

Oldható fibrin vizsgálatára szolgáló eljárás

Kivonat

A találmány tárgya eljárás oldható fibrin vizsgálatára mintában. Az eljárás abban áll, hogy a mintát oldható fibrin iránt erősen fajlagos plazminogén aktivátorral (PA-Fb sp) érintkezésbe hozzák, a mintában az oldható fibrin számot meghatározzák oly módon, hogy az oldható fibrin PA-Fb sp révén való degradálása útján nyert fibrin lebomlási termékek számának és az PA-Fb sp-vel való érintkezésbe hozást megelőzően a mintában lévő alap fibrin lebomlási termékek számának különbségét veszik.

A találmány tárgya továbbá pozitív kontroll a fenti eljárásban való alkalmazásra, amely a kontroll normál plazma in vitro koaguláció aktiválás megindítására rögzépződés létrejötte nélkül kezelt, és a plazma oldható fibrinre fajlagos és/vagy az iránt nagy affinitással bíró plazminogén aktivátorral a vizsgálati mintánál alkalmazottal analóg körülmények mellett érintkezésbe hozott.

A találmány tárgya még fibrin iránt erősen fajlagos plazminogén aktivátor alkalmazása oldható fibrin meghatározására, egy kit oldható fibrin meghatározására, valamint az előbbi eljárás és kit alkalmazása koaguláció aktiválási folyamat változásának nyomonkövetésére, valamint antikoaguláns hatóanyagok hatékonyságának értékelésére.

Jellemező a'ha Ø
F. 1111

Oldható fibrin vizsgálatára szolgáló eljárás

A találmány tárgya eljárás oldható fibrin vizsgálatára sajátos degradációs termékek vérmintából való létrehozásával.

5 Ha koagulálódást aktiválunk, trombin képződik, amely fibrinlerakódások képződésével és oldható fibrin képződésével jár.

A trombin a fibrinogén molekuláról fibrinopeptid A-t választ le, és ezzel olyan fibrin monomerek létrejöttét váltja ki, amelyeken az "A" polimerizációs helyek, amelyek a fibrinogénben maszkírozva voltak, maszkírozatlanná válnak, és ezáltal kölcsönhatás jön létre a fibrin monomer "A" helyei és mind a fibrinogén, mind a fibrin hozzáférhető "a" helyei között.

10 Ezt követően fibrinopeptid B válik szabaddá, miáltal a "B" polimerizációs helyek maszkírozatlanná válnak, ez a fibrin monomer molekula "B" helyei és mind a fibrinogén, mind a fibrin monomerek hozzáférhető "b" helyei közötti kölcsönhatáshoz vezet.

Ha a trombin mennyisége nagyon nagy (in vitro vizsgálatban), a fibrinogén egésze fibrin monomerekké alakul, amelyek azután az "A" helyek "a" helyekkel és a "B" helyek "b" helyekkel való kölcsönhatása révén polimerizálódva fibrin rögöt alkotnak. In vivo azonban

15 lényegesen kevesebb trombin képződik. A fibrin monomerek képződése kevésbé robbanásszerű, és így a fibrin monomerek egy része polimerizálódva fibrint (trombust) képez, és egy további részük hozzáférhető a és b helyekkel bíró fibrinogénnel vagy fibrinogén degradációs termékekkel reagálva oldható fibrint képez, ahol a fibrin monomerek fibrinogénnel

20 kapcsolódnak.

Az oldható fibrint annak érdekében határozzuk meg, hogy vizsgáljuk, vajon fennáll-e egy betegben a koaguláció aktiválás, az oldható fibrin vérben, különösen plazmában való jelenléte az ilyen aktiválás bizonyítéka.

Ez a meghatározás szükségszerű kiegészítője a trombust alkotó fibrin fibrinolízise révén képződő D-dimerek vizsgálatának, amelyek ugyancsak a koaguláció aktiválási folyamat

25 markerei. A D-dimer szám növekszik a plazmában, ha a rög in vivo degradálódik. Ez okból, ha trombus van jelen, és degradáció van folyamatban, a D-dimer szám megnövekszik független attól, hogy a koaguláció fennáll vagy megszűnt; ezzel ellentétesen, az oldható-fibrin szám nem növekszik többé, ha a koaguláció megállt, és fordítottnak, növekszik, ha a koaguláció fennáll.

30 A plazma oldható fibrin tartalmának a D-dimer számmal kapcsolatos sajátos meghatározása így lehetővé teszi:

1. annak meghatározását, hogy a mintavétel időpontjában a betegben jelen van-e koagulációs folyamat;

2. a koagulo-litikus egyensúly kiértékelését; az alap-D-dimer szám a trombus in vivo degradációjának tükröződése; az a D-dimer szám, amelyet trombolitikus szernek a plazmához való adagolása után nyerünk az alap-D-dimerek és a keringésben lévő fibrin degradációjából származó D-dimerek (vagy oldható fibrin) összegét képviselik.

A fibrin meghatározására ismertetett legkorábbi módszerek körébe tartoznak az etanolos vizsgálat (1, 2, 9) vagy a protamin-szulfát vizsgálat (3, 4, 5, 7). Ezek a vizsgálatok azonban nem túlzottan specifikusak (9, 10), és nem nagyon érzékenyek (10). Továbbá, a nagy fibrinogén szám (5 g/l feletti) zavarja az etanolos vizsgálat és a protamin-szulfátos vizsgálat eredményeit. Végül, a protamin-szulfátos vizsgálat eredményeit nehéz interpretálni (6, 8).

Az oldható fibrin meghatározására szolgáló egy további eljárás fibrin monomerekkel szenzitizált vörös vértetek hemagglutinációs eljárásán alapszik, amint azt Largo (11, 12) leírja. Ilyen típusú tesztet árul például a Diagnostica Stago FS tesztként.

Miközben ez az eljárás igen egyszerű, esetenként nem eléggé érzékeny, és különösen szóródott (disszeminált) intravaszkuláris koaguláció diagnosztizálására alkalmas. A módszer azonban nem alkalmas kisebb mennyiségű oldható fibrin kimutatására (helyi trombózisok, antikoaguláns hatóanyagok hatékonyságának vizsgálatára).

Napjainkban további olyan vizsgálati eljárások ismeretesek oldható fibrin meghatározására, amelyek monoklonális antitest alkalmazásán alapszanak, maszkírozatlan epitópokat mutatnak ki fibrinben, és maszkírozott epitópokat fibrinogénben vagy fibrin vagy fibrinogén degradációs termékeket mutatnak ki (13-14). A monoklonális antitestek alkalmazásával végzett közvetlen vizsgálatok azonban olyan oldható-fibrin számokat eredményeznek, amelyek a kereskedelmi forgalomból beszerzett antitesttől függően változóak.

A beteg koagulo-litikus egyensúlyának meghatározására olyan megközelítést javaslunk, amely a technika állása szerintiektől eltérő, és különösen egyszerű és gyors. A módszer érzékenyebb, mint az előzőekben leírt hemagglutinációs eljárás. Előnyös a monoklonális antitestek alkalmazásával járó módszerekhez viszonyítva is, előnye abban áll, hogy ugyanazt a módszert alkalmazzuk a keringő (oldható) fibrin kimutatására, mint az in vivo már degradálódott fibrinére, így a koagulo-litikus egyensúly igen pontos értékelését adjuk.

A találmány szerinti eljárással a mintában jelenlévő oldható fibrint oldható fibrin degradációs termékek létrehozása után mérjük, a mintának fibrin iránt erősen specifikus plazminogén aktivátorral (PA-Fb sp) való inkubálása során. Az oldható fibrin PA-Fb sp révén való degradációjának lebomlási termékei száma és az alap fibrin degradációs termékeinek

száma közötti különbség a mintának a PA-Fb sp-vel való érintkezésbe hozását megelőzően mérve, lehetővé teszi a mintában lévő plazmatikus oldható-fibrin szám mérését.

Így a találmány eljárást nyújt oldható fibrin biológiai mintában való mérésére, amelynek során az említett mintát fibrin iránt nagy affinitással bíró plazminogén aktivátorral (PA-Fb sp) hozzuk érintkezésbe, és meghatározzuk az említett minta oldható-fibrin számát oly módon, hogy mérjük az PA-Fb sp alkalmazásával degradált oldható fibrin lebomlási termékeinek számát, valamint a PA-Fb sp-vel való érintkezésbe hozást megelőzően meghatározzuk a mintából a fibrin degradációs termékek alapszámát.

Az oldható fibrin biológiai mintában való találmány szerinti vizsgálata az alábbi lépésekből áll:

- meghatározzuk a fibrin lebomlási termékeket a plazma mintában,
- a vérmintát fibrin iránt erősen fajlagos plazminogén aktivátorral (PA-Fb sp) hozzuk érintkezésbe olyan körülmények mellett, amelyeknél a mintában lévő oldható fibrin lebomlási termékekké degradálódik;
- meghatározzuk a PA-Fb sp-vel inkubált mintában lévő fibrin lebomlási termékeket,
- meghatározzuk az oldható fibrint, ami a PA-Fb sp-vel történt inkubálás után meghatározott fibrin lebomlási termékek számának és a kezeletlen mintából meghatározott fibrin lebomlási termékek számának különbsége.

A lebomlási termékek vizsgálatára alkalmas reagenst úgy választjuk meg, hogy a lebomlási termékek egy adott csoportját mérjük. Például, az antitesteket bizonyos adott típusú lebomlási termékekre fajlagos szettel határozzunk meg.

A biológiai minta előnyösen biológiai folyadék, például vér- vagy plazmaminta vagy váladék.

A találmány tárgyát képezi fibrin iránt erősen fajlagos plazminogén aktivátor alkalmazása (például olyané, amely a plazminogént csak fibrinben aktiválja) oldható fibrin meghatározási eljárásában specifikus lebomlási termékek létrehozása révén. A találmány tárgyát képezi egy kit is az előzőekben ismertetett eljárás végrehajtására.

Számos plazminogén aktivátor ismeretes. Egyesek azonban mind a fibrinogént, mind a fibrint lebontják, ilyenek a sztreptokináz és urokináz (15). Ezek a vegyületek nem alkalmasak a találmány szerinti eljárásban, mivel a fibrinogén degradálódását okozzák, és így fibrinogén lebomlási termékeket hoznak létre, amelyek megzavarják a fibrin degradációjából származó lebomlási termékek meghatározását.

A plazminogén aktivátorok egy második csoportját az olyan vegyületek képezik, amelyeket mint fibrin degradációban fibrinogén degradációhoz hasonlítva erősen fajlagosakat írnak le. A találmány szerinti eljárásban előnyösen használjuk ki a vegyületek e második csoportjának fajlagosságát.

5 A szakirodalomban különféle ilyen fajlagossággal (PA-Fb sp) bíró vegyületeket ismertettek. Ilyen vegyületek ismert példáiként említjük az alábbiakat:

- szövet plazminogén aktivátor (t-PA) vagy származékai, például TNK-tPA, amely fibrin iránt erősen fajlagos t-PA mutáns (16);
- a Desmodus rotundus nyálból származó aktivátor (bat-tPA vagy vPA = vámpír denevér nyál plazminogén aktivátor) vagy származékai: DSPA-k = Desmodus rotundus nyál PA-k, FEKP = DSPA alfa 1 és alfa 2, EKP = DSPA béta, KP = DSPA gamma, (17);
- Stafilokináz (SAK) a Staphylococcus aureus (18-19) vagy valamely mutánsa (20) által kiválasztott polipeptid.

15 A találmány szerinti eljárást előnyösen plazma mintán hajtjuk végre. Az oldható-fibrin számot a PA-Fb sp hatására létrejövő lebomlási termékek mérésével határozzuk meg. Kívánt esetben az eljárást pozitív kontroll alkalmazásával hitelesítjük, amelyet nyomnyi trombinnal kezelt normál plazma alkalmazásával nyerünk, a nyomnyi mennyiségű trombin az oldható fibrin képződéséért felelős koaguláció aktiválást indukálja anélkül, hogy rögzképződés következne be.

20 Pozitív plazma kontroll nyerésére a plazmát először trombinnal vagy más koaguláció aktivátorral inkubáljuk egy időtartamon át. A megindult koagulációs folyamatot azután aktivátor inhibitorral blokkoljuk, hogy megakadályozzuk az annak folytatásából adódó reakciót. Ha az aktivátor trombin, inkubátorként például hirudint vagy heparint alkalmazunk.

A plazma inkubálás időtartamát és a koaguláció aktivátor és a blokkoló inhibitor koncentrációit előnyösen úgy választjuk meg, hogy a rögzképződés bekövetkeztét megelőző valamennyi koagulációs aktiválási lépés bekövetkezzon.

A koaguláció aktivátor (trombin) jelenlétében végrehajtott inkubálást előnyösen szobahőmérsékleten 2 perces inkubációs időtartamon át folytatjuk. Ezután a koaguláció blokkolására az inhibitort nagy feleslegben adagoljuk.

30 - Ha hirudint alkalmazunk, előnyösen egy végső 0,18 E/ml trombin-koncentráció elérésére a hirudint 100 µg/ml végkoncentrációban alkalmazzuk.

- Heparin alkalmazása esetén ezt 0,18 E/ml végső trombin-koncentráció esetén 500 E/ml végkoncentrációval használjuk.

Az oldható fibrin találmány szerinti meghatározásában első lépésként PA-Fb sp alkalmazásával az oldható fibrint degradáljuk, majd mérjük a PA-Fb sp hatására képződött specifikus lebomlási termékeket.

Fontos, hogy a találmány szerinti eljárás eredményeit olyan gyorsan kapjuk meg, amilyen gyorsan csak lehetséges, és emellett az a mintában jelenlévő oldható fibrin mennyiségét képviselje. Ebből a célból a PA-Fb sp alkalmazásának körülményeit úgy kell meghatározni, hogy az oldható fibrin degradálódása gyors legyen, és így ne kísérje a keringő plazma fibrinogén "szennyező" degradálódása, ami a vizsgálatban részt vevő oldható fibrinből származó lebomlási termékek értékelését befolyásolná.

A PA-Fb sp dózisait úgy választjuk meg, hogy a pozitív kontrollban lévő fibrin lebomlási termékek számának legnagyobb növekedését váltsa ki, és egyidejűleg gyakorlatilag 0 növekedést a negatív kontrollokban (azaz a koaguláció aktivátorral nem kezelt kontrollban).

A találmány összefüggésében különböző, specifikus fibrin lebomlást biztosító fibrinolízis aktivátorok alkalmazhatók. Előnyösen a PA-Fb sp-t az aktivátorok előzőekben említett csoportjából választjuk, nevezetesen tPA vagy származékai, VPA vagy származékai és stafilokináz vagy mutánsai. Előnyösen tPA-t vagy stafilokinázt alkalmazunk, még előnyösebben tPA-t.

Ha a mintát 15 percen át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk, 1-12 µg/ml stafilokináz végkoncentrációt alkalmazunk. A végső megőrzött koncentráció 10 µg/ml. Az inkubációs időtartam módosítható, variációi az alkalmazott PA-Fb sp természetétől és koncentrációjától függőek.

A tPA-t előnyösen 1-2,5 µg/ml végkoncentrációban, előnyösen 2 µg/ml koncentrációban alkalmazzuk.

Különböző, specifikusan kimutatható oldható fibrin lebomlási termékek léteznek. Egy előnyös megvalósítási mód szerint mérjük a PA-Fb sp oldható fibrinre való hatásából származó D-dimer számot, azaz kiértékeljük a PA-Fb sp hatására az oldható fibrinből származó D-dimerek koncentrációját (D-dimerek az a PA-Fb sp hatása után – alap D-dimerek a PA-Fb sp hatását megelőzően).

Az oldható fibrin PA-Fb sp jelenlétében történő degradációjából származó D-dimerek rutin vizsgálati eljárásokkal, például ELISA típusú eljárásokkal, latex gyöngy agglutinációs szenzitív módszerekkel, immunkromatográfiai módszerekkel, stb. határozhatók meg. A kereskedelmi forgalomban kapható különböző D-dimer vizsgálati tesztek körében példaként

említhetjük az ASSERACHROM D-Di vagy STA LIATEST D-Di teszteket, mindkettő a Diagnostica Stago gyártmánya. A találmány összefüggésében azonban az ASSERACHROM D-Di-től származó ELISA teszt alkalmazásának körülményeit előnyösen úgy módosítjuk, hogy lerövidítjük a tesztet (15 perc inkubálás immobilizált antitesttel és 15 perc peroxidázzal jelzett antitesttel).

A DD/E fragmentum mellett más fibrin lebomlási termékek is léteznek, például az YD/DY, YD/DXD komplexek, ezek is kiértékelhetők.

Amint azt a következő példákban bemutatjuk (lásd a 3. példában), a találmány szerinti eljárás végrehajtható olyan koaguláció aktiválással bíró betegeknél, akiknél még nem kezdtek meg terápiát, vagy antikoagulációs kezelés során vagy az antikoagulációs terápia befejezését követően. Az eljárás nemcsak a koaguláció aktiválás folyamatának változását teszi értékelhetővé, különösen a koaguláció aktiválás diagnózisa tekintetében, hanem valamely antikoaguláns kezelés hatékonyságának értékelését is lehetővé teszi.

Egy további szempontját tekintve a találmány olyan kitre vonatkozik, amely valamely mintában lévő oldható fibrin dózisának vizsgálatára szolgál, a kitre jellemző, hogy összetevői:

- az előzőekben leírt módon előállított pozitív kontroll oldható fibrin jelenlétének kimutatására;
- negatív kontroll, amelyre kontroll plazma szolgál;
- PA-Fb sp egyedi mennyiségekben egy mintához vagy több mintához elegendő mennyiségben;
- D-dimerek vizsgálatára szolgáló reagens;
- adott esetben a minták hígítására szolgáló puffer, például pH = 7,4-es foszfát-puffer, amely 0,1 % magzati borjúsérumot és 0,05 % Tween 20-t tartalmaz.

A pozitív és negatív plazma kontrollokat előnyösen fagyasztva-szárítjuk.

Az előnyös PA-Fb sp a tPA.

A D-dimereket például ELISA típusú eljárással határozzuk meg, például ASSERACHROM D-Di alkalmazásával vagy latex részecske agglutinációra érzékeny tesztre szolgáló reagenssel, például STA LIATEST D-Di-vel, mindkét teszt a Diagnostika Stago terméke.

A következőkben a találmányt példákban mutatjuk be.

1. Példa

Oldató fibrint tartalmazó pozitív plazma kontroll nyeréséhez szükséges trombin koncentráció megválasztása

Pozitív plazma kontrollt készítünk az alábbiak szerint:

Normál plazma 300 µl

Humán trombin (Stago, ref. 00896), 2 E/ml 30 µl

Inkubálás laboratóriumi hőmérsékleten 2 percig

5 Hirudin (Knoll) 100 µg/ml (végkoncentráció)

vagy Heparin (Choay) 500 E/ml (végkoncentráció)

Ellenőrizzük, hogy

- a csőben nincs rögzépződés,
- a kereskedelmi forgalomban kapható oldható fibrin meghatározási teszt pozitív (például FS teszt, Stago).

10

Az I. táblázatban bemutatott módon két lehetőséget tarthatunk meg.

I. Táblázat

I-A: A 2. csövet tartjuk meg.

A cső száma	1.	2.	3.	4.
Citráttal kezelt normál plazma	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Trombin	30 µl, 4 E/ml	30µl, 2 E/ml	30µl, 1 E/ml	30µl, 0,5 E/ml
	Inkubálás környezeti hőmérsékleten 2 percig			
Rög jelenléte	+	-	-	-
Heparin vagy hirudin	500 egység 100 µg	500 egység 100 µg	500 egység 100 µg	500 egység 100 µg

I-B: A 3. csövet tartjuk meg.

A cső száma	1.	2.	3.	4.
Citráttal kezelt normál plazma	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Trombin	30 µl, 4 E/ml	30µl, 2 E/ml	30µl, 1 E/ml	30µl, 0,5 E/ml
	Inkubálás környezeti hőmérsékleten 10-15 percig			
Rög jelenléte	+	+	-	-
Heparin vagy hirudin	500 egység 100 µg	500 egység 100 µg	500 egység 100 µg	500 egység 100 µg

2. Példa

Meghatározott inkubálási körülmények mellett alkalmazandó PA-Fb sp mennyiség meghatározása

5 A találmány megvalósításához az szükséges, hogy olyan mennyiségű aktivátort adjunk a mintába, amely jelentős D-dimer képződést indukál a pozitív kontroll plazmában, mint az 1. példa szerint kapott, és jelentéktelen D-dimer képződést indukál a negatív plazma kontrollban (trombinnal nem kezelt kontroll).

10 A kontroll plazmák és a pozitív kontroll plazmák (n=21) inkubálását 15 percen át 37 °C hőmérsékleten végezzük különböző dózisú PA-Fb sp alkalmazásával. Az inkubációs időszak végén a D-dimereket Liatest vagy gyors ELISA (D-Di Stago) alkalmazásával határozzuk meg (inkubálás 15 percig 37 °C hőmérsékleten befogó antitestekkel és 15 percig 37 °C hőmérsékleten megjelenítő antitestekkel). A I. táblázatban bemutatott eredményeket ELISA teszt alkalmazásával nyertük.

15 Lényegében analóg eredményeket nyertünk Liatest alkalmazásával is (n=5).

II. Táblázat

Oldható fibrin degradálódása növekvő mennyiségű t-Pa és SAK alkalmazásával

	D-dimerek (ng/ml)		Oldható fibrin (ng/ml)	
	Negatív kontroll	Pozitív kontroll (trombinnal kezelt)	Negatív kontroll	Pozitív kontroll trombinnal kezelt
PA-Fb sp adagolás nélkül	375	375		
Stafilokináz				
10 µg/ml	400	1750	<50	1375
2 µg/ml	390	1615	<50	1225
1,5 µg/ml	375	1700	<50	1325
1 µg/ml	350	1657	<50	1305
0,5 µg/ml	410	1125	<50	715
t-PA				
2 µg/ml	350	1790	<50	1415
1 µg/ml	360	1420	<50	1045
0,5 µg/ml	360	1210	<50	835

A megválasztott PA-Fb sp dózis az a mennyiség, amely

- a kezeletlen kontroll plazmákban (negatív kontrollok) 300 ng/ml alatti növekedést indukál,
- a pozitív kontroll plazmákban a legnagyobb növekedést indukálja.

5 Ezekből az eredményekből úgy tűnik, hogy az alkalmazott PA-Fb sp előnyös végső koncentrációi:

- 2 µg/ml t-PA esetén: ezen körülmények mellett a t-PA-nak az a dózisa, amely PAI-
-val neutralizálható, elhanyagolható;
- 10 µg/ml SAK (alacsonyabb SAK dózisok egyes betegek vagy bizonyos pozitív
10 kontrollok esetén az oldható fibrin gyenge degradálódását okozzák, valószínűleg a
mintában lévő anti-stafilokináz jelenléte folytán, amely anti-stafilokináz
staphylococcus fertőzés eredményének tűnik).

3. Példa

15 **Egészséges önkéntesekkel és (D-dimerek gyarapodása folytán) feltételezett koaguláció aktiválással bíró betegekben kapott eredmények**

Az eljárást az előzőekben leírtak szerint 2 plazma mintán végezzük, a plazmákat 15 percig 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk 2 µg/ml t-PA vagy 10 µg/ml SAK jelenlétében.

A képződött D-dimereket az előzőekben ismertetett ELISA teszt alkalmazásával vizsgáljuk.

20 **A. Egészséges önkéntesekkel kapott eredmények**

III. Táblázat

	S.F. (ng/ml)
Kontroll plazmák + t-PA (n = 21)	147 ± 100 ng/ml
Kontroll plazmák + IIa + t-PA (n = 21)	2128 ± 1219 ng/ml (szélső értékek: 742-3660)
Kontroll plazmák + SAK (n = 11)	64 ± 82 ng/ml (szélső értékek: 0-215)
Kontroll plazmák + IIa + SAK (n = 11)	1700 ± 1880 ng/ml (szélső értékek: 250-5000)

B. Emelkedett D-dimer számmal bíró betegekkel kapott eredmények (a vizsgálatot gyors ELISA alkalmazásával végeztük).

IV. Táblázat

Vizsgálataink szerinti példák:

	D-dimer szám t-PA adagolás után (ng/ml)	D-dimer szám t-PA adagolás előtt (ng/ml)	Oldható-fibrin szám (ng/ml)
1. csoportba tartozó beteg	5420	510	4910
2. csoportba tartozó beteg	1316	1234	82
3. csoportba tartozó beteg	30162	20699	9463

5

KÖVETKEZTETÉSEK:

A találmány szerinti eljárással a betegeket oldható fibrin és D-dimer plazma számuk alapján 3 csoportba oszthatjuk. Az egyes csoportok jellemzőit az alábbi V. táblázatban mutatjuk be:

10

V. Táblázat

	Oldható fibrin (ng/ml)	D-dimerek (ng/ml)	Következtetés
1. csoport	>500	+/-	Röggképződés, amely rög még nem degradálódott
2. csoport	<300	+ /+++	Trombus jelenléte, de a koaguláció már leállt
3. csoport	>500	+++	A koaguláció fennáll, rög degradációval kapcsolatos

Amint azt az előzőekben bemutattuk, a találmány szerinti eljárás nem csak a koaguláció aktiválási folyamat változásának követését teszi lehetővé, de valamely antikoaguláns hatóanyag hatékonyságát is értékelhetővé teszi, és alkalmas annak megállapítására, hogy a hatóanyag adagolás megszüntetése reaktiválja-e a koagulációt.

15

1. csoport: korai koaguláció aktiválódás az oldható fibrin mennyiségének növekedésével, a D-dimerek mennyiségének növekedése nélkül.

2. csoport: betegek, akiknél a koaguláció aktiválás megszűnt (hatékony gyógyszer), de a már létrejött trombus degradációja folytatódik (normális oldható-fibrin szám, emelkedett D-dimer szám).
3. csoport: koaguláció aktiválást mutató betegek, akiknél in vivo rög degradáció folyik (az oldható fibrin és a D-dimerek egyidejű emelkedett értéke): a gyógyszer nem eléggé hatékony.

4. Példa

Az alkalmazott megoldás összegzése:

Reagensek:

pH 7,4-es puffer

tisztított humán trombin (Stago, ref. 00896)

t-PA (Boehringer)

Aprotinin. Az oldatot 4 °C-on tároljuk.

D-dimer kit.

Az alkalmazott eljárást a VI. táblázatban összegezzük.

VI. Táblázat

Oldható fibrin vizsgálatára alkalmazott eljárás D-dimer képződés révén

Plazma	200
t-PA (20 µg/ml) (végkoncentráció 2 µg/ml)	20
37 °C hőmérsékleten tartjuk 15 percig	
Aprotinin	20
Hígított minta az alap D-dimerek függvényében (1/20-1/1000)	
Asserachrom D-Di lemez	
Hígított minta	200
A lyukakat lefedjük, és 15 percig 37 °C hőmérsékleten tartjuk	
Mosás háromszor	
Peroxidázzal jelzett humán anti-D fragmentum	200
A lyukakat fedjük, és 15 percig 37 °C hőmérsékleten tartjuk	
Háromszor mossuk	
OPD/H ₂ O ₂ szubsztrát	200
Minden mintánál pontosan 3 percet várunk, majd az alábbiakat adagoljuk:	
3 mol/liter H ₂ SO ₄ vagy	50
1 mol/liter HCl	100
Az abszorpciót 492 nm-nél mérjük	

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. GODAL, H. C.; ABILGAARD, U.: "Gelation of soluble fibrin in plasma by ethanol". Scand. J. Haematol., 3, 342-350, (1966).
- 5 2. BREEN, F. A.; TULLIS, J. L.: "Ethanol gelation: a rapid screening test for intravascular coagulation" Ann. Intern. Med., 69, 1197-1206, (1968).
3. LIPINSKI, B.; WOROWSKI, K.: "Detection of soluble fibrin monomer complexes in blood by means of protamine sulphate test". Thromb. Diath. Haemorrh., 20, 44-49, (1968).
- 10 4. SEAMAN, A. J.: "The recognition of intravascular dotting. The plasma protamine paracoagulation test". Arch. Intern. Med., 125, 1016-1021, (1970).
5. LATALLO, Z. S.; WEGRZYNOWICZ, S.; BUDZUNKI, A. Z.: "Effect of protamine sulphate on the solubility of fibrinogen, its derivatives and other plasma proteins". Scand. J. Haematol., suppl., 13, 151-162, (1971).
- 15 6. MUSUMECI, V. : "Ethanol gelation test and protamine sulphate test in diagnosis of intravascular coagulation". Scand. J. Haematol., suppl. 13, 197-202, (1971).
7. NIEWIAROWSKI, S.; GUREWICH, V.: "Laboratory identification of coagulation. The serial dilution protamine sulfate test for the detection of fibrin monomer and fibrin degradation products". J. Lab. Clin. Med., 77, 665-676, (1971).
- 20 8. KIDDER, W. R.; LOGAN, L. J.; RAPAPORT, S. I.; PATCH, M. J.: "The plasma protamine paracoagulation test – Clinical and laboratory evaluation". A. J. C. P., 58, 675-686, (1972).
9. GUREWICH, V.; LIPINSKI, B.; LIPINSKA, I.: "A comparative study of precipitation and paracoagulation by protamine sulphate and ethanol gelation tests". Thromb. Res., 2, 539-556, (1973).
- 25 10. GERRITS, W. B. J.; PRAKKE, E. M.; VAN DER MEER, J.; VREEKEN, J.: "Causes of a negative ethanol gelation test in diffuse intravascular coagulation". Thromb. Diath. Haemorrh., 31, 299-308, (1974).
- 30 11. LARGO, R.; HELLER, V.; STRAUB, P. W.: "Detection of soluble intermediates of the fibrinogen-fibrin conversion using erythrocytes coated with fibrin monomers". Blood, 47, 991-1002, (1976).

12. SORIA, J.; SORIA, C.; DE RODRIGUEZ, S.; HORELLOU, M. H.; SAMAMA, M.; BILSKI-PASQUIER, G.: "Recherche des complexes solubles de fibrine par un test d'héماغglutination – Applications cliniques". Presse Méd., 6, (43), 4045-4048, (1977).
- 5 13. DEMPFLER, C. E.; DOLLMAN, M.; LILL, H.; PUZZOVIO, D.; DESSAUER, A.; HEENE, D. L.: "Binding of a new monoclonal antibody against N-terminal heptapeptide of fibrin alphachain to fibrin polymerization site "A": effects of fibrinogen and fibrinogen derivatives, and pretreatment of samples with NaSCN. Blood Coagul. Fibrinolysis, 4, 79-86, (1993).
- 10 14. SOE, G.; KOHNO, I.; INUZUKA, K.; ITOH, Y.; MATSUDA, M.: "A monoclonal antibody that recognizes a neo-antigen exposed in the E domain of fibrin monomer complexed with fibrinogen or its derivatives : its application to the measurement of soluble fibrin in plasma. Blood, 88, 2109-2117, (1996).
- 15 15. GUREWICH, V.; HYDE, E.; LIPINSKI, B.: "The resistance of fibrinogen and soluble fibrin monomer in blood to degradation by a potent plasminogen activator derived from cadaver limbs". Blood, 46, 555-565, (1975).
- 20 16. CANNON, C. P.; GIBSON, C. M.; MCCABE, C. H.; ADGEY, A. A.; SCHWEIGER, M. J.; SEQUEIRA, R. F.; GROLLIER, G.; GIUGLIANO, R. P.; FREY, M.; MUELLER, H. S.; STEINGART, R. M.; WEAVER, W. D.; VAN DE WERF, F.; BRAUNWALD, E.: "TNK-tissue plasminogen activator compared with front-loaded alteplase in acute myocardial infarction results of the TIMI 10B trial". Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 10B Investigators, Circulation 98, (25), 2805-14, (1998).
- 25 17. BRINGMANN, P.; GRUBER, D.; LIESE, A.; TOSCHI, L.; KRATZCHMAR, J.; SCHLEUNING, W. D.; DONNER, P.: "Structural features mediating fibrin selectivity of vampire bat plasminogen activators". J Biol Chem, 270, 25596-603, (1995).
- 30 18. COLLEN, D.: "Staphylokinase: a potent, uniquely fibrin-selective thrombolytic agent". Nat. Med., 4, 279-84, (1998).
19. SAKHAROV, D. V.; BARRERTT-BERGSHOEFF, M.; HEKKENBERG, R. T.; RIJKEN, D. C.: "Fibrin-specificity of a plasminogen activator affects the efficiency of fibrinolysis and responsiveness to ultrasound: comparison of nine plasminogen activators in vitro". Thromb Haemos, 81, 605-12, (1999).

20. COLLEN, D.; BERNAERTS, R.; DECLERCK, P.; DE COCK, F.; DEMARSIN, E.; JENNE, S.; LAROCHE, Y.; LIJNEN, H. R.; SILENCE, K.; VERSTREKEN, M.: "Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. I: Construction and characterization". *Circulation*, 94, 197-206, (1996).

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás oldható-fibrin vizsgálatára mintában, **azzal jellemezve**, hogy a mintát oldható fibrin iránt erősen fajlagos plazminogén aktivátorral (PA-Fb sp) érintkezésbe hozzuk, a
5 mintában az oldható-fibrin számot meghatározzuk oly módon, hogy az oldható fibrin PA-Fb sp révén való degradálása útján nyert fibrin lebomlási termékek számának és az PA-Fb sp-vel való érintkezésbe hozást megelőzően a mintában lévő alap fibrin lebomlási termékek számának különbségét vesszük.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a fibrin lebomlási termékeket D-dimerekként mérjük.
10
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az oldható fibrin iránt erősen fajlagos plazminogén aktivátor (PA-Fb sp) fibrinre fajlagos.
4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy PA-Fb sp-ként az alábbiak körébe tartozó anyagokat alkalmazunk: t-PA és származékai, VPA vagy származékai, stafilokináz vagy mutánsai.
15
5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy PA-Fb sp-ként t-PA-t vagy stafilokinázt alkalmazunk.
6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy vérmintaként plazmát alkalmazunk.
7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a fibrin lebomlási termékeket ELISA vagy LIATEST típusú eljárásokkal vizsgáljuk.
20
8. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a vizsgálati mintát 15 percig 37 °C hőmérsékleten PA-Fb sp jelenlétében inkubáljuk.
9. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy PA-Fb sp-
25 -ként 2 µg/ml minta végkoncentrációban lévő t-PA-t alkalmazunk.
10. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy PA-Fb sp-ként az alábbi körbe tartozó anyagot alkalmazunk: stafilokináz, denevér-t-PA, VPA, DSPA-k, FEKP, EKP és KP.
11. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy PA-Fb sp-
30 -ként stafilokinázt alkalmazunk 10 µg/ml minta végkoncentrációban.

12. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az oldható fibrin PA-Fb sp aktiválásból származó lebomlási termékeinek számát pozitív kontrollhoz viszonyítva határozzuk meg.

13. A 11. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy pozitív kontrollt olyan normál plazmából készítünk, amelyet in vitro a koagulációs aktiválás kiváltására rögzépződés bekövetkezése nélkül kezeltünk.

14. Pozitív kontroll az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti eljárásban való alkalmazásra, amely a kontroll normál plazma in vitro koaguláció aktiválás megindítására rögzépződés létrejötte nélkül kezelt, és a plazma oldható fibrinre fajlagos és/vagy az iránt nagy affinitással bíró plazminogén aktivátorral a vizsgálati mintánál alkalmazottal analóg körülmények mellett érintkezésbe hozott.

15. Fibrin iránt nagy affinitással bíró plazminogén aktivátor (PA-Fb sp) alkalmazása oldható fibrin vizsgálatára specifikus lebomlási termékek létrehozásával.

16. A 15. igénypont szerinti alkalmazás, amelynél a fibrin lebomlási termékei D-dimerek.

17. A 15. igénypont szerinti alkalmazás, amelynél PA-Fb sp-ként az alábbi körbe tartozó anyagot alkalmazunk: t-PA és származékai, VPA és származékai, stafilokináz vagy mutánsai.

18. A 15. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben PA-Fb sp-ként t-PA-t vagy stafilokinázt alkalmazunk.

19. Kit oldható fibrin mintában való vizsgálatára, **azzal jellemezve**, hogy összetevői:

- oldható fibrin jelenlétének kimutatására szolgáló pozitív kontroll,
- kontroll plazma által képviselt negatív kontroll,
- PA-Fb sp egyetlen mintához szolgáló egyedi mennyiségekben vagy több mintához szolgáló mennyiségekben;
- D-dimerek vizsgálatára szolgáló reagens, és
- adott esetben a minta hígítására szolgáló puffer.

20. A 19. igénypont szerinti kit, **azzal jellemezve**, hogy a pozitív és negatív kontroll plazmái fagyasztva-száritott formájúak.

21. A 19. igénypont szerinti kit, **azzal jellemezve**, hogy PA-Fb sp-ként t-PA-t tartalmaz.

22. A 19. igénypont szerinti kit, **azzal jellemezve**, hogy a D-dimerek vizsgálatára szolgáló reagens ELISA vagy LIATEST típusú reagens szenzitizált latex részecske agglutinációs teszthez.

5 23. Az 1-12. igénypontok szerinti eljárás vagy a 19-22. igénypontok szerinti kit alkalmazása koaguláció aktiválási folyamat változásának nyomonkövetésére, valamint antikoaguláns hatóanyagok hatékonyságának értékelésére.

A meghatalmazott:

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft
Válas Györgyné dr.
szabadalmi ügyvivő

17 oldal
Zenna