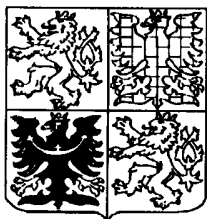


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA
VYNÁLEZU

(12)

(22) 12.05.93

(32) 15.05.92

(31) 92/999

(33) AT

(40) 16.02.94

(21) 878-93

(13) A3

5(51)

G 01 N 33/50

G 01 N 33/86

G 01 N 33/49

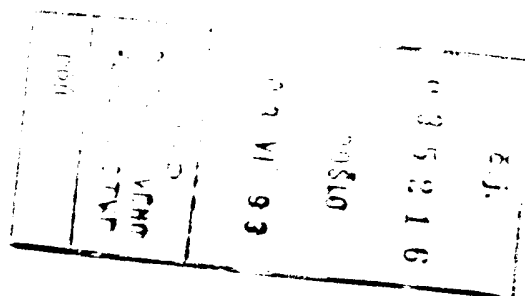
(71) IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT, Wien, AT;

(72) Lang Hartmut dr., Wien, AT;
Moritz Berta dr., Wien, AT;

(54) Způsob stanovení fibrinogenu

(57) Způsob stanovení fibrinogenu enzymatickou přeměnou trombinem fragmenty protrombinu s trombinovou aktivitou nebo směsí těchto látek při pH od 4 do 7,3, případně v pufru s molaritou tlumících solí od 0,02 do 0,5 M a následujících detekcí vzniklého fibrinu popřípadě štěpných fragmentů fibrinogenu stanovením doby srážení nebo štěpných produktů fibrinogenu. Stanovení fibrinogenu se provádí se zředěného vzorku plazmy. Činidlo pro stanovení fibrinogenu obsahující trombin, protrombinové fragmenty s trombinovou aktivitou nebo směsí těchto látek.

Způsob stanovení fibrinogenu



Oblast techniky

Vynález se týká způsobu stanovení fibrinogenu enzymatickou reakcí s trombinem, protrombinovými fragmenty s "thrombin like activity" nebo směsí těchto látek a potom detekcí vzniklého fibrinu popř. štěpných produktů fibrinogenu. Dále vynález zahrnuje činidlo pro stanovení obsahu fibrinogenu v popřípadě neředitelném a popřípadě také heparinobsahujícím vzorku plasmy.

Dosavadní stav techniky

Stanovení fibrinogenu v plasmě má velký význam v rámci výzkumu poruch srážení. Pro stanovení fibrinogenu jsou známy jak imunologické tak také funkční metody, jako např. testy srážení. Při testech srážení se stanoví obsah fibrinogenu měřením času, kdy se vytvoří sraženina.

Běžnou metodu stanovení popsal Clauss (Acta Haemat. 17, 237-246, 1957). Oxalátová plasma se zředí v pufru o pH 7,4 a přidá se koncentrovaný trombinový roztok. Na závěr se stanoví doba až do bodu srážení. Doba srážení vzorku plasmy, který reagoval s trombinem je ale úměrná obsahu fibrinogenu jen tehdy, když byl zvolen dostatečně velký přebytek trombinu k plasmě, aby byly překryty plasmové rušivé faktory. Za rušivý faktor je považován antitrombin III (AT III), který především spolu s heparinem účinně potlačuje působení trombinu. Heparin je obvyklé antikoagulační činidlo a používá se jako přísada při odběru krve nebo jako terapeutikum. Obsah heparinu ve vzorku plasmy může vést k prodlouženým dobám srážení a tak k nesprávnému výsledku.

Působení antitrombinu III v plasmě zde bude díky vysoké koncentraci trombinu a díky zředění plasmy a tím díky snížení koncentrací AT III popř. heparinu silně sníženo. Jestliže se plasma nebude ředit, je působení antitrombinu několikrát silnější a doba srážení se prodlužuje.

Zředění plasmy a s tím spojený další stupeň zpracování znamená při rutinních pokusech značné zatížení. Vedle vyšších pracovních nákladů a dalšího nutného zpracování potenciálně infekční plasmy je každé ředění zásadním zdrojem chyb. Mimoto musí být ředění často provedeno tak, aby odpovídalo obsahu fibrinogenu, což ztěžuje práce s automatickými analyzátory.

Obvykle se ředění plasmy provádí za použití veronalového pufru, protože tento pufr usnadňuje tvorbu měřitelných fibrinových sraženin, což zejména u plasmy s nízkým obsahem fibrinogenu usnadňuje stanovení. Veronal je ale současně také narkotikum s návykovým charakterem, čímž je používání této substance značně ztíženo.

Další pokusy o vyřazení rušivého faktoru antitrombinu III popř. heparinu, zahrnují neutralizaci popř. odstranění heparinu. V *Clinical Chemistry* 29, 614-617 (1983) je popsán způsob, podle kterého se heparin ve vzorku plasmy neutralizuje přidávkou polybrenu, Plasma se zředí v pufru o pH 7,4 a po přidávku trombinu se přenesou do fotometru. Potom se nefelometricky stanoví reakční rychlost.

Po přidávku enzymů hadího ječtu s účinností podobnou trombinu (batroxobin) místo trombinu, může být fibrinogen v plasmě stanoven nezávisle na rušivých uvedených faktorech. Tyto enzymy hadího ječtu nejsou zejména inhibovány ATIII popř. heparinem.

Použití proteinů, které nejsou považovány za přirozené srážecí enzymy, jako např. enzymy hadích jedů, ve způsobu stanovení lidských proteinů je problematické. Reakce mezi enzymem zvířete, kterým není savec a lidským proteinem jsou často nespecifické. V soulasu s principem biochemické analytiky, porovnávat a zkoumat jen stejné se stejným, je snaha o to, používat pro stanovení lidských proteinů rovněž jen enzymy savců a mezi jinými lidské enzymy jako reakčního partnera.

Trombin může být vyroben aktivací protrombinu. Jako mezistupně vznikají během aktivace meizotrombinu (MT) a meizotrombin (desF1). Dvojřetecové trombinové meziprodukty ale vykazují za přítomnosti protrombinu proteázovou aktivitu, která je podobná aktivitě trombinu ("thrombin like activity"). Jsou tedy schopny popřípadě štěpit substráty, které by mohly být přeměněny trombinem. "Thrombin like activity" je také proteázová aktivita, která umožňuje štěpit trombinové substráty, jejichž reakční kinetika a reakční parametry, jako pH- nebo optima iontové síly, inhibitory, efektory, alosterické vedlejší působení atd. nemusí bezpodmíněčně být shodné s těmito parametry pro trombin.

Aktivita nově zjištěného enzymu meizotrombinu, meizotrombinu (desF1) a trombinu ^{byly} porovnány v J.of Biol.Chemistry 265, 10693-10701 (1990) při hodnotě pH 7,4. Meizotrombin vykazuje jen 2% "fibrinogen clotting activity" trombinu. Tato snížená aktivita může však také opět být 10 až 15 % obsahu MT(desF1) v přípravku MT. Pro MT(desF1) byla nalezena aktivita 14 % trombinu.

Test enzymatické přeměny fibrinogenu na fibrin se obvykle provádí při hodnotě pH v oblasti 7,4 až 8,0. Tato oblast pH se obvykle používá při enzymatických reakcích trombinu, neboť odpovídá fyziologickému rozsahu pH. Optimální pH hodnota pro trombinovou aktivitu leží blízko pH 8.

Cílem vynálezu je nalezení způsobu stanovení fibrinogenu pomocí testů srážení, který by odstranil uvedené nevýhody známých způsobů a mohl být zejména prováděn také ve vzorcích neředěné plasmy nezávisla na obsahu AT III- popř. heparinu.

Podstata vynálezu

Tato úloha je podle vynálezu řešena způsobem stanovení fibrinogenu nezávislým na inhibitech trombinu enzymatickou přeměnou trombinem, protrombinovými fragmenty s "trombin like activity" nebo směsí těchto látek a potom detekcí vzniklého fibrinu popř. štěpných produktů fibrinogenu, který se vyznačuje tím, že se enzymatická přeměna fibrinogenu provádí při pH v rozsahu 4 až 7,3 a detekce vzniklého fibrinu se provádí stanovením doby srážení popřípadě fibrinogenovým štěpným produktům. Potom se deteguje vzniklá sraženina fibrinu. Detekce se může provádět fotometrickým nebo turbidimetrickým stanovením doby srážení. K protrombinovým fragmentům s "trombin like activity" se počítají zejména směsi MT, MT(desF1) nebo těchto látek samotných. Koncentrace popř. poměry směsí použitých enzymů se volí tak, že je zaručen lineární vztah v co možno nejširším rozsahu obsahu fibrinogenu ve vzorku.

Také proteiny vyrobené genovou technikou, které na základě své struktury vykazují aktivitu podobnou trombinu a v porovnání s trombinem vykazují nepatrnou aktivitu k antitrombinu III, jsou vhodné pro způsob podle vynálezu.

Provedení způsobu stanovení v uvedené oblasti pH činí toto tak dalece nezávislým na uvedených rušivých faktorech AT III a heparinu, že stanovení fibrinogenu může být provedeno jednoduchým způsobem ve zředěném a popřípadě také heparin obsahujícím vzorku plasmy. Přídavný stupeň ředění plasmy může

být při způsobu podle vynálezu vynechán, čímž se výsledek testulepší vyloučením eventuálního zdroje chyb.

Vynález spočívá na poznatku, že je možno potlačit inhibici trombinu působením AT III/heparinem při pH 4 až 7,3, přičemž přes suboptimální podmínky je dosaženo trombinové aktivity k enzymatické přeměně fibrinogenu. O něco snížená aktivita trombinu má dokonce tu výhodu, že doby srážení nejsou příliš krátké a jsou snadno zaznamatelné.

Při použití trombinu, protrombinových fragmentů s "trombin like activity" nebo jejich směsí, ^{bylo zjištěno} že trombinová aktivita v uvedeném rozsahu pH, výhodně při pH 5 až 7 nebo nejvýhodněji při pH asi 6, je optimální pro stanovení fibrinogenu nezávisle na inhibitorech trombinu.

Enzymatická přeměna fibrinogenu se výhodně provádí v pufru s molaritou tlumících solí v rozsahu 0,02 až 0,5 M, nejvýhodněji s puftrem 0,1 až 0,25 M. Iontová síla se popřípadě může zvýšit přidáním solí, jako je chlorid sodný. Bylo zjištěno, že trombin je především při nízkých iontových silách necitlivý vůči AT III -inhibici. Pro provedení způsobu podle vynálezu je ale také použitelné prostředí s pufrovací kapacitou v porovnání s plasmovým vzorkem stejnou nebo vyšší, aby se zachovalo určené pH během způsobu stanovení.

Výhodně se provádí stanovení fibrinogenu ~~z~~ z neředěného a popřípadě také heparinobsahujícího vzorku plasmy, ve kterém je také přítomen v neutralizované formě.

Vynález se týká také činidla pro stanovení obsahu fibrinogenu v širokém rozsahu nezávislého na inhibitorech trombinu vzorku popřípadě zředěné a popřípadě také heparinobsahující plasmy obsahující trombin, protrombinové fragmenty s "trombin like activity" nebo jejich směsí pro enzymatickou

přeměnu fibrinogenu v pufru o pH v rozsahu 4 až 7,3 a potom pro detekci vzniklého fibrinu stanovením doby srážení, popř. štěpných produktů fibrinogenu. Činidlo slouží k jednoduchému stanovení fibrinogenu, bez zdlouhavého ředění vzorků plasmy nebo neutralizace popř. odstranění heparinu ze vzorků plasmy.

Vynález bude blíže vysvětlen následujícími příklady.

Příklady provedení vynálezu

Stanovení fibrinogenu při pH 6 a pH 8:

Pro porovnání se použijí meizotrombin a trombin při pH 6 a pH 8 a stanoví se doba srážení v závislosti na obsahu fibrinogenu ve vzorcích plasmy. Meizotrombin se připraví aktivací lidského protrombinu imobilizovaným ecarinem (fa. Pentapharm) postupem podle Stockera a Müllera (Thromb. Haemostasis 65(6), abstrakt 855(1991)). Vzorky, obsahující plasmu s různým obsahem fibrinogenu byly připraveny pro testování.

50 μ l vzorky plasmy byly smíseny se 100 μ l pufru (0,2 M Tris HCl-pufr, pH 8 nebo 0,2M fosfátový pufr, pH 6) a 150 μ l meizotrombinu (15 NIH-analog j./ml) nebo trombinu (10 NIH j./ml, Thrombin Reagent, fa. Immuno) a při 37 °C se stanoví doba srážení Schnitger-Gross-koagulometrem (Fa. Amelung). Stanovení se provádí jak za nepřítomnosti tak za přítomnosti heparinu (1 j./ml).

Z tabulek je zřejmé, že průběh průběh křivek vztahu pro fibrinogen je při pH 6 nezávislý na obsahu heparinu ve vzorku. Obsahem heparinu ve vzorku se však doby srážení při pH 8 prodlouží; a to jak pro meizotrombin tak také pro trombin jako srážecí enzym.

Meizotrombin

obsah fibrinogenu (mg/ml)	pH 8		pH 6	
	bez hep.	s hep.	bez hep.	s hep.
310	8,0	10,6	30,4	30,1
238	11,1	15,1	50,7	49,1
94	26,0	35,5	166,4	157,5
62,5	35,6	>250	>250	>250

Trombin

obsah fibrinogenu (mg/ml)	pH 8		pH 6	
	bez hep.	s hep.	bez hep.	s hep.
373	11,6	>200	18,6	17,3
310	16,1	>200	24,1	24,1
238	25,6	>200	28,4	30,1
100	50,0	>200	85,9	89,8

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob stanovení fibrinogenu v širokém rozsahu nezávislý na inhibitech trombinu enzymatickou přeměnou trombinem, protrombinovými fragmenty s "trombin like activity" nebo jejich směsí a potom detekcí vzniklého fibrinu popř. štěpných produktů fibrinogenu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se enzymatická přeměna fibrinogenu provádí při pH v rozsahu 4 až 7,3 a detekce vzniklého fibrinu se provádí stanovením doby srážení popř. štěpných produktů fibrinogenu.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se enzymatická přeměna fibrinogenu provádí v pufru s molaritou tlumících solí v rozsahu od 0,02 do 0,5 M, výhodně 0,1 až 0,25 M, jakož i po zvýšení iontové síly přídevkem solí, jako je NaCl.
3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se stanovení fibrinogenu provede ze zředěného a popřípadě také heparin obsahujícího vzorku plasmy.
4. Činidlo pro stanovení obsahu fibrinogenu široce nezávislého na inhibitech trombinu v popřípadě nezředěném a popřípadě také heparin obsahujícím vzorku plasmy, obsahující trombin, protrombinové fragmenty s "trombin like activity" nebo jejich směsí pro enzymatickou přeměnu fibrinogenu a potom pro detekci vzniklého fibrinu pomocí doby srážení popř. štěpných produktů fibrinogenu v pufru o pH v rozmezí 4 až 7,3.

č.j.	035216
	00510
	03. VI. 93
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLÁDNICTVÍ	
Příl.	