

H. KOWARZYK, K. BULUK I J. OLEARCZYK

ROLA PROTEAZY KRWI W MECHANIZMIE KRZEPNIĘCIA

(Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Kierownik: Prof. Dr Hugon Kowarzyk)

Praca zgłoszona na Zjazd Fizjologów Polskich w Warszawie w dniach 28 i 29 maja 1950 r.

W poprzednich doniesieniach wykazano, że w krzepnącej samoistnie krwi i osoczu szczawianowym po rekalcynacji oraz w krzepnącym roztworze euglobulin osocza różnogatunkowego pochodzenia, zadany solą wapnia, zachodzi przyrost azotu niebiałkowego. Zjawisko to interpretowano jako proteolizę związaną z mechanizmem krzepnięcia.

Obecnie donosimy, że proteaza przez nas badana pojawia się w układach złożonych z oczyszczonych preparatów protrombiny i fibrynogenu, zanieczyszczonych lub zadanych trombokinazą osoczą; układy te krzepną za dodatkiem soli wapnia i równocześnie pojawiają się w nich substancje azotowe niebiałkowe, świadczące o procesie proteolitycznym, uruchomionym w czasie krzepnięcia. Interpretujemy te doświadczenia jako aktywację „profibrynolizyny“ stale obecnej w osoczach różnogatunkowego pochodzenia. Aktywacja ta zachodzi w tych samych warunkach, w jakich aktywuje się protrombina w trombinę; nei udało się dotąd obu procesów od siebie oddzielić.

Preparaty użyte do doświadczeń:

1) Doświadczenia dokonano na trzech preparatach fibrynogenu, które określamy jako: 1) surowy, 2) bezprotrombinowy, 3) wysoko oczyszczony.

Preparat fibrynogenu „surowego“ był to strął fibrynogenu, utrzymywany z osocza przez wymrażanie, zawierający około 30% białek niekrzepnących. Krzepł on po dodaniu soli wapnia, zawierał zatem protrombinę i kinazę osoczoową.

Preparat fibrynogenu „bezprotrombinowego“ sporządzano z osocza, pozbawionego protrombiny przez adsorbcję na węglanie baru. Preparat ten z reguły nie krzepł pod wpływem soli wapnia, chociaż w niektórych doświadczeniach po upływie dłuższego czasu pojawiały się w nim nitki włóknika.

Preparat fibrynogenu „wysoko oczyszczonego“ otrzymywano z osocza, pozbawionego protrombiny, z którego usunięto część globulin przez dializę. Strął fibrynogenu z tego osocza, uzyskany przez wymrażanie, był dwukrotnie uwalniany od zanieczyszczeń przez wytrącanie alkoholem. Zawierał on średnio około 6% zanieczyszczeń białkowych, niekrzepnących. Preparat ten nie krzepł za dodatkiem soli wapnia; za dodatkiem protrombiny i soli wapnia pojawiały się w nim po dłuższym czasie ślady nitek włóknika, jako znak, że preparaty te nie były całkowicie wolne od trombokinazy osoczowej.

2) Użyte w doświadczeniach preparaty protrombiny pochodziły z osocza bydlęcego i uzyskane były w kilkustopniowym postępowaniu według przepisu W. H. Seegersa, E. C. Loomisa, J. N. Vandenbelta (1945). Preparaty te były w znacznym stopniu wolne od akceleratora globulinowego, moc ich określona w jednostkach wrocławskich wynosiła w układach badanych przeciętnie 30 j.wr. (j.wr. = jednostka wrocławska). System jednostkowania oparty jest na oznaczaniu mocy trombiny. Jednostkę mocy ma preparat trombiny powodujący krzepnięcie równej objętości osocza szczawianowego ludzkiego w czasie 30 sekund w temp. 37° C.).

3) Preparaty trombiny „samorodnej“ użyte w doświadczeniach są pochodzenia czysto osoczowego, bez dodatku tromboplastyny tkankowej. Ich moc wynosiła w układach badanych przeciętnie około 3 j.wr.

4) Preparat „fibrylizyny“ z osocza krwi psa, był izolowany metodą K. N. v. Kauli (1949). Preparat ten tworzy mleczny roztwór w fizjologicznym roztworze soli kuchennej z dodatkiem

0,25% boraksu. Roztwór fibrynolizyny w ostatecznym stężeniu $\frac{2}{3}$ % upłynnia skrzep rekalcynacyjny szczawianowego osocza ludzkiego rozcieńczonego 18 razy w czasie mniej więcej 30 minut. Fibrynolizyna nie powoduje w obecności soli wapnia konwersji protrombiny w trombinę w preparatach oczyszczonych, jest zatem wolna od trombokinazy; fibrynolizyna nie przyspiesza konwersji protrombiny w trombinę w obecności tromboplastyny mózgowej i soli wapnia, nie zawiera zatem akceleratora globulinowego, opisanego przez A. G. Ware'a, M. M. Guesta i W. H. Seegersa (1947). Wreszcie użyty w tej pracy preparat fibrynolizyny nie zawiera, w przeciwieństwie do preparatów Rocha e Silva (1948), trombiny.

5) Preparat trombokinazy osoczowej uzyskano w drodze modyfikacji przepisu Milstone'a (1948) z osocza szczawianowego ludzkiego lub bydłowego po usunięciu większości fibrynogenu przez kryolizę i po adsorbcji protrombiny przy pomocy węgla baru. Globuliny wytrącone za pomocą dwutlenku węgla dokładnie oddzielono przez wirowanie i rozpuszczono w fizjologicznym roztworze soli kuchennej z dodatkiem 0,25% boraksu i 0,001 mol szczawianu potasu. Preparat zawiera ślady fibrynogenu; z dodatkiem soli wapnia nie krzepnie i nie wytwarza trombiny. Roztwór reaguje wolno z protrombiną w obecności soli wapnia, dając trombinę i fibrynolizynę.

Wszystkie preparaty były rozpuszczane i rozcieńczane w roztworze fizjologicznym soli kuchennej z dodatkiem 0,001 mol szczawianu potasu. Roztwór chlorku wapnia był 0,025 mol; dodawano go stale po 2 cm³ do układów krzepnących o przeciętnej objętości 10 cm³. Doświadczenia przeprowadzano w łaźni wodnej albo w temp. 37°C przez 15' albo w temp. 20°C przez 1 godz.

Zastosowano technikę badań azotu niebiałkowego identyczną z opisem w doniesieniu H. Kowarzyka i M. Szerchy (1949).

Wyniki badań:

Związek krzepnięcia krwi z proteolizą wynika z serii doświadczeń, przedstawionych w Tabl. I.:

Tablica I.

Fibrynogen	Do- świad- czenie	Ilość pomiarów	Sposób aktywacji (20°C-1h)	Δ RN/100 mg fibrynogenu w mg
Surowy	I.	6	Ca ⁺⁺	0,150 (0,096—0,226)
Bez-protrombino- wy, surowy	IIa.	6	Ca ⁺⁺	0,018 (—0,008—+0,052)
	b.	4	Protrombina wolna od Tromb.	0,011 (—0,029—+0,041)
	c.	15	Protrombina +Ca ⁺⁺	0,160 (0,046—0,378)
Bez-protrombino- wy, wysokiej czystosci	IIIa.	6	Protrombina zanieczyszczona ślądem Trombiny	0,043 (—0,005—+0,095)
	b.	6	Trombina samorodna (37°C—15')	0,191 (0,104—0,300)

W doświadczeniu I. zmierzono przyrost azotu niebiałkowego, który zachodzi w rekalcynowanym roztworze bydlęcego fibrynogenu „surowego“, zawierającego wystarczające do skrzepnięcia ilości protrombiny i trombinazy osoczowej.

W doświadczeniu II. zmierzono przyrost azotu niebiałkowego, zachodzący w takim samym surowym preparacie fibrynogonu, pozbawionym jednak zupełnie lub prawie zupełnie protrombiny. Roztwór taki nie krzepł lub krzepł tylko w śladzie, po dodaniu soli wapnia. Przeciętnie też dał przyrost azotu niebiałkowego około 9 razy mniejszy od krzepnącego fibrynogenu, zawierającego protrombinę (dośw. IIa.), bezprotrombinowy fibrynogen nie krzepł też po zadaniu czystym preparatem protrombiny w nieobecności jonu wapnia i w tych warunkach nie dawał przyrostu azotu niebiałkowego (dośw. IIb), natomiast zadany równocześnie protrombiną i chlorkiem wapnia krzepł całkowicie i dał przyrost azotu niebiałkowego (dośw. IIc), podobnych rozmiarów jak w dośw. I.

W doświadczeniu III użyto wreszcie bardzo czystych roztworów fibrynogenu, nie zawierających protrombiny a tylko

śląd trombokinazy. Roztwory te nie krzepły, lub krzepły tylko niezupełnie po zadaniu chlorkiem wapnia i protrombiną. (Dośw. IIIa). Przeciętny przyrost azotu niebiałkowego był w tych warunkach bardzo niski, około 4 razy niższy od przyrostu w roztworach fibrynogenu mniej oczyszczonych (dośw. I i IIc). Preparaty fibrynogenu wysokiej czystości nie były zdenaturowane, gdyż zadane roztworem trombiny krzepły samoistnie z normalnym przyrostem azotu niebiałkowego (dośw. IIIb).

Z opisanych doświadczeń wynika, że przyrost azotu niebiałkowego występuje ściśle w tych samych warunkach, w których powstawała trombina w układach badanych, a nie występuje lub występuje tylko w małym stopniu w warunkach, w których układ nie był trombinotwórczy, lub w układzie, który wytwarzał bardzo małe ilości trombiny.

W drugiej serii doświadczeń badano wpływ fibrylizyny i preparatu „trombokinazy osoczowej“ na mechanizm krzepnięcia. Typowy przebieg doświadczeń był następujący:

Dodatek równej objętości preparatu trombokinazy do ludzkiego osocza skracał czas krzepnięcia po rekalcynacji z 4 minut na 2 minuty. Jeżeli trombokinaza osoczowa była uprzednio inkubowana w temperaturze 37 stopni z chlorkiem wapnia, dodatek jej do osocza nie powodował dalszego skrócenia czasu krzepnięcia.

Preparat fibrylizyny nie powodował krzepnięcia rekalcynowanego osocza pozbawionego protrombiny, ani też nie przyspieszał przemiany protrombiny oczyszczonej w trombinę, w układzie zawierającym tromboplastynę z mózgu królika i sól wapnia. Preparat fibrylizyny uzyskany metodą Kaulli nie zawiera ani trombiny, ani trombokinazy lub protrombiny, ani wreszcie czynników przyspieszających konwersję protrombiny opisanych pod nazwą „trombotropina“ przez Andrejenkę (1948), lub „akcelerator globulinowy“ przez Ware'a, Guesta i Seegera (1947).

W dalszym ciągu doświadczeń sporządzono dwa układy trombinotwórcze A i B i zbadano je w sposób który wynika z tablicy II.

Tablica II.

Układ A: 1 vol. preparatu protrombiny + 1 vol. preparatu trombokinazy + 1 vol. (NaCl 0,9% + Na₂B₄O₇ 0,25%) + 1 vol. CaCl₂

Układ B: 1 vol. preparatu protrombiny + 1 vol. preparatu trombokinazy + 1 vol. preparatu fibrynolizyny + 1 vol. CaCl₂.

Oba układy umieszczono w łaźni wodnej 37°C

Na czas:	2'	3'	5'	7'	9'	13'	15'	20'	40'
----------	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----

0,5 ml układu A i B przenoszono do 0,5 ml osocza bezprotrombinowego

Czas krzepnięcia osocza bezprotrombinowego	A	∞	∞	~7'	~5'	~3'	54''	46''	27''	13''
	B	∞	~10'	~2'	75''	45''	22''	17''	17''	13''

Z Tabl. II wynika, że czas konwersji protrombiny w trombinę w obecności preparatu trombokinazy i soli wapnia (układ A) znacznie się skraca za dodatkiem fibrynolizyny (układ B). Fibrynolizyna przyspiesza wytwarzanie trombiny tylko w obecności preparatu trombokinazy osoczowej; tłumaczymy to spostrzeżenie obecnością w tych preparatach nieczynnej formy trombokinazy, tzn. „protrombokiny”. Jednak definitywna moc trombiny jest w układzie A i B mniej więcej jednakowa na dowód że cała protrombokinaza uległa także bez dodatku fibrynolizyny przekształceniu w czynną trombokinazę.

W układzie A obok trombiny pojawia się równocześnie proteaza; układ A dodany do roztworu fibrynogeny powoduje jego skrzepnięcie i przyrost azotu niebiałkowego tak, jak trombina samorodna w doświadczeniu IIIb. na tablicy I. Preparaty trombiny, uzyskane zatem z oczyszczonej protrombiny, skonwertowanej za pomocą trombokinazy osoczowej, zawierają proteazę, podobnie jak preparaty trombiny samorodnej.

Z doświadczeń opisanych wynika następująca interpretacja procesu krzepnięcia: w pierwszej fazie krzepnięcia „pro-fibrynolizyna” w bliżej nieokreślony sposób aktywuje się

w fibrynolizynę, fibrynolizyna z protombokinazą daje trombokinazę osoczkową, która reagując z protrombiną daje trombinę. Nie wyjaśnione jest w jaki sposób w czasie krzepnięcia powstaje z profibrynolizyny fibrynolizyna oraz czy obecność akceleratora globulinowego jest potrzebna do reakcji protrombiny z trombokinazą osoczkową.

Spostrzeżenia nasze dotyczące fibrynolizyny potwierdzają i uzupełniają doniesienie J. H. Fergusona i współpracowników (1947) o tromboplastycznym działaniu proteazy osoczowej w mechanizmie krzepnięcia.

PIŚMIENNICTWO

1. A n d r e j e n k o. Dokłady Akademii Nauk ZSRR. 1948, 61, 1117.
2. K. B u l u k. O przyroście azotu niebiałkowego w krzepającym osoczu krwi zwierzęcej i krzepającym roztworze globulin osocza. Przegląd Lekarski 1949. Nr 13—14. 483—441.
3. J. H. F e r g u s o n. B. L. T r a v i s i E. B. G e r h e i m: Thromboplastic Action of Plasma Protease (Trypsin). Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1947, 64: 302—305.
4. K. N. v. K a u l l a: Extraction of fibrinolytic enzyme from the blood. Nature, 1949, 164: 408.
5. H. K o w a r z y k, M. S z e r c h a, K. B u l u k, Z. K r z y s z t o ń: O mechanizmie krzepnięcia krwi. Sprawozdania Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego, 1948, 3: 268—269.
6. H. K o w a r z y k i M. S z e r c h a: Metoda badania proteolitycznych własności krwi. Acta Biologiae Experimentalis, 1949 vol. XV. Supl. Nr 16.
7. H. K o w a r z y k M. S z e r c h a, K. B u l u k i Z. K r z y s z t o ń: Dalsze badania nad mechanizmem krzepnięcia krwi. Sprawozdania Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego, 1949, 4 (w druku).
8. H. K o w a r z y k, M. S z e r c h a, K. B u l u k, Z. K r z y s z t o ń: O proteolitycznej teorii krzepnięcia. Acta Biologiae Experimentalis, 1949, vol. XV. Nr 17.
9. Z. K r z y s z t o ń: O przyroście azotu niebiałkowego w krzepającym osoczu krwi ludzkiej, Przegląd Lekarski 1949, Nr 10. 311—314.
10. J. H. M i l s t o n e: Three-stage analysis of blood coagulation Journal of General Physiology, 1948, 31: 301—324.
11. M. R o c h a e S i l v a i C. R i m i n g t o n: Studies on the Activation and Purification of Blood Fibrinolysin, The Biochemical Journal 1948, 43: 163—168.

12. W. H. S e e g e r s, E. C. L o o m i s i J. M. V a n d e n b e l t: Preparation of Prothrombin Products: Isolation of Prothrombin and its Properties. Archives of Biochemistry 1945. 6: 85—95.
13. M. S z e r c h a: O różnicy poziomu reszty azotowej w osoczu i surowicy krwi. Przegląd Lekarski 1947, Nr 21—22. 741—746.
14. A. G. W a r e, M. M. G u e s t i W. H. S e e g e r s: A Factor in Plasma which accelerates the Activation of Prothrombin. The Journal of Biological Chemistry, 1947, 169: 231—232.

H. KOWARZYK, K. BULUK & J. OLEARCZYK

BLOOD PROTEASE AND CLOTTING MECHANISM

(Department of general & experimental Pathology. Medical Academy in Wrocław).

It was reported in a series of earlier papers, that during the clotting of native blood (as well as that of recalcinated oxalate plasma and of calcinated eu-globulin solution) an increase of Non-Protein-Nitrogen (NPN) was noted. The proteins were precipitated by the Pincussen-reagent (trichloroacetic acid and Na_2WO_4).

In the present work we have demonstrated, that the protease causing this increase of NPN is activated under strictly the same conditions, as are essential for the conversion of prothrombin to thrombin. Both reactions, the prothrombin conversion and the activation of protease take place in purified clot-forming systems.

Three preparations of fibrinogen were used in the following experiments.

One of them, described below as „crude fibrinogen“ clotted spontaneously if calcium salt was added; so it contained all the factors taking part in the clotting mechanism except the Ca-ions.

A second preparation was obtained in the same way as the „crude fibrinogen“ except that the plasma was first adsorbed by BaCO_3 . The solution did not form clots immediately after addition of Ca — salt, but scanty fibrin threads were formed after standing some 15 minutes at 37° C. This preparation is described below as „Prothrombin — free fibrinogen“.

The third preparation described as „purified fibrinogen“ did not clot with Ca- ions and gave only incomplete and scanty clots, if Ca — salt was added together with a purified prothrombin solution prepared by the method of Seegers, Loomis and Vandebelt. Some of the prothrombin preparations were entirely free of thrombin, some of them slowly produced traces of thrombin.

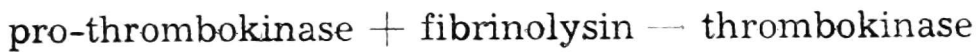
T a b l e I.

Fibrinogen preparation	Number of determinations	Addde	mgs of NPN-increase per 100 mg fibrinogen Average & range
„Crude“	6	Ca ⁺⁺	0,15 (0,10 — 0,23)
	6	Ca ⁺⁺	0,02 (— 0,01 — + 0,05)
„Prothrombin-free“	4	prothrombin	0,01 (— 0,03 — + 0,04)
	15	prothrombin +Ca ⁺⁺	0,16 (0,05 — 0,38)
„Purified“	6	prothrombin (traces of thrombin)	0,04 (— 0,01 — + 0,09)
	6	crude thrombin	0,19 (0,10 — 0,30)

It is evident from the table I that with varying specimens of fibrinogen the amount of NPN increase is varying. The increase of NPN is distinctly connected with the formation of thrombin in the different fibrinogen preparations. It falls below the error of the method, if no thrombin, or eventually traces of thrombin only are formed under the conditions enumerated in the table.

The procedure of purification does not denaturate the fibrinogen; our highly purified preparations gave the usual increase of NPN, well known from our earlier observations, after addition of a crude, thrombin preparation, containing the active blood protease.

A fibrinolysin preparation obtained according to the method of Kaulla does not contain thrombin, thrombokinase, prothrombin or the globulin-accelerator. Nevertheless it speeds up the formation of clot in the solution of plasma eu-globulins. This statement being in accord with similar observation of Ferguson, Travis & Gerheim is interpreted, as an activation of the following reaction:



The activation of plasma-protease and the thrombin formation seem to be closely linked in time and probably one having mutual influence on the other.