

rührt. Nach dem Abnutschen und Nachwaschen mit verdünntem Alkohol wurden die alkalischen Auszüge mit Salzsäure sauer gestellt, worauf das Hesperidin ausfiel (die letzten Mengen scheiden sich erst nach mehrtägigem Stehen aus). Das so erhaltene Rohhesperidin wurde in der Kälte in der 20-fachen Menge 1-proz. wässrig-alkoholischer (1 : 1) Natronlauge gelöst und aus der Lösung durch Einleiten von CO₂ das Hesperidin ausgefällt. Der Schmelzpunkt des so erhaltenen, analysenreinen Hesperidins ist 251–252°. Die aus absolutem Alkohol umkrystallisierte Substanz schmilzt bei 257–259°.

Nebenstehende Tabelle orientiert über die erhaltenen Resultate.

Zusammenfassung.

Aus unreifen Pomeranzen (*Fructus Aurantii immaturi*) italienischer Herkunft wurde viel Hesperidin (aus kleinsten Früchten bis 28,5%) neben wenig Neohesperidin isoliert; unreife Pomeranzen spanischer Herkunft enthielten mehr Neohesperidin (kleinere Früchte bis gegen 10%) als Hesperidin. Während des Wachstums der Früchte nimmt der relative Gehalt dieser Flavanonglykoside ab, der absolute Gehalt dagegen zu. Aus den Fruchtknoten und Narben eines Musterns von Pomeranzen-Blütenknospen südfranzösischer Herkunft wurden 8,9 resp. 6,4% Neohesperidin isoliert, aus den Fruchtknoten zudem noch 1,7% Hesperidin; das Vorkommen eines weiteren Flavonglykosides in den Fruchtknoten ist wahrscheinlich.

Basel, Wissenschaftliche Laboratorien
der *F. Hoffmann-La Roche & Cie., A.G.*

95. Der Einfluss von Faktor V auf die Prothrombinbestimmung

von **F. Koller** und **P. Frick**.

(10. I. 49.)

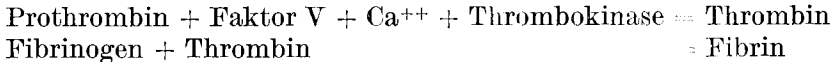
Nach *Owren*¹⁾ ist für das Zustandekommen der normalen Blutgerinnung ausser den 4 obligaten Gerinnungsfaktoren (Prothrombin, Calcium, Thrombokinase, Fibrinogen) noch ein weiterer notwendig, der von ihm als Faktor V bezeichnet wurde. *Owren* konnte den Nachweis erbringen, dass eine besondere Form von Blutungsneigung beim Menschen auf einem Mangel an diesem Gerinnungsfaktor beruht. Derselbe ist wahrscheinlich identisch mit dem „labile Factor“ von *Quick*²⁾, sowie dem „Accelerator Factor“ von *Fantl* und *Nance*³⁾ bzw.

¹⁾ *P. A. Owren*, The coagulation of blood, Suppl. Act. Med. Scand. 1947.

²⁾ *A. J. Quick*, Lancet **2**, 379 (1947).

³⁾ *P. Fantl* und *M. H. Nance*, Nature **158**, 708 (1946).

von *Seegers, Ware* et al.¹⁾. In das klassische Gerinnungsschema lässt sich der neue Faktor am einfachsten folgendermassen einfügen:



Aus dem Schema geht ohne weiteres hervor, dass Faktor V bei der Prothrombinbestimmung berücksichtigt werden muss, und zwar ganz besonders bei der Einphasen-, in geringerem Masse aber auch bei der Zweiphasen-Methode (*Owren*). Die „One-step method“ nach *Quick*²⁾ beruht auf der Annahme, dass bei Konstanthalten aller obligaten Gerinnungsfaktoren mit Ausnahme des Prothrombins Änderungen in der Gerinnungszeit notwendigerweise auf Schwankungen dieses einzigen noch variablen Faktors zurückgeführt werden können. In der Originalmethode von *Quick* werden jedoch aus praktischen Gründen nur 2 Gerinnungsfaktoren (Thrombokinese und Calcium) konstant gehalten. Unter diesen Umständen können Änderungen der Gerinnungszeit durch Schwankungen sowohl des Prothrombins als auch des Fibrinogens und des Faktors V bedingt sein. Wollen wir den Einfluss jedes einzelnen dieser drei Faktoren auf die Gerinnungszeit nach *Quick* bestimmen, so müssen wir den zu untersuchenden Gerinnungsfaktor allein variieren lassen.

Für das Prothrombin kann dieses Postulat dadurch erfüllt werden, dass das Normalplasma sukzessive mit Plasma verdünnt wird, welches ein *Seitz*-Filter (*Seitz* EK Schichten von 6 cm Durchmesser) passiert hat³⁾. Das *Seitz*-Filter hält Prothrombin beinahe quantitativ zurück, während es Fibrinogen und Faktor V in praktisch unveränderter Konzentration durchlässt. Thrombokinese wird allerdings zurückgehalten, was aber bei der Versuchsanordnung nach *Quick* keine Rolle spielt, da dieser Gerinnungsfaktor ohnehin im Überschuss zugesetzt wird. Prothrombinfreies Plasma kann auch in vivo erhalten werden, entweder nach Verabreichung von 3.3'-Methylen-di-(4-oxy-cumarin) oder während eines länger dauernden Verschluss-icterus. Bei Verdünnung des Normalplasmas mit prothrombinfreiem Plasma erhält man die wahre Prothrombinkurve (siehe punktierte Linie in Fig. 1), welche die Beziehung zwischen Gerinnungszeit und Prothrombinkonzentration (bei Versuchsanordnung nach *Quick*) zum Ausdruck bringt.

Dementsprechend kann die Beziehung zwischen Fibrinogenkonzentration und Gerinnungszeit durch Verdünnung von Normalplasma mit fibrinogenfreiem Plasma erhalten werden (Fig. 2, Kurve A).

¹⁾ *W. H. Seegers, A. G. Ware* et al., *Science* **106**, 618 (1947) und *J. Biol. Chem.* **172**, 699 (1948).

²⁾ *A. J. Quick, M. Stanelly-Brown* und *F. W. Bancroft*, *Am. J. Med. Science* **190**, 150 (1935).

³⁾ *P. A. Owren*, *The coagulation of blood*, *Suppl. Act. Med. Scand.* 1947.

Letzteres wird am schonendsten für die übrigen Gerinnungsfaktoren dadurch erhalten, dass man zu Normalplasma gerade soviel gereinigtes Thrombin zusetzt, dass alles Fibrinogen als Fibrin ausfällt. Das überschüssige Thrombin wird durch das normale Antithrombin inaktiviert.

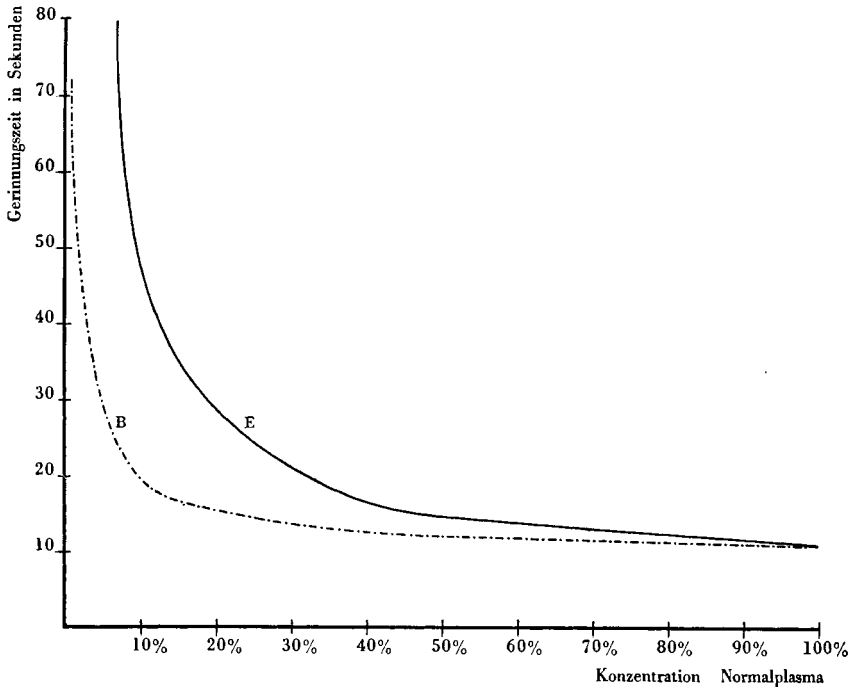


Fig. 1.

Beziehung zwischen Konzentration von Normalplasma und Gerinnungszeit nach *Quick* bei Verdünnung.

B mit prothrombinfreiem Plasma,
E mit physiologischer NaCl-Lösung.

Für den Faktor V liegen die Verhältnisse insofern ungünstiger, als es uns nicht gelungen ist, ein Faktor V-freies Plasma zu erhalten, das die übrigen Gerinnungsfaktoren in normaler oder annähernd normaler Konzentration enthält. Durch Stehenlassen von Plasma bei Zimmertemperatur unter aseptischen Kautelen erreicht man zwar einen raschen Abfall von Faktor V (*Quick*¹⁾, *Fantl*); gleichzeitig nimmt aber auch die Prothrombin- und Fibrinogenaktivität (wenn auch in geringerem Masse) ab, und ausserdem beobachteten wir während der sterilen Lagerung das Auftreten eines gerinnungshemmenden Faktors. Der Einfluss von Faktor V auf die *Quick*'sche Gerinnungszeit liess sich dagegen indirekt feststellen: Verdünnen wir Normalplasma

¹⁾ A. J. Quick, *Lancet* 2, 379 (1947).

mit einem Plasma, aus dem sowohl Fibrinogen wie Prothrombin nach den oben erwähnten Verfahren entfernt worden ist, so erhalten wir Gerinnungszeiten (vgl. Kurve C in Fig. 2), die immer noch deutlich kürzer sind als die durch Verdünnung von Normalplasma mit physiologischer NaCl-Lösung erhaltenen. (Kurve E in Fig. 2.)

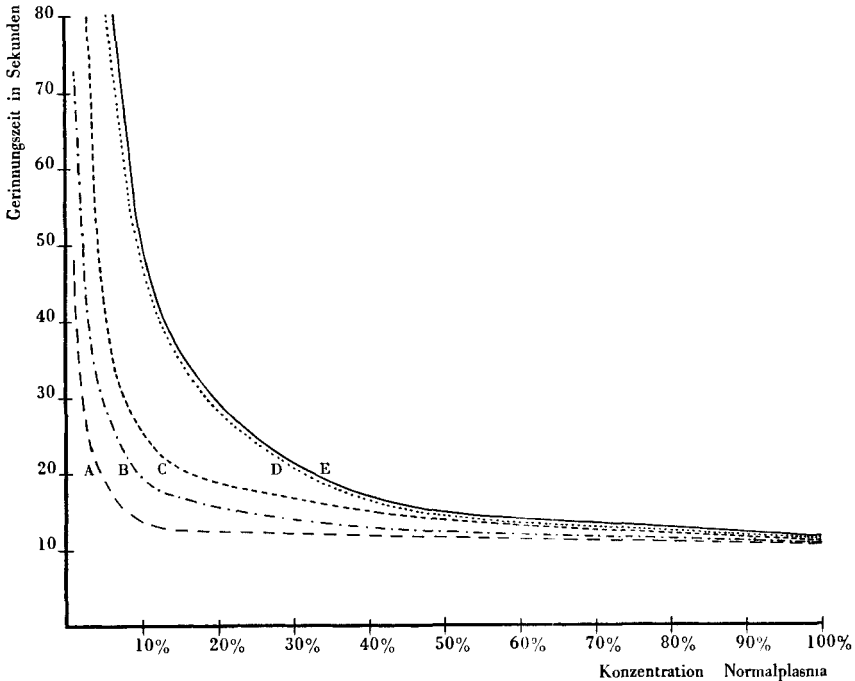


Fig. 2.

Beziehung zwischen Konzentration von Normalplasma und Gerinnungszeit bei Verdünnung desselben mit:

- A — — — fibrinogenfreiem Plasma (reine Fibrinogenkurve),
- B - - - - - prothrombinfreiem Plasma (reine Prothrombinkurve),
- C - - - - - fibrinogen- und prothrombinfreiem Plasma
(kombinierte Fibrinogen-Prothrombin-Kurve),
- D fibrinogen-, prothrombin- und Faktor-V-freiem Plasma
(kombinierte Fibrinogen-Prothrombin-Faktor-V-Kurve).
- E ——— physiologischer NaCl-Lösung.

Das prothrombin- und fibrinogenfreie Plasma muss somit noch einen gerinnungsfördernden Faktor enthalten, der nach unsern heutigen Kenntnissen nur Faktor V sein kann. Der Einwand, dass die gerinnungsfördernde Wirkung auf dem Eiweiss als solchem und nicht auf einem spezifischen Gerinnungsfaktor beruhen könnte, wird durch folgenden Versuch entkräftet: Plasma, welches das *Seitz*-Filter passiert hat und das ausserdem während 30 Minuten auf 60° erwärmt

wurde, wird in steigenden Mengen mit Normalplasma gemischt. Die Verdünnung desselben mit diesem Prothrombin-, Fibrinogen- und Faktor V-freien Plasma ergibt praktisch dieselben Gerinnungszeiten wie Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung (Kurve D in Fig. 2).

Es muss allerdings die Möglichkeit offengelassen werden, dass im Plasma ausser den heute bekannten Gerinnungsfaktoren noch andere vorhanden sind, die ebenfalls durch 30 Minuten langes Erhitzen auf 60° zerstört werden.

Die erwähnten Tatsachen machen eine Ergänzung der Prothrombinbestimmung nach der Einphasenmethode notwendig. Wenn nach der bisherigen Methode eine Verlängerung der Gerinnungszeit nachgewiesen wird, so muss zunächst festgestellt werden, durch welche der drei in Betracht fallenden Faktoren sie zustande gekommen ist. Als weitere Ursache der Gerinnungsverzögerung müssen gerinnungshemmende Substanzen in Betracht gezogen werden, die durch eine besondere Methode leicht festgestellt werden können (Thrombintitration¹). Erst wenn durch Zusatz von $\frac{1}{5}$ Volumen prothrombinfreien aber Faktor V- und Fibrinogenhaltigen Plasmas (gewonnen durch *Seitz*-Filtration z. B.) die Gerinnungsverzögerung nicht behoben wird, darf eine Hypoprothrombinaemie angenommen werden. Der Grad derselben wurde bisher in Prozenten der Norm angegeben, wobei man eine Standardkurve (Kurve E vgl. Fig. 1) benützte, die durch Verdünnung von Normalplasma mit physiologischer NaCl-Lösung erhalten worden war. Es ist jedoch klar, dass für die Bestimmung des Prothrombins nur die durch Verdünnung von Normalplasma mit prothrombinfreiem Plasma gewonnene Kurve massgebend sein kann. Dass die damit erhaltenen Werte richtiger sind, geht aus der Beobachtung hervor, dass bei Mischung gleicher Teile von Plasma mit verschiedener Prothrombinkonzentration eine Gerinnungszeit erhalten wird, die der errechneten mittleren Prothrombinkonzentration entspricht. Bei Verwendung der früheren Standardkurven entsprach die Gerinnungszeit des Mischplasmas nicht der errechneten Prothrombinkonzentration²).

Beispiel:

Mischung gleicher Teile von Plasmaproben verschiedener Prothrombinkonzentration.

- a) Berechnung unter Anwendung der reinen Prothrombinkurve.
- | | | |
|-------------|----------------------|--------------------------|
| Plasma I | 16,2 Sek. GZ. | = 20% Prothrombin |
| Plasma II | 44 Sek. GZ. | = 3% Prothrombin |
| Plasma I+II | = 11,5% Prothrombin | = 19 Sek. GZ theoretisch |
| Plasma I+II | ergibt experimentell | 19,4 Sek. GZ |
- b) Berechnung unter Anwendung der Verdünnungsreihe mit NaCl.
- | | | |
|-------------|----------------------|--------------------------|
| Plasma I | 16,2 Sek. GZ | = 40% „Prothrombin“ |
| Plasma II | 44 Sek. GZ | = 10% „Prothrombin“ |
| Plasma I+II | = 25% „Prothrombin“ | = 24 Sek. GZ theoretisch |
| Plasma I+II | ergibt experimentell | 19,4 Sek. GZ. |

¹) *A. J. Quick*, *Am. J. Physiol.* **116**, 535 (1936).

²) Vgl. auch *P. Frick*, *Helv. med. acta* **15**, Fasc. 6 (1948).

Die Prothrombinkonzentration, unterhalb welcher erfahrungsgemäss Spontanblutungen auftreten, wird als „kritische“ Prothrombinkonzentration bezeichnet, die bei der Behandlung mit Methylen-dioxyumarin nicht unterschritten werden darf. Diese Konzentration wurde bisher zu 20% angegeben, entsprechend einer Gerinnungszeit von ca. 30 Sekunden. Nach obigen Ergebnissen entspricht diese Gerinnungszeit jedoch einer Prothrombinkonzentration von nur 5%, die somit als kritische Konzentration zu gelten hat (vgl. Fig. 1).

Gegen die Einphasenmethode der Prothrombinbestimmung sind z. T. berechtigte Einwände erhoben worden (*Smith*¹), (*Owren*²), (*Rieben*³). Einige derselben werden durch die vorgeschlagene Ergänzung hinfällig. Die grösste praktische Schwierigkeit dieser Methode liegt in der Herstellung einer Thrombokinase von konstanter Aktivität. Vergleichbare Werte können nur erhalten werden, wenn die Aktivität der Thrombokinasepräparate genau bekannt ist.

Bei der Zweiphasenmethode liegt die Hauptschwierigkeit in der Beschaffung eines prothrombinfreien Fibrinogens von konstanter Wirkung. Variationen von Faktor V haben dagegen (ausser bei völligem Fehlen des Faktors) auf die Prothrombinbestimmung keinen direkten Einfluss, da die erste Gerinnungsphase vollständig abläuft, unabhängig von der Schnelligkeit mit der dieser Vorgang sich abspielt. Da jedoch bei starker Verminderung von Faktor V die Umwandlung des Prothrombins in Thrombin sehr langsam erfolgt, so kann unter diesen Umständen das normale Antithrombin zur Wirkung kommen und damit indirekt die Prothrombinbestimmung beeinflussen.

Zusammenfassung.

Eine Verminderung von Gerinnungsfaktor V (*Owren*) kann bei Verwendung der Einphasenmethode nach *Quick* eine Reduktion des Prothrombins vortäuschen. Die erwähnte Bestimmungsmethode muss daher durch Zusatz von prothrombinfreiem, aber Faktor V-haltigem Plasma ergänzt werden. Die Angabe der Prothrombinkonzentration in Prozenten der Norm bedarf ebenfalls einer Revision unter Berücksichtigung der Wirkung von Faktor V. Die kritische Prothrombinkonzentration z. B., unterhalb welcher Spontanblutungen zu erwarten sind, liegt nicht, wie bisher angenommen, bei 20, sondern bei 5% Prothrombin.

Medizinische Universitätsklinik, Zürich.

¹) *H. P. Smith*, Annual Review of Physiol. Vol. 10, 1948.

²) *P. A. Owren*, The coagulation of blood, Suppl. Act. Med. Scand. 1947.

³) *W. K. Rieben*, Beiträge zur Kenntnis der Blutgerinnung, Benno Schwabe, Basel (1947).