

- Goossens, N.: Proc. 6th Congr. europ. Soc. Haemat., Copenhagen 1957 (Karger, Basel/New York 1958).
- Hardaway, R. M.; Mc. Kay, D.; Conley, C. L. and Hartmann, C. R.: Amer. J. Surg. 87: 41 (1954).
- Kleinmaier, K.; Goergen, K.; Lasch, H. G.; Krecke, H. J. und Bohle, A.: Klin. Wschr. In Vorbereitung (1959).
- Krevans, J. R.; Jackson, D. P.; Conley, C. L. and Hartmann, C. R.: Blood 12: 834 (1957).
- Koller, F.: Acta haemat. 18: 33 (1957).
- Lasch, H. G. und Roka, L.: Z. physiol. Chem. 294: 30 (1953); Klin. Wschr. 32: 460 (1954).
- Lasch, H. G.; Mechelke, K.; Nusser, E. und Seßner, H. H.: Dtsch. Arch. klin. Med. 204: 1 (1957); 205: 131 (1958); Z. exp. Med. 129: 484 (1958).
- Lasch, H. G.; Linke, A.; Seßner, H. H. und Völker, A.: Klin. Wschr. 36: 717 (1958).
- Lasch, H. G.; Seßner, H. H.; Spohn, K.; Heinzel, H.; Kolb, K. und Kratzert, R.: Klin. Wschr. 37: 182 (1959).
- Lüscher, E. F.: Schweiz. med. Wschr. 86: 345 (1956).
- Quick, A. J.; Georgatos, J. G. and Hussey, C. V.: Amer. J. med. Sci. 228: 207 (1954).
- Rooss, L.: Thromb. Diath. haemorrh. 1: 471 (1957).
- Seegers, W. H.: Advanc. Enzymol. 15 (1955).
- Witte, S.: Folia haemat. (neue Folge) 1: 320 (1957).
- Witte, S. und Kinzelmaier, H.: Folia haemat. (neue Folge) 1: 241 (1957).

222

## Essais d'isolement de certains anticoagulants spontanés par fractionnement des protéines plasmatiques

J. FAVRE-GILLY, J. P. THOUVEREZ ET R. CREYSSEL

Lyon, France

Nous rapportons 4 observations personnelles dont 2 concernent des diathèses hémorragiques par antithromboplastinogène, acquises au cours d'une polyarthrite chronique évolutive et au cours d'accidents sériques et les 2 autres ont trait à des diathèses par antithrombine du type de l'héparine, acquises au cours de lupo-érythématoviscérites.

### Observation n° 1 – Antithromboplastinogène

Homme de 50 ans, atteint d'une polyarthrite chronique évolutive compliquée depuis un an d'une diathèse hémorragique. L'allongement important du temps de coagulation, du temps de Howell et du temps de Quick (avec perturbation de la consommation de la prothrombine et des tests de génération de la thromboplastine, plasmatique et sérique) est dû à la présence d'un anticoagulant circulant de type antithromboplastinogène, inhibant la globuline anti-hémophilique. Cet anticoagulant est thermostable, non dialysable et non adsorbable par le sulfate de baryum.

L'électrophorèse des protéines, pratiquée à plusieurs reprises, montre une hyperglobulinémie, portant surtout sur les gamma-globulines, mais aussi sur les  $\alpha_2$  et  $\beta$ -globulines:

|                        | Le 25 septembre 1956 | Le 12 mars 1957 |
|------------------------|----------------------|-----------------|
| Protéines totales      | 72 g par litre       | 68 g par litre  |
| Albumines              | 24,9 %               | 39,2 %          |
| $\alpha_1$ -globulines | 9,6 %                | 8,2 %           |
| $\alpha_2$ -globulines | 9,1 %                | 13,6 %          |
| $\beta$ -globulines    | 18,7 %               | 12,7 %          |
| $\gamma$ -globulines   | 37,7 %               | 26,3 %          |

Nous nous sommes efforcés de localiser l'anticoagulant dans les groupes de protéines après migration électrophorétique. Pour cela, après avoir fait migrer sur papier, pendant 24 heures, le sérum de notre malade, nous avons découpé 4 bandes correspondant aux albumines, aux  $\alpha$ , aux  $\beta$  et aux  $\gamma$ -globulines, et nous avons trempé chacune de ces bandes dans une quantité déterminée d'un plasma normal. Après une heure d'incubation, seul était allongé le test de tolérance à l'héparine *in vitro* du plasma dans lequel avait trempé la 4<sup>e</sup> bande correspondant aux gamma-globulines:

#### Test de tolérance à l'héparine *in vitro*

|                                    | 0      | I       | II     | III     |
|------------------------------------|--------|---------|--------|---------|
| Plasma normal                      | 2' 30" | 4' 15"  | 6' 30" | 11'     |
| Plasma normal incubé 1 heure à 37° | 2' 40" | 5'      | 8'     | 13'     |
| Avec Bande 1: albumines            | 2' 40" | 4' 30"  | 9'     | 15'     |
| Avec Bande 2: $\alpha$ -globulines | 2' 30" | 4'      | 6' 30" | 10' 30" |
| Avec Bande 3: $\beta$ -globulines  | 2' 30" | 5'      | 7' 30" | 12' 30" |
| Avec Bande 4: $\gamma$ -globulines | 4' 25" | 15' 30" | 25'    | 37'     |
| Plasma du malade                   | 5' 30" | 11'     | 27'    | 40'     |

De même seul est perturbé le test de *Biggs et Douglas* du plasma normal dans lequel a trempé la 4<sup>e</sup> bande correspondant aux gamma-globulines.

Ainsi l'anticoagulant paraît migrer avec les gamma-globulines.

#### Test de *Biggs et Douglas*

|                                    | 1'  | 3'    | 5'    | 7'    | 9'  |
|------------------------------------|-----|-------|-------|-------|-----|
| Plasma normal                      | 55" | 10"   | 10"   | 10"   | 12" |
| Plasma normal incubé 1 heure à 37° | 60" | 9"    | 10,5" | 10,5" | 11" |
| Avec Bande 1: albumines            | 32" | 10"   | 10,5" | 11"   | 11" |
| Avec Bande 2: $\alpha$ -globulines | 84" | 13,5" | 11"   | 11"   | 12" |
| Avec Bande 3: $\beta$ -globulines  | 71" | 10,5" | 10"   | 9,5"  | 13" |
| Avec Bande 4: $\gamma$ -globulines | 75" | 66"   | 28"   | 25"   | 25" |
| Plasma du malade                   | 67" | 32"   | 33"   | 38"   | 44" |

Nous avons aussi procédé à des précipitations fractionnées du plasma et du sérum par du sulfate d'ammonium à 25 %, à 33 %, à 37 % et à 50 % de saturation. Aussi bien à partir du sérum que du plasma, l'anticoagulant se retrouve principalement dans le précipité obtenu avec le sulfate d'ammonium à 50 % de saturation, et accessoirement dans le précipité obtenu avec le sulfate d'ammonium à 37 % de saturation, alors qu'il est absent des précipités obtenus avec des concentrations de sulfate d'ammonium à 25 % et 33 % de saturation. Le pouvoir anticoagulant a pu être vérifié en mélangeant  $\frac{1}{5}$  de précipité redissout en sérum physiologique dans  $\frac{4}{5}$  de plasma citraté siliconé normal, et en testant la coagulabilité globale du mélange au thrombo-élastigramme.

*Observation n° 2 – Antithromboplastinogène*

Homme de 65 ans, ayant fait une diathèse hémorragique temporaire dans les mois qui ont suivi l'administration de sérum antitétanique pour une plaie.

L'allongement du temps de coagulation, du temps de Howell et du temps de Quick, avec trouble de la consommation de la prothrombine et de la génération de la thromboplastine, est dû à la présence d'un anticoagulant qui se comporte comme un antithromboplastinogène, inhibant la globuline antihémophilique.

Nous nous sommes contentés, chez ce malade, de pratiquer à deux reprises, une électrophorèse des protéines sur papier, qui a montré une hypergammaglobulinémie et une hyper- $\alpha_2$ -globulinémie même sur le second diagramme, à une date où il n'y avait pourtant plus d'anticoagulant dans le sang.

|                        | Mai 1957       | Novembre 1957  |
|------------------------|----------------|----------------|
| Protéines totales      | 64 g par litre | 69 g par litre |
| Albumines              | 43,7 %         | 49 %           |
| $\alpha_1$ -globulines | 12 %           | 3,4 %          |
| $\alpha_2$ -globulines | 11,1 %         | 8,8 %          |
| $\beta$ -globulines    | 10 %           | 9,7 %          |
| $\gamma$ -globulines   | 23 %           | 29,1 %         |

*Observation n° 3 – Antithrombine héparine*

Jeune fille de 25 ans, atteinte depuis 2 ans d'une lupoerythématoviscérite signée par la présence de cellules L.E. dans le sang et lui occasionnant des poussées fébriles, des arthralgies, des adénopathies, de l'albuminurie et des éruptions caractéristiques. Apparition d'un purpura hémorragique rapidement mortel. Dans le sang on trouve à la fois une thrombocytopénie et un allongement du temps de coagulation, du temps de Howell et du temps de thrombine, sans allongement important du temps de Quick et sans perturbation de la génération de la thromboplastine. Ce trouble est dû à la présence d'un anticoagulant se comportant comme une antithrombine, analogue à l'héparine, puisque le sulfate de protamine le neutralise et corrige le temps de thrombine.

Nous nous sommes contentés de pratiquer, chez cette malade, une électrophorèse des protéines sur papier qui a montré une hyperglobulinémie portant surtout sur les gamma-globulines et plus accessoirement sur les  $\alpha_2$ -globulines.

|                        |                |
|------------------------|----------------|
| Protéines totales      | 39 g par litre |
| Albumines              | 40,5 %         |
| $\alpha_1$ -globulines | 6,4 %          |
| $\alpha_2$ -globulines | 10,8 %         |
| $\beta$ -globulines    | 8,3 %          |
| $\gamma$ -globulines   | 34 %           |

*Observation n° 4 – Antithrombine – Héparine*

Jeune femme de 22 ans atteinte depuis 2 ans d'une lupoérythématoviscérite signée par la présence de cellules L.E. dans le sang et lui ayant occasionné des poussées fébriles récidivantes, avec éruptions cutanées, arthralgies, albuminurie et pleuro-péricardite. A l'occasion d'un purpura hémorragique, on lui trouve une diathèse complexe consistant en une thrombocytopénie, et en un allongement du temps de coagulation, du temps de Howell et du temps de Thrombine (alors que le temps de Quick est normal, de même que la génération de la thrombo-plastine). Ce trouble est dû à la présence d'un anticoagulant se comportant comme une antithrombine, analogue à l'héparine, puisqu'il est neutralisé par le sulfate de protamine qui corrige le temps de thrombine.

Cet anticoagulant paraît non dialysable, mais thermolabile et adsorbable par le sulfate de baryum.

Nous avons pratiqué chez cette malade, à plusieurs reprises, une électrophorèse des protéines sur papier et nous avons trouvé chaque fois une perturbation importante: hypo-albuminémie et hyperglobulinémie, consistant surtout en une élévation considérable des gamma-globulines, et importante des  $\alpha_2$ - et  $\beta_2$ -globulines.

|                        | Le 2 janvier 1958 | Le 27 mai 1958 |
|------------------------|-------------------|----------------|
| Protéines totales      | 64 g par litre    | 64 g par litre |
| Albumines              | 36,4 %            | 23,9 %         |
| $\alpha_1$ -globulines | 8 %               | 4 %            |
| $\alpha_2$ -globulines | 12,6 %            | 13,6 %         |
| $\beta$ -globulines    | 10 %              | 16,7 %         |
| $\gamma$ -globulines   | 33 %              | 41,7 %         |

Nous avons ensuite cherché à déterminer avec quelles protéines migrait l'anticoagulant à l'électrophorèse. Pour cela, après avoir laissé migrer sur papier pendant 24 heures, le sérum du malade, nous avons découpé ce papier en 5 bandes correspondant à peu près aux albumines, aux  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -globulines. Seule la 5<sup>e</sup> bande, correspondant aux gamma-globulines, allongeait le temps de thrombine d'un plasma normal dans lequel on l'avait trempée:

|                                      | Temps de thrombine |        |
|--------------------------------------|--------------------|--------|
|                                      | au 1/2             | au 1/8 |
| Plasma normal                        | 12"                | 15"    |
| + Bande n° 1: Albumines              | 15"                | 16"    |
| + Bande n° 2: $\alpha_1$ -globulines | 16"                | 14"    |
| + Bande n° 3: $\alpha_2$ -globulines | 14"                | 15"    |
| + Bande n° 4: $\beta$ -globulines    | 16"                | 16"    |
| + Bande n° 5: $\gamma$ -globulines   | 25"                | 29"    |
| Plasma du malade                     | 24"                | 30"    |

Nous avons ensuite précipité les englobulines du sérum par dialyse dans l'eau distillée, et constaté qu'elles n'avaient pas de pouvoir anticoagulant. L'anticoagulant était au contraire présent dans les pseudoglobulines surnageantes, que nous avons précipitées par du phosphate mono et dipotassique de 40 à 50 % de saturation. Les précipités obtenus entre 40 % et 45 % et entre 45 % et 50 % de saturation, dans lesquels nous avons pu reconnaître électrophorétiquement des gamma-globulines, contenaient bien l'anticoagulant, puisqu'ils allongeaient le temps de thrombine d'un plasma normal.

Ainsi tous nos essais de fractionnements nous ont conduits à localiser l'anticoagulant dans les gamma-globulines.

### Discussion

Il nous a paru intéressant de confronter nos résultats avec ceux des observations publiées ces dernières années sur les diathèses hémorragiques par antithromboplastine ou antithromboplastinogène (80 cas publiés environ) et sur les diathèses hémorragiques par antithrombine (18 cas publiés environ).

Nous avons pu remarquer que, dans l'ensemble, les antithromboplastinogènes (ou antithromboplastines) étaient bien comme dans nos deux observations, thermostables, non dialysables et non adsorbables par le sulfate de baryum ou le phosphate tricalcique. Dans les diathèses par antithromboplastinogène, un diagramme électrophorétique a été tracé dans 28 observations; il était normal dans 3 cas, perturbé dans 25 cas avec une hyperglobulinémie soit globale (5 cas), soit partielle: hypergammaglobulinémie le plus souvent, mais on peut voir aussi des élévations isolées des  $\alpha$ - ou des  $\beta$ -globulines, et des élévations groupées:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta$ , ou  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\gamma$  ou  $\beta$  et  $\gamma$ . Si l'on se reporte aux seuls auteurs qui ont essayé de localiser l'anticoagulant au cours des migrations électrophorétiques, on trouve 8 cas dans lesquels l'anticoagulant est retrouvé, comme dans notre première observation, avec les gamma-globulines. Dans 3 cas l'anticoagulant migrait non seulement avec les gamma-globulines, mais aussi avec les  $\beta$ -globulines. Dans un seul cas on le retrouvait avec les  $\beta$ -globulines.

Quant aux auteurs, moins nombreux, qui ont pratiqué, comme nous l'avons fait, des précipitations fractionnées par le sulfate d'ammonium, ils n'ont pas tous localisé leurs anticoagulants dans les mêmes fractions: la gamme des localisations de l'anticoagulant est donc plus étendue dans les précipitations salines que dans les électrophorèses.

Quant aux diathèses par antithrombine, moins nombreuses, elles sont aussi moins bien connues. Il semble d'ailleurs, qu'on rencontre deux sortes d'antithrombines: l'une se comporte comme l'héparine, c'est elle que nous avons observée: l'anticoagulant est alors thermolabile et non adsorbable par le sulfate de baryum. L'autre paraît distincte de l'héparine, c'est celle que *Loeliger et Hers* ont décrite comme thermostable et non adsorbable par le sulfate de baryum. Une hypergammaglobulinémie importante a été notée aussi bien par *Loeliger et Hers* que par nous-mêmes; elle s'accompagnait d'une augmentation des  $\beta$ -globulines dans le cas de *Loeliger et Hers*, d'une augmentation des  $\alpha_2$ -globulines dans nos 2 cas et des  $\beta_2$ -globulines dans notre deuxième cas.

### Summary

We had occasion to detect five circulating antibodies in the blood of our patients, after a year. Two of these anticoagulants belonged to the antithromboplastinogen type, and we have been able to study one of them appearing during chronic evolutive polyarthritis. It was thermostable, non-dialysable, and not absorbed by barium sulfate. Fractionation by electrophoresis and by re-widening has allowed us to locate the gamma-globulins.

Two other anticoagulants had an antithrombin action similar to that of heparin. Studies on same have not progressed, but in the case where they appeared during lupus erythematosus there was high hypergammaglobulinemia.

Finally, we have detected an anticoagulant to anticonvertin type during a case of *Waldenström* macroglobulinemia, and it was localized in the macroglobulins. Comparison of our observations and those gathered from the literature, allows us to reach certain conclusions regarding the protein support of spontaneous anticoagulants.

### Bibliographie

*Favre-Gilly, J.; Thouverez, J. P. et Tournaire Lamicq, X.*: Les pseudogémophilies par anticoagulant du type antithromboplastine ou antithromboplastinogène (Camugli, Lyon 1957).  
– Les Diathèses hémorragiques par anticoagulant du type antithrombine. L'héparinémie spontanée (Doin, Paris 1958).

## Studies on Coagulation Factors in Stored Blood

S. I. DE VRIES, M. T. BOSMAN AND C. M. T. SMIERS  
Amsterdam, Netherlands

The choice between fresh blood and stored blood for the achievement of haemostasis depends mainly on the views on the haemostatic activity of the material, held by clinicians and transfusionists.

A rejection of stored blood will bring about radical changes in the organization of blood banks in hospitals, where major surgery is performed. On a former occasion, we have reported on modifications in the behaviour of coagulation factors in stored blood. Since then we have compared the thromboplastic activity of blood stored in ACD-solution, liquid ACD-plasma and lyophilized plasma, which are suspensions with essential differences (tables I and II).

1. In stored blood the contact between red cells and platelets lasts for the duration of the experiment. A constant liberation of the red cell lipid factor takes place into the supernatant plasma. There is no qualitative difference in the thromboplastic activity of platelet factor 3 and lipid factor from haemolyzed red cells. The influence of the acid anticoagulant in *in vitro* experiments does not seem to play a part.

2. In liquid plasma which has been separated from the red cells 24 hours after the withdrawal of blood, a permanent contact with erythrocytes is lacking. Therefore there is less "lipid factor activity".