

Zakład Chemii Ogólnej. Instytut Chemii Podstawowych. Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: doc. dr hab. Stanisław Biliński

Zakład Chemii. Wytwórnia Surowic i Szczepionek w Lublinie

Dyrektor: dr med. Marian Biernacki

Cezariusz CHOJNOWSKI, Jerzy ISKIERKO

Oznaczanie protrombiny w osoczu ludzkim i wołowym metodą dwustopniową Biggsa według modyfikacji własnej

Определение протромбина в плазме человека и крови

• двухступенчатым методом Биггса по собственной модификации

The Determination of Prothrombin in Human and Bovine Plasma by the Two-Stage Biggs's Method Modified by the Authors

Protrombina występuje w krwi, w limfie, w szpiku, w wysiękach, a w śladowych ilościach również w płynie mózgowo-rdzeniowym i w mleku (6). Dane odnośnie do zawartości protrombiny w osoczu krwi różnych zwierząt i człowieka są sprzeczne (8, 12). Według Nicola (6, 10, 11) najniższe stężenie protrombiny posiada osocze świnki morskiej, wyższe kolejno osocze psa, królika, kota, szczura, wołu i człowieka. Quick (15) i Witte (18, 19) twierdzą, że plazma szczura posiada 4—5 razy więcej protrombiny w ml niż plazma ludzka. Zdaniem Seegersa i współpr. (16, 17) stężenie protrombiny w plazmie ludzkiej wynosi około 20 mg %. Fantl (4, 5) podaje stężenie 10-krotnie niższe, bo zaledwie 2 mg %. Według Latałło (7) zawartość protrombiny w osoczu ludzkim oceniana jest na podstawie badań aktywności na 7—20 mg %. Według Seegersa (16, 18) zawartość protrombiny w plazmie ludzkiej i wołowej jest jednakowa i wynosi 210—260 j NIH/ml. Również Lanchantin (9) uważa, że zawartość protrombiny w normalnej plazmie ludzkiej wynosi 250 j NIH/ml. Natomiast Magnusson (9) określa zawartość protrombiny w normalnej zbiorczej plazmie ludzkiej na 140—150 j NIH w ml. Sprzeczności i rozbieżności występujące u cytowanych autorów skłoniły nas do podjęcia badań nad ilościowym oznaczaniem protrombiny w osoczu krwi (1). Do oznaczania protrombiny spośród wielu metod wybrano jako najbardziej odpowiednią metodę dwustopniową Biggsa (2, 3) wg Niewiarowskiego (13). Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń (1) stwierdzono jednak, że metoda ta ma wiele wad i niedociągnięć, w związku z czym opracowano własną modyfikację. Przedmiotem naszej pracy jest ilościowe oznaczenie zawartości protrombiny w osoczu ludzkim i wołowym w jednostkach NIH w oparciu o metodę dwustopniową Biggsa w modyfikacji własnej.

BADANIA WŁASNE

Materiały i metody

Jako substrat stosowano 0,25% roztwór fibrynogenu wołowego pozbawionego zanieczyszczeń protrombiną, trombiną i plazminą w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0. Do sporządzania roztworów używano handlowych preparatów fibrynogenu wołowego firmy BDH Chemicals Ltd Poole England oraz Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie. Fibrynogen zawieszano w buforze, ogrzewano na łaźni wodnej w temp. 30—37°C. przez 10—15 min. do całkowitego rozpuszczenia, często mieszając, po czym roztwór sączono przez bibułę Whatmann 1. W temperaturze pokojowej roztwory fibrynogenu były trwałe przez okres kilku godzin.

Jako źródła tromboplastyny używano szczepionki przeciw wścieklźnie produkcji Warszawskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek, standaryzowanej na świeżym normalnym szczawianowym osoczu ludzkim wg Niewiarowskiego (12, 14) o czasie protrombinowym około 15 sek. W części doświadczeń stosowano również handlowy preparat tromboplastyny firmy Hoffmann-La Roche Basel — Szwajcaria (stabilizowany roztwór tromboplastyny o czasie protrombinowym $11,5 \pm 1$ sek.). Preparaty tromboplastyny przechowywano w chłodni o temp. 4°. Do sporządzania standardowych roztworów trombiny używano wzorców trombiny wyprodukowanych przez Wytwórnę Surowic i Szczepionek w Lublinie w oparciu o oryginalny wzorec National Institute of Health Bethesda — USA (Lot Nr B 3; 5000 j NIH; 21,7 j NIH na mg).

Zawartość protrombiny w osoczu ludzkim i wołowym oznaczano metodą dwustopniową Biggsa wg Niewiarowskiego (13) w modyfikacji własnej przy pomocy testu krzepnięcia i wizualnej oceny powstawania skrzepu. Wyniki wyrażano w jednostkach NIH/ml roztworu w oparciu o krzywe standardowe uzyskane na podstawie wzorcowych roztworów trombiny. Czas krzepnięcia mierzono stoperem od momentu zmieszania substratu z trombiną do chwili pojawienia się skrzepu. Do 0,8 ml substratu dodawano 0,2 ml roztworu trombiny (standardu lub badanego konwertu). Pomiary przeprowadzano w probówkach szklanych o średnicy 8 mm i gładkiej nie porysowanej powierzchni. Oznaczenie czasu krzepnięcia przeprowadzano na łaźni wodnej z termoregulacją w temp. $37^\circ \pm 1^\circ$.

Szkoło laboratoryjne używane do oznaczeń poddawane było przed myciem działaniu 1 n NaOH przez okres co najmniej 1 godziny dla zinaktywowania ewentualnych śladów trombiny.

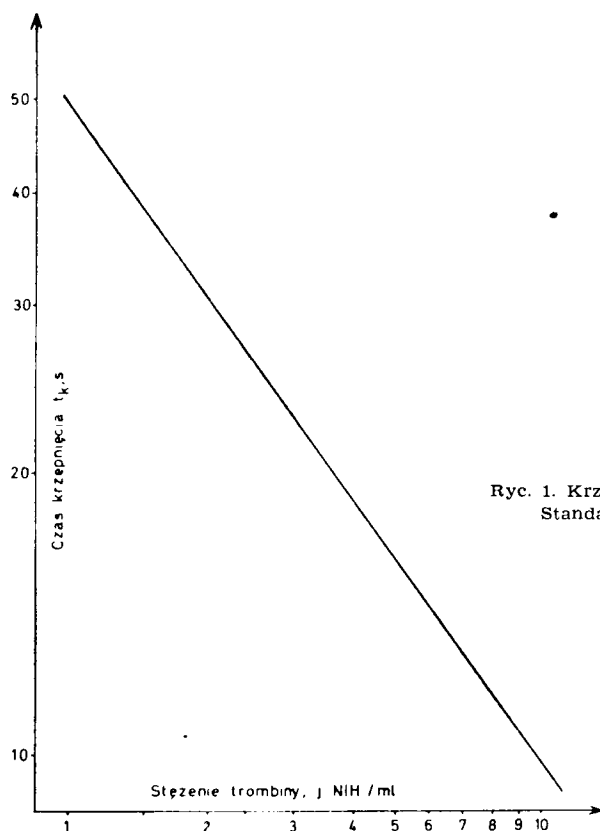
Oznaczanie protrombiny

Metoda polega na badaniu ilości trombiny powstającej w czasie konwersji protrombiny na trombinę w temperaturze pokojowej w rozcieńczonym i odwłóknionym osoczu, badanym w różnych odstępach czasu. Miernikiem zawartości protrombiny jest maksymalna ilość trombiny, którą uda się uzyskać w doświadczeniu.

Wykonanie oznaczenia

Krew ludzką i wołową pobierano do 0,1 M roztworu szczawianu potasowego w stosunku 9:1, dokładnie mieszano i wirowano na wirówce laboratoryjnej z chłodzeniem w temp. 10° przy 3 000 obr./min. przez 20 min. Osocze oddzielano od krwinek i umieszczano w lodówce w temp. 4°. Badanie prze-

prowadzano w czasie nie dłuższym niż 3 godz. od chwili pobrania krwi. Osocze rozcieńczano fizjologicznym roztworem chlorku sodowego w stosunku 1 : 10 (1 ml osocza + 9 ml 0,9% NaCl) lub 1 : 12,5 (1 ml osocza + 11,5 ml 0,9% NaCl) w probówce szklanej o pojemności 20 ml lub kolbce Erlenmeyera o pojemności 50 ml i odwłókniano przy pomocy niewielkich ilości trombiny. Do 10 ml rozcieńczonego osocza dodawano 0,2 ml roztworu trombiny o mianie 20 j NIH/ml czyli 4 j NIH i mieszano bagietką lub perełkami szklanymi w temperaturze pokojowej przez okres 10—15 min. W tym czasie powstawał włóknik gromadząc się na bagietce lub perełkach szklanych, a dodana trombina ulegała inaktywacji pod wpływem antytrombiny zawartej w osoczu. Rozcieńczone, odwłóknione osocze mieszano następnie z tromboplastyną i 1/40 M roztworem CaCl_2 w stosunku 1 : 1 : 1. Aktywację protrombiny, w odróżnieniu od innych autorów, przeprowadzano w temperaturze pokojowej, a nie w 37° . W czasie aktywacji protrombiny pobierano w określonych odstępach czasu (po 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11 i 12 min.) próbki konwertu i oznaczano czas krzepnięcia substratu. Na podstawie ustalonego minimalnego czasu krzepnięcia obliczano, drogą interpolacji z krzywej standardowej, maksymalne stężenie trombiny uzyskane w doświadczeniu, a po uwzględnieniu rozcieńczenia (3×10 lub $3 \times 12,5$) — ilość jednostek NIH protrombiny w 1 ml badanego osocza.



Ryc. 1. Krzywa standardowa trombiny
Standard curve of thrombin

Krzywą standardową otrzymywano w następujący sposób. Z wzorca trombiny (Standard Nr III — S. 10570; 250 j NIH w ampulce) przygotowywano standardowe roztwory trombiny o stężeniu 1,0, 2,5, 5,0 i 10,0 j NIH/ml na nośniku składającym się z równych objętości 0,9% roztworu NaCl, tromboplastyny i 1/40 M roztworu CaCl_2 . Standardowe roztwory trombiny testowano na 0,25% roztworze fibrynogenu wołowego w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0 i wykresiano krzywą standardową w układzie logarytmicznym, od-

Tab. 1. Zawartość protrombiny w osoczu ludzkim
Content of prothrombin in human plasma

Materiał	Rozcieńczenie	min. t_k substratu	Miano konwertu j NIH/ml	Miano osocza J NIH/ml
Osocze ludzkie X 1	1 : 12,5 : 3 = 1 : 37,5	21,5	3,3	124
Osocze ludzkie X 2	1 : 12,5 : 3 = 1 : 37,5	22,5	3,1	116
Osocze ludzkie X 3	1 : 12,5 : 3 = 1 : 37,5	20,5	3,5	131
Osocze ludzkie X 4	1 : 12,5 : 3 = 1 : 37,5	22,0	3,2	120
Osocze ludzkie X 5	1 : 12,5 : 3 = 1 : 37,5	21,0	3,4	128
Osocze ludzkie X 6	1 : 12,5 : 3 = 1 : 37,5	20,0	3,6	135
Osocze ludzkie X 7	1 : 12,5 : 3 = 1 : 37,5	20,5	3,5	131
Osocze ludzkie X 8	1 : 12,5 : 3 = 1 : 37,5	22,0	3,2	120
Osocze ludzkie X 9	1 : 12,5 : 3 = 1 : 37,5	20,0	3,6	135
Osocze ludzkie X 10	1 : 12,5 : 3 = 1 : 37,5	21,5	3,3	124
Średnia arytmetyczna $\bar{x}$			126	
Przedział zmienności (rozpiętość)			116—135	
Odchylenie standardowe			±6,6	
Współczynnik zmienności			±5,2%	

Tab. 2. Zawartość protrombiny w osoczu wołowym
Content of prothrombin in bovine plasma

Materiał	Rozcieńczenie	min. t_k substratu s	Miano konwertu j NIH/ml	Miano osocza j NIH/ml
Osocze wołowe TB 19	1 : 7,5 : 3 = 1 : 22,5	20,5	3,6	81
Osocze wołowe TB 19	1 : 10 : 3 = 1 : 30	24,5	2,7	81
Osocze wołowe TB 20	1 : 10 : 3 = 1 : 30	26,0	2,5	75
Osocze wołowe TB 20	1 : 12,5 : 3 = 1 : 37,5	30,0	2,1	79
Osocze wołowe TB 21	1 : 7,5 : 3 = 1 : 22,5	18,0	4,2	95
Osocze wołowe TB 21	1 : 10 : 3 = 1 : 30	22,0	3,2	96
Osocze wołowe TB 21	1 : 12,5 : 3 = 1 : 37,5	26,0	2,5	94
Osocze wołowe TB 22a	1 : 10 : 3 = 1 : 30	23,0	3,0	90
Osocze wołowe TB 22b	1 : 10 : 3 = 1 : 30	25,0	2,6	78
Osocze wołowe TB 23	1 : 10 : 3 = 1 : 30	22,0	3,2	96
Osocze wołowe TB 23	1 : 12,5 : 3 = 1 : 37,5	26,0	2,5	94
Osocze wołowe TB 24	1 : 10 : 3 = 1 : 30	22,5	3,1	93
Osocze wołowe TB 24	1 : 10 : 3 = 1 : 30	23,0	3,0	90
Osocze wołowe TB 24	1 : 12,5 : 3 = 1 : 37,5	27,5	2,3	86
Osocze wołowe TB 29	1 : 10 : 3 = 1 : 30	22,0	3,2	96
Osocze wołowe TB 30	1 : 10 : 3 = 1 : 30	23,0	2,9	87
Osocze wołowe TB 37	1 : 10 : 3 = 1 : 30	25,0	2,6	78
Średnia arytmetyczna $\bar{x}$			88	
Przedział zmienności (rozpiętość)			75—96	
Odchylenia standardowe			±7,5	
Współczynnik zmienności			±8,5	

mierząc na osi odciętych stężenie trombiny w j NIH/ml, na osi rzędnych — czas krzepnięcia substratu w sekundach. W układzie tym zamiast hiperboli otrzymywano linię prostą (ryc. 1). Krzywą standardową wykreślano powtórnie dla każdego nowego preparatu fibrynogenu lub tromboplastyny. Wyniki badań ilustrują tab. 1 i 2. Tab. 1 przedstawia zawartość protrombiny w osoczu ludzkim, tab. 2 — zawartość protrombiny w osoczu wołowym.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Wyniki badań pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- 1) zawartość protrombiny w osoczu ludzkim jest wyższa niż w osoczu wołowym,
- 2) osocze ludzkie zawiera 116—135, średnio 126 j NIH protrombiny/ml,
- 3) osocze wołowe zawiera 75—96, średnio 88 j NIH protrombiny/ml.

Uzyskane wyniki dotyczące zawartości protrombiny w osoczu ludzkim są zbliżone do rezultatów otrzymanych przez Magnussona (9), który podaje, że normalna zbiorcza plazma ludzka zawiera 140—150 j NIH protrombiny w ml. Badania własne nie potwierdzają sugestii Seegersa (16, 18), uważającego, że zawartość protrombiny w osoczu ludzkim i wołowym jest jednakowa i wynosi 210—260 j NIH/ml.

PIŚMIENICTWO

1. Chojnowski C., Iskierko J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, sectio D, 30, Lublin 30, 87—98, 1975.
2. Biggs R., Douglas A. G.: J. Clin. Pathol. 6, 15, 1953.
3. Biggs R. MacFarlane E. G.: Blood Coagulation and its Disorders, Oxford 1953; Human Blood Coagulation: and Ed. Oxford 1957.
4. Fantl P., w: Beller F.: Die Gerinnungsverhältnisse bei der Schwangeren und beim Neugeborenen, J. A. Barth, Leipzig 1975.
5. Gaertner H.: Krzepnięcie krwi. Fizjologia i patologia układu hemostatycznego, Kraków 1960.
6. Kaulla K. N., w: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Analyse, 10. Aufl., Bd. VI C, S. 315, 1966.
7. Latałło Z. S.: Post. Hig. Med. Dośw. 20, 657, 1966.
8. Latałło Z., Niewiarowska M., Niewiarowski S.: Układ krzepnięcia krwi zwierząt laboratoryjnych. Addendum, PWN, Warszawa 1962.
9. Magnusson S.: Ark. Kemi, 24, 355, 1954.
10. Nicola De P.: Blood 8, 947, 1953.
11. Nicola De P.: Schweiz. med. Wschr. 82, 355, 1954.
12. Niewiarowski S.: Krzepnięcie krwi. PZWL, Warszawa 1954 i 1960.
13. Niewiarowski S., w: Ławkowicz W., Krzemińska-Ławkowiczowa I. Diagnostyka Hematologiczna, PZWL, Warszawa 1960.
14. Niewiarowski S., w: Tulczyński M.: Metody laboratoryjne diagnostyki klinicznej. PZWL, 703. Warszawa 1962.
15. Quick A. J.: Am. J. Physiol. 132, 239, 1941.
16. Seegers W. H.: Prothrombin. Harvard University Press, Cambridge 1962.
17. Seegers W. H., Andrews E. B.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 79, 112, 1952.
18. Walsmann P., Markwardt P.: Pharmazie, 23, 597, 1968.
19. Witte S.: Acta Haematol., 10, 359, 1953.

Otrzymano 4 X 1974.

РЕЗЮМЕ

Авторы представляют подробный способ определения протромбина плазмы (крови) двухступенчатым методом Биггса по собственной модификации. На основании произведенных исследований, опираясь на формулу NIH протромбина, авторы пришли к выводу, что содержание протромбина в плазме (крови) человека выше, чем

■ плазме коровы. По их мнению плазма человека содержит около 125 единиц NIH протромбина/мл, а плазма коровы около 90 ед. NIH протромбина/мл.

S U M M A R Y

The authors present in detail a way of determining prothrombin in plasma useing the two — stage Bigg's method modified by themselves. On the basis of the research carried out, depending on the thrombin NIH type the authors came to the conclusion that the contents of prothrombin in human plasma is greater than in bovine plasma. According to them human plasma contains about 125 j NIH prothrombin/ml and whole bovine plasma only about 90 j NHI prothrombin/ml.