplasma notwendig.

Ein Vergleich der Konzentrationen zur Verdopplung der GZ in Humanplasma und im plasmafreien System ergibt eine der Braunkohle HS <Aldrich HS> ähnliche Wirkungsstärke für KOP, Melanoidin M42 und HS5. Die Wirkungsstärke des Melanoidins Typ M1 liegt im Bereich der Moorwasser HS <NaHS>.

Tabelle 11: Gegenüberstellung der Konzentrationen, die eine Verdopplung der Thrombin- und Fibrinogengerinnungszeiten bewirkten, der IC₅₀-Werte (bestimmt im isolierten System) und der Syntheseausgangsstoffe

Prüfsubstanz	Thrombinzeit (µg/mL)	Fibrinogengerinnungszeit (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	Syntheseausgangsstoffe
Aldrich HS	19,5	28,9	19,9 (17,5-22,7)	aus Braunkohle isoliert
KOP 409/85	10,7	22,5	15,0 (13,3-16,8)	Kaffeensäure
HS5	19,9	27,2	26,2 (25,2-27,3)	Glycin/ Hydrochinon

NaHS I-IV/80	35,0	85,7	76,3 (71,7-81,3)	aus Moorwasser isoliert
Melanoidin Typ M1	44,0	106,4	101,6 (92,0-112,2)	Glycin/Xylose
Melanoidin Typ M42	6,9	7,0	5,2 (3,3-8)	Glutaminsäure/ Xylose
HS 136	103,7	135,6	133,4 (132,7-134,3)	Lysin/ Hydrochinon
HS 130	76,9	24,9	23,2 (22,8-23,8)	Glutaminsäure/ Hydrochinon

Eine deutlich schwächere antikoagulierende Aktivität als die NHS zeigte, die mit der basischen AS <Lysin> hergestellte HS 136. Ein von den NHS in den Gerinnungstests abweichendes Wirkungsprofil besitzt die mit der sauren AS <Glutaminsäure> hergestellte Verbindung HS 130. Während für die anderen HSÄP zum Erreichen der gleichen antikoagulierenden Wirkung in der Fibrinogen-GZ höhere Konzentrationen als in der TZ erforderlich waren, genügte für HS 130 ein um 67,6% geringerer Substanzeinsatz (Tab. 11). Eine Komplexbildung mit Plasmabestandteilen wie Eiweiß, aus welcher ein teilweiser Wirkungsverlust resultieren könnte, wäre eine mögliche Ursache für den höheren Anteil an HS 130 in Plasma.

Für alle HSÄP wurde eine gute Übereinstimmung der IC_{50} -Werte mit den Konzentrationen zur Verdopplung der Fibrinogen-GZ gefunden. Auch hier kann eine Wechselwirkung zwischen den HSÄP und FI als Ursache der Hypokoagulation ausgeschlossen werden (Tab. 11).

Mit Hilfe von Untersuchungen im plasmafreien System können Rückschlüsse zur Abhängigkeit der gerinnungshemmenden Wirkung von Cofaktoren wie ATIII gezogen werden. Schließt man Heparin in die Betrachtungen mit ein, kann für die HSÄP ebenso wie für die NHS eine solche Abhängigkeit trotz der schwächeren antikoagulierenden Wirkung im plasmafreien System ausgeschlossen werden. Zur Verdopplung der GZ

wird im plasmafreien System bei Heparin eine ca. 2000-fach höhere Konzentration benötigt als in Humanplasma.

Die Ergebnisse der durchgeführten Gerinnungsuntersuchungen sprechen dafür, dass wie bei den NHS eine direkte, Cofaktor-unabhängige Wechselwirkung mit Thrombin ursächlich für die GZ-verlängernde Wirkung der HSÄP ist.

Antagonisierung der antikoagulierenden Wirkung mit Protaminsulfat

Durch Zusatz von Protaminsulfat konnte die antikoagulierende Aktivität aller untersuchter HSÄP aufgehoben werden. Das Verhältnis Prüfsubstanz/Protaminsulfat liefert dabei Anhaltspunkte zur Abhängigkeit der antikoagulierenden Wirkung von vorhandenen sauren Oberflächengruppen der HSÄP, welche durch Wechselwirkung mit basischen funktionellen Gruppen der Serinprotease Thrombin eine Gerinnungshemmung bewirken. Während das Melanoidin M42, KOP und HS5 als die Verbindungen mit der stärksten gerinnungshemmenden Wirkung im Verhältnis 1:0,7, 1:0,8 und 1:1,3 neutralisiert werden, genügen zur Aufhebung der antikoagulierenden Wirkung von 1 Teil der aus der basischen AS hergestellten HS 136 schon 0,2 Teile PS.

Einzelfaktorbestimmung

Die aus den Untersuchungen der TZ vermutete Anti-Thrombin Wirkung der HSÄP konnte nur für KOP und HS 130 bestätigt werden. Ähnlich den beiden untersuchten NHS lassen sich die HSÄP entsprechend der erhaltenen Konzentrations-Wirkungskurven in 2 Gruppen teilen. *Gruppe 1* (NaHS, KOP, HS 130) zeigt eine deutliche Zunahme der FIIa-hemmenden Wirkung mit der Konzentration. Im Unterschied zu NaHS verfügen sie mit einem um ca. 5-fach kleineren IC_{50} -Wert über eine stärkere FIIa-inhibierende Potenz. *Gruppe 2* (Melanoidin Typ M1 und M42, HS 136) entspricht im Wirkungsprofil der Aldrich HS. Die bis 25 $\mu\text{g/mL}$ stattfindende Hemmung der FIIa-Aktivität wird im weiteren Konzentrationsverlauf wieder geringer. Der aufgrund einer denkbaren Komplexbildung mit plasmabestandteilen stattfindende teilweise Wirkungsverlust der Verbindung HS 130 in der TZ kann durch die relativ starke Anti-IIa Wirkung der Verbindung im isolierten System und der kompletten Aufhebung derselben nach Zusatz von ATIII bestätigt werden.

Übereinstimmung besteht bei allen Verbindungen auch in der fehlenden Abhängigkeit der Anti-IIa Wirkung vom Cofaktor ATIII. Während der Zusatz von ATIII zum Reakti-

onsansatz in der *Gruppe 2* gar keinen Einfluss hat, wird die Anti-IIa Wirkung der Verbindungen in *Gruppe 1* etwas geringer. Die Vermutung einer ATIII-unabhängigen Wechselwirkung mit FIIa aus den Ergebnissen der TZ/Fibrinogen-GZ konnte bestätigt werden.

Mit Ausnahme des Melanoidins Typ M1 verfügen alle HSÄP über eine im Bereich der NHS liegenden FXa-hemmenden Potenz, welche nicht ATIII-vermittelt ist. Die durch Betrachtung der IC₅₀-Werte vermutete Wirkungsverstärkung durch Zusatz von ATIII entspricht nur einer sich aus Anti-Xa Wirkung der HSÄP und ATIII zusammengesetzten Wirkung. Für KOP und HS 130 wurde eine im Vergleich zur relativ starken Anti-IIa Wirkung um ca. 80% geringere Anti-Xa Wirkung nachgewiesen. Im Fall der aus der basischen AS Lysin synthetisierten Substanz HS 136 bewirkte die Zugabe von ATIII eine deutliche Wirkungsabnahme.

Plasmatische Gerinnungszeit nach Aktivierung der Gerinnung über den extrinsischen Gerinnungsweg

Der Einfluss von HS 130, HS 136, Melanoidin Typ M1 und KOP auf die extrinsisch aktivierte Gerinnung wurde untersucht. Wie bereits bei den NHS führte der Zusatz von KOP und Melanoidin M1 im Konzentrationsbereich (0,4-25 µg/mL) zu einer Hyperkoagulabilität des Testplasmas. Auch im weiteren Konzentrationsbereich zeigte sich ein den NHS entsprechendes Wirkungsprofil. Es fand eine Verlängerung der GZ statt. Von allen untersuchten NHS und HSÄP übte KOP mit einem IC₅₀-Wert von 27,6 µg/mL den stärksten FVIIa-inhibierenden Effekt aus.

HS 130 und HS 136 verfügen dagegen über keine prokoagulierenden Eigenschaften. Mit steigenden Konzentrationen bewirkten sie eine Hypokoagulabilität des Plasmas, verursacht durch eine Hemmung von FVIIa.

Einfluss auf das PC-Antikoagulationssystem

Der Einfluss der HSÄP auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC wurde im plasmafreien System und in Humanplasma untersucht.

Ähnlich den NHS bewirkten alle HSÄP bereits bei Konzentrationen im Bereich von 6,25-25 µg/mL eine Hemmung der PC-Aktivierung im isolierten System, die zu APC-Aktivitäten unter 70% führten und damit außerhalb des physiologischen Normbereiches

von 70-120% Aktivität liegen. Für KOP, HS 130, HS 136 und das Melanoidin M42 korrelieren diese Ergebnisse gut mit denen in Humanplasma. Das Melanoidin M1 hatte im Plasma keinen Einfluss auf die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC.

In ihrer Wirkung auf isoliertes APC verhalten sich nur die beiden Melanoidine ähnlich den NHS. Erst ab einer Konzentration von 100 µg/mL Melanoidin M42 (800 µg/mL Melanoidin M1) findet eine Hemmung von APC über 30% (20%) statt. Mit KOP und den beiden ROS-Substanzen HS 130 und HS 136 wird diese Wirkung schon mit 3,1 bzw. 12,5 und 25,0 µg/mL erreicht. In Humanplasma besitzen dagegen alle HSÄP wie auch die NHS einen deutlich geringeren Einfluss auf APC. Erst mit Konzentrationen über 200 µg/mL (HS 130) bzw. 400 µg/mL KOP und NHS wurde die APC-Aktivität auf Werte unter 70% gesenkt. Trotz der ungünstigen Auswertbarkeit der Versuche in Humanplasma wird deutlich, dass HSÄP ebenso wie NHS einen eher geringen direkten Einfluss auf das PC-Antikoagulationssystem besitzen. Durch eine Hemmung der APC-Bildung können sie dennoch thrombogene Prozesse nachteilig beeinflussen. Die stärkste Hemmung der APC-Aktivierung in beiden Untersuchungssystemen besitzt KOP. Weder einen direkten noch einen indirekten Einfluss auf das PC-Antikoagulationssystem hat das Melanoidin M1.

5.3.2.2. Einfluss auf das Fibrinolysesystem

Ebenso wie für NHS konnte auch für die HSÄP mit Ausnahme des Melanoidins M1 (ab 200 µg/mL) im Lysetest keine antifibrinolytische Wirkung gefunden werden.

Klöcking et al. (1994) wies für NaHS I-IV/80 und KOP eine profibrinolytische Wirkung nach. Am isoliert durchströmten Schweineohr war KOP bei einer Konzentration von 50 µg/mL Perfusionslösung fähig, die Plasminogenaktivorkonzentration um 70% zu steigern. Von den NHS entsprach NaHS I-IV/80 etwa der Wirksamkeit von KOP. Die i.v. Applikation von 10mg/kg NaHSI-IV/80 und KOP führte bei Ratten zu einer statistisch signifikanten Steigerung der t-PA-Freisetzung (Klöcking et al., 1984; Klöcking, 1991 a-d). Aufgrund dieser Plasminogenaktivatorfreisetzenden Wirkung können Stoffe vom HS-Typ und NHS in der Lage sein, den antithrombotischen Abwehrmechanismus zu stimulieren, d.h. die Auflösung von Fibrin indirekt zu initiieren. Eine nachteilige Beeinflussung dieser Wirkung durch eine antifibrinolytische Wirkung der HSÄP und NHS kann durch o.g. Ergebnisse ausgeschlossen werden.

5.3. Eignung der HSÄP als Modellsubstanzen für natürlich vorkommende Huminsäuren

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Wirkung HSÄP auf die Blutgerinnung in-vitro wurde das Hauptaugenmerk hauptsächlich auf den Vergleich ihres Wirkprofils mit dem von NHS gelegt. So wurde bei den untersuchten Verbindungen zwischen dem Melanoidin M42 und der Braunkohle HS einerseits und KOP und der Moorwasser HS andererseits eine gute Korrelation in der Stärke der antikoagulierenden Wirkung und v.a. im Wirkprofil bzgl. der Aktivitätsminderung der Serinproteasen IIa, Xa, VIIa und dem Einfluss auf das APC-Antikoagulationssystem in Humanplasma gefunden.

Sowohl für KOP als auch für die Moorwasser HS wurde in früheren Untersuchungen eine stärkere Wirkung in der PT als in der aPTT gefunden. Die sich daraus ergebende Vermutung eines stärkeren Angriffs im exogenen System konnte durch eine starke FXa- und FVIIa-hemmende Wirkung bestätigt werden. Zusätzlich zur FIIa-Bildungshemmung hemmen beide Substanzen auch die Aktivität von bereits entstandenem Thrombin. KOP besitzt stärkere aktivitätsmindernde Eigenschaften auf FIIa, FXa und FVIIa. Ursächlich dafür könnte der durch Fernekorn (1989) bestimmte höhere Gehalt an sauren phenolischen Hydroxylgruppen, bei gleichem Gehalt an Carboxylgruppen und daraus resultierenden höheren Gesamtsäuregehalt von KOP gegenüber der Moorwasser HS sein.

Auch das Melanoidin M42 und die Braunkohle HS haben ihre Hauptangriffspunkte im exogenen System. Im Gegensatz zu KOP und der Moorwasser HS wird durch sie die Aktivität von bereits gebildeten Thrombin deutlich weniger beeinflusst. Das Melanoidin M42 und die Braunkohle HS verhalten sich ähnlich in der Stärke ihrer Anti-FXa- und GZ-verlängernden Wirkung.

Für die Verbindungen aus beiden Gruppen wurde keine Abhängigkeit der Anti-IIa und Anti-Xa Wirkung vom Cofaktor ATIII gefunden. Eine nachteilige Beeinflussung der Fibrinolyse durch antifibrinolytische Wirkung kann ausgeschlossen werden.

Für beide Gruppen HSÄP ebenso wie für HS 130 und HS 136 wurde bereits in früheren Untersuchungen der Nachweis von Übereinstimmungen in wichtigen chemischen und physikalischen Eigenschaften zwischen den beschriebenen HSÄP und NHS wie Löslichkeit in Wasser und wässrigem Alkali, Säure- und Schwermetallfällbarkeit, (Molegewicht), Farbe und Gehalt an stabilen freien Radikalen erbracht (Hänninen et al., 1987; Helbig et al., 1983; Pompe et al., 1996; Eller et al., 1920). Probleme bereitet z.T.

noch die Bestimmung der Molgewichte. Im Fall der Melanoidine macht man die fraktale (irreguläre) Struktur der HSÄP dafür verantwortlich, die zu schwankenden Ergebnissen in der Molekulargewichtsbestimmung führt. Für die beiden Melanoidine wurden so MG zwischen 1000 und 3000 Da bestimmt¹.

Die Eignung einzelner HSÄP als Modellsubstanz für eine bestimmte NHS leitet sich aus der Tatsache, der aus verschiedenen Bildungsbedingungen resultierenden unterschiedlichen Eigenschaften der NHS ab. Fernekorn (1989) bestimmte für eine aus Braunkohle isolierte HS relativ hohe Gehalte an aliphatischen und niedrige Gehalte an aromatischen Strukturen. Hatcher geht allerdings von einem eher aromatischen Grundgerüst bei „Boden HS“ aus. Würde man diese Ergebnisse auf die von mir untersuchten NHS übertragen, bestünde neben einer Übereinstimmung im Einfluss auf die Blutgerinnung auch teilweise strukturelle Übereinstimmung zwischen den Modellhuminsäuren und den von mir untersuchten NHS dahingehend, dass die der Braunkohle HS ähnliche Verbindung Melanoidin M42 aus aliphatischen Grundkörpern und die der aus dem Moorwasser eines Hochmoortorfes gewonnene HS-ähnliche Verbindung KOP aus aromatischen Grundkörpern synthetisiert wurden.

Die Verbindungen aus p-Diphenolen HS 130 und HS 136 eignen sich den Ergebnissen nach weniger als Modellsubstanzen zum Studium des Einflusses der Moorwasser- und Braunkohle HS auf die Blutgerinnung in-vitro. Sowohl in den Untersuchungen der GZ, als auch im Verhalten gegenüber FVIIa und in ihrer Wechselwirkung mit ATIII ergaben sich von den NHS abweichende Ergebnisse.

In Abbildung 86 sind die Angriffspunkte sulfatierter Hyaluronsäuren, natürlich vorkommender Huminsäuren und Huminsäure-ähnlicher Polymere innerhalb der Gerinnungskaskade dargestellt.

¹ Persönliche Mitteilung vom Institut für Radiochemie, FZ Rossendorf

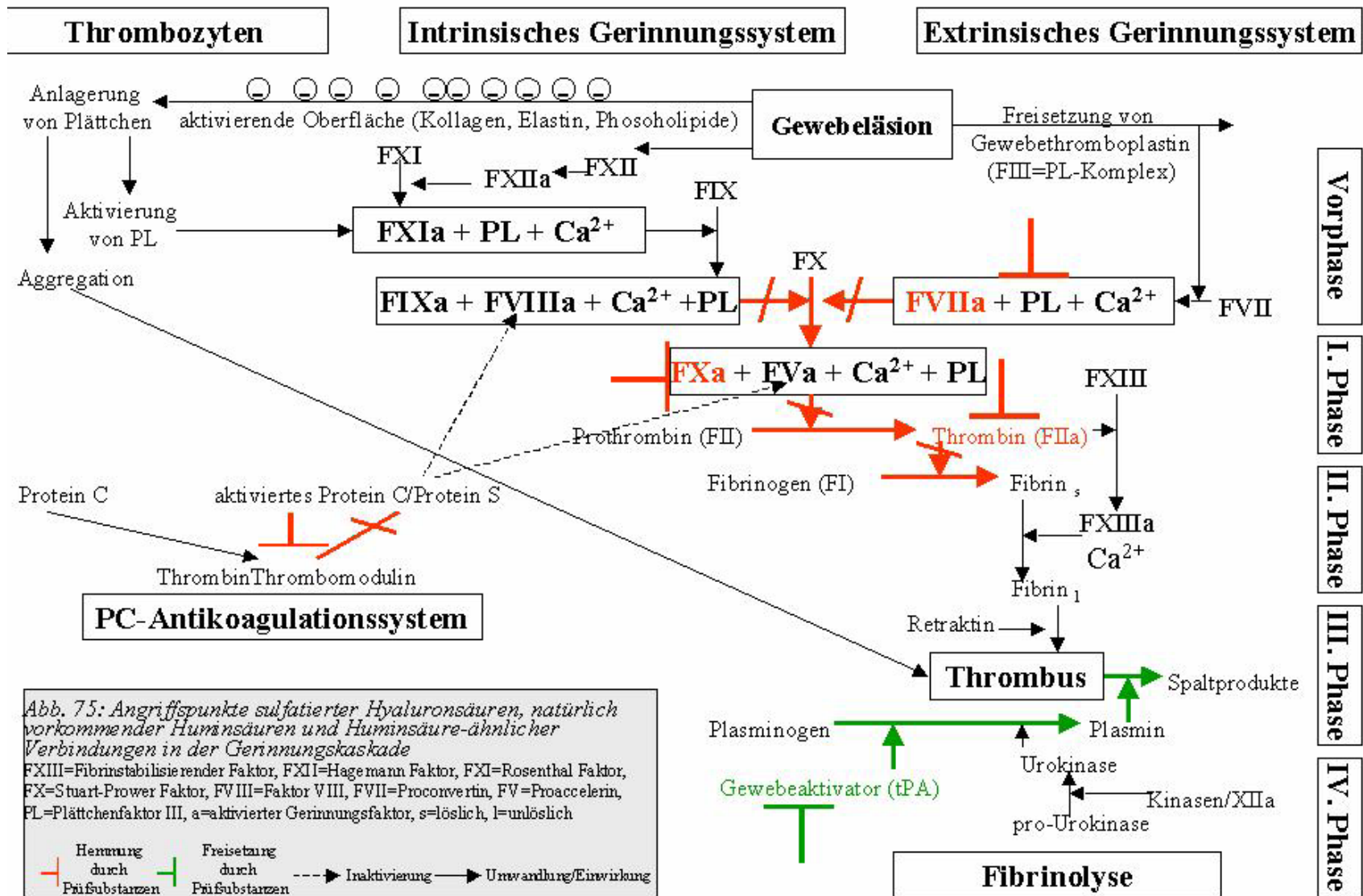


Abb. 75: Angriffspunkte sulfatierter Hyaluronsäuren, natürlich vorkommender Huminsäuren und Huminsäure-ähnlicher Verbindungen in der Gerinnungskaskade
 FXIII=Fibrinstabilisierender Faktor, FXII=Hagemann Faktor, FXI=Rosenthal Faktor, FX=Stuart-Prower Faktor, FVIII=Faktor VIII, FVII=Proconvertin, FV=Proaccelerin, PL=Plättchenfaktor III, a=aktivierter Gerinnungsfaktor, s=löslich, l=unlöslich

6. Zusammenfassung

Thrombo-embolische Erkrankungen gehören in den westlichen Industrienationen bis heute zu den häufigsten Todesursachen. Für die Prophylaxe dieser Erkrankungen stehen neben Thrombozytenaggregationshemmstoffen und Cumarinderivaten die polyanionischen Heparine und Heparinoide zur Verfügung. Keine der genannten Arzneistoffgruppen erfüllt jedoch die Anforderungen an Wirksamkeit und Unbedenklichkeit optimal. Daher kommt der Suche nach Wirkstoffen mit höherer Effizienz, Spezifität und Sicherheit große Bedeutung zu.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren In-vitro-Untersuchungen zur Wirkung höhermolekularer polyanionischer Verbindungen auf die Blutgerinnung und auf einzelne zentrale Bestandteile des Gerinnungssystems. Gleichzeitig sollten die Angriffspunkte dieser Wirkstoffe näher charakterisiert werden.

Entsprechend ihrer Struktur, ihrem Vorkommen und ihrer Verwendung in verschiedenen Bereichen der Medizin und Pharmazie repräsentieren die Testsubstanzen drei Gruppen polyanionischer Verbindungen:

1. Sulfatierte Polyglykoside (Hyaluronsäuren, Heparin, Pentosanpolysulfat)
2. Natürlich vorkommende Huminsäuren
3. Synthetische huminsäure-ähnliche Polymere

zu 1) Die antikoagulierende Wirkung von zwei biotechnologisch hergestellten und nachfolgend sulfatierten **Hyaluronsäuren** (HYA) verschiedener Molekulargewichte (HYA PS 10A = 18,9 kDa; HYA DS 48 = 62,4 kDa) wurde mit der von unfraktioniertem Heparin und Pentosanpolysulfat (PPS) als weiteren Sulfatgruppen tragenden Polyglykosiden verglichen.

zu 2) Polyanionische Verbindungen mit Carboxyl- und phenolischen Hydroxylgruppen als vorherrschenden aciden funktionellen Gruppen wie die aus Moorwasser (NaHS) und aus Braunkohle (Aldrich HS) isolierten natürlichen **Huminsäuren** (NHS) wurden aufgrund möglicher struktureller Ähnlichkeit zu den in Taiwan vorkommenden fluoreszierenden HS (FHS) untersucht. FHS aus dem Trinkwasser taiwanesischer Bergdörfer gelten nach Lu und Liu (1986) als Ursache der bei Bewohnern der Südwestküste von Taiwan epidemieartig auftretenden *Blackfoot disease* (BD), einer peripheren arteriellen Gefäßerkrankung.

zu 3) Um Schwierigkeiten bei der Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu überwinden, die durch die heterogene chemische Zusammensetzung von NHS bedingt sind, wurden sechs **HS-ähnliche Polymere** (HSÄP) in die Testung einbezogen,

von denen vier durch Oxidation aromatischer Ausgangsstoffe (HS 5, HS 130 und HS 136 aus Hydrochinon, KOP aus Kaffeesäure) und zwei durch Maillard-Reaktion aus nicht aromatischen Ausgangsstoffen (Melanoidin M1 und M42 aus Zucker und Aminosäuren) synthetisiert wurden.

Zur **Ermittlung des antikoagulierenden Potenzials** der Prüfsubstanzen und dessen Abhängigkeit von dem Heparin-Cofaktor ATIII wurde die Gerinnungszeit (GZ) in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanzen in Humanplasma als Thrombinzeit (TZ) und im plasmafreien System als Fibrinogen-GZ gemessen. Mit der gleichen Methode wurde auch der Einfluss auf Faktor VIIa (FVIIa) als zentralem Bestandteil der extrinsischen Gerinnung untersucht. Zum Ausschluss einer antifibrinolytischen Wirkung der Substanzen diente der Lysetest.

Die Bestimmung der durch den Angriff von Prüfsubstanzen veränderten enzymatischen (Rest-)Aktivität ausgewählter Serinproteasen erfolgte durch Umsetzung mit chromogenen Substraten und anschließende photometrische Messung der Farbintensität des abgespaltenen Chromophors. Der Einfluss auf Thrombin (FIIa) und Stuart-Prower-Faktor (FXa) wurde in An- und Abwesenheit von ATIII im plasmafreien System untersucht. Die Untersuchung der Wirkung auf das Protein-C(PC-)-Antikoagulationssystem erfolgte im plasmafreien System und in Humanplasma.

Die **Thrombinzeit (TZ)** zeigte bei alle geprüften Verbindungen eine konzentrationsabhängige Verzögerung der Gerinnung an. Eine Verdopplung der GZ gegenüber dem Leerwert *in Humancitratplasma* bewirkten 0,2 µg/mL Heparin; 0,3 µg/mL HYA PS 10A; 0,4 µg/mL HYA DS 48; 2,2 µg/mL PPS; 6,9 µg/mL Melanoidin M42; 10,7 µg/mL KOP; 19,5 µg/mL Aldrich HS; 19,9 µg/mL HS 5; 35,0 µg/mL NaHS; 44,0 µg/mL Melanoidin M1; 76,9 µg/mL HS 130 und 103,7 µg/mL HS 136.

Ein Vergleich mit den zur Verdopplung der GZ *im plasmafreien (ATIII-freien) System* erforderlichen Konzentrationen – 391,9 µg/mL Heparin; 0,1 µg/mL HYA PS 10A; 0,4 µg/mL HYA DS 48; 559,4 µg/mL PPS; 7,0 µg/mL Melanoidin M42; 22,5 µg/mL KOP; 28,9 µg/mL Aldrich HS; 27,2 µg/mL HS 5; 85,7 µg/mL NaHS; 106,4 µg/mL Melanoidin M1; 24,9 µg/mL HS 130 und 135,6 µg/mL HS 136 – macht deutlich, dass an der GZ-verlängernden Wirkung der Testsubstanzen in Humanplasma kein Cofaktor wie ATIII beteiligt ist. Vielmehr liegt der GZ-verlängernden Wirkung eine direkte Hemmung von FIIa (Thrombin) zugrunde, da die im plasmafreien System bestimmten IC₅₀-Werte mit den in Humanplasma erhaltenen IC₅₀-Werten nahezu übereinstimmen. Nur bei Hepa-

rin, von dem eine ATIII-vermittelte Anti-FIIa-Wirkung bekannt ist, liegt die zur GZ-Verdopplung erforderliche Konzentration ca. 2000fach höher als in Humanplasma.

Die antikoagulierende Wirkung der polyanionischen Verbindungen konnte durch Protaminsulfat im Verhältnis 1:3,3 HYA PS 10A; 1:1,8 Heparin; 1:1,3 HS 5; 1:1,2 HYA DS 48; 1:1,2 PPS; 1:0,8 KOP; 1:0,7 Melanoidin M42; 1:0,6 HS 130; 1:0,4 Aldrich HS; 1:0,3 NaHS; 1:0,3 Melanoidin M1 bzw. 1:0,2 HS 136 neutralisiert werden.

Die nach Einwirken der Prüfsubstanzen mit dem chromogenen Substrat S-2238 bestimmte **amidolytische (Rest-)Aktivität von Thrombin** wurde nur durch einen Teil der Prüfsubstanzen konzentrationsabhängig vermindert. Eine 50%ige Hemmung der FIIa-Aktivität (IC_{50}) wurde mit 11,6 $\mu\text{g/mL}$ KOP; 16,7 $\mu\text{g/mL}$ HS 130; 26,0 $\mu\text{g/mL}$ HYA DS48; 48,0 $\mu\text{g/mL}$ HYA PS 10A und 60,8 $\mu\text{g/mL}$ NaHS erreicht. Für diese Verbindungen konnte damit die zu erwartende Hemmung von Thrombin bestätigt werden. Eine maximale FIIa-Inhibierung gefolgt von einer Wirkungsabnahme bei ansteigender Konzentration wurde bei 3,1 $\mu\text{g/mL}$ Melanoidin M42 ($21,2 \pm 1,5\%$ Hemmung); 6,25 $\mu\text{g/mL}$ HS 136 ($9,70 \pm 0,8\%$); 12,5 $\mu\text{g/mL}$ Melanoidin M1 ($21,2 \pm 1,5\%$); 25,0 $\mu\text{g/mL}$ Aldrich HS ($66,8 \pm 2,4\%$) und 100,0 $\mu\text{g/mL}$ PPS ($68,04 \pm 7\%$) registriert.

Mit Ausnahme von PPS ($IC_{50} = 2,2 \mu\text{g/mL}$) und den sulfatierten Hyaluronsäuren (HYA PS 10A: $IC_{50} = 0,24 \mu\text{g/mL}$; HYA DS 48: $IC_{50} = 0,5 \mu\text{g/mL}$) war bei keiner der Testsubstanzen eine ATIII-abhängige Anti-Thrombinwirkung festzustellen. Der Zusatz von ATIII führte bei HS 130 sogar zu einer vollständigen Aufhebung der Anti-Thrombinwirkung. Damit könnte die schwächere Wirkung von HS 130 in der TZ gegenüber der Fibrinogen-GZ erklärt werden. Im Fall der sulfatierten Hyaluronsäuren bewirkte der Zusatz von ATIII eine enorme Wirkungsverstärkung, für die eine unspezifische elektrostatische Wechselwirkung als zugrunde liegender Mechanismus angenommen wird. An der Wechselwirkung mit FIIa könnte eine benachbart zu den aktiven Zentren liegende basische Region, die "anion binding exosite" im Thrombinmolekül beteiligt sein.

Mit S-2765 als chromogenem Substrat konnte für alle Prüfsubstanzen eine konzentrationsabhängige Hemmung der **FXa-Aktivität** nachgewiesen werden. Die halbmaximalen Hemmkonzentrationen betragen für HYA PS 10A 27,4 $\mu\text{g/mL}$; HS136 36,5 $\mu\text{g/mL}$; KOP 45,1 $\mu\text{g/mL}$; NaHS 67,0 $\mu\text{g/mL}$; Melanoidin M42 70,2 $\mu\text{g/mL}$; HS130 88,4 $\mu\text{g/mL}$; HYA DS48 159,0 $\mu\text{g/mL}$; PPS 171,0 $\mu\text{g/mL}$ und Melanoidin M1 274,8 $\mu\text{g/mL}$. Eine Wirkungsverstärkung durch ATIII wurde bei Melanoidin M1 ($IC_{50} = 118,6 \mu\text{g/mL}$) sowie bei den sulfatierten Verbindungen HYA PS 10A ($IC_{50} = 0,5 \mu\text{g/mL}$), PPS ($IC_{50} = 0,67 \mu\text{g/mL}$) und HYA DS 48 ($IC_{50} = 3,3 \mu\text{g/mL}$) gefunden. Als Mechanismus der Wir-

kungsverstärkung wird auch hier eine unspezifische elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Prüfsubstanzen und ATIII angenommen. Die Anti-Xa-Wirkung der beiden natürlich vorkommenden HS NaHS und Aldrich HS sowie der synthetischen HSÄP KOP, Melanoidin M42 und HS 130 blieb durch ATIII-Zusatz nahezu unbeeinflusst. Bei HS 136 ($IC_{50} = 426,7 \mu\text{g/mL}$) kam es zu einer starken Wirkungsabnahme.

Sowohl in den Untersuchungen der Anti-IIa- als auch der Anti-Xa-Wirkung konnte keine Wechselwirkung saurer funktioneller Gruppen der NHS und HSÄP mit ATIII nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der von Magnani et al. (1996) nachgewiesenen strengen Abhängigkeit der Heparin-ATIII-Wechselwirkung von Anzahl und Position der im Molekül enthaltenen Sulfatgruppen und dem Aufbau der auch für eine unspezifische Wechselwirkung erforderlichen Pentasaccharidsequenz.

Der Einfluss auf die plasmatische Gerinnungszeit nach Aktivierung der Gerinnung über den extrinsischen Gerinnungsweg wurde durch Untersuchung des Einflusses der Prüfsubstanzen auf **Faktor VIIa** geprüft. Vier der untersuchten Verbindungen bewirkten eine Verkürzung der GZ mit einem Maximum der prokoagulatorischen Aktivität bei 25,0 $\mu\text{g/mL}$ NaHS (21,0%); 12,5 $\mu\text{g/mL}$ Aldrich HS (19,1%); 6,25 $\mu\text{g/mL}$ KOP (24,0%) bzw. 12,5 $\mu\text{g/mL}$ Melanoidin M1 (24,0%). Höhere Konzentrationen führten bei allen Prüfsubstanzen zu einer verlängerten extrinsisch aktivierten Gerinnungszeit mit IC_{50} -Werten von 2,1 $\mu\text{g/mL}$ (HYA DS 48); 27,6 $\mu\text{g/mL}$ (KOP); 40,0 $\mu\text{g/mL}$ (HS 130); 43,6 $\mu\text{g/mL}$ (HS 136); 51,5 $\mu\text{g/mL}$ (Aldrich HS); 52,2 $\mu\text{g/mL}$ (Melanoidin M1) und 84,2 $\mu\text{g/mL}$ (NaHS). Die genaue Ursache der prokoagulatorischen Wirkung ist ungeklärt. Sie wurde jedoch auch von Lu et al. (1990c) bei der Untersuchung des Einflusses von FHS auf die Prothombinzeit und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit beobachtet und als Folge des konzentrationsabhängigen Polymerisationsgrades der HS und der gegensätzlichen Wirkung (pro- bzw. antikoagulatorisch) nieder- und höhermolekularer HS erklärt.

Der Einfluss der Testsubstanzen auf **aktiviertes Protein C (APC) und die Protac[®]-vermittelte Aktivierung von PC** wurde mit Hilfe des chromogenen Substrates S-2366 geprüft. Sowohl die sulfatierten Verbindungen als auch die beiden NHS sowie Melanoidin M1 haben *im plasmafreien System* nur eine marginale Wirkung auf APC. IC_{50} -Werte konnten nur für KOP (145,5 $\mu\text{g/mL}$), HS 130 (58,8 $\mu\text{g/mL}$) und HS 136 (123,0 $\mu\text{g/mL}$) bestimmt werden. Die durch 200 $\mu\text{g/mL}$ Melanoidin M42 um 54,7% geminderte APC-Aktivität nahm bis 800 $\mu\text{g/mL}$ nicht weiter zu.

Mit Ausnahme der sulfatierten Verbindungen war der Einfluss der Prüfsubstanzen auf die durch Protac[®], einen spezifischen, schnell wirkenden PC-Aktivator, vermittelte PC-Aktivierung im plasmafreien System deutlich stärker ausgeprägt. Die IC₅₀-Werte betragen 14,4 µg/mL KOP; 23,0 µg/mL Aldrich HS; 25,2 µg/mL Melanoidin M42; 28,6 µg/mL HS 130; 33,5 µg/mL Melanoidin M1; 35,2 µg/mL HS 136 und 59,3 µg/mL NaHS. Die mit 400 µg/mL verursachte maximale Hemmung der PC-Aktivierung betrug für HYA DS 48 22,9±2,7%, für HYA PS 10A 34,1±0,2% und für PPS 39,2±1,9%.

In Humanplasma als Mehrkomponentensystem führte allein der Zusatz der Prüfsubstanzen zum Entstehen einer unspezifischen amidolytischen Aktivität, die sowohl mit thrombin- als auch mit APC-spezifischen chromogenen Substraten nachweisbar war. Aprotinin und Hirudin hemmten die deutlich temperaturabhängige (enzymatische) Aktivität, deren Herkunft bisher nicht geklärt werden konnte, nur teilweise. Möglicherweise handelt es sich um einen Komplex aus Polyanionen und Plasmabestandteilen. Bemerkenswert ist, dass die unspezifische Aktivität in Humanplasma keine Gerinnung auslöst. Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung sulfatierter Hyaluronsäuren als Antikoagulantien sowie zum Ausschluss eines thrombogenen Potenzials von NHS ist die Erforschung der Ursache dieser Aktivität jedoch von entscheidender Bedeutung.

Anhand der Untersuchungsergebnisse im plasmafreien System und in Humanplasma konnte für die NHS und HSÄP eine deutlich stärkere Wirkung auf den PC-Aktivierungsvorgang als auf bereits gebildetes APC nachgewiesen werden. Eine Abhängigkeit der Wirkung von der Struktur der verwendeten Ausgangsstoffe konnte nicht festgestellt werden. Nur in ihrem Einfluss auf APC waren die aus o- bzw. p-Diphenolen hergestellten Verbindungen HS 130, HS 136 und KOP stärker wirksam als die übrigen Testsubstanzen.

Mit Ausnahme von Melanoidin M1 entfaltete keine der Prüfsubstanzen eine **antifibrinolytische Wirkung**. 400 µg/mL Melanoidin M1 verlängerten die Gerinnselysezeit etwa um das Vierfache.

Mit den **sulfatierten Hyaluronsäurederivaten** steht eine neue Gruppe antikoagulatorisch aktiver Verbindungen zur Verfügung, deren Wirkungsstärke in vitro, gemessen an der Verlängerung der Thrombinzeit, größer ist als die von PPS und etwa der von Heparin entspricht. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber Heparin und PPS besteht aus pharmakologischer Sicht vor allem in der ATIII-unabhängigen Wirkung. Sie ermöglicht eine antikoagulatorische Wirkung auch bei erniedrigtem ATIII-Spiegel. Ferner könnte die

Hemmung von Clot-gebundenem Thrombin initiiert und die Freisetzung von gerinnungsaktivem Thrombin bei der medikamentösen Thrombolyse vermieden werden.

Der Hypokoagulierer liegt eine direkte, aber unspezifische Wechselwirkung mit den Gerinnungsfaktoren IIa, Xa und VIIa zugrunde. Für die Verbindung mit geringerem Molekulargewicht und höherem Sulfatierungsgrad – HYA DS 48 – wurde eine gegenüber der Anti-Xa-Wirkung stärkere Anti-Thrombin- und TZ-verlängernde Wirkung nachgewiesen. Zusammen mit einer starken FVIIa-Hemmwirkung kann bei HYA DS 48 von einem bevorzugten Angriff im exogenen Gerinnungssystem ausgegangen werden. Zusätzlich zur FIIa-Bildungshemmung wird mit HYA DS 48 eine Inhibierung von bereits gebildetem Thrombin erreicht. Im Gegensatz dazu findet der Hauptangriff von HYA PS 10A eher im endogenen Gerinnungssystem statt. Eine gegenüber der Anti-FIIa-Wirkung stärkere Anti-Xa-Aktivität führt vor allem zu einer FIIa-Bildungshemmung. Da Thrombin nicht nur für die Fibrinbildung verantwortlich ist, sondern auch seine eigene Produktion verstärkt, ist die Hemmung der FIIa-Synthese von großer Bedeutung. Thrombin zählt außerdem zu den potentesten Thrombozytenaktivatoren.

Da beide HYAs bis 400 µg/mL die Funktionalität des PC-Regulationssystems durch Hemmung von APC oder Hemmung der PC-Aktivierung nicht beeinträchtigen, bleiben die profibrinolytischen Funktionen des PC-Regulationssystems (durch Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa, PAI-1 und PAI-3) erhalten. Außerdem initiieren sulfatierte Hyaluronsäuren am Gefäßendothel die Gewebelplasminogenaktivatorfreisetzung und unterstützen dadurch die profibrinolytische Wirkung des PC-Regulationssystems.

Vorteile bzgl. Molekulargewichtsverteilung und Chargenstabilität ergeben sich gegenüber Heparin und NMH aus der biotechnologischen Herstellung der sulfatierten HYAs. Eine Kontaminierung mit Pathogenen durch Gewinnung aus tierischen Ressourcen kann ausgeschlossen werden. Hinzu kommt eine im Vergleich zu Heparin günstigere Pharmakokinetik aufgrund der Hyaluronidasestabilität. Zusammen mit den positiven Ergebnissen der Biokompatibilitätstestung könnten sich daraus neue klinische Ansätze ergeben, bei denen sulfatierte HYAs nicht als Ersatz, sondern als Ergänzung zu herkömmlichen Antikoagulantien dienen, z.B. bei Heparin-Resistenz und ATIII-Mangel sowie bei der Oberflächenbeschichtung von Membranen für Hämodialyse und Hämofiltration.

Für die beiden **natürlich vorkommenden Huminsäuren** konnte eine vorwiegend antikoagulierende Wirkung durch direkte, unspezifische Hemmung der Faktoren IIa, Xa und VIIa nachgewiesen werden, die nicht Cofaktor-vermittelt ist. Der antikoagulierenden Wirkung liegt eine FIIa-Bildungshemmung, im Fall der Moorwasser-HS auch eine

Hemmung von bereits gebildetem Thrombin zugrunde. Dadurch verfügen NHS über die Potenz, die Thrombenbildung bzw. das Wachsen von Thromben sowie die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten zu verhindern. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, die Aktivierung der Gerinnung durch den Gewebefaktor im extrinsischen Gerinnungssystem (FVIIa/Gewebefaktor) abzufangen und eine Aktivierung im intrinsischen System (über FIX/FIXa durch den Komplex von FVIIa/Gewebefaktor) zu blockieren. Anders als bei den in Taiwan vorkommenden FHS konnte für NHS keine prokoagulatorische Aktivität festgestellt werden. Die erhaltenen Ergebnisse sprechen – zusammen mit in früheren Untersuchungen nachgewiesenen profibrinolytischen Eigenschaften – gegen eine thrombophile Wirkung von NHS.

Von den sechs untersuchten **HS-ähnlichen Polymeren** stehen mit dem Melanoidin M42 und KOP Modellsubstanzen für Untersuchungen zum Einfluss der Moorwasser- und Braunkohle-HS auf die Blutgerinnung in vitro zur Verfügung. Ihre Bildung aus einem oder wenigen niedermolekularen Ausgangsstoffen unter reproduzierbaren äußeren Bedingungen, die im Vergleich zu NHS zu chemisch homogeneren Produkten führen, stellt für Untersuchungen zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus natürlicher HS einen wichtigen Schritt, gleichwohl aber auch einen zu berücksichtigenden Unterschied dar.

7. Literatur

Abatangelo, G.; Barbucci, R.; Brun, P.; Lamponi, St.: Biocompatibility and enzymatic degradation studies on sulfated hyaluronic acid derivatives. *Biomaterials* 18 (1997) 1411-1415

Aiken, G. R.; Mc Knight, D. M.; Wershaw, R. L.; Mac Carthy, P.: *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*. New York: Wiley- Interscience, 1985

Alban, S.: Carbohydrates with anticoagulant and antithrombotic properties. In: *Carbohydrates in Drug Design* (Eds.: Witczak, Z. J.; Nieforth, K. A.) New York: Marcel Dekker, 1997, pp. 209-276

Alban, S.; Franz, G.: Characterisation of the anticoagulant actions of a semisynthetic curdlan sulfate. *Thromb. Res.* 99 (2000) 377-388

Alban, S.; Jeske, W.; Welzel, D.; Franz, G.; Fareed, J.: Anticoagulant and antithrombotic actions of a semisynthetic β -1,3-Glucansulfate. *Thromb. Res.* 78 (1995) 201-210

Aznar, J.; Espana, F.; Estelles, A.; Royo, M.: Heparin stimulation of activated protein C and other enzymes by human protein C inhibitor. Influence of the molecular weight of heparin and ionic strength. *Thromb. Haemost.* 76 (1996) 983-988

Baatz, H.: Moorthherapie in der Frauenheilkunde. In: *Moorthherapie: Grundlagen und Anwendungen* (Hrsg.: Flaig, W.; Goecke, C.; Kauffels, W.) Wien, Berlin: Ueberreuter-Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1988, S. 161-168

Bachmann, P.: Fibrinolysis. In: *Thrombosis and Haemostasis* (Eds.: Verstraete, M.; Vermeylen, J. G.; Lijnen, H. R.) Leuven University Press, 1987, pp. 227-265

Barbucci, R.; Benvenuti, M.; Casolaro, M.; Lamponi, St.; Magnani, A.: Sulfated hyaluronic acid as heparin-like material: physicochemical and biological characterisation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 5 (1994) 830-833

Barbucci, R.; Lamponi, St.; Magnani, A.; Renier, D.: The influence of molecular weight on the biological activity of heparin like sulphated hyaluronic acids. *Biomaterials* 19 (1998) 801-806

Barbucci, R.; Magnani, A.; Casolaro, M.; Marchettini, N.; Rossi, C.: Modification of hyaluronic acid by insertion of sulphate groups to obtain a heparin-like molecule. Part I. Characterisation and behaviour in aqueous solution towards H^+ and Cu^{2+} ions. *Gac. Chim. Ital.* 125 (1995) 169-179

Barbucci, R.; Magnani, A.; Lamponi, S.; Albanese A.: Chemistry and biology of glycosaminoglycans in blood coagulation. *Polymers for Advances Technologies* 7 (1996) 675-685

Blezer, R.; Fouache, B.; Willems, G. M.; Lindhout, T.: Activation of blood coagulation at heparin-coated surfaces. *J. Biomed. Mater Res.* 37 (1996) 108-113

Bourin, M. C.; Lindahl, U.: Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochem. J.* 289 (1993) 313-317

Callas, D. D.; Fareed, J.: Direct inhibition of protein Ca by site directed thrombin inhibitors: Implications in anticoagulant and thrombolytic therapy. *Thromb. Res.* 78 (1995) 457-460

Campbell, A.; Nesheim, M. E.; Doctor, M.: Mechanism of potentiation of antithrombin III (ATIII) inhibition by sulfated xylans. *Thromb. Res.* 47 (1987) 341-352

Casu, B.: Heparin and heparin-like polysaccharides. In: *Polymeric biomaterials* (Eds.: Dimitru, S.) New York: Marcel Dekker, 1994, pp. 159-177

Chang, N.-S.; Inrieri, C.; Mattison, J.; Armand, G.: Synthetic polysulfated hyaluronic acid is a potent inhibitor for tumor necrosis factor production. *J. Leukoc. Biol.* 55 (1994) 778-784

Chen, G. S.; Asai, T.; Suzuki, Y.; Nishioka, K.; Nishiyama, S.: A possible pathogenesis for blackfoot disease- effects of trivalent arsenic (As_2O_3) on cultured human umbilical vein endothelial cells. *J. Dermatol.* 17 (1990) 599-608

Chen, G.; Ito, Y.; Imannishi, Y.; Magnani, A.; Lamponi, St.; Barbucci, R.: Photoimmobilization of sulfated hyaluronic acid for antithrombogenicity. *Bioconjug. Chem.* 8 (1997) 730-734

Chen, S. L.; Yeh, S. J.; Yang, M. H.; Lin, T. H.: Trace element concentration and arsenic speciation in the well water of a taiwan area with endemic blackfoot disease. *Biol. Trace Elem. Res.* 48 (1995) 263-274

Chiu, H. C.; Shih, S. R.; Lu, F. J.; Yang, R. L.: Stimulation of endothelin-production in cultured human endothelial cells by fluorescent compounds associated with blackfoot disease. *Thromb. Res.* 69 (1993) 139-151

Claus, B.; *Granulometrie. Klassier- und Sedimentationsmethoden.* Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1990, S. 292-294

Collen, D.: On the regulation and control of fibrinolysis. *Thromb. Haemost.* 43 (1987) 77-89

Colman, R. W.: Surface-mediated defence reactions: The plasma contact activation system. *J. Clin. Invest.* 73 (1984) 1249-1253

Coon, W. W.; Arbor, A.: Heparin: A drug of varying composition and effectiveness. *Clin. Pharmacol. ther.* 23 (1978) 139-142

Dace, R.; Mc Bride, E.; Brooks, K.; Gander, J.; Buszko, M.; Doctor, V. M.: Comparison of the anticoagulant action of sulfated and phosphorylated polysaccharides. *Thromb. Res.* 87 (1997) 113-121

David, H.: Rudolf Virchow und die Medizin des 20. Jahrhunderts. In: *Hamburger Beiträge zur Geschichte der Medizin* (Hrsg.: Selberg, W.; Hamm, H.) München, 1993

Dreyfus, M.; Magny, J. F.; Bridey, F.; Schwarz, H. P.; Planche, C.; Dehan, M.; Tchernia, G.: Treatment of homozygous protein C deficiency and neonatal purpura fulminans with a purified protein C concentrate. *N. Engl. J. Med.* 325 (1991) 1565-1568

Duckert, F.: Heparin. In: *Thrombose und Embolie* (Hrsg.: Koller, F.; Duckert, F.) . Stuttgart, New York: Schattauer, 1983, S. 290-308

Eichhorn, U.; Klöcking, R.; Helbig, B.; Koch, J.: Organverteilung einer huminsäureähnlichen Modells substanz (^{14}C -KOP) bei der Maus. *Z. Physiother.* 34 (1982) 103-108

Eller, W.; Koch, K.: Synthetische Darstellung von Huminsäuren. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 53 (1920) 1469-1476

Engel, B.: Untersuchungen der Huminsäure mit Hilfe von pH-Titrationen. Diplomarbeit, Universität Bielefeld. (1998)

Fernandez, J. A.; Petäjä, J.; Griffin, J. H.: Dermatan sulfate and LMW heparin enhance the anticoagulant action of activated protein C. *Thromb. Haemost.* 82 (1999) 1462-1468

Ferne Korn, A.: Beitrag zur chemischen und biologischen Charakterisierung von Huminsäuren und huminsäureähnlichen Polymeren. Dissertation zur Promotion A, Akademie der Wissenschaften der DDR. (1989)

Ferne Korn, A.; Klöcking, R.: Fütterungseinrichtung für Mäuse zur Bestimmung der Trockenfuttereinnahme. *Z. Versuchstierkd.* (1987)

Fooker, U.: Huminsäuren in Oberflächensedimenten der Nordsee: Indikatoren für terrestrischen Eintrag? Dissertation, Universität Oldenburg. (2000)

Frimmel, F. H.; Abbt-Braun, G.: Comparison of humic substances of different origin. In: *Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment* (Eds.: Allard, B.; Boren, H.; Grimvall, A.) Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona: Springer, 1991, pp. 37-46

Frimmel, F. H.; Abbt-Braun, G.: Refraktäre organische Säuren in Gewässern: Ergebnisse eines Rundgesprächs am 2. und 3. Juli 1990 / Mitteilung der Senatskommission für Wasserforschung / Deutsche Forschungsgemeinschaft / VCH, Weinheim 1990

Frimmel, F. H.; Christman, R. F.: Humic Substances and their role in the Environment. Chichester: Wiley-Interscience, 1988

Gan, Z.-R.; Li, Y.; Connolly, T. M.; Sardana, M. K.: Importance of the Arg-Gly-Asp triplet in human thrombin for maintenance of structure and function. Arch. Biochem. Biophys. 2 (1993) 228-236

Gast, A.; Tschopp, T. B.; Schmid, G.; Hilpert, K.; Ackermann, J.: Inhibition of clot-bound and free (fluid-phase) thrombin by a novel synthetic thrombin inhibitor (Ro 46-6240), recombinant hirudin and heparin in human plasma. Blood Coagul. Fibrinolysis 5 (1994) 879-887

Gerotziapas, G. T.; Bara, L.; Bloch, M. F.; Makris, P. E.; Samama, M. M.: Treatment with LMWHs inhibits factor VIIa generation during in vitro coagulation of whole blood. Thromb. Res. 81 (1996) 491-496

Gerotziapas, G. T.; Bara, L.; Markis, P. E.; Samama, M. M.: The role of antithrombin, TEPI and the various clotting factors in the inhibition of factor VIIa generation by the synthetic pentasaccharide or LMWH or UFH. Thromb. Haemost. 82 (1999) 2403

Gerotziapas, G.T.; Samama, M.M.: On the mechanism of inhibition of factor VIIa by synthetic pentasaccharide, low molecular-weight heparins and unfractionated heparin. Br. J. Haematol. 109 (2000) 903-905

Greinacher, A.; Michels, I.; Müller-Eckhardt, C.: Heparin-associated thrombocytopenia: The antibody is not heparin specific. Thromb. Haemost. 67 (1992) 545-549

Griffin, J. H.; Evatt, B. L.; Zimmermann, T. S.; Kleiss, A. J.; Wideman, C.: Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. J. Clin. Invest. 68 (1981) 1370-1373

Griffith, M. J.: Kinetics of the heparin-enhanced antithrombin III/thrombin reaction: evidence for a template model for the mechanism of action of heparin. *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 7360-7365

Griffith, J. H.; Evatt, B.; Zimmermann, D. S.; Kleiss, A. J.; Wideman, C.: Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J. Clin. Invest.* 68 (1981) 1370-1373

Hänninen, K. I.; Klöcking, R.; Helbig, B.: Synthesis and characterisation of humic acid-like polymers. *Sci. Total Environ.* 62 (1987) 201-210

Hartert, H.: Klinische Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie. *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 199 (1952) 284-292, 293-311, 402-437

Hartert, H.: Klinische Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klin. Wschr.* 26 (1948) 577-583

Hatcher, P. C.: Aliphatic structure of humic acids; a clue to their origin. *Org. Geochem.* 3 (1981) 43-48

Hayes, M. H. B.; Mac Carthy, P.; Malcolm, R. L.; Swift, R. S.: *Humic Substances II – In Search of Structure*. Chichester: Wiley-Interscience, 1989

Heimann, W.: *Grundzüge der Lebensmittelchemie*. Dresden: Verl. Steinkopf, 1969, S. 610

Helbig, B.; Klöcking, R.: Darstellung und Charakterisierung von Huminsäure-Modellsubstanzen. *Z. Physioth.* 33 (1983) 31-37

Herdering, W. (1998): Modellsubstanzen für ROS. <http://analytik.chemie.uni-hamburg.de/rosig/Modelle.html>

Hirsh, J.; Warkentin, T. E.; Raschke, R.; Granger, C.; Ohman, E. M.; Dalen, J. E.: Heparin and low molecular weight heparin: Mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy and safety. *Chest.* 114 (1998) 489-510

Hörath, H.: Gefährliche Stoffe und Zubereitungen. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1995

Hoffmann, A.; Markwardt, F.: Pharmakologie des Heparins. Z. ges. Med. Jahrg. 34 Heft 1 (1979) 3-8

Hogg, P. J.; Bock, P. E.: Modulation of thrombin and heparin activities by fibrin. Thromb. Haemost. 77 (1997) 424-433

Hortin, G. L.; Trimpe, B. L.: Allosteric changes in thrombins activity produced by peptides corresponding to segments of natural inhibitors and substrates. J. Biol. Chem. 11 (1991) 6866-6871

Hseu, Y. C.; Lu, F. J.; Engelking, L. R.; Chen, C. L.; Chen, Y. H.; Yang, H. L.: Humic acid-induces echinocyte transformation in human erythrocytes: Characterization of morphological changes and determination of the mechanism underlying damage. J. Toxicol. Environ. Health 60 (2000) 215-230

Huang, T. S.; Lu, F. J.; Tsai, C. W.; Chopra, I. J.: Effect of humic acids on thyroidal function. J. Endocrinol. Invest. 17 (1994) 787-791

Inoue, M.; Katakami, C.: The effect of hyaluronic acid on corneal epithelial cell proliferation. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 34 (1993) 2313-2315

Ito, Y.: Antithrombogenic heparin-bound polyurethanes. J. Biomater. Appl. 2 (1987) 235-265

Jaques, L. B.: Heparin: An old drug with a new paradigm. Science 206 (1979) 528-536

Jaques, L. B.: Heparins-anionic polyelectrolyte drugs. Pharmacol. Rev. 31 (1980) 99-108

Jorpes, E.: Heparin. Its chemistry, physiology and application in medicine. London: Oxford University Press, 1946

Kallus, J.: Gastritis, das gastroduodenale Ulkus und Neydhartinger Moor. In: Bericht über den 8. Internationalen Kongress für universelle Moor- und Torfforschung vom 5. bis 10. Oktober 1962 in Bremen. Linz a. D.: Länderverlag, 1962, S. 112-114

Kazama, Y.; Niwa, M.; Yamagishi, R.; Takahashi, K.; Sakuragawa, N.; Koide, T.: Specificity of sulfated polysaccharides to accelerate the inhibition of activated protein C by protein C inhibitor. *Thromb. Res.* 48 (1987) 179-185

Kemkes-Matthes, B.; Matzdorff, A.; Niemann, F.: Differentialdiagnostik zur Beurteilung des Thromboserisikos mit ProC[®]. In: *Hämostaseologie* (Hrsg.: Schattauer, F.K.). Stuttgart, New York: Schattauer-Verlagsgesellschaft mbH, 1999, S. 153-156

Kleinpaul, R.: Die Lebendigen und die Toten in Volksglauben, Religion und Sage. Leipzig, 1898

Kleinschmidt, J.: Moortherapie bei rheumatischen Erkrankungen. In: *Moortherapie: Grundlagen und Anwendungen* (Hrsg.: Flaig, W.; Goecke, C.; Kauffels, W.) Wien, Berlin: Ueberreuter-Wissenschaftliche-Verlagsgesellschaft mbH, 1988, S. 216-224

Klöcking, H.-P.: Anticoagulatory efficacy of (poly)-carboxylates. In: *The role of Humic Substances in the Ecosystems and in Environmental Protection* (Eds.: Drozd, J.; Gonet, S.; Senesi, N.; Weber, J.) Bydgoszcz: Zakład Poligraficzny, 1997, pp. 951-953

Klöcking, H.-P.: Influence of humic acids and humic acid-like polymers on fibrinolytic and coagulation system. In: *Humic Substances in the Global Environment and Implication on Human Health* (Eds.: Senesi, N.; Miano, T. M.) Amsterdam, London, New York, Tokyo: Elsevier, 1994a, pp. 1337-1340

Klöcking, H.-P.: Influence of natural humic acids and synthetic phenolic polymers on fibrinolysis. In: *Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment* (Eds.: Allard, B.; Boren, H.; Grimvall, A.) Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona: Springer, 1991a, pp. 423-428

Klöcking, H.-P.: Influence of natural humic acids and synthetic phenolic polymers on haemostasis. *Arch. Toxicol. Suppl.* 14 (1991b) 166-169

Klöcking, H.-P.: Pharmacological stimulation of t-PA release in rats. *Fibrinolysis* 4 Suppl. 2 (1990) 45-46

Klöcking, H.-P.: Pharmakologische Beeinflussung der Freisetzung von t-PA aus dem Gefäßendothel. *Hämostaseol.* 11 (1991c) 76-88

Klöcking, H.-P.: Stimulation of t-PA release by polyanionic compounds in vivo. In: *Thrombosis and haemorrhagic disorders* (Eds.: Nagy, I.; Losonczy, H.; Vinazzer, H.) Würzburg: Schmitt & Meyer, 1991d, pp. 355-358

Klöcking, H.-P.; Helbig, B.; Klöcking, R.: Einfluss von Stoffen vom Huminsäuretyp auf die Hämostase. *TELMA* 24 (1994b) 153-163

Klöcking, H.-P.; Klöcking, R.: Einfluss von Phenolkörperpolymerisaten auf das Gerinnungs- und Fibrinolysesystem. In: *100 Jahre Veterinärpharmakologie Berlin* (Hrsg.: Werner, E.; Heinze, W.; Wilsdorf, G.) Oberlungwitz: VEB Kongress- und Werbedruck, 1986, S. 217-224

Klöcking, H.-P.; Klöcking, R.; Helbig, B.: Einfluss von Phenolkörperpolymerisaten auf die Freisetzung von Plasminogenaktivatoren. *Farmakol. i. Toksikol.* 47 (1984) 93-96

Klöcking, H.-P.; Klöcking, R.; Helbig, B.: Release of plasminogen activator by natural humic acids and synthetic phenolic polymers. *Int. Peat . J.* 4 (1992) 105-109

Klöcking, H.-P.; Möller, S.; Müller, P.-J.: Anticoagulant and profibrinolytic effects of high-sulphated hyaluronic acids. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 331 Suppl. 2 (1998) 68

Klöcking, R.: Giftung und Entgiftung von Schwermetallen durch Huminsäuren. *Arch. Exper. Vet. med.* 34 (1980) 389-393

Klöcking, R.: Humic substances as potential therapeutics. In: *Humic Substances in the Global Environment and Implication on Human Health* (Eds.: Senesi, N.; Miano, T. M.) Amsterdam, London, New York, Tokyo: Elsevier, 1994c, pp. 1245-1257

Klöcking, R.: Stoffe vom Huminsäuretyp und ihre Metallverbindungen. Habil.-Schrift, Universität Rostock. (1967)

Klöcking, R.; Helbig, B.: Interaction of humic acids and humic acid-like polymers with Herpes simplex virus type 1. In: Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment (Eds.: Allard, B.; Boren, H.; Grimvall, A.) Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona: Springer, 1991e, pp. 407-412

Klöcking, R.; Helbig, B.: Physiologische Wirkungen von Huminstoffen als Grundlage für ihre medizinische Anwendung. In: Refraktäre organische Säuren in Gewässern (Hrsg.: Frimmel, F.; Abbt-Braun, G.) Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1991f, S. 173-189

Klöcking, R.; Helbig, B., Drabke, P.: Eine verbesserte Methode für die Isolierung wasserlöslicher Huminsäuren und enzymatisch oxidierter o-Diphenolverbindungen. Pharmazie 32 (1977) 297

Klöcking, R.; Hofmann, R.; Mücke, D.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur entzündungshemmenden Wirkung von Humaten. Arzneimittelforschung 18 (1968) 941-942

Klöcking, R.; Manuwald, O.; Müller, B.; Legal, G.; Bräuning, H.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Toxizität von Blei(II)-humat. Farmakol. i Toksikol. 37 (1974) 94-95

Klöcking, R.; Spröβig, M.: Antiviral properties of humic acids. Experientia 28 (1972) 607-608

Klöcking, R.; Spröβig, M.: Wirkung von Ammoniumhumat auf einige Virus-Zell-Systeme. Z. Allg. Mikrobiol. 15 (1975) 25-30

Klöcking, R.; Spröβig, M.; Wutzler, P.; Thiel, K.-D.; Helbig, B.: Antiviral wirksame Huminsäuren und huminsäureähnliche Polymere. Z. Physiother. 33 (1983) 95-101

Kovarik, R.: Über die Anwendung von Präparaten aus Torf bzw. Huminstoffen bei gynäkologischen Erkrankungen. In: Moortherapie: Grundlagen und Anwendungen (Hrsg.:

Flaig, W.; Goecke, C.; Kauffels, W.) Wien, Berlin: Ueberreuter-Wissenschaftliche-Verlagsgesellschaft mbH, 1988, S. 177-197

Kraus, M.; Noah, M.; Fickenscher, K.: The PCAT – a simple screening assay for assessing the functionality of the protein C anticoagulant pathway. *Thromb. Res.* 79 (1995) 217-222

Kühnert, M.; Bartels, B.; Kröll, S.; Lange, N.: Huminsäurehaltige Tierarzneimittel in Therapie und Prophylaxe bei gastrointestinalen Erkrankungen von Hund und Katze. *Mh. Vet.-Med.* 46 (1991) 4-8

Kühnert, M.; Fuchs, V.; Golbs, S.: Pharmakologisch-toxikologische Eigenschaften von Huminsäuren und ihre Wirkungsprofile für eine vet.-med. Therapie. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 96 (1982) 3-10

Kühnert, M.; Fuchs, V.; Golbs, S.: Pharmakologisch-Toxikologische Untersuchungen an Huminsäuren unter der Zielstellung ihrer oralen Anwendung bei Magen-Darm-Erkrankungen der Nutztiere. Die Schriften des Internationalen Symposiums des II. und des IV. Ausschusses der IMTG „Torf, seine Eigenschaften und die Perspektive für seine Anwendung“, Minsk, UdSSR, 1982

Kumada, K.; Suzuki, A.; Aizawa, K.: Isolation of anthraquinone from humus. *Nature* 191 (1961) 415-416

Lachmann, H.: Die Möglichkeiten der Heilmoor-Schwebstoff-Therapie. In: Bericht über den 8. Internationalen Kongress für universelle Moor-und Torfforschung, 5.-10. Oktober 1962 in Bremen, Linz: Länderverlag, 1964, S. 115-116

Linder, R.; Blombäck, M.; Egberg, N.; Grip, L.: Thrombin inhibitors suppress the thrombin-thrombomodulin-mediated generation of activated protein C. *Thromb. Res.* 95 (1999) 117-125

Lu, F. J.: Arsenic as a promoter in the effect of humic substances on plasma prothrombin time in vitro. *Thromb. Res.* 58 (1990a) 537-541

- Lu, F. J.: Blackfoot disease: arsenic or humic acid? *Lancet* 336 (1990b) 115-116
- Lu, F. J.; Huang, T.-S.; Lee, J.-H.: Effect of humic acid-multimetal complex on human plasma prothrombin time. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53 (1994) 577-582
- Lu, F. J.; Lee, Y. S.: Humic acid: inhibitor of plasmin. *Sci. Total Environ.* 114 (1992) 135-139
- Lu, F. J.; Ling, K.-H.: Studies on fluorescent compounds in drinking water of blackfoot disease endemic areas. An experimental animal study on peripheral vasculopathy. *J. Formosan Med. Assoc.* 78 (1979) 314-318
- Lu, F. J.; Liu, T. M.: Fluorescent compounds in drinking water of blackfoot disease endemic areas: animal experimental model. *J. Formosan Med. Assoc.* 85 (1986) 352-358
- Lu, F. J.; Shih, S. R.; Liu, T. M.; Shown, S. H.: The effect of fluorescent humic substances existing in the well water of blackfoot disease endemic areas in Taiwan on prothrombin time and activated partial thromboplastin time in vitro. *Thromb. Res.* 57 (1990b) 747-753
- Lu, F. J.; Yamamura, Y.; Yamauchi, H.: Studies on fluorescent compounds in water of a well in blackfoot disease endemic areas in Taiwan: Humic substances. *J. Formosan Med. Assoc.* 87 (1988) 66-75
- Magnani, A.; Albanese, A.; Lamponi, St.; Barbucci, R.: Blood-interaction performance of differently sulphated hyaluronic acids. *Thromb. Res.* 81 (1996) 383-395
- Maillard, L. C.: Action des acides amines sur les sources; for des melanoidines par voie methodique. *C. R. Acad. Sci. III.* 164 (1912) 66-68
- Mak, O. T.: Prostacyclin production in vascular endothelium of patients with blackfoot disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 242 (1988) 119-125

Mak, O. T.; Chen, S. H.; Chen, M. H.: Effects of arsenate and ergot alkaloid compounds on prostacyclin synthesis in human umbilical endothelium. *Cell. Biol. Int.* 10 (1986) 287-293

Mann, J.: Online-Buch über Nierenerkrankungen. Krankenhaus München-Schwabing, Abteilung für Nephrologie und Hypertonie, vom 27.11.2002

Mansel, A.; Montavon, G.; Seibert, A.; Artinger, R.; Keller, H.; Kim, J. I.; Kratz, J. V.; Marquardt, C.; Scherbaum, F.; Trautmann, N.: Complexation studies of actinides with humic acids at very low metal concentrations. Final Report, BMBF-Project No.: 02E8795 (1999)

Markwardt, F.; Klöcking, H.-P.: Heparin-induced release of plasminogen activator. *Haemostasis* 6 (1977) 370-374

Markwardt, F.; Landmann, H.; Klöcking, H.-P.: Fibrinolytika und Antifibrinolytika. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1972, S. 105-107

Matsubara, K.; Matsuura, Y.; Bacic, A.; Liao, M.; Hori, K.; Miyazawa, K.: Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *Int. J. Biol. Macromol.* 28 (2001) 395-399

Mc Ginnis, D. M.; Outschoorn, A. S.: Problems of component activities of heparin. *Pharmacopeial Forum* 5 (1991) 2438-2441

Mc Mullen, B. A.; Fujikawa, K.; Kisiel, W.: Primary structure of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *Biochemistry* 28 (1989) 674-679

Millet, J.; Jouault, S. C.; Mauray, S.; Theveniaux, J.; Sternberg, C.; Boisson, V. C.; Fischer, A. M.: Antithrombotic and anticoagulant activities of a low molecular weight fucoidan by the subcutaneous route. *Thromb. Haemost.* 81 (1999) 391-395

Mitchell, C. A.; Rowell, J. A.; Hau, L.; Young, J. P.; Salem, H. H.: A fatal thrombotic disorder associated with an acquired inhibitor of protein C. *New Engl. J. Med.* 317 (1987) 1638-1642

Möller, S.; Müller, P.-J.; Ozegowski, J.-H.: Verfahren zur Herstellung hochsulfatierter Hyaluronsäuren. Offenlegungsschrift DE 198 13 234 A1, 26.03.1998

Morrissey, J. H.; Macik, B. G.; Neuenschwande, P. F.; Comp, P. C.: Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 81 (1993) 734-744

Morita, T.; Igarashi, H.; Iwanaga, S: Staphylocoagulase. *Methods Enzymol.* 80 (1981) 311-319

Mourao, P. A.; Pereira, M. S.: Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. *Trends Cardiovasc. Med.* 9 (1999) 225-232

Müller, P.-J.; Ozegowski, J.-H.; Günther, E.; Veith, G.; Liebisch, W.: Biotechnologische Herstellung von Hyaluronat enthaltenden Kulturlösungen. Offenlegungsschrift DE 195 48 954 A1, 28.12.1995

Müller, P.-J.; Liebisch, W.; Gura, E.; Peschel, G.; Rozh, M.; Menzel, K.-D.: Bioprocess development of the biopolymer hyaluronic acid. Annual Report from Hans-Knöll-Institute (1998)

Navara, V.: Einfluss von natürlichen Huminsäuren und synthetischen Huminsäure-ähnlichen Polymeren auf die Blutgerinnung. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2001

Nicolaes, G. A.; Tans, G.; Christella, M.: Peptide bound cleavages and loss of functional activity during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 21158-21166

Nizzi, F. A.; Kaplan, H. S.: Protein C and S deficiency. *Semin. Thromb. Haemost.* 25 (1999) 265-272

Oden, S.: Die Huminsäuren. *Kooloidchem. Beihefte* 11 (1919) 75-260

Orthner, C. L.; Bhattacharya, P.; Strickland, D. K.: Characterisation of a protein C activator from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*. *Biochemistry* 27 (1988) 2558-2564

Pabinger, I.; Brucker, S.; Kyrle, P. A.: Hereditary deficiency of antithrombin III, protein C and protein S. Prevalence in patients with a history of venous thrombosis and criteria for rational patient screening. *Blood Coag. Fibrinolysis* 3 (1992) 547-553

Painter, T. J.: Carbohydrate origin of aquatic humus from peat. *Carbohydr. Res.* 124 (1983) C22-C26

Perdue, E. M.; Gjessing, E. T.: *Organic acids in Aquatic Ecosystems*. Chichester: Wiley-Interscience, 1990

Pernerstorfer, T.; Jilma, B.; Eichler, H. G.; Aull, S.; Handler, S.; Speiser, W.: Heparin lowers plasma levels of activated factor VII. *Br. J. Haematol.* 105 (1999) 1127-1129

Petäjä, J.; Fernandez, J. A.; Gruber, A.; Griffin, J. H.: Anticoagulant synergism of heparin and activated protein C in vitro. *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 2655-2663

Philip, J. H.; Öhlin, A. K.; Stenflo, J.: Identification of structural domains in protein C involved in its interaction with thrombin-thrombomodulin on the surface of endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 703-706

Pompe, S.; Bubner, M.; Denecke, M. A.; Reich, T.; Brachmann, A.; Geipel, G.; Nicolai, R.; Heise, K.-H.; Nitsche, H.: A comparison of natural humic acids with synthetic humic acid model substances: Characterisation and interaction with Uranium (VI). *Radiochimica Acta* 74 (1996) 135-140

Pompe, S.; Schmeide, K.; Bubner, M.; Geipel, G.; Reich, T.; Heise, K.-H.; Bernhard, G.: Untersuchungen des Einflusses phenolischer OH-Gruppen auf das Komplexbildungsverhalten von Huminsäuren mit Uran (VI). Arbeitstagung der Sektion IV der Deutschen Gesellschaft für Moor- und Torfkunde vom 7.-8.10.1999, Bad Elster

Priegnitz, H.: *Wasserkur und Badelust*. Leipzig: Koehler & Amelang, 1986, S. 174-175

Racanelli, A.; Fareed, J.; Walenga, J. M.; Coyne, E.: Biochemical and pharmacologic studies on the protamine interactions with heparin, its fractions and fragments. *Semin. Thromb. Haemost.* 11 (1985) 176-189

Renatus, M.; Bode, W.; Huber, R.; Stürzebecher, J.; Stubbs, M. T.: Structural and functional analysis of benzamidine-based inhibitors in complex with trypsin: implications of factor Xa, t-PA and urokinase. *J. Med. Chem.* 41 (1998) 5445-5456

Rochus, W.: Die Diffusion von Moor-Huminsäuren durch Lipoidbarrieren. *TELMA* 7 (1977) 175-189

Roka, L.; Bleyl, H.: Heparin. Beziehung zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung. In: *Hämostase, Thrombophilie und Arteriosklerose* (Hrsg.: van de Loo, J.; Asbeck, F.). Stuttgart, New York: Schattauer, 1982, S. 185-199

Rothschuh, K. E.: *Konzepte der Medizin in Vergangenheit und Gegenwart*. Stuttgart: Hippokrates-Verlag, 1978, S. 1-2

Schewe, Ch.; Klöcking, R.; Helbig, B.; Schewe, T.: Lipxygenaseinhibitory action of antiviral polymeric oxidation products of polyphenols. *Biomed. Biochem. Acta* 50 (1991) 299-305

Schipperges, H.: Blut in Altertum und Mittelalter. In: *Einführung in die Geschichte der Hämatologie* (Hrsg.: Boroviczeny, K. G.; Schipperges, H.; Seidler, E.) Stuttgart, 1974, S. 17-30

Schnitzer, M.; Khan, S. U.: *Humic substances in the environment*. New York: Marcel Dekker, 1972

Schröer, H.: Die Entwicklung der Hämostaseologie. In: *Einführung in die Geschichte der Hämatologie* (Hrsg.: Boroviczeny, K. G.; Schipperges, H.; Seidler, E.) Stuttgart, 1974, S. 80-98

Schulten, H. R.; Leinweber, P.: New insights into organic-mineral particles: composition, properties and models of molecular structure. *Biol. Fertil. Soils* 30 (2000) 399-432

Schulten, H. R.; Plage, B.; Schnitzer, M.: A chemical structure for humic substances. *Naturwissensch.* 78 (1991) 311-312

Schultz, H.: Die viricide Wirkung der Huminsäuren im Torfmull auf das Virus der Maul- und Klauenseuche. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 69 (1962) 613-616

Shen, M. C.; Tseng, W. P.; Chen, C. S.: Increased circulating platelet aggregates and coagulation factors in patients with blackfoot disease. *J. Formosan Med. Assoc.* 82 (1983) 816-821

Siedeck, H.; Hammerl, H.; Henk, W.: Behandlungen von Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes mit Trinkmoor. Bericht über den 7. Internationalen Kongress für universelle Moorforschung vom 15.-19. September 1960 in Frantiskoy Lazne, CFSR. (1960)

Stenflo, J.: Structure and function of protein C. *Semin. Thromb. Haemost.* 10 (1984) 109-121

Stocker, K.; Fischer, H.; Meier, J.; Brogli, M.; Svendesen, L.: Characterisation of the protein C activator protac[®] from the venom of the southern copperhead (*Agkistrodon contortrix*) snake. *Toxicon* 25 (1987) 239-252

Stürzebecher, J.; Neumann, U.; Meier, J.: Inhibition of the protein C activator protac[®] a serine proteinase from the venom of the southern copperhead snake *agkistrodon contortrix*. *Toxicon.* 29 (1991) 151-155

Suzuki, K.: Activated protein C inhibitor. *Semin. Thromb. Haemost.* 10 (1984) 154-161

Suzuki, K.; Nishioka, J.; Kusumoto, H.; Hashimoto, S.: Mechanism of inhibition of activated protein C by protein C inhibitor. *J. Biochem.* 95 (1984) 187-195

Tan, S. W.; Johns, M. R.; Greenfield, P. F.: Hyaluronic acid-a versatile biopolymer. Aust. J. Biotechnol. 4 (1990) 38-43

Taugner, B.: Tierexperimentelle Untersuchungen über ein Natriumhuminat-Salicylsäure-Bad. Arzneimittelforschung 13 (1963) 329-333

Thiel, K.-D.; Klöcking, R.; Schweizer, H.; Sprößig, M.: Untersuchungen in vitro zur antiviralen Aktivität von Ammoniumhumat gegenüber Herpes simplex-Virus Typ 1 und 22. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 239 (1977) 304-321

Thunberg, L.; Bäckström, G.; Grundberg H.; Riesenfeld, J.; Lindahl, U.: The molecular size of the antithrombin-binding sequence in heparin. FEBS Lett. 117 (1980) 203-206

Tollefsen, D. M.; Pestka, C. A.; Monafu, W. J.: Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. J. Biol. Chem. 258 (1983) 6713-6716

Tseng, W. P.: Blackfoot disease in Taiwan: a 30-year follow-up study. Angiologie (1989) 547-557

Varadi, K.; Rosing, J.; Tans, G.; Pabinger, I.; Keil, B.; Schwarz, H. P.: Factor V enhances the cofactor function of protein S in the APC-mediated inactivation of factor VIII: Influence of the factor VR^{506Q} Mutation. Thromb. Haemost. 76 (2) (1996) 208-214

Villanueva, G. B.: Predictions of the secondary structure of antithrombin III and the location of the heparin-binding site. J. Biol. Chem. 259 (1984) 2531-2536

Virchow, R.: Thrombose und Embolie (1846-1856). In: Klassiker der Medizin. Leipzig, 1910, S. 7-8

Wada, T.; Chirachanchai, S.; Izawa, N.; Inaki, Y.; Takemoto, K.: Synthesis of sulfated hyaluronan derivatives containing nucleic acid bases. Chem. Lett. (1994) 2027-2030

Wakil, M.: Über die Behandlung natürlicher Huminstoffe als ϵ -Donator-Acceptor-Komplexe und die Konsequenzen für bestehende Modellvorstellungen. Dissertation, Universität Göttingen. (1972)

Walenga, J. M.; Hoppensteadt, D.; Fareed, J.: Non-heparin glycosaminoglycan-derived drugs: a biochemical and pharmacologic perspective. *Semin. Thromb. Haemost.* 17 Suppl. 2 (1991) 137-142

Walther, H.: Klinische Erfahrungen bei der Behandlung der Rheumatoid Arthritis mit Moorpaste. In: *Torf in der Medizin* (Hrsg.: Plötner, G.; Weber, U.) Symposium der Kommission VI der IMTG, Bad Elster, 1981, S. 358-362

Wang, C. T.: Concentration of arsenic, selenium, zink, iron and copper in the urine of blackfoot disease patients at different clinical stages. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 34 (1996) 493-497

Weitz, J.; Hudoda, M.; Masel, D.; Maraganore, J.; Hirsch, J.: Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III independent inhibitors. *J. Clin. Invest.* 86 (1990) 685-691

Witt, I.: Biochemie und Funktion des Protein C-Systems. In: *Protein C- Klinische Bedeutung und Bestimmungsmethoden* (Hrsg.: Witt, I.; Zimmer, E.) Berlin, New York: Walter de Gruyter, 1986, S. 1-15

Wohlrab, W.; Helbig, B.; Klöcking, R.; Sprößig, M.: Penetrationskinetik eines potentiellen Virustaticums in die menschliche Haut. *Pharmazie* 39 (1984) 562-564

Wu, H. L.; Yang, W. H.; Wang, M. Y.; Shi, G. Y.: Impaired fibrinolysis in patients with blackfoot disease. *Thromb. Res.* 72 (1993) 211-218

Yang, H. L.; Chiu, H. C.; Lu, F. J.: Effects of humic acid on the viability and coagulant properties of human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Hematol.* 51 (1996) 200-206

Yang, H. L.; Hseu, Y. C.; Lu, F. J.; Tsai, H. D.: Humic acid reduces protein C-activating cofactor activity of thrombomodulin of human umbilical vein endothelial cells. *Br. J. Haematol.* (1998) 16-23

Yang, H. L.; Tu, S. C.; Lu, F. J.; Chiu, H. C.: Plasma protein C activity is enhanced by arsenic but inhibited by fluorescent humic acid associated with blackfoot disease. *Am. J. Hematol.* 45 (1994) 264-269

Yu, H. S.: Blackfoot disease and chronic arsenism in Southern Taiwan. *Int. J. Dermatol.* 23 (1984) 258-230

Zaribnicky, F.: Verwendung von Heilmoor in der Tiermedizin. Bericht über den Internationalen Kongress für universelle Moorforschung, Brüssel, Spa, 1958, S. 209-210

Ziechmann, W.: Chemische und physikalische Eigenschaften von Torfinhaltsstoffen und ihre Bedeutung für die Balneotherapie. In: *Moortherapie: Grundlagen und Anwendungen* (Hrsg.: Flaig, W.; Goecke, C.; Kauffels, W.) Wien, Berlin: Ueberreuter-Wissenschaftliche-Verlagsgesellschaft mbH, 1988, S. 146-152

Ziechmann, W.: Huminstoffe und ihre Wirkungen. In: *Spektrum Umwelt*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verl. GmbH, 1996, S. 14-28

Ziechmann, W.: Über die Elektronen-Donator-Acceptor-Eigenschaften von Huminstoffen. *Geoderma* 8 (1972) 111-131

Zsunshuj, V.; Tschén, P.; Njanzy, L.; Sjaona, T.: Untersuchungen des antiphlogistischen Effekts von Huminsäuren. In: *Torf in der Medizin* (Hrsg.: Plötner, G.; Weber, U.) Symposium der Kommission VI der IMTG, Bad Elster, 1981, S. 358-362

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Einfluss von sulftierten Hyaluronsäuren, natürlichen Huminsäuren und synthetischen Huminsäure-ähnlichen Polymeren auf das Gerinnungssystem
in vitro

unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. H.-P. Klöcking

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort angeführten Hilfsmittel und Literatur benutzt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Leipzig, den 30.05.2003

Erklärung

Die hier vorliegende Dissertation wurde seit Oktober 2001 von Frau PD Dr. E. Krause, Institut für Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, als Mitglied der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg betreut.

Leipzig, den 30.05.2003

Lebenslauf

Name:	Nicolle Mahr
Geburtstag:	07.11.1974
Geburtsort:	Sonneberg
Familienstand:	ledig
Anschrift:	Heubischer Ortsstraße 59 96524 Föritz/OT Heubisch
09/1981 – 07/1991	Polytechnische Oberschule in Mupperg
09/1991 – 06/1993	2. Staatliches Gymnasium in Sonneberg
06/1993	Abitur
01/1994 – 11/1999	Studium der Pharmazie an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
03.11.1999	II. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
12/1999 – 05/2000	Praktikum am Institut für Pharmakologie und Toxikologie Bereich Erfurt der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Betreuung durch Prof. Dr. Dr. H.-P. Klöcking
06/2000 – 11/2000	Pharmaziepraktikantin in einer Apotheke in Jena
15.12.2000	III. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
03.01.2001	Erteilung der Approbation als Apothekerin
seit 15.01.2001	stellvertretende Apothekenleiterin der Flora Apotheke in Je- na (seit 09/2002 im gesetzl. Mutterschutzurlaub/Elternzeit)
05/2000 – 05/2003	Arbeit an der Promotion

Leipzig, den 30.05.2003

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. H.-P. Klöcking, Institut für Pharmakologie und Toxikologie/Bereich Erfurt der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für die Vergabe dieses interessanten Themas sowie für die intensive Betreuung und die wertvollen Ratschläge während der Arbeiten an der Dissertation.

Frau Prof. Dr. R. Klöcking, Institut für Antivirale Chemotherapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena/Bereich Erfurt danke ich für die Hinweise zur Durchführung der Versuche und für hilfreiche Anmerkungen bzw. Anregungen zur Diskussion der Untersuchungsergebnisse. Frau PD Dr. E. Krause, Institut für Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich ebenfalls für die Betreuung der Arbeit.

Frau St. Möller vom Hans-Knöll Institut in Jena, Frau Dr. M. Bubner vom Institut für Radiochemie des Forschungszentrums Rossendorf und den Mitarbeitern des Institutes für Anorganische und Angewandte Chemie der Universität Hamburg danke ich für die Bereitstellung der Prüfsubstanzen und die fachliche Beratung.

Herrn St. Lohse und Herrn Stephan Kaufmann danke ich v.a. für ihre Unterstützung bei Problemen mit der elektronischen Datenverarbeitung.

Außerdem danke ich Dr. H.-P. Engelke von der Firma Haemochrom Diagnostica GmbH Essen für die hilfreichen Anregungen zur Versuchsdurchführung und den Mitarbeitern der Flora Apotheke in Jena, welche die Durchführung mit ermöglicht und unterstützt haben. Für ihre Hilfe bei meinen Literaturrecherchen danke ich Frau B. Thiele, Bibliothekarin in der Universitäts- und Landesbibliothek der FSU Jena, Außenstelle Erfurt.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Ohne ihre tatkräftige Hilfe, ihre stetige Motivation und Geduld wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.