

# Elektrophoretische Untersuchungen der verschiedenen Gerinnungsfaktoren des Blutes

Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik, Athen

A. Gou ttas, H. Tsevrenis, J. Priovolos, Ph. Fessas,  
K. Rombos und T. Mandalaki

Auf die Entdeckung der verschiedenen Gerinnungsfaktoren folgt die Bemühung um die Aufklärung des Wesens dieser Faktoren und ihrer physikochemischen Eigenschaften. Im Rahmen dieser Forschungen sind in der Literatur elektrophoretische Arbeiten über diese Gerinnungsfaktoren angegeben worden.

So hat Seegers festgestellt, daß das Prothrombin bei der Elektrophorese eine Wanderungsgeschwindigkeit hat, die sich zwischen der des Albumins und des  $\alpha$ -Globulins befindet (3). Ware und Seegers haben bei der elektrophoretischen Untersuchung eines Präparates des Faktor V (Ac-Globulin, Pro-Accelerin) beobachtet, daß dieses aus 2 Elementen besteht; das eine mit einer Wanderungsgeschwindigkeit von  $-2,96 \times 10^{-5}$  entspricht den  $\beta$ -Globulinen und das andere mit einer Wanderungsgeschwindigkeit von  $-4,77 \times 10^{-5}$  hielten sie für den Faktor V (4). Koller hat ein Präparat des Faktor VII (Proconvertin, S.P.C.A.) hergestellt und bei seiner elektrophoretischen Untersuchung festgestellt, daß es sich dabei um ein Gemisch von Stoffen handelt, dessen Hauptbestandteil 80% des ganzen Präparates war (5). Im Jahre 1954 wurde von Aggeler, Spaet und Emery eine Arbeit über die *elektrophoretischen Eigenschaften* des B-antihämophilen Faktors (Christmas Faktor, P.T.C.) veröffentlicht, den sie aus physiologischem Plasma isoliert hatten (6).

## Methodik

Wir haben das elektrophoretische Verhalten folgender Gerinnungsfaktoren untersucht: 1. Prothrombin, 2. Faktor V (Proaccelerin), 3. Faktor VII (Prokonvertin), 4. A-Antihämophiles Globulin (AHF), 5. B-Antihämophiler Faktor (PTC, Christmas Faktor) und 6. C-Antihämophiler Faktor (PTA). Wir brauchten für unsere Methode 1. Plasma oder Blut, das keine oder nur geringe Mengen des zu untersuchenden Faktors enthält und 2. Plasma oder Serum eines normalen Menschen. Es wurde die Papierelektrophorese des Plasmas oder des Serum eines gesunden Menschen, in dem der entsprechende Faktor entweder in beiden oder in einem von beiden enthalten ist, durchgeführt. Die erhaltenen Streifen wurden in gleiche 1 cm lange Stücke geschnitten und jedes einzelne in 0,5 ccm einer isotonischen Kochsalzlösung 12 Stunden lang extrahiert. Dann beobachteten wir die Wirkung dieser Extrakte auf die Prothrombinzeit (nach Quick) des prothrombin- oder proaccelerin- oder proconvertinarmen Plasmas (Untersuchung des Faktor II, V und VII) und ferner auf die pathologische Prothrombinkonsumption eines hämophilen A-, B- oder C-Blutes (Untersuchung der VIII, IX und PTA antihämophilen Faktoren). Bei den zuerst genannten Untersuchungen wurde das Plasma eines Gesunden verwendet, während bei den Versuchen über das Proconvertin und den B-antihämophilen Faktor IX, das Serum eines Gesunden gebraucht wurde. Was den C-antihämophilen (PTA) Faktor betrifft, so ist es gleichgültig, ob Plasma oder Serum zur Untersuchung verwendet wird. (Für die Bestimmung des Prothrombin [Faktor II], des Proaccelerin [Faktor V] und des Proconvertin [Faktor VII] wurde die von Soulier und Larrieu [16] beschriebene analytische Methode der Quickzeit gebraucht. Für die Bestimmung der Prothrombinkonsumption des hämophilen Blutes [Faktor VIII, IX oder PTA], die Methode von Soulier [11] [Normal: > als 2 Minuten].)

*Technik der Elektrophorese:* Wir haben den Apparat Evans Electro selenium benutzt. Es wurde 0,1 ccm Plasma oder Serum auf ein Filterpapierband Whatman Nr. 3 in einer Veronalpufferlösung von pH 8,6 aufgetragen. Die Dauer der Elektrophorese betrug 7 Stunden bis eine Trennung der Proteinfractionen auf einer Streifenlänge von 12 cm erreicht war. Ein Teil des Streifens wurde konsolidiert und wie bei der gewöhnlichen Elektrophorese der Proteinfractionen des Serums gefärbt, um den Ort zu bestimmen, wohin diese gewandert waren.

## Ergebnisse

### 1. Elektrophoretische Untersuchung des Prothrombin

Durch BaSO<sub>4</sub>-Adsorption des Plasmas eines Gesunden bekamen wir ein Prothrombin- und Prokonvertin-armes Plasma. Der Prokonvertinmangel wurde durch Hinzufügen von Oxalat-Serum ausgeglichen. Bei dem so hergestellten Plasma fand, nach der Zugabe von Thromboplastin und Kalzium (Gerinnungszeit nach Quick länger als 5 Minuten) keine plasmatische Gerinnung statt, vielleicht wegen des absoluten Prothrombinmangels. Die Prothrombinzeit nach Quick war ebenfalls länger als 5 Minuten nach Hinzufügen der aus den Streifen gewonnenen Extrakte 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, die durch Elektrophorese des Plasmas eines Gesunden gewonnen worden waren. Dagegen trat nach Hinzufügen von Extrakten aus den Teilen 7 und 8 eine Gerinnung ein (Prothrombinzeit 95 Sekunden). Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, daß bei der Elektrophorese des Plasmas eines Gesunden das Prothrombin an die Stelle 7 und 8 gewandert ist, die der Stelle des  $\alpha$ -Globulins entspricht und dicht zwischen ihm und dem Albumin liegt (Abb. 1). Die trotzdem auf 90 Sekunden verlängerte Prothrombinzeit (normal bis 20 Sekunden) muß man der sehr kleinen Menge von Prothrombin zuschreiben, welche natürlich die Extrakte der Teile 7 und 8 enthielten, besonders wenn man die große Rolle, die das Prothrombin bei der Gerinnung spielt, in Betracht zieht.

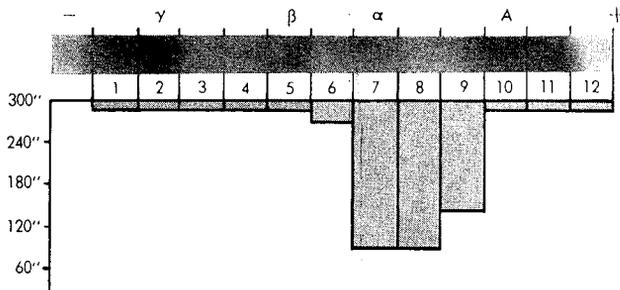


Abb. 1: Elektrophoretische Untersuchung des Prothrombin. Veränderung der Prothrombinzeit nach Quick des Ba SO<sub>4</sub>-adsorbierten Plasma nach der Zufügung von Extrakten der verschiedenen Teile des Elektrophorese-Streifens von normalem Plasma.

Aus diesen Versuchen schlossen wir also, daß das Prothrombin an den Ort der  $\alpha$ -Globuline wandert und sich etwas nach den Albuminen zu erstreckt.

## II. Elektrophoretische Untersuchung des Faktor V (Proaccelerin)

Wir haben Oxalatplasma verwendet, welches für die Dauer eines Monats bei einer Temperatur von 4° C aufbewahrt wurde. Es ist bekannt, daß dieses Plasma keinen Faktor V mehr enthält, weil er durch die Anwesenheit von Oxalatsalzen zerstört wird, während die anderen Faktoren: Faktor II (Prothrombin) in einer Konzentration von 70%, Faktor VII (Proconvertin) 80% und Faktor I (Fibrinogen) in einer Normal-Konzentration (0,4 g% bis 0,6 g%) gefunden wurden, und die Quickzeit dieses Plasmas länger als 60 Sekunden ist.

Wir haben nach der angegebenen Methode die Elektrophorese des Plasmas eines Gesunden nicht bei Zimmertemperatur sondern bei 4° C durchgeführt, um auf alle Fälle eine Zerstörung des Faktor V zu vermeiden. Dann stellten wir folgende Versuche an: 1. Gaben wir zum Oxalatplasma den Teil 5 des Elektrophorese-Streifens des Normalplasmas, so verringerte sich die Prothrombinzeit (nach Quick) des Oxalatplasmas von 67 auf 53 Sekunden. Bei einer zweiten gleichartigen Untersuchung sank die Prothrombinzeit von 77 auf 67 Sekunden. Eine geringfügige Änderung der Gerinnungszeit trat auch bei Zugabe des Extraktes aus Teilen 3 und 4 des Elektrophorese-Streifens des Normalplasmas ein (Abb. 2). 2. Gab man Teil 5 eines Elektrophorese-Streifens von an BaSO<sub>4</sub> adsor-

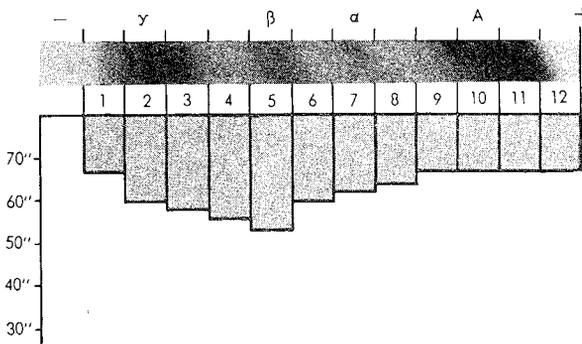


Abb. 2: Elektrophoretische Untersuchung des Proaccelerins (Faktor V). Veränderung der Prothrombinzeit nach Quick des aufbewahrten Oxalat-Plasmas nach der Zufügung von Extrakt der verschiedenen Teile des elektrophoretischen Bandes von normalem Plasma.

biertem Plasma, das kein Prothrombin und keinen Faktor VII enthält, in dem aber Faktor V unverändert enthalten ist, zu Oxalatplasma hinzu, so wurde die Gerinnungszeit nach Quick ebenfalls gesenkt und zwar von 64 auf 54 Sekunden (Abb. 3). 3. Die Gerinnungszeit wurde nicht verändert durch Zugabe verschiedener Extrakte aus den Teilen des Elektrophorese-Streifens vom Serum eines Gesunden. Dies wird mit der Tatsache zusammenhängen, daß man keinen Faktor V im Serum findet. Die Ursache für die nur geringe Verkürzung, aber nicht Normalisierung der Prothrombinzeit bei dem aufbewahrten Oxalatplasma ist

nach unserer Meinung auf 2 Ursachen zurückzuführen: erstens, daß das Prothrombin dieses Plasmas sich nicht absolut in seiner physiologischen Konzentration (100%) erhält, sondern um 30 bis 40% absinkt, und zweitens, daß es uns vielleicht nicht gelungen ist, das optimale pH für die Wirkung des Faktor V zu erreichen.

Aus diesen Versuchen schlossen wir, daß der Faktor V bei der Elektrophorese eine Stelle zwischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin, näher am  $\beta$ -Globulin einnimmt.

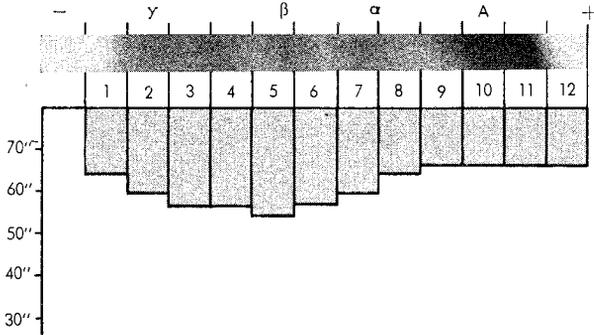


Abb. 3: Elektrophoretische Untersuchung des Proaccelerin (Faktor V). Veränderung der Prothrombinzeit nach Quick des aufbewahrten Oxalat-Plasma nach der Zufügung von Extrakt der verschiedenen Teile des elektrophoretischen Bandes eines durch Ba SO<sub>4</sub>-adsorbierten Plasmas.

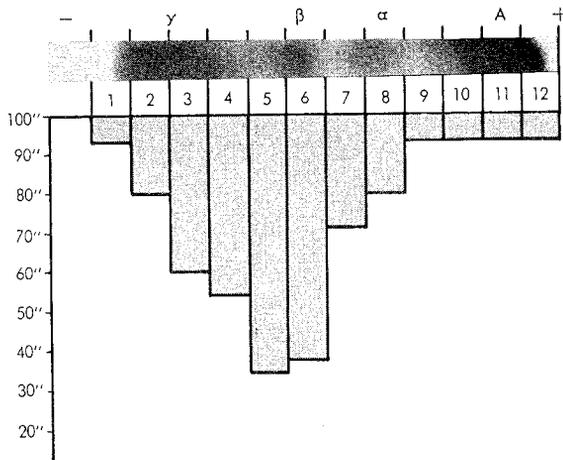


Abb. 4: Untersuchung des Proconvertin (Faktor VII). Veränderung der Prothrombinzeit nach Quick eines proconvertinarmen Plasmas (Plasma eines mit Tromexan vorbehandelten Menschen) nach der Zufügung von Extrakt der verschiedenen Teile des elektrophoretischen Bandes eines normalen Serum.

### III. Elektrophoretische Untersuchung des Faktor VII (Proconvertin)

Wir haben das Plasma eines mit Tromexan behandelten Menschen (2 Tage je 600 mg) benutzt, das 5% Proconvertin, 50% Prothrombin und 100% Proaccelerin

enthielt. Dieses Plasma zeigte eine Prothrombinzeit (nach Quick) von 93 Sekunden, die nach Zugabe des Extraktes von Teil 5 des Elektrophorese-Streifens vom Serum eines Gesunden auf 33 Sekunden verkürzt werden konnte. Eine geringfügige Verkürzung dieser Zeit konnte auch mit den Extrakten von Teil 4 und 6 des Elektrophorese-Streifens erzielt werden (Abb. 4). Die gleichen Untersuchungen wurden mit dem Plasma eines Patienten mit kongenitaler Hypoproconvertinämie wiederholt (15). Dieses Plasma enthielt 10% Proconvertin, 110% Prothrombin und 100% Proaccelerin. Es hatte eine Prothrombinzeit von 72 Sekunden, die durch Zugabe des Extraktes von Teil 4 des Elektrophorese-Streifens von Normalserum auf 13 Sekunden herabgesetzt werden konnte. Extrakte der Teile 3 und 5 riefen eine geringfügige Verkürzung dieser Zeit hervor. Gab man zu dem Plasma des Kranken mit Hypoproconvertinämie die entsprechenden Teile des Elektrophorese-Streifens vom Serum des Patienten, so kam es nur zu einer Verkürzung der Prothrombinzeit von 72 auf 65 Sekunden, entsprechend der Menge des Faktor VII, die im Serum des Patienten enthalten war (Abb. 5). Den Unterschied zwischen der Verkürzung der Prothrombinzeit des Plasmas des mit Tromexan vorbehandelten Menschen und der des Plasmas des an kongenitaler Hypoproconvertinämie Leidenden glauben wir in der Tatsache zu sehen, daß das erstere 50%, das zweite dagegen 110% Prothrombin enthielt.

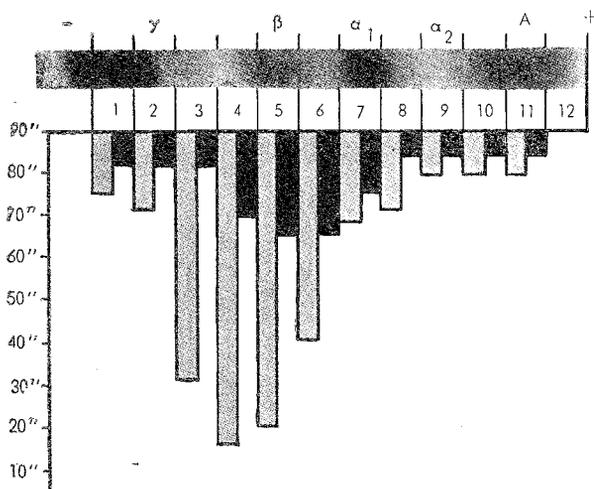


Abb. 5: Veränderungen der Prothrombinzeit nach Quick des Plasmas eines an kongenitaler Hypoproconvertinämie leidenden Patienten nach der Zufügung von Extrakt der verschiedenen Teile des elektrophoretischen Bandes.

▨ von normalem Serum

■ vom Serum des Patienten

Aus den obigen Versuchen ergibt sich, daß bei der Elektrophorese, der Faktor VII die Stelle zwischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin einnimmt und zwar näher am  $\beta$ -Globulin, wo es sich etwas ausbreitet.

#### IV. Elektrophoretische Untersuchung des A-Antihämophilen Globulins (Faktor VIII)

Wir haben Plasma eines hämophilen Patienten (Hämophilie A) benutzt. Die Diagnose der Form der Hämophilie wurde nach allen heute angewandten, speziellen Untersuchungen gestellt (16). Mit diesem Plasma haben wir Versuche über die Änderung der Gerinnungszeit nach Howell und der Prothrombinkonsumptionszeit (nach Soulier [11]) nach Zugabe von Extrakten der verschiedenen Teile des Elektrophorese-Streifens eines normalen Plasmas angestellt. Wir haben die Elektrophorese des Normalplasmas einmal bei Zimmertemperatur und ein anderes Mal bei 4° C durchgeführt, um eine Zerstörung des Anti-hämophilie-Faktors (Faktor VIII) bei längerem Stehenlassen bei Zimmertemperatur zu vermeiden. Im ersten Fall kam es nach Zufügen vom Extrakt der Teile 3 und 4 des Elektrophorese-Streifens vom Normalplasma zu einer vollständigen Normalisierung der Gerinnungszeit nach Howell und zu einer geringen Verbesserung der Prothrombinkonsumptionszeit (Abb. 6). Beim 2. Fall, der Elektrophorese des Normalplasmas bei 4° C, gelang eine vollständige Normalisierung sowohl der Gerinnungszeit wie auch der Prothrombinkonsumptionszeit des rekalkifizierten Plasmas (Abb. 7). Bei Zugabe von Extrakten aus den verschiedenen Teilen des Elektrophorese-Streifens des Patientenplasmas kam es zu keiner Änderung von Gerinnungs- und Prothrombinkonsumptionszeit.

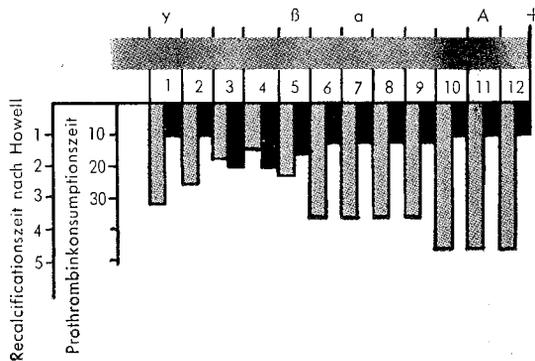


Abb. 6: Elektrophoretische Untersuchung des A-antihämophilen Globulins (Faktor VIII).  
 // Veränderung der Zeit nach Howell in Min. des Plasma eines bekannten Hämophilen A nach Zufügung von Extrakt der verschiedenen Teile des elektrophoretischen Bandes eines normalen Plasmas.  
 ■ Veränderung der Prothrombinkonsumptionszeit in Sek. des Plasmas eines bekannten Hämophilen A nach Zufügung von Extrakt der verschiedenen Teile des elektrophoretischen Bandes eines normalen Plasmas (Die Elektrophorese wurde bei Zimmertemperatur ausgeführt).

Diese Beobachtungen führten uns zu der Schlußfolgerung, daß der Anti-hämophilie-Faktor A bei der Elektrophorese die Stelle zwischen  $\gamma$ - und  $\beta$ -Globulin einnimmt. Aus der Arbeit von v. Creveld und Mitarbeitern (7) geht auf Grund von Versuchen mit Papierelektrophorese des von ihnen hergestellten

A-Antihämophilen Globulins hervor, daß das wirksamste Element ihres Präparats zum Ort des  $\beta_2$ -Globulins wandert, d. h. sich zwischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin befindet.

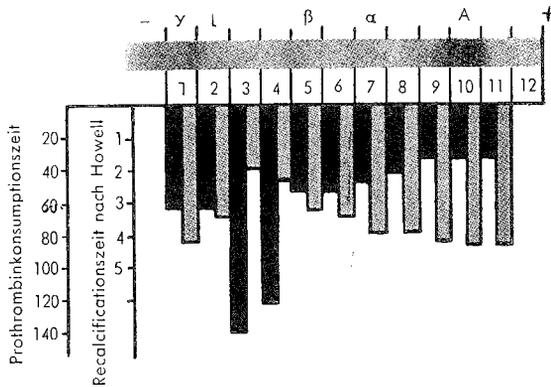


Abb. 7: Elektrophoretische Untersuchung des A-antihämophilen Globulins. —

/// Veränderung der Zeit nach Howell in Min. des Plasma eines bekannten Hämophilen A nach Zufügung von Extrakt der verschiedenen Teile des elektrophoretischen Bandes eines normalen Plasmas.

■ Veränderung der Prothrombinkonsumptionszeit in Sek. des Plasma eines bekannten Hämophilen A nach Zufügung von Extrakt der verschiedenen Teile des elektrophoretischen Bandes eines normalen Plasmas. (Die Elektrophorese wurde bei 4° C ausgeführt.)

#### V. Elektrophoretische Untersuchung des Antihämophilie-Faktor B (Faktor IX)

Die Untersuchung des Antihämophilie-Faktor B gründet sich auf die Änderung der Prothrombinkonsumption des Blutes eines hämophilen Patienten (Hämophilie B) durch Zugabe von Extrakten der verschiedenen Teile des Elektrophorese-Streifens eines Normalserum. Dabei konnten wir beobachten, daß eine vollständige Normalisierung der pathologischen Prothrombinkonsumption durch die Extrakte der Teile 4 und 5 des Elektrophorese-Streifens eintrat.

Daher nehmen wir an, daß der Antihämophilie-Faktor B die Stelle zwischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin, näher am  $\beta$ -Globulin einnimmt (Abb. 8).

Außer den oben beschriebenen Untersuchungen über die elektrophoretische Wanderung der verschiedenen Gerinnungsfaktoren, haben wir bei 2 Patienten des gleichen Stammbaumes, welche eine hämophilieartige Diathese aufwiesen, versucht, den im Blut fehlenden Faktor elektrophoretisch zu bestimmen. Daß es sich um eine Hämophilie handelte, ergab sich aus der geringen Verlängerung der Gerinnungszeit und der erheblichen Verlängerung der Zeit beim Heparintoleranz-Test, als auch aus der pathologischen Prothrombinkonsumption. Es wurde vorher bei diesen Patienten eine qualitative oder quantitative Blutplättchenstörung ebenso wie jedwede andere der sonst bekannten Ursachen der hämorrhagischen Diathesen ausgeschlossen. Es konnte weiter gezeigt werden, daß bei unserem Fall auch keine Hämophilie A oder B vorlag, da die pathologische Prothrombinkonsumptionszeit sich sowohl durch Plasma eines uns bekannten Kranken mit Hämophilie A als auch durch das Plasma eines Hämophilen B normali-

sieren ließ. Umgekehrt trat auch eine vollständige Normalisierung der pathologischen Prothrombinkonsumptionszeit des Plasma oder des Blutes eines Hämophilen A oder B nach der Zugabe von Plasma unseres Patienten ein (14). Die pathologische Prothrombinkonsumptionszeit unserer Kranken wurde 1. durch Plasma eines Gesunden, 2. durch BaSO<sub>4</sub> adsorbiertes Plasma eines Gesunden, 3. durch frisches Serum eines Gesunden und 4. durch BaSO<sub>4</sub> adsorbiertes Serum eines Gesunden normalisiert. Auf Grund dieser Untersuchungen kamen wir zuerst auf den Gedanken, daß der Hämophilie-Faktor C (P. T. A.) fehlen könnte. Unsere Beobachtung aber, daß der fehlende Faktor temperaturempfindlich ist (er wurde durch 20 Minuten langes Erwärmen des Plasmas auf 56° C zerstört), zwang uns, die Hämophilie C (P. T. A.) auszuschließen, da von *R o s e n t h a l* (8), der solche Fälle untersucht hat festgestellt wurde, daß der von ihm studierte Faktor nicht temperaturempfindlich ist. Infolgedessen schlossen wir auf das Fehlen des Faktors P. T. F.-D von *S p a e t*, der temperaturempfindlich ist (9) oder auf das Fehlen eines anderen, noch nicht bekannten Faktors, der auch temperaturempfindlich sein müßte. (Das Dasein des Faktors P. D. F.-D wurde aber von *S p a e t* selbst abgeleugnet) (18). Es war uns aber leider nicht möglich, mit Sicherheit das Fehlen des P. T. F.-D und nicht das des P. T. A.-Faktors zu beweisen, weil wir kein Blut eines bekannten Hämophilen C oder D zur Verfügung hatten. Wir hoffen jedoch, dieses noch zu erhalten, um die Hämophilie-Form unserer Patienten noch mit Sicherheit bestimmen zu können.

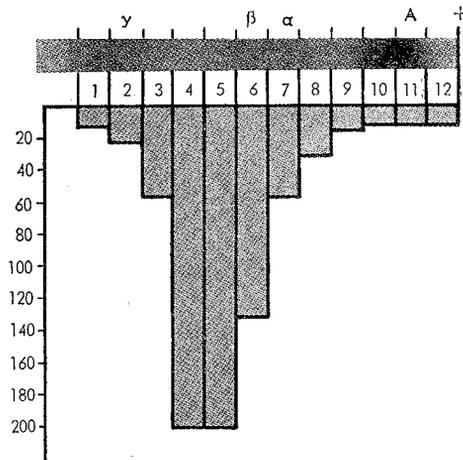


Abb. 8: Elektrophoretische Untersuchung des antihämophilen Faktor B (P. T. C.) (Faktor IX). — Veränderung der Prothrombinkonsumptionszeit in Sek. des Blutes eines bekannten Hämophilen B nach Zufügung von Extrakt der verschiedenen Teile des elektrophoretischen Bandes eines normalen Serum.

Die elektrophoretische Untersuchung des fehlenden Faktors ergab folgendes:  
 1. Gibt man Teil 4 des Elektrophorese-Streifens von Normalplasma zum Blut der Patienten, so kann die Prothrombinkonsumptionszeit von 10 auf 35 Sekunden

den verändert werden. Eine geringfügige Änderung läßt sich auch durch Extrakte der Teile 7 und 8 erzielen (Abb. 9). 2. Gibt man Teil 4 des Elektrophorese-Streifens von frischem Normalserum zum Blut des Patienten, so läßt sich die Prothrombinkonsumptionszeit von 30 auf 65 Sekunden und durch Extrakt des Teils 7 von 30 auf 45 Sekunden verbessern (Abb. 10). 3. Verwendet man zur Elektrophorese an  $\text{BaSO}_4$  adsorbiertes Normalserum und nimmt davon den Extrakt des Teils 4, so läßt sich die Prothrombinkonsumptionszeit von 20 auf 45 Sekunden und durch Extrakt des Teils 7 von 20 auf 80 Sekunden ändern (Abb. 11). Bei einer Kontrolluntersuchung mit Elektrophorese von Normalplasma und Normalserum ergab sich noch folgendes: 1. Extrakt des Teils 4 des Normalplasmas änderte die Prothrombinkonsumptionszeit von 25 auf 55 Sekunden und Extrakt von Teil 7 von 25 auf 45 Sekunden. Eine fast vollständige Normalisierung der Zeit des Prothrombinverbrauchs trat nach Hinzufügen

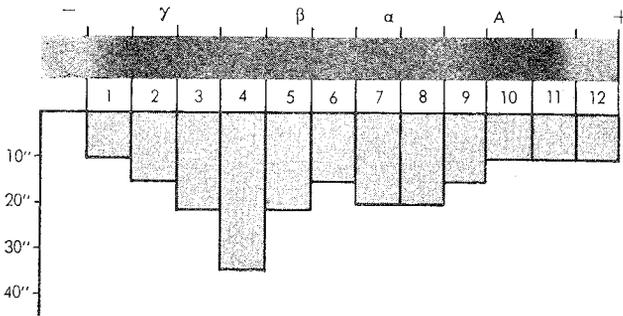


Abb. 9: Veränderung der Prothrombinkonsumptionszeit des Blutes des Patienten B (Hemophilie D?) nach Zufügung von Extrakt der verschiedenen Teile des elektrophoretischen Bandes eines normalen Plasmas.

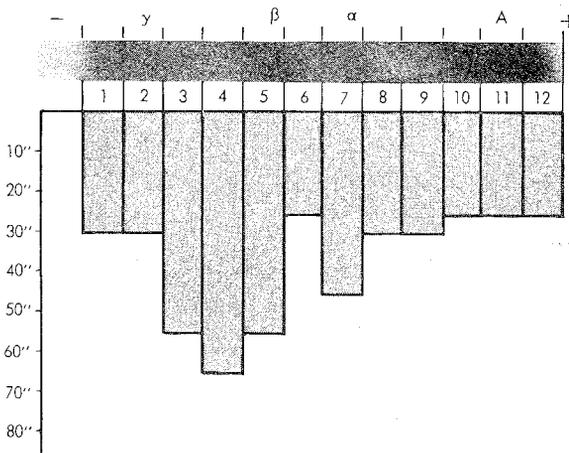


Abb. 10: Veränderung der Prothrombinkonsumptionszeit des Blutes des Patienten B (Hemophilie D?) nach Zufügung von Extrakt der verschiedenen Teile des elektrophoretischen Bandes eines normalen Serums.

eines Gemisches von Extrakten der Teile 4 + 7 (Abb. 12 und 13) ein. 2. Extrakt des Teils 4 des Normalserum änderte die Prothrombinkonsumptionszeit von 25 auf 65 Sekunden und des Teils 7 von 25 auf 35 Sekunden. Wurde aber dem Patientenblut ein Gemisch von Extrakt 4 und 7 oder 4 und 8 zugefügt, so betrug die Änderung 25 auf 95 Sekunden (Abb. 14 und 15).

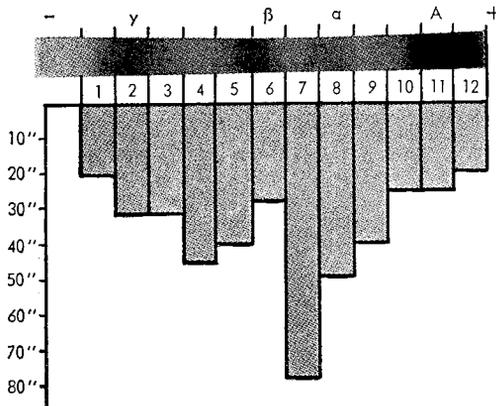


Abb. 11: Veränderung der Prothrombinkonsumptionszeit des Blutes des Patienten B. (Hemophilie D?) nach Zufügung von Extrakt der verschiedenen Teile des elektrophoretischen Bandes eines Ba SO<sub>4</sub>-adsorbierten normalen Serum.

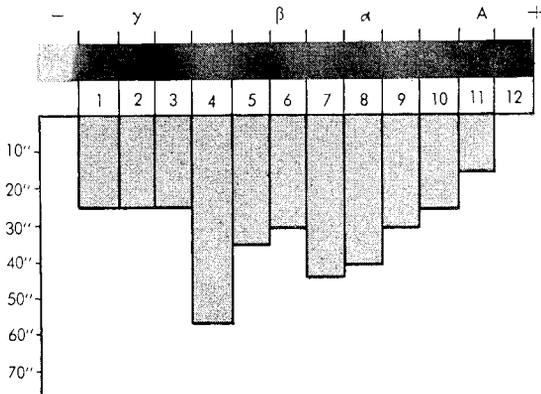


Abb. 12: Veränderung der Prothrombinkonsumptionszeit des Blutes des Patienten B. (Hemophilie D?) nach Zufügung von Extrakt der verschiedenen Teile des elektrophoretischen Bandes eines normalen Plasmas.

Es ergab sich aus diesen Untersuchungen: 1. daß eine deutliche, aber keine vollständige Korrektur der Prothrombinkonsumptionszeit eintrat und 2. daß diese Korrektur durch zwei Teile, und zwar durch die Extrakte der Teile 4 und 7 am besten gelang. Obwohl wir nicht in der Lage sind, eine sichere Erklärung aus unseren Beobachtungen anzugeben, so sind wir doch der Meinung, daß die erreichte Korrektur der Prothrombinkonsumptionszeit sich nur durch die

Anwesenheit des Antihämophilie-Faktors C in den Extrakten der Teile 4 und 7 des Elektrophorese-Streifens erklären läßt. Da es durch die Extrakte der Teile 4 und 7 zusammen zu einer wesentlich deutlicheren Besserung der Prothrombin-konsumptionszeit kam, als es durch einen Extrakt allein möglich war, schlossen wir, daß der, bei unseren Fällen fehlende Faktor aus 2 Fraktionen besteht, von welchen die erste zwischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin, näher am  $\beta$ -Globulin und die zweite (Teil 7) die Stelle zwischen  $\beta$ - und  $\alpha$ -Globulin einnimmt. Es scheint so, als ob jede dieser 2 Fraktionen die Eigenschaften des fehlenden Faktors hat, daß aber für ihre vollständige und normalisierende Wirkung die Mitarbeit beider notwendig ist. Von unseren künftigen Untersuchungen über das Wesen dieses

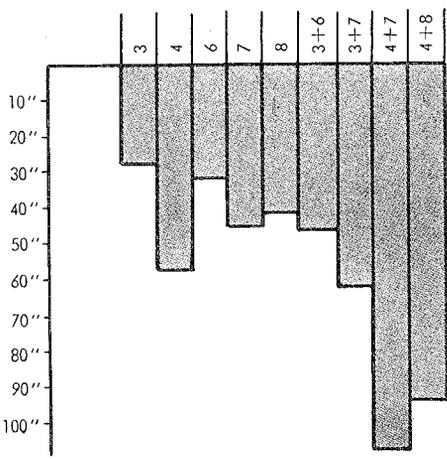


Abb. 13: Veränderung der Prothrombinkonsumptionszeit des Blutes des Patienten B. (Hemophilie D?) nach der Zufügung von Extrakt gewisser Teile des elektrophoretischen Bandes eines normalen Plasmas, als auch nach der Zufügung einer Mischung der Extrakte dieser Teile.

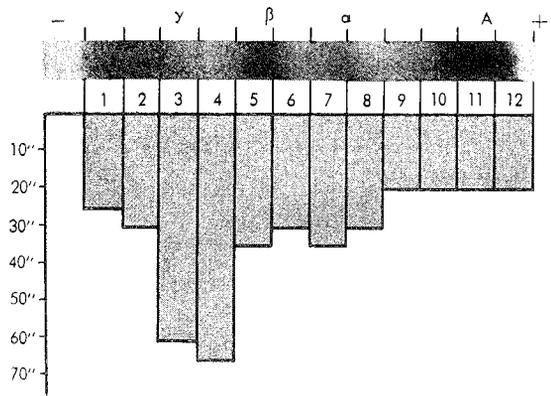


Abb. 14: Veränderung der Prothrombinkonsumptionszeit des Blutes des Patienten B. (Hemophilie D?) nach Zufügung von Extrakt der verschiedenen Teile des elektrophoretischen Bandes eines normalen Serum.

Faktors wird es abhängen, ob die oben angegebenen Fälle die P. T. A.- oder die P. T. F.-D-Hämophilie betreffen. Rosenthal und seine Mitarbeiter (8) stellten bei der Untersuchung der elektrophoretischen Eigenschaften des von ihnen isolierten P. T. A.-Faktors fest, daß dieser bei der Papierelektrophorese bis zum Ort des  $\beta_2$ -Globulins wandert, aber diese Autoren erwähnen den von uns beobachteten Faktor nicht. Aus diesen Untersuchungen müssen wir schließen, daß der von uns gefundene Faktor nicht derselbe ist, der von Rosenthal untersucht wurde.

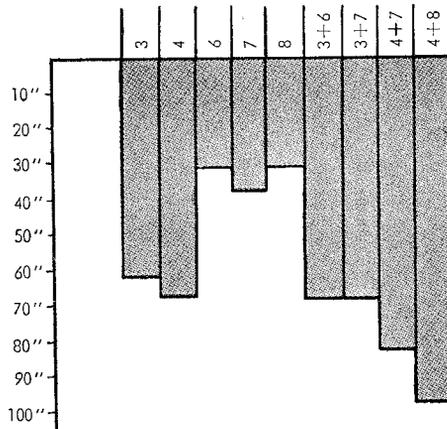


Abb. 15: Veränderung der Prothrombinkonsumptionszeit des Blutes des Patienten B. (Hämophilie D?) nach der Zufügung von Extrakt gewisser Teile des elektrophoretischen Bandes eines normalen Serum, als auch nach der Zufügung einer Mischung der Extrakte dieser Teile.

### Zusammenfassung

Wir haben elektrophoretische Untersuchungen der Gerinnungsfaktoren mit der Methode der Papierelektrophorese durchgeführt. Dabei konnten wir feststellen, daß die Wanderungsorte dieser Faktoren auf dem elektrophoretischen Streifen folgende sind:

1. Das Prothrombin wandert zum  $\alpha$ -Globulin und bleibt zwischen diesem und dem Albumin liegen.

2. der Faktor V (Proaccelerin), der Faktor VII (Prokonvertin), der Anti-Hämophilie-Faktor A und der Antihämophilie-Faktor B sind zwischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin näher am  $\beta$ -Globulin zu finden.

3. Der fehlende Faktor bei zwei hämophilieähnlichen Fällen, welche weder zur Form A noch zur Form B gehören, und bei denen wahrscheinlich der P. T. F.-D- oder ein anderer auch temperaturempfindlicher Faktor fehlt (da eine Hämophilie C ebenfalls mit Wahrscheinlichkeit auszuschließen ist), besteht aus zwei Fraktionen, wie die elektrophoretischen Untersuchungen ergaben. Die eine nimmt bei der Elektrophorese eine Stelle zwischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin und die andere zwischen  $\beta$ - und  $\alpha$ -Globulin ein.

### Summary

The electrophoretic behaviour of blood clotting factors has been studied using paperelectrophoresis. Following observations were made:

1. Prothrombin migrates almost as alpha-globulin and remains between alpha-globulins and albumins.

2. Factor V, factor VII, antihemophilic globulin and factor IX are located between beta and gamma globulins, close to beta globulins.

3. The clotting factor lacking in two cases resembling haemophilia but different from the type A and B is composed of two components; one migrates between beta and gamma globulins, the second between beta and alpha globulins. This factor is possibly P. T. F.-D or another factor unstable at 56° C.

### Résumé

Nous avons étudié le comportement électrophorétique des facteurs de coagulation. Au moyen de l'électrophorèse sur papier nous avons pu déterminer à quel groupe de protéines ces facteurs appartiennent. Leurs propriétés électrophorétiques sont les suivantes:

1) La prothrombine migre à peu près comme les  $\alpha$ -globulines et reste entre ces dernières et les albumines.

2) Le facteur V, le facteur VII, la globuline antihémophilique A (Facteur VIII) et le facteur IX se placent entre les  $\beta$  et les  $\gamma$  globulines, plus près des  $\beta$  globulines.

3) Le facteur déficient dans deux cas semblables à l'hémophilie, qui n'appartiennent ni à la forme A ni à la forme B consiste en deux fractions, l'une migre entre les  $\beta$  et  $\gamma$  globulines, l'autre entre les  $\beta$  et  $\alpha$  globulines. Il est possible que ce facteur soit le P. T. F.-D. ou un autre facteur peu stable à la température de 56° C.

### Literatur

- (1) Seegers, W. H., Loomis, E. C. and Wanderbelt, J. M.: Preparation of Prothrombin products Isolation of Prothrombin and its properties. Arch. Biochem 6: 85 (1945).
- (2) Seegers, W. H., McClaughry, R. I., Fahey, J. L.: Some properties of purified Prothrombin and its activation with sodium citrate. Blood 5: 421 (1950).
- (3) Seegers, W. H., Andrews, E. B.: Note on purification of human prothrombin. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 79: 112 (1952).
- (4) Ware, A. G., Seegers, W. H.: Plasma Accelerator Globulin partial purification. Quantitative determination and properties. J. biol. Chem. 172: 699 (1948).
- (5) Koller, F., Loeliger, A., Duckert, F.: Le facteur VII. Sa fonction dans la coagulation. Son importance clinique. Rev. Hémat. 7 (1952).
- (6) Aggeler, P. M., Spaet, T. H., Emery, B. E.: Purification of plasma thromboplastin factor B. and its identification as a beta 2 globulin. Science 119: 806 (1954).

- (7) Creveld, S. van, Hoorweg, P. G., Den Ottolauder, G. J. H., Veder, H. A.: Isolation of the Anti-haemophilic Factor from human plasma. *Acta haemat. (Basel)* **15** (1956).
- (8) Rosenthal, R. L., Dreskin, O. H., Rosenthal, N.: Plasma thromboplastin Antecedant (P.T.A.) deficiency: Clinical, coagulation, therapeutic and hereditary aspects of a new hemophilia-like disease. *Blood* **10** (1955).
- (9) Spaet, T. H., Aggeler, P. M., Kinsell, B. G.: A possible fourth thromboplastic component. *J. clin. Invest.* **33**: 1095 (1954).
- (10) Caen, J., Bernard, J.: Syndrome hémorragique dû au défaut du facteur thromboplastique de Rosenthal (P.T.A.). *Sang* **27**: 249 (1956).
- (11) Soulier, J. P.: Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie utilisant les sangs veineux et capillaire coagulés. *Sang* **19**: 78 (1948).
- (12) Tsevrenis, H.: Thèse d'agrégation (Athènes 1955) L'influence de diverses substances anticoagulantes sur les facteurs de la coagulation du sang.
- (13) Priovolos, J.: Inauguraldissertation. (Athènes 1955). Le dosage de la prothrombine et des facteurs V et VII. comme méthode de contrôle du fonctionnement hépatique.
- (14) Mandalaki, T.: Inauguraldissertation. (Athènes 1956). Contribution à l'étude de l'Hémophilie.
- (15) Choremis, K., Pédiatelis, K., Tsevrenis, H., Hadzidimitriou, E., Priovolos, J. et Mandalaki, T.: A propos d'un cas d'hypoproconvertinémie congénitale. *Helv. paediat. Acta* **II**: 301 (1956).
- (16) Soulier, J. P., Larrieu, M. G.: Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage des facteurs antihémophiliques A et B. *Sang* **24**: 205 (1953).
- (17) Beaumont, J. L., Caen, J., Bernard, J.: Recherches sur l'hémophilie. Etude clinique et biologique de 35 observations (Variétés A, B, et A'). *Sang* **25**: 938 (1954).
- (18) Soulier, J. P.: Persönliche Mitteilung.