

Zakład Chemii Ogólnej, Instytut Chemii Podstawowych, Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik — doc. dr hab. Stanisław Billński  
Zakład Chemii, Wytwórna Surowic i Szczepionek w Lublinie  
Dyrektor — dr med. Marian Biernacki

Cezariusz CHOJNOWSKI, Jerzy ISKIERKO

### Badania nad oznaczaniem protrombiny w osoczu krwi metodą dwustopniową

Исследования по определению протромбина в плазме крови двуступенчатым методом

Research on the Indication of Prothrombin in Plasma by the Two — Stage Method

Do oznaczania protrombiny w osoczu krwi stosowana jest najczęściej jednostopniowa metoda *Quicka* (20, 22, 24, 25), polegająca na pomiarze czasu krzepnięcia osocza szczawianowego w obecności nadmiaru tromboplastyny i jonów wapnia, czyli określaniu tzw. czasu protrombinowego. Ze względu na swą prostotę oddaje ona cenne usługi w klinice przy badaniu skaz krwotocznych i leczeniu antykoagulantami, posiada jednak wiele wad. Metodę *Quicka* zmodyfikowaną przez *Borowską* i *Rowińską* (4); cechuje większa dokładność. Modyfikacja ta jednak, jak i szereg innych modyfikacji metody *Quicka* (2, 7, 18, 19, 34), pozostawia wiele do życzenia i nie nadaje się do dokładnych oznaczeń analitycznych. *Koller* i współpr. (9, 10, 23) oraz *Soulier* i *Larrieu* (20, 22, 27) oprócz tromboplastyny i chlorku wapniowego używają dodatkowo w charakterze substratu osocza adsorbowanego fosforanem wapniowym (10) lub siarczanem barowym (27), które jest źródłem fibrynogenu i czynnika V, oraz surowicy szczawianowej wolnej od protrombiny, która jest źródłem czynnika VII i X.

Przy pomocy metod jednostopniowych poziom protrombiny w badanym materiale porównuje się z poziomem protrombiny w osoczu prawidłowym i wyraża w sekundach lub tzw. wskaźniku, ewentualnie w procentach normy. Oznaczenie i wyrażenie aktywności protrombiny w jednostkach konwencjonalnych lub NIH\*) wymaga stosowania metody dwustopniowej. Oznaczanie protrombiny metodą dwustopniową opisali: *Warner* i współpr. (33), *Sternberger* (28), *Ware* i *Seegers* (32), *Kowarzyk* i współpr. (11, 12, 16), *Biggs* i współpr. (1, 2), *Niewiarowski* (20, 21), *Wagner* i współpr. (31), *Stormorken* i *Hjort* (29), *Schultze* (26) oraz *Magnusson* (17).

Po zapoznaniu się z wyżej wymienionymi metodami do przeprowadzenia badań metodycznych wybrano metodę dwustopniową *Biggsa* wg *Niewiarowskiego* (21). W przedstawionej pracy przebadano: 1) wpływ odwłókniania osocza na przebieg aktywacji protrombiny, 2) wpływ temperatury

\* NIH = National Institute of Health, Bethesda (USA).

na przebieg aktywacji protrombiny, 3) wpływ substratu oraz trombiny na czas krzepnięcia, 4) wpływ rozpuszczalnika standardu trombiny na czas krzepnięcia.

## BADANIA WŁASNE

### Materiały i metody

Jako substraty stosowano osocze wołowe szczawianowe adsorbowane siarczanem baru oraz 0,1—0,75% roztwory fibrynogenu wołowego. Fibrynogen preparowano z osocza wołowego wg metody własnej (5) opartej na metodach: Cohna i współpr. (6), Sznajder (30) oraz Blombäck i Blombäck (3). Uzyskane preparaty fibrynogenu zawierały 85—90% białka krzepnącego i były pozbawione protrombiny, trombiny i plazminy. Stosowano również handlowy preparat fibrynogenu wołowego firmy angielskiej BDH. Fibrynogen rozpuszczano w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0 lub 0,9% roztworze NaCl.

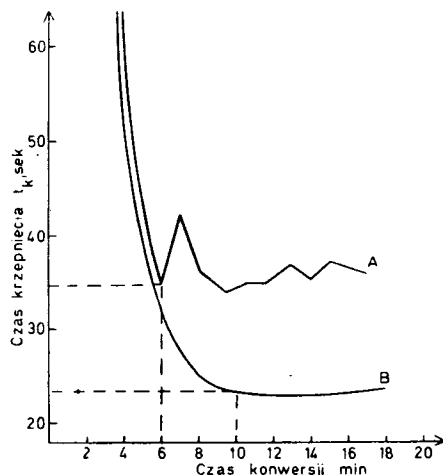
Jako źródła tromboplastyny używano szczepionki przeciw wścieklicznie produkcji Warszawskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek, standaryzowanej na świeżym normalnym szczawianowym osoczu ludzkim wg Niewiarowskiego (20, 22), o czasie protrombinowym około 15 sek. Stosowano również handlowy preparat tromboplastyny firmy Hoffmann-La Roche, Basel (Szwajcaria) o czasie protrombinowym  $11,5 \pm 1$  sek. Preparaty tromboplastyny przechowywano w chłodni o temp.  $4^{\circ}\text{C}$ . Standardowe roztwory trombiny sporządzano z wzorców trombiny wyprodukowanych przez Wytwórnę Surowic i Szczepionek w Lublinie w oparciu o oryginalny wzorzec National Institute of Health (USA). Stosowane wzorce zawierały 160 i 250 j NIH trombiny w ampułce.

Zawartość protrombiny w osoczu oznaczano dwustopniową metodą Biggsa wg Niewiarowskiego (21) oraz wg modyfikacji własnej. 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.  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ . Krzywe standardowe trombiny wykreślano w układzie logarytmicznym, odmierając na osi odciętych stężenie trombiny w jednostkach NIH/ml, na osi rzędnych — czas krzepnięcia w sekundach.

### 1. Wpływ odwłóknienia osocza na przebieg aktywacji protrombiny

Osocze wołowe szczawianowe rozcieńczano fizjologicznym roztworem chloru sodowego w stosunku 1 : 10 (1 ml osocza + 9 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 10 lub 20 j NIH/ml, czyli 2—4 j NIH i mieszano bagietką lub perełkami szklanymi w temperaturze pokojowej przez okres 10—15 min. W tym czasie powstawał włóknik gromadzący się na bagietce lub perełkach szklanych, a dodana trombina ulegała inaktywacji pod wpływem antytrombiny obecnej w osoczu. Rozcieńczone i odwłóknione osocze mieszano następnie z tromboplastyną i 1/40 M roztworem  $\text{CaCl}_2$  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 próbki konwertu i oznaczano czas krzepnięcia substratu (0,25% roztworu fibrynogenu w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0). Równoległe przeprowadzano analogiczne badanie z osoczem szczawianowym nieodwłóknionym. Wyniki doświadczeń przedstawiono graficznie na ryc. 1.

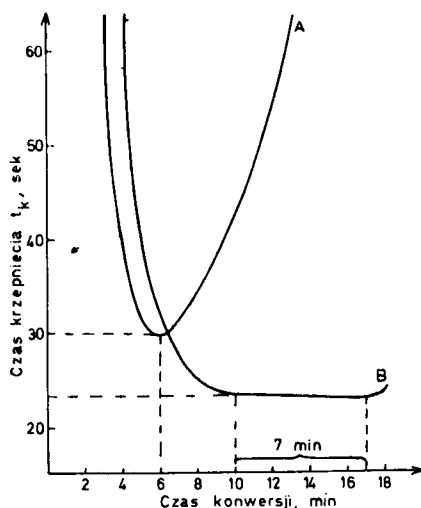


Ryc. 1. Wpływ odwłóknienia osocza na przebieg aktywacji protrombiny; A — osocze nieodwłókn.,  $t_k = 35$  sek., rozc. 1:10:3, konwersja w 20°, miano = 50 j NIH/ml; B — osocze odwłóknione,  $t_k = 23,5$  sek., rozc. 1:10:3, konwersja w 20°, miano = 87 j NIH/ml  
The effect of plasma defibrination upon the course of prothrombin activation; A — Plasma with fibres, dilution: 1:10:3, conversion in 20°, temp. of coagulation = 35 sec., denomination: 50 j NIH/ml; B — plasma cleared of fibres, dilution 1:10:3, conversion in 20°C, temp. of coagulation = 23,5 sec., denomination: 87 j NIH/ml

Na osi odciętych wykresu podano czas aktywacji protrombiny (w temperaturze pokojowej) w minutach, na osi rzędnych — czas krzepnięcia substratu w sekundach. Krzywa A obrazuje typowy przebieg aktywacji protrombiny w osoczu rozcieńczonym nieodwłóknionym, krzywa B — typowy przebieg aktywacji protrombiny w osoczu rozcieńczonym odwłóknionym. Jak widać minimalny czas krzepnięcia substratu, który jest miarą maksymalnego stężenia trombiny, jest wyraźnie niższy w przypadku odwłóknienia osocza niż minimalny czas krzepnięcia substratu w przypadku osocza nieodwłóknionego.

## 2. Wpływ temperatury na przebieg aktywacji protrombiny

Osocze wołowe rozcieńczano fizjologicznym roztworem chlorku sodowego w stosunku 1 : 10 i odwłókniano przy pomocy niewielkich ilości trombiny, jak opisano wyżej, a następnie mieszano z tromboplastyną i 1/40 M roztworem CaCl<sub>2</sub> w stosunku 1 : 1 : 1. Aktywację protrombiny przeprowadzano w temp. 37° oraz równoległe w temperaturze pokojowej. W czasie aktywacji protrombiny pobierano próbki konwertu i oznaczano czas krzepnięcia substratu (0,25% roztworu fibrynogenu w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0). Wyniki doświadczeń przedstawiono graficznie na ryc. 2.



Ryc. 2. Wpływ temperatury na przebieg aktywacji protrombiny; A — konwersja w 37°, osocze odwłókn., rozc.: 1:10:3, tk = 30 sek., miano: 63 j NIH/ml; B — konwersja w temp. pok., osocze odwłókn., rozc.: 1:10:3, tk = 23,5 sek., miano: 87 j NIH/ml

The effect of temperature upon the course of prothrombin activation; A — conversion in 37°, plasma cleared of fibres, dilution: 1:10:3, temp. of coagulation = 30 sec., denomination: 63 j NIH/ml; B — conversion in room temperature, plasma cleared of fibres, dilution: 1:10:3, temp. of coagulation = 23,5 sec., denomination: 87 j NIH/ml

Na osi odciętych wykresu podano czas aktywacji protrombiny (w temp. 37° lub temperaturze pokojowej) w minutach, na osi rzędnych — czas krzepnięcia substratu w sekundach. Krzywa A obrazuje typowy przebieg aktywacji protrombiny w osoczu rozcieńczonym odwłóknionym w temp. 37°, krzywa B — typowy przebieg aktywacji protrombiny w osoczu rozcieńczonym odwłóknionym w temperaturze pokojowej.

### 3. Wpływ substratu oraz stężenia trombiny na czas krzepnięcia

Niewiarowski (21) zaleca stosowanie w charakterze substratu 0,1% roztworu fibrynogenu lub osocza bezprotrombinowego. Wstępne badania własne wykazały, że osocze absorbowane siarczanem baru jest niestabilne, natomiast 0,1% roztwór fibrynogenu daje skrzep słaby, nietwały, często w czasie prób niezauważalny. Z tych względów w dalszych badaniach używano roztworów fibrynogenu o wyższym stężeniu: 0,25—0,75%.

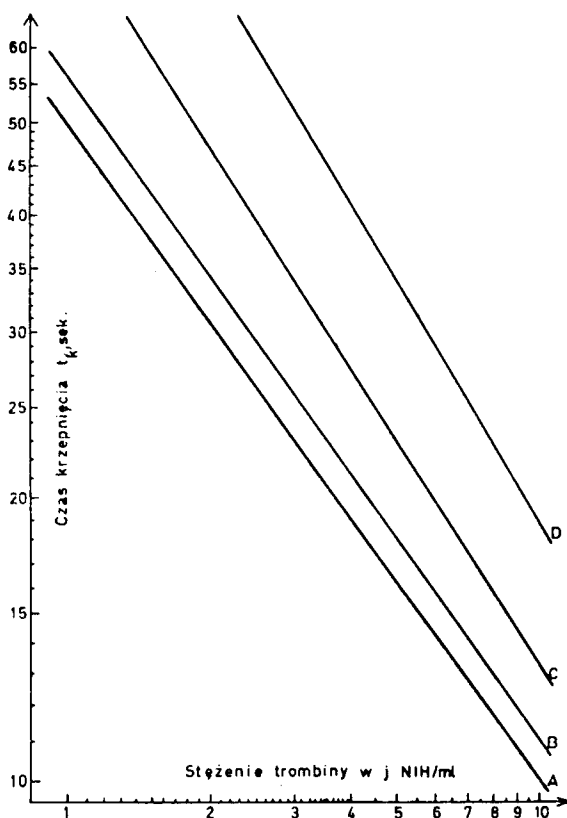
Wpływ stężenia fibrynogenu i trombiny na czas krzepnięcia obrazuje tab. 1 oraz ryc. 3 i 4. Doświadczenia przeprowadzono przy pomocy standardowych roztworów trombiny o mianie 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 i 20,0 j NIH/ml dla czterech różnych stężeń fibrynogenu (0,25%, 0,33%, 0,5% i 0,75%) przy stałych wartościach pH i siły jonowej. Fibrynogen rozpuszczano w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0. Standardowe roztwory trombiny przygotowywano w roztworze składającym się z równych objętości: 0,9% roztworu NaCl, tromboplastyny i 1/40 M roztworu CaCl<sub>2</sub>. Na osi odciętych wykresów odłożono stężenie trombiny w j NIH/ml (ryc. 3) lub stężenie fibrynogenu w procentach (ryc. 4), na osi rzędnych — czas krzepnięcia substratu w sekundach (t<sub>k</sub>). Za-

Tab. 1. Wpływ stężenia enzymu i substratu na czas trombinowy  
The effect of enzyme and substratum concentration on the thrombin time

Stężenie trombiny j NIH/ml	Stężenie fibrynogenu			
	A	B	C	D
	0,25%	0,35%	0,50%	0,75%
1,0	50,0 sek.	56,4 sek.	80,0 sek.	130 sek.
2,5	25,9 sek.	29,3 sek.	39,5 sek.	61,5 sek.
5,0	15,9 sek.	17,8 sek.	22,3 sek.	33,7 sek.
10,0	10,0 sek.	11,1 sek.	13,2 sek.	19,0 sek.
20,0	6,2 sek.	6,8 sek.	7,8 sek.	11,1 sek.

Podane wyniki czasu trombinowego  $t_k$  w sekundach są średnimi z 5 wykonanych oznaczeń.

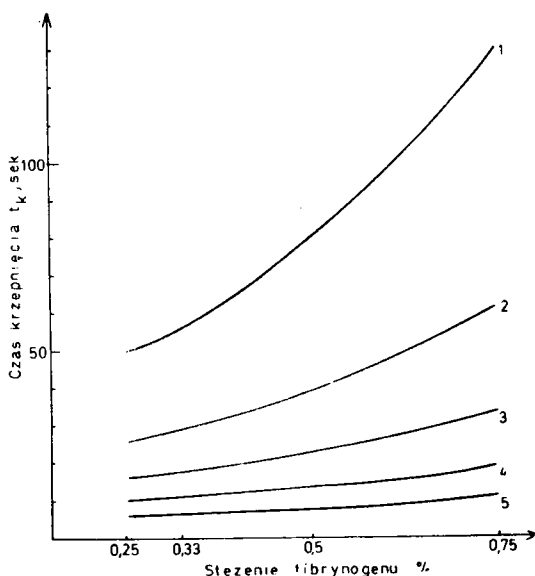
Given results of thrombin time  $t_k$  in second are the average of 5 indications



Ryc. 3. Wpływ stężenia trombiny na  $t_k$  substratu; A — krzywa krzepnięcia dla 0,25% fibrynogenu, B — krzywa krzepnięcia dla 0,33% fibrynogenu, C — krzywa krzepnięcia dla 0,50% fibrynogenu, D — krzywa krzepnięcia dla 0,75% fibrynogenu

Influence of the concentration of thrombin on time coagulation of the substrat; A — coagulation curve for 0,25% of the fibrinogen, B — coagulation curve for 0,33% of the fibrinogen, C — coagulation curve for 0,50% of the fibrinogen, D — coagulation curve for 0,75% of the fibrinogen

leżność wartości  $t_k$  od stężenia trombiny nie wymaga dyskusji. Wartość  $t_k$  traktować można jako odwrotność szybkości tworzenia się skrzepu. Jak widać na ryc. 4, wpływ stężenia fibrynogenu na czas trombinowy jest dość znaczny.



Ryc. 4. Wpływ stężenia fibrynogenu na czas trombinowy; 1 — krzywa krzepnięcia dla standardu o mianie 1 j NIH/ml, 2 — krzywa krzepnięcia dla standardu o mianie 2,5 j NIH/ml, 3 — krzywa krzepnięcia dla standardu o mianie 5 j NIH/ml, 4 — krzywa krzepnięcia dla standardu o mianie 10 j NIH/ml, 5 — krzywa krzepnięcia dla standardu o mianie 20 j NIH/ml  
The effect of fibrinogen concentration upon thrombin time; 1 — coagulation curve for standard with 1 j NIH/ml denomination, 2 — coagulation curve for standard with 2,5 j NIH/ml denomination, 3 — coagulation curve for standard with 5 j NIH/ml denomination, 4 — coagulation curve for standard with 10 j NIH/ml denomination, 5 — coagulation curve for standard with 20 j NIH/ml denomination

#### 4. Wpływ rozpuszczalnika standardu trombiny na czas krzepnięcia substratu

Zasadniczym celem tej części pracy było zbadanie wpływu rodzaju rozpuszczalnika standardu trombiny na czas krzepnięcia substratu, dobór odpowiedniego rozpuszczalnika i wykreślenie właściwej krzywej standardowej. Z wzorca trombiny o zawartości 160 j NIH w ampułce przygotowano standardowe roztwory trombiny o stężeniu 10 j NIH/ml w 6 różnych rozpuszczalnikach: 1) wodzie redestylowanej, 2) 0,9% roztworu NaCl, 3) 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0, 4) mieszaninie składającej się z równych objętości wody redestylowanej, tromboplastyny i 1/40 M roztworu CaCl<sub>2</sub>, 5) mieszaninie składającej się z równych objętości 0,9% roztworu NaCl, tromboplastyny i 1/40 M roztworu CaCl<sub>2</sub>, 6) mieszaninie składającej się z równych objętości 0,05 M buforu fosforanowego o pH 7,0, tromboplastyny i 1/40 M roztworu CaCl<sub>2</sub>. Roztwory standardowe trombiny testowano na 0,5% roztworze fibrynogenu w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0, oznaczając czas krzepnięcia. Wyniki przeprowadzonych badań zestawiono w tab. 2. Świadczą one o wyraźnym wpływie rozpuszczalnika standardu trombiny na czas krzepnię-

Tab. 2. Wpływ rozpuszczalnika standardu trombiny na czas krzepnięcia substratu  
The effect of thrombin standard solvent upon the coagulation time of the substrate

Rozpuszczalnik standardu trombiny	$t_k$ sek.
a) woda redestylowana	14,0
b) 0,9% roztwór chlorku sodowego	16,7
c) 0,05 M bufor fosforanowy o pH 7,0	18,2
d) H <sub>2</sub> O redestyl. — tromboplastyna — 1/40 M CaCl <sub>2</sub> (1 : 1 : 1)	13,2
e) 0,9% NaCl — tromboplastyna — 1/40 M CaCl <sub>2</sub> (1 : 1 : 1)	13,3
f) 0,05 M bufor fosf. o pH 7,0 — tromboplastyna — 1/40 M CaCl <sub>2</sub> (1 : 1 : 1)	28,5

Substrat: 0,5% roztwór fibrynogenu w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0. Roztwory standardowe trombiny o stężeniu 10 j NIH/ml. Podane wyniki czasu krzepnięcia substratu  $t_k$  są średnimi z 5 wykonanych oznaczeń.

Substratum: 0.5% fibrinogen solution in 0.05 M phosphoric buffer with pH 7.0. Standard thrombin solution with concentration of 10 j NIH/ml. Given results of substratum coagulation time to are average of indication.

cia substratu. Mimo jednakowego stężenia enzymu we wszystkich 6 standardowych roztworach trombiny czasy krzepnięcia substratu są bardzo różne.

W następnej serii doświadczeń użyto wzorca trombiny o zawartości 250 j NIH w ampulce, z którego przygotowano standardowe roztwory trombiny o stężeniu 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 i 20,0 j NIH/ml na dwu różnych rozpuszczalnikach: 1) 0,9% roztworze NaCl i 2) mieszaninie składającej się z równych objętości 0,9% roztworu NaCl, tromboplastyny i 1/40 M roztworu CaCl<sub>2</sub>. Do testowania standardowych roztworów trombiny jako substratu użyto 0,25% roztworu fibrynogenu wołowego w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0. Uzyskane wyniki badań zestawiono w tab. 3. Potwierdzają one wpływ ro-

Tab. 3. Wpływ rozpuszczalnika standardu trombiny na czas krzepnięcia substratu  
The effect of thrombin standard solvent upon the coagulation of the substrate

Rozpuszczalnik standardu trombiny	Stężenie trombiny w j NIH/ml				
	1,0	2,5	5,0	10,0	20,0
1) 0,9% roztwór NaCl	75,0"	37,2"	22,1"	12,5"	7,5"
2) 0,9% NaCl — tromboplastyna — 1/40 M CaCl <sub>2</sub> (1 : 1 : 1)	50,0"	26,0"	16,0"	10,0"	6,2"

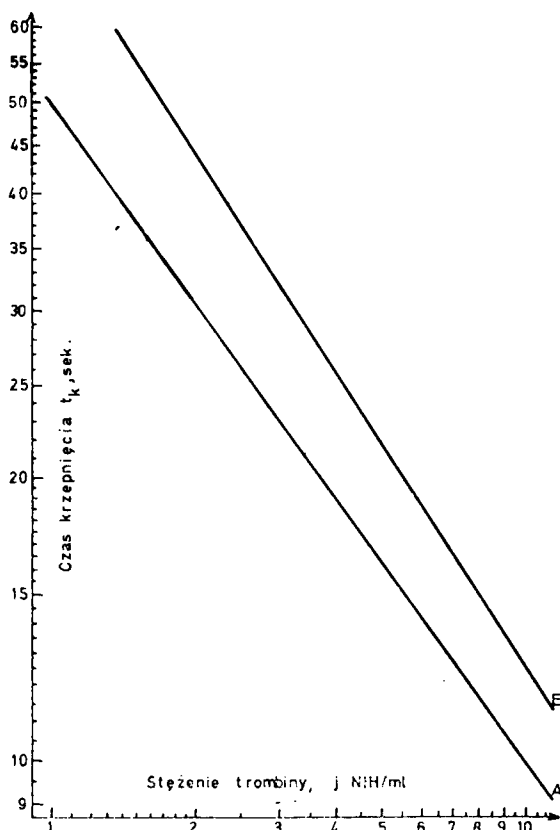
Substrat: 0,25% roztwór fibrynogenu w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0. Podane wyniki czasu krzepnięcia substratu  $t_k$  w sek. są średnimi z 5 oznaczeń.

Substratum: 0.25% fibrinogen solution in 0.05 M phosphoric buffer with pH 7.0. Given results of the substratum coagulation time  $t_k$  in seconds are the average of 5 indication.

dzaju użytego rozpuszczalnika standardu trombiny na czas krzepnięcia substratu, a ponadto pozwalają na wykreślenie odpowiednich krzywych standardowych (ryc. 5), które wykorzystano do ilościowego oznaczania protrombiny i trombiny.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przy oznaczaniu protrombiny metodą dwustopniową miernikiem zawartości protrombiny w badanym materiale jest maksymalna ilość trombiny, któ-



Ryc. 5. Wpływ rozpuszczalnika standardu trombiny na czas krzepnięcia substratu; E — krzywa krzepnięcia dla standardu trombiny na 0,9% NaCl, A — krzywa krzepnięcia dla standardu trombiny na nośniku: 1 cz. 0,9% NaCl ÷ 1 cz. tromboplastyny ÷ 1 cz. 1/40 M CaCl<sub>2</sub>

The effect of thrombin standard solvent upon the coagulation time of the substratum; E — coagulation curve for thrombin standard on 0,90% solution of NaCl, A — coagulation curve for thrombin standard on the bearer: 1 molecule 0,9% NaCl + 1 m thromboplastin + + 1 m 1/40 M CaCl<sub>2</sub>

rażą się uzyskać w doświadczeniu. Zbyt krótki i zbyt długi czas konwersji (aktywacji) powoduje za małe wyniki. W pierwszym przypadku trombina nie zdąży się jeszcze wytworzyć, w drugim — jest już częściowo zubożona działaniem antytrombin. Przebieg przedstawionych badań i uzyskane wyniki świadczą o konieczności dokładnego wstępnego odwłóknienia osocza przed właściwym oznaczeniem protrombiny. W konwercie nieodwłóknionym tworzą się bowiem skrzepy fibryny, które adsorbują część powstającej trombiny, a także utrudniają pobieranie i dokładne odmierzanie próbek, co w efekcie prowadzi do uzyskania gorszych i niedokładnych wyników (wyższy minimalny czas krzepnięcia oraz wahania skokowe widoczne na ryc. 1 na wykresie A). Należy podkreślić, że tylko niektórzy autorzy stosują odwłóknienie osocza. Z przedstawionych doświadczeń wynika również, że aktywacji protrombiny tromboplastyną i chlorkiem wapniowym nie powinno się przeprowadzać w



temp. 37°, gdyż wpływa to niekorzystnie na rezultaty oznaczeń. Konwersję protrombiny w rozcieńczonym i odwłóknionym osoczu należy bezwzględnie przeprowadzać w temperaturze pokojowej. Podczas aktywacji protrombiny w temp. 37° inaktywujące działanie antytrombin, mimo rozcieńczenia i odwłóknienia osocza, jest jeszcze dość znaczne. Szczyt aktywności jest trudny do uchwycenia; poza tym nie uzyskuje się maksymalnej ilości trombiny. Natomiast w temperaturze pokojowej działanie antytrombin jest znikome i praktycznie niedostrzegalne. Szczyt aktywności utrzymuje się przez stosunkowo długi okres czasu i poziom protrombiny jest wyższy. Przez obniżenie temperatury z 37° do około 20° zwalnia się wprawdzie szybkość aktywacji protrombiny w trombinę, ale jednocześnie eliminuje prawie całkowicie wpływ inhibitorów reakcji. Być może na przebieg reakcji, poza antytrombinami, mają również wpływ inhibitory aktywacji protrombiny o czynności antytromboplastycznej i antyprotrombinowej. Należy podkreślić, że w dostępnym piśmiennictwie na temat oznaczania protrombiny metodą dwustopniową nie spotkano doniesienia ani informacji o przeprowadzaniu aktywacji protrombiny w temperaturze pokojowej. Wszyscy autorzy aktywują protrombinę przy pomocy tromboplastyny i  $\text{CaCl}_2$  w 37° lub 28°.

Do mianowania trombiny Niewiarowski i niektórzy inni autorzy zalecają stosowanie w charakterze substratu 0,1% roztworu fibrynogenu lub osocza bezprotrombinowego. Badania własne wykazały, że osocze adsorbowane siarczanem barowym jest niestabilne, najprawdopodobniej wskutek obecności w nim różnych aktywatorów i inhibitorów krzepnięcia, natomiast 0,1% roztwór fibrynogenu daje skrzep słaby, nietrwały, często w czasie prób niezauważalny. Jako substratu należy używać około 0,25% roztworu fibrynogenu wołowego pozbawionego zanieczyszczeń protrombiną, trombiną i plazminą, w buforze o pH 6,6—7,0 i sile jonowej około 0,15. Za stosowaniem wyższego stężenia substratu oraz buforu o określonym zakresie pH i siły jonowej przemawiają doświadczenia własne i innych autorów (13, 14, 15), jak również rozważania teoretyczne nad kinetyką działania enzymów.

Ilościowe oznaczenie protrombiny metodą dwustopniową wymaga wykreślenia krzywej wzorcowej. Według Niewiarowskiego (21) krzywą tę wykreślić można na podstawie dowolnego preparatu trombiny przyjmując, że 1 jednostka trombiny powoduje krzepnięcie 1 ml 0,1% roztworu fibrynogenu w 37° w ciągu 15 sek. Przy dokładnych oznaczeniach ilościowych nie można opierać się na takiej umownie przyjętej definicji jednostki trombiny. Czas krzepnięcia substratu zależy bowiem nie tylko od stężenia enzymu (trombiny), stężenia fibrynogenu i temperatury, ale również od wielu innych czynników (pH, siły jonowej, charakteru obecnych w środowisku jonów itp.). Przy wykreślaniu krzywej standardowej należy posługiwać się wzorcem trombiny, najlepiej wzorcem NIH lub zastępczym.

Test polegający na oznaczeniu czasu krzepnięcia mieszaniny fibrynogenu z trombiną, zwany w skrócie czasem trombinowym, jest prosty w wykonaniu, ale jednocześnie bardzo czuły na niewielkie nawet zmiany środowiska, w jakim przebiegają reakcje przemiany fibrynogenu w fibrynę. Niedostateczna ścisła kontrola wszystkich parametrów reakcji krzepnięcia może spowodować znaczne błędy w oznaczeniach, a tym samym prowadzić do wręcz fałszywej interpretacji uzyskanych wyników. Przy oznaczaniu protrombiny metodą dwustopniową standardowe roztwory trombiny oparte na wzorcu NIH należy bezwzględnie przygotowywać na nośniku składającym się z fizjologicznego

roztworu NaCl, 1/40 M roztworu chlorku wapniowego i tromboplastyny w stosunku 1:1:1. Standardowe roztwory trombiny oraz roztwory badanych próbek (konwertów) powinny posiadać zbliżone środowisko. W przeciwnym przypadku uzyskuje się fałszywe i zawyżone wartości protrombiny. Większość badaczy zapomina o tym fakcie i standardowe roztwory trombiny przygotowuje na 0,9% roztworze NaCl lub odpowiednim buforze. Przeprowadzone badania i spostrzeżenia pozwoliły na wprowadzenie do oryginalnej metody Biggs'a istotnych zmian i opracowanie własnej modyfikacji oznaczania protrombiny, która daje wyniki powtarzalne i bardziej zbliżone do wartości rzeczywistych.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Biggs R., Douglas A. S.: *J. Clin. Pathol.* 6, 15, 1953.
2. Biggs R., MacFarlane E. G.: *Blood Coagulation and its Disorders*, Oxford 1953; *Human Blood Coagulation*: 2nd Ed., Oxford 1957.
3. Blombäck B., Blombäck M.: *Ark. Kemi* 10, 415, 1956.
4. Borowskaja D. P., Rowińska S. D.: *Klin. med.*, 4, 88, 1948.
5. Chojnowski C.: Dokumentacja technologiczna otrzymywania fibrynogenu wołowego do celów laboratoryjnych, Biomed, Wytwórnia Surowic i Szczepionek w Lublinie, 1971.
6. Cohn E. J., Strong L. E., Hughes W. L. jr, Mulford D. L., Ashworth J. N., Molin M., Taylor H. L.: *Am. Soc.* 68, 459, 1946.
7. Deutsch E.: *Blutgerinnungsfaktoren*, S. 85, Wien 1955.
8. Fiechter N.: *Schweiz. med. Wschr.* 21, 259, 1940.
9. Kaulla K. N., w: *Hoppe-Seyler/Thierfelder, Analyse*, 10. Aufl., Bd. VI C, S. 315, 1966.
10. Koller F., Loeliger A., Duckert F.: *Acta Haematol.* 6, 1, 1951.
11. Kowarzyk H., Buluk K.: *Post. Hig. Med. Dośw.* 2, 1, 1950.
12. Kowarzyk H., Marciniakówna E., Kotschy M., Czerwińska B.: *Post. Hig. Med. Dośw.* 14, 95, 1960.
13. Latallo Z.: *Pror. VIII-th Congress Europ. Sol. Haematol.*, Vienna 1961, Karger, 423, Basel 1962.
14. Latallo Z.: *Post. Hig. Med. Dośw.*, 20, 657, 1966.
15. Latallo Z., Fletcher A. P., Alkjaersig N., Sherry S.: *Am. J. Physiol.* 202, 675, 1962.
16. Leonow A.: *Przegl. Lek.* 6, 765, 1950.
17. Magnusson S.: *Ark. Kemi* 23, 285, 1965.
18. Marbet R., Strässle R., Winterstein A.: *Helv. Physiol. Acta*, 11, C 65, 1954.
19. Marbet R., Winterstein A.: *Praxis*, 42, 61, 1953.
20. Niewiarowski S.: *Krzepnięcie krwi*. PZWL, Warszawa 1954; *Krzepnięcie krwi*, wyd. 2, PZWL, Warszawa 1960.
21. Niewiarowski S., w: Ławkowicz W., Krzemińska-Ławkowiczowa: *Diagnostyka Hematologiczna*, PZWL, Warszawa 1960.
22. Niewiarowski S., w: Tulczyński M.: *Metody laboratoryjne diagnostyki klinicznej*, PZWL, 703, Warszawa 1962.
23. Pendl I., Felix K., w: *Hoppe-Seyler/Thierfelder, Analyse*, 10. Aufl., Bd IV, S. 264, 1960, 1960.
24. Quick A. J.: *J. Biol. Chem.* 1, 109, 1935.
25. Quick A. J.: *Am. J. Physiol.* 114, 232, 1936.
26. Schultze H. E., w: Jürgens J. u. Beller E. (Hrsgb): *Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalyse*, Stuttgart 1959, S. 198.
27. Soulier J. P., Lariou M. J.: *Sang* 23, 549, 1952.
28. Sternberger L. A.: *Brit. J. Exp. Pathol.* 28, 168, 1947.
29. Stormorken H., Hjort P.: *VI Congress de la Soc. Intern. d'Hematol.*, Copenhagen 1957.
30. Sznejder L. Ch.: *Łabor. dielo* 1, 31, 1969.
31. Wagner H. R., Graham J. B., Penick C. D., Brinkhouse K. M., w: Tocantins L. M.: *The Coagulation of Blood*, New York 1955.
32. Ware A. G., Seegers W. H.: *Am. J. Clin. Path.* 10, 471, 1949.
33. Warner E. D., Brinkhouse K. M., Smith H. P.: *Am. J. Physiol.* 114, 667, 1936.
34. Winterstein A., Marbet R.: *Helv. Med. Acta* 19, 409, 1952.

Otrzymano 4 X 1974.

## РЕЗЮМЕ

Подробному анализу подвергался способ определения протромбина в плазме крови двухступенчатым методом Биггса по Неверовскому (21). Установлено, что на точность и конечные результаты определения существенное влияние имеют: 1) извлечение волокна исследуемой плазмы; 2) температура активации протромбина в тромбин; 3) тип субстрата употребленного для установления титра; 4) тип растворителя стандарта тромбина.

## SUMMARY

The method of determining prothrombin in plasma by the two — stage method by Biggs after Niewiarowski has undergone a thorough analysis (21). It has been ascertained that four factors have a bearing on the accuracy and final results of determining prothrombin. They are: 1) the defibrination of the examination, 2) the activation temperature of prothrombin into thrombin, 3) the kind of substratum used for fibrination, 4) the kind of thrombine standard resolvent.

