

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 397-399

Plasminogengehalt in Human-Fibrinogen-Präparationen verschiedener Hersteller¹⁾

Von H. Auel und M. Martin

Aus der Aggertalklinik, Klinik für Gefäßerkrankungen (Chefarzt: Prof. Dr. W. Schoop) Engelskirchen bei Köln

(Eingegangen am 3. Januar/1. März 1977)

Zusammenfassung: Im Rahmen der fibrinolytischen Therapie interessierte der Plasminogengehalt verschiedener Handelsfibrinogene. Mit Hilfe der semiquantitativen Plasminogenbestimmung war diese Frage beantwortbar. Der ermittelte Plasminogengehalt in den Fibrinogenpräparationen wurde der Plasminogenkonzentration in gepooltem Human-Mischplasma gegenübergestellt. Die Relation von Plasminogen zu Fibrinogen betrug im Vergleich zu Humanplasma für Fibrinogen Immuno 134%, für Fibrinogen Behringwerke 13,7% und für Fibrinogen Kabi 2,71%.

Plasminogen content of human fibrinogen preparations from different sources

Summary: In connection with fibrinolytic therapy, it is of interest to know how much plasminogen is contained in different commercially available fibrinogen preparations. This problem was investigated with the aid of a semi-quantitative determination of plasminogen. The determined plasminogen content was compared with plasminogen concentration of pooled human plasma. Using the ratio of plasminogen to fibrinogen, and fixing the plasminogen content of human plasma arbitrarily at 100%, the proportion of plasminogen in fibrinogen from Immuno is 134%, fibrinogen from Behringwerke contains 13.7%, and Kabi-fibrinogen contains 2.71% plasminogen.

Einführung

Human-Fibrinogen dient zur Substitution der Fibrinogenfraktion im menschlichen Blut. Eignet sich z. B. im Rahmen einer fibrinolytischen Therapie bei stark erniedrigter Fibrinogenkonzentration eine Blutung, so stellt dies eine klare Indikation zur Gabe von Human-Fibrinogen dar. Von großer klinischer Bedeutung ist hierbei die Frage, wieviel Plasminogen mit dem Fibrinogen zugeführt wird. Bei nur kurzzeitiger Unterbrechung der Streptokinaseinfusion treffen die noch zirkulierenden Streptokinasequantitäten auf die frisch infundierte, plasminogenhaltige Fibrinogenpräparation. Unter dieser Bedingung kann es zur Umwandlung in Plasmin mit nachfolgender Fibrinogenolyse und Auftreten unerwünschter gerinnungshemmender Fibrinogenspaltprodukte kommen.

Es ergab sich somit die klinisch wichtige Frage, wieviel Plasminogen einzelnen kommerziell angebotenen Human-Fibrinogen-Präparationen anhaftet. Bei hohem Plasmino-

gengehalt wäre nach Fibrinogen-Infusion mit einer erheblichen unerwünschten Plasminämie zu rechnen.

In der folgenden Studie wird der Plasminogengehalt in Human-Fibrinogen-Präparaten verschiedener Hersteller ermittelt und auf den Fibrinogengehalt der einzelnen Proben bezogen.

Material und Methode

Plasminogen-Bestimmung

Reagenzien und technische Ausrüstung

1. Rinderfibrinogen, Fläschchen zu 60 mg, Behringwerke AG, Marburg/Lahn.
2. Test-Streptokinase, Fläschchen zu 5000 E, Behringwerke AG, Marburg/Lahn.
3. Thrombin, Ampulle zu 16 E, Antithrombin-Reagenz, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach/Baden.
4. Michaelispuffer pH 7,4 und pH 7,8 (Ionenstärke 0,1).
5. Citrat-Mischplasma (9 Teile Blut, 1 Teil Natriumcitrat 3,8%, zentrifugiert bei 2500 U/min für 10 min) von 30 Probanden (Patienten mit statischen Beschwerden).

¹⁾ Mit Unterstützung des Vereins zur Bekämpfung der Gefäßerkrankheiten e. V., D-5250 Engelskirchen, Aggertalklinik.

6. Human-Fibrinogen der Deutschen Kabi GmbH, München, Behringwerke AG, Marburg/Lahn, Immuno GmbH, Heidelberg.
7. Thrombelastographie-Ausrüstung nach *Hartert* (1), Fa. Hellige, Freiburg/Breisgau.

Methodische Einzelheiten zur Plasminogen-Bestimmung nach Martin (2, 3)

Der Inhalt eines Fläschchens Rinderfibrinogen wurde in ein Reagenzglas überführt, mit 6,0 ml *Michaelis*-Puffer pH 7,8 überschichtet und zur Lösung für 30 Minuten im Wasserbad bei 37 °C belassen. Das so gelöste Rinderfibrinogen wurde vor Gebrauch filtriert. Ferner kamen 2 Fläschchen Test-Streptokinase in je 0,625 ml *Michaelis*-Puffer pH 7,4 und 1 Ampulle Thrombin in 1,0 ml *Michaelis*-Puffer pH 7,4 zur Auflösung.

Der Inhalt einer Infusionsflasche mit 1 g Human-Fibrinogen wurde in 50 ml Lösungsmittel (dest. Wasser bzw. physiol. NaCl-Lösung) aufgenommen; es resultierte eine Konzentration von 1000 mg Fibrinogen pro 50 ml Lösungsmittel (= 20 g/l). Durch eine weitere 1:10 Verdünnung ergab sich eine „Firmen-deklarierte Fibrinogenkonzentration“ von 2 g/l.

Citrat-Mischplasma von 30 Probanden wurde 1:40 und 1:4000 mit *Michaelis*-Puffer pH 7,4 verdünnt. Die Verdünnung 1:40 entsprach einer Plasminogenkonzentration von 100% der Norm, die Verdünnung 1:4000 einer Plasminogenkonzentration von 1% der Norm.

0,10 ml Rinderfibrinogenlösung
0,05 ml Plasmaverdünnung
0,05 ml Streptokinase-Lösung
0,05 ml Thrombinlösung

wurden je zweimal (= Doppelbestimmung) in einer Thrombelastographie-Küvette zur Gerinnung gebracht und die Lysezeit dieses Testgerinnsels registriert. Da bis auf die Plasma-verdünnung alle Komponenten des Testgerinnsels standardisiert waren, hing die Lysezeit allein von der vorhandenen Plasminogenkonzentration im Plasma ab (hohe Plasminogenkonzentrationen – kurze Lysezeiten; niedrige Plasminogenkonzentrationen – lange Lysezeiten). Die erhaltenen spindelförmigen Thrombelastographie-Aufzeichnungen wurden ausgemessen, wobei die Strecke zwischen Auseinanderweichen der Branchen um 1 mm bis zur Wiederannäherung auf 1 mm bestimmt wurde. Die ermittelten Werte in mm, dividiert durch 2 ergaben die Lysezeiten in Minuten. Das Eintragen der erhaltenen Werte erfolgte in doppelt-logarithmiertem Papier, wobei auf der Abszisse der Verdünnungsgrad in Prozent und auf der Ordinate die Lysezeit in Minuten erschienen. Die Verbindung der Werte miteinander ergab die Standardgerade (Abb. 1).

Die einzelnen, wie oben beschrieben hergestellten Fibrinogenlösungen (2 g/l) mit unbekanntem Plasminogengehalt wurden mit *Michaelis*-Puffer pH 7,4 im Verhältnis 1:40 verdünnt und in

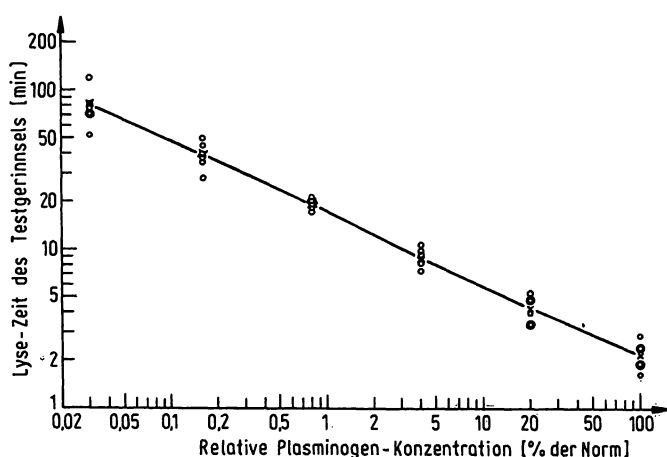


Abb. 1. Standardgerade zur Plasminogen-Bestimmung im doppelt-logarithmischen System. Auf der Abszisse erfolgte die Eintragung der relativen Plasminogenkonzentrationen

das Standardgerinnsel eingebracht (Doppelbestimmungen aus einer Verdünnung). Die erhaltenen, auf dem Thrombelastogramm abzulesenden Lysezeiten in Minuten wurden an Hand der zuvor erstellten Standardkurve in Plasminogen umgerechnet.

Fibrinogenbestimmung

Um den gravimetrischen Fibrinogengehalt der einzelnen Fibrinogenpräparate zu erhalten, wurde die Methode nach *Gram* (4) gewählt. Hierzu wurde der Flascheninhalt (1 g Fibrinogen lt. Firmenangabe) in 50 ml Medium gelöst (d. h. eine firmen-deklarierte Fibrinogenkonzentration von 20 g/l hergestellt), dann nochmals 1:10 weiter verdünnt und in dieser Lösung der Fibrinogengehalt mit der gravimetrischen Methode überprüft. 2,0 ml Fibrinogenlösung (2 g/l) wurden mit 0,1 ml Thrombin (50 NIH-E/ml) zum Gerinnen gebracht, 2 h im Wasserbad bei 37 °C belassen, anschließend mit physiol. NaCl-Lösung und dest. Wasser ausgewaschen und in absol. Alkohol und Äther entwässert. Zur vollkommenen Trocknung wurde das Fibrin für 12 h im Brutschrank bei 37 °C aufbewahrt und dann auf einer Analysenwaage ausgewogen.

Ergebnisse

Fibrinogengehalt in 4 Handelsfibrinogenlösungen

Die gravimetrisch bestimmte Fibrinogenkonzentration wurde in Lösungen bestimmt, die entsprechend den Angaben der Hersteller eine Konzentration von 2 g/l enthielten. Die ermittelten Werte sind in der Tabelle 1, Spalte II, zu entnehmen.

Fibrinogenkonzentration von gepooltem Humanplasma

In einem Mischplasma von 30 Probanden wurde mit Hilfe der gravimetrischen Methode eine Fibrinogenkonzentration von 3,55 g/l ermittelt.

Plasminogengehalt einer firmendeklarierten Fibrinogenlösung (2 g/l)

Plasminogengehalt von Human-Fibrinogen Kabi

Human-Fibrinogenlösungen vier verschiedener Chargen wurden ausgetestet. Die ermittelten Plasminogenwerte bei deklarierten Fibrinogenkonzentrationen von 2 g/l sind in der Tabelle 1, Spalte I, zu entnehmen.

Plasminogengehalt von Human-Fibrinogen Behring

Human-Fibrinogenlösungen fünf verschiedener Chargen wurden ausgetestet. Die ermittelten Plasminogenwerte bei deklarierten Fibrinogenkonzentrationen von 2 g/l sind in der Tabelle 1, Spalte I, zu entnehmen.

Plasminogengehalt von Human-Fibrinogen Immuno

Human-Fibrinogenlösungen vier verschiedener Chargen wurden ausgetestet. Die ermittelten Plasminogenwerte bei deklarierten Fibrinogenkonzentrationen von 2 g/l sind in der Tabelle 1, Spalte I, zu entnehmen.

Plasminogengehalt in kommerziellen Humanfibrinogen-Lösungen, bezogen auf eine normale Plasma-Fibrinogenkonzentration von 3,55 g/l.

Um die Plasminogenkonzentration in den Fibrinogenlösungen mit jener im Humanplasma korrelieren zu

Tab. 1. Plasminogengehalt verschiedener Chargen von Fibrinogenpräparaten dreier Hersteller, bezogen auf Fibrinogen. Der Plasminogengehalt eines Mischplasmas (n = 30) mit 3,55 g/l Fibrinogen wurde gleich 100 % gesetzt.

Chargen	Plasminogengehalt in deklarierten Fibrinogenlösungen von 2 g/l	Gravimetrisch ermittelte Fibrinogenkonzentration in deklarierten Fibrinogenlösungen von 2 g/l	Umgerechneter Plasminogengehalt für eine Fibrinogenkonzentration von 3,55 g/l
Kabi			
7065 33492	0,98%	2,00 g/l	1,74 %
7045 33455	1,80%	1,95 g/l	3,28 %
7055 33482	1,45%	2,10 g/l	2,45 %
7045 32677	2,00%	2,10 g/l	3,38 %
			M = 2,71 %
Behring			
1152	10,50%	2,40 g/l	15,5 %
1056	10,50%	2,60 g/l	14,3 %
1156	8,00%	2,30 g/l	12,3 %
1151	8,50%	2,25 g/l	13,4 %
10510	8,50%	2,30 g/l	13,1 %
			M = 13,7 %
Immuno			
040 275	86,0 %	2,38 g/l	128,2 %
043 474	70,0 %	2,44 g/l	101,8 %
044 574	100,0 %	2,50 g/l	142,0 %
043 775	100,0 %	2,16 g/l	164,3 %
			M = 134,0 %

können, bezogen wir alle Plasminogenkonzentrationen auf den gravimetrisch ermittelten Fibrinogengehalt eines gepoolten Humanplasmas (3,55 g/l) und setzten dessen Plasminogengehalt gleich 100 %.

Beispiel: Im Versuch wurde ermittelt, daß einer Fibrinogenlösung von 2 g/l 0,98 % Plasminogen anhaftete. Bezogen auf einen normalen Plasma-Fibrinogengehalt von 3,55 g/l errechnet sich folgender Plasminogenwert:

$$\frac{0,98\%}{2,00 \text{ g/l}} = \frac{x\%}{3,55 \text{ g/l}}$$

$$x = 1,74$$

Literatur

- Hartert, H. (1951), Z. Gesamte Exp. Med. 117, 189–203.
- Martin, M. (1969), Thromb. Diath. Haemorrh. 22, 121–137.

Eine Fibrinogenlösung von 3,55 g/l enthielt somit 1,74 % Plasminogen (siehe Tabelle).

Besprechung und Schlußfolgerung

Im Rahmen der fibrinolytischen Therapie war von Interesse, wieviel Plasminogen verschiedenen Handels-Fibrinogenen anhaftete.

Mit Hilfe der semiquantitativen Plasminogenbestimmung wurde versucht, diese Frage zu beantworten. Die hier verwendete Methode beruhte auf der Lysezeitbestimmung eines Standardgerinnsels, welches definierte Mengen von Rinderfibrin, Rinderplasminogen, Streptokinase, Humanplasminogen und Thrombin enthielt. Die gemessene Zeit von der Gerinnselbildung bis zur Auflösung war dabei ein reziprokes Maß für den Plasminogengehalt der zugeführten Lösung.

Der Plasminogengehalt von Handelsfibrinogenen wurde mit dem im menschlichen Plasma verglichen. Es zeigte sich, daß Fibrinogen Immuno mit 134 % den höchsten Plasminogenanteil enthielt. Im Vergleich zu Mischplasma mit einer Plasminogenkonzentration von 100 % bedeutet dies, daß Plasminogen und Fibrinogen ohne Trennung voneinander im Herstellungsprozeß gefällt wurden. Im Gegensatz hierzu war Fibrinogen Kabi annähernd plasminogenfrei. Es enthielt lediglich einen Plasminogenanteil von 2,71 %.

Fibrinogen Behring stand mit einer Plasminogenkonzentration von 13,7 % etwa in der Mitte zwischen diesen beiden Extremen.

Aus den Untersuchungen ergibt sich, daß zur Blutstillung während einer fibrinolytischen Therapie mit Streptokinase Fibrinogen Kabi am besten geeignet ist. Hier dürfte am wenigsten mit einer erneuten Plasminbildung durch den Kontakt von Plasminogen und Streptokinase gerechnet werden.

- Martin, M. (1976), Thrombos. Haemostas. 36, 551–565.
- Gram, H. C. (1921), J. Biol. Chem. 49, 279–295.

H. Auel und Priv.-Doz. Dr. M. Martin
D-5250 Engelskirchen
Aggertalklinik

