

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung von Streptokinase (SK) und Urokinase (UK) auf Pferdeblutgerinnung wurde mit Hilfe von zwei *in-vitro*-Systemen (Thrombelastographie und CHANDLER loop) untersucht.

### 1. Thrombelastographie

Die Untersuchungen im Thrombelastographen wurden mit jeweils 11 rekalkifizierten Zitratblutproben von insgesamt 16 gesunden Pferden durchgeführt. Zur Blutprobe in der Thrombelastographieküvette (310  $\mu$ l) wurden 50  $\mu$ l physiologische Kochsalzlösung (Kontrolle) bzw. steigende Streptokinase- (2175 IE, 4350 IE, 6525 IE, 8700 IE, 10.875 IE, 13.050 IE, 15.225 IE, 17.400 IE, 19.575 IE und 21.750 IE SK/ml Plasma) oder Urokinasekonzentrationen (348 IE, 522 IE, 696 IE, 870 IE, 1044 IE, 1218 IE, 1392 IE und 1566 IE UK/ml Plasma) jeweils in 50  $\mu$ l physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt und die Auswirkungen der Medikamente auf die Parameter des Thrombelastogramms untersucht. Streptokinase führte mit steigender Konzentration zu einer Verkürzung des Parameters f (Zeit vom Erreichen der halben Maximalamplitude bis zum Wiedererreichen der halben Maximalamplitude des Thrombelastogramms) von  $> 240$  min (Kontrolle) bis auf maximal  $44,7 \pm 14,4$  min (17.400 IE SK/ml Plasma). Steigende Urokinasekonzentrationen führten zu einer Verkürzung des Parameters f von  $> 240$  min (Kontrolle) bis auf  $6,3 \pm 4,8$  min bei der Konzentration 1566 IE UK/ml Plasma. Die Reaktionszeit (= Zeit von der Rekalkifizierung bis zum Erreichen einer Amplitude von 1 mm) nahm bei den Versuchsansätzen mit Streptokinase mit steigenden Konzentrationen von  $7,2 \pm 0,94$  min (Kontrolle) auf  $8,2 \pm 2,1$  min bei Verwendung von 21.750 IE SK/ml Plasma zu. Die Versuchsansätze mit Urokinase ließen keinen signifikanten Einfluß des Medikaments auf die Reaktionszeit erkennen. Die Maximalamplitude (größter Abstand der Kurvenschenkel des Thrombelastogramms) nahm mit steigenden Streptokinasekonzentrationen im Versuchsansatz von  $21,1 \pm 3,3$  mm (Kontrolle) auf  $16,7 \pm 4,3$  mm (21.750 IE SK/ml Plasma) ab. Bei den Versuchsansätzen mit Urokinase verringerte sich die Maximalamplitude mit steigenden Konzentrationen von  $21,1 \pm 3,3$  mm (Kontrolle) auf  $5,3 \pm 2,5$  mm bei 1566 IE UK/ml Plasma.

## 2. CHANDLER loop

In einem rotierenden Schlauchring (CHANDLER loop) wurden unter Zusatz von  $10 \mu\text{l}^{125}\text{J}$  markiertem Fibrinogen (Aktivität ca. 200.000 Becquerel) Pferdeblutgerinnsel aus rekalkifiziertem Zitratblut (1 ml) von 4 gesunden Probanden mit normalem Gerinnungsstatus hergestellt. Die Gerinnsel wurden danach unter Zugabe von in physiologischer Kochsalzlösung gelöster Streptokinase oder Urokinase bzw. von aliquoten Mengen physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle) für 24 h in autologem Zitratplasma rotiert. Bei den Untersuchungen mit Streptokinase wurden nach 10 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h Plasmaproben ( $100 \mu\text{l}$ ) zur Bestimmung der Radioaktivität im  $\gamma$ -Counter entnommen. Der Anstieg der Plasmaradioaktivität wurde als Maß für die Gerinnselauflösung angesehen. Bei den Untersuchungen mit Urokinase wurden zusätzlich nach 20 min, 40 min und 1 h Proben entnommen. Streptokinase wurde mit Konzentrationen von 5000 IE, 10.000 IE, 15.000 IE und 20.000 IE SK/ml Plasma in der CHANDLER loop untersucht. Die Plasmaradioaktivität lag nach 10 min im Mittel bei  $0,82 \pm 0,09$  % der Gerinnselanfangsradioaktivität und stieg nach 6 h auf  $5,2 \pm 1,53$  % (5000 IE),  $5,58 \pm 1,58$  % (10.000 IE),  $9,89 \pm 1,52$  % (15.000 IE) bzw. auf  $9,19 \pm 1,57$  % (20.000 IE) der Gerinnselanfangsradioaktivität an. Die Steigerung der Lyserate war im Vergleich zur Kontrolle ( $2,7 \pm 0,06$  %) bei allen Konzentrationen signifikant ( $p < 0,05$ ). Nach 4 h war der Anstieg der Plasmaradioaktivität bei den Versuchsansätzen mit den Konzentrationen 15.000 IE und 20.000 IE SK signifikant höher als bei den Kontrollversuchen und nach 6 h Versuchsdauer signifikant höher als bei der Konzentration 5000 IE SK/ml Plasma. Zwischen den Konzentrationen 15.000 IE und 20.000 IE SK/ml Plasma bestand zu keinem ausgewerteten Meßzeitpunkt ein signifikanter Unterschied. Nach 24 h wurden mit der Konzentration 15.000 IE maximal eine Gerinnselauflösung von  $36,56 \pm 21,00$  % und mit der Konzentration 20.000 IE Streptokinase  $54,87 \pm 31,78$  % erreicht. Die Urokinasekonzentrationen im Versuchsansatz betragen 250 IE, 500 IE, 750 IE und 1000 IE UK/ml Plasma. Nach 20 min war die Gerinnselauflösung bei den Versuchsansätzen mit der Konzentration 1000 IE UK/ml Plasma mit  $2,68 \pm 1,57$  % signifikant höher als bei der Kontrolle ( $0,67 \pm 0,31$  %) und allen anderen Urokinasekonzentrationen. Die Lyserate war mit Ausnahme der Konzentration 250 IE UK/ml Plasma bei allen anderen Konzentrationen nach 1 h ( $3,16 \pm 1,18$  %, 250 IE;  $8,44 \pm 5,91$  %, 500 IE;  $9,64 \pm 7,88$  %, 750 IE;  $23,86 \pm 4,17$  % 1000 IE) und bei jedem weiteren Meßzeitpunkt signifikant höher als die der Kontrolle ( $0,89 \pm 0,37$  %). Die Konzentration 250 IE zeigte keine signifikanten Unterschiede

zur Kontrolle. Die Gerinnselauflösungsrate der Versuchsansätze mit den Konzentrationen 500 IE und 750 IE UK/ml Plasma unterschieden sich zu keinem Meßzeitpunkt voneinander. Die Konzentration 500 IE UK/ml Plasma war die niedrigste wirksame Konzentration. Die Versuchsansätze mit der Konzentration 1000 IE UK/ml Plasma wiesen zu allen Meßzeitpunkten gegenüber den anderen Konzentrationen eine signifikant höhere Fibrinolyserate auf ( $p < 0,05$ ). Nach 40 min betrug die Lyserate bereits  $13,8 \pm 5,19 \%$  und stieg nach 24 h auf  $67,49 \pm 20,64 \%$  an.

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß mit beiden Fibrinolytika bei Pferdeblutgerinnsel *in vitro* eine Gerinnselauflösung erreicht werden kann. Jedoch variierte der fibrinolytische Effekt der Streptokinase interindividuell erheblich und trat erst nach einer längeren Latenzphase auf. Die Urokinasewirkung war demgegenüber bereits frühzeitig feststellbar und erreichte insgesamt eine höhere Fibrinolyserate als Streptokinase.

**In vitro effects of the fibrinolytic agents streptokinase and urokinase on clots of equine blood**

**7. SUMMARY**

The effects of streptokinase (SK) and urokinase (UK) on clots of equine blood have been studied, using 2 in vitro systems simulating physiological clot lysis, the thrombelastograph (HARTERT 1951) and the CHANDLER loop.

**1. Thrombelastography**

In the thrombelastographic studies, 22 recalcified citrated blood samples from 16 clinically healthy horses were used. 310  $\mu$ l of recalcified blood and 50  $\mu$ l of normal saline (control) or varying concentrations of streptokinase (2175 IU; 4350 IU; 6525 IU; 8700 IU; 10,875 IU; 13,050 IU; 15,225 IU; 17,400 IU; 19,575; and 21,750 IU of SK/ml of plasma) or urokinase (348 IE, 522 IU, 696 IU, 870 IU, 1044 IU, 1218 IU, 1392 IU, and 1566 IU of UK/ml of plasma) diluted in 50  $\mu$ l of normal saline were placed in each cylinder of the thrombelastograph, and curves were recorded for up to 240 min. Increasing concentrations of SK caused shortening of the fibrinolytic parameter f (time required to attain the half of the maximum amplitude of the thrombelastogram to reattain the half of the maximum amplitude, in minutes). The parameter f shortened from  $> 240$  min (control) to a minimum of  $44.7 \pm 14.4$  min when 17,400 IU of SK/ml of plasma were used. With increasing concentrations of UK, the parameter f shortened from  $> 240$  min (control) to  $6.3 \pm 4.8$  min when 1566 IU of UK/ml of plasma were used.

The reaction time (time required from recalcification to attain an amplitude of 1 mm in the thrombelastogram) increased with increasing concentrations of SK from  $7.2 \pm 0.94$  min (control) to  $8.2 \pm 2.1$  min, when 21,750 IU of SK were used. Using UK, no significant effects on the reaction time could be detected.

The maximum amplitude (maximum gap between both branches of the curve of the thrombelastogram) decreased with increasing concentrations of SK from  $21.1 \pm 3.3$  mm (control) to  $16.7 \pm 4.3$  mm when 21,750 IU of SK/ml of plasma were used. Increasing

concentrations of UK caused a decrease of the maximum amplitude from  $21,1 \pm 3,3$  mm (control) to  $5.3 \pm 2.5$  mm when 1566 IU of UK/ml of plasma were used.

## 2. CHANDLER loop

In a circular tube placed on a turntable, tilted to an angle of  $23^\circ$  and rotated at 15 rpm at  $37^\circ$ , artificial clots were produced using citrated equine blood which was drawn from 4 healthy horses with normal coagulograms. The blood samples were recalcified and x ml of the recalcified blood were mixed with  $10 \mu\text{l}$   $^{125}\text{J}$ -fibrinogen (200,000 Becquerel) and were allowed to clot in the CHANDLER loop. Portions of the clot were filled in a new tube containing autologous citrated plasma, the radioactivity was counted in a  $\gamma$ -counter and the clots were exposed to either SK, UK or normal saline (control) and rotated for 24 h. The increasing release of  $^{125}\text{J}$ -fibrin degradation products from the clot into the liquid phase was considered as a criterion for clot lysis and the radioactivity (cpm) was expressed as per cent of the initial total activity of the clot. In the experiments with SK, aliquots ( $100 \mu\text{l}$ ) of plasma were removed from the tube after 10 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, and 24 h for radioactive counting in the a liquid scintillator. In the experiments with UK, additional plasma samples were taken after 20 and 40 min, and after 1 h.

The following concentrations of SK/ml of plasma were tested in the CHANDLER loop: 5000 IU; 10,000 IU; 15,000 IU, and 20,000 IU. After 10 min, the mean radioactivity of plasma in the tube was  $0.82 \pm 0.09$  % of the initial total activity of the clot. After 6 h, the radioactivity increased to  $5.2 \pm 1.53$  % when 5000 IU of SK/ml of plasma were used, to  $5.58 \pm 1.58$  % with 10,000 IU of SK/ml of plasma, to  $9.89 \pm 1.52$  with 15,000 IU of SK/ml of plasma, and to  $9.19 \pm 1.57$  % with 20,000 IU of SK/ml of plasma. The increase of the radioactivity was significant with all tested concentrations of SK compared to the control value of  $2.7 \pm 0.06$  %. There were no statistically significant differences between the values attained with 15,000 IU and 20,000 IU of SK/ml of plasma at any of the other measuring points. After 24 h, the radioactivity was increased to  $36.56 \pm 21.00$  % when 15,000 IU of SK/ml of plasma were used and to  $54.87 \pm 31.78$  % when 20,000 IU of SK/ml of plasma were used.

The following concentrations of UK/ml of plasma were tested in the CHANDLER loop: 250 IU, 500 IU, 750 IU, and 1000 IU. After 20 min, the radioactivity was significantly increased to  $2.68 \pm 1.57$  % when 1000 IU of UK/ml of plasma were used compared to the

control value of  $0,67 \pm 0.31$  % and compared to values attained with all other concentrations of UK. After 1h, the radioactivity was significantly increased from  $0.89 \pm 0.37$  % to  $3.16 \pm 1.18$  % with 250 IU of UK, to  $8.44 \pm 5.91$  % with 500 IU of UK, to  $9.64 \pm 7.88$  % with 750 IU of UK, and to  $23.86 \pm 4.17$  % with 1000 IU of UK/ml of plasma. The increase was also significant at any of the other measuring points. However, there was no significant increase in radioactivity when 250 IU of UK/ml of plasma were used compared to the control value. 500 IU of UK/ml of plasma was the lowest effective concentration used in the test. There was no statistically significant difference in the increase of the radioactivity produced by 500 IU and 750 IU of UK/ml of plasma at any of the measuring points. In the experiments with 1000 IU of UK/ml of plasma, a significant increase in radioactivity was found compared to all other concentrations. After 40 min, the increase in radioactivity was  $13.8 \pm 5.19$  % and after 24 h the radioactivity was  $67.49 \pm 20,64$  % of the initial total activity of the clot.

The results of the present studies suggest that SK and UK are effective for lysis of clots from equine blood *in vitro*. However, the fibrinolytic effect of SK showed great interindividual variations and appeared only with a considerable delay. With UK, the fibrinolytic effect appeared more readily and was more effective than with SK.