

## TROMBINA, PROTEAZA TROMBINOWA I PLAZMINA

Z Zakładu Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Akademii Medycznej we Wrocławiu

Kierownik: Prof. dr H. Kowarzyk \*\*

W latach 1946 do 1950 ustalono w tutejszym zakładzie na stosunkowo obszernym materiale doświadczalnym, że we wszystkich warunkach krzepnięcia czy to w pełnym osoczu krwi człowieka i ssaków, czy to w oczyszczonych preparatach fibrynogenu i trombiny zachodzi proteoliza fibrynogenu z przyrostem azotu niebiałkowego (Kowarzyk i współpracownicy 1948, 1949, 1950; Szercha 1947; Krzysztoń 1949; Buluk 1949; Olearczyk 1950). Wynik ten został potwierdzony w niezależnej pracy przy użyciu najczystszych dotychczasowych preparatów trombiny przez Loranda i Middlebrooka (1951). Ponadto Lorand wspólnie z Bailey'em, Bettelheimem i Middlebrookiem (1951) stwierdzili we włókniku obecność wolnych grup aminowych glikokolu, których nie ma w fibrynogenie. Fakt proteolizy podczas krzepnięcia został po roku 1950 potwierdzony również na materiale z krwi kury (Buluk 1951), ryby (Jara 1952) i hemolimfy raka (Buluk i Katusza 1953). W ten sposób został definitywnie ustalony udział proteolizy w krzepnięciu, który był przedtem wielokrotnie, ale dorywczo obserwowany, po raz pierwszy przez Petitjeana (1922), następnie przez Fuchsa i Zakrzewskiego (1934), Presnella (1938), Mac Fadyena (1942), wreszcie Christensena i Lyncha (1946). Proteazę, która rozkłada fibrynogen w czasie krzepnięcia nazywamy obecnie proteazą trombinową, ponieważ okazało się, że powstaje ona zawsze w tych samych warunkach, w jakich następuje aktywacja trombiny z protrombiny (Kowarzyk 1950, Kowarzyk, Buluk i Olearczyk 1950).

Lorand i Middlebrook (1951 i 1952) wypowiedzieli hipotezę, że działanie trombiny na cząsteczkę fibrynogenu polega na odszczepianiu peptydu nazwanego „peptydem fibrynowym“. Odszczepienie tego peptydu uwalnia centra powinowactw, które wiążą cząsteczki monomerów fibrynowych w siatkę przestrzenną skrzepu. Tę drugą fazę krzepnięcia uważa się za nieenzymatyczną polimeryzację (Laki i Mommaerts 1945, Belicer i współpr. 1952, 1953). Według tej hipotezy trombina byłaby identyczna z proteazą trombinową. Teoria oparta była pierwotnie na analizie wolnych grup aminowych fibrynogenu i włóknika oraz na koincydencji czasowej przyrostu azotu niebiałkowego z krzepnięciem roztworu fibrynogenu zadanego trombiną. Do tego dołączyły się obecnie dalsze spostrzeżenia z naszej pracowni:

1. Przyrost azotu niebiałkowego podczas konwersji fibrynogenu w fibrynę jest niezależny od pochodzenia gatunkowego preparatu trombiny;

\* Obecnie Kierownik Zakładu Patologii Ogólnej i doświadczalnej A. M. w Białymstoku.

\*\* W pracy brał techniczny udział lek. J. Olearczyk.

przyrost azotu niebiałkowego jest tego samego rzędu przy krzepnięciu fibrynogenu bydłęcego pod wpływem preparatów trombiny pochodzących z krwi filogenetycznie odległych gatunków, jak różne ssaki, kura i karp.

2. Fibrynogen hemolimfy raka krzepnie pod wpływem bezpośredniego działania enzymu z rozpadających się hemocytów. Przyrost azotu niebiałkowego podczas krzepnięcia tego fibrynogenu jest tego rzędu, co przyrost azotu przy konwersji fibrynogenu kręgowców. Mianowicie gdy u człowieka przyrost azotu niebiałkowego roztworu globulin niezagęszczonych w przeliczeniu na 100 cm<sup>3</sup> wynosi przeciętnie 0,19 mg, w analogicznym preparacie z hemolimfy raka wynosi on przeciętnie 0,16 mg. Według danych z piśmiennictwa, hemolimfa raka zawiera z reguły fibrynogen w ilości około 0,4%. Mimo, że w układzie krzepnięcia hemolimfy raka nie udaje się wykazać trombiny i układ ten reprezentuje archaiczny typ krzepnięcia odmienny od układu krzepnięcia kręgowców, konwersja fibrynogenu hemolimfy w fibrynę ma charakter proteolityczny, jak u kręgowców.

Nigdy dotąd nie udało się uzyskać konwersji fibrynogenu w fibrynę, której by nie towarzyszyła proteoliza.

Zjawisko upłynnienia zachodzące w skrzepie globulin izolowanych z osocza krwi było badane w naszym Zakładzie od roku 1949. Stwierdziliśmy wówczas, że między rozplywaniem się skrzepu a przyrostem azotu niebiałkowego nie ma związku. Skrzep po upłynnieniu zawiera tylko nieznaczną nadwyżkę substancji azotowych niebiałkowych w porównaniu z pomiarem azotu bezpośrednio po krzepnięciu (*Buluk* 1949). Fibrynoliza zatem jest procesem proteolitycznym, w którym produkty rozpadu włókna ujawniają się tylko w małej frakcji jako azot niebiałkowy. Przypuszczaliśmy, że „fibrynolizyna“ jest innym enzymem niż proteaza trombinowa. (*Kowarzyk, Szercha, Buluk i Krzysztoń* 1949).

W tym samym czasie stwierdził w naszej pracowni *Augustyn*, że „skrzep globulin kury wytworzony w nieobecności wapnia przez ślad preparatu trombiny uzyskanego z osocza kury, praktycznie biorąc, w ogóle nie ulega fibrynolizie, mimo że taki sam roztwór globulin kury po dodaniu chlorku wapnia ulega zawsze fibrynolizie w ciągu kilku godzin“. „Wyniki doświadczeń przemawiały za tym, że fibrynoliza kury nie jest czynna w roztworze globulin, a staje się czynna dopiero w obecności jonów wapnia. W materiale natomiast ludzkim jest obecna proteaza działająca w nieobecności jonów wapnia, z tym, że w jego obecności fibrynoliza jest szybsza, prawdopodobnie wskutek dalszego uczynnienia profibrynolizyny“.

To spostrzeżenie uważaliśmy w pracy pisanej w r. 1949 (*Kowarzyk i Buluk* 1950) za dowód, że w rekalcynowanym roztworze globulin następuje aktywacja fibrynolizyny, którą początkowo identyfikowaliśmy z plazminą.

Dopiero po wypowiedzeniu tego przypuszczenia *Guest i Ware* (1950) stwierdzili, że samoistna konwersja oczyszczonych wolnych od plazminogenu preparatów protrombiny w trombinę aktywuje w tym materiale „fibrynolizynę“, która w dużym stężeniu upłynnia włóknik. To spostrzeżenie *Guesta i Ware'a* zmusiło do rewizji poglądów, gdyż stało się prawdopodobne, że enzym aktywowany podczas trombinogenezy, który obserwował *Augustyn*, nie jest plazminą pochodzącą z plazminogenu, lecz raczej proteazą trombinową pochodzącą z protrombiny. Także wyniki niniejszej pracy przemawiają przeciw przyjęciu aktywacji plazminogenu w czasie krzepnięcia.

Ze względu na zamieszanie terminologiczne, którego nie byliśmy w stanie uniknąć nawet we własnych dotychczasowych pracach, zastrzegamy

się, że stosować będziemy w dalszym ciągu określenie fibrynoliza wyłącznie dla efektu upłynnienia skrzepu. Fibrynolizyną jest zatem każdy ferment, który upłynnia skrzep. Enzym upłynniający skrzep, który powstaje z plazminogenu pod wpływem niefizjologicznych aktywatorów, jak chloroform lub streptokinaza, będziemy nazywali „plazminą“. Plazminą będziemy nazywali także enzym, który w nieskrzepłych roztworach globulin powoduje powolne zanikanie fibrynogenu i znajduje się we frakcjach globulinowych izolowanych z osocza krwi, w warunkach, które wyłączają trombinogenezę. Proteazą trombinową będziemy nazywali enzym powstający z protrombiny w czasie trombinogenezy, który odszczepia azot niebiałkowy z krzepnącego fibrynogenu.

### METODYKA

1. Poziom azotu niebiałkowego oznaczano techniką Kowarzyka i Szerchy (1949).

Odbiałczenie sposobem Pincussena polega na dopełnieniu materiału badanego wodą destylowaną do objętości 18,4 cm<sup>3</sup>.

Do tak rozcieńczonego materiału dodaje się 0,8 cm<sup>3</sup> kwasu trójchlorooctowego (20%) oraz 0,8 cm<sup>3</sup> wolframianu sodu (10%). Dokładnie wstrząsać i odsączyć.

Odbiałczenie kwasem trójchlorooctowym polega na dopełnieniu badanego materiału wodą destylowaną do objętości 17 cm<sup>3</sup>.

Do tak rozcieńczonego materiału dodawano 3 cm<sup>3</sup> kwasu trójchlorooctowego (20%). Dokładnie wstrząsać i odsączyć.

2. Roztwory globulin osocza sporządzano według przepisu podanego przez *Buluka* (1949). Dane w niniejszej pracy, jeżeli w opisie nie ma zastrzeżenia, odnoszą się do materiału globulin rozpuszczonego w równej objętości, jak wyjściowy materiał osocza.

3. Preparaty fibrynogenu sporządzane były z osocza bydłęcego pobieranego w rzeźni do 0,1 objętości roztworu szczawianu potasu (0,1 mol.). Osocze bezprotrombinowe uzyskane drogą adsorpcji na węglanie baru w ilości 125 mg na 1 ml osocza (wytrząsanie przez 15'/37°C). Po odwirowaniu adsorbentu poddawano materiał dializie wobec bieżącej wody wodociągowej przez noc. Następnie po odrzuceniu strątu przez wirowanie zamrażano materiał w temperaturze zestalonego dwutlenku węgla. Podczas powolnego odmrożenia w temperaturze około 5°C wirowano osocze w chłodzonej wirówce i mrożonych naczyniach wirówkowych. Zebrany w ten sposób strąt fibrynogenu rozpuszczano w 4 razy mniejszej objętości niż objętość osocza użytego do preparatyki — roztworu 0,9% soli kuchennej, zawierającego 0,25% boraksu. Rozpuszczony preparat fibrynogenu oziębiony w mieszaninie śniegu i soli uwalniano od zanieczyszczeń przez dwukrotne wytrącanie alkoholem. Strąt używany do doświadczeń rozpuszczano w 0,9% roztworze soli kuchennej z dodatkiem 0,25% boraksu. Preparaty zawierały około 6% zanieczyszczeń białkowych i nie zawierały protrombiny.

4. Czas fibrynolizy i fibrynogenolizy oznaczano w łaźni wodnej przy 37°.

Przy pomiarze fibrynogenolizy pobierano w krótkich odstępach czasu próbki i zadawano słabym roztworem trombiny mierząc czas krzepnięcia przy 37°. W miarę postępującej fibrynogenolizy czas krzepnięcia przedłuża się dając w ten sposób miarę rozkładu fibrynogenu. Po zupełnej fibrynogenolizie trombina przestaje wykrzepiać próbki.

Przebieg fibrynolizy znakujemy w następujący sposób:

+ = pojawienie się kropli płynu nad skrzepem.

++ = oderwanie się skrzepu od ściany próbki, tak że pływa swobodnie w osoczu w postaci „meduzy“.

+++ = skurczenie się skrzepu do rozmiaru pojedynczego strzępka lub kilku.

++++ = fibrynoliza całkowita.

5. Otrzymywanie fibrynolizyny metodą Kaulli.

Krew z psa pobierano do naczyń mrożonych, zawierających 1/10 objętości szczawianu potasu 0,1 M. Krew pozostawiono w chłodni przez około 15 min., po czym wirowano osocze. Otrzymane osocze rozcieńczano 10-krotnie wodą destylowaną i wysycano dwutlenkiem węgla. Wysycany materiał dekantowano po kilku godzinach, a osad ponadto wirowano, otrzymując obfity strąk globulin krwi. Następnie rozpuszczano za pomocą kwasu octowego N/10 w ilości około 1/10 objętości osocza wyjściowego, co wymagało mieszania płynu w łaźni wodnej w temperaturze 37°. Powstawał opalizujący płyn, który doprowadzano do pH 1—2 za pomocą 2 N kwasu solnego kroplami. Strąty nie powstawały. (Wskaźnik logarytmiczny stężenia jonów wodorowych określano za pomocą papierków „Bayer“ Nr 1). Następnie rozpuszczano materiał w czterokrotnej objętości acetonu ochłodzonego w mieszance mrożącej i doprowadzono do pH 1—2 za pomocą stężonego kwasu solnego. Powstawał ciężki strąk, który wirowano.

Osad ponownie rozpuszczano w kwasie octowym N/10 dokładnie mieszając, przy czym osad rozpuszczał się w temperaturze 37° przez fazę żelifikacji z pozostawieniem skąpych ilości denaturatów, których nie usuwano.

Następnie za pomocą N/1 ługu sodowego doprowadzano materiał do pH 5. Powstawał przy tym nieznaczny strąk, który można było usunąć przez silne wirowanie. To stadium postępowania decyduje o wydajności końcowej preparatu; niedoprowadzenie do pH 5 powoduje niedostateczne wytrącenie białek nieczynnych, przekroczenie pH 5 powoduje wytrącanie białek fibrynolizyny. Celem dokładnej kontroli wypadania zanieczyszczeń białkowych alkalizowano najpierw odmierzoną próbkę preparatu, kontrolując przy tym wystąpienie trudno widzialnego strątu za pomocą wirowania. Po odwirowaniu płyn z nad osadu rozpuszczano w czterokrotnej objętości uprzednio zakwaszonego i ochłodzonego w mieszance mrożącej acetonu. (Przepis Kaulli w tym miejscu nie podaje, czy należy używać acetonu zwykłego, czy zakwaszonego. Przekonaliśmy się, że należy używać acetonu zakwaszonego do pH 1—2). Po zadaniu acetonem wypadł strąk drobny, który wirowano; osad rozpuszczono w buforze weronalowo-octowym (*Kaulla* rozpuszczał w bufrze weronalowo-octowym) o pH 4,92. Po silnym wytrząsaniu przez pół godziny wśród stałego ziębienia w mieszance mrożącej, dializowano materiał w wężu celofanowym przez 36 godzin wobec wody zakwaszonej do pH 1—2 stężonym kwasem solnym. W czasie dializowania materiału wodę zmieniano kilkakrotnie.

Po 36 godzinach wykonywano precypitację przez dodawanie kroplami wśród ciągłego mieszania N/10 ługu sodowego do pH 6. Powstaje ciężki strąk, który po odwirowaniu suszono nad kwasem siarkowym w próżni.

Po wysuszeniu preparat przedstawia się w formie łusek szarozółtych.

Do użycia preparat rozpuszczano w roztworze 0,9% soli kuchennej z dodatkiem 0,25% boraksu.

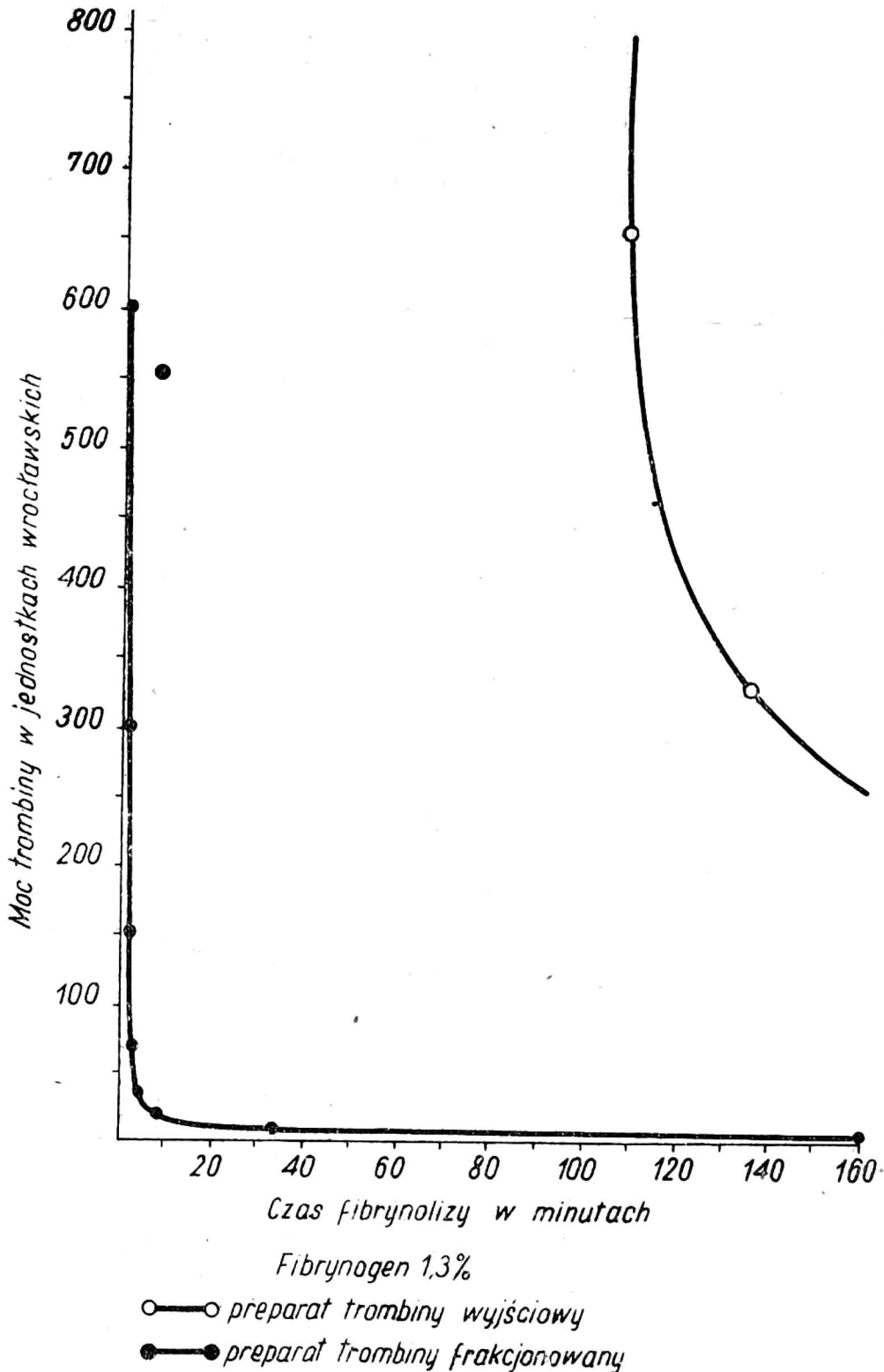
#### 6. Streptolizyna.

Jako streptokinazy użyto preparatu „Bistreptase“ firmy Behringwerke uprzejmie użyczonego przez Instytut Hematologii w Warszawie. Preparat obok streptokinazy zawiera streptodornazę rozkładającą kwasy nukleinowe. Roztwór globulin sporządzonych zwykłym sposobem z surowicy nie zawierającej trombiny, zadany tym preparatem i przechowany przez noc w lodówce, używany był w niniejszej pracy jako preparat streptolizyny.

### PROTEAZY OSOCZA KRWI, A PRZYROST AZOTU NIEBIAŁKOWEGO.

Wszystkie nawet najbardziej oczyszczone preparaty trombiny pochodzące z krwi kręgowców zawierają według obecnego stanu wiadomości proteazę trombinową, która działając na fibrynogen z krwi bydlęcej lub ludzkiej powoduje w czasie jego krzepnięcia przyrost azotu niebiałkowego.

Ten przyrost azotu niebiałkowego w skrzepie fibrynogenu osiąga w granicach błędów pomiarów ten sam poziom końcowy w różnych warunkach, niezależnie od pochodzenia gatunkowego i mocy trombiny, niezależnie



Ryc. 1. Zależność czasu fibrynolizy od mocy trombinowej dwóch różnych preparatów proteazy trombinowej. Roztwór fibrynogenu bydlęcego w soli fizjologicznej z dodatkiem boraksu 1,3% zadawano równą objętością preparatów rozcieńczanych solą fizjologiczną odpowiednio do mocy trombinowej wyskalowanej na osi rzędnych. Temperatura doświadczenia 37°

także od temperatury i w szerokich granicach od stężenia jonów wodorowych, byle tylko konwersja fibrynogenu w fibrynę była kompletna.

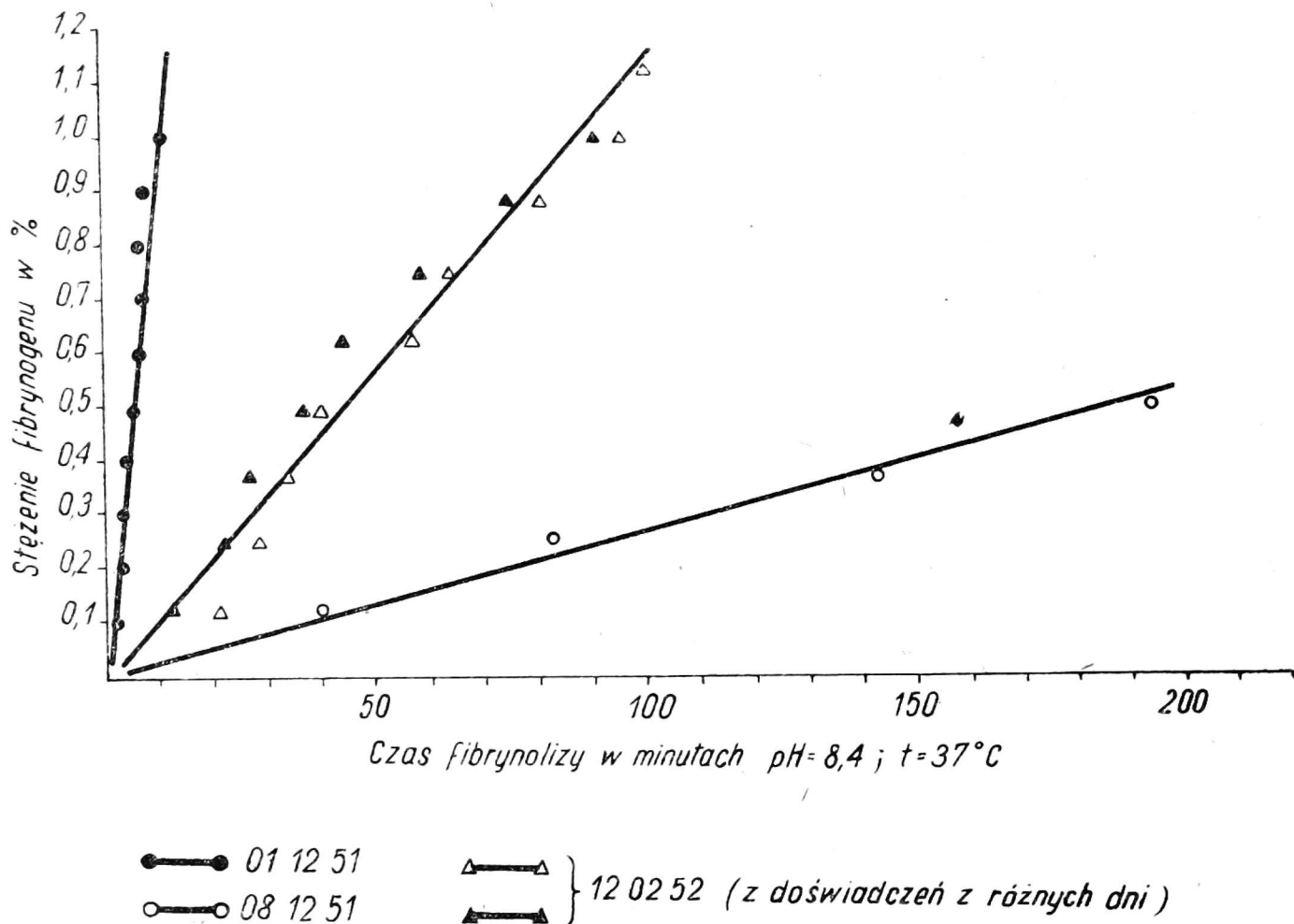
Inaczej przedstawia się wynik doświadczeń, jeżeli użyty zostanie preparat o silnym działaniu fibrynolitycznym.

Drogą frakcjonowania preparatów trombiny uzyskaliśmy preparaty „proteazy trombinowej“ o bardzo silnym działaniu fibrynolitycznym

w przeliczeniu na jednostkę mocy trombinowej. Załączony wykres (ryc. 1) daje wyobrażenie o ich fibrynolitycznych własnościach.

Czas fibrynolizy jest odwrotną funkcją stężenia fibrynogenu. Ryc. 2-ga przedstawia zależność czasu fibrynolizy (+++) od różnych stężeń fibrynogenu przy użyciu trzech różnych preparatów „proteazy trombinowej“.

Przy użyciu takich preparatów przyrost azotu niebiałkowego przekracza graniczną wartość, jaką dają preparaty ubogie w fibrynolizynę i postępuje w dalszym ciągu po zupełnej konwersji fibrynogenu w fibrynę osiągając bardzo wysokie wartości w chwili upłynięcia skrzepu; odróżnić można w ten sposób „koagulacyjny“ i „fibrynolityczny“ przyrost azotu niebiałkowego.

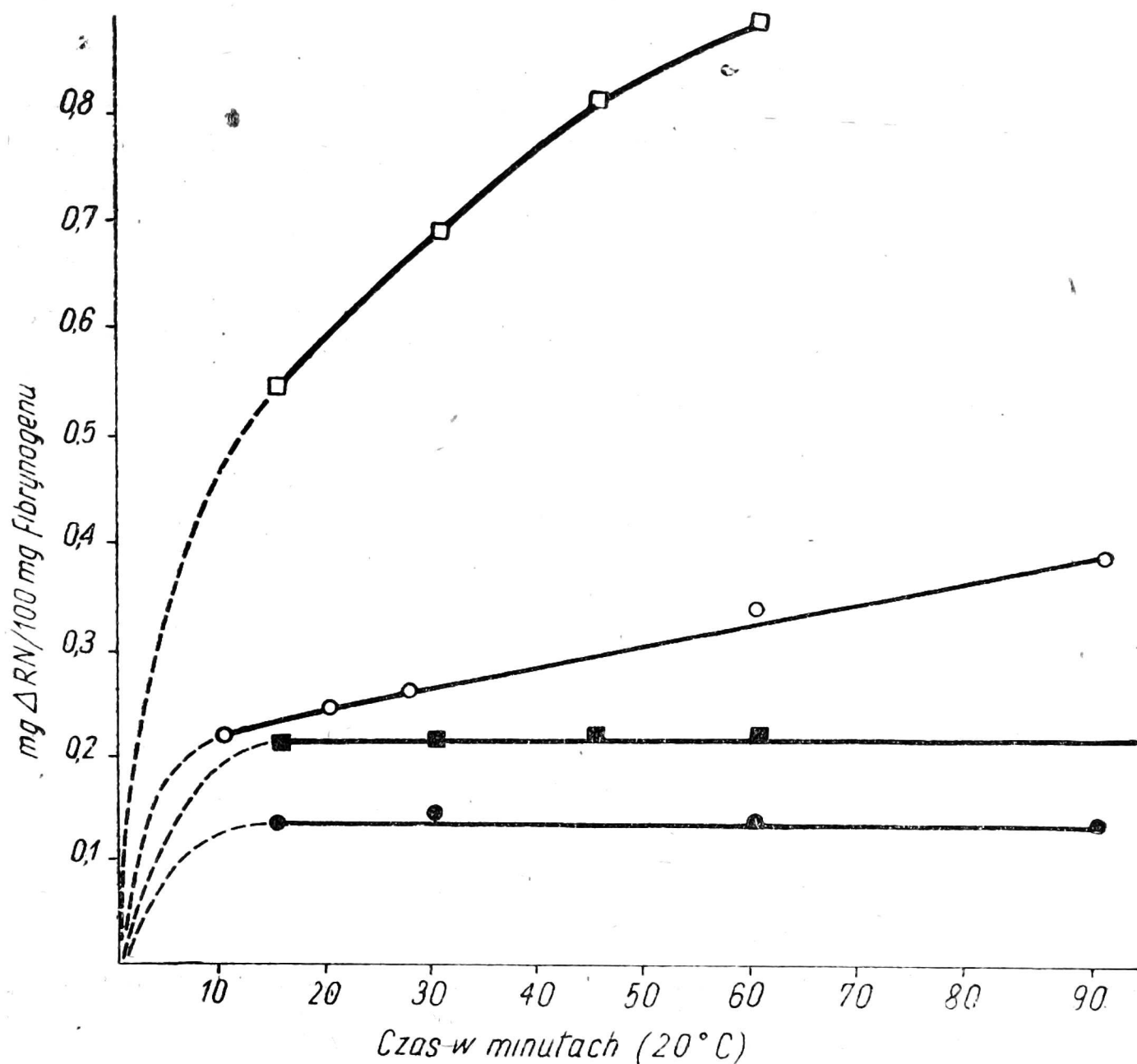


Ryc. 2. Zależność czasu fibrynolizy od stężenia fibrynogenu rozpuszczonego w soli fizjologicznej z dodatkiem boraksu badana za pomocą trzech różnych preparatów liofilizowanej proteazy trombinowej. Temperatura doświadczenia  $37^{\circ}$

Fibrynolityczny przyrost azotu niebiałkowego występuje tylko wówczas, jeśli preparat trombiny upłynnia skrzep w sposób widoczny już w czasie doświadczenia. Można uzyskać sam tylko koagulacyjny przyrost azotu niebiałkowego nawet przy użyciu preparatów trombiny, które szybko upłynniają skrzep, jeżeli przeprowadzi się doświadczenia w warunkach, w których fibrynoliza jest bardzo zwolniona, na przykład w temperaturze  $18^{\circ}$  zamiast  $37^{\circ}$ , albo przy użyciu bardziej stężonego roztworu fibrynogenu, który nie ulega w czasie doświadczenia fibrynolizie. Takie doświadczenia przedstawia ryc. 3.

Do doświadczenia tego użyto dwóch roztworów tego samego fibrynogenu bydlęcego: jednego o stężeniu 0,06‰, drugiego o stężeniu 0,3‰. Dodatek proteazy trombinowej do obu roztworów był ten sam i tak był wypośredkowany, że skrzep fibrynogenu rozcieńczonego ulegał fibrynolizie już po pół godzinie, natomiast skrzep fibrynogenu stężonego do końca

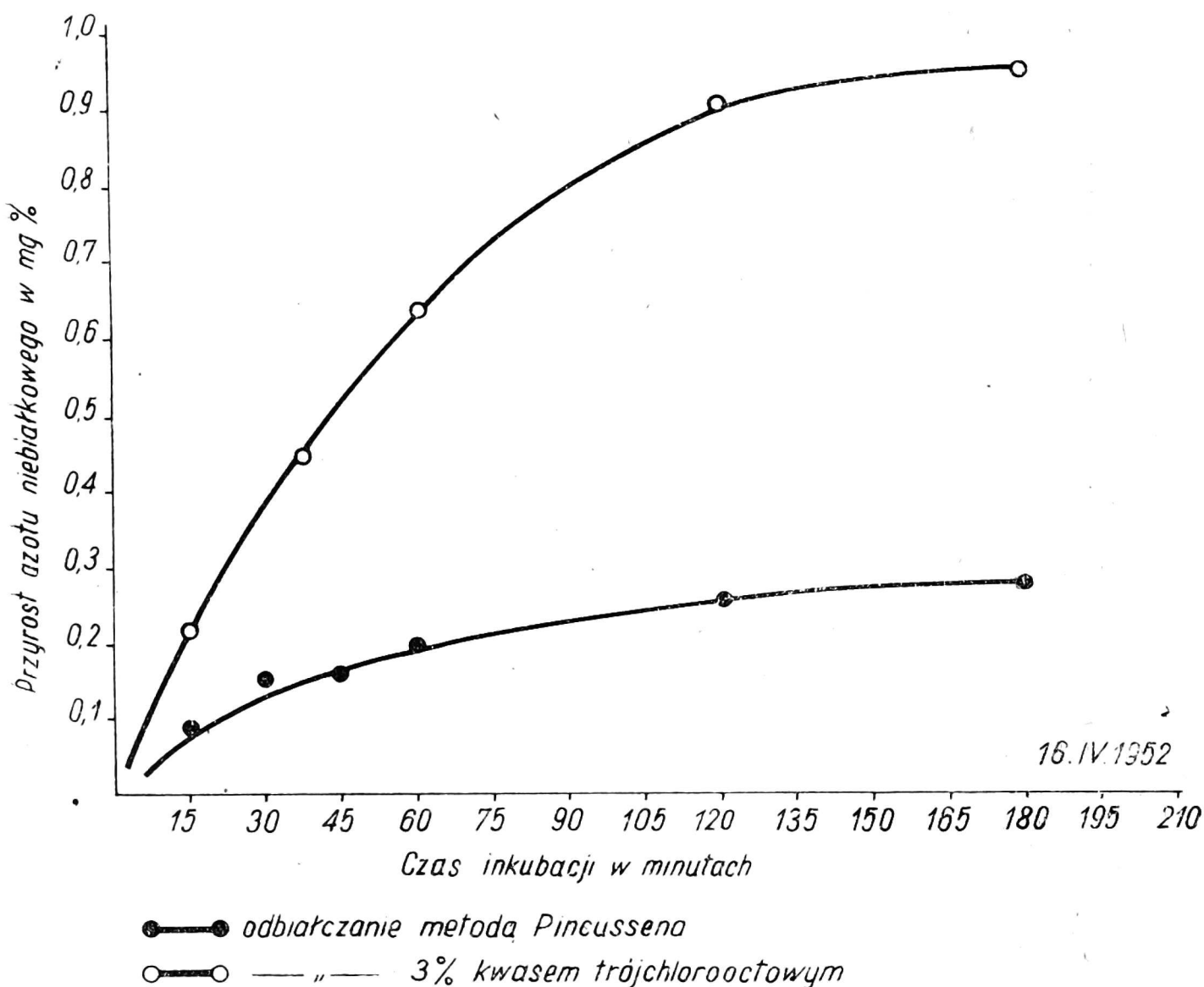
doświadczenia nie wykazywał ani śladu fibrynolizy. W tych warunkach przyrost azotu niebiałkowego był w skrzepie, który nie ulegał fibrynolizie, ściśle asymptotyczny, w skrzepie zaś, który ulegał fibrynolizie, był progresywny, nieasymptotyczny. Sposób odbiałczania czy to odczynnikiem Pincussena, czy to kwasem trójchlorooctowym wprawdzie ma wpływ na absolutne wartości azotu niebiałkowego, ale nie ma wpływu na wyżej opisaną prawidłowość.



Ryc. 3. Przyrost azotu niebiałkowego w dwóch roztworach: 0,3% (kółka i kwadraty wypełnione) i 0,06% (kółka i kwadraty puste) fibrynogenu bydlęcego, zadanych tym samym preparatem trombiny (ok. 1 jedn/cm<sup>3</sup>) bogatej w fibrynolizynę. W skrzepie rozcieńczonego fibrynogenu fibrynoliza (++) wystąpiła po pół godziny. Krzywe znaczone kółkami — odbiałczanie odczynnikiem Pincussena. Krzywe znaczone kwadratami — odbiałczanie kwasem trójchlorooctowym

Na dalszy rozwój zagadnienia wywarło wpływ następujące spostrzeżenie *Niewiarowskiego* (1952). W roztworach globulin osocza człowieka, sporządzonych według naszego przepisu, badał *Niewiarowski* przebieg fibrynolizy posługując się odbiałczaniem za pomocą kwasu trójchlorooctowego, a nie odczynnikiem Pincussena prawie wyłącznie przedtem przez nas używanym.

Przy odbiałczaniu kwasem trójchlorooctowym *Niewiarowski* stwierdził, że rekalcynowany, skrzepły roztwór globulin z krwi człowieka wykazuje znaczny przyrost reszty niebiałkowej trwający przez kilka a nawet kilkadziesiąt godzin po skrzepnięciu i upłynnieniu; tę proteolizę można było częściowo usunąć, jeżeli roztwór globulin był sporządzony z osocza pozbawionego częściowo protrombiny przez adsorpcję na wodorotlenku magnezu.



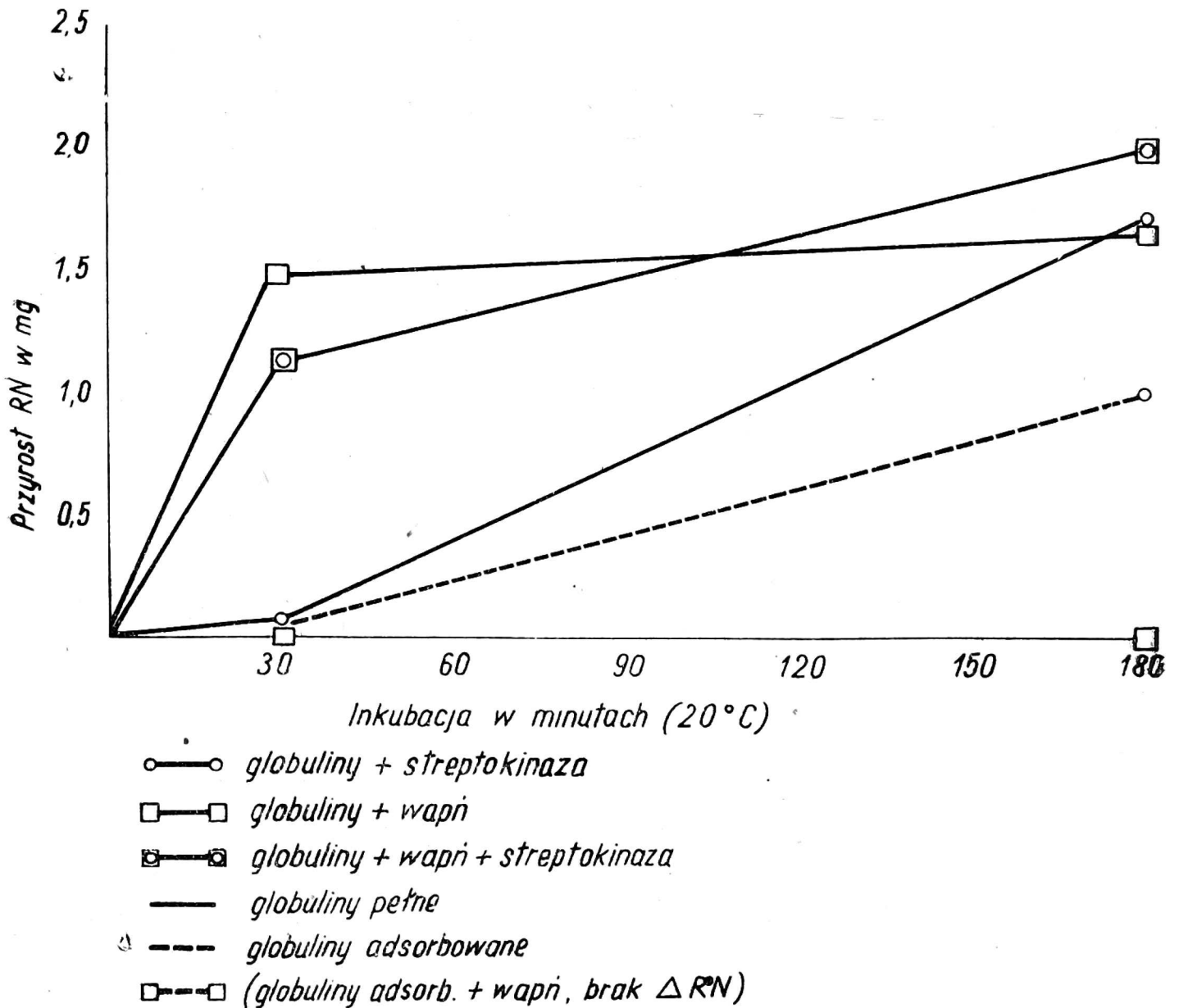
Ryc. 4. Przyrost azotu niebiałkowego w rekalcynowanym roztworze globulin izolowanym z osocza ludzkiego (przeliczony na 100 cm<sup>3</sup> niezagęszczonego roztworu globulin). Temperatura doświadczenia 37°

Przedstawiona ryc. 4 demonstruje różnice w zachowaniu się azotu niebiałkowego w skrzepłym roztworze globulin po odbiałczeniu kwasem trójchlorooctowym i po odbiałczeniu odczynnikami Pincussena. Należy zwrócić uwagę, że podczas gdy krzywa azotu niebiałkowego po odbiałczeniu sposobem Pincussena ma mniej więcej asymptotyczny przebieg, to krzywa odpowiadająca przyrostowi azotu po odbiałczeniu kwasem trójchlorooctowym ma charakter krzywej „fibrynolitycznej“.

W krzywej odpowiadającej odbiałczeniu przez odczynnik Pincussena widać wyraźny wstępny przyrost azotu niebiałkowego odpowiadający czasowi trombinogenezy (około 45'), po którym następuje dalszy nieznaczny tylko przyrost fibrynolityczny; w krzywej odbiałczania kwasem trójchlorooctowym takiego związku z krzepnięciem nie można się dopatrzeć. Gdy-



by doświadczenia w tutejszym zakładzie pierwotnie były prowadzone za pomocą odbiałczania globulin kwasem trójchlorooctowym, prawdopodobnie przeoczylibyśmy związek między proteolizą a trombinogenezą. Fakt, że po odbiałczeniu kwasem trójchlorooctowym, który jest słabszym strącalnikiem niż odczyn Pinsussena, przyrost reszty niebiałkowej okazuje się tak znaczny, nie był zjawiskiem nieoczekiwanym. Natomiast nieoczekiwane było spostrzeżenie, że proteolizę tę nie mającą, jak widać z wykre-



Ryc. 5. Przyrost azotu niebiałkowego (przeliczony na 100 cm<sup>3</sup> około 5 razy zagęszczonego roztworu globulin) w roztworze globulin pełnym lub pozbawionym protrombiny (adsorbowanym) zadany chlorkiem wapnia lub streptokinazą albo chlorkiem wapnia i streptokinazą. Odbiałczenie kwasem trójchlorooctowym

su, związku czasowego z krzepnięciem można usunąć przez częściową preadsorpcję protrombiny; zupełnie analogicznie można przez preadsorpcję protrombiny usunąć efekt proteazy trombinowej w rekalcynowanym osoczu szczawianowym, o czym wiedzieliśmy od roku 1950 (*Olearczyk*).

Doświadczenia *Niewiarowskiego* wymagały powtórzenia naszą techniką pozwalającą mierzyć przyrost azotu niebiałkowego rzędu przyrostu koagulacyjnego w czasie krzepnięcia, a nie dopiero w czasie fibrynolizy.

Ponieważ w doświadczeniach z globulinami preadsorbowanymi *Niewiarowski* uzyskał tylko roztwory ubogie w protrombinę, a nie bezprotrombinowe, i jego roztwory wytwarzały po rekalcynacji trombinę w ilo-

ściach wystarczających do zupełnego wykrzepienia fibrynogenu, należało także i z tego powodu doświadczenia powtórzyć.

Powtórzenie doświadczenia polegało na pomiarze przyrostu azotu niebiałkowego w roztworze globulin krwi ludzkiej pełnym i pozbawionym protrombiny przez intensywną preadsorpcję (ryc. 5) z dodatkiem wapnia, streptokinazy lub streptokinazy i wapnia.

Przy intensywnej adsorpcji na węglanie baru część plazminogenu ulega usunięciu (*Abucewicz* 1950); w doświadczeniach obecnie wykonanych była także usunięta część fibrynogenu, jak wynikało ze skrócenia czasu fibrylizacji skrzepu globulin preadsorbowanych, zadanych fibrylizyną o znanej mocy. Dlatego wyniki uzyskane z globulinami adsorbowanymi i nieadsorbowanymi nie są między sobą ściśle porównywalne.

Z doświadczeń wynika, że wapń nie aktywuje plazminogenu globulin pozbawionych protrombiny, gdyż globuliny takie po rekalcynacji do trzech godzin nie wykazują przyrostu azotu niebiałkowego, chociaż zadane streptokinazą dają łatwo wyznaczalny przyrost azotu niebiałkowego. Obecność wapnia nie tylko nie wzmaga, lecz nawet raczej hamuje aktywację plazminogenu przez streptokinazę. Nie ma też żadnych doświadczalnych podstaw do przyjęcia, że wapń aktywuje plazminogen w roztworze globulin w obecności protrombiny, lub że wytworzona w tych warunkach trombina aktywuje plazminogen. Niewątpliwie wysoki przyrost azotu niebiałkowego zachodzący w związku z fibrylizacją w skrzepie fibrynogenu (por. ryc. 3) lub w skrzepie globulin (por. ryc. 4) jest spowodowany przez proteazę trombinową.

Związek tego przyrostu azotu niebiałkowego spowodowanego przez proteazę trombinową z fibrylizacją wynika stąd, że pojawia się zawsze w warunkach, w których obserwuje się upłynnienie skrzepu, a więc w rekalcynowanym roztworze globulin, lub w skrzepie fibrynogenu pod wpływem trombiny zawierającej fibrylizynę, natomiast nie pojawia się w roztworze fibrynogenu po ukończonym krzepnięciu spowodowanym przez dodatek śladu trombiny w warunkach, w których nie następuje fibrylizacja.

Z doświadczeń tych wynika, że proteaza trombinowa, która odszczepia azot niebiałkowy z fibrynogenu, również odszczepia azot niebiałkowy z wysoko cząsteczkowego produktu fibrylizacji (*Kowarzyk, Buluk i Olearczyk* 1952); jest przy tym znamienne, że w stężeniach, które nie wystarczają do odszczepienia reszty azotowej z włókniaka proteaza trombinowa czyni to z dużą łatwością w reakcji z fibrynogenem i wysokocząsteczkowymi produktami fibrylizacji.

#### FIBRYNOLIZA

Zjawisko upłynnienia rekalcynowanych skrzepów globulin przebiega wyraźnie odmiennie od koagulacyjnego przyrostu azotu niebiałkowego pod względem charakterystyki temperatury, hamowania przez dodatek surowicy i pod względem przebiegu w substratach różnogatunkowego pochodzenia. Fakt ten był w naszej pracowni dobitnie podkreślany (*Kowarzyk, Szercha, Buluk, Krzysztoń* 1949). Do tego samego wyniku doszedł *Niewiarowski*, który niezależność czasu fibrylizacji od przyrostu azotu niebiałkowego stwierdził na przykładzie skrzepu globulin po częściowym usunięciu protrombiny. Od r. 1952 *Niewiarowski* w kilku pracach (częściowo wspólnie z *Hanną Wehr*) zajął stanowisko, że w fibrylizacji po rekalcynacji roztworu globulin osocza ludzkiego biorą udział dwa enzymy, a mianowicie enzym powodujący depolimeryzację fibryny, względnie

fibrynogenu, na mniejsze fragmenty białkowe z małym tylko przyrostem azotu niebiałkowego i „właściwa proteaza“, której prekursor jest adsorbowany z osocza przez wodorotlenek magnezu wraz z protrombiną i która powoduje znaczny przyrost niebiałkowej reszty rozpuszczalnej w kwasie trójchlorooctowym.

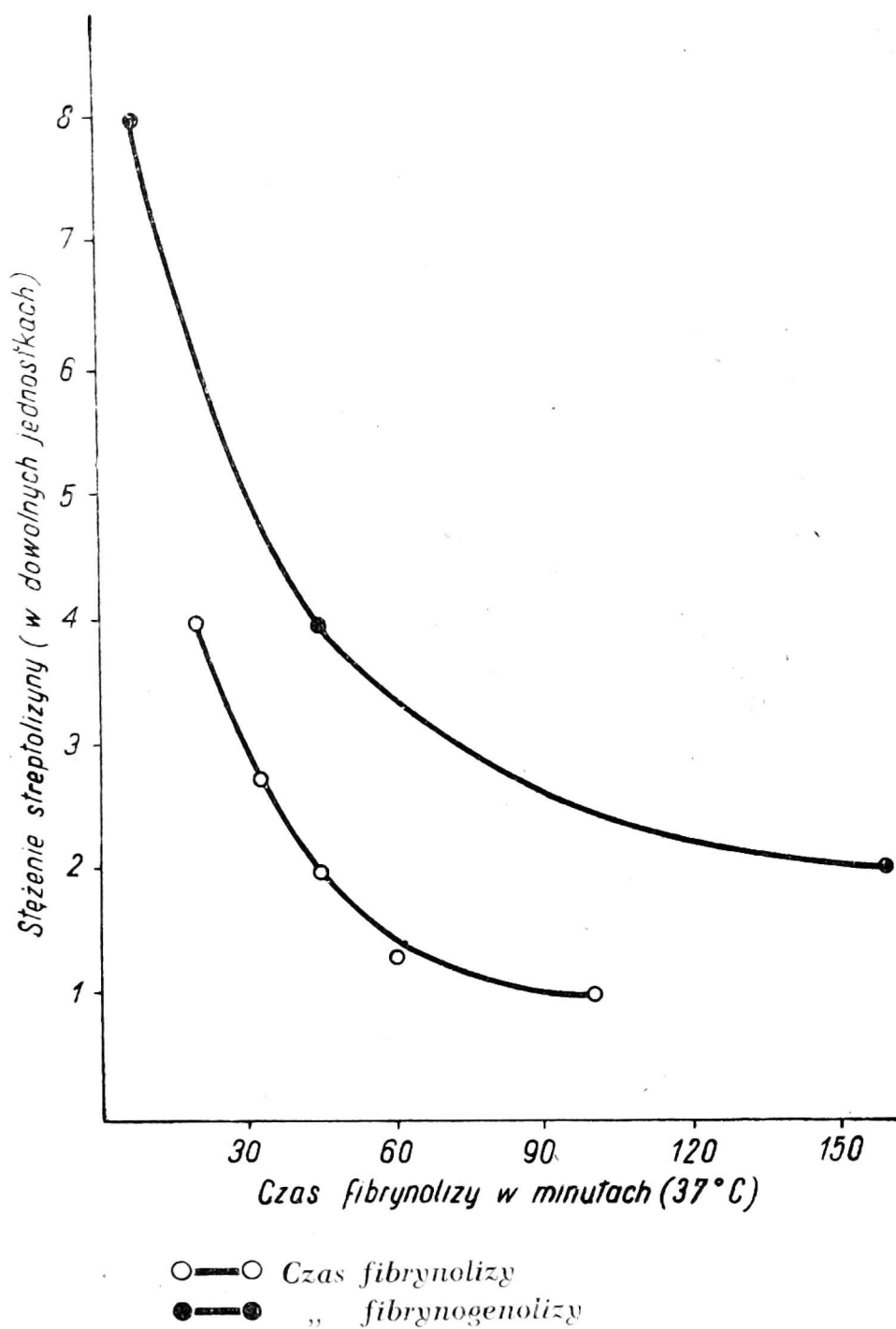
Od czasu naszej pierwszej pracy nad przyrostem azotu niebiałkowego w krzepnącej krwi (Szercha 1947) rozróżniana była w naszym zakładzie proteoliza koagulacyjna, to znaczy według dzisiejszego stanu rzeczy proteoliza fibrynogenu przez proteazę trombinową od proteolizy nie związanej swoiście z krzepnięciem. Wyłączenie wpływu działania tej nieswoistej proteazy na azot niebiałkowy było wstępnym warunkiem wykrycia proteazy trombinowej. W niekrzepnących roztworach globulin krwi człowieka oraz w ciągu dłuższego czasu po zupełnym skrzeptaniu stwierdzaliśmy przy inkubacji w 37° zazwyczaj nieznaczny tylko przyrost azotu niebiałkowego. Natomiast niezwiązany z krzepnięciem przyrost azotu niebiałkowego jest na przykład w materiale globulin z krwi kozy lub psa bardzo znaczny w porównaniu z materiałem globulin krwi człowieka lub królika. Istota sprawy nie polega jednak dla nas na kwestii, czy w roztworze globulin podczas fibrylizacji są czynne inne jeszcze proteazy, oprócz proteazy trombinowej. Za swoje zadanie uważamy badanie proteazy ulegającej aktywacji w związku z krzepnięciem; dzisiaj, jak i poprzednio, nie znamy dostatecznego powodu do przypuszczenia, że aktywacja ta dotyczy więcej niż jednego tylko enzymu, mianowicie proteazy trombinowej. Natomiast skrzeple i nieskrzeple roztwory globulin z osocza ludzkiego zawierają niewątpliwie obok proteazy trombinowej również plazminę.

W nierekalcyrowanym, nieskrzeptanym roztworze globulin z krwi ludzkiej przechowywanym w 37° zachodzi powolny i nieznaczny przyrost azotu niebiałkowego i równocześnie znika fibrynogen. Zjawisko to nazywa się fibrynogenolizą. Czas zupełnej fibrynogenolizy jest zawsze znacznie dłuższy od czasu fibrylizacji, zachodzącej w roztworze globulin skrzeptanym po rekalcyrowaniu. Fibrylizacja w rekalcyrowanym skrzeple globulin jest wynikiem działania dwóch proteaz, a mianowicie plazminy, to znaczy enzymu, który powoduje powolną fibrynogenolizę w nierekalcyrowanym lub pozbawionym protrombiny roztworze globulin i proteazy trombinowej, która jest uczyniona przez rekalcyrowanie. W pracy pisanej w roku 1949 (Kowarzyk, Buluk 1950) stosunek plazminy do proteazy trombinowej jeszcze nie był dyskutowany i przyspieszenie fibrylizacji spowodowane przez rekalcyrowanie roztworu globulin przypisywaliśmy z pewnymi zastrzeżeniami aktywacji profibrylizyny, czyli plazminogenu. Obecnie ponieważ wiadomo, że wapń nie aktywuje plazminogenu, a proteaza trombinowa wolna od plazminogenu i plazminy jest w stanie spowodować fibrylizację, (Guest i Ware 1950), pogląd pierwotny uległ rewizji; efekty przypisywane aktywacji plazminogenu są w istocie efektami aktywacji proteazy trombinowej. Dotąd nie ma metody badania czasu fibrylizacji w skrzeptanym roztworze globulin z zupełnym wyłączeniem działania plazminy, która w takim roztworze jest preformowana. Natomiast można usunąć przez dostatecznie intensywną preadsorpcję protrombinę i badać czas fibrynogenolizy lub fibrylizacji przy całkowitym lub prawie całkowitym wyłączeniu proteazy trombinowej.

W tych warunkach czas fibrynogenolizy lub fibrylizacji jest miarą aktywności plazminy obecnej w preparatach globulin osocza.

W roztworze globulin pozbawionym protrombiny czas fibrynogenolizy jest taki sam niezależnie od tego, czy dodano do roztworu soli wapnia.

Skrzep globulin o pełnej zawartości protrombiny uzyskany przez dodanie małej ilości trombiny bez dodatku wapnia, a więc zawierający plazminę i ślady tylko proteazy trombinowej (obecnej w preparacie trombiny), upływnia się w czasie znacznie krótszym od wspomnianego wyżej czasu fibrynogenolizy ale dłuższym niż czas fibrylizacji skrzepu globulin po rekalcytacji. Wynika stąd, że rekalcytacji uczynnia dodatkowy enzym upływnia-



Ryc. 6. Działanie streptolizyny na fibrynogen i fibrynę. Roztwór fibrynogenu 1% zadawano równą objętością streptolizyny (kółka pełne) lub streptolizyny z dodatkiem śladu trombiny (kółka puste)

jący skrzep. Jest nim proteaza trombinowa; w przeciwieństwie bowiem do roztworu globulin nie zawierających protrombiny, dodatek wapnia aktywuje proteazę upływniającą skrzep w roztworze globulin zawierających protrombinę.

Przy skróceniu czasu fibrylizacji w stosunku do fibrynogenolizy współdziała także większa aktywność plazminy wobec włókniaka niż wobec fibrynogenu.

Przyczyną szybszego upłynniania skrzepu od fibrynogenolizy przez ten sam preparat proteolityczny mogą być odmienne warunki działania enzymów, a nie różnice chemiczne cząsteczki fibrynogenu i fibryny. Skrzep służący do pomiarów fibrynolizy jest z punktu widzenia fizycznego układem dwufazowym, w którym kinetyka reakcji zależy od zjawisk powierzchniowych.

Związek między czasem fibrynolizy a aktywacją proteazy trombinowej bardzo wyraźnie ostatnio wystąpił w doświadczeniu *Niewiarowskiego* (1953) nad czasowym przebiegiem aktywacji proteaz podczas trombinogenezy; czas fibrynolizy skrzepu rekalcynowanych globulin, który na szczycie fazy powolnego wytwarzania trombiny wynosił około 10 godzin, skrócił się w okresie autokatalitycznej aktywacji trombiny do 4 godzin. Po przednio już *Niewiarowski* stwierdził (1952), że fibrynoliza skrzepów globulin ubogich w protrombinę (a więc wytwarzających mało proteazy trombinowej) jest przeciętnie przedłużona do 7 godzin przy czasie 4½ godziny globulin kontrolnych z pełną zawartością protrombiny. Te różnice czasu fibrynolizy można przypisać dołączeniu się fibrynolitycznego działania proteazy trombinowej aktywującej się podczas trombinogenezy, do fibrynolitycznego działania preformowanej plazminy.

Cytowane prace *Niewiarowskiego* przyczyniły się znacznie do wyjaśnienia stosunku zachodzącego w rekalcynowanym roztworze globulin osocza ludzkiego między plazminą a proteazą trombinową.

Własności plazminy krwi i proteazy trombinowej są dotąd ciągle jeszcze niedostatecznie poznane. Wyników badań preparatów plazminy aktywowanych streptokinazą lub chloroformem nie można bez zastrzeżeń przenosić na plazminę preformowaną w osoczu. Uzyskanie preparatu trombiny z całą pewnością wolnego od plazminogenu i plazminy jest nie tylko bardzo trudnym zadaniem preparatywnym; brak dotąd metod, które by w sposób niewątpliwy pozwalały sprawdzić zanieczyszczenie preparatu jednej z tych proteaz — proteazą drugą.

Beztrombinowy preparat powodujący upłynnienie skrzepów osocza można otrzymać z osocza krwi różnego pochodzenia gatunkowego sposobem *Kaulli* (1949).

Badanie tego preparatu jest utrudnione małą wydajnością i kapryśnością metody otrzymywania podkreślaną przez samego autora. Wskutek tego otrzymywaliśmy go dotąd w małych tylko ilościach. Preparat ten ma następujące właściwości:

1) Powoduje przyrost azotu niebiałkowego w działaniu na fibrynogen pojawiający się od razu od pierwszych minut działania.

2) W stężeniu około 0,5% powoduje łatwo wymierny przyrost azotu niebiałkowego w działaniu na osocze krwi, roztwory globulin i na fibrynogen. Uderza przy tym, że proteoliza następuje mimo obecności antyplazminy w takim samym stopniu, jak w układzie oczyszczonym roztworu globulin, gdzie działanie antyplazminy i antytrombiny jest napewno znacznie słabsze (por. tabele). Niewrażliwość preparatu na antyplazminę była już podkreślana przez samego *Kaullę*, na podstawie obserwacji czasu upłynniania skrzepów.

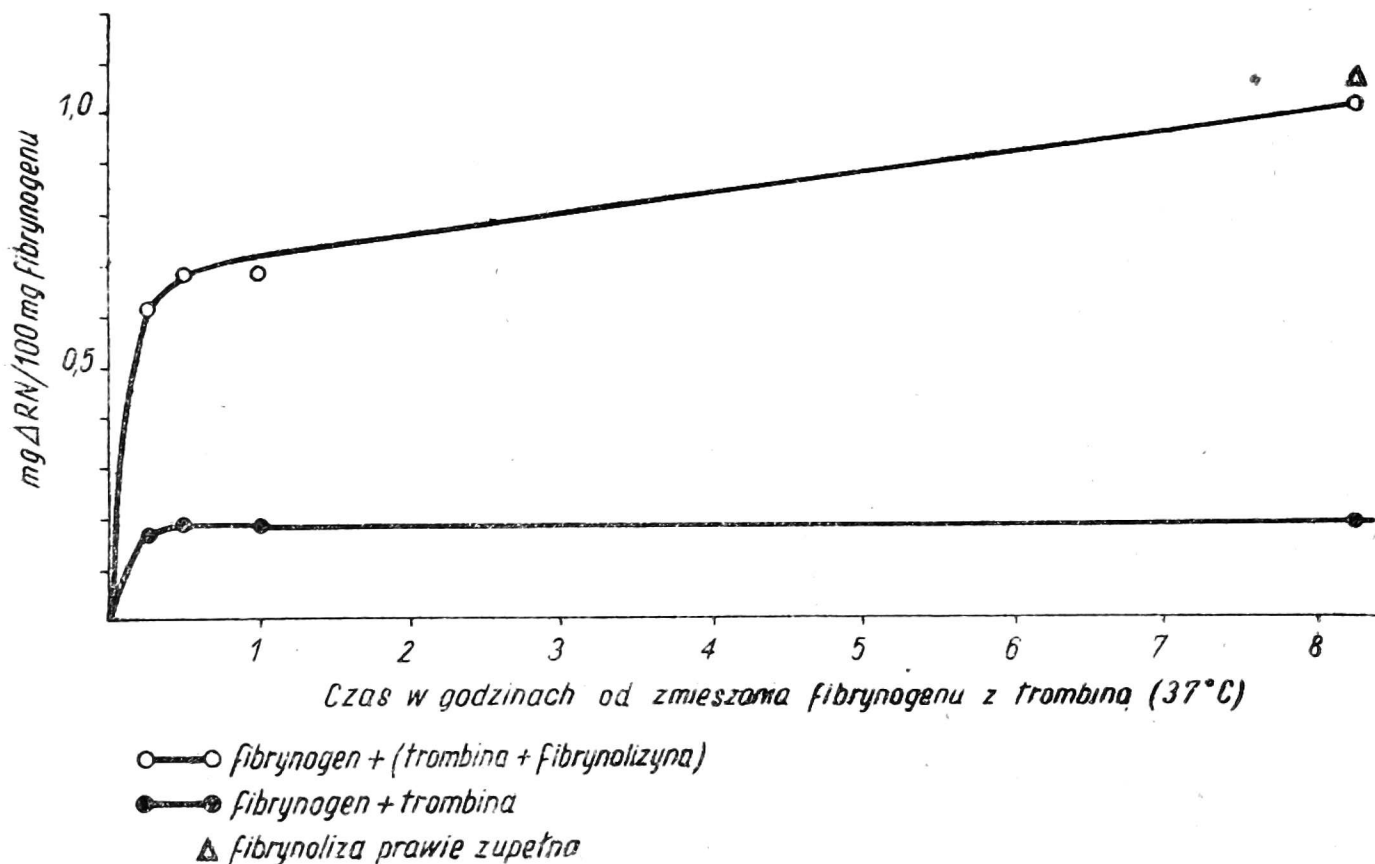
3) Jeżeli do fibrynogenu zostanie dodany preparat *Kaulli* razem z trombiną wówczas w pierwszych minutach występuje duży przyrost odpowiadający sumie działania preparatu i trombiny na fibrynogen; po wytworzeniu włóknika następuje dalszy przyrost azotu, podobnie jak w ryc. 3 podczas fibrynolizy fibrynogenu zadanego preparatem trombiny o silnych własnościach fibrynolitycznych.

Tabela I.

Przyrost azotu niebiałkowego wyrażony w mg<sup>0</sup>% spowodowany przez beztrombinową fibrynolizynę Kaulli, w porównaniu z przyrostem koagulacyjnym spowodowanym przez trombinę (15 minut, 37°).

	Osocze szczawianowe ludzkie	Roztwór globulin z krwi ludzkiej
Fibrynolizyna Kaulli	0,73	0,92
Trombina	0,15	0,17

4) Preparat fibrynolizyny Kaulli działa przyspieszająco na trombinogenezę w rekalcynowanym roztworze globulin (Kowarzyk, Buluk i Olearczyk 1950).



Odbiałczanie odczynnikiem Pincussena

Ryc. 7. Przyrost azotu niebiałkowego w czasie krzepnięcia fibrynogenu bydlęcego pod wpływem samej trombiny i trombiny z dodatkiem fibrynolizyny Kaulli

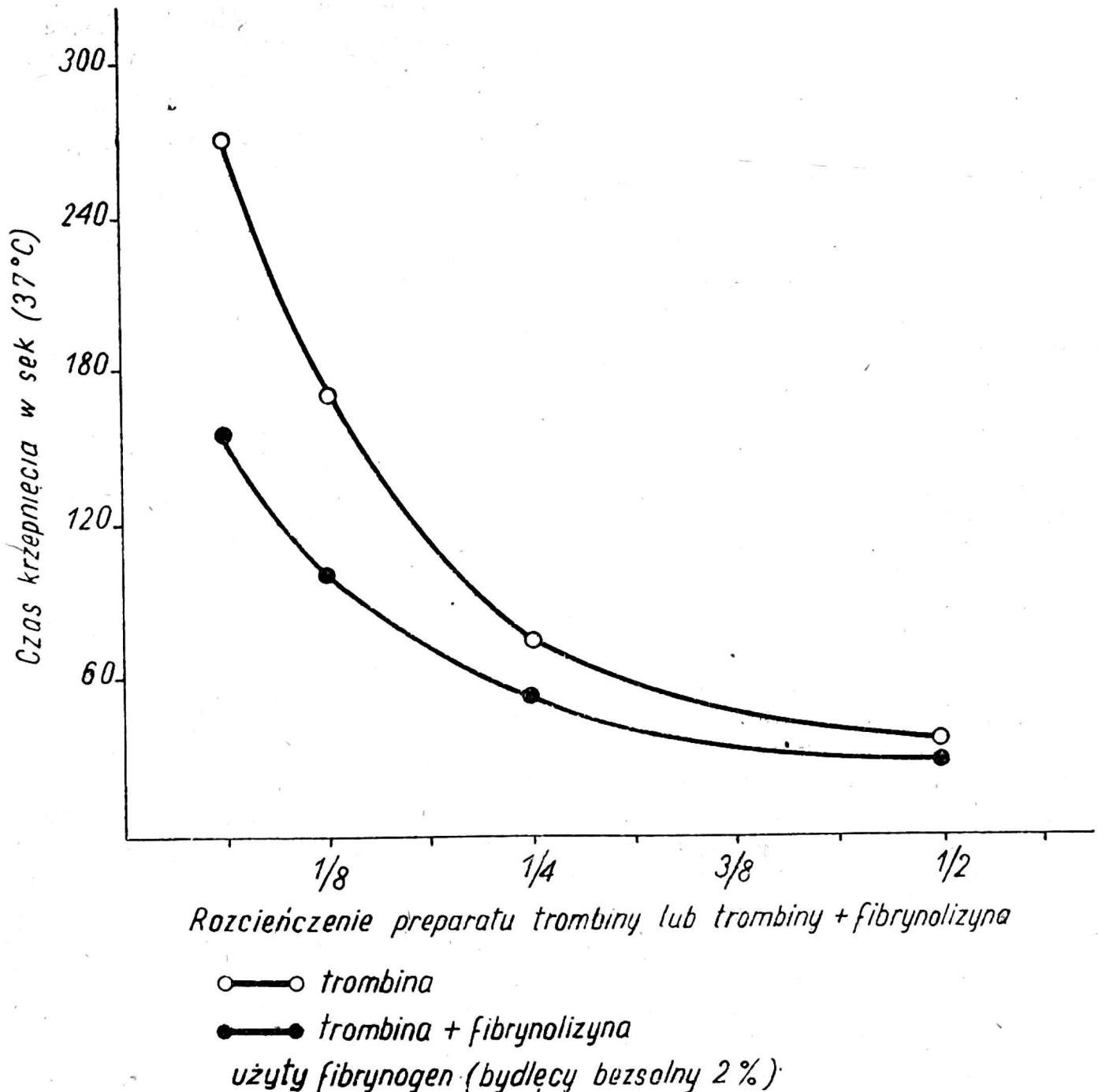
5) Działanie słabych preparatów trombiny wzmacnia się pod wpływem dodatku preparatu Kaulli. Na ten efekt preparatu nie ma wpływu preinkubacja preparatu do 10 minut ani z trombiną, ani z fibrynogenem wziętym z osobna.

### Peptyd fibrynowy.

Według Loranda i Middlebrooka (1952) konwersja fibrynogenu w fibrynę polega na odszczepieniu z cząsteczki fibrynogenu określonego, jednorodnego peptydu, nazwanego przez nich peptydem fibrynowym. Nasze

obserwacje wykonane za pomocą odczynników odbiałczających różnego rodzaju nie przemawiają za jednorodnością peptydu.

Jak można odczytać z tablicy, azot niebiałkowy osocza ludzkiego po odbiałczeniu sposobem Pincussena wypada wyżej niż po odbiałczeniu metodą Folina i Wu, a różnica ta staje się jeszcze większa w badaniu osocza skrzepłego. Wskutek tego przyrost azotu niebiałkowego podczas krzepnie-



Ryc. 8. Wpływ dodatku fibrynolizyny Kaulli na czas krzepnięcia fibrynogenu zadanego śladem trombiny

cia osocza jest po odbiałczeniu metodą Pincussena dwa do trzech razy wyższy niż po odbiałczeniu według *Folina* i *Wu*. Peptyd powstający podczas krzepnięcia da się przy użyciu tych dwóch różnych odbiałczaczy frakcjonować na część wytrącalną jednym, a niewytrącalną drugim odczynnikiem.

W rekalcynowanym roztworze globulin wyizolowanych z osocza krwi ludzkiej i innych ssaków obserwować można całkiem różny pozorny przebieg proteolizy w zależności od metody odbiałczania. Była o tym poprzednio mowa przy dyskusji wyników *Niewiarowskiego* (por. ryc. 4).

Niżej zamieszczona tabela pochodząca jeszcze z roku 1948 zawiera dane uzyskane za pomocą odczynnika Pincussena oraz Folina i Wu.

Tabela II

Material	Liczba pomiarów	Podbrominowana reszta azotowa (w mg %). Odbiałczenie sposobem		Średnia różnica (w mg %)
		Pincussena	Folina i Wu	
Osocze szczawianowane nie skrzeplę	12	7,02	6,64	0,38
Osocze rekalcynowane skrzeplę		7,58	6,83	0,75
Przyrost koagulacyjny azotu niebiałkowego		0,56	0,19	—
Układ: osocze + surowica 1:1 nieskrzeplę	9	9,05	8,51	0,54
Układ: osocze + surowica w stosunku 1:1 skrzeplę		9,73	8,75	0,97
Przyrost koagulacyjny azotu niebiałkowego		0,68	0,25	—

Podobnie został zbadany za pomocą dwóch odbiałaczy roztwór fibrynogeny zadany trombiną.

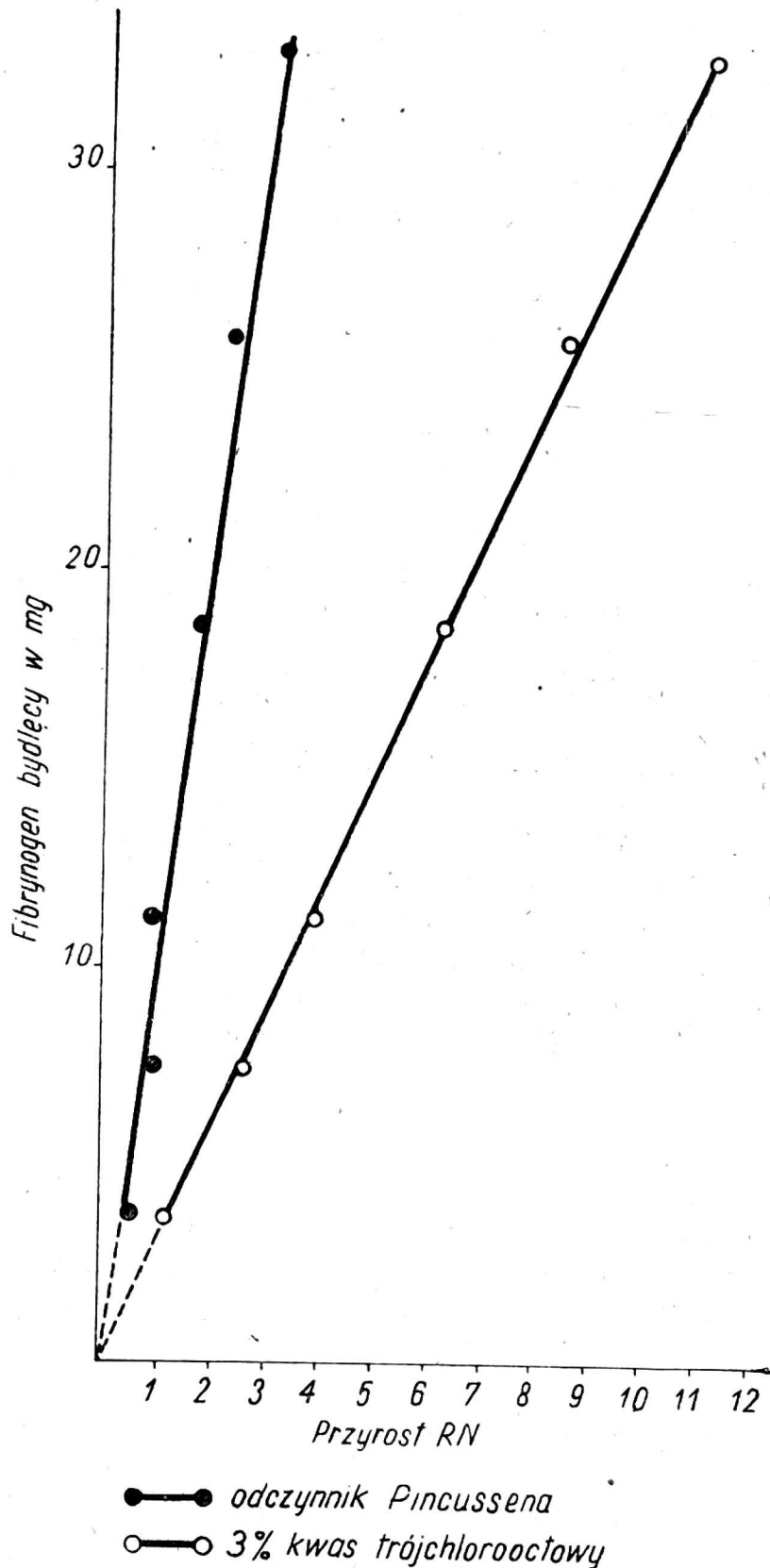
Jak wynika z tabeli przyrost azotu niebiałkowego jest proporcjonalny do ilości fibrynogeny skonwertowanego we włókniak. Zależność przyrostu azotu niebiałkowego od stężenia fibrynogeny jest taka sama, jak zależność czasu fibrynolizy od stężenia fibrynogeny. Azot niebiałkowy pozostający w roztworze po odbiałczeniu kwasem trójchlorooctowym (3%) jest znacznie wyższy od azotu po wytrąceniu odczynnikiem Pincussena; stąd wniosek, że odczynnik Pincussena strąca dużą część azotu niebiałkowego, którego nie wytrąca kwas trójchlorooctowy.

Z przebiegu krzywych przyrostu azotu niebiałkowego widoczne jest, że zarówno w ciągu krzepnięcia jak i podczas fibrynolizy frakcja peptydów niewytrącalnych odczynnikiem Pincussena przyrasta mniej niż azot niebiałkowy po odbiałczeniu kwasem trójchlorooctowym.

Przypuszczenie, że wytrącalność przez kwas trójchlorooctowy lub odczynnik Pincussena spowodowana jest obecnością we frakcji azotu niebiałkowego peptydów o różnym składzie, udało się potwierdzić pomiarami azotu wolnych grup aminowych metodą van Slyke'a. Procent azotu aminowego w stosunku do azotu całkowitego upłynniony przez fibrynolizę skrzepów euglobulin wynosi we frakcji niebiałkowej po odbiałczeniu odczynnikiem Pincussena około 30%, natomiast po odbiałczeniu kwasem trójchlorooctowym — około 18%. Widoczne jest zatem, że w czasie fibrynolizy nie powstaje jednolity peptyd, lecz peptydy o różnej wytrącalności, uboższe i bogatsze w wolne grupy aminowe.

Również peptydy frakcji azotowej niebiałkowej powstające w czasie 15 minut po zadaniu oczyszczonego fibrynogeny śladem trombiny nie są





Ryc. 9. Przyrost azotu niebiałkowego po odbiałczeniu odczynnikami Pincussena lub 3% kwasem trójchlorooctowym (wyrażony w setnych częściach miligrama RN), w roztworach fibrynogenu o różnych stężeniach powstający pod działaniem śladu trombiny (30'20')

jednorodne. Wyizolowany według przepisu *Loranda* peptyd zawiera około 45% azotu w postaci wolnych grup aminowych, natomiast przeciętna wartość wolnych grup aminowych w całości frakcji azotowej niebiałkowej po odbiałczeniu kwasem trójchlorooctowym wynosi około 30%. Azot wolnych grup aminowych wynosił w naszych preparatach fibrynogenu średnio 5%.

Jako istotny wynik tych pomiarów podkreślić należy, że zarówno niebiałkowy produkt krzepnięcia, jak i produkt upłynnienia skrzepu zawiera obok peptydów o dużej zawartości azotu aminowego również peptydy o mniejszej zawartości azotu aminowego. Z punktu widzenia teorii krzepnięcia krwi, zastanowić musi fakt, że preparaty trombiny odszczepiają od cząsteczki fibrynogenu peptydy szczególnie bogate w wolne hydrofilowe grupy aminowe.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Pomiary omówione w niniejszej pracy wiążą się w ustaleniu następującego poglądu.

W rekalcynowanym roztworze globulin następuje aktywacja proteazy nazwanej proteazą trombinową ze względu na bardzo bliski związek z trombiną. Obok proteazy trombinowej czynna jest w roztworze globulin druga proteaza — plazmina, preformowana w roztworze globulin i aktywna już przed rekalcynacją. Plazmina łatwiej rozszczepia fibrynę niż fibrynogen, jak wynika z pomiaru czasu fibrynolizy w nieskrzeplonym roztworze globulin i porównania z czasem fibrynolizy skrzeplonego roztworu globulin po dodatku śladu trombiny bezwapniowej. Proteaza trombinowa odszczepia łatwiej azot niebiałkowy z fibrynogenu niż z fibryny, jak widać z przebiegu przyrostu azotu niebiałkowego, który zachodzi po zadaniu fibrynogenu śladem oczyszczonego preparatu trombiny. Obie zatem proteazy uzupełniają swoje działanie w tym znaczeniu, iż jedna działa przede wszystkim jako fibrynogenaza, druga zaś raczej jako fibrynaza.

Proteaza trombinowa odszczepia azot niebiałkowy również z wysoko-cząsteczkowych produktów powstających z włókniaka po działaniu plazminy. Ten fakt wynika z przebiegu przyrostu azotu niebiałkowego w rekalcynowanym roztworze globulin zawierającym proteazę trombinową, lub nie zawierającym jej.

Obie proteazy powodują upłynnienie skrzepu, przy czym przyrost azotu niebiałkowego jest znacznie wyższy w momencie fibrynolizy jeśli obok plazminy działa proteaza trombinowa, niż jeśli działa sama plazmina, na co pierwszy zwrócił uwagę *Niewiarowski* (1952).

Dalszego wyjaśnienia wzajemnego stosunku między plazminą a proteazą trombinową można oczekiwać po zastosowaniu do badań preparatów antyplazminy z krwi bydłowej, która według *Guesta* i *Ware'a* nie hamuje proteazy trombinowej. Również nasze spostrzeżenia koagulacyjnego przyrostu azotu niebiałkowego w krzepnącym osoczu szczawianowym pod wpływem trombiny znajdującej się w świeżej surowicy przemawiają za tym, że antyplazmina nie hamuje proteazy trombinowej (*Krzysztoń* 1949, porówn. także tabele I i II niniejszej pracy).

W pełnej surowicy obok działania antyplazminowego zachodzi jednak również zanik proteazy trombinowej przebiegający równolegle z zanikiem trombiny.

Sprawa ewentualnej identyczności proteazy trombinowej z trombiną nie jest dotąd definitywnie rozstrzygnięta. Głównym argumentem przemawiającym za tą identycznością jest fakt, że nie znaleziono dotąd przykładu konwersji fibrynogenu w fibrynę, przy której nie następowałby przyrost azotu niebiałkowego, ani w doświadczeniach z materiałem izolowanym z krwi ssaków, ani z krwi kury i karpia, ani wreszcie z hemolimfy raka. Przeciw identyczności proteazy trombinowej z trombiną przemawia fakt, że najczystsze dotychczasowe preparaty trombiny mają nieswoiste działa-

nie proteolityczne na inne substraty niż fibrynogen, a mianowicie na włóknik (*Guest i Ware 1950*), na kazeinę (*Schultze i Schwick 1951*), oraz na produkty fibrynolizy (*Kowarzyk, Buluk i Olearczyk 1952*).

Przeciw identyczności proteazy trombinowej z trombiną przemawia także fakt, że dotychczas ani nam, ani *Schultzemu i Schwickowi (1951)* nie udało się potwierdzić ściślejszej proporcjonalności między czasem fibrynolizy włóknika przez czyste preparaty trombiny a ich mocą trombinową wyrażoną w jednostkach, co stanowiło zasadniczą treść doniesienia *Guesta i Ware'a*. Dokładniejsza analiza oryginalnej krzywej *Guesta i Ware'a* też wykazuje odchylenia od średniej, które budzą wątpliwości, czy można z tych doświadczeń wyciągnąć wnioski tak daleko idący, jak identyczność proteazy upłynniającej włóknik z trombiną. Dlatego też zapewne *Guest i Ware* zastrzegali się w swym doniesieniu, że różne działanie trombiny może być wynikiem obecności w cząsteczce trombiny różnych grup aktywnych.

Jedyny dotąd typ doświadczenia, w którym udało się oddzielić działanie proteazy trombinowej od wytworzenia skrzepu, znalazł *Buluk (1951)*. Przy zadawaniu szczawianowego osocza krwi kury małą ilością trombiny z osocza ludzkiego można wypośrodkować dawkę, która wystarcza do wykrzepienia osocza naturalnego kury lub ludzkiego osocza szczawianowego, ale nie wystarcza do wywołania skrzepu w osoczu szczawianowym kury. W takim układzie szczawianowego osocza kury z dodatkiem trombiny stwierdził *Buluk* mimo braku krzepnięcia przyrost azotu niebiałkowego odpowiadający mniej więcej 50% przyrostu koagulacyjnego w osoczu krzepnącym. Doświadczenie to nie wystarcza jednak do wyłączenia związku przyczynowego między przyrostem azotu niebiałkowego a konwersją fibrynogenu w fibrynę. Jesteśmy nadal w podobnej sytuacji jak w r. 1952, gdy zwracając uwagę na niedostateczne uzasadnienie teorii identyczności trombiny z proteazą trombinową musieliśmy zastrzec się, że również nie ma definitywnego dowodu odrębności obu tych ciał.

Г К о в а ж ы к и К. Бу л ю к (при технической помощи Я. О л е а р ч и к а)

## ТРОМБИН, ТРОМБИНОВАЯ ПРОТЕАЗА И ПЛАЗМИН

### С о д е р ж а н и е

В сгустке глобулинов из кровяной плазмы человека существуют по крайней мере два активные протеаза, тромбиновая протеаза и плазмин. Одна из них, а именно, тромбиновая протеаза появляется одновременно с тромбином после рекальцинации раствора глобулинов, другая же, а именно плазмин преформирован в растворе глобулинов и проявляет активность уже перед рекальцинацией. Плазмин легче расщепляет фибрин, чем фибриноген как это вытекает из сравнения времени фибринолиза в свернувшемся растворе глобулинов с продолжительностью фибринолиза свернувшегося раствора глобулинов после прибавления следа обезызвестленного тромбина.

Тромбиновая протеаза легче отщепляет в небелковый азот из фибриногена чем из фибрина, как это вытекает из асимптотического хода приращения небелкового азота, который после прибавления к фибриногену следов очищенного препарата тромбина держится только во время свертывания.

Обе протеазы взаимно дополняют свое действие таким образом, что одна действует главным образом как фибриногеназа, другая же скорее как фибриназа,

хотя обе протеазы расщепляют субстрата. Тромбиновая протеаза отщепляет небелковый азот также из мультимолекулярных продуктов, образующихся из фибрина под влиянием плазмينا.

Коагуляционный прирост внебелкового азота происходит не только во время свертывания излориванного фибрина, но также в рекальцинированной щавелевой плазме, равно как под влиянием тромбина, находящегося в сыворотке из самобытно свернувшейся крови, это говорит за то, что антиплазмин не задерживает действия тромбиновой протеазы.

Вопрос о возможной тождественности тромбиновой протеазы с тромбином не разрешен до сих пор в окончательной форме. Главным аргументом, говорящим за идентичность тромбиновой протеазы является факт, что до сих пор не найдено примера конверсии фибриногена и фибрин, во время которой не выступалбы прирост внебелкового азота, будь это при опытах с материалом, выделенным из крови млекопитающих, будь из крови курицы и карпа, или же наконец из гемолимфы рака.

Против тождественности тромбиновой протеазы а тромбином говорит факт, что самые чистые получены до сих пор препараты тромбина обладают неспецифическим действием протеолитическим на другие субстраты чем фибриноген, а именно на волокнистую ткань (Гвест и Уэр 1950), на казеин (Шульце и Швик 1951) а также на продукты фибринолиза (Ковжик, Булюк и Оларчик 1952).

До сих пор ни в нашей лаборатории, ни в работе Шульце и Швика не был подтвержден факт, сообщенный Гвастом и Уэром, что время фибринолиза волокнистой ткани очищенными препаратами тромбина, якобы совершенно пропорционально силе содержащегося в препарате тромбина. Таким образом вопрос об идентичности тромбиновой протеазы с тромбином является до сих пор еще сомнительным.

H. K o w a r z y k, K. B u l u k (with the technical assistance of  
I. O l e a r c z y k)

## THROMBIN, THROMBIN-PROTEASE AND PLASMIN

### S u m m a r y

Two proteases, thrombin-protease and plasmin are present in the coagulum of human plasma globulins.

Plasmin is active in the oxalated globulin solution before recalcification and so before the formation of thrombin takes place. The thrombin-protease is activated only after recalcification of plasma globulins, during thrombinogenesis. Fibrin is split by plasmin easier than fibrinogen. This can be concluded from measurements of the fibrinolytic time, which is shorter than the fibrinogenolytic time for this enzyme.

Thrombin-protease liberates NPN from fibrinogen much faster than from fibrin. Thrombin-protease and plasmin act on the same substrate but the first one preferably as fibrinogenase and the second one as fibrinase. Both enzymes supplement each other in their action.

Thrombin-protease liberates NPN also from fibrin lysed by plasmin. Antiplasmin in human plasma and serum does not stop the action of thrombin-protease.

There is no definite evidence of the identity of thrombin-protease and thrombin.

The conversion of fibrinogen into fibrin is always followed by liberation of NPN. This liberation of NPN occurs in mammalian blood, in the blood of chickens, of carps and also in the haemolymph of lobster.

Pure thrombin preparations have always nonspecific proteolytic action on other substrates than fibrinogen i. e. on fibrin, on casein and on the fibrinolysis reaction mixture.

In purified thrombin preparations there does not exist the equivalency of fibrynolytic and coagulative activity, as claimed by Guest and Ware (1951).

These facts are not in good agreement with the view of the identity of thrombin and thrombinprotease.

The authors discuss the need of further studies to solve the problem of identity or non-identity of thrombin-protease and thrombin.

## PIŚMIENICTWO

1. *Abucewicz S.*: O niektórych własnościach dwóch preparatów fibrynolizyny otrzymanych różnymi sposobami. Praca doktorska. — Wrocław 1950. — 2. *Augustyn J.*: O niektórych własnościach proteazy krwi. Praca doktorska — Wrocław 1949. — 3. *Bailey K., Bettelheim F. R., Lorand L. i Middlebrook W. R.*: Action of thrombin in the clotting of fibrinogen — *Nature*, 167: 233—234, 1951. — 4. *Belicer W. A. i Belik J. W.*: Ob obrazowaniu i polimeryzacji fibrin monomera. *Dokłady Akademii Nauk SSSR*, 41: 895—898, 1953. — 5. *Belicer W. A. i Chodorowa E. Ł.*: O przyrodę prewraszczenia fibrynogena w fibryn. *Biochemija*, 17: 676—683, 1952. — 6. *Buluk K.*: O przyroście azotu niebiałkowego w krzepającym roztworze globulin. *Przegląd Lekarski*, 5: 438—441, 1949. — 7. *Buluk K.*: Układ krzepnięcia krwi kury. (Praca doktorska 1951) ukaże się w zbiorze prac zakładu w serii B Prac. Wrocł. Tow. Nauk. — 8. *Buluk K. i Kałuża B.*: Układ krzepnięcia hemolimfy raka. Ukaże się w zbiorze prac zakładu w serii B Prac. Wrocł. Tow. Nauk. — 9. *Christensen H. N. i Lynch E. L.*: The conjugated, non — protein amino acids of plasma. *The Journal of Biological Chemistry*, 163: 741—751, 1946.
10. *Guest M. M. i Ware A. G.*: Fibrynolytic activity of purified thrombin. *Science*, 112: 21—22, 1950. — 11. *Guest M. M., Ware A. G. i Seegers W. H.*: A quantitative study of antifibrinolysin in chick plasma: increase in antifibrinolysin activity during pteroylglutamic acid deficiency. *The American Journal of Physiology*, 150: 661—669, 1947. — 12. *Fuchs H. i Zakrzewski Z.*: Mikrochemische Analyse von beim Blutgerinnungsprozess ablaufenden Teilreaktionen. *Klinische Wochenschrift*, 13: 1511, 1934. — 13. *Jara Z.*: Układ krzepnięcia krwi karpia. Ukaże się w zbiorze prac zakładu w serii B Prac. Wrocł. Tow. Nauk. — 14. *Kaulla K. N.*: Extraction of fibrinolytic enzyme from the blood. *Nature*, 164: 408, 1949. — 15. *Kowarzyk H.*: O mechanizmie krzepnięcia krwi. *Szpitalnictwo Polskie*, 3: 217—225, 1950 oraz *Pamiętnik I Ogólnopolskiego Zjazdu Hematologów w Krakowie* 28—30. V. 1950. — 16. *Kowarzyk H. i Buluk K.*: Postępy badań nad krzepnięciem krwi. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*, 2: 1—76, 1950. — 17. *Kowarzyk H. i Szercha M.*: Metoda badania proteolitycznych własności krwi. *Acta Biologiae Experimentalis*, 15, 49—50, 1949. — 18. *Kowarzyk H., Szercha M., Buluk K. i Krzysztóń Z.*: O proteolitycznej teorii krzepnięcia. *Acta Biologiae Experimentalis* 15, 1949. — 19. *Kowarzyk H., Szercha M., Buluk K. i Krzysztóń Z.*: O mechanizmie krzepnięcia krwi. *Sprawozdanie Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego*, 3: 268—269, 1948.
20. *Kowarzyk H., Szercha M., Buluk K., Krzysztóń Z.*: Dalsze badania nad mechanizmem krzepnięcia krwi. *Sprawozdania Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego*, 4: 202—206, 1949. — 21. *Kowarzyk H., Buluk K. i Olearczyk J.*: Rola proteazy krwi w mechanizmie krzepnięcia. *Acta Physiologica Polonica*, 1: 69—78, 1950. — 22. *Kowarzyk H.*: Thrombin and thrombin protease. *Nature*, 169: 614—615, 1952. — 23. *Kowarzyk H., Buluk K. i Olearczyk J.*: O właściwościach tak zwanej proteazy trombinowej. *Acta Physiologica Polonica* dodatek do tomu III. *Prace III Zjazdu Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego*: 161—164, 1952. — 24. *Krzysztóń Z.*: O przyroście azotu niebiałkowego w krzepającym osoczu krwi ludzkiej. *Przegląd Lekarski*, 5: 311—314, 1949. — 25. *Laki L. i Mommaerts W. F. H. M.*: Transition of fibrinogen to fibrin as a two-step reaction. *Nature*, 156: 664, 1945. — 26. *Lorand L.*: Fibrino-Peptide — New aspects of the fibrinogen — fibrin transformation.

Nature, 167: 992—993, 1951. — 27. *Lorand L. i Middlebrook W. R.*: The action of thrombin on fibrinogen. The Biochemical Journal, 52: 196—199, 1952. — 28. *Mac Fayden D. A.*: Determination of amino acids in plasma by the finhydrin — carbon dioxide reaction without removal of proteins. The Journal of Biological Chemistry, 145 : 387—403, 1942. — 29. *Niewiarowski S.*: O przyroście produktów hydrolizy białka w czasie fibrynolizy. Acta Physiologica Polonica 3: 375—391, 1952.

30. *Niewiarowski S.*: O aktywacji plazminogenu w krzepnących euglobulinach. Acta Physiologica Polonica, 4 : 231—235, 1953. — 31. *Olearczyk J.*: O proteolitycznych własnościach preparatów trombiny. Przegląd Lekarski, 6 : 761—765, 1950. — 32. *Petitjean F.*: Influence de la coagulation sur la teneur du sang en azote amine. Comptes Rendus de la Societe de Biologie. 87: 1001—1004. 1922. — 33. *Presnell A. K.*: Thrombin a proteolytic fibrinogenase, American Journal of Physiology, 122 : 596, 1938. — 34. *Schultze H. E. i Schwick G.*: Über den Mechanismus der Thrombildung in isolierten System. Zeitschrift physiologische Chem. 289: 26—43, 1951. — 35. *Szercha M.*: O różnicy poziomu reszty azotowej w osoczu i surowicy krwi. Przegląd Lekarski, 3: 741, 1947. — 36. *Wehr H. i Niewiarowski S.*: Aktywność antyproteolityczna osocza krwi i powstałej z niego surowicy. Acta Physiologica Polonica, 3. Dodatek Prace III Zjazdu Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego we Wrocławiu: 164—167, 1952.

Otrzymano 28. X. 1953.