

Abhängigkeit der Prothrombinzeit von der Calcium- und H⁺-Ionenkonzentration

Von I. MARSCHNER, K. HORN und P. C. SCRIBA¹⁾

Aus den Laboratorien für klinische Chemie und Endokrinologie der II. Medizinischen Klinik der Universität München

(Eingegangen am 18. September 1970)

Im Vergleich zur klassischen Bestimmung der Prothrombinzeit nach QUICK wird über Ergebnisse mit einer neuen elektro-optischen Methode berichtet. Untersucht wird der Einfluß der Calcium- und Wasserstoffionenkonzentration auf die Meßergebnisse. Die Arbeit enthält Angaben über eine einfache und präzise Verarbeitung von linearen Eichkurven zu Eich Tabellen mittels eines Tischrechners.

The dependence of prothrombin time on the concentration of calcium and hydrogen ions

Results of determinations of the thromboplastin time using the conventional QUICK-test and an electro-optical technique are reported. The influence of different concentrations of calcium ions and pH-values are studied. The calculation of convenient standard tables from linear standard curves by a digital computer is reported.

Die Bestimmung des Quick-Wertes ist heute zu einer der Routinemethoden im klinisch-chemischen Laboratorium geworden (1, 2, 3, 4). Abgesehen von der Überwachung der Wirkung von Cumarinderivaten, hat die Methode längst ihren festen Platz im diagnostischen Screening-Programm. Die mit der wachsenden Anzahl der durchzuführenden Untersuchungen einhergehende Belastung des Labors erfordert rationellere und zuverlässigere Meßverfahren.

Methodik

Visuelle Handmethode

Da im Zentrallabor zur Vereinfachung für die Stationen aus demselben Citratblut Blutsenkung nach WESTERGREN und QUICK-Wert ermittelt werden, ist für die Klinik die Citratblutgewinnung einheitlich auf 1 ml/0,1M Natriumcitratlösung plus 4 ml Venenblut in einer 5 ml-Einmalspritze festgelegt. Ein Teil des gut durchgemischten Spritzeninhalts wird zur Plasmagewinnung im Labor in Mikrolitergefäßen bei 12000 g eine Minute zentrifugiert. 100 µl des Überstandes werden mit einer Marburgpipette in ein schmales Glasröhrchen (Ø = 10 mm, h = 100 mm) eingefüllt und darin im Wasserbad auf 37° gebracht. Das Wasserbad liegt in Augenhöhe, die Glaswände bestehen aus planen Scheiben, die Reagenzröhrchen hängen nahe der Vorderwand und sind von unten beleuchtet. Eine starke Lupe erleichtert die Beobachtung. Aus einer Tuberkulinspritze werden mit Auslösen einer Stoppuhr 200 µl eines Gemisches von einem Teil Thrombokinaselösung (5) (Thromboplastin, Hoffmann-La Roche) und einem Teil einer 25 mM Calciumchloridlösung hinzugefügt. Man mißt die Zeit bis zum Auftreten des ersten Fibrinfadens am Glashäkchen, welches man durch das Gemisch zieht.

Geeicht wird die Methode mit Verdünnungsreihen (100, 90, 80, 70 ... bis 10% Citratplasma in physiol. NaCl-Lösung) aus zwei bis drei Plasmen von männlichen Gesunden, deren Prothrombinzeit zwischen 11 und 12 Sek. liegt, was bei dieser Arbeitsweise dem Bereich der einfachen Standardabweichung der Prothrombinzeiten eines Normalkollektivs entspricht. Für jede neue Charge der Thrombokinasase muß eine neue Eichkurve ermittelt werden (5). Man trägt die ermittelten Prothrombinzeiten der Verdünnungsreihen (Ordinate) gegen Prozent Plasmagehalt graphisch

auf und erhält eine Hyperbel (Abb. 2), der man die Zwischenwerte entnimmt. Der QUICK-Wert einer Probe ist als Prozentgehalt an Normalcitratplasma derjenigen Verdünnungsstufe definiert, welche die gleiche Prothrombinzeit aufweist.

Elektro-optische Methode

Benutzt wurde das „Coagulation Unimeter“ der Firma Bio-Dynamics GmbH, das im wesentlichen aus drei Elementen besteht:

- Leistungstransistor-gesteuerter Blockthermostat (37°) mit 12 Bohrungen für runde Polystyrolküvetten (Ø = 11, h = 35 mm) mit flachem Boden.
- Lichtquelle, temperierter Küvettenhalter und photosensibles Element.
- Timer und drei Zählröhrchen mit digitaler Zeitanzeige in Zehntel-Sekunden-Schritten.

Man füllt mehrere Küvetten mit 200 µl Calciumchlorid-Thrombokinaselösung (Marburgpipette, bei großen Serien Hamiltonspritze), temperiert etwa 5 Min. vor und bringt die erste Küvette in die Meßposition. Durch einen Knopfdruck stellt man das Gerät auf die Ausgangsextinktion der Lösung ein. Lage und Größe der Blende in der Küvettenhalterung sind so gewählt, daß die geringe Flüssigkeitsmenge ausreicht, um den Lichtweg voll auszufüllen. Mit einer zum Coagulation-Unimeter gehörenden automatischen Pipette fügt man durch eine Halterung hindurch dem Küvetteninhalt 100 µl Plasma zu. Die damit verbundene Extinktionsänderung startet den Timer — die Zählröhrchen beginnen den Zeitablauf anzuzeigen. Während der folgenden 6 Sek. ist das Gerät gegen Extinktionsänderungen unempfindlich, um zu vermeiden, daß eventuell entstandene Luftblasen eine Fehlmessung verursachen. Der Gerinnungseintritt, der mit einer neuerlichen Extinktionsänderung einhergeht, stoppt den Timer, die Zählröhrchen zeigen die abgelaufene Zeit so lange an, bis im Rahmen einer neuen Messung das Gerät wieder in Bereitschaftstellung gebracht wird.

Ergebnisse

Aus Rationalisierungsgründen (s. o.) wird mit einem Blut-Citrat-Verhältnis von 4 zu 1 und nicht, wie üblich von 9 zu 1 gearbeitet (3, 4, 5). Es zeigte sich, daß bei einer Rekalzifizierung mit 25 mM Calciumchloridlösung, wie für die 9 : 1 Verdünnung vorgesehen, die Calciumkonzentration nicht ausreicht.

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51).

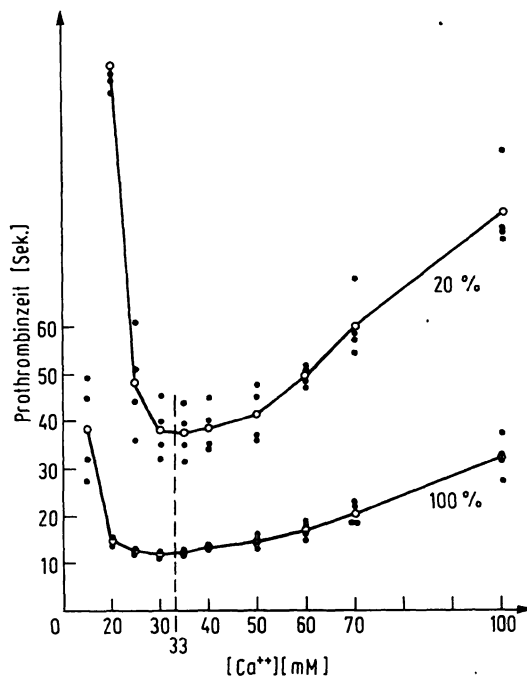


Abb. 1

Abhängigkeit der Prothrombinzeit des Normalwertes (etwa 100% Quick) und therapeutischer Werte (etwa 20% Quick) von der Calciumionenkonzentration. (Mittelwerte aus je vier Plasmen)

Die Abbildung 1 zeigt die gemittelte Abhängigkeit der Prothrombinzeit von der Calciumionenkonzentration für 100% und 20% Quick-Wert. Das Optimum findet man bei Verwendung einer 33 mM Calciumchloridlösung. Das ist besonders bei der Erstellung der Eichkurven bedeutsam. Verdünnt man nämlich wie üblich mit physiol. NaCl-Lösung, so stehen einer abnehmenden Citratmenge der Plasmaverdünnung gleichbleibende Mengen an Calciumionen gegenüber, was zu einer steigenden Konzentration an freien Calciumionen in der Küvette führt. Nach Abbildung 1 verändert das aber die Prothrombinzeiten. Verwendet man statt physiol. NaCl-Lösung als Verdünnungsmittel 20 mM Na-Citrat-0,9% NaCl-Lösung, so ist in jeder Verdünnungsstufe die gleiche Menge an Citrat und damit auch an freien Calciumionen. Auf diese Weise vermeidet man, daß Verdünnungen von 80 oder 90% kürzere Prothrombinzeiten als der 100%-Wert haben und außerhalb der Eichkurve liegen.

Die pH-Werte von 32 mit einer Meßkette für Blut bei 37° gemessenen Citratplasmen (1:4) lagen zwischen 7,64 und 7,98 ($\bar{x} = 7,78$; $s = 0,09$), auch wenn die Citratlösung auf pH = 7,4 eingestellt wurde. Blut-pH, Pufferkapazität und endogenes Calcium dürften die für diese recht erheblichen Abweichungen entscheidenden Veränderlichen sein. Löst man das für die Blutentnahme benutzte Na-Citrat nicht in Wasser, sondern in 0,2 M Tris/HCl-Puffer, so läßt sich damit der Plasma-pH-Wert einstellen. Durch Parallelbestimmung bei pH-Werten zwischen 7,3 und 8,0 konnte ein sehr schwach ausgeprägtes pH-Optimum der Prothrombinzeit zwischen 7,4 und 7,5 festgestellt werden. Demnach wirkt sich der Einfluß des von Probe zu Probe schwankenden pH-Wertes nicht entscheidend auf den Quick-Wert aus.

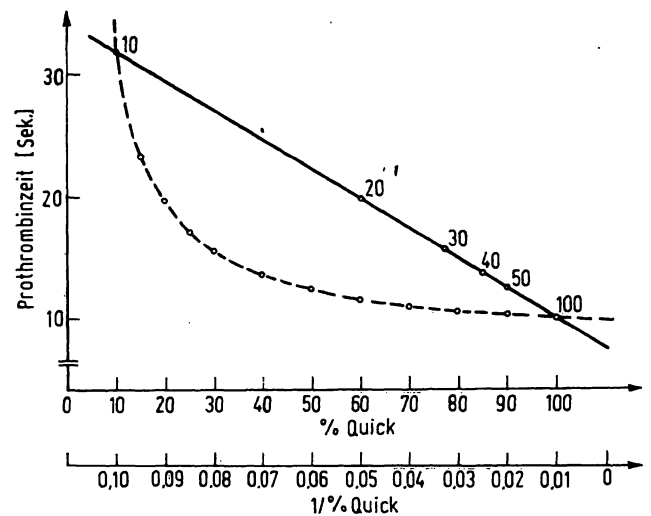


Abb. 2

Eichkurve für die Bestimmung des Quick-Wertes bei direkter Auftragung als Hyperbel (o---o) und nach mathematischer Umformung in eine Gerade (o—o) (s. Text)

Die Verwendung einer gepufferten Natriumcitratlösung erscheint unnötig.

Die Quick-Eichkurve hat die Form einer Hyperbel und läßt sich als Gerade darstellen, wenn man die gefundenen Prothrombinzeiten (t) gegen die reziproken Werte der Verdünnungen aufträgt (Abb. 2). Die Regressionsgerade gehorcht der Gleichung:

$$t = b \left(\frac{1}{\% \text{ Quick}} \right) + a.$$

Mit dem Programm A drückt der Rechner (Olivetti Programma 102), nach Eingabe der Datenpaare: Zeit — % Verdünnung, die Werte für b (Steigung der Regressionsgeraden), a (Schnittpunkt mit der Y-Achse), $-\frac{a}{b}$ (Schnittpunkt mit der X-Achse) und den Korrelationskoeffizienten r aus²⁾. Dieser allein erlaubt

²⁾ Programm A:

Man setzt $\frac{1}{\% \text{ Quick}} = x$ und erhält $t = bx + a$. Die Steigung b der Regressionsgeraden errechnet sich aus möglichst vielen Werten für t (Prothrombinzeit) und x (1/% Verdünnung) nach der Gleichung:

$$b_{tx} = \frac{\sum(x_v \cdot t_v - \bar{x} \cdot \bar{t})}{\sum(x_v - \bar{x})^2}.$$

Für $x = 0$ errechnet sich der Schnittpunkt a mit der Ordinate; für $t = 0$ der Schnittpunkt $-\frac{a}{b}$ mit der Abszisse. Zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten r wurde folgende Gleichung in das Rechenprogramm gespeichert:

$$r = \frac{\sum(x_v \cdot t_v - \bar{x} \cdot \bar{t})}{\sqrt{[\sum(x_v - \bar{x})^2] [\sum(t_v - \bar{t})^2]}}.$$

Programm B:

Hier rechnet man günstiger mit der Hyperbelformel der Eichkurve:

$$y = \frac{b}{x} + a \text{ oder in diesem Fall: } t = \frac{1}{\% \text{ Quick}} + a.$$

Mit Hilfe eines bedingten Sprunges werden alle ganzzahligen Werte für % Quick und die dazugehörigen Prothrombinzeiten automatisch errechnet und ausgedruckt:

eine Aussage über die Qualität der Werte und die Brauchbarkeit für eine Eichkurve.

Mit dem Programm B erhält man nach Eingabe der Konstanten a und b in zwei Speicher des Rechners die vollständige Eich-tabelle in Ein-Prozent-Schritten von 100% bis 1% mit den zugehörigen Prothrombinzeiten ausgedruckt²⁾. Damit wird jeder Ungenauigkeit beim Ablesen aus graphischen Darstellungen ausgewichen, abgesehen von der beachtlichen Zeitersparnis.

So war es uns leicht möglich, die Korrelationskoeffizienten der Meßwerte aus den letzten 12 Eichkurven der Handmethode zu errechnen. Es fand sich ein erstaunlich hoher Mittelwert von $\bar{r} = 0,9975$ bei einer Standardabweichung von $s = 0,0017$. Für ebenfalls 12 willkürlich ausgewählte Eichkurven, die mit dem Coagulation-Unimeter erstellt waren, errechnete sich ein mittlerer Korrelationskoeffizient von $\bar{r} = 0,9990$, $s = 0,0012$, welcher erkennbar besser als der der Handmethode ist.

Diskussion

Nachteile der klassischen Arbeitsweise nach QUICK sind:

1. Körperliche Anstrengung: Eine Assistentin sitzt mit

über Kopfhöhe erhobenem Arm vor dem Wasserbad, um das Glashäkchen durch das Gerinnungsgemisch zu ziehen.

2. Individuelle Verschiedenheiten der Stoppzeiten erfordern, daß jede Assistentin ihre eigene Eichkurve erstellt.

3. Der Zeitaufwand der Methode bedingt, daß die letzten QUICK-Werte manchmal erst vier Stunden nach Blutentnahme bestimmt werden können, was zu falschen niedrigen Werten führt (4).

Demgegenüber hat die elektro-optische Methode folgende *Vorteile*:

1. Denkbar einfache Handgriffe, die auch von ungeübtem Personal und im Nachtdienst schnell und sicher ausgeführt werden können.

2. Einmal-Gefäße, keine Spülarbeit.

3. Keinerlei körperliche Anstrengung der Assistentin.

4. Rationellere und schnellere Verarbeitung des Untersuchungsgutes.

5. Vermeidung der individuellen Beobachtungsungenauigkeit.

Literatur

1. QUICK, A. J., The hemorrhagic diseases. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois (1942). — 2. MARX, R. und H. BAYERLE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 283, 243 (1948). — 3. MARX, R., Hämostaseologie. Habilitationsarbeit, Universität München (1953).

— 4. DEUTSCH, E. und G. GEYER, Laboratoriumsdiagnostik, S. 260, Steinkopf, Berlin (1969). — 5. AVERDUNK, R. und K. BORNER, diese Z. 8, 263 (1970).

PD Dr. med. Peter C. Scriba
Dr. med. Klaus Horn
cand. med. Ingo Marschner
II. Medizinische Klinik
der Universität
8 München 15, Ziemssenstraße 1