

Activation by Contact with Glass and the Action of Thrombin

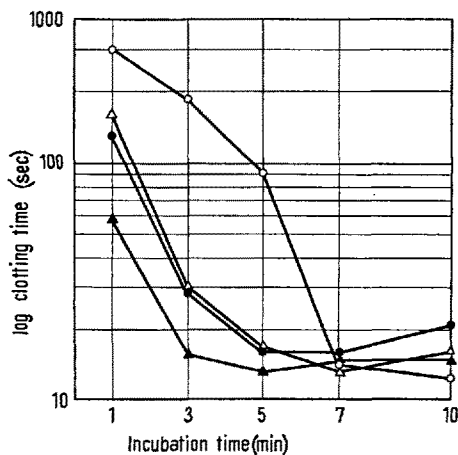


Fig. 1. Thromboplastin inscreening test. $\circ$ — $\circ$ intact plasma + saline, $\bullet$ — $\bullet$ intact plasma + 0.125 U. NIH thrombin, Δ — Δ activated plasma + saline, $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ activated plasma + 0.125 U. NIH thrombin.

In order to elucidate whether the catalytic action of thrombin on blood coagulation is dependent on contact activation by an activating surface, we investigated the effect of small thrombin concentrations on contact-activated and intact plasma.

Methods. All experiments with blood and plasma were carried out in siliconized test tubes and with siliconized pipettes. Siliconized needles were used for blood collecting.

Blood was collected from the cubital vein into a sodium oxalate solution (1 part of sodium oxalate *M*/10 to 1 part of blood). Immediately after collection, the blood was centrifuged at 3000 rpm. for 1 h (platelet poor plasma) or at 1500 rpm. for 10 min (platelet rich plasma). The plasma was then divided into two portions. One remained intact, the other was activated with a fine glass powder (100 mg to 1 ml plasma) and shaken by hand for 10 min at room temperature. The glass powder was removed by centrifugation at 1500 rpm. for 5 min. The activated and intact plasma were stored on ice during the whole of the experiment.

The chloroform extract from brain was prepared by the method of BELL and ALTON¹.

Thrombin (Behring) was diluted with saline.

A veronal-acetate buffer pH 7.35 and 0.025 *M* calcium chloride were used for the experiments.

The principle of the thromboplastin screening test² and the thrombin time were used for analysis.

All experiments were performed at 37°C in a water bath.

Results. The pattern of the thromboplastin screening test with normal activated and intact plasma is shown in Figure 1. The addition of 0.125 U. NIH thrombin has a marked accelerating effect, so that if thrombin in the concentration mentioned is added to the reaction mixture containing intact plasma, the development of the coagulation activity (thromboplastin + thrombin) is practically the same as in activated plasma to which no thrombin was added. Thrombin, however, has a greater effect on activated plasma.

We then investigated the coagulation times of intact and activated plasma after addition of thrombin in the one-stage arrangement (thrombin time).

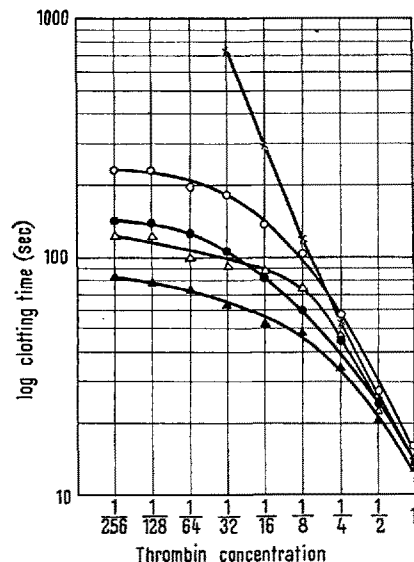


Fig. 2. Thrombin times of intact platelet poor plasma $\circ$ — $\circ$, activated platelet poor plasma $\bullet$ — $\bullet$, intact platelet rich plasma Δ — Δ , activated platelet rich plasma $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$, and BaSO_4 adsorbed intact plasma $\times$ — $\times$.

The correlation between thrombin concentration and thrombin times obtained with intact, platelet-poor and -rich plasma and activated platelet-poor and -rich plasma is demonstrated in Figure 2. The longest coagulation times were obtained with intact platelet-poor plasma.

The thrombin times of BaSO_4 adsorbed plasma are the same before and after activation (Fig. 3). The total shape of the curve of the thrombin dilution with adsorbed plasma differs essentially from that with non-adsorbed plasma. In haemophilic A and B plasma (Fig. 4), the difference in thrombin times before and after activation is far less pronounced than in normal plasma.

On studying the thrombin times, we found that if no calcium chloride was added to the coagulation mixture, the slope of the dilution curves was always very steep.

Discussion. It can be seen from these experiments that previous contact activation of plasma is not essential for the accelerating action of thrombin in the blood coagulation process. In the concentrations used, thrombin apparently acts mainly through the intrinsic clotting system (blood thromboplastin formation) and not by direct action on fibrinogen. The exact mechanism of the accelerating effect of thrombin is not yet known.

Thrombin formed by the action of tissue thromboplastin released from damaged tissue and plasma factors on prothrombin may speed up the formation of blood thromboplastin and thus initiate the whole coagulation process. The thromboplastin accelerating effect of small thrombin concentrations may well be the important link in the hemostatic process responsible for the fact that persons deficient in the Hageman factor do not bleed³.

Zusammenfassung. Thrombin in kleinen Konzentrationen beschleunigt den Verlauf des Thromboplastin-Differenzierungs (screening)-Tests, unabhängig davon, ob

¹ W. N. BELL and H. G. ALTON, *Nature* (Lond.) **174** (1954).

² N. D. HICKS and W. R. PITNEY, *Brit. J. Haemat.* **3**, 227 (1957).

³ O. D. RATNOFF and J. E. COLOPY, *J. clin. Invest.* **34**, 62 (1955).

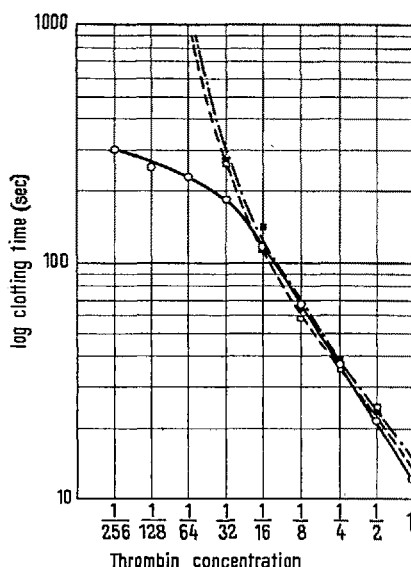


Fig. 3. Thrombin times of BaSO₄ adsorbed plasma before □—□ and after ■—■ contact activation. Thrombin time of normal intact plasma ○—○.

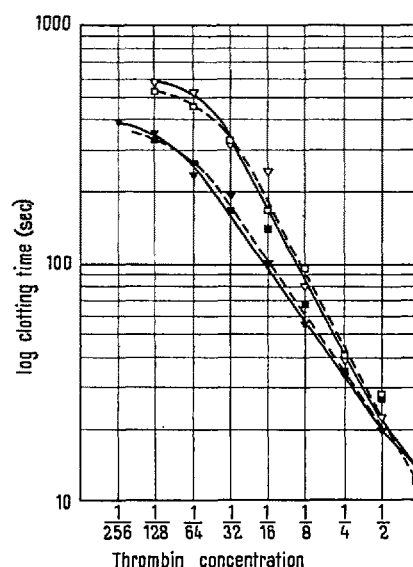


Fig. 4. Thrombin times of haemophilic A plasma before △—△ and after ▲—▲ activation and haemophilic B plasma before □—□ and after ■—■ activation.

das Plasma vorher durch Kontakt aktiviert wurde oder nicht. Die Wirkung des Thrombins zeigt sich jedoch deutlicher bei aktiviertem Plasma. Die Thrombinzeit des aktivierten Plasmas ist kürzer als die von inaktivem Plasma.

P. PUDLÁK, IRENA STARÁ, and ERIKA DEIMLOVÁ

Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague (Czechoslovakia), October 24, 1960.

Versuche zur Isolierung der γ -Globuline aus Kaninchenserum durch Acetonfällung¹

Proteine lassen sich bekanntlich durch Aceton reversibel fällen. Von dieser Möglichkeit zur Gewinnung gereinigter Proteine ist bisher unter anderem Gebrauch gemacht worden bei der Isolierung von Fermenten (COLOWICK und KAPLAN²) und bei der Einengung von Liquor (BÜCHER, MATZELT und PETTE³). Die Anwendung organischer Lösungsmittel zur Fällung von Proteinen beruht einmal auf einer Herabsetzung der Dielektrizitätskonstanten, zum anderen auf einer Verminderung des an das Protein gebundenen Hydratationswassers. Wie ein Vergleich von Dielektrizitätskonstanten zeigt, wird durch Zugabe von Aceton zu wässrigen Lösungen die Dielektrizitätskonstante einer solchen Lösung stark herabgesetzt (WUHRMANN und WUNDERLY⁴). Ausserdem ist Aceton mit Wasser in jedem Verhältnis mischbar und kann so den Proteinen das Hydratationswasser entziehen. Wegen der Bedeutung der γ -Globuline als Träger der Antikörpereigenschaften versuchten wir zunächst die γ -Globuline von den übrigen Serumproteinen zu trennen, zumal wir zeigen konnten, dass die Antikörpereigenschaften durch Acetonfällung nicht verloren gehen (DREES und MESTER⁵). Über die erhaltenen Ergebnisse soll kurz berichtet werden.

Methodik. Für die Fällung wurde Kaninchen-Mischserum verwendet.

Die Chemikalien waren p.a. Substanzen der Firma Merck. Tris wurde von der Firma Sigma, USA, bezogen.

Für die Acetonfällung verdünnten wir 1 Teil Kaninchenserum mit 9 Teilen Tris-Puffer (pH 7,6; Ionenstärke 0,1) (COLOWICK und KAPLAN²). Während der Fällung befand

sich die Serumverdünnung in einem Eisbad und wurde magnetisch gerührt. Die Rührgeschwindigkeit war so schnell, dass noch keine Schaumbildung eintrat. Die Zugabe des vorgekühlten Acetons zu der Serumverdünnung erfolgte aus einer eisgekühlten Bürette. Die Zuflussgeschwindigkeit war so eingestellt, dass einerseits sich in der Serumverdünnung kein Schaum bildete, andererseits die Fällung nach 15 min beendet war. Die Fällung wurde dann auf einer Sole-gekühlten Zentrifuge (Pirouette, Phywe, Göttingen) 15 min bei 10 000 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand von dem Sediment abgegossen und die Zentrifugenbecher mit der Öffnung nach unten auf Fliesspapier gestellt. Die dann noch am Rande der Zentrifugenbecher haftenden Flüssigkeitstropfen wurden mit Fliesspapier entfernt. Das in den Zentrifugenbechern verbleibende Sediment wurde mit dem halben Volumen des eingesetzten Serums mit phosphatgepufferter isotonischer Kochsalzlösung (pH 7,4) im Kühlraum geschüttelt, bis sich das Sediment gelöst hat. Befindet sich noch Albumin in der ausgefällten Fraktion, so ist die Lösung durchsichtig. Die Fraktion, die hingegen die von den übrigen Proteinen befreiten γ -Globuline ent-

¹ Ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

² S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, vol. I, p. 282 und 143.

³ TH. BÜCHER, D. MATZELT und D. PETTE, *Klin. Wschr.* 30, 325 (1952).

⁴ F. WUHRMANN und CH. WUNDERLY, *Die Bluteiweisskörper des Menschen* (Basel 1957), p. 100.

⁵ O. DREES und TH. MESTER, in Vorbereitung.