



ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ



Для исследований
и производства

Свертываемость
крови и анемия



Сердечные
маркеры



D-димер и высокомолекулярные продукты деградации фибрина



Фибриноген – это белок крови, из которого образуются сгустки фибрина при свертывании крови или тромботическом процессе. Фибриноген состоит из двух одинаковых субъединиц, которые содержат три полипептидные цепи: α , β и γ . Во время свертывания крови фибриноген сначала превращается в фибрин

под действием тромбина, затем эти мономеры фибрина полимеризуются с образованием сгустков фибрина. При фибринолизе сгустки фибрина расщепляются плазмином, и в кровоток высвобождаются продукты разложения фибрина (FDP) с разной молекулярной массой (рис. 1). D-димер (молекулярный вес 180 кДа) является конечным продуктом разложения фибрина. Он состоит из остатков всех трех цепей (α , β и γ цепей) фибриногена, сшитых дисульфидными связями. Димерная структура D-димера поддерживается двумя ковалентными межмолекулярными изопептидными связями между γ -цепями.

D-димер в диагностике

Уровень D-димера у здоровых людей составляет менее 0,5 мкг/мл, в то время как у пациентов с тромбозом легких (или тромбозом легочной артерии – ТЭЛА), тромбозом глубоких вен (ТГВ) и атеросклерозом он повышен. Считается, что повышенный уровень D-димера в крови является надежным маркером патологической коагуляции, которая лежит в основе патогенеза большинства сердечно-сосудистых заболеваний (1, 2). Он широко используется для исключения диагноза тромбоза глубоких вен (3).

Несмотря на долгую историю использования теста на D-димер в клинической практике, существует много проблем, касающихся количественного определения D-димера в образцах плазмы. Плазма пациента содержит широкий спектр FDP разных размеров наряду с самим D-димером. Все эти продукты обладают эпитопом D-димерного антигена. Следовательно,

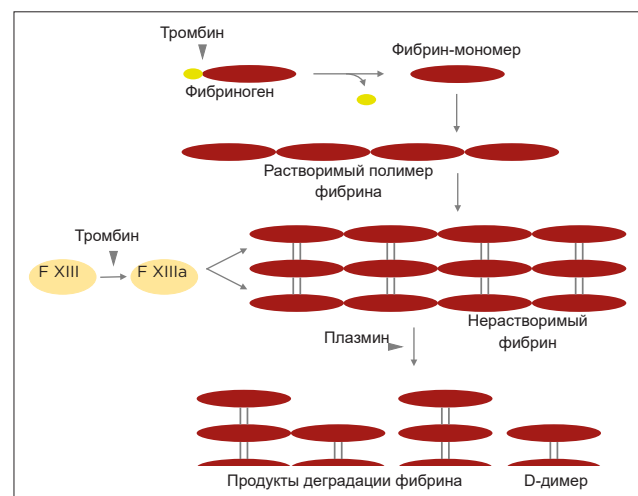


РИСУНОК 1. СХЕМА ФИБРИНОЛИЗА И ОБРАЗОВАНИЯ ФИБРИНА.

антитела, специфичные к D-димеру, также распознают FDP. Тем не менее, существует большая разница между результатами, полученными различными иммунодиагностическими тестами. Это можно объяснить различиями в специфичности антител; некоторые антитела и пары антител распознают D-димер лучше, чем FDP и наоборот. До сих пор все попытки стандартизации и гармонизации не привели к удовлетворительным результатам, и это является распространённой причиной проблем в повседневной практике (4).

Для точного определения всех FDP и D-димера, и для использования D-димера в качестве стандарта моноклональные антитела должны обнаруживать FDP и D-димер с одинаковой специфичностью. Кроме того, наборы на D-димер не должны обнаруживать фибриноген, концентрация которого в плазме в 1000 раз выше, чем концентрация D-димера.



КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

- ✓ Маркер патологического свертывания крови
- ✓ Исключение тромбоза любой этиологии, в т.ч. вызывающего ТГВ или ТЭЛА

Разработка иммунометрических систем и рекомендованные пары антител

Для разработки иммунометрических аналитических систем для определения D-димера мы предлагаем ряд моноклональных антител, специфичных к D-димеру и FDP. В дополнение к антителам мы предлагаем D-димер, который производится из свернувшегося фибриногена путем расщепления плазмином.

Моноклональные антитела, специфичные к D-димеру и FDP

FDP и D-димер, наиболее деградированная форма FDP, появляются в крови человека в результате протеолитического расщепления сгустков фибрина. Соотношение продуктов деградации фибрина не является постоянным и может отличаться от пациента к пациенту (см. Рис. 3). Мы разработали иммунометрическую систему, которая распознает FDP и D-димер с одинаковой специфичностью, что позволяет снизить погрешность в измерении FDP в крови. Такой подход может в перспективе стать первым серьезным шагом к созданию единой универсальной методики анализа D-димера.

Количественный сэндвич-иммуноанализ, одинаково специфично определяет D-димер и FDP

Хайтест предлагает моноклональные антитела DD189сс и DD255сс, которые распознают D-димер и высокомолекулярные продукты разложения фибрина с одинаковой специфичностью в сэндвич-флюороиммуноанализе при концентрации антигена до 1 мкг/мл (рис. 2).

Для «сэндвич»-ИФА плазму можно развести в 10-кратном 20 мМ трис-HCl-буфере, pH 7,5, содержащем 0,15 M NaCl. Оба клона окрашивали D-димер в вестерн-блоттинге в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (рис. 5 A и B).

Характеристика моноклонов DD189сс и DD255сс представлена в статье Kogan et al. (5)

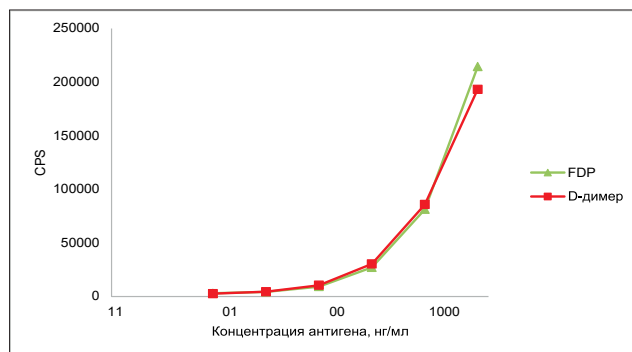


РИСУНОК 2. Пара антител DD189сс-DD255сс определяет D-димер и FDP с одинаковой специфичностью. В лунки планшета нанесли 100 мкл клона DD189сс (10 мкг/мл в PBS) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок трис-буферным солевым раствором (TBS), содержащим 0,05% Tween 20, добавили 50 мкл меченного Eu3 + клона DD255сс (4 мкг/мл в буфере для анализа Delfia) и 25 мкл D-димера или FDP. Инкубировали, перемешивая, в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки в каждую лунку добавили 300 мкл раствора Lanfia, и после 3 минут интенсивного перемешивания измерили флуоресцентные сигналы на 1420 Victor™ Multilabel Counter (Wallac, Финляндия).

Соотношение D-димера и FDP отличается у разных пациентов

Мы провели анализ плазмы от пациентов с двумя различными расстройствами с помощью гель-фильтрации, в результате которого было установлено, что соотношение D-димера и FDP не является постоянным (рис. 3). Следовательно, иммуноаналитические системы должны в равной степени распознавать D-димер и FDP, чтобы обеспечить более точное определение всех продуктов распада, возникающих в результате разложения фибрина.

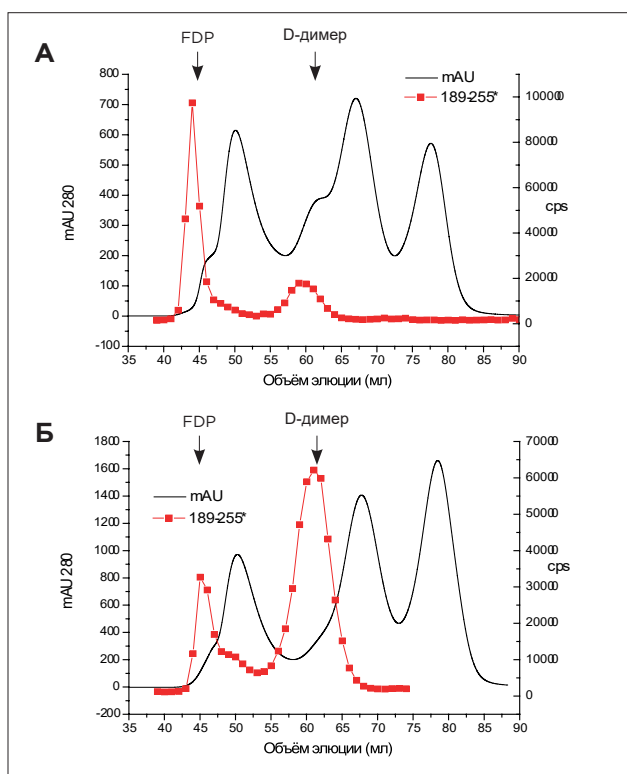


РИСУНОК 3. ВЭЖХ-гель-фильтрация образцов плазмы от пациентов с тромбозом (А) и после хирургической операции (Б). 200-500 мкл плазмы наносили на колонку Superdex 200 16/60 со скоростью потока 1 мл/мин. Фракции объемом 1 мл анализировали парой DD189-DD255 в сэндвич-ИФА, как описано на рис.2.

Рекомендации по парам антител для количественного сэндвич-иммуноанализа

Рекомендованные пары представлены в таблице 1. Они успешно распознают D-димер и высокомолекулярные продукты разложения фибрина и не обнаруживают фибриноген (рис. 4).

ТАБЛИЦА 1. Рекомендуемые пары для сэндвич-ИФА для обнаружения D-димера в плазме человека. Обратите внимание, эти рекомендации и наблюдения основаны на полученных результатах с использованием нашей собственной иммунометрической платформы DELFIA®.

Пара (подложка-конъюгат)	Примечания
DD189cc – DD255cc	Одинаковая специфичность к D-димеру и высокомолекулярным продуктам деградации фибрина
DD2 – DD41cc	Более специфичная пара к высокомолекулярным продуктам деградации фибрина при высоких концентрациях
DD2 – DD4*	Приблизительно одинаковая специфичность к D-димеру и высокомолекулярным продуктам деградации фибрина

* Ввиду кросс-реактивности DD4 с фибриногеном, мы настоятельно рекомендуем использовать его в качестве детектирующего антитела. В сэндвич-иммуноанализе плазма должна быть разведена, по крайней мере, в 2-кратном растворе 10 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 1 М NaCl, 0,1% Твин 20, чтобы избежать неспецифического связывания. Каждый из следующих этапов иммуноанализа должен сопровождаться инкубацией и промывкой: нанесение моноклонального антитела на подложку, добавление образца, а позже – конъюгированного моноклонального антитела.

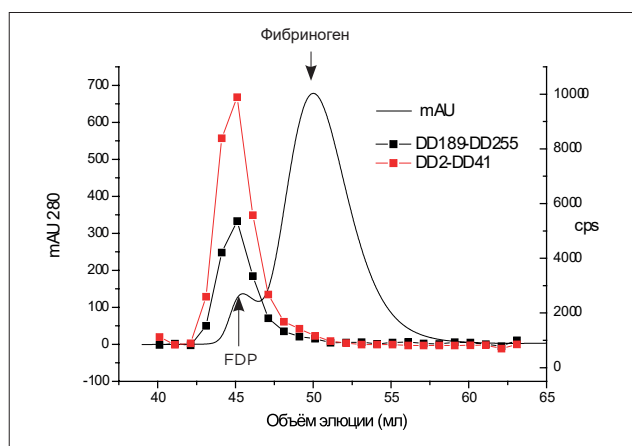


РИСУНОК 4. Кросс-реактивность с фибриногеном при использовании в иммунометрических системах пар антител DD2-DD41 и DD189-DD255 отсутствует. 5 мг фибриногена (Calbiochem) наносили на колонку Superdex 200 16/60 с использованием TBS, рН 7,5 при скорости потока 1 мл/мин. Фракции объемом 1 мл анализировали в сэндвич-анализе с помощью пар DD2-DD41 и DD189-DD255, как описано на рисунке 3 (у финов рис.3, в русской – 2). Результаты показывают, что иммунометрические системы на D-димер не обнаруживают фибриноген, несмотря на присутствие некоторых высокомолекулярных продуктов деградации фибрина в препарате.

Моноклональные антитела к D-димеру могут быть использованы в вестерн-блоттинге

Наши антитела к D-димеру также могут применяться при методе вестерн-блоттинга. В проведенных тестах все моноклональные антитела окрашивали невосстановленный D-димер, а некоторые из них окрашивали и восстановленный D-димер (рис. 5 А и В соответственно).

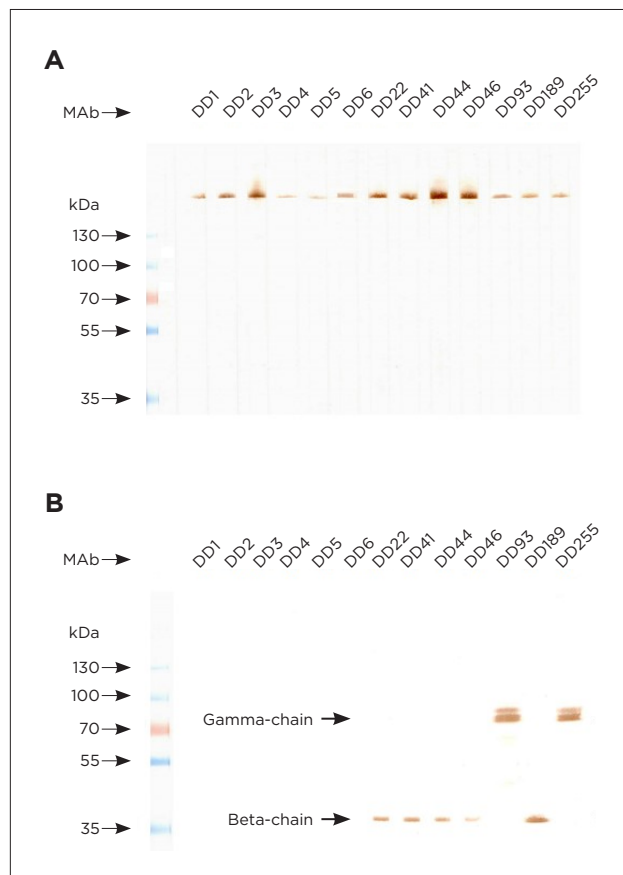
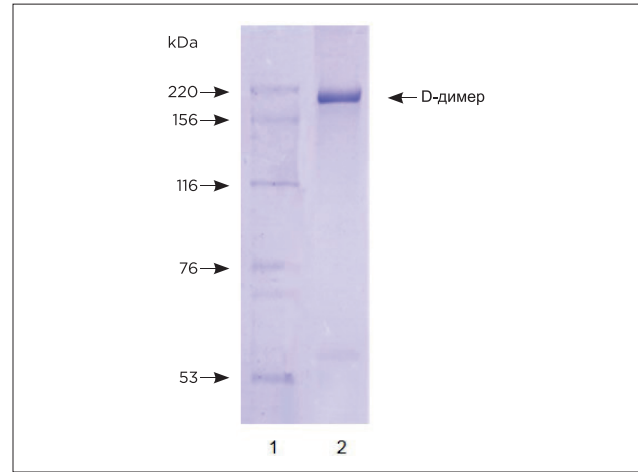


РИСУНОК 5. Вестерн-блот D-димера. D-димер (кат. № 8D70) анализировали в ДСН-ПААГ в невосстанавливающих (А) или восстанавливающих (В) условиях с использованием разделяющего геля 7,5–12,5% и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану блокировали 7% молоком в PBST в течение 30 минут, полосы белка окрашивали различными моноклональными антителами к D-димеру (10 мкг/мл) в течение 1 часа, используя Mini-Protean® II MultiScreen (Bio-Rad). После промывания с помощью PBST, добавляли пероксидазный конъюгат козьих анти-мышинных антител специфичных к Fc-фрагменту IgG (разведённый в соответствии с рекомендациями производителя) и инкубировали в течение часа. После промывания PBST иммунные комплексы визуализировали с помощью DAB/перекиси водорода в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7,5.

D-димер человека

Уже более 10 лет Хайтест является одним из ведущих мировых поставщиков нативного D-димера. Мы предлагаем D-димер высокой степени очистки, полученный из человеческой плазмы.

РИСУНОК 6. SDS-PAGE очищенного D-димера в невосстанавливающих условиях. Гель окрашивали с использованием комасси бриллиантового голубого R-250.
Полоса 1: Весовой стандарт
Полоса 2: D-димер (3 мкг)



Информация для заказа.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
D-димер	4D30	DD1	IgG2a	ИФА, ВБ, Нет к/р с фибриногеном
		DD2	IgG2b	ИФА, ВБ, Нет к/р с фибриногеном
		DD3cc	IgG2b	In vitro, ИФА, ВБ, Нет к/р с фибриногеном
		DD4 *	IgG2b	ИФА, ВБ, К/р с фибриногеном (для обнаружения МАб)
		DD5 *	IgG2b	ИФА, ВБ, К/р с фибриногеном (для обнаружения МАб)
		DD6cc *	IgG2a	In vitro, ИФА, ВБ, К/р с фибриногеном (для обнаружения МАб)
		DD22	IgG2a	ИФА, ВБ, Нет к/р с фибриногеном
		DD41cc	IgG2a	In vitro, ИФА, ВБ, Нет к/р с фибриногеном
		DD44cc	IgG2b	In vitro, ИФА, ВБ, Нет к/р с фибриногеном
		DD46	IgG2a	ИФА, ВБ, Нет к/р с фибриногеном
		DD93	IgG1	ИФА, ВБ, Нет к/р с фибриногеном
		DD189cc *	IgG1	ИФА, ВБ, Нет к/р с фибриногеном
DD255cc *	IgG1	ИФА, ВБ, Нет к/р с фибриногеном		

* Примечание. При использовании данных антител в качестве детекторных, иммуноаналитический набор может давать ложноположительные результаты у пациентов, получавших стрептокиназу.

АНТИГЕН

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
D-димер	8D70	>90%	Плазма человека

Обратите внимание, что некоторые или все данные, представленные в настоящем техническом описании, были подготовлены с использованием моноклональных антител, произведенных in vivo. Ожидается, что моноклональные антитела, полученные in vitro, будут иметь аналогичные характеристики.

Ссылки на литературу

- Bounameaux H, et al.** (1994) Plasma measurement of D-dimer as diagnostic aid in suspected venous thromboembolism: an overview. *Thromb Haemost.* 71, 1-6.
- Rowbotham BJ, et al.** (1987) Measurement of crosslinked fibrin derivatives – use in the diagnosis of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 57, 59-61.
- Righini M, et al.** (2008) D-Dimer for venous thromboembolism diagnosis: 20 years later. *J Thromb Haemost.* 6, 1059-71.
- Reber G. and de Moerloose P.** (2009) Standardization of D-dimer testing. *Quality in Laboratory and Thrombosis* 99-109.
- Kogan, AE et al.** (2016) Monoclonal antibodies with equal specificity to D-dimer and high-molecular-weight fibrin degradation products. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 27: 542-550.