

Katedra Patofizjologii AR i Zakład Fizjologii Człowieka AM w Lublinie

ANDRZEJ LEDWOŻYW, BARBARA BOROWICZ

*Oznaczanie aktywności antytrombiny III w osoczu krwi koni,
bydła, owiec i świń*

The estimation of antithrombin III level in livestock blood plasma

W wieloletnich badaniach nad mechanizmami hemostazy, funkcja i znaczenie inhibitorów jako szeroko pojętych mechanizmów krzepnięcia i fibrynolizy odgrywały zawsze rolę drugoplanową. Świadczy o tym fakt, że dopiero w 1975 roku odkryto główny fizjologiczny inhibitor fibrynolizy (11). W tym samym okresie stwierdzono także, że wiele białek osocza, takich jak α_2 -makroglobulina, α_1 -antytrypsyna, inaktywator składnika Cl dopełniacza, konfktor antytrombina III – heparyna, czy α_2 -antypłazmina są silnymi inhibitorami proteaz (22), stanowiąc około 20% frakcji globulin osocza (21). Jak dotąd, bliżej scharakteryzowano antytrombinę III, kompleks antytrombina III – heparyna, α_2 -antypłazminę, główny inhibitor plazminy, α_2 -makroglobulinę, ogólny inhibitor enzymów proteolitycznych, α_1 -antytrypsynę, inaktywator składnika Cl dopełniacza i inhibitor wczesnych stadiów krzepnięcia i fibrynolizy, indukowany działaniem kalikreina–kininy (24).

Począwszy od 1975 roku w piśmiennictwie pojawiło się wiele prac poświęconych α_2 -antypłazminie, głównemu inhibitorowi układu fibrynolitycznego (12, 33, 34). Najważniejszym jednak inhibitorem w układzie krzepnięcia *per se* jest antytrombina III, która wraz z naturalnie występującym polisacharydem heparyną stanowi najważniejszy i najtrwalszy inhibitor proteaz serynowych (6, 43, 44, 51). W 1939 roku Brinkhous i wsp. (8) wykazali, że heparyna hamuje krzepnięcie krwi tylko w obecności składnika osocza, zwanego obecnie kofaktorem heparyny. Później stwierdzono, że antytrombina III i aktywność kofaktora heparyny są ze sobą powiązane (31, 50).

Przyjmuje się obecnie, że antytrombina III jest głównym inhibitorem trombiny, a dzięki pracy Harpela i Rosenberga (21) wiadomo, że hamuje ona także aktywność czynników Xa, XIa, IIa i XIIa oraz w mniejszym stopniu aktywność plazminy, tworząc z tymi białkami nieodwracalne kompleksy enzym – inhibitor. Doświadczenia Rosenberga i Damusa (44) zdefiniowały rolę kompleksu antytrombina III – heparyna w procesie hemostazy. Heparyna bez antytrombiny III nie ma wpływu na układ krzepnięcia (8). Należy podkreślić, że trombina w nieobecności heparyny tylko w niewielkim stopniu wiąże się z antytrombiną III. Przypuszcza się, że heparyna, posiadająca dużą ilość ujemnie naładowanych grup siarczanowych, wiąże niektóre bogate w lizynę rejonu cząsteczki antytrombiny III, indukując w ten sposób zmiany konformacyjne pozwalające na ściślejsze wiązanie się kompleksu z trombiną. Czynnikiem limitującym neutralizację trombiny jest ilość

antytrombiny III. Ponieważ uważa się, że heparyna i antytrombina III tworzą kompleks w stosunku stechiometrycznym 1:1, wysycenie antytrombiny III przez heparynę jest niezwykle ważne w aktywacji tego procesu.

W 1974 roku Bloom i wsp. (7) po raz pierwszy oznaczyli poziom antytrombiny III przy użyciu syntetycznego substratu trójpetydowego, p-nitroanilidu benzoilo-fenylalanilo-valilo-argininy. Do oznaczenia użyto wówczas odwłóknionego osocza, celem zapobieżenia krzepnięciu próbki w kuwecie spektrofotometru i nie wprowadzono heparyny celem wysycenia antytrombiny III, co spowodowało, że oznaczono w ten sposób ogólną aktywność antytrombinową, włącznie z α_2 -makroglobuliną, wolno działającym inhibitorem trombiny.

Odegaard i wsp. (37) opisali następnie warunki dwustopniowego oznaczania kofaktora heparyny. Celem zapobieżenia powstawania włókniaka przy wysokich stężeniach fibrynogenu w próbce oznaczenia przeprowadzano przy wysokim pH i przy krańcowo wysokiej sile jonowej buforu (35). W tych warunkach inaktywacja trombiny przez heparynę i kofaktor następowała prawie natychmiast. Oznaczenie to obejmowało więc ogólną zdolność inaktywacyjną rozcieńczonego, heparynizowanego osocza, wyeliminowano jednocześnie możliwą interferencję z powstającymi produktami fibrynogenu lub pozostałym w próbce fibrynogenem. Zmiany w reaktywności antytrombiny III i wpływ innych inhibitorów wyeliminowano przez wprowadzenie próbki osocza do standaryzowanego buforu zawierającego heparynę, w którym heparyna całkowicie przechodziła w kompleks heparyna – antytrombina III. Po zakończeniu reakcji heparynę neutralizowano polibrenem i pozostała aktywność trombiny mierzono przy użyciu p-nitroanilidu fenylalanilo-alanilo-valilo-argininy.

Później Abildgaard i wsp. (2) opisali dwustopniową metodę oznaczania antytrombiny III przy użyciu dwu nowych substratów syntetycznych: p-nitroanilidu H-D-fenylalanilo-pipekolilo-argininy (S-2238) (10) i chromozyму TM (p-nitroanilidu tozyl-glicylo-prolilo-argininy) (46) z uwagi na to, że uprzednio używany substrat S-2160 jest trudno rozpuszczalny.

We wcześniejszych publikacjach (26, 27, 28) wykazaliśmy przydatność substratów chromogennych do oznaczania czynnika VII, czynnika VIII i endogennej heparyny w osoczu krwi dużych zwierząt gospodarskich.

Celem niniejszej pracy było określenie przydatności substratu S-2338 (p-nitroanilidu H-D-fenylalanilo-pipekolilo-argininy) do oznaczania aktywności antytrombiny III w osoczu krwi koni, bydła, owiec i świń.

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 krów (nbc, samice, wiek 3-4 lata, z gospodarstw prywatnych) i 20 świń (rasy wbp, samice, z tuczarni prywatnych).

Krew (9 obj.) pobierano z żyły jarzmowej w przypadku koni, bydła i owiec oraz z żyły brzeżnej ucha w przypadku świń, mieszano z 1 obj. 0,1 M roztworu cytrynianu sodu i wirowano przez 20 min. przy 2000 g.

Jako czynnika przyspieszającego reakcję między antytrombiną w osoczu a oczyszczonym preparatem trombiny używa się nadmiaru heparyny. Pozostałą ilość trombiny mierzy się na drodze pomiaru wzrostu ekstynkcji przy 405 nm podczas odszczepiania p-nitroaniliny od chromogennego substratu trójpetydowego S-2238.

Do termostatowanej (37°C) kuwety spektrofotometru wlać 400 μ l rozcieńczonej próbki osocza (50 μ l osocza + 3000 μ l 50 mM buforu Tris-HCl zawierającego 7,5 mM EDTA, 1% glikolu polietylenowego 8000 i 3 jedn./ml heparyny, pH 8,3). Dokładnie po upływie 30 sek. dodać 300 μ l 0,75 mM roztworu substratu S-2238 i mierzyć wartość ΔE_{405} przez 40 sek.

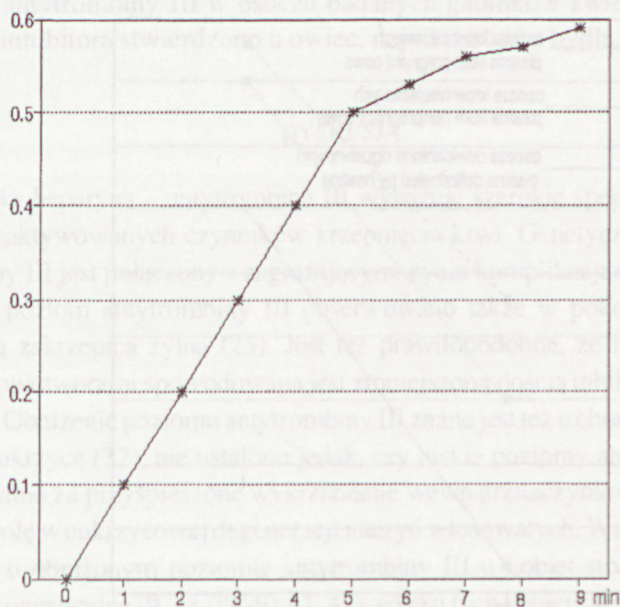
Jednostka inhibicji definiowana jest jako ilość inhibitora hamującego aktywność 1 μ kat trombiny. Jeden μ kat trombiny odpowiada 60 jednostkom międzynarodowym trombiny.

WYNIKI

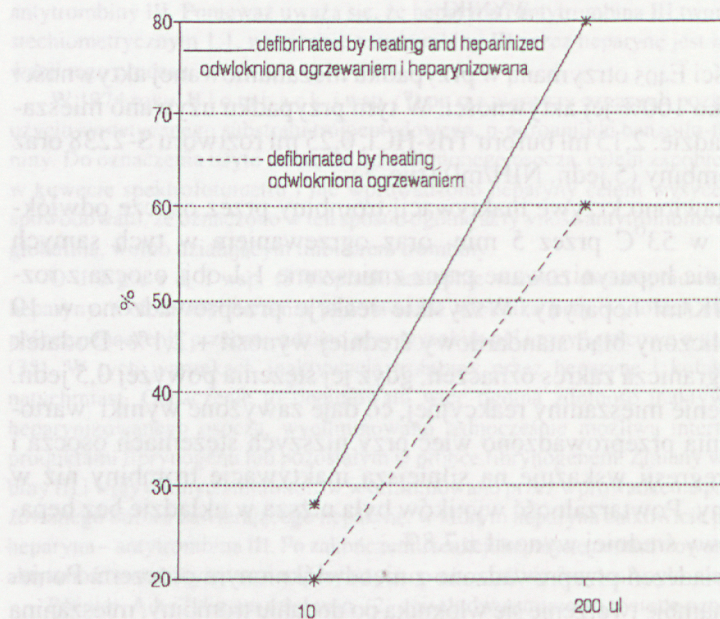
Różnicę w wartości E_{405} otrzymaną w przypadku niezahamowanej aktywności trombiny przyjęto jako 100% jej aktywności. W tym przypadku używano mieszaniny reakcyjnej o składzie: 2,15 ml buforu Tris-HCl, 0,25 ml roztworu S-2238 oraz 0,10 ml roztworu trombiny (5 jedn. NIH/ml) (ryc. 1).

Na ryc. 2 przedstawiono krzywe inaktywacji trombiny przez osocze odwłóknione ogrzewaniem w 53°C przez 5 min. oraz ogrzewaniem w tych samych warunkach, a następnie heparynizowane przez zmieszanie 1:1 obj. osocza z roztworem 20 jedn. NIK/ml heparyny. Wszystkie reakcje przeprowadzono w 10 powtórzeniach, a obliczony błąd standardowy średniej wynosił $\pm 2,1\%$. Dodatek heparyny znacznie ogranicza zakres oznaczeń, gdyż jej stężenia powyżej 0,5 jedn. ml powodują zmętnienie mieszaniny reakcyjnej, co daje zawyżone wyniki wartości ekstynkcji. Badania przeprowadzono więc przy niższych stężeniach osocza i heparyny. Krzywa regresji wskazuje na silniejszą inaktywację trombiny niż w układzie bez heparyny. Powtarzalność wyników była niższa w układzie bez heparyny, błąd standardowy średniej wynosił $\pm 7,8\%$.

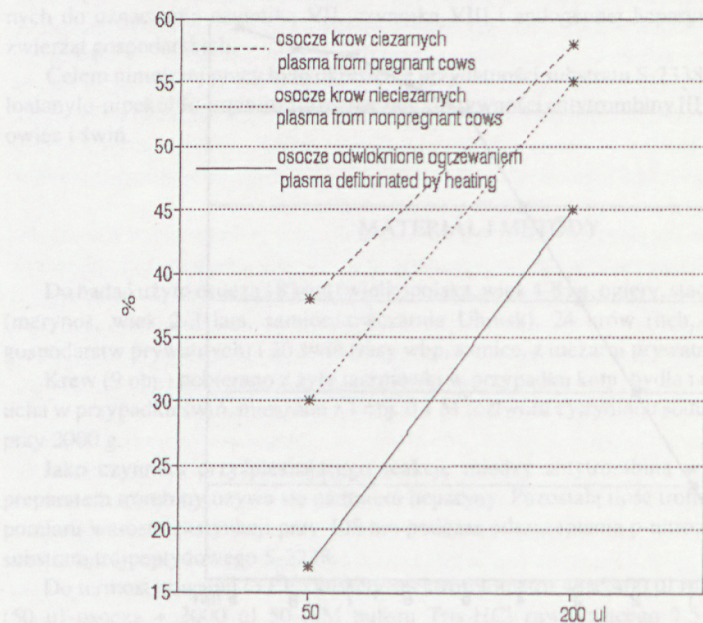
Dalszą serię doświadczeń przeprowadzono z nieodwłóknionym osoczem. Ponieważ substrat S-2238 hamuje tworzenie się włókniaka po dodaniu trombiny, mieszanina reakcyjna pozostaje przezroczysta (ryc. 3). Badania te wykonano także na osoczu krów wysokociężarnych, o stężeniach fibrynogenu 5,8-7,3 g/l. W tym przypadku hamowanie trombiny było także silniejsze niż w normalnym osoczu. Ryc. 4. przedstawia



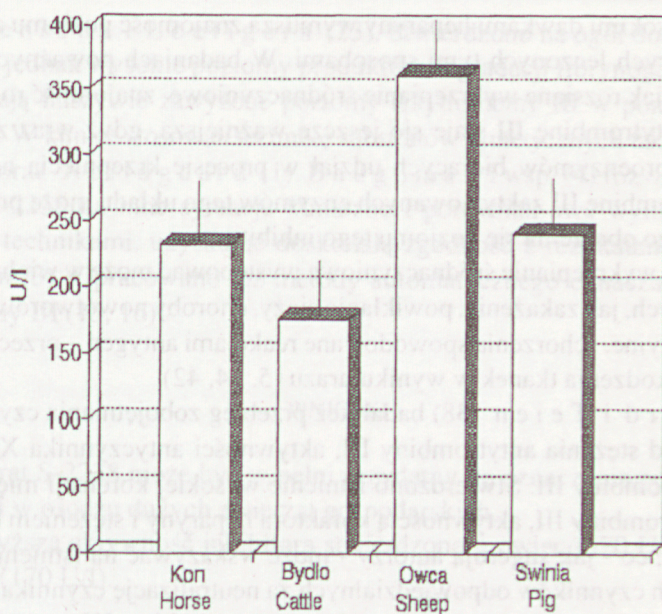
Ryc. 1. Powstawanie p-nitroaniliny podczas reakcji trombiny (5 IU/ml) i S-2238 (ΔE_{405})
Time-dependent formation of p-nitroaniline during the reaction between thrombin (5 IU/ml)
and S-2238 (ΔE_{405})



Ryc. 2. Inaktywacja trombiny przez różne ilości osocza
Inactivation of thrombin by various amounts of plasma



Ryc. 3. Inaktywacja trombiny z pominięciem odwiłknienia osocza
Inactivation of thrombin when defibrination is omitted



Ryc. 4. Poziom antytrombiny III w osoczu koni, bydła, owiec i świń (U/l). Wartości średnie $\pm$ S.D.
Antithrombin III levels in horse, cattle, sheep and pig plasma (U/l). Mean $\pm$ S.D.

aktywność antytrombiny III w osoczu badanych gatunków zwierząt. Najwyższą aktywność inhibitora stwierdzono u owiec, najniższą zaś u bydła.

DYSKUSJA

Kompleks heparyna – antytrombina III wykazuje szerokie spektrum aktywności względem zaktywowanych czynników krzepnięcia krwi. Genetycznie niski poziom antytrombiny III jest połączony z zagrażającymi życiu komplikacjami zakrzepowymi (17). Niski poziom antytrombiny III obserwowano także w pokoleniach rodzin z nawracającą zakrzepicą żylną (25). Jest też prawdopodobne, że nadkrzepliwość u chorych z nowotworami spowodowana jest zmniejszoną ilością inhibitorów krzepnięcia (29, 45). Obniżenie poziomu antytrombiny III znane jest też u chorych z marskością wątroby i cukrzycą (32), nie ustalono jednak, czy niskie poziomy antytrombiny III są odpowiedzialne za przyspieszone wykrzepianie wewnątrz naczyń, a tym samym odgrywają rolę w cukrzycowej degeneracji naczyń włosowatych. Ważne mogą też być doniesienia o obniżonym poziomie antytrombiny III u kobiet stosujących doustne środki antykoncepcyjne (9, 13, 39, 40, 41, 47), gdyż u tych kobiet zakrzepica występuje częściej w sposób statystycznie istotny (18).

Teoretycznie, obniżony poziom antytrombiny III może być przyczyną niekontrolowanego przebiegu procesów krzepnięcia. Stale wzrastająca częstość terapii

niskimi i wysokimi dawkami heparyny wymusza znajomość poziomu antytrombiny III u chorych leczonych tymi sposobami. W badaniach poważnych zaburzeń krzepnięcia, jak rozsiane wykrzepianie śródnaczyniowe, znajomość roli odgrywanej przez antytrombinę III staje się jeszcze ważniejsza, gdyż wraz z aktywacją wszystkich proenzymów biorących udział w procesie krzepnięcia neutralizacja przez antytrombinę III zaktywowanych enzymów tego układu może prowadzić do rzeczywistego obniżenia się poziomu tego inhibitora.

Rosiane wykrzepianie śródnaczyniowe występować może w wielu sytuacjach patologicznych, jak zakażenia, powikłania ciąży, choroby nowotworowe, powikłania pooperacyjne, schorzenia spowodowane reakcjami antygen – przeciwciało czy rozległe uszkodzenia tkanek w wyniku urazu (5, 14, 42).

O d e g a r d i T e i e n (38) badali też przebieg zubożniania czynnika Xa w zależności od stężenia antytrombiny III, aktywności antyczynika Xa i stężenia białka antytrombiny III. Stwierdzono istnienie wysokiej korelacji między aktywnością antytrombiny III, aktywnością kofaktora heparyny i stężeniem białka antytrombiny III, co – jak sugerują autorzy – może wskazywać na istnienie w osoczu dodatkowych czynników odpowiedzialnych za neutralizację czynnika Xa.

V i n a z z e r (49) oznaczył poziom antytrombiny III metodą podobną do B l o m b a c k a (7), porównując ją z metodami wzorcowymi, celem określenia dokładności przy użyciu odwłóknionej surowicy. Stosowano też metody pomijające odwłóknienie; wykorzystywano kompetycyjne hamowanie przez nadmiar substratu. M i t c h e l l i wsp. (30) zastosowali w oznaczaniu poziomu antytrombiny III metodę fluorometryczną, przy użyciu 4-metoksy-2-naftyloamidu karbobenzoksy-glicylo-prolilo-argininy jako substratu. Ze względu na wysoką czułość reakcji i małą objętość próbki (5 µl) w metodzie tej nie jest konieczne odwłóknienie, zaś wprowadzenie nadmiaru heparyny celem przeprowadzenia wszystkiej antytrombiny III w kompleks standaryzuje warunki reakcji. Użycie fluorometrii eliminuje też wpływ hemolizy lub zabarwienia próbek, np. spowodowanego bilirubiną czy hiperlipemią. Technikę tę zastosowano następnie do badań klinicznych poziomu antytrombiny III używając jako fluoroforu estru dwumetylowego kwasu 5-aminoozoftalowego (48). Kliniką przydatność metody oznaczania poziomu antytrombiny III przy użyciu substratu chromogennego S-2160 wykazali też O d e g a r d i T e i e n (38).

O d e g a r d i i wsp. (36) użyli syntetycznego substratu do badania oczyszczonej ludzkiej i bydlęcej trombiny i czynnika Xa i stwierdzili, że antytrombina III wywiera silniejszy efekt neutralizujący na bydlęcy czynnik Xa niż na bydlęcą trombinę. W przypadku ludzkiej trombiny i czynnika Xa efekt był przeciwny. Użycie hirudyny i inhibitora trypsyny z ziaren soi dla wybiórczego hamowania tych enzymów zapewnia niezależny pomiar aktywności tych dwu proteaz, przy jednoczesnej obecności ich obu w próbce.

F r i g o l a i wsp. (20) oznaczali poziom antytrombiny III porównując technikę syntetycznych substratów z techniką oznaczania czasu krzepnięcia

według H e n s e n a i L o e l i g e r a (23). Stwierdzono na ogół dobrą zgodność obu metod, jednak wysokie poziomy produktów degradacji fibrynogenu obecne w surowicy dają fałszywie zawyżone poziomy antytrombiny III w pomiarach czasu krzepnięcia. W klinice stosowali technikę substratów syntetycznych także F a r e e d i wsp. (19) oraz A b i l d g a a r d (1). B a u g h m a n i wsp. (4) rozszerzyli użycie substratu S-2238 na inne sytuacje kliniczne i porównali swe wyniki z ogólnie przyjętymi technikami, uzyskując doskonałą zgodność z rezultatami wcześniejszych badań (3). Opracowano też metody automatycznego oznaczania poziomu antytrombiny III (15, 16).

WNIOSKI

1. Substrat S-2238 może być w pełni przydatny do oznaczania poziomu antytrombiny III w osoczu dużych zwierząt gospodarskich.

2. Najwyższą aktywność inhibitora stwierdzono u owiec (370 U/l), najniższą zaś u bydła (170 U/l).

PIŚMIENICTWO

1. A b i l d g a a r d U.: Antithrombin assay using chromogenic substrates. [W:] Chromogenic Peptide Substrates (Scully M.F., Kakkar V.V., red.), Churchill Livingstone, London 1979, s. 171.
2. A b i l d g a a r d U., L i e M., O d e g a r d O. R.: Antithrombin (heparin cofactor) assay with new chromogenic substrates (S-2238 and Chromozym TH). *Thromb. Res.* **11**, 549, 1977.
3. B a u g h m a n D. J., L y t w y n A.: A novel chromogenic assay equivalent to the one stage prothrombin time. *Thromb. Haemost.* **42**, 291, 1979.
4. B a u g h m a n D. J., N a t e l s o n E. A., T r i p l e t t D. A., Z i m m e r m a n T. S.: Characteristics of amidolytic antithrombin III assay. *Thromb. Haemost.* **42**, 21, 1979.
5. B i c k R. L., D u k e s M. L., W i l s o n W. L., F e k e t e L. F.: Antithrombin III (AT-III) as a diagnostic aid in disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Res.* **10**, 721, 1977.
6. B i g g s R., D e n s o n K. W. E., A k m a n N.: Antithrombin III, anti factor Xa and heparin. *Br. J. Haematol.* **19**, 283, 1970.
7. B l o m b a c k M., B l o m b a c k B., O l s s o n P., S v e n d s e n L.: The assay of antithrombin using a synthetic chromogenic substrate for thrombin. *Thromb. Res.* **5**, 621, 1974.
8. B r i n k h o u s K. M., S m i t h H. P., W a r n e r E. D.: The inhibition of blood clotting: an unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion of prothrombin into thrombin. *Am. J. Physiol.* **125**, 683, 1939.
9. C a r v a l h o A. C., V a i l l a n c o u r t R. A., C a b r a l R. S., L e e s R. S., C o l m a n R. W.: Coagulation abnormalities in woman taking oral contraceptives. *J. Am. Med. Assoc.* **237**, 875, 1977.
10. C l a e s o n G., A u r e l l L., K a r l s s o n G., F r i b e r g e r P.: Substrate structure and activity relationship. [W:] New Methods for the Analysis of Coagulation Using Chromogenic Substrates (Witt I., red.), Walter de Gruyter, Berlin-New York 1977, s. 37.
11. C o l l e n D.: Identification and some properties of a new fast-reacting plasmin inhibitor in human plasma. *Eur. J. Biochem.* **69**, 209, 1976.
12. C o l l e n D., D e C o c k F., V e r s t r a e t e M.: Immunological distinction between antiplasmin and α_1 -antitrypsin. *Thromb. Res.* **7**, 245, 1975.

13. Daume E., Wenzel K., Reifschneider G., Knoell K.G., Brueckner T.: Influence of oral contraceptives with various amounts of different estrogens and of estradiol valerianate conjugated estrogens and estradiol on antithrombin III. *J. Steroid. Biochem.* **9**, 864, 1978.
14. De Boer A.C., Van Riel L.A.M., Den Ottolander G.J.H.: Measurement of antithrombin III, 2-macroglobulin and 1-antitrypsin in patients with deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Thromb. Res.* **15**, 17, 1979.
15. Dettori A.G., Civandi E., Magni R., Fenili D., Ponari O.: Automated kinetic assay for antithrombin III with a chromogenic substrate. *Thromb. Haemost.* **42**, 20, 1979.
16. Dunikoski C.K., Myrmel K.H., Derzak M.T.: Automated chromogenic antithrombin III assay with a centrifugal analyzer. *Clin. Chem.* **25**, 1076, 1979.
17. Edgeberg O.: Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **13**, 516, 1965.
18. Fagerhol M.K., Abildgaard U.: Immunological studies on human antithrombin III. *Scand. J. Haematol.* **7**, 10, 1970.
19. Fareed J., Nessmore H.L., Balis J.U.: Current status of methodologies for antithrombin III and heparin with the advent of peptide chromogenic substrates. [W:] *Chromogenic Peptide Substrates* (Scully M.F., Kakkar V.V., red.), Churchill Livingstone, London 1979, s. 183.
20. Frigola A., Angeloni S., Cerquetti A.R.: Determination of antithrombin activity by an amidolytic and clotting procedure. *J. Clin. Pathol.* **32**, 21, 1979.
21. Harpel P.C., Rosenberg R.D.: α_2 -macroglobulin and antithrombin - heparin cofactor: modulators of hemostatic and inflammatory reaction. *Prog. Haemost. Thromb.* **3**, 154, 1976.
22. Heimburger N.: Biochemistry of proteinase inhibitors from human plasma: A review of recent developments. [W:] *Proteinase Inhibitors* (Fritz H., Tschesche H., Greene L.F., red.), Springer Verlag, Berlin 1974, s. 14.
23. Hensen A., Loeliger E.A.: Antithrombin III. Its metabolism and its function in blood coagulation. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **9** (Suppl. 1), 13, 1963.
24. Huseby R.M., Smith R.E.: Synthetic oligopeptide substrates. Their diagnostic application in blood coagulation, fibrinolysis and other pathological states. *Semin. Thromb. Haemost.* **6**, 175, 1980.
25. Lane J.L.: Some immunological investigations on antithrombin III Budapest. *Br. J. Haematol.* **40**, 459, 1978.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Losito R., Beaudry R., Valderrama J.D., Cousineau L., Longre B.: Antithrombin III and factor VII in patients with neoplasma. *Am. J. Clin. Pathol.* **68**, 258, 1977.
30. Mitchell G.A., Hudson P.M., Huseby R.M., Lawson D.E., Pochron S.P., Schuanes J.A.: Assay for plasma heparin using a synthetic peptide substrate for thrombin: introduction of the fluorophore aminoisophthalic acid dimethyl ester. *Thromb. Res.* **13**, 47, 1978.
31. Monkhouse F.C., France E.S., Seegers W.H.: Studies on the antithrombin and heparin cofactor activities of a fraction absorbed from plasma by aluminum hydroxide. *Circ. Res.* **8**, 397, 1955.
32. Monnier L., Folléa G., Nirouze J.: Antithrombin III deficiency in diabetes mellitus: influence on vascular degenerative complications. *Horm. Metab. Res.* **10**, 470, 1978.
33. Moroi M., Aoki N.: Isolation and characterization of 2-plasmin inhibitor from human plasma. *J. Biol. Chem.* **251**, 5956, 1976.

34. Mullertz S., Clemmensen I.: The primary inhibition of plasmin in human plasma. *Biochem. J.* **259**, 545, 1976.
35. Odegard O. R.: Evaluation of an amidolytic heparin cofactor assay method. *Thromb. Res.* **7**, 351, 1975.
36. Odegard O. R., Abildgaard U., Lie M., Miller-Andersson M.: Inactivation of bovine and humanthrombin and factor Xa by antithrombin studied with amidolytic methods. *Thromb. Res.* **11**, 205, 1977.
37. Odegard O. R., Lie M., Abildgaard U.: Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method. *Thromb. Res.* **6**, 287, 1975.
38. Odegard O. R., Teien A. N.: Antithrombin III, heparin cofactor and antifactor Xa in a clinical material. *Thromb. Res.* **8**, 173, 1976.
39. Poller L.: Oral contraceptives, blood clotting and thrombosis. *Br. Med. Bull.* **34**, 151, 1978.
40. Poller L., Thomson J. M., Otridge B. W., Yee K. F., Logam S. H. M.: Effects of manufacturing oral contraceptives on blood clotting. *Br. Med. J.* **1**, 1761, 1979.
41. Rakoczi I., Nagy I., Szigetvari I., Losonczy H., Hadnagy J., Gati I.: Oestrogen containing oral contraceptives and antithrombin III activity. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **45**, 281, 1974.
42. Rapaport S. I.: Defibrination syndromes. [W:] *Hematology* (Williams W. J., Seutler E., Erslev A. J., Rundles R. W., red.), McGraw - Hill, New York 1972, s. 1454.
43. Rosenberg R. D.: Actions and interactions of antithrombins and heparin. *N. Engl. J. Med.* **292**, 146, 1975.
44. Rosenberg R. D., Damus P. S.: The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* **248**, 6490, 1973.
45. Sun N. C. J., McAfee W. M., Hum G. J., Weiner J. M.: Hemostatic abnormalities in malignancy, a prospective study of one hundred eight patients. I. Coagulations studies. *Am. J. Clin. Pathol.* **71**, 10, 1979.
46. Svendsen L., Stocker K.: Die Bestimmung von Protease-Aktivitäten mit gezielt konstruierten Peptid-p-Nitroanilid Derivaten. [W:] *New Methods for the Analysis of Coagulation Using Chromogenic Substrates* (Witt I., red.), Walter de Gruyter, Berlin-New York 1977, p. 23.
47. Toddywalla V. S., Virkar K. D., Virkar M. S.: Antithrombin III levels in Indian women during pregnancy, post partum and intake of oral contraceptives. *J. Obstet. Gynecol. India* **28**, 52, 1978.
48. Triplett D. A., Harms C., Huseby R. N., Mitchell G. A., Pochron S. P.: Clinical studies of the use of a fluorogenic substrate assay for the determination of antithrombin III activity. *Thromb. Haemost.* **42**, 20, 1979.
49. Vinazzer H.: Photometric assay of antithrombin III with a chromogenic substrate. *Haemostasis* **4**, 101, 1975.
50. Waugh D. F., Fitzgerald M. A.: Quantitative aspects of antithrombin and heparin in plasma. *Am. J. Physiol.* **184**, 627, 1956.
51. Yin E. T., Wessler S., Stoll P. J.: Identity of plasma-activated factor X inhibition with antithrombin III and heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* **246**, 3712, 1971.

SUMMARY

The usefulness of synthetic chromogenic tripeptide substrate H-D-phenylalanyl-pipecolyl-argi-nyl-p-nitroanilide in antithrombin III level determination in horse, cattle, sheep and pig plasma was investigated. It was stated that this substrate is fully serviceable in determination of this inhibitor in veterinary haematology. The highest antithrombin activity was observed in sheep, the lowest one in cattle.