

# Differentiële leverfunctie bepaling met behulp van de trombotest van Owren

DOOR DR. H. C. HEMKER, J. VAN DER MEER EN DR. E. A. LOELIGER

## Inleiding

Een van de functies van de lever is de synthese van de stollingsfactoren. Als deze tekortschiet, kan men de oorzaak in twee richtingen zoeken: een afwijking in de cel-stofwisseling bij leverparenchymziekten, of gebrek aan vitamine K bij een overigens normale lever. Verondersteld wordt, dat bij parenchymziekten de gehele eiwitsynthese en dus ook de synthese van de stollingsfactoren kwantitatief tekort schiet, terwijl bij vitamine-K-deficiëntie slechts een selecte groep stollingsfactoren (II, VII, IX en X) in verminderde mate wordt aangemaakt. Tot voor kort meende men de mate van vermindering specifiek te kunnen meten met behulp van de trombotest van Owren, zij het zonder dat het resultaat een gedifferentieerd inzicht in de aard van de stoornis in de stollingsfactoren-synthese zou geven. Omdat er van vitamine K geen effect op de aanmaak van eiwitten in het algemeen bekend is, nemen wij aan dat voor de productie van deze stollingsfactoren behalve een eiwitsynthese-mechanisme ook een specifieke vitamine-K-gevoelige stap nodig is. Onafhankelijk van de oorzaak van de synthese-stoornis (dus: parenchymstoornis of vitamine-K-deficiëntie) zien wij, althans bij chronische toestanden, de factoren II, VII, IX en X tot eenzelfde percentage van het normale gehalte dalen (LOELIGER e.a. 1963; LOELIGER 1964). Onderscheid tussen een leverparenchymstoornis en een vitamine-K-deficiëntie kon tot dusverre uitsluitend worden gemaakt, door de reactie op intraveneus toegediende vitamine K na te gaan, waarbij een significante verkorting van de stollingstijd — gevonden met trombotest of met de protrombinetijdbepaling, 24 uur na toediening van vitamine K — bewijzend was voor een deficiëntie (PESTALOZZI 1958). Met de ontdekking van de bij vitamine-K-deficiëntie in de circulatie komende stollingsremmer (preprotrombine; HEMKER e.a. 1963) is het, zoals uit het navolgende zal blijken, mogelijk geworden, in vele gevallen terstond na het vaststellen van een verlengde trombotesttijd, te differentiëren tussen leverparenchymstoornissen en vitamine-K-deficiëntie.

## Materiaal en methoden

### Bereiding en bewaren van plasma

De venapunctie geschiedde met een conusloze naald van V2A-staal (inwendige diameter 0,6 mm), in den regel uit de vena mediana cubiti. De eerste druppels bloed werden op-

*Uit de afdeling Hematologie van de Kliniek voor Inwendige Geneeskunde (hoofd: Prof. Dr. J. MULDER) en de Trombosedienst van het Nederlandsche Rode Kruis (hoofd: Dr. E. A. LOELIGER), Academisch Ziekenhuis, Leiden.*

## Samenvatting:

Er bestaat een verschil tussen het stollingsfactorenpatroon bij vitamine-K-tekort (resp. behandeling met vitamine-K-antagonisten) en bij leverparenchymbeschadiging. Dit verschil komt tot uitdrukking bij het bepalen van de trombotesttijd met een reeks verdunningen van het te onderzoeken plasma. Het verschil blijkt niet veroorzaakt door een afwijkend gedrag van een van de bekende stollingsfactoren, maar het wordt verklaard als men aanneemt, dat bij vitamine-K-gebrek een competitieve remmer van de protrombine-omzetting (voorlopig preprotrombine genaamd) in de circulatie komt. Het artikel beschrijft hoe het, door het bepalen van deze remmer, mogelijk is, te differentiëren tussen leverparenchymbeschadiging en vitamine-K-tekort.

gevangen in een watteprop en de daaropvolgende 5 ml in een polysterol buis, die 0,1 ml natriumcitraat 0,55 mol. bevatte. De opening van de buis werd met Parafilm (Marathon, Menasha, Wisc.) afgedekt en het bloed werd grondig met het anticoagulans gemengd. Daarna werd het bloed gedurende 10 minuten bij 800 g gecentrifugeerd. Het bovenstaande plasma werd afgezogen en gedurende 30 minuten bij 20.000 g gecentrifugeerd, waarna in het plasma geen trombocyten meer aan te tonen waren.

*Normaal plasma*, dat gedurende het gehele onderzoek als standaard diende, werd verkregen door vers bereid trombocytenvrij plasma van 30 gezonde mannen en vrouwen van dertig jaar te mengen. Dit verzamelplasma werd in porties van 1 ml bij  $-25^{\circ}\text{C}$  in polysterol buisjes bewaard.

De activiteit van het standaard-plasma, gemeten volgens de hieronder beschreven methoden, bleek gedurende het gehele, 9 maanden durende onderzoek constant te blijven. Het te onderzoeken *patiënten-plasma* werd, eveneens als het niet direct gebruikt werd, bij  $-25^{\circ}\text{C}$  bewaard. Steekproeven hebben uitgewezen, dat ook in dit plasma de activiteit van de factoren II, VII, IX en X en preprotrombine na diepvriezen niet was veranderd.

### Meting van de protrombinetijd

De protrombinetijd werd gemeten volgens Quick, waarbij echter mensenhersen-tromboplastine gebruikt werd, bereid volgens OWREN en AAS 1951. De bepaling werd verricht in glazen reageerbuizen met ronde bodem (lengte 100 mm, diameter 16 mm). Het ogenblik van de stolling werd geconstateerd met een haak van Kolle. De normale protrombinetijd bedroeg gemiddeld 15,2 sec. met een standaarddeviatie van 0,7 sec.

### Bepaling van de stollingsfactoren

De stollingsfactoren II (protrombine), VII (proconver-tine), IX (christmas-factor) en X (stuart-factor) werden volgens het éentrap („one-stage”)-principe bepaald (LOELIGER e.a. 1963). Als reagens voor de factor-VII- en factor-

IX-bepaling werd citraatplasma van lijders aan ernstige hypoproconvertinemie resp. hemophilie B gebruikt. Plasma, arm aan factor II en X werd kunstmatig bereid (LOELIGER en KOLLER 1952; BACHMANN e.a. 1958). Ter standaardisering van het factor-V-gehalte werd bij elke bepaling een gelijke hoeveelheid met BaSO<sub>4</sub> behandeld runder-plasma toegevoegd. Alle verdunningen van het te onderzoeken plasma en van het standaard-plasma werden in gesiliconeerde glazen reageerbuisen op smeltend ijs bewaard. De uitvoering van de bepaling geschiedde op dezelfde wijze als onder „Meting van de protrombinetijd” vermeld. Een uitvoerige beschrijving van de details van de bepaling werd elders gegeven (LOELIGER e.a. 1963; VAN DER MEER 1965).

*Vitamine-K-test*

In geval van verlenging van de protrombinetijd en vermindering van de factoren II, VII, IX en X werd 10-20 mg vitamine K<sub>1</sub> (Konaktion „Roche”) intraveneus toegediend; 24 uur en 48 uur later werden de protrombinetijd en de genoemde stollingsfactoren opnieuw bepaald.

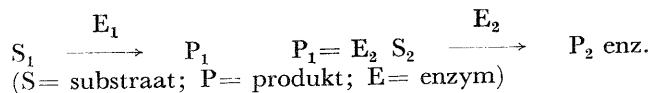
*Verdunningscurven met trombotest*

Als reagens werd trombotest-reagens („Nyegaard”, Oslo), charge nummers 137, 358 en 359, gebruikt. Van de te onderzoeken plasma's werd 0,05 ml bij 0,25 ml trombotest-reagens gevoegd. In afwijking van OWRENS voorschrift werden de bepalingen verricht in glazen buisjes van 55 mm lengte en 12 mm diameter (SCHNITGER en GROSS 1954; VELTKAMP 1965). De bepalingen geschieden in triplo. Elk plasma werd onverdund en in twee verdunningen onderzocht; de verdunningsvloeistof was michaelis-buffer p<sub>H</sub> 7,4. Verdunningen 1/2 en 1/3 werden gekozen wanneer de protrombinetijd of de trombotesttijd van het onverdunde plasma meer dan twee maal verlengd was, terwijl bij kortere tijden verdunningen 1/3 en 1/5 gemaakt werden. Hiermee werd enerzijds bereikt dat de stollingstijden, verkregen met de verschillende verdunningen, niet te dicht bij elkaar lagen, anderzijds dat de gemeten tijden kleiner waren dan 200 seconden. Wij hebben nl. vastgesteld dat stollingstijden langer dan 200 seconden vaak niet voldoende nauwkeurig te meten zijn. Te kleine verschillen tussen de tijden, verkregen met de verschillende verdunningen, moeten worden vermeden omdat dan het extrapoleren naar de ordinaat in de tijd-verdunningsgrafiek (zie onder) niet met voldoende nauwkeurigheid kan geschieden. Bij elke bepaling werden als referentie trombotest-bepalingen gedaan met het normale verzamelplasma en met verdunningen daarvan (meestal 1/3 en 1/5).

Met de gevonden stollingstijden werd op millimeterpapier een tijd-verdunningsgrafiek gemaakt (zie onder Resultaten).

*Enzymkinetische grondslagen*

Een juiste interpretatie van de uitkomsten van bepalingen met behulp van de Owren-trombotest zou slechts mogelijk zijn als het reactiemechanisme van het stollingsproces bekend was. Dit is nog niet het geval, maar er begint zich in de chaos van bekende factoren wel een patroon af te tekenen (ESNOUF en WILLIAMS 1962; ESNOUF e.a. 1963 en LÜSCHER e.a. 1963). Het algemene principe lijkt te zijn, dat een niet geactiveerde stollingsfactor door een proteolytisch enzym wordt omgezet in een eiwit met eiwitplitsende eigenschappen, dat op zijn beurt een volgende stollingsfactor tot enzym activeert, enz. (MACFARLANE 1964). In vergelijking gebracht ziet de reactie er als volgt uit:



Met dit principe als basis kan men een voorlopig reactiemechanisme van het stollingsproces in schema brengen (fig. 1).

Een enzymkinetische interpretatie van de reactiesnelheid in een dergelijk systeem brengt vele moeilijkheden mee (HEMKER e.a. 1964b); zeker waar men

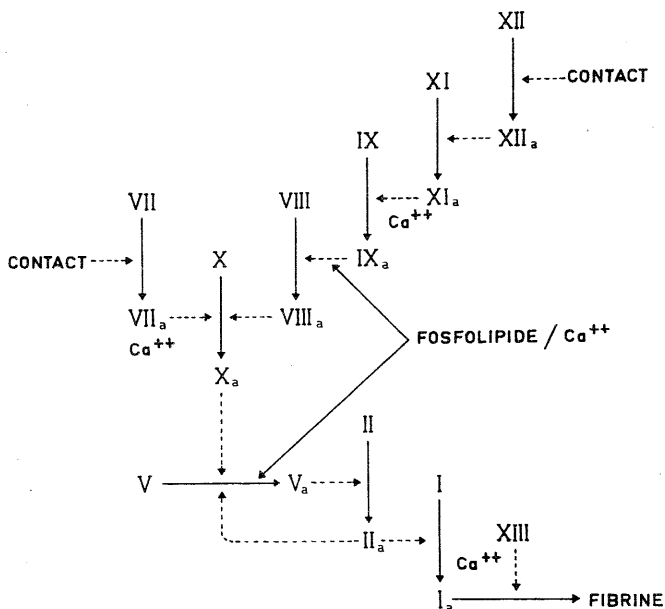


Fig. 1. Schema van het mechanisme van de bloedstolling.

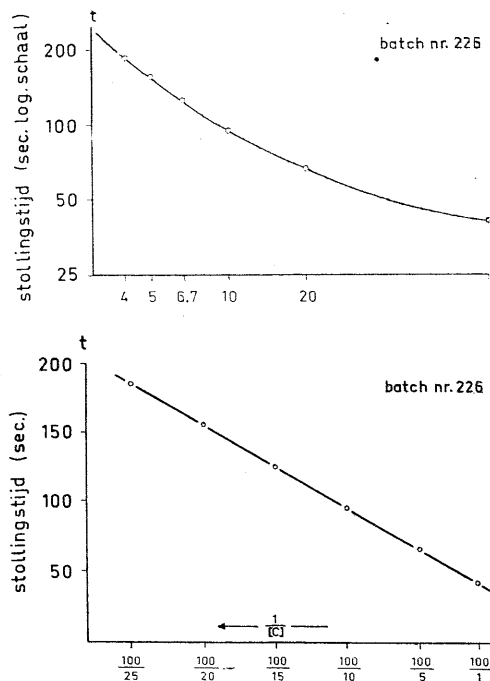


Fig. 2. De reference curve van de Owren-trombotest. De bovenste grafiek toont de curve uitgezet op de gebruikelijke dubbel logaritmische schaal; de onderste grafiek toont dezelfde curve op een reciproke schaal.

vier factoren (II, VII, IX en X) gelijktijdig varieert, zoals in de hier beschreven proeven noodgedwongen het geval is. Nu blijkt echter (fig. 2), dat het verband tussen stollingstijd ( $t$ ) en het omgekeerde (!) van de factorenconcentratie ( $1/S$ ; evenredig met de verdunning  $D$ ) lineair is (HEMKER e.a. 1964a). Als wij aannemen, dat de stollingstijd omgekeerd evenredig is met de snelheid van het stollingsproces ( $v$ ), zien wij hier dus een lineair verband tussen  $1/S$  en  $1/v$ . Dit verband is in de enzymkinetica reeds lang bekend (LINEWEAVER en BURK 1934). Het is het verband dat onder zekere voorwaarden ontstaat tussen reactiesnelheid en substraatconcentratie bij processen die door enzymen gekatalyseerd worden (zie verder bv.: DIXON en WEBB 1958). Wonderlijkerwijze zien wij dus in onze gecompliceerde proefopstelling een eenvoudig verband tussen stollingstijd en factorengehalte; wij zullen aannemen dat dit veroorzaakt wordt doordat de vele factoren, die het systeem compliceren, onder de gegeven proefomstandigheden niet snelheidsbeperkend zijn.

Daar wij de betrokken stollingsfactoren niet zuiver in handen hebben, en daar hun molecuulgewicht onbekend is, moeten wij ons behelpen met relatieve concentraties. Alle concentraties worden dus uitgedrukt als percentage van de concentratie van de stollingsfactor in normaal plasma. Een plasma dat  $a$  pct van de als substraat fungerende stollingsfactor bevat, zal in onverdunde toestand dezelfde stollingstijd geven als  $100/a$  maal verdund normaal plasma; en in  $x$  maal verdunde toestand geeft het dezelfde tijd als  $x \cdot 100/a$  maal verdund normaal plasma. Dit houdt in dat de helling van de rechte lijn, die men verkrijgt als men de stollingstijd ( $t$ ) tegen de verdunning ( $D$ ) uitzet (de tijd-verdunningsgrafiek), een maat is voor de factorenconcentratie van het uitgangsplasma (vergelijk fig. 3a, waar  $a$  50 resp. 28 pct is).

De verdunning wordt aangegeven met een getal  $D$ ,

3 APRIL 1965 NED. T. GENEESK. 109. I. 14  
 en wel zo dat  $D=1$  staat voor onverdund plasma,  $D=2$  voor plasma dat 1:2 verdund is (dus 1 deel buffer en 1 deel plasma),  $D=3$  voor plasma dat 1:3 verdund is (1 deel buffer en 2 delen plasma) enz.  $D=1/2$  zou dus twee maal geconcentreerd plasma weergeven,  $D=1/4$  vier maal geconcentreerd plasma enz. Het is duidelijk dat  $D=0$  inhoudt dat er een oneindige concentratie stollingssubstraat aanwezig is. Als men dus de door de experimentele punten gevonden rechte lijn doortrekt tot de  $Y$ -as, verkrijgt men een snijpunt, dat een bepaalde tijd ( $t_{\min.}$ ) aanwijst. De betekenis van  $t_{\min.}$  is, dat dit de stollingstijd weergeeft, die gevonden zou worden als men aan het systeem een oneindige concentratie van de betreffende stollingsfactor toevoegt. Immers op de  $Y$ -as geldt  $D=0$ , en  $D=0$  wil zeggen, dat de concentratie oneindig is. Dus is  $t_{\min.}$  onafhankelijk van de substraatconcentratie, maar varieert nog met de enzymconcentratie en met de concentratie van een eventueel aanwezige competitieve remmer. Beide variaties hebben in de grafiek eenzelfde effect; nl. de helling van een lijn verandert niet, maar de lijn wordt evenwijdig naar boven verschoven (fig. 3b). Daar bij leverparenchymstoornissen, onafhankelijk van de stollingsfactorenconcentratie, een vaste  $t_{\min.}$  gevonden werd, moeten wij aannemen, dat de als enzym fungerende factor óf in constante hoeveelheid óf in relatieve overmaat in het testsysteem aanwezig is. Indien  $t_{\min.}$  nu wél blijkt te variëren als men de plasma's van patiënten met een echte of door coumarine geïnduceerde vitamine-K-deficiëntie onderzoekt, kan dit niet het gevolg zijn van een variatie in enzymconcentratie; immers bij echte vitamine-K-deficiëntie en voortgezette coumarinebehandeling vinden wij in principe dezelfde daling van de factoren II, VII, IX en X als bij langdurige parenchymbeschadigingen (LOELIGER e.a. 1963; LOELIGER 1964). De eenvoudigste verklaring voor deze discrepantie is, aan te nemen dat het verschil in  $t_{\min.}$  het

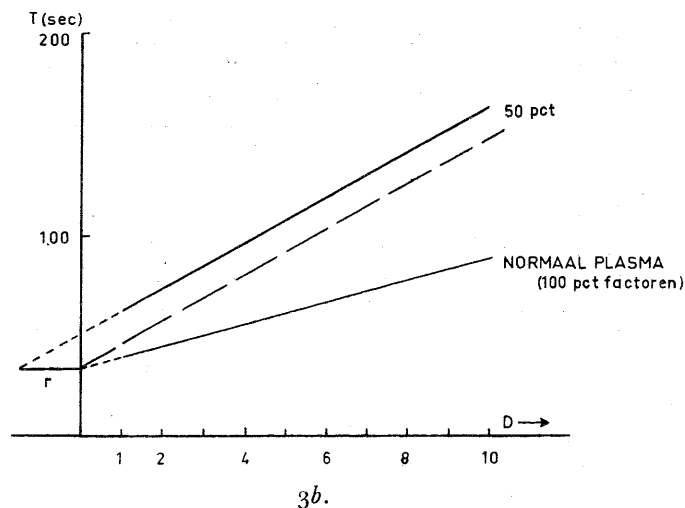
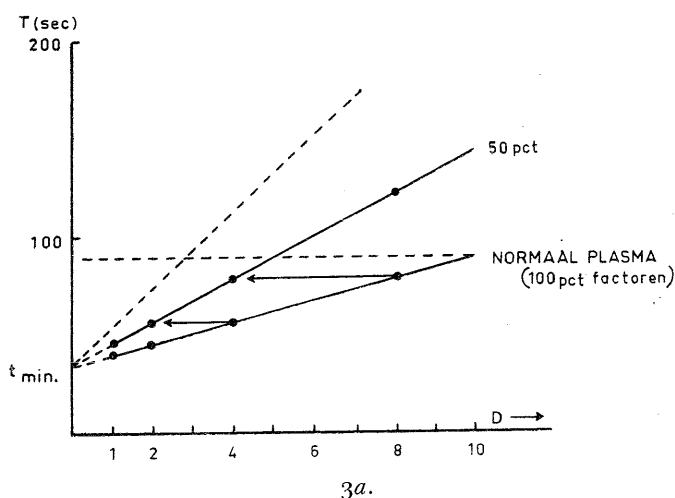


Fig. 3. De stollingstijd-verdunningsgrafiek

- Een verminderde concentratie van de als substraat fungerende stollingsfactor in het uitgangsplasma geeft een toeneming van de helling van de verkregen lijn.
- Een verminderde concentratie van de als enzym fungerende stollingsfactor, of de aanwezigheid van een competitieve remmer geeft een parallelle verschuiving van de verkregen lijn.

TABEL I.

## KLINISCHE GEGEVENS VAN DE ONDERZOCHE PATIËNTEN

Patiënten met		Geslacht	Leeftijd (jaren)	Diagnose	Bevestigd door	Bilirubine mg/100 ml	
vitamine-K-deficiëntie	parenchymstoornis					Direct	Totaal
A		v	67	Afsluitingsicterus e causa ignota	Klinisch beloop (Courvoisier +)	+	16,2
B		v	63	Afsluitingsicterus, galwegcarcinoom	Laparotomie	+	9,2
C		m	46	Afsluitingsicterus, pancreaskopcarcinoom	Laparotomie	+	16,2
D		v	77	Afsluitingsicterus, galgangcarcinoom, met levermetastasen	Laparotomie	+	15,0
E		m	30	Steatorroe	Vetgehalte faeces	—	0,5
F		m	64	Steatorroe, mesotheliooma peritonei	Obductie	—	0,4
G		v	84	Afsluitingsicterus e causa ignota	Klinisch beloop palpabele tumor bovenbuik	+	13,5
H		v	69	Afsluitingsicterus, pancreastumor	Laparotomie	+	10,8
I		m	59	Afsluitingsicterus, pancreaskoptumor	Laparotomie	+	14,9
	J	v	16	Cirrhosis hepatis	Obductie	+	17,6
	K	m	49	Cirrhosis hepatis	Klinisch beloop	—	0,7
	L	v	50	Cirrhosis hepatis	Obductie	+	21,0
	M	v	39	Cirrhosis hepatis	Klinisch beloop	+	1,2
	N	v	53	Cirrhosis hepatis	Laparoscopie	+	1,9
	O	v	37	Chronische hepatitis	Klinisch beloop	+	10,3
	P	m	74	Cirrhosis hepatis	Obductie	+	2,9
	Q	m	58	Cirrhosis hepatis	Obductie	+	26,0
	R	v	68	Subacute hepatitis	Obductie	+	32,0
	S	m	47	Cirrhosis hepatis	Obductie	+	8,0
	T	m	73	Acute gele leveratrofie	Obductie	+	11,1

gevolg is van de aanwezigheid van een remmer (HEMKER e.a. 1963). Wij konden aantonen, dat de lengte van het lijnstuk  $r$ , d.i. het lijnstuk liggende op een horizontale hulplijn getrokken door  $t_{min}$ , van normaal plasma, tussen de Y-as en het snijpunt van de hulplijn, met de lijn verkregen uit de verdunningscurve van het onderzochte plasma, de hoeveelheid remmer weergeeft die in het onderzochte plasma aanwezig is (fig. 3b). De lengte van dit lijnstuk drukken wij uit in de lengte-eenheid die op de Y-as tussen  $D=0$  en  $D=1$  staat. Als  $r$  gelijk is aan deze lengte, zeggen wij dat per definitie 1 eenheid remmer aanwezig is.

## Patiënten

De onderzochte patiënten werden in twee groepen verdeeld:

1. patiënten met vitamine-K-deficiëntie
2. „ „ „ leverparenchymbeschadiging

Enkele belangrijke gegevens over patiënten zijn in tabel I samengevat. De diagnose werd in de meeste gevallen door laparoscopie, laparotomie of obductie bevestigd. Een duidelijke verbetering resp. normalisering van het stollingsfactorenpatroon, 24-48 uur na

intraveneuze toediening van 10-20 mg vitamine  $K_{12}$ , werd als criterium voor vitamine-K-deficiëntie beschouwd.

## Resultaten

De resultaten zijn weergegeven in tabel II. Het factorengehalte werd niet alleen met ééntraps(one-stage)-factorenbepalingen gemeten (X), maar het werd tevens uit de hellingshoek van de in de tijd-verdunningsgrafiek voor patiëntenplasma verkregen rechte lijn berekend (Y). De hoeveelheid remmer (Z) is in eenheden aangegeven (voor definitie zie boven).

Figuur 4 en 5 geven de grafieken weer die zijn verkregen met plasma-mengsels; figuur 4: afkomstig van 11 lijdens aan leverparenchymbeschadiging; figuur 5: afkomstig van 6 patiënten met vitamine-K-deficiëntie. Figuur 5 toont duidelijk dat bij vitamine-K-deficiëntie de lijn, verkregen met patiëntenplasma en de verdunningen daarvan, de normaal-lijn ver links van de ordinaat snijdt. De hoeveelheid remmer is ongeveer 2,3 E, d.i. gelijk aan de hoeveelheid remmer, berekend als het gemiddelde van de individuele plasma's (tabel II). Uit figuur 4 blijkt, dat bij parenchymbeschadiging („hepatitis”) de lijn, verkregen met het patho-

Patiënt		Factoren in pct						Trombotesttijd								
1	2	II 3	VII 4	IX 5	X 6	I 7	V 8	P.T. 9	1/1 10	1/2 11	1/3 12	1/5 13	X 14	Y 15	Z 16	
<i>Vitamine-K-deficiëntie</i>																
A	V	51	78	53	47	940	200	19,2	53	—	66	73	57	70	1,4	
	N	74	140	51	76	—	—	15,4	46							
B	V	32	20	16	23	1550	75	33,8	86	—	110	132	23	37	3,2	
	N	86	88	118	144	—	120	18,8	59							
C	V	27	43	20	20	1140	150	27,9	75	—	96	114	27	48	2,8	
	N	103	123	86	64	—	—	17,8	56							
D	V	25	20	24	23	—	150	32,8	112	—	148	182	23	30	3,5	
	N	50	56	65	62	—	—	17,8	49							
E	V	46	46	75	44	380	115	21,0	66	—	90	106	53	45	1,6	
	N	68	73	96	56	—	—	17,1	62							
F	V	25	23	25	21	1050	110	35,4	89	—	124	192	23	23	1,5	
	N	68	100	84	72	—	—	18,0	44							
G	V	50	39	—	43	485	100	25,8	80	97	—	161	44	53	2,5	
	N	—	—	—	—	—	—	18,2								
H	V	26	60	—	19	845	—	43,0	87	106	—	157	24	26	2,1	
	N	—	—	—	—	—	—	18,0								
I	V	50	20	—	20	710	150	26,3	83	94	103	135	22	30	2,5	
	N	105	100	—	100	—	—	14,0								
<i>Leverparenchymstoornis</i>																
J	V	27	3	23	24	205	35	28,8	88	128	171		19	14	+0,3	
	N	30	2	30	33	—	—	29,0	88							
K	V	37	34	55	56	310	45	20,2	45	—	67	83	46	54	0	
	N	34	45	62	45	—	—	19,2								
L	V	15	5	12	17	100	16	39,2	88	—	152	271	12	15	+0,6	
	N	—	—	—	—	—	—	—								
M	V	37	33	34	40	340	100	18,9	53	—	74	87	36	47	+0,4	
	N	60	28	61	69	490	90	21,0	54	—	74	97	47	47	+0,3	
N	V	49	27	55	58	—	—	20,0	52							
O	V	41	52	69	33	260	75	19,3	47	—	70	86	49	45	—0,1	
	N	50	51	34	48	—	—	19,3	46							
P	V	42	28	26	56	250	70	19,5	45	—	65	85	38	50	—0,4	
	N	33	13	26	42	300	25	27,0	63	—	96	120	28	25	+0,5	
Q	V	30	14	26	42	—	—	25,0	60							
	N	30	14	26	42	—	—	25,0	60							
R	V	21	22	28	22	480	100	26,6	67	—	113	140	23	25	+0,4	
	N	12	9	20	10	94	15	27,5	82	—	132	166	13	15	+0,4	
S	V	12	9	20	10	94	15	27,5	82	—	132	166	13	15	+0,4	
	N	—	—	—	—	86	—	26,0	—	74	—	123	25	27	—0,1	

Kolom 2: V is vóór, N is ná toediening van vitamine K<sub>1</sub>.

Kolom 7: Factor I is het fibrinogeen. Het gehalte is bepaald volgens CLAUSS (1957) en uitgedrukt in mg pct.

Kolom 8: Het factor-V-gehalte werd bepaald volgens BORCHGREVINK (1960).

Kolom 14: Het gemiddelde van de percentages stollingsfactoren van de kolommen 2 t.m. 5.

Kolom 15: Het percentage stollingsfactoren afgelezen op de stollingstijd-verdunningsgrafiek.

Kolom 16: De hoeveelheid remmer in eenheden.

Normale waarden: PTT 15,2 ± 0,7 sec.

TT 40,0 ± 1,0 sec.

logisch plasma en de verdunningen daarvan, de normaal-lijn daarentegen vrijwel op de ordinaat snijdt, hetgeen wederom in overeenstemming is met de gegevens verkregen uit de individuele plasma's van deze groep.

Tenslotte kon met mengproeven waarschijnlijk worden gemaakt dat er geen verschil bestaat tussen de inhibitor, aanwezig in plasma van de zes patiënten met vitamine-K-deficiëntie, en die, aanwezig in plas-

ma van de met coumarine behandelde patiënten, terwijl een mengsel van gelijke delen plasma uit de groep patiënten met vitamine-K-deficiëntie en uit die met leverparenchymbeschadiging een halvering van het inhibitorgehalte te zien gaf (fig. 6).

Tabel III geeft een samenvatting van de resultaten. Hoewel het gemiddelde factorengehalte van de twee onderzochte groepen niet verschilt, is de trombotesttijd bij „vitamine-K-deficiëntie” aanzienlijk langer

*Involed van bilirubine op de uitkomsten van de trombotest*

Aangezien bij een groot aantal patiënten het bilirubinegehalte van het bloed sterk verhoogd was, werd nagegaan in hoeverre bilirubine storend zou kunnen werken bij de meting van stollingstijden met behulp van de trombotest. Wij voegden zowel aan normaal plasma als aan plasma afkomstig van met coumarine behandelde patiënten bilirubine toe in zodanige hoeveelheden, dat de eindconcentratie 0,05 en 0,25 mg/ml bedroeg. Trombotesttijden, verkregen met deze plasma's verschilden niet met de tijden, die wij verkregen met de plasma's zonder toegevoegde bilirubine.

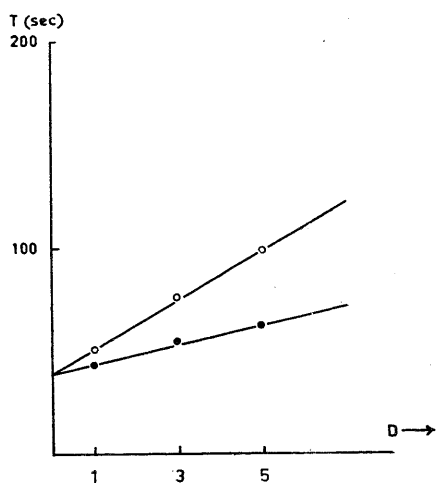


Fig. 4. De stollingstijd-verdunningsgrafiek van normaal plasma (•) en van gemengd plasma van 11 patiënten met chronische leverparenchymbeschadiging (o).

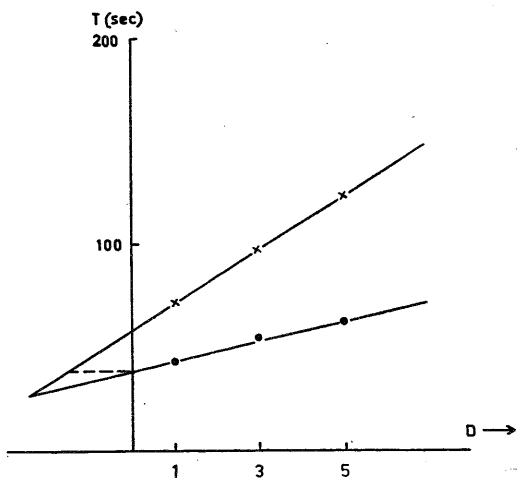


Fig. 5. De stollingstijd-verdunningsgrafiek van normaal plasma (•) en van gemengd plasma van 9 patiënten met vitamine-K-deficiëntie (x).

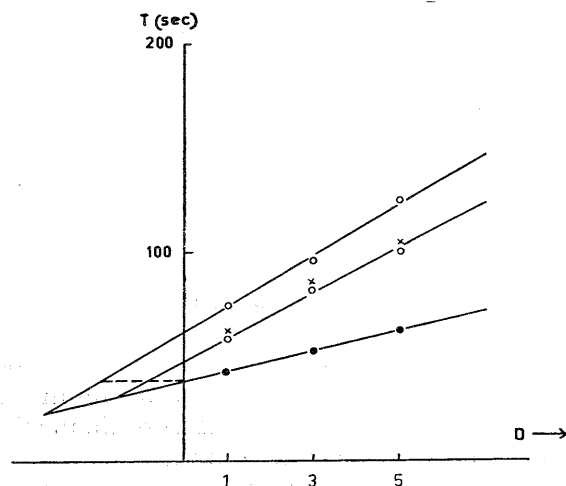


Fig. 6. De stollingstijd-verdunningsgrafiek van mengsels van verschillende plasma's  
 o (bovenste lijn) gelijke delen plasma van patiënten met vitamine-K-deficiëntie en van patiënten onder dicoumarolbehandeling  
 x gelijke delen plasma van patiënten met vitamine-K-deficiëntie en van patiënten met chronische leverparenchymbeschadiging  
 o (middelste lijn) gelijke delen plasma van patiënten onder dicoumarolbehandeling en van patiënten met chronische leverparenchymbeschadiging.

• normaal plasma

TABEL III. SAMENVATTING VAN DE RESULTATEN

Aantal patiënten	Factoren				
	Protr. tijd (sec.)	Trombotest-tijd (sec.)	Trombotest (pct)	One-stage (pct)	Preprotrombine (E)
Vit.-K-deficiëntie	9	29,5	81	40	2,3
Parenchymbeschadiging	11	25,3	63	33	0,2

*Beschouwingen*

Hoewel het een dubieuze eer is, aan het bekende aantal bij de bloedstolling samenwerkende factoren er één toe te voegen, lijkt de postulering van een circulerend anticoagulans, preprotrombine genaamd, dat naast het tekort aan de factoren II, VII, IX en X bij vitamine-K-deficiëntie voorkomt, gewettigd (HEMKER e.a. 1963). Preprotrombine is niet dialyseerbaar, thermolabiel, adsorbeerbaar aan BaSO<sub>4</sub> en Al(OH)<sub>3</sub>, en gedraagt zich ook in andere opzichten als een eiwit, dat behoort tot de groep van de stollingsfactoren II, VII, IX en X. Het met de trombotest onderzochte systeem wordt door preprotrombine competitief geremd, hetgeen eveneens een gelijkenis suggereert met het substraat van de trombotestreactie.

Omdat van vitamine K geen effect op de eiwitsynthese bekend is, postuleerden HEMKER e.a. (1963), dat protrombine — en (of) de factoren VII, IX en X — in twee stadia gesynthetiseerd wordt; eerst zou het eiwitdeel (preprotrombine) gemaakt worden; in een

latere, vitamine-K-gevoelige fase zou dit eiwitdeel in de actieve stollingsfactor worden omgezet. Als nu de normale bloedspiegel gehandhaafd wordt, doordat de concentratie van het eindprodukt via een feedback-mechanisme de synthese van het eiwitdeel regelt, zal vitamine-K-onttrekking (die een vermindering van het eindprodukt tot gevolg heeft) de synthese van het eiwitdeel maximaal stimuleren, met het gevolg dat preprotrombine, welke stof onder normale omstandigheden niet in het bloed is aan te tonen, in de circulatie verschijnt; daar remt het als een veel op protrombine gelijkend eiwit, de protrombine-omzetting competitief. De hoeveelheid circulerende preprotrombine zal bij een maximaal feedback-sigitaal slechts afhankelijk zijn van de eiwitsynthetiserende functie van de lever, en niet van de hoeveelheid gesynthetiseerd eindprodukt, dat wil zeggen, niet van de hoeveelheid circulerende stollingsfactoren. De bevindingen bij relatieve vitamine-K-deficiëntie (coumarinewerking) steunen deze hypothese; het preprotrombine-gehalte van plasma's afkomstig van patiënten bij wie het factorengehalte verschillend sterk gedaald was, bleek inderdaad gelijk te zijn (HEMKER e.a. 1963).

Ook bij absolute vitamine-K-deficiëntie door resorptiestoornis bij afsluitingsicterus, waarvan in het voorgaande een 9-tal voorbeelden gegeven zijn, blijkt echter het preprotrombinegehalte onafhankelijk te zijn van de intensiteit van de vermindering van stollingsfactoren (tabel II). Gemiddeld lijkt het gehalte aan preprotrombine bij vitamine-K-deficiëntie hoger dan bij coumarinebehandeling; het verschil is echter niet significant.

In de praktijk blijkt, dat er bij de bepaling van preprotrombine twee bronnen van fouten zijn aan te wijzen, die bijzondere aandacht verdienen. Ten eerste kan een selectief factor-VII-tekort de aanwezigheid van een remmer suggereren; dit blijkt slechts van praktisch belang als het gehalte aan factor-VII minder dan de helft van het gehalte aan de factoren II en X bedraagt, hetgeen in het begin van de coumarinetherapie of bij acute hepatitis voorkomt. De proef is, met andere woorden, alleen dan bruikbaar, wanneer de concentratie van de factoren II, VII en X gelijkelijk gedaald is, hetgeen bij chronische leverparenchymbeschadiging en vitamine-K-deficiëntie het geval is. Ten tweede blijkt de remmer moeilijk te bepalen, als het gehalte aan factoren II, VII en X hoger is dan 50 pct. Dit vindt zijn verklaring daarin, dat bij vlak lopende lijnen kleine bepalingsfouten reeds grote verschuivingen in het gebied bij de Y-as meebrengen, en daardoor een zeer grote fout bij het grafisch bepalen van de hoeveelheid remmer induceren. Om dezelfde reden moet de normaal-lijn met nauwkeurigheid worden vastgesteld.

Genoemde overwegingen deden ons de volgende vuistregel opstellen: indien bij een chronische leverfunctiestoornis de concentratie van de stollingsfactoren II, VII en X gedaald is onder 50 pct, en er meer dan één eenheid preprotrombine aantoonbaar is, heeft men te maken met een toestand die veroorzaakt is of mede gecompliceerd wordt door vitamine-K-deficiëntie.

### Summary:

*Differential determination of hepatic function with Owren's thrombotest.* — In Owren's thrombotest there is a difference between the clotting factor pattern in vitamin K deficiency (or treatment with vitamin K antagonists) and in parenchymatous liver disease. This difference is apparent when the thrombotest time is determined with a series of plasma dilutions. The difference is not caused by abnormalities in any of the known clotting factors, but can be explained by assuming the presence of a circulating competitive inhibitor of prothrombin conversion (tentatively called preprothrombin) in vitamin K deficiency. By determining this inhibiting factor it is possible to differentiate parenchymatous liver disease from vitamin K deficiency.

### Literatuur:

- BACHMANN, F., F. DUCKERT en F. KOLLER (1958) The Stuart-Prower factor assay and its clinical significance. *Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttgart)* **2**, 24.
- BORCHGREVINK, C. F., J. G. POOL, en H. STORMORKEN (1960) A new assay for factor V (proaccelerin-accelerin) using Russell's viper venom. *J. Lab. clin. Med.* **55**, 625.
- CLAUSS, A. (1957) Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta haemat. (Basel)* **17**, 237.
- DIXON, M. en E. C. WEBB (1958) *Enzymes*. Longmans Green & Co. Londen.
- ESNOUF, M. P., F. JOBIN en J. C. PEDEN (1963) The purification of bovine factor V. *Proc. Biochem. Soc.* **430**.
- ESNOUF, M. P. en W. J. WILLIAMS (1962) The isolation and purification of a bovine-plasma protein which is a substrate for the coagulant fraction of Russell's viper venom. *Biochem. J.* **84**, 62.
- HEMKER, H. C., J. J. VELTKAMP, A. HENSEN, E. A. LOELIGER (1963) Nature of prothrombin biosynthesis. *Nature (Lond.)* **200**, 589; (1964a) *Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttgart) Suppl.* **13**, 379.
- HEMKER, H. C., P. W. HEMKER en E. A. LOELIGER (1964b) Kinetic aspects of the interaction of blood clotting enzymes I. *Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttgart)*. In druk.
- LINWEAVER, H. en D. BURK (1934) The determination of enzyme association constants. *J. Amer. chem. Soc.* **56**, 658.
- LOELIGER, E. A. en F. KOLLER (1952) Behaviour of factor VII and prothrombin in late pregnancy and in the newborn. *Acta haemat. (Basel)* **7**, 157.
- LOELIGER, E. A., B. VAN DER ESCH, M. J. MATTERN en A. S. A. DEN BRABANDER (1963) Behaviour of factors II, VII, IX and X during long-term treatment with coumarin. *Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttgart)* **9**, 74.
- LOELIGER, E. A. (1964) Niet gepubliceerde waarnemingen.
- LÜSCHER, E., P. A. OWREN en R. G. MACFARLANE (1963) *Trans. Conf. Int. Comm. Blood Clotting Factors*. F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart.
- MACFARLANE, R. G. (1964) An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature (Lond.)* **202**, 498.
- MEER, J. VAN DER, Proefschrift Leiden (in voorbereiding).
- OWREN, P. A. en K. AAS (1951) The control of dicoumarol therapy and the quantitative determination of prothrombin and proconvertin. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **3**, 201.
- PESTALOZZI, H. (1958) Die prognostische und differential diagnostische Bedeutung des Vitamin K-Tests. *Schweiz. med. Wschr.* **88**, 402.
- SCHNITGER, H. en R. GROSS (1954) Ueber ein Universalgerät zur automatischen Registrierung von Gerinnungszeiten. *Klin. Wschr.* **32**, 1011.
- VELTKAMP, J. J., Proefschrift Leiden (in voorbereiding).