

Katedra Patofizjologii AR i Zakład Fizjologii Człowieka AM w Lublinie

ANDRZEJ LEDWOŻYW, BARBARA BOROWICZ

*Oznaczanie poziomu czynnika II w osoczu krwi koni,
bydła, owiec i świń*

Factor II levels in blood plasma of large domestic animals

O molekularnym działaniu trombiny na fibrynogen istnieje dość dużo informacji, nie dziwnego więc, że metoda używająca syntetycznych substratów peptydowych została opracowana po raz pierwszy właśnie dla trombiny i enzymów do niej podobnych (19). Struktura tych substratów opiera się na sekwencji aminokwasów w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca odszczepiania fibrynopeptydu A od cząsteczki fibrynogenu, prócz tego zawierają one też resztę fenyloalaniny w takiej samej odległości od miejsca odszczepienia p-nitroaniliny, w jakiej znajduje się ona od miejsca w cząsteczce fibrynogenu, na które działa trombina. Największą przydatność do oznaczania trombiny wykazały dwa substraty syntetyczne (opracowane w laboratoriach Kabi Vitrum, Molndal, Szwecja): S-2337 – H-D-fenyloalanylo-pipekolilo-arginylo-p-nitroanilid i S-2160 – benzoilo-fenyloalanylo-valilo-arginylo-p-nitroanilid.

Przy założeniu, że protrombina ulega ilościowej konwersji w trombinę, stężenie protrombiny w próbce musi być równoważne ilości utworzonej trombiny. W praktyce jednak trudne jest ustalenie takich warunków pomiaru, aby założenie to zostało zachowane. Po pierwsze, osocze zawiera szereg inhibitorów trombiny (antytrombina III, α_2 -makroglobulina, α_1 -antytrypsyna), które w pewnym stopniu mogą reagować z powstałą w czasie inkubacji trombiną. Po drugie, wybór aktywatora protrombiny może wprowadzać zależność szybkości aktywacji od innych czynników osoczkowych, jak czynnik V, czynnik X, czynnik VII, białko indukowane niedoborem witaminy K (PIVKA) itp. Tak więc celem osiągnięcia ilościowej konwersji protrombiny w trombinę wymagany jest aktywator, który zapewni przebieg reakcji w bardzo krótkim czasie (w porównaniu z działaniem inhibitorów trombiny).

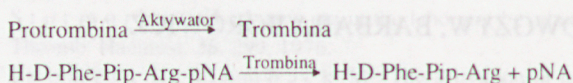
We wcześniejszych publikacjach (13, 14, 15) wykazaliśmy przydatność substratów chromogen-nych do oznaczania czynnika VII, czynnika VIII i endogennej heparyny w osoczu krwi dużych zwierząt gospodarskich.

W niniejszej pracy postanowiono określić przydatność syntetycznego substratu chromogen-ego S-2338 do oznaczania poziomu protrombiny w osoczu krwi dużych zwierząt gospodarskich wykorzystując metody Axelssona i wsp. (1) oraz Bergstroma i Blombäck (3).

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto osocza 18 koni (wielkopolska, wiek 4-8 lat, ogiery, stadnina Posadowo), 21 owiec (merynos, wiek 2-3 lata, samice, owczarnia Uhrusk), 24 krowy (nch, samice, wiek 3-4 lata, z gospodarstw prywatnych) i 20 świń (rasy wbp, samice, z tuczarni prywatnych). Osocze otrzymywano z cytrynizowanej krwi (1 obj. 0,1 M cytrynianu sodu + 9 obj. krwi) przez wirowanie 20 min. przy 2000 g. Przed oznaczeniem osocze (100 μ l) mieszano z 3 ml 0,05 M buforu, Tris-HCl o pH = 7,3. Krew pobierano przez nakłucie żyły jarzmowej w przypadku koni, bydła i owiec oraz żyły brzeżnej ucha w przypadku świń.

Zasada metody:



Ilość powstałej p-nitroaniliny mierzona jest przyrostem wartości E_{405} .

M e t o d a I. Aktywacja protrombiny następuje pod działaniem mieszaniny czynnika Xa, fosfolipidu i jonów wapnia. Do termostatowanej (37°C) kuwety spektrofotometru dodać 0,8 ml 0,05 M buforu Tris-imidazolowego, pH 8,3, zawierającego 0,13 M NaCl, 0,01 ml zawiesiny tromboplastyny (Thromboplastin, Kabi Vitrum, Molndal, Szwecja), 0,02 ml 0,2 M roztworu CaCl_2 , 0,01 ml roztworu bydlęcego czynnika Xa (30 nkat/ml, Kabi Vitrum) oraz 0,005 ml badanego osocza. Po 90 sek. dodać 0,2 ml 2 mM roztworu substratu S-2238 i mierzyć szybkość wzrostu wartości ekstynkcji przy 405 nm przez 5 min.

M e t o d a II. Aktywacja protrombiny następuje pod działaniem czynnika prokoagulacyjnego z jadu *Echis carinatus*. Do termostatowanej (37°C) kuwety spektrofotometru dodać 0,8 ml buforu Tris-imidazolowego, pH 8,3, zawierającego 0,13 M NaCl, 0,01 ml roztworu jadu *Echis carinatus* (5 mg/ml, Sigma, St. Louis, USA) i 0,005 ml badanego osocza. Po 90 sek. dodać 0,2 ml 2 mM roztworu substratu S-2238 i mierzyć szybkość wzrostu wartości ekstynkcji przy 405 nm przez 5 min.

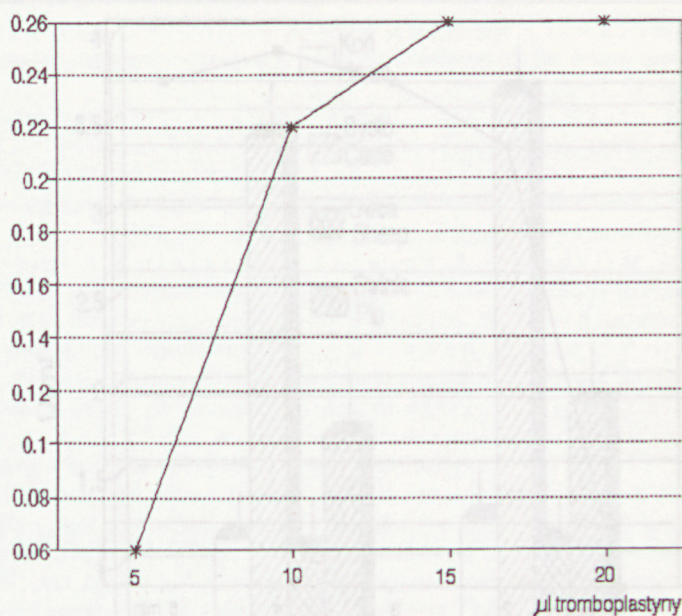
Jedną jednostkę aktywności enzymu definiuje się jako ilość enzymu uwalniającą 1 μ M p-nitroaniliny na minutę.

WYNIKI

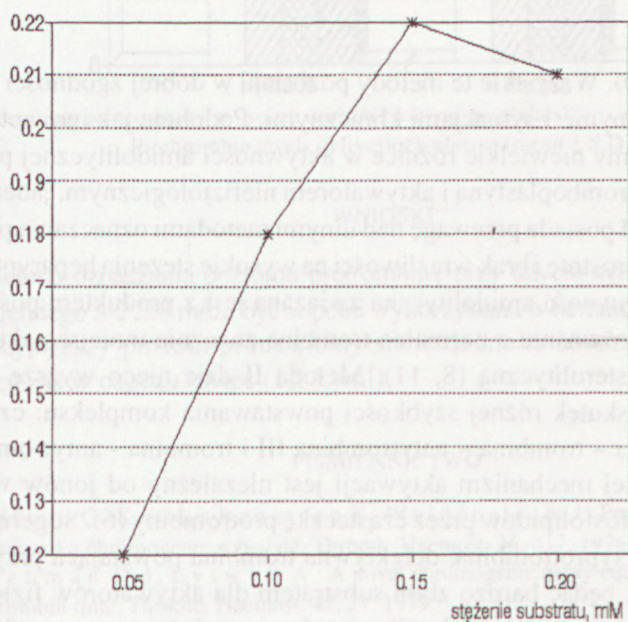
Na ryc. 1 przedstawiono wykres aktywacji protrombiny przez tromboplastynę. Już 10 μ l roztworu tromboplastyny aktywuje całą ilość trombiny. Ryc. 2 obrazuje zależność stopnia hydrolizy substratu S-2238 od jego stężenia. Końcowe stężenie substratu, wynoszące 0,20 mM, wybrano do oznaczeń rutynowych. Ryc. 3 ukazuje zależność stopnia hydrolizy substratu S-2238 od czasu inkubacji. Wartość E_{405} osiąga plateau już po 3 min., czas inkubacji w oznaczeniach rutynowych ustalono na 5 min. Ryc. 4 przedstawia poziomy protrombiny w osoczu badanych gatunków zwierząt. Najwyższy poziom protrombiny stwierdzono w osoczu bydła, najniższy zaś w osoczu owiec.

DYSKUSJA

W niniejszej pracy opisano metody oznaczenia poziomu protrombiny w osoczu krwi dużych zwierząt gospodarskich, używając do aktywacji osocza protrombiny

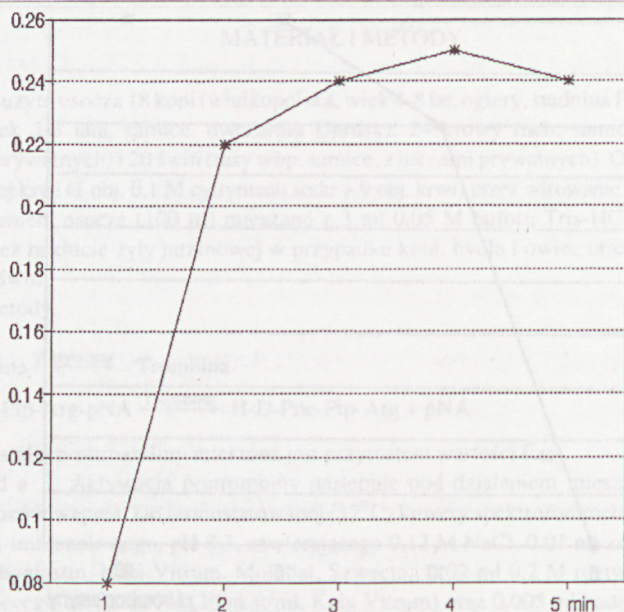


Ryc. 1. Wyznaczenie optymalnego stężenia tromboplastyny (E405)
Determination of the optimal thromboplastin concentration (E405)

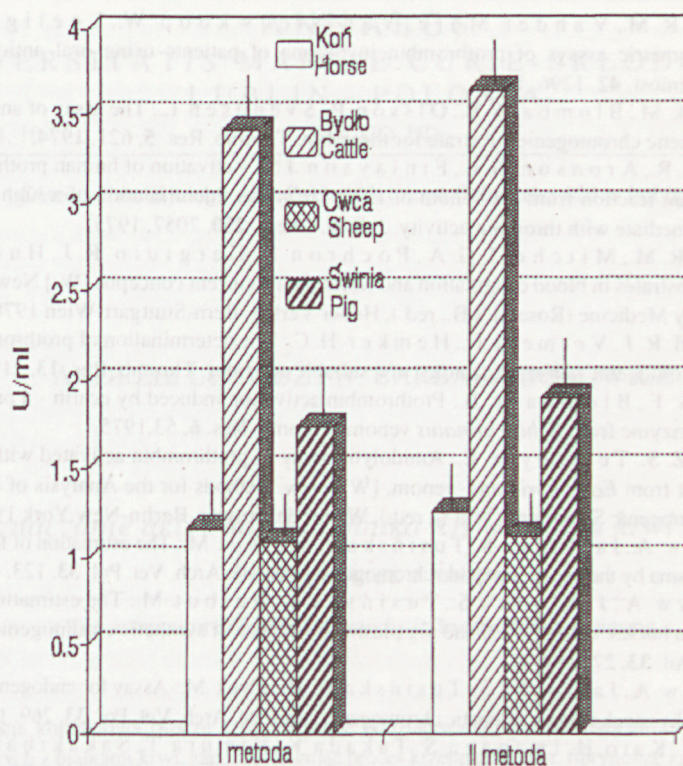


Ryc. 2. Wpływ stężenia substratu na szybkość reakcji (E405)
Effect of substrate on the rate of reaction (E405)

i czynnika prokoagulacyjnego z jadu *Echis carinatus*. Inni autorzy także używali tromboplastyny różnego pochodzenia (18, 22), czynnika Xa (10), czynnika prokoagulacyjnego z jadu *Echis carinatus* (4, 12, 20), jadu żmii Russella (4) oraz jadu

Ryc. 3. Oznaczenie optymalnego czasu inkubacji (E₄₀₅)Determination of optimal incubation time (E₄₀₅)

źmii tajpańskiej (10). Wszystkie te metody pozostają w dobrej zgodności z metodami konwencjonalnymi i sytuacjami klinicznymi. Podobnie jak inni autorzy (6, 12, 20) stwierdziliśmy niewielkie różnice w aktywności amidolitycznej protrombiny aktywowanej tromboplastyną i aktywatorem нефизjologicznym, jadem *Echis carinatus*. Metoda II posiada przewagę nad innymi metodami oznaczania protrombiny z uwagi na jej prostotę i brak wrażliwości na wysokie stężenia heparyny. Może to oznaczać, że aktywność amidolityczna związana jest z produktem pośrednim, posiadającym w porównaniu z normalną trombiną znacznie mniejszą aktywność koagulacyjną niż esterolityczną (8, 11). Metoda II daje nieco wyższe wyniki, prawdopodobnie wskutek różnej szybkości powstawania kompleksu: czynnik z jadu *Echis carinatus* – trombina – antytrombina III i trombina – antytrombina III (12). W metodzie tej mechanizm aktywacji jest niezależny od jonów wapnia i zdolności wiązania fosfolipidów przez cząsteczkę protrombiny (6). Sugeruje to, że PIVKA-II (akarboksypotrombina, defektywna trombina powstająca przy niedoborze witaminy K), będąc bardzo złym substratem dla aktywatorów fizjologicznych, może być mierzona tą metodą. B a u g h m a n i L y t w y n (2) opisali metodę z użyciem substratu syntetycznego, równoważną testowi czasu protrombinowego, opisano też substraty syntetyczne dla metody fluorymetrycznej (9, 16), gdzie grupami detektorowymi są 4-metoksy-2-naftyloamina i 7-amino-4-metylokumaryna. Opracowano też metodę oznaczania aktywności antytrombiny III przy użyciu syntetycznych substratów chromogennych (5, 7, 17).



Ryc. 4. Poziomy proteombiny w osoczu dużych zwierząt gospodarskich (wartości średnie $\pm$ S.D.)
Prothrombin levels in livestock plasma (mean $\pm$ S.D.)

WNIOSKI

1. Metoda oznaczania poziomu protrombiny przy użyciu syntetycznego substratu chromogenego S-2238 może być w pełni wykorzystana w hematologii weterynaryjnej.
2. Najwyższy poziom protrombiny stwierdzono w osoczu bydła (3,6 U/ml), najniższy zaś w osoczu owiec (1,1 U/ml).

PIŚMIENNICTWO

1. Axelsson G., Korsan-Bengtson K., Waldenström J.: Prothrombin determination by means of a chromogenic substrate. *Thromb. Haemost.* **36**, 517, 1976.
2. Baughman D. J., Lytwyn A.: A novel chromogenic assay equivalent to the one stage prothrombin time. *Thromb. Haemost.* **42**, 21, 1979.
3. Bergström K., Blomback N.: Determination of plasma prothrombin with a reaction rate analyzer using a synthetic substrate. *Thromb. Res.* **4**, 719, 1974.
4. Bergström K., Egberg N.: Determination of vitamin K sensitive coagulation factors in plasma. Studies on three methods using synthetic chromogenic substrates. *Thromb. Res.* **12**, 531, 1978.
5. Bergström K., Lahnberg G.: The effect of major surgery, low doses of heparin and thromboembolism on plasma antithrombin. Comparison of immediate thrombin inhibiting capacity and the antithrombin III content. *Thromb. Res.* **6**, 223, 1975.

6. Bertina R. M., Vander Marel-Van Nieuwkoop W., Loeliger E. A.: Spectrophotometric assays of prothrombin in plasma of patients using oral anticoagulants. *Thromb. Haemost.* **42**, 1296, 1979.
7. Blomback M., Blomback B., Olsson P., Svendsen L.: The assay of antithrombin using a synthetic chromogenic substrate for thrombin. *Thromb. Res.* **5**, 621, 1974.
8. Franza B. R., Aronson D. L., Finlayson J. S.: Activation of human prothrombin by a procoagulant fraction from the venom of *Echis carinatus*. Identification of a high molecular weight intermediate with thrombin activity. *J. Biol. Chem.* **250**, 7057, 1975.
9. Huseby R. M., Mitchell G. A., Pochron S., Gargiulo R. J., Hudson P.: Synthetic substrates in blood coagulation and fibrinolysis: current concepts. [W:] *New Pathways in Laboratory Medicine* (Rosalki S. B., red.), Huber Verlag, Bern-Stuttgart-Wien 1978, s. 49.
10. Kirchhof B. R. J., Vermeer C., Hemker H. C.: The determination of prothrombin using synthetic chromogenic substrates: choice of a suitable activator. *Thromb. Res.* **13**, 219, 1978.
11. Kornalik F., Blomback B.: Prothrombin activation induced by ecarin - a prothrombin converting enzyme from *Echis carinatus* venom. *Thromb. Res.* **6**, 53, 1975.
12. Latallo Z. S., Teisseyre E.: Amidolytic assay of prothrombin activated with ecarin - a procoagulant from *Echis carinatus* venom. [W:] *New Methods for the Analysis of Coagulation Using Chromogenic Substrates* (Witt I., red.), Walter de Gruyter, Berlin-New York 1977, s. 181.
13. Ledwożyw A., Jabłonka S., Tusińska E., Herbut M.: The estimation of factor VII in livestock plasma by the use of tripeptide chromogenic substrate. *Arch. Vet. Pol.* **33**, 123, 1993.
14. Ledwożyw A., Jabłonka S., Tusińska E., Herbut M.: The estimation of factor VIII levels in horses, cattle, sheep and pig plasma by the use of synthetic chromogenic substrate. *Arch. Vet. Pol.* **33**, 275, 1993.
15. Ledwożyw A., Jabłonka S., Tusińska E., Herbut M.: Assay for endogenous heparin in plasma of livestock using a synthetic chromogenic substrate. *Arch. Vet. Pol.* **33**, 269, 1993.
16. Morita T., Kato H., Iwanaga S., Takada K., Kimura T., Sakakibara S.: New fluorogenic substrates for -thrombin, factor Xa, kallikreins and urokinase. *J. Biochem.* **82**, 1495, 1977.
17. Odegard O. R., Lie N., Abildgaard U.: Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method. *Thromb. Res.* **6**, 287, 1975.
18. Roka L., Koch R., Bleyl H.: Studies on the determination of prothrombin with S-2160. [W:] *New Methods for the Analysis of Coagulation Using Chromogenic Substrates* (Witt I., red.), Walter de Gruyter, Berlin-New York 1977, s. 171.
19. Svendsen L., Blomback B., Olsson P.: Synthetic chromogenic substrates for determination of trypsin, thrombin and thrombin-like enzymes. *Thromb. Res.* **1**, 267, 1972.
20. Van Wijk F. M., Kahle L. H., Jenkins C. S. P., Cate J. W.: The determination of prothrombin using an automated amidolytic technique. *Abstr. XVIIth Congr. Int. Soc. Haematol.*, Paris 1978, p. 862.
21. Vermeer C., Govers-Riemslog J. W. P., Soute B. A. M., Lindhout M. J., Kop J., Hemker H. C.: The role of blood clotting factor V in the conversion of prothrombin and decarboxyprothrombin into thrombin. *Biochim. Biophys. Acta* **533**, 521, 1978.
22. Witt I.: Determination of plasma prothrombin with Chromozym TH. [W:] *New Methods for the Analysis of Coagulation Using Chromogenic Substrates* (Witt I., red.), Walter de Gruyter, Berlin-New York 1977, s. 155.

SUMMARY

The usefulness of synthetic tripeptide substrate H-D-Phenylalanyl-pipecolyl-arginyl-p-nitroanilide in factor II level determination in plasma of livestock was investigated. It was stated that this substrate is suitable in veterinary haematology. The highest level of prothrombin was found in cattle plasma, the lowest one in sheep plasma.