

Bejelentés napja: 1979. II. 13.

(BO—1763)

Nemzetközi osztályozás:

G 01 N 33/16

Elsőbbsége: Német Szövetségi Köztársaság
1978. III. 23. (P 28 12 943.3)

Közzététel napja: 1980. VI. 28.

Megjelent: 1981. VI. 30.

Feltalálók:

dr. Bartl Knut vegyész, Tutzing,
dr. Lill Helmut vegyész, Wielenbach,
dr. Ziegenhorn Joachim biokémikus, Starnberg,
Német Szövetségi Köztársaság

Szabadalmas:

Boehringer Mannheim GmbH.,
Mannheim-Waldhof,
Német Szövetségi Köztársaság

Eljárás és reagens a t

1

A találmány tárgya eljárás és reagens a biológiailag aktív heparin meghatározására plazmában.

A heparin meghatározása fontos paramétere a trombólisveszély esetén rendszerint folytatott heparinterápia folyamat ellenőrzésének. A heparin antitrombin III-mal (AT III) komplexet képez, amely a trombin proteolitikus aktivitását csökkenti. Mivel a trombin fibrinnek fibrinogénből való képződését katalizálja, a trombinaktivitás felelős a vér vagy plazma alvadásáért, és így a trombólis esetén keletkező fibrinalvadékért is. A heparinterápiát főleg trombólisveszély fennállása esetén (például sebészeti beavatkozások előtt) alkalmazzák. A heparinkoncentráció pontos beállítása ekkor rendkívül fontos. Túl alacsony adagolás esetén fennáll a trombólis illetve embólia veszélye, ami halálhoz vezethet. Túl magas heparinkoncentráció ellenben elvérzéshez vezet. A heparin kvantitatív analízise ezért a véralvadásvizsgáló laboratóriumban gyakran elvégzendő vizsgálatokhoz tartozik.

A heparin meghatározására a gyakorlatban mindeddig lényegében két módszert alkalmaztak:

1. A vér vagy plazma alvadási aktivitásának meghatározása. Az ezen alapuló eljárások még nem kielégítőek. Alacsony koncentrációtartományban az érzékenység túl csekély, magas koncentrációnál viszont az alvadásképtelenség miatt már nem alkalmazhatók. [Lásd Thromb. Res, 8, 413 (1976)].

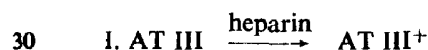
2. Újabban kromogén szubsztrátokat alkalmaznak az Xa enzimfaktorhoz vagy trombinhoz. [J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 239 (1977)].

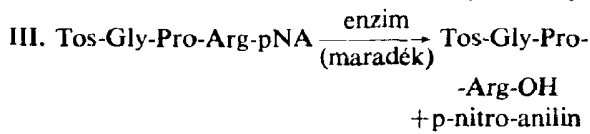
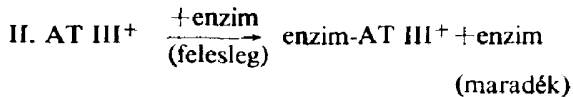
Ez az újabb eljárás a következő elven alapul:

tív heparin meghatározására in

2

A plazmamintát, amely a meghatározandó heparint, valamint ismeretlen, változó mennyiségű antitrombin III-t (AT III, illetve heparin-kofaktor) tartalmaz, AT III jelenlétében Xa faktoral, illetve trombinnal inkubálják. A hozzáadott AT III-nak egyrészt a mintában levő különböző AT III mennyiségeket főlölsleg alkalmazásával ki kell egyenlítenie, másrészt az szükséges, hogy a teszt érzékenységét, különösen alacsonyabb heparinkoncentráció-tartományban kielégítően megnövelje. Az AT III normálplazma formájában adható, amely mindig fiziológias mennyiségű AT III-t tartalmaz, vagy tisztított AT III formájában. Az inkubáció során a mintában levő heparin katalitikus úton az AT III konformációváltozását okozza, ami ennek aktiválódásával jár. Az aktivált AT III képes arra, hogy az inkubációs oldatban jelenlevő Xa proteolitikus enzim, illetve trombin egyrészt spontán kialakuló kovalens kötés útján inaktíválja. A heparinnal aktivált AT III által nem gátolt proteolitikus enzim egy megfelelő kromogén szubsztrátból, rendszerint egy p-nitro-anilint tartalmazó peptidből, így Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA-ból illetve Tos-Gly-Pro-Arg-pNA-ból képes a p-nitro-anilin színezék felszabadítására, amelynek extinkciója 405 nm-nél mérhető. A hozzáadott enzimaktivitás ($\Delta E_1/\text{perc}$) és az inkubáció után mért maradék aktivitás ($\Delta E_2/\text{perc}$) közötti különbség kalibrációs görbe segítségével összefüggésbe hozható a mintában levő heparinkoncentrációval. Az alábbi reakcióvázlatok magyarázzák az eljárást:





(A + jel aktiválást jelez.)

Fölös mennyiségű AT III normálplazma vagy tisztított AT III formájában való hozzáadásával az ezen eljárás szerint végzett heparinmeghatározás messzemenően független a plazmamintában levő AT III-tól. Így a mintában jelenlevő összes heparint meghatározzák, amely az AT III-on át trombin, illetve Xa-faktor inaktiválására képes. Azt találtuk azonban, hogy ennek a rendszernek a következő hátrányai vannak: a páciensplazmákban nem ritkán előforduló AT III-hiány a hozzáadott AT III miatt nem vehető észre. Olyan extrém, de a klinikai gyakorlatban mindazonáltal előforduló esetben, ha a páciens plazmájában gyakorlatilag nincs AT III, egy egyedüli heparinterápia hatástalan lenne. A heparin semmilyen biológiai hatást nem gyakorolhat már a trombinra. Az orvos így eszerint a tesztelv szerint hamis képet kapna a páciens véralvadási képességéről. Következésképpen a heparinmeghatározáshoz kiegészítésképpen egy AT III meghatározást is kell végezni.

A találmány feladata ezért olyan eljárás kidolgozása, amely alkalmazásával heparin biológiai aktivitása közvetlenül meghatározható.

Ezt a feladatot a találmány szerint a plazmában levő heparin biológiai aktivitásának meghatározására szolgáló olyan eljárással oldjuk meg, amelynek során egy proteolitikus enzimet és ennek egy kromogén szubsztrátját adjuk hozzá a rendszerhez, és a kromogén szubsztrátból felszabaduló színezéket mérjük; proteolitikus enzimként trombint vagy Xa faktort alkalmazunk, és a meghatározást antitrombin III hozzáadása nélkül végezzük.

Az irodalomban található adatok szerint tisztított AT III hozzáadásával a heparinmeghatározás érzékenysége annyira megnövekszik, hogy kis (10 egység/liter) heparinmennyiségek is meghatározhatók lesznek.

A találmány szerinti eljárás alkalmazásával meglepő módon az is lehetséges, hogy AT III hozzáadása nélkül is kielégítő érzékenységgel mérjünk a plazmában kis koncentrációtartományban, normál AT III szint esetén. A meghatározás például 37 °C-on 20 USP/liter plazmakoncentrációnál még kielégítő pontossággal elvégezhető. Mivel a vizsgálati rendszerhez külön AT III-t nem adunk hozzá, a trombin inaktiválás biológiai mechanizmusának megfelelően mindkét paramétert, a heparint és az AT III-t is értékelhetjük. A mintában levő AT III-on keresztül a heparin, amelyet a mintában meghatározunk, kifejtheti biológiai aktivitását a trombin inaktiválása formájában. Ez az eljárás a páciens véralvadási állapotának közvetlen ellenőrzési lehetőségét biztosítja az orvosnak a heparinterápia során.

A proteolitikus enzim kromogén szubsztrátjai alatt általában olyan szubsztrátokat értünk, amelyekből az enzim hatására színezék hasad le. Ez a spektrum látható tartományában meghatározható színezék, valamilyen fluoreszcens színezék vagy ultraibolya tartományban meghatározható valamilyen színezék. Előnyös kromo-

gén szubsztrátok olyan peptidek, amelyek egy argininrész karboxilcsoportján amidkötéssel kapcsolódó színezéket tartalmaznak. Különösen alkalmas a p-nitro-anilid-csoport, valamint ebből szubsztitúcióval levezethető hasonló színezékek. Kapcsolódhatnak azonban az argininrész karboxilcsoportjához más aminosoportartalmú színezékek is.

Trombin alkalmazása esetén szubsztrátként előnyösen Bz-Phe-Val-Arg-pNA-t, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA-t vagy Tos-Gly-Pro-Arg-pNA-t használnak.

Xa faktor alkalmazása esetén előnyösen Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA-t használnak kromogén szubsztrátként.

Az eljárás körülményei pH-érték, idő, hőmérséklet és hasonlók tekintetében lényegében megfelelnek az ismert eljárásoknál alkalmazottaknak. Előnyösen pH 8,0-nál és trisz(hidroximetil)-amino-metán/sósav pufferrel dolgozunk. Más pufferrendszerek, így például trisz(hidroximetil)-amino-metán/imidazol vagy imidazol/sósav pufferek is alkalmazhatók. A meghatározást célszerűen szobahőmérsékleten végezzük. Végezhető azonban a meghatározás magasabb (30-tól 37 °C-ig terjedő) hőmérsékleten is, ahol magasabb trombinaktivitásnak megfelelően kisebb enzimm koncentrációkat adunk hozzá.

A vizsgálati elegyben optimális ionerősség elérése céljából a pufferoldathoz sokat, előnyösen alkálifémkloridokat, így nátrium-kloridot vagy kálium-kloridot adunk hozzá. A plazmamintában levő zavaró idegen proteázaktivitások csökkentésére előnyösen aprotinint alkalmazunk.

A találmány tárgyát képezi továbbá a plazmában levő heparin meghatározására szolgáló reagens is, amely lényegében

0,01–0,3 mól/liter 6–9 pH-jú puffert,
0,01–0,25 mól/liter alkáli-kloridot,
200–1100 egység/liter trombint vagy Xa faktort,
0,05–10 mmól/liter kromogén szubsztrátot,
0–0,01 g/liter aprotinint,
0–0,03 mól/liter etilén-diamin-tetraecetsavat és
0–10 /gliter poli-etilén-glikolt

40 tartalmaz.

A trombin, illetve Xa faktor mennyiségénél megadott egységek (a továbbiakban is) a National Institut of Health (NIH) definíciói szerinti egységek.

A találmány szerinti eljárás és reagens előnye, hogy a vizsgálat kivitelezéséhez egy komponenssel kevesebb szükséges, mint az ismert eljárásokhoz. Következésképp a vizsgálat manuális elvégzése egyszerűbb. Az eljárás azonban mindenekelőtt analízáló automatákra való alkalmazást illetően előnyösebb. Továbbá, az AT III-hozzáadás elhagyása rendkívül kedvezően hat a meghatározás költségeire. A normálplazma valamint a tisztított AT III hozzáférhetősége korlátozó faktort jelent. Az eljárás lényeges előnyeként említendő az alkalmazó részére a klinikán megnövekedett vizsgálati kapacitás.

Az eljárás kivitelezhető kinetikusan, amikor a trombin-kiindulási aktivitás reakciósebessége és a trombin-maradék aktivitás reakciósebessége közvetlenül a szubsztráttal való reakció megindítása után szolgálnak mérési értékül. Alkalmazható továbbá a végérték-eljárás is, amelynél bizonyos mérési idő után a reakciót savval, például ecetsavval, való pH-eltolással leállítják.

A teszt-keverék például a következőket tartalmazza:
0,045 mól/liter 8,0 pH-értékű trisz/sósav puffer,
0,14 mól/liter nátrium-klorid,
0,01 mól/liter etilén-diamin-tetraecetsav,

9 g/liter poli-etilén-glikol,
0,01 g/liter aprotinin,
300 egység/liter trombin,
0,14 mmól/liter Tos-Gly-Pro-Arg-pNA.

Példa:

Az alább leírt példát a kinetikus eljárás szerint a következő reagensok alkalmazásával valósítjuk meg:

1. reagens:

0,05 mól/liter 8,0 pH-értékű trisz/sósav puffer,
0,15 mól/liter nátrium-klorid,
0,01 mól/liter etilén-diamin-tetraecetsav,
10 g/liter poli-etilén-glikol,
0,01 g/liter aprotinin,
330 NIH/liter trombin.

2. reagens:

1,5 mmól/liter Tos-Gly-Pro-Arg-pNA.

Meghatározási körülmények:

Mérési hullámhossz: Hg 405 nm; a kuvetta rétegvastagsága: 1 cm; inkubációs hőmérséklet: szobahőmérséklet.

A kuvettába 2,0 ml 1. reagenst pipettázunk, hozzáadunk 0,02 ml mintát, és összekeverjük. Az elegyet 3 percig 25 °C-on inkubáljuk, utána hozzákeverünk 0,2 ml 2. reagenst. Az extinkciót 3 percig regisztráljuk 25 °C-on.

Mérési sorozatonként egy vakpróbát kell végezni. Itt a plazmaminta helyett vizet adunk a rendszerhez.

Kiértékelés:

Megállapítjuk a különbséget a vakpróbánál 3 percen át mért extinkcióváltozás és a mintánál 3 percen át mért extinkcióváltozás között. Ez a különbség a plazmában levő heparin biológiai aktivitásának mértéke. Éppígy használható a 3 perc múlva mért abszolút extinkció a kiértékeléshez, amint az 1. ábrán ábrázoljuk. Ez az 1. ábra 18 plazmamintára kapott eredményeket mutat, amelyekhez mért mennyiségű heparint adtak, úgyhogy 0,05-től 1,0 USP heparin/ml plazma közötti koncentrációtartományt fog át.

A reagens összetétele a következő:
0,01—0,3 mól/liter 6—9 pH-értékű puffer,
0,01—0,25 mól/liter nátrium-klorid,
0,001—0,03 mól/liter etilén-diamin-tetraecetsav,
200—1100 egység/liter trombin,
≥ 0,05 mmól/liter szubsztrát,
0—0,01 g/liter aprotinin és
0—10 g/liter poli-etilén-glikol.

10

Szabadalmi igénypontok

15

1. Eljárás plazmában levő heparin biológiai aktivitásának meghatározására proteolitikus enzim és kromogén szubsztrátjának hozzáadásával és a kromogén szubsztrátból felszabaduló színezék mérésével, emellett kromogén szubsztrátként előnyösen olyan peptid alkalmazásával, amely egy argininrész karboxilcsoportjához amidkötéssel kapcsolódó p-nitro-anilid-csoportot tartalmaz és proteolitikus enzimeként, trombin alkalmazása esetén szubsztrátként előnyösen Bz-Phe-Val-Arg-pNA, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA vagy Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, illetve proteolitikus enzimeként Xa faktor alkalmazása esetén kromogén szubsztrátként előnyösen Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA alkalmazásával, azzal jellemezve, hogy proteolitikus enzimeként trombint vagy Xa faktort alkalmazunk.

20

25

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, azzal jellemezve, hogy a vizsgálati elegyhez aprotinint is adunk.

30

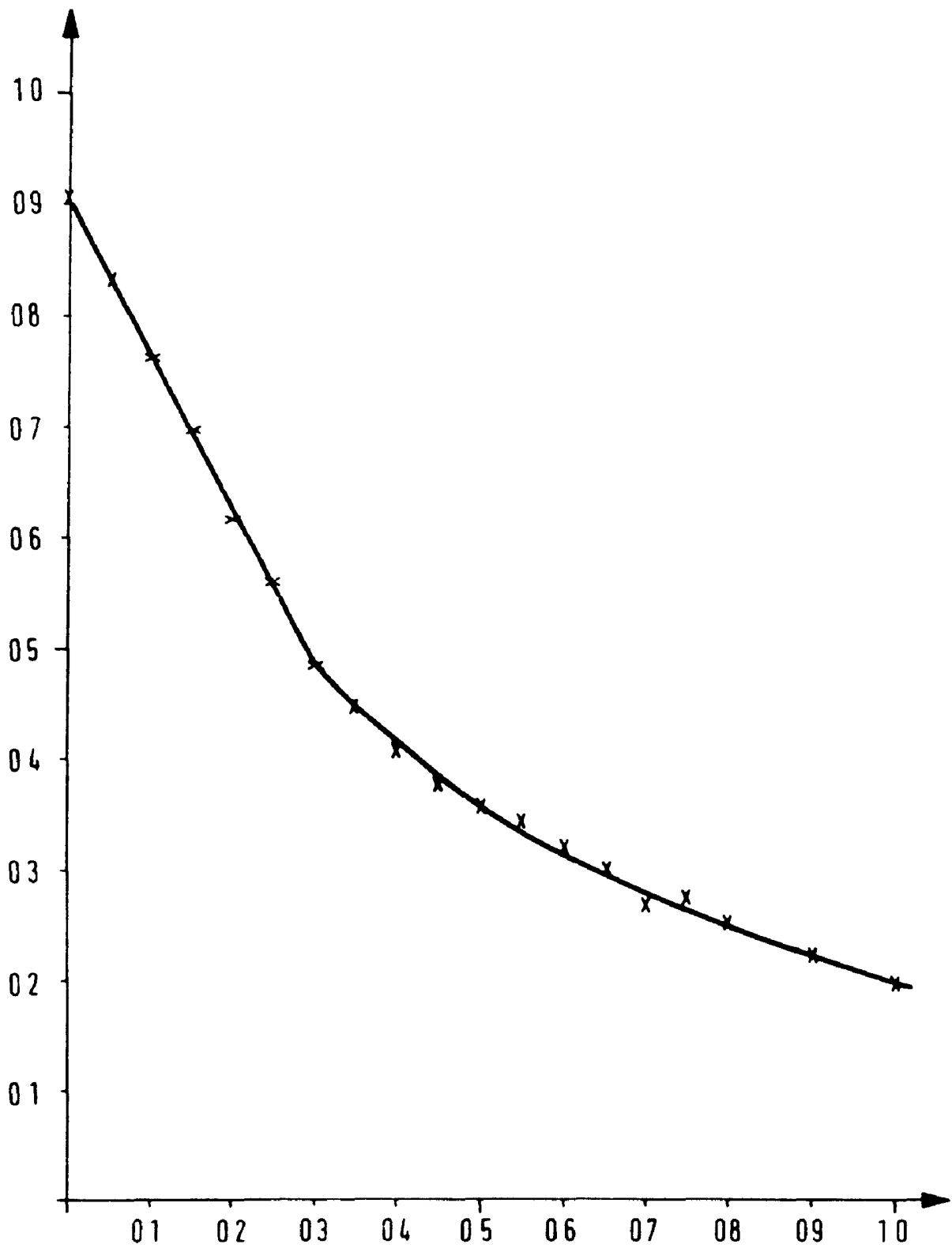
35

3. Reagens plazmában levő heparin 1. igénypont szerinti meghatározására, azzal jellemezve, hogy 0,01—0,3 mól/liter 6—9 pH-értékű puffert, 0,01—0,25 mól/liter alkálifém-kloridot, 200—1100 egység/liter trombint vagy Xa faktort, 0,05—10 mmól/liter kromogén szubsztrátot, 0—0,01 g/liter aprotinint, 0—0,03 mól/liter etilén-diamin-tetraecetsavat, 0—10 g/liter poli-etilén-glikolt

40

tartalmaz.

1 db ábra



176068
Nemzetközi osztályozás:
G 01 N 33/16