

Zakład Fizyki Chemicznej i Fizykochemicznych Metod Rozdzielania
Wydziału Chemii

ANDRZEJ L. DAWIDOWICZ*, TERESA RAUCKYTE*,
MAGDALENA FIJAŁKOWSKA**

Metody analizy antytrombiny III (naturalnego antykoagulantu krwi) oraz sposoby otrzymywania koncentratów zawierających antytrombinę III

The Methods of Antithrombin III Analysis (The Natural Blood Anticoagulant) and the Preparation of the Concentrates Containing Antithrombin III

1. WSTĘP

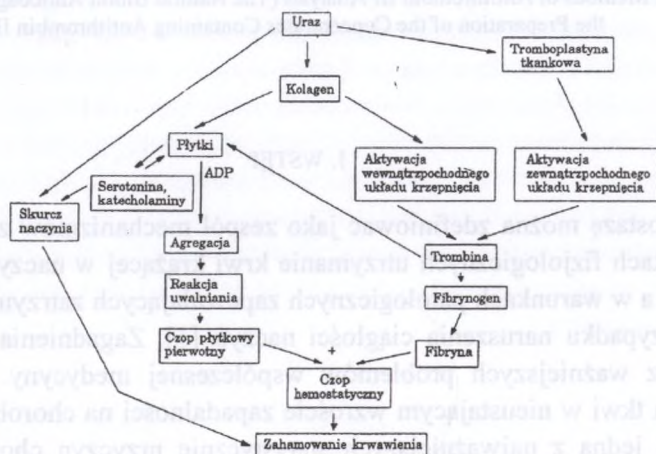
Hemostazę można zdefiniować jako zespół mechanizmów zapewniających w warunkach fizjologicznych utrzymanie krwi krążącej w naczyniach w stanie płynnym, a w warunkach patologicznych zapewniających zatrzymanie krwawienia w przypadku naruszenia ciągłości naczyń [1]. Zagadnienia hemostazy są jednymi z ważniejszych problemów współczesnej medycyny. Główna tego przyczyna tkwi w nieustającym wzroście zapadalności na chorobę zakrzepową, która jest jedną z najważniejszych statystycznie przyczyn chorób i zgonów. Prawidłowy przebieg hemostazy zdeterminowany jest przebiegiem dwóch procesów — krzepnięcia i fibrynolizy — które w warunkach fizjologicznych równoważą się nie powodując krwawienia ani nadmiernego krzepnięcia. Układ hemostatyczny do swego sprawnego działania wymaga udziału krwi (zarówno krwinek, jak i osocza), naczyń krwionośnych z otaczającymi tkankami, mechanizmów hemodynamicznych, narządów krwiotwórczych oraz układu nerwowego i hormonalnego [2].

* Zakład Fizyki Chemicznej i Fizykochemicznych Metod Rozdzielania, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej, 20-031 Lublin, Pl. Marii Curie Skłodowskiej 3.

** Oddział Anestezjologii i Intensywnej Terapii, Państwowy Szpital Kliniczny Nr 1 w Lublinie, 20-950 Lublin, ul. Staszica 16

Krzepnięcie krwi można określić jako przejście rozpuszczalnego białka — fibrynogenu — w nierozpuszczalną fibrynę [4]. Jest to proces bardzo złożony (Ryc.1), przebiegający z udziałem kilkunastu czynników (tzw. osoczowych czynników krzepnięcia) [5–6] zestawionych w tabeli 1. Każdy z nich występuje w formie nieaktywnej lub jako proenzym. W czasie krzepnięcia są one przekształcane w formę mającą aktywność enzymatyczną (Ryc.2). Aktywacja każdego czynnika jest reakcją łańcuchową, a nowo powstały enzym reaguje z jego specyficznym substratem zmieniając go w aktywny enzym. Wszystkie czynniki osoczowe z wyjątkiem czynnika tkankowego oraz wapnia są białkami. Można je podzielić na 3 grupy [7]:

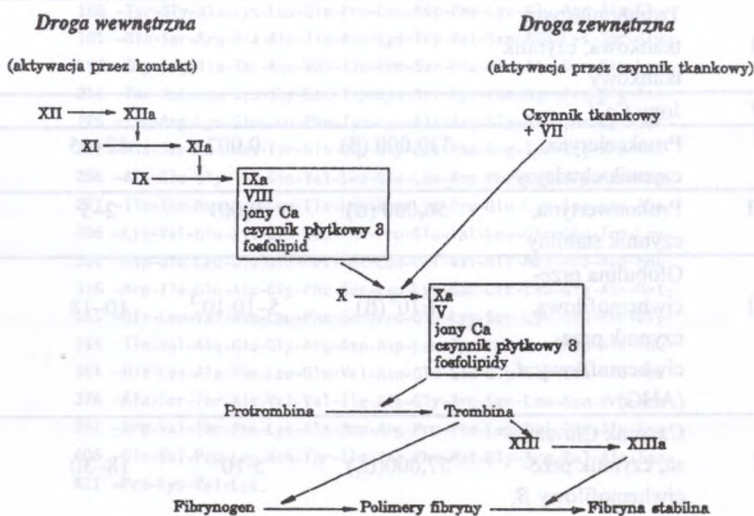
1. czynniki zespołu protrombiny — II, VII, IX, X;
2. czynniki wrażliwe na działanie trombiny — I, V, VIII, XIII;
3. czynniki kontaktu — XI, XII, prekalkreina oraz wielkocząsteczkowy kininogen.



Ryc. 1. Schemat mechanizmu hemostazy wg [3]

Ciąg reakcji zachodzących w procesie krzepnięcia krwi prowadzi do powstania enzymu, który przeprowadza protrombinę w trombinę. Jest nim aktywny czynnik X (oznaczany Xa). Jego aktywacja może przebiegać dwiema drogami (Ryc. 2). W układzie zewnątrzprzochodnym krzepnięcie zapoczątkowuje zetknięcie krwi z tromboplastyną tkankową. Dochodzi do reakcji tromboplastyny (czynnika tkankowego) z czynnikiem VII w obecności jonów wapnia. W wyniku tej reakcji powstaje kompleks przekształcający czynnik X w aktywny Xa.

W układzie wewnątrzpochodnym krzepnięcie zapoczątkowuje kontakt z kolagenem odsłoniętym w uszkodzonej ścianie naczynia. Aktywuje to czynnik XII w obecności kalikreiny i wielkocząsteczkowego kininogenu. Ten z kolei aktywuje czynnik XI. Aktywny czynnik XI powoduje aktywację IX, a ten w kompleksie z VIII i fosfolipidem płytkowym w obecności jonów wapnia aktywuje czynnik X. Aktywny czynnik X powoduje przekształcenie protrombiny w trombinę przy udziale czynnika V, jonów wapnia i fosfolipidów. Końcową fazą jest przejście rozpuszczalnego fibrynogenu w nierozpuszczalną fibrynę czyli włóknik, stabilizowaną przez czynnik XIIIa.



Ryc. 2. Uproszczony schemat krzepnięcia krwi wg [8]

Poza czynnikami biorącymi udział w pobudzeniu procesów hemostazy występują we krwi również czynniki hamujące te procesy, czyli fizjologiczne inhibitory krzepnięcia, głównie antytrombina III (AT III). Ta syntetyzowana w wątrobie glikoproteina ma średnią masę cząsteczkową ok. 56000. Jej strukturę (schematycznie zaprezentowaną na Ryc. 3) stanowi pojedynczy łańcuch glikoproteinowy zawierający we frakcji α_2 -globuliny 424 aminokwasy. Pełną pierwszorzędową strukturę AT III wprowadzono w 1979 roku [9]. Stwierdzono, że trzy obecne w molekułe połączenia S—S formują się przez Cys⁸—Cys¹²⁸, Cys²¹—Cys⁹⁵ i Cys²³⁹—Cys⁴²² (poza molekułą).

Tabela 1. Niektóre właściwości czynników krzepnięcia wg [5,6]

Oznaczenie czynnika	Synonim	Masa cząst. wg danych elektro- foretycznych	Stężenie w osoczu, w [g/dm ³]	Czas półtrwania (t _{1/2}) w [h]	Minimum aktywności przy izolowa- nym niedobo- rze w [%]
I	Fibrynogen	340,000 305,000 (β ₂)	2,0–4,5	110–112	50
II	Protrombina	72,000 (α ₁)	0,05–0,1	41–72	20
III	Tromboplastyna tkankowa, czynnik tkankowy				
IV	Jony Ca ⁺²				
V	Proakceleryna, czynnik chwiejny	330,000 (β)	0,007	12–15	10–15
VI	Prokonwertyna, czynnik stabilny	56,000 (α)	0,001	2–5	10
VII	Globulina prze- ciwhemofilowa, czynnik prze- ciwhemofilowy A, (AHG)	1·10 ⁶ (β)	5–10·10 ⁻³	10–18	25
IX	Czynnik Christma- sa, czynnik prze- ciwhemofilowy B, (PTC)	57,000(α ₁)	5·10 ⁻³	18–30	20–25
X	Czynnik Stuarta Prowera	59,000 (α ₁)	0,1	20–42	20
XI	Czynnik Rosen- thala, czynnik przeciw hemofilo- wy C, (PTA)	180,000 (γ)	0,006	10–20	10–15
XII	Czynnik Hagemana	80,000 (β)	15–47·10 ⁻³	50–70	5
XIII	Czynnik stabilizu- jący skrzep, fibry- naza, (FSF)	340,000 (β)	0,01–0,04	100–200	2–10
	Prekalikreina	95,000 (α)			
	Wielkocząstecz- kowy kininogen	197,000 (α)			

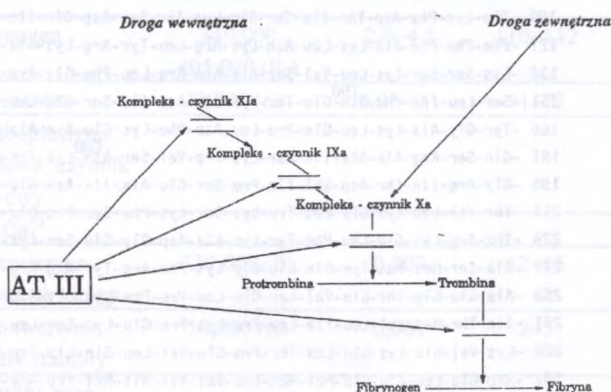


Ryc. 3. Pierwszorzędowa struktura ludzkiej antytrombiny III wg [9]

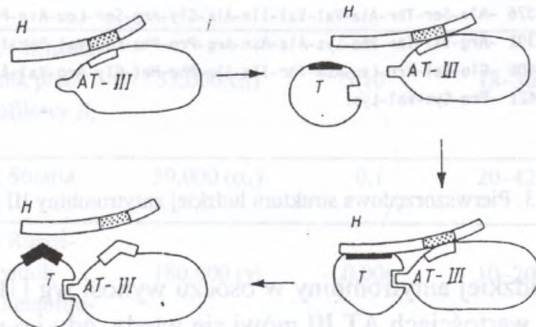
Zawartość ludzkiej antytrombiny w osoczu wynosi wg [10] 150–350 mg/dl. O prawidłowych wartościach AT III mówi się wtedy, gdy jej aktywność wynosi 85–115% normy lub 0,85–1,15 j/ml. Gdy powstanie rozbieżność pomiędzy aktywnością (obniżona) a stężeniem (prawidłowe), należy dopatrywać się zaburzeń w syntezie. Aktywność poniżej 70% normy uznawana jest za niedobór [11].

Jak wykazano, AT III jest bardzo silnym inhibitorem trombiny i czynnika Xa (Ryc. 4). Hamuje także, chociaż słabiej, aktywność czynnika IXa, XIa, XIIa oraz plazminy — enzymu powodującego rozpad włóknika (czyli fibryny) w procesie fibrylizacji [12]. AT III tworzy kompleks z trombiną. Reakcja hamowania trombiny przez AT III ma charakter progresywny, a zwiększa ją ok.

tysiąckrotnie heparyna. Najpierw powstaje kompleks AT III + heparyna (Ryc. 5). Heparyna po przyłączeniu do grupy lizylowej antytrombiny III zmienia konformację tego inhibitora i czyni go bardziej dostępnym dla trombiny. Następnie tworzy się kompleks stechiometryczny (1:1) (AT III + heparyna) + trombina. W dalszej kolejności cząsteczka heparyny odłącza się i uczestniczy w nowych operacjach.



Ryc. 4. Schemat hamującego działania AT III wg [13]



Ryc. 5. Inaktywacja trombiny przez AT III — rola heparyny jako kofaktora wg [14].

H — cząsteczka heparyny; *T* — cząsteczka trombiny

O potencjalizacji heparynowej powyższych reakcji świadczy fakt, że jeżeli proces inaktywacji trombiny trwa *in vitro* 20–30 min, to ten sam proces w obecności kompleksu AT III + heparyna zachodzi zaledwie w 20–30 s. [15]. Jest prawdopodobne że heparyna wiąże się również z samą trombiną zwiększając jej dostępność dla AT III [16].

Pojęcie *antytrombina* po raz pierwszy zostało wprowadzone w roku 1905 przez Morawitza [17]. Liczne badania nad hemostazą doprowadziły do stwierdzenia, że w osoczu istnieje kilka czynników o właściwościach antytrombinowych [18]. Różnią się one między sobą budową chemiczną, cechami fizykochemicznymi i aktywnością biologiczną. Szeroko rozpowszechniony podział z r. 1954 zakładał istnienie 6 czynników antytrombinowych w osoczu [19] (oznaczanych także rzymskimi literami). Dołączono do nich jeszcze siedem następujących:

- I. wiązanie trombiny przez fibrynę;
- II. kofaktor heparyny;
- III. α_2 -globulinę (antytrombinę progresywną);
- IV. neutralizację trombiny w przebiegu aktywacji protrombiny;
- V. aktywność antytrombinową w stanach patologicznie podwyższonych immunoglobulin;
- VI. produkty degradacji fibrynogenu (PDF);
- VII. α_2 -makroglobulinę.

Bardziej dokładny podział antytrombin można znaleźć w rozprawie doktorskiej P. Freysinga [20]:

- AT I jest niczym innym, jak fibryną zdolną do wiązania i neutralizowania trombiny. W tym przypadku jej działanie jest bardzo mocne i gwałtowne. 10 mg fibryny jest zdolne do zneutralizowania 250 j. trombiny [21,22].
- AT II przypuszczalnie odpowiada kofaktorowi heparyny, czyli czynnikowi, który w obecności heparyny wykazuje natychmiastowe działanie typowe dla antytrombiny.
- AT IV jest antytrombiną progresywną. Staje się aktywna chemicznie, gdy zmieszamy z eterem plazmę, w której znajduje się jedynie aktywna AT III. Przejawem tej aktywności jest pojawienie się dużych ilości inhibitora trombiny z chwilą rozpoczęcia aktywacji fazowej protrombiny [23]. Tego rodzaju działania nie można przypisać żadnej określonej substancji chemicznej. Wielu autorów upatruje przyczyny tego zjawiska we właściwościach enzymatyczno-kinetycznych AT IV.
- AT V jest czynnikiem o charakterze patologicznym. Należy do grupy γ -globulin.

— AT VI. Nazwę tę przypisano jednemu ze związków aktywnych, który jest produktem pośrednim procesu degradacji fibrynogenu.

— AT VII to α_2 -makroglobulina (M_r ok. 820000). Przejawia ona działanie typowe dla progresywnej antytrombiny. Jest ono charakterystyczne dla antytrypsyny i antyplazminy. Wydaje się, że jest jednym z czynników regulacji hormonalnej, a jej zawartość rośnie w miarę rozwoju organizmu.

Powyższe podziały nie są uwzględniane przez wszystkich autorów i nie mają znaczenia klinicznego. Powszechnie uznawana jest AT III oraz trzy inne glikoproteiny o aktywności antytrombinowej osocza:

α_2 -makroglobulina (M_r ok. 650.000),

α_1 -antytrypsyna (M_r ok. 50.000),

inhibitor C_1 -esterazy (M_r ok. 105.000) [6].

Mają one mniejsze niż AT III znaczenie fizjologiczne w procesie hamowania krzepnięcia, ale stwarzają kłopoty przy jej oznaczaniu i oczyszczaniu.

Wrodzony niedobór AT III jest cechą dziedziczną autosomalnie w sposób dominujący. Niedobór wynoszący 25–50% poziomu prawidłowego ujawnia się klinicznie pod postacią zakrzepicy żyłnej. Czynnikiem wywołującym incydent zakrzepowy może być uraz, zabieg operacyjny, ciąża itp. [24].

Częstsze od niedoboru wrodzonego są przypadki nabytego obniżenia poziomu AT III. Obserwowano je u chorych z ciężkimi uszkodzeniami mięszu wątroby (spadek syntezy), z zespołem nerczycowym (wzrost utraty), zespołem rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego, tzw. DIC (wzrost zużycia), w powikłaniach zakaźnych bakteriami G(-) po operacjach oraz w niektórych przypadkach przyjmowania środków antykoncepcyjnych. Oznaczanie poziomu i aktywności AT III jest niewątpliwie pomocne w diagnostyce i różnicowaniu wielu jednostek chorobowych. Jeśli weźmiemy pod uwagę, że we wszystkich przypadkach niedoboru może zaistnieć konieczność profilaktycznego lub leczniczego stosowania antykoagulantów oraz substytucji AT III, to problem analizy AT III bezpośrednio w płynach ustrojowych staje się wyjątkowo aktualny. Mając przy tym na względzie cechy osobnicze (ilość krwi krążącej, aktualne stężenie AT III w organizmie, wartość niedoboru, czas półtrwania) dochodzi się do wniosku, że analiza AT III winna być analizą rutynową, która musi być prowadzona u wszystkich chorych poddawanych kuracji antytrombinowej oraz u chorych szczególnie zagrożonych ryzykiem wystąpienia choroby zakrzepowej.

2. METODY ANALIZY ANTYTROMBINY III

Na świecie opracowano kilka metod analizy AT III. Generalnie można je podzielić na dwie grupy: 1) metody niechromatograficzne; 2) metody chromatograficzne. Wśród metod niechromatograficznych wyróżniamy metody: a) immunologiczne; b) czynnościowe: metodę krzepnięcia fibrynogenu i plazminy; metodę amidolityczną opartą na syntezie substratów chromogennych lub fluorogennych. Chromatograficzne metody analizy AT III opierają się głównie na mechanizmie jonowymyennym, sitowo-molekularnym i powinowactwie.

2.1. IMMUNOLOGICZNE METODY NIECHROMATOGRAFICZNE

Immunoelektroforeza

Rozdział białka metodą immunoelektroforezy został wprowadzony w r. 1953 przez Grabara i Williama [25]. Dzięki modyfikacji dokonanej w r. 1955 przez Scheideggera można ją powszechnie wykonywać na szkiełkach mikroskopowych [26]. Postępowanie uwzględniające zastosowanie sprzętu i odczynników firmy CORNING jest dalszym udoskonaleniem i uproszczeniem mikrometody Scheideggera. W tej modyfikacji badanie odbywa się na gotowym, dostępnym w handlu żelu agarozowym pokrywającym plastikową, przezroczystą folię [27].

Immunoelektroforeza polega na tym, że w fazie elektroforezy badaną mieszaninę białek umieszcza się w otworku wyciętym w żelu agarowym i pod działaniem pola elektrycznego uzyskuje się rozdział elektroforetyczny na poszczególne frakcje białkowe. Następnie wycina się w agarze rowek w odległości 3–5 mm od rozdzielonych frakcji białkowych, równoległe do osi długiej szkiełka przedmiotowego. Rowek wypełnia się bogatą w przeciwciała surowicą. Następuje dyfuzja w kierunku prostopadłym do rozdzielanych frakcji białkowych. Gdy przeciwciała (dzięki dyfuzji) zetkną się z odpowiednią ilością homologicznych antygenów, w agarze powstają charakterystyczne strąty (zmętnienia). W celu uzyskania lepszej widoczności można je zabarwić stosując rozmaite barwniki (np. azokarmin, indygokarmin, czerń amidową lub błękit bromofenolowy) i różnicować dalej (np. przez wybarwienie lipoproteidów sudanem lub czernią olejową o) aż do utrwalenia na zdjęciu fotograficznym. Zastosowane przeciwciało może mieć także atomy znakowane, co oczywiście umożliwia zastosowanie radiometrycznego systemu detekcji.

W porównaniu z elektroforezą immunoelektroforeza umożliwia rozróżnienie składników wykazujących jednakową bądź zbliżoną szybkość wędrówki w polu elektrycznym. W rezultacie w normalnej ludzkiej surowicy zamiast 5 frakcji białkowych można oznaczyć ponad 20 różnych elementów.

Wyróżniamy następujące typy immunoelektroforezy [28]: a) prostą według Grabara i Williamsa; b) krzyżową według Clarke'a i Freemana; c) raketkową według Laurella. AT III oznacza się metodą immunoelektroforezy raketkowej według Laurella [29]. Zgodnie z cytowaną literaturą immunoelektroforezę prowadzi się na 1% żelu agarozowym (firmy BEHRING) zawierającym przeciwciała (na 19 ml żelu — 0,2 ml przeciwciał). Do przygotowania żelu stosuje się bufor, złożony z 40 mM/l weronalu i 7 mM/l EDTA o pH 8,6. W aparaturze wykorzystuje się bufor o pH 8,6, zawierający 28 mM/l weronalu. Na żelu wycina się wgłębienie o średnicy ok. 5,5 mm, w które wprowadza się 30 μ l badanej próby. Elektroforezę prowadzi się przez 17 h przy natężeniu 16 mA na płytce chłodzonej wodą. Posługując się próbkami standardowymi sporządza się krzywą kalibracyjną, do której odnosi się rezultaty otrzymane na materiale badanym. Rycina 6 prezentuje przykładowy obraz uzyskany z immunoelektroforezy raketkowej AT III według Laurella.

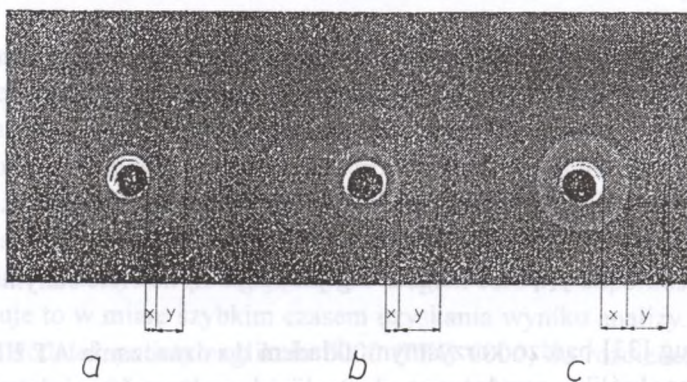


Ryc. 6. Zespól obrazów immunoelektroforetycznych (odpowiadających różnym stężeniom AT III) uzyskanych dla poszczególnych frakcji elementów strefy stężeniowej) zbieranych podczas elucji koncentratu z kolumny chromatograficznej wg [29]. (Po złożeniu immunoelektroforogramów rozkład stężenia AT III w strefie przypomina krzywą Gaussa)

Immunodyfuzja

Zasada pomiaru metodą immunodyfuzji polega na tym, że badaną surowicę wprowadza się do okrągłego wgłębienia wydrążonego w żelu agarowym, zawierającym surowicę monospecyficzną, skierowaną przeciwko antygenowi, którym jest białko surowicy. Antygen dyfundując do żelu wiąże się z cząsteczkami przeciwciał i w miejscu optymalnego stosunku stężeń antygeny do przeciwciał (a więc w miejscu, w którym antygen zostaje wysycony cząsteczkami przeciw-

ciał) tworzy się pierścień precypitacyjny. Między pierścieniem precypitacji a otworem, do którego dodano antygen, nie stwierdza się precypitacji, ponieważ antygen dyfundujący w tej przestrzeni jest w nadmiarze w stosunku do przeciwciał i tworzy z nimi kompleksy rozpuszczalne. Średnica pierścienia precypitacyjnego jest proporcjonalna do stężenia antygeny. Pomiary przeprowadza się zwykle po kilku godzinach dyfuzji, odczytując stężenie badanego antygeny z krzywej kalibracyjnej otrzymanej na podstawie pomiaru średnicy pierścienia dla kilku wzorców antygeny. AT III jest oznaczana za pomocą immunodyfuzji radialnej według Manciniego [30]. Do oznaczania stosuje się płytki firmy BEHRING, pokryte agarem zawierającym immunosurowicę specyficzną dla AT III. W każdej płytce znajduje się przeważnie 12 otworów. Do każdego otworu wprowadza się standardową ilość badanej próbki (tzn. plazmy lub surowicy). Przed rozpoczęciem oznaczenia należy przeprowadzić kalibrację każdej płytki stosując do tego celu standardową mieszaninę białek plazmy otrzymaną z laboratorium Behringa. Istnieje bezpośrednia liniowa zależność pomiędzy kwadratem średnicy pierścienia dyfuzyjnego a stężeniem AT III. Wizualną analizę płytek przeprowadza się po upływie 48 h od chwili naniesienia próbki plazmy lub surowicy. Po upływie tego czasu można również wykonać fotografię próbki. Interpretacja wyników zależy bezpośrednio od rodzaju wybranej metody oznaczania. Typowy obraz uzyskiwany w trakcie analizy immunodyfuzyjnej (także i w przypadku analizy AT III) przedstawia rycina 7.



Ryc. 7. Efekt immunodyfuzji radialnej antytrombiny III. Analizowane preparaty zawierają odpowiednio: a) 25% AT III; b) 50% AT III; c) 100% AT III. Wewnętrzny pierścień precypitacyjny oznaczony na zdjęciu jako x odpowiada AT III. Jak widać jego szerokość zależy od ilości AT III. Zewnętrzny pierścień (y) koresponduje z α_{2HS} -glikoproteina

Radioimmunologiczna metoda (RIA)

Podstawowym odczynnikiem w analizie radioimmunologicznej jest badany antygen znakowany pierwiastkiem promieniotwórczym. Antygenem może być zarówno hormon, lek, antygen wirusowy, jak też czynnik krzepnięcia. Znakovanie pierwiastkiem promieniotwórczym polega na wprowadzeniu do cząstki antygeny jednego lub kilku atomów pierwiastka emitującego promieniowanie β lub γ . Najczęściej stosowany do znakowania antygenów jest jod (^{125}J), tryt (^3H) lub węgiel (^{14}C).

Podstawą metod radioimmunologicznych jest zjawisko współzawodnictwa antygeny znakowanego i nieznakowanego o ograniczoną liczbę miejsc wiążących na cząsteczce przeciwciała. Zakłada się, że zarówno antygen znakowany, jak nieznakowany mają taką samą zdolność wiązania się z przeciwciałem. Podczas oznaczenia radioimmunologicznego ilość przeciwciała i antygeny znakowanego jest zawsze stała. Zmienna jest jedynie ilość antygeny nieznakowanego [31]. Stosowane w praktyce metody radioimmunologiczne różnią się sposobem rozdziału frakcji wolnej od związanej. Najczęściej stosowanymi metodami rozdziału są [32]:

- 1) metoda podwójnych przeciwciał;
- 2) metoda węglowa;
- 3) metoda z zastosowaniem ekstrakcji na ciele stałym.

W chwili obecnej procedura z wykorzystaniem ekstrakcji na ciele stałym (*solid phase extraction* — SPE) wydaje się najbardziej dokładna. Przewiduje ona:

- 1) otrzymanie i oczyszczanie jedną z technik powinowactwa AT III znaczonej ^{125}J ;
- 2) immobilizację przeciwciała względem AT III na ciele stałym.

Według [33] bardzo korzystnym układem do oznaczania AT III jest immunoglobulina królika przyłączona do polisacharydu, takiego jak sefaroza C (*Sepharose*) z białkiem A. W celu wykonania oznaczenia miesza się znaną ilość roztworu, w którym badamy zawartość AT III ze znaną ilością roztworu zawierającego AT III znaczoną ^{125}J i znaną ilością zawiesiny sorbentu ze zimmobilizowaną immunoglobuliną. Po okresie inkubacji zawiesinę odwirowuje się,

a otrzymany osad płucze i określa radioaktywność licznikiem γ . Oczywiście pomiary ilościowe wymagają wykonania krzywej kalibracyjnej.

Nefelometria i turbidymetria

Do oznaczania małych zawartości niektórych substancji można wykorzystać to, że tworzą one z odpowiednimi odczynnikami koloidalne zawiesiny (w immunologii tworzy się kompleks antygen-przeciwciało). Trwałe zawiesiny wykazują szczególne właściwości optyczne. Wiązka promieniowania padającego na mętny ośrodek zostaje tylko częściowo przepuszczona. Reszta ulega absorpcji i rozproszeniu przez cząstki zawiesiny.

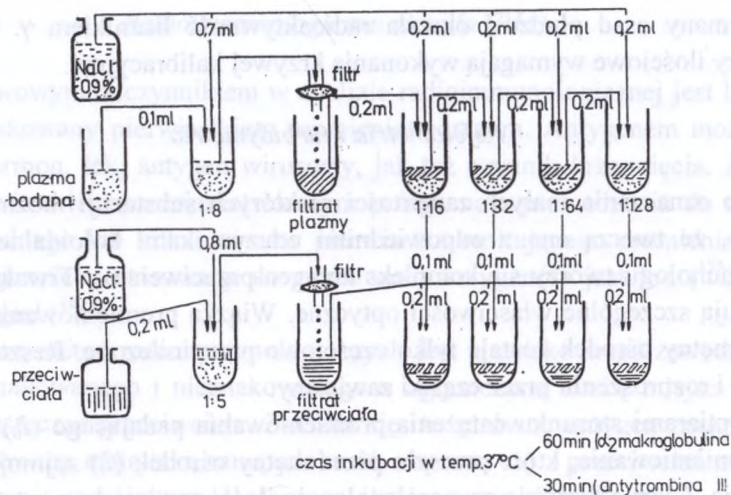
Pomiarami stosunku natężenia promieniowania padającego (I_0) do natężenia promieniowania, które przeszło przez mętny ośrodek (I_t) zajmuje się turbidymetria. I_t jest odwrotnie proporcjonalne do ilości zawiesiny, a zatem do stężenia oznaczanego składnika.

Nefelometria opiera się na pomiarach natężenia promieniowania rozproszonego przez cząstki ośrodka (I_n). Pomiar przeprowadza się na zasadzie porównania wielkości I_n bądź z natężeniem promieniowania padającego (I_0), bądź z natężeniem promieniowania rozproszonego przez odpowiedni wzorzec (I'_n).

W omawianych pomiarach konieczne jest ścisłe zachowanie identyczności warunków otrzymywania zawiesiny. Decydują one o rozmiarach cząstek koloidalnych, a więc wpływają na wartość natężenia promieniowania rozproszonego.

Oznaczanie AT III prowadzi się najczęściej za pomocą nefelometrii i turbidymetrii laserowej [34]. Przed przystąpieniem do analizy surowicę odpornościową i plazmę filtruje się stosując na przykład filtry millex — 0,45 μm . W celu wykonania krzywej kalibracyjnej próbki plazmy rozcieńcza się solanką (0,9% NaCl). Roztwory surowicy i plazmy można mieszać w kuwecie pomiarowej. Po zmieszaniu mieszaninę należy inkubować w temp. 37°C przez 120 min.

Wprawdzie metody te wymagają użycia drogich surowic odpornościowych, jednak owocuje to w miarę szybkim czasem uzyskania wyniku analizy. Badania dowiodły, że dodatek polietylenglikolu 6000 (PEG 6000) do rozcieńczonej surowicy odpornościowej może zmniejszyć czas reakcji nawet do 1 min. PEG 6000 przyspiesza wytrącenie kompleksu antygen-przeciwciało, a przez to zmniejsza czas pomiaru. Opisaną procedurę postępowania obrazowo przedstawia rysina 8.



Ryc. 8. Schemat postępowania przy oznaczaniu AT III metodą nefelometryczną

2.2. METODY NIECHROMATOGRAFICZNE, CZYNNOŚCIOWE

Metody amidolityczne

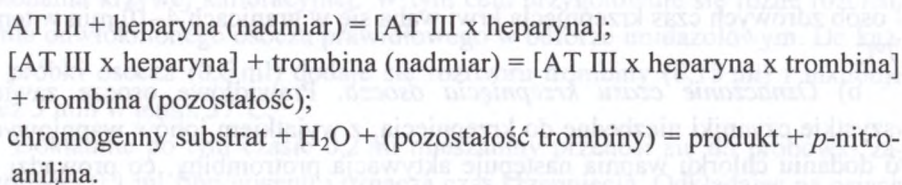
Proteolityczna aktywność niektórych białek może być oznaczona fotometrycznie przy zastosowaniu substratów chromogennych. Substraty chromogenne [35] są przeważnie krótkimi peptydami (zakończonymi arginina, lizyną lub tyrozyną), do których jest przyłączana chromogenna *p*-nitroanilina (*p*NA). Enzym, którego aktywność oznaczamy, rozrywa wiązanie między aminokwasem i *p*NA, w wyniku czego uwalnia się *p*NA zabarwiając roztwór na żółto. Wykorzystując spektrofotometr bada się zmianę gęstości optycznej roztworu przy długości fali 405 nm i wnioskuje o aktywności enzymu [36].

Pierwszym chromogennym substratem zastosowanym w badaniach amidolitycznych był tripeptyd S-2160 (N-benzoilo-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilid) wrażliwy na działanie trombiny, trypsyny i innych proteaz. Obecnie stosowane są nie tylko tri, ale także tetrapeptydy chromogenne. Przy użyciu chromogennych substratów można oznaczyć metodą amidolityczną nie tylko aktywne enzymy, lecz również w odpowiednich układach — kofaktory i inhibitory. Opracowano już wiele metod ilościowego pomiaru biomolekuł z zastosowaniem tego typu substratów. W sprzedaży znajduje się szeroki asortyment zestawów do bezpośredniego lub pośredniego oznaczenia AT III metodą amidolityczną:

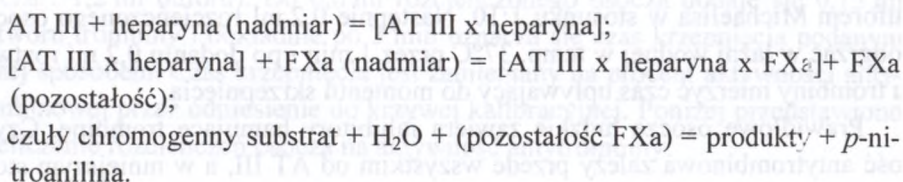
(*Coatest/Antithrombin*, KABI; *AT III Reagent Kit*, IMMUNO AG; *Antithrombin III*, BOEHRINGER), heparyny (*Coatest/Heparin*, KABI), białka C (*Coatest/Protein C*, KABI) i wiele innych. Ze względu na dużą czułość substratów do badań można stosować bardzo małe próbki osocza. Badania te są proste w wykonaniu, dokładne i łatwe do automatyzacji. Stosowanie chromogennych substratów ogranicza ich wysoka cena.

Zasada pomiaru zawartości AT III metodą amidolityczną przy użyciu substratów chromogennych sprowadza się do zmieszania badanego osocza (rozcieńczonego buforem zawierającym heparynę) z nadmiarem trombiny wołowej. W obecności heparyny AT III szybko inaktywuje trombinę. W oznaczeniach używa się trombiny wołowej, ponieważ w obecności trombiny ludzkiej u chorych z wrodzonym niedoborem AT III wyniki pomiaru są zawyżone. Z resztkowej, nie zahamowanej aktywności trombiny wnioskuje się pośrednio o ilości AT III w badanej próbce osocza. Resztkową aktywność trombiny mierzy się w etapie drugim dodając do mieszaniny inkubacyjnej substrat chromogeny swoisty dla tego enzymu. Najpopularniejszym sposobem — w przypadku analizy trombiny — jest dodanie wspomnianych wyżej peptydów, serynowych proteaz, z przyłączoną pNA [37].

Sporo uwagi przy oznaczaniu trombiny poświęca się także zastosowaniu substratów, które wywołują fluorescencję, np. 4-metoksy- β -naftyłamid lub 5-amidoizoftan kwasu dimetyloestrowego (AIE). Opisane wyżej oznaczanie AT III za pomocą chromogennych substratów metodą amidolityczną przy użyciu trombiny można ująć następująco:



Analogicznie przebiega pomiar, w którym zamiast trombiny używa się czynnika Xa:



W przypadku oznaczania nadmiaru FXa — podobnie jak w przypadku oznaczania trombiny — coraz więcej uwagi poświęca się zastosowaniu substratów fluorogennych. Zaburzenia fotometrycznych oznaczeń (jako efekt wytrącania się fibryny) są likwidowane poprzez rozcieńczenie plazmy w odpowiednim buforze. Fotometryczne oznaczenia mogą być prowadzone z uwzględnieniem kinetyki reakcji lub w punkcie końcowym. Przy pomiarach aktywności AT III postuluje się użycie standardu, co pozwala na kontrolę wyników i przyspieszenie analizy poprzez oparcie się w dalszych pomiarach tylko na molowej ekstynkcji *p*-nitroaniliny.

Metody oparte na pomiarze krzepnięcia

Oznaczenia białek krwi (a szczególnie inhibitorów krzepnięcia krwi) można dokonać przez ogólne próby krzepnięcia krwi. Należą do nich oznaczenia czasu krwawienia, czasu krzepnięcia krwi i osocza, czasu protrombinowego, tromboelastografia itp. Próby te są jednak tylko orientacyjne i mało czułe. Często wystarczy obecność zaledwie 5–10% prawidłowej zawartości niektórych czynników, aby wyniki były zgodne z wymaganymi.

a) *Oznaczenie czasu krzepnięcia krwi.* Czasem krzepnięcia nazywa się okres, jaki upłynął między pobraniem krwi a wytworzeniem się w niej skrzepu. W metodzie Lee i White'a [38] mierzy się czas upływający od momentu wynaczynienia krwi do chwili jej skrzepnięcia w szklanych probówkach. Pozostawienie probówek w łaźni wodnej pozwala na ocenę fizycznych właściwości skrzepu (rozmiar, wygląd, oporność mechaniczna), jego stabilności i retrakcji. U osób zdrowych czas krzepnięcia krwi waha się w granicach 4–10 min w temp. 37°C.

b) *Oznaczenie czasu krzepnięcia osocza.* Prawidłowe osocze zawiera wszystkie czynniki niezbędne do krzepnięcia, z wyjątkiem jonów wapniowych. Po dodaniu chlorku wapnia następuje aktywacja protrombiny, co prowadzi do konwersji fibrynogenu w fibrynę. Czas upływający od chwili dodania chlorku wapnia do momentu powstania skrzepu w mieszaninie reagującej mierzy się stoperem. Wartości prawidłowe czasu krzepnięcia osocza wynoszą 100–180 s.

c) *Oznaczenie czasu krzepnięcia fibrynogenu.* Osocze należy rozcieńczyć buforem Michaelisa w stosunku 1:10. Następnie 0,2 ml rozcieńczonego osocza podgrzać w łaźni wodnej w temp. 37°C przez 1 min i po dodaniu 0,2 ml roztworu trombiny mierzyć czas upływający do momentu skrzepnięcia.

Prawidłowe osocze ludzkie zawiera inhibitory hamujące trombinę. Czynność antytrombinowa zależy przede wszystkim od AT III, a w mniejszym stop-

niu także od α_2 -makroglobuliny, α_1 -antytrypsyny i inhibitora C_1 -esterazy. Ponieważ trombina absorbuje się na skrzepie fibrynowym, przed wykonaniem oznaczenia osocze należy odwłóknąć. W metodzie tej inkubuje się odwłóknione osocze z trombiną, pobiera próbkę mieszaniny inkubacyjnej i dodaje ją do roztworu fibrynogenu. Mierzy się czas krzepnięcia fibrynogenu i porównuje go z czasem krzepnięcia układu zawierającego osocze prawidłowe. Względne wydłużenie czasu krzepnięcia oznacza nadmiar antytrombiny, a skrócenie — jej niedobór [39].

W tejże metodzie ważne jest, by krew cytrynianową i odwirowane osocze przechowywać w naczyniach silikonowych i plastikowych, a czas krzepnięcia oznaczać w probówkach szklanych. Zwraca się uwagę, aby badane osocze i mieszaninę osocza prawidłowego dobrze odwłóknąć (np. za pomocą preparatu arwin).

Do 1 ml osocza dodaje się 0,1 ml preparatu i inkubuje mieszaninę przez 10 min w temp. 37°C . Powstający skrzep usuwa się. Inny sposób odwłóknienia polega na podgrzaniu osocza do temp. 56°C przez 3 min i odwirowaniu precipitatu. Wymaga się dobrze zmianowanych roztworów trombiny. Do 0,6 ml buforu imidazolowego ($pH\ 7,3$) dodaje się 0,15 ml roztworu trombiny i inkubuje mieszaninę przez 3 min w temp. 37°C . Po upływie tego czasu 0,2 ml mieszaniny przenosi się do próbki zawierającej 0,1 ml fibrynogenu i oznacza czas krzepnięcia. Powinien on wynosić 15–20 s. Jeśli jest krótszy lub dłuższy, to należy przygotować inny roztwór trombiny.

Zastosowanie metody opartej na pomiarze czasu krzepnięcia zmusza do wykonania krzywej kalibracyjnej. W tym celu przygotowuje się różne rozcieńczenia odwłóknionego osocza prawidłowego w buforze imidazolowym. Do każdej próbki osocza (0,6 ml) dodaje się roztworu trombiny (0,15 ml) i inkubuje przez 3 min w temp. 37°C .

Dokładnie po tym czasie 0,2 ml mieszaniny przenosi się do próbki zawierającej 0,1 ml fibrynogenu i oznacza czas krzepnięcia. Odkładając na osiach logarytmy czasów krzepnięcia (w sekundach) jako funkcje stężenia osocza (w procentach) powinno się uzyskać linię prostą.

Odwłóknione badane osocze rozcieńcza się buforem imidazolowym (0,4 ml osocza i 1,2 ml buforu). Do 0,6 ml rozcieńczonego osocza dodaje się 0,15 ml roztworu trombiny i dokładnie po 3 min oznacza się czas krzepnięcia podanym wyżej sposobem. Czas krzepnięcia jest zamieniany na procent aktywności antytrombinowej przez odniesienie do krzywej kalibracyjnej. Poniżej przedstawiono przeliczenie rozcieńczeń osocza na aktywność antytrombiny:

1.Odwłókn. osocze, w [ml]		2.Bufor imidazol., w [ml]		Razem 1+2, w [ml]	Aktywn. AT III, w [%]
0,5	+	1,1	=	1,6	125
0,4	+	1,2	=	1,6	100
0,3	+	1,3	=	1,6	75
0,2	+	1,4	=	1,6	25

Poza opisanymi wyżej niechromatograficznymi metodami oznaczania AT III można wykorzystać także elektroforezę. Tę metodę trudno jest zakwalifikować (przy zastosowanym podziale) do metod immunologicznych lub czynnościowych. Warto jednak zauważyć, że rozdział metodą elektroforezy (tak, jak w przypadku omówionej wcześniej immunoelektroforezy) wynika z tego, że białka — jako wielkocząsteczkowe związki amfoteryczne — zmieniają swój ładunek w zależności od pH środowiska. Każde białko ma swój punkt izoelektryczny, to jest takie pH środowiska, przy którym dodatnie i ujemne ładunki w cząsteczce białka się równoważą. Elektroforezę białek surowicy zwykle przeprowadza się w buforze o pH 8,6, przy którym białka w większości mają przewagę ładunków ujemnych i przesuwają się w kierunku anody. Ponieważ różne białka są w różnym stopniu naładowane ujemnie (w zależności od liczby zdysocjowanych grup karboksylowych $-COO^-$), dlatego rozmaite jest oddziaływanie pola elektrycznego na te molekuly. Mówi się, że białka różnią się ruchliwością elektroforetyczną. Jeżeli po pewnym czasie trwania elektroforezy zbada się przesunięcie białek w polu elektrycznym, to okaże się, że jedne spośród nich przemieściły się dalej, a inne bliżej w kierunku anody. W ten sposób dokonuje się rozdziału mieszaniny białek na frakcje białkowe, z których każda zawiera inne białko. Rozdzielone elektroforetycznie pasma barwi się, a następnie za pomocą pomiaru fotometrycznego oznacza się stężenie poszczególnych frakcji. Białka surowicy krwi dzielą się podczas elektroforezy na 5 frakcji:

- α_1 (składnikami są: antytrypsyna, orozomukoid α -lipoproteiny i inne);
- α_2 (haptoglobulina, α_2 -makroglobulina);
- β_1 (transferyna, hemopeksyna);
- β_2 (β -lipoproteiny, składnik C_3);
- γ (immunoglobuliny) [40].

W elektroforezie są wykorzystywane różne techniki [41–44]. W celu oznaczania antytrombiny III stosuje się zazwyczaj elektroforezę dyskową jednokierunkową w warunkach niedenaturujących według L a e m l i [43]. Elektroforezę prowadzi się w kolumnkach o wymiarach 0,9 x 10 cm przez 6 godzin przy

natężeniu prądu 3 mA na rurkę. Bufor elektrodowy stanowi 0,192 M glicyna i 0,025 M tris z dodatkiem 0,001% błękitu bromofenolowego, *pH* 8,3. Postuluje się, aby kolumnienki zawierały dwie warstwy żelu: 1) żel separujący 7%; 2) żel zagęszczający 3%. W skład żelu separującego według [43] wchodzi 2800 mg akryloamidu, 93 mg bis-akryloamidu, 56 mg nadsiarczanu amonu, 7 μ l N,N,N,N-czterometylenodiaminy (temed), 40 ml buforu 0,375 M tris-HCl o *pH* 8,8. Żel zagęszczający zawiera: 300 mg akryloamidu, 20 mg bis-akryloamidu, 14 mg nadsiarczanu amonu, 12 ml temed, 10 ml buforu 0,125 M tris-HCl o *pH* 6,8.

Nieco inne warunki prowadzenia elektroforezy w celu oznaczenia AT III proponuje L e o n o w i c z [45]. Elektroforezę prowadzi się w kolumnienkach o wymiarach 0,9 x 10 cm przez 5 h przy natężeniu 2,5 mA na rurkę. Bufor elektrodowy o *pH* 8,45 stanowi mieszanina 0,05 M tris-H₃BO₃ z dodatkiem 0,0001% amidu, 45 mg bis-akryloamidu, 30 mg nadsiarczanu amonu, 0,05 ml 10% etanolowego roztworu temed.

2.3. METODY CHROMATOGRAFICZNE

Chromatografia to zespół metod analitycznych, których jednym z podstawowych zadań jest rozdzielenie mieszaniny substancji na składniki podczas ich wędrówki przez złożę sorbenta. Rozdział następuje wskutek różnej dla poszczególnych składników dynamiki wymiany masy pomiędzy fazami: nieruchomą (stacjonarną) i ruchomą [46]. Elementem wspólnym dla wszystkich metod chromatograficznych jest występowanie faz ruchomej i nieruchomej, między które dzielą się poruszające się wzdłuż złoża substancje. Związki, charakteryzujące się większym powinowactwem do fazy stacjonarnej poruszają się wolniej i odwrotnie, składniki mieszaniny o największym powinowactwie do fazy ruchomej najszybciej opuszczają złożę chromatograficzne. W praktyce stosowanych jest wiele metod chromatograficznych, które różnią się mechanizmem rozdziału. W celu oznaczania i oczyszczania AT III wykorzystuje się zasadniczo chromatografię jonowymienną, sitowo-molekularną (żelową) oraz powinowactwa (affinitywną).

Podstawą rozdziału w chromatografii jonowymiennej jest wymiana jonowa, która polega na tym, że wymienniacz jonowy (jonit), zanurzony do roztworu elektrolitu, pobiera z tego roztworu kationy lub aniony substancji rozdzielanych oddając równoważną ilość jonów o takim samym znaku [47]. Każdy jonit musi zawierać grupy aktywne, zdolne do zatrzymania jonów przeciwnego znaku — przeciwjonów. Prędkość poruszania się poszczególnych składników mieszanin

wzdłuż złoża jonitu zależy przede wszystkim od stałych równowagi reakcji wymiany jonowej. W chromatografii sitowo-molekularnej rozdział na kolumnach wypełnionych ziarnem sorbentu o określonej średnicy porów następuje dzięki zróżnicowanej zdolności penetracji wnętrza ziarna przez molekuly [48,49]. Przyjmuje się, że ta różna zdolność penetracji wynika ze zróżnicowanej wielkości separowanych molekuł. Droga, którą musi pokonać każda molekula złożonej mieszaniny do momentu wycieku z kolumny, będzie różna dla poszczególnych składników różniących się wielkością i tym większa, im dana substancja swobodniej penetruje ziarna żelu. Najdłuższą drogę muszą pokonać cząsteczki o najmniejszym ciężarze cząsteczkowym i dlatego wypływają najpóźniej z kolumny. Związki o znacznej masie cząsteczkowej, których efektywna średnica jest większa niż pory w ziarnach żelu, wędrują jedynie przestrzenią międzyziarnową (a więc najszybciej) i pojawiają się w wycieku z kolumny jako pierwsze.

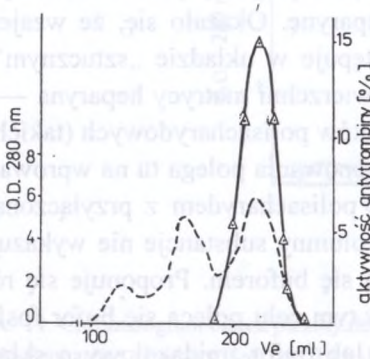
Chromatografia powinowactwa jest metodą rozdziału opartą na specyficznym, komplementarnym oddziaływaniu między związkiem rozdzielanym (enzymem, receptorem, przeciwciałem, lektyną, kwasem nukleinowym) a ligandem chemicznie związanym (immobilizowanym) z nierozpuszczalnym złożem (nośnikiem) [50,51]. Znakomita większość związków biologicznie czynnych wykazuje zdolność do specyficznego rozpoznawania innych substancji (komplementarnego oddziaływania z innymi substancjami). Termodynamiczną wartością określającą tę zdolność jest powinowactwo (*affinity*) wyrażane najczęściej jako stała powinowactwa.

Odmianą chromatografii powinowactwa, w której ligand dołączony do złoża jest barwnikiem wykazującym powinowactwo do pewnego typu białek, jest tzw. *dye-ligand chromatography* [52,53]. Barwnikami z reguły są substancje stosowane typowo w przemyśle włókienniczym. Połączone z polisacharydami — takimi jak agarozą (*Agarose*) lub sefadeks (*Sephadex*) lub innymi nośnikami pozwalają na izolację wielu biomolekuł.

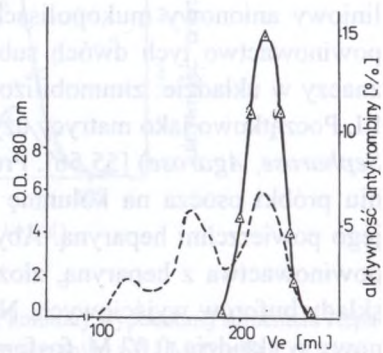
Pierwszym, który wyizolował AT III — wykorzystując do tego celu chromatografię — był A b i l g a a r d [54]. Opierając się na mechanizmie sitowo-molekularnym z częściowo zubożonej krwi wyizolował frakcje o znacznej aktywności antytrombinowej. Frakcje te doczyścił w procesie ultrawierowania, dializy oraz na kolumnie jonowymiennej wypełnionej polisacharydem (takim jak *Deae-Sephadex*). Końcowy preparat miał aktywność 300 razy większą niż sama plazma (osocze).

Procedura zastosowana przez Abilgaarda była bardzo złożona. W pierwszym etapie z plazmy izolowano II, VII, IX i X czynnik krzepnięcia poprzez ich adsorpcję na BaSO₄. Następnie po termicznym odwłóknieniu uzyskana surowica

była poddawana ultrawirowaniu celem usunięcia lipoprotein. Z tak przygotowanego preparatu wyodrębniono nieaktywne białka stosując adsorpcję na $Al(OH)_3$. Zateżone tą metodą białka aktywne rozdzielano na frakcje masowe wykorzystując kolumnę chromatograficzną wypełnioną sefadeksem (*Sephadex G 200*). Uzyskany przez Abilgaarda sitowo-molekularny rozdział przedstawiono na rycinie 9. Procedura opisana do tego momentu pozwala na uzyskanie preparatu o aktywności antytrombinowej przekraczającej 20 razy aktywność plazmy. Podwójne oczyszczanie tak otrzymanego materiału na kolumnie jonowymiennej upakowanej takim polisacharydem, jak *Deae-Sephadex* (Ryc. 10) podnosiło aktywność koncentratu do 300 razy.



Ryc. 9. Chromatogram plazmy (linia przerywana) uzyskany na kolumnie (27 x 600 mm) wypełnionej sorbentem *Sephadex G-200*. Faza ruchoma 0,15 M NaCl w 0,053 M buforze fosforanowym, *pH* 8,0. Pik oznaczony trójkątami odpowiada aktywności antytrombiny



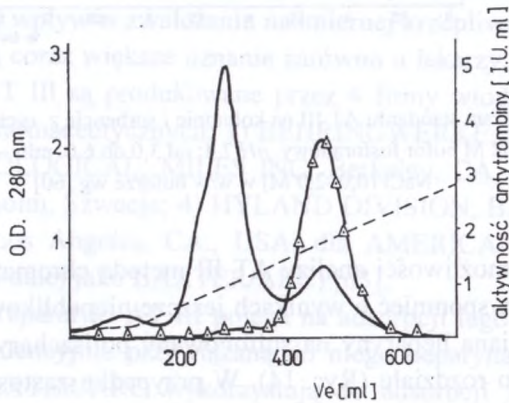
Ryc. 10. Chromatogram koncentratu AT III (otrzymanego po procesie chromatograficznym prezentowanym na rycinie 9) uzyskany na kolumnie wypełnionej *DEAE-Sephadex'em*. AT III eluowano stosując gradient NaCl w 0,1 M buforze Tris, *pH* 9,0. Linie przerywane — gęstość optyczna 280 nm, pik oznaczony trójkątami — aktywność AT III

Ta pierwsza procedura wykorzystująca chromatografią do oczyszczania antytrombiny III była niewątpliwie ogromnym osiągnięciem. Mogła być ona użyta do produkcji preparatów bogatych w AT III, lecz absolutnie nie nadawała się do zastosowania w analizie rutynowej. Wynikało to nie tyle z uciążliwości postępowania, ile z tego, że końcowy preparat mimo znacznej aktywności miał aktywność 5–10% sumarycznej aktywności plazmy użytej do analizy.

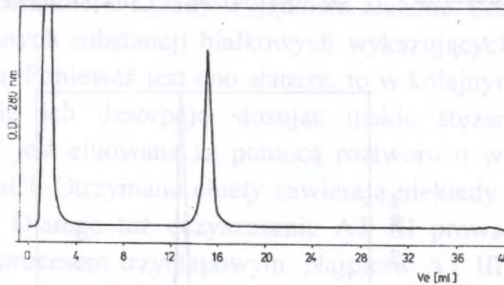
W chwili obecnej badacze prowadzą rozdział i analizę antytrombiny III metodą chromatografii cieczowej opierając się na mechanizmie powinowactwa. Dzięki temu mechanizmowi praktycznie zanika cała złożona procedura przygotowania krwi. Wystarczy potraktować ją substancjami przeciwdziałającymi krzepnięciu (edta, cytrynianami, mrówczanami) — nie można stosować heparyny — oraz odwirować czerwone ciała krwi. Ten ostatni proces nie jest konieczny. Postuluje się przeprowadzenie go jedynie w celu wydłużenia żywotności chromatograficznej kolumny. Rozdział AT III metodą chromatografii powinowactwa bazuje na reakcji komplementarnego oddziaływania tego antykoagulantu z heparyną. Jak już wspomniano AT III neutralizuje aktywne czynniki krzepnięcia zawarte w osoczu. Proces ten przyspieszany jest znacznie przez liniowy anionowy mukopolisacharyd — heparynę. Okazało się, że wzajemne powinowactwo tych dwóch substancji występuje w układzie „sztucznym”, to znaczy w układzie: zimmobilizowana na powierzchni matrycy heparyna — AT III. Początkowo jako matrycy używano nośników polisacharydowych (takich jak *Sepharose*, *Agarose*) [55,56]. Procedura postępowania polega tu na wprowadzeniu próbki osocza na kolumnę wypełnioną polisacharydem z przyłączoną do jego powierzchni heparyną. Aby usunąć z kolumny substancje nie wykazujące powinowactwa z heparyną, złożę przemywa się buforem. Proponuje się różne składy buforów wyjściowych. Najczęściej w tym celu poleca się bufor fosforanowy o składzie 0,02 M fosforanu *pH* 7,4 lub bufor imidazolowy o składzie 0,02 M imidazolu, 0,15 M NaCl *pH* 7,4 lub bufor złożony z 0,02 M tris-HCl, 0,01 M cytrynianu, 0,15 M. NaCl *pH* 7,8. Po przemyciu kolumny prowadzi się elucje zaadsorbowanej AT III stosując w tym celu gradient NaCl do stężenia 2 mol/dm³ w buforze wyjściowym. Rycina 11 prezentuje przykładowy chromatogram antytrombiny III uzyskany przy zastosowaniu sorbentu — heparyno-sefarozy (*Heparin-Sepharose*) [55].

Pomimo wspaniałych własności sorbentów polisacharydowych — jako nośników rozmaitych ligandów przeznaczonych do rozdziału biomolekuł metodą chromatografii powinowactwa — mają one zasadniczą wadę, polegającą na niemożności przyspieszenia analizy (rozdziálu) poprzez zastosowanie wysokiego ciśnienia (wymuszającego przepływ fazy ruchomej) — są miękkie i kruche. Wprawdzie tej wady nie mają nośniki krzemionkowe, ale powierzchnia krzemionki z kolei może działać denaturująco na separowane biomolekuły [57–59]. Po wprowadzeniu matryc mieszanych, zbudowanych z nośnika krzemionkowego (żelu krzemionkowego, szkła o kontrolowanej porowatości), na powierzchnię którego wprowadzono polisacharyd, otrzymano materiał (łączy w sobie cechy zarówno polisacharydów, jak materiału SiO₂) znakomicie nadający się do szyb-

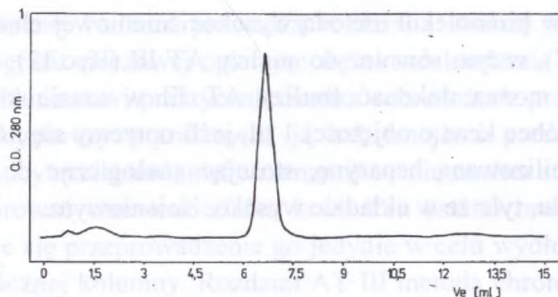
kich rozdziałów biomolekuł metodą wysokociśnieniowej chromatografii affinitywnej (HPAC), w tym również do analizy AT III (Ryc.12). W publikacji [60] wykazano, że można dokonać analizy AT III w czasie krótszym od 5 min (Ryc. 13) w próbce krwi o objętości 1 μ l, jeśli oprzemy się na nośniku zawierającym zimmobilizowaną heparynę, stosując analogiczne do opisanych wyżej zasady rozdziału, tyle że w układzie wysokociśnieniowym.



Ryc. 11. Chromatogram białek plazmy desorbowanych z kolumny wypełnionej sorbentem Heparin-Sepharose. Gradient NaCl od 0,15–1,5 M w buforze złożonym z 0,1 M Tris-HCl i 0,01 M cytrynianu, pH 7,4. Pik oznaczony trójkątami odpowiada aktywności AT III

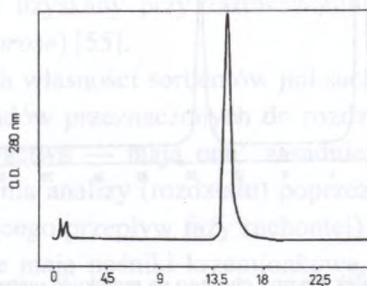


Ryc. 12. Chromatogram białek plazmy chorego na marskość wątroby na kolumnie wypełnionej sorbentem złożonym ze szkła porowatego, na powierzchni którego zimmobilizowano warstwę dextranu ze związaną heparyną. Kolumna 120 x 4 mm. Faza ruchoma: od 0 do 10 min — 0,02 M bufor fosforanowy, pH 7,4; od 10 do 30 min — gradient NaCl (0,0–2,0 M) w w/w buforze. Pierwszy pik — substancje zawarte w plazmie nie wykazujące powinowactwa do heparyny. Drugi pik odpowiada AT III — wg [59]



Ryc. 13. Chromatogram standardu AT III na kolumnie i sorbencie z ryciny 12. Elucja: od 0,0 do 3,0 min — 0,02 M bufor fosforanowy, pH 7,4; od 3,0 do 6,0 min — liniowy gradient NaCl (0,0–2,0 M) w w/w buforze wg [60]

Omawiając możliwości analizy AT III metodą chromatografii powinowactwa warto także wspomnieć o wynikach jeszcze niepublikowanych [61]. Dowodzą one, że zamiana heparyny na sulfonowany polisacharyd prowadzi do bardziej korzystnego rozdziału (Ryc. 14). W przypadku zastosowania na przykład sulfonowanego dekstranu elująca się strefa stężeniowa AT III jest węższa, a otrzymane piki chromatograficzne reprezentujące ten antykoagulant wyższe (przy takim samym ziarnie i gęstości upakowania kolumny). Wskazuje to z jednej strony na możliwość dalszego zwiększenia czułości metody HPLC w odniesieniu do analizy AT III, z drugiej zaś na obniżenie kosztów preparatyki wypełnień do oznaczania i — co ważniejsze — preparatyki koncentratów antytrombinowych.



Ryc. 14. Chromatogram standardu AT III na sorbencie złożonym ze szkła porowatego z warstwą sulfodestranu. Kolumna i warunki — patrz rycina 12 wg [61]

3. PRZEMYSŁOWE METODY OTRZYMYWANIA KONCENTRATÓW ANTYTROMBINY III

Olbrzymie zapotrzebowanie na preparaty zawierające inhibitory enzymów proteolitycznych stało się powodem podjęcia badań mających na celu opracowanie metod ich otrzymywania. Obecne już na rynku koncentraty AT III z uwagi na korzystny wpływ w zwalczaniu nadmiernej krzepliwości oraz stanów zakrzepowych budzą coraz większe uznanie zarówno u lekarzy, jak i pacjentów [62]. Koncentraty AT III są produkowane przez 4 firmy wiodące w produkcji leków i preparatów farmaceutycznych: 1) BEHRINGWERKE, Marburg, Niemcy; 2) CUTTER BIOLOGICAL, MILES INC, Berkeley, CA, USA; 3) KABI VITRUM AB, Stokholm, Szwecja; 4) HYLAND DIVISION, BAXTER HEALTHCARE CORP., Los Angeles, CA., USA; dla AMERICAN RED CROSS (oznaczone skrótoowo dalej jako BAXTER/ARC) [63].

Pierwszy etap preparatyki AT III polega na adsorpcji tego antykoagulantu na sorbencie z kowalencyjnie przywiązanej do niego heparyną. Firmy KABI-VITRUM AB i BAXTER/ARC wykorzystują do adsorpcji AT III sorbent, w którym heparyna przyłączona jest do sefarozy (*Sepharose*) — PHARMACJE, Uppsala, Szwecja. Firma CUTTER w powyższym celu wykorzystuje sorbent o nazwie *Heparin-Ultrogel A4RV* (IBF LA-GARENNE, Francja), a wytwórcy z BEHRINGWERKE w pierwszym etapie preparatyki stosują sorbent *Heparin-Amino-Fractogel* (TOSO-HAAS i E.MERCK, Niemcy).

Krew oraz jej pochodne to układy wyjątkowo złożone. Poza AT III zawierają znaczną ilość innych substancji białkowych wykazujących również powinowactwo z heparyną. Ponieważ jest ono słabsze, to w kolejnym etapie produkcji przeprowadza się ich desorpcję stosując niskie stężenie NaCl (0,1–0,5 mol/dm³). AT III jest eluowana za pomocą roztworu o wysokim stężeniu (1,5–2,0 mol/dm³) NaCl. Otrzymane eluaty zawierają niekiedy inne białka plazmy oprócz AT III. Dlatego też oczyszczanie AT III prowadzone w firmie BAXTER/ARC jest procesem trzyetapowym. Najpierw AT III przyłączona do heparyno-sefarozy (*Heparin-Sepharose*) jest myta buforem soli fosforanowej (PBS) i eluowana 2 M NaCl. Z takiego podwójnie przefiltrowanego eluatu w drugim etapie wytrąca się zanieczyszczenia białkowe stosując 20% glikol polietylenowy (PEG). W trzecim stadium oczyszczania AT III zawartą w supernatancie adsorbują ponownie na heparyno-sefarozie, przemywa PBS i 0,5 M roztworem NaCl, po czym eluuje 2 M NaCl. Po procedurze zatężania i filtracji roztwór AT III jest ogrzewany przez 10–11 h w temp. 60°C w obecności cytry-

nianu sodu, napełniany w pojemniki, sterylizowany i liofilizowany. W procedurze firmy BEHRINGWERKE AT III przyłączona do heparyno-amino-fraktożelu jest po przemyciu wytworzonego kompleksu eluowana. Białkowe zanieczyszczenia znajdujące się w eluacie wytrąca się za pomocą 31,3% siarczanu amonu, sama zaś AT III jest wytrącana 45,9% siarczanem amonu. Uzyskany osad AT III po rozpuszczeniu w roztworze złożonym z sacharozy ($1,00 \text{ g/dm}^3$), glicyny (150 g/dm^3), edta ($2,5 \text{ mmol/dm}^3$) i CaCl_2 (20 mmol/dm^3) ogrzewa się przez 10 h w temp. 60°C . W końcowym stadium otrzymywania koncentratu AT III jest wytrącana ponownie [$45,9\% (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], po czym produkt — po rozpuszczeniu i umieszczeniu w naczyniach — sterylizuje się i liofilizuje.

Oczyszczanie AT III prowadzone przez firmę CUTTER jest w zasadzie procesem dwuetapowym. W pierwszym etapie, po przemyciu 0,3 M NaCl kompleksu AT III- *Heparin-Ultrogel A4R*, AT III eluowana jest 2 M. roztworem NaCl, filtrowana i ogrzewana przez 10–11 h w 60°C w obecności cytrynianu sodu. W drugim stadium oczyszczania uzyskany półprodukt jest ponownie adsorbowany na sorbencie *Heparin-Ultrogel A4R*, myty 0,4 M NaCl i eluowany 2 M NaCl. Po przefiltrowaniu umieszcza się eluat w pojemnikach, sterylizuje i liofilizuje.

W firmie KABI-VITRIUM AB stężony, przefiltrowany eluat oczyszcza się z pozostałych białek stosując wymiennicz kationowy. Przefiltrowany, stężony roztwór AT III ogrzewa się przez 10–11 h w temperaturze 60°C w obecności cytrynianu sodu i sacharozy. Po ponownej filtracji uzyskany preparat antytrombiny jest pakowany, po czym dodaje się do niego ludzką albuminę (w celu podniesienia jej stabilności), sterylizuje i liofilizuje.

A zatem zasadniczym etapem w produkcji koncentratów antytrombiny jest komplementarna adsorpcja AT III na sorbencie z przyłączoną heparyną. Należy jednak podkreślić, że użycie miękkiego żelu lub innych porowatych cząsteczek jako ligandu wykazującego powinowactwo z biomolekułą jest ograniczone czynnikami związanymi z transportem masy. Z tego też względu nie tylko badacze, ale także przemysłowcy coraz większą uwagę poświęcają mikro-porowatym membranom. Dotyczy to również produkcji preparatów zawierających AT III. Opisane w literaturze [64] układy oparte na heparynie immobilizowanej na aminowanych membranach firmy SARTORIUS pozwalają na komplementarną adsorpcję ok. $91 \mu\text{g}$ AT III na 1 cm membrany.

Obecnie na świecie choroby zakrzepowe, wynikające z niedoboru AT III, stanowią olbrzymi problem społeczny. Nic zatem dziwnego, że trwają intensywne badania mające na celu zarówno doskonalenie metod analizy tej biomolekuły, jak i sposobów preparatyki koncentratów AT III. Wydaje się, że to wła-

śnie chromatografia może wnieść duży wkład w rozwiązanie wspomnianego problemu, ponieważ umożliwia ona bardzo szybką i dokładną analizę AT III (w tak złożonej mieszaninie, jaką jest krew), a także stanowi podstawowy, ekonomicznie uzasadniony etap w procesie produkcji dość powszechnie stosowanych na Zachodzie specyfików zawierających antytrombinę III.

LITERATURA

- [1] Angielski S., Rogulski J., *Zarys biochemii klinicznej i analityki*, Warszawa 1982, 384.
- [2] Orłowski T., *Nauka o chorobach wewnętrznych*, VII, Warszawa 1990, 304.
- [3] *Ibid.*, 305.
- [4] Angielski S., Rogulski J., *Zarys biochemii...*, 385.
- [5] Traczyk Z., *Podstawy hematologii dla lekarza praktyka*, Warszawa 1984, 124.
- [6] Uszyński M., *Koagulopatie położnicze*, Warszawa 1987, 23–24.
- [7] Orłowski T., *Nauka o chorobach wewnętrznych*, VII, Warszawa 1990, 314.
- [8] Traczyk Z., *Podstawy hematologii...*, 125.
- [9] Petersen T.E., Dudek-Wojciechowska C., Sottrup-Jensen L., Magnusson S., *The physiological inhibitors of blood coagulation*, Amsterdam 1979, 43–54.
- [10] *Hematologia kliniczna*, I, Warszawa 1991, 199.
- [11] Uszyński M., *Koagulopatie...*, 44.
- [12] Orłowski T., *Nauka o chorobach...*, 317.
- [13] Begemann H., *Hematologia praktyczna*, Warszawa 1985, 217.
- [14] Uszyński M., *Koagulopatie...*, 45.
- [15] *Ibid.*, 43.
- [16] Pawelski S., *Diagnostyka laboratoryjna w hematologii*, Warszawa 1983, 209.
- [17] Morawitz P., *Die Chemie der Blutgerinnung*, [in:] *Ergebnisse der Physiologie*, 4 (1905) 307.
- [18] Seegers W.H., *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 85 (1954) 199.
- [19] Seegers W.H., *Prothrombin*, Cambridge 1962.
- [20] Freyssinge P., *Anti-thrombine III et phlébites*, Thèse pour le doctorat en médecine, 148, Université de Paris-Broussais-Hôtel-Dierr 1973, 58.
- [21] Hensen A., Loeliger E.A., *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* (Stuttg.), 9 (1963) Suppl. 1.
- [22] Heimburger N., Schwick H.G., *Sonderdruck aus "Antithrombin. Uterin Hämostase. Herz und Blut Gerinnung"*, Berlin 1971, Documentation Scientifique du laboratoire Behring 72/43 TC N° 0262.
- [23] Seegers W.H., Johnson J.F., Fell C., *Am.J.Physiol.*, 176 (1954) 97.
- [24] Szczepański M., *Zakrzepica żył głębokich i jej powikłania*, Warszawa 1989, 13.
- [25] Grabar P., Williams C.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1953) 193.
- [26] Scheidegger J.J., *Int. Arch. Allergy*, 7 (1955) 103.

- [27] Corning Medical and Scientific Instruction. *Manual Agarose Electrophoresis System. Operations Procedures Manual*, CME 470 166004, Firefield 1978.
- [28] *Współczesne metody separacji białek*, Warszawa 1983, 82.
- [29] Laurell C.B., *Anal. Biochem.*, 15 (1966) 45.
- [30] Mancini G., Carbonara A.O., Heremans J.F., *Immunochemistry*, 2 (1965) 235.
- [31] *Biochemia kliniczna i analityka*, Warszawa 1990, 557.
- [32] *Ibid.*, 561.
- [33] *Antithrombin III, Biochemistry, function, assay and clinical significance*, Supl. 3, *Ann. Univ. Sarav. Med.*, (1983) 97.
- [34] *Ibid.*, 101.
- [35] Heber H.E., Heimburger N., Uhmam R., Teetz V.V., Geiger R., *Fib. Thromb. Haemost.* (1980) 302.
- [36] Astrup T., *Thromb. Diath. Haemorrh.* 2 (1958) 247.
- [37] Friberger P., Bohner J., von Pape K.W., Blaurock M., *Thrombos. Res.* 67 (1992) 473.
- [38] Lee R.J., White P.D., *Amer. J. Med. Sci.*, 145 (1913) 495.
- [39] Howie P.W., Prentice C.R.M., McNicol G.P., *Brit. J. Haemat.*, 25 (1973) 101.
- [40] *Biochemia kliniczna i analityka*, Warszawa 1990, 547.
- [41] *Diagnostyka laboratoryjna w hematologii*, Warszawa 1990, 214.
- [42] Gordon A.H., *Electrophoresis of Protein Polyacrylamide and Starch Gels*, [in:] *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 1, Amsterdam 1957.
- [43] Laemli U.K., *Nature*, 178 (1970) 313.
- [44] *Współczesne metody separacji białek*, Warszawa 1983, 79.
- [45] Leonowicz A., *Ann. UMCS, Sec. C*, 30 (1975) 43.
- [46] Snyder L.R., *J. Chromat. Library*, 51A, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo 1992, A2.
- [47] Haddad P.R., Jackson P.E., *J. Chromat. Library*, 46, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo 1990, 15.
- [48] Bywater R.P., Marsden N.V.B., *J. Chromat. Library*, 22A, Amsterdam-Oxford-New York 1983, A258.
- [49] Dawidowicz A.L., Sokołowski S., *Chromatographia*, 18 (1984) 579.
- [50] Turková J., *J. Chromat. Library*, 12, Amsterdam-Oxford-New York 1978, 13.
- [51] Rogalski J., Dawidowicz A.L., Fiedurek J., Leonowicz A., *Acta Biotechnol.*, 10 (1990) 283.
- [52] Phillips T.M., *J. Chrom. Library*, 51A, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo 1992, A324.
- [53] *Współczesne metody separacji białek*, Warszawa 1983, 55.
- [54] Abildgaard U., *Scand. J. Clin. & Labor. Investigation*, 19 (1967) 190.
- [55] Miller-Andersson M., Borg H., Anderson L.O., *Thromb. Res.*, 5 (1974) 439.
- [56] Nishikawa A.H., [in:] *Solid Phase Biochemistry — Analytical and Synthetic Aspects*, New York 1983, 54.
- [57] Zhou F.L., Muller D., Santarelli X., Jozefonvicz J., *J. Chromat.*, 476 (1989) 195.
- [58] Zhou F.L., Muller D., Jozefonvicz J., *J. Chromat.*, 510 (1990) 71.

- [59] Dawidowicz A.L., Rauckyte T., Rogalski J., *Chromatographia*, 37 (1993) 168.
- [60] Dawidowicz A.L., Rauckyte T., Rogalski J., *J. Liq. Chromat.*, 17 (1994) 817.
- [61] Dawidowicz A.L., Rauckyte T. (praca w przygotowaniu).
- [62] Menache D., *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 6, 5 (1992) 1115.
- [63] Nunez H., Drohan W.N., *Seminars in hematology*, 28 (1991) 24.
- [64] Lütkemeyer D., Bretschneider M., Büntemeyer H., Lehmann J., *J. Chromatogr.*, 639 (1993) 57.

SUMMARY

Diseases of the blood vascular system resulting from thrombus formation create a serious problem in contemporary medicine. Injuries, surgical interventions as well as sometimes pregnancy can cause the intravascular clot. This is very often observed in patients with heavy liver parenchyma damage, nephrotic syndrome, disseminated intravascular clotting or during oestrogen therapy. The above mentioned health problems frequently result from the antithrombin III (AT III) deficiency — the natural blood anticoagulant deficiency. The AT III concentrates administration is one way of treatment and prevention of thrombus diseases. Mostly it requires the continuous AT III monitoring in organism. For this reason, analysis of AT III level should be a routine one.

The present paper deals with the methods of AT III analysis in the blood. Together with classical procedures a very quick chromatographic method based on the biological affinity process is shown. Apart from analytical aspects, preparation of the antithrombin III concentrates is discussed in the paper. In order to introduce the reader into the above mentioned problem, the blood coagulation process and importance of AT III in it are briefly presented in the introductory part of the paper.

