

2.6.15. АКТИВАТОР ПРЕКАЛІКРЕЇНУ

Активатор прекалікреїну (РКА) активізує процес перетворення прекалікреїну в калікреїн і може бути кількісно оцінений за його здатністю відщеплювати хромофор від синтетичного пептидного субстрату, що дає можливість спектрофотометрично виміряти швидкість відщеплення, і обчислюють концентрацію РКА порівнянням зі стандартним препаратом, каліброваним у Міжнародних одиницях (МО).

МО – активність, що міститься у зазначеній кількості міжнародного стандарту, що складається з ліофілізованого активатора прекалікреїну. Еквівалент в МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня організація охорони здоров'я.

РЕАКТИВИ

БСП активатора прекалікреїну в альбумині ▽ калібрований в МО відносно міжнародного стандарту ▲.

Буфер А. 6.055 г *трис(гідроксиметил)амінометану Р*, 1.17 г *натрію хлориду Р*, 50 мг *гексаметринбромиду Р* та 0.100 г *натрію азиду Р* розчиняють у воді *Р*. Доводять значення рН до 8.0 2 М *хлористоводневою кислотою Р* та доводять об'єм одержаного розчину водою *Р* до 1000 мл.

Буфер В. 6.055 г *трис(гідроксиметил)амінометану Р* та 8.77 г *натрію хлориду Р* розчиняють у воді *Р*. Доводять рН до 8.0 2 М *хлористоводневою кислотою Р* та доводять об'єм одержаного розчину водою *Р* до 1000 мл.

ПРИГОТУВАННЯ СУБСТРАТУ ПРЕКАЛІКРЕЇНУ

Щоб уникнути активації процесу коагуляції, кров або плазма, які використовуються для приготування прекалікреїну, мають контактувати лише з пластиковою або силіконізованою поверхнею.

Уводять 9 об'ємів крові людини в 1 об'єм розчину антикоагулянту (АСД, СРД або 38 г/л *розчину натрію цитрату Р*), до яких додають 1 мг/мл *гексаметринбромиду Р*. Центрифугують суміш за 3600 g протягом 5 хв. Відокремлюють плазму та центрифугують ще раз за 6000 g протягом 20 хв для осадження тромбоцитів. Відокремлюють плазму із зниженим вмістом тромбоцитів та проводять діаліз із 10 об'ємами буфера А протягом 20 год. Після проведеного діалізу плазму поміщають у хроматографічну колонку, яка містить *агарозу-DEAE (діетиламіноетил) для іонообмінної хроматографії Р*, та урівноважена буфером А й об'єм якої удвічі перевищує об'єм плазми. Проводять елювання з колонки з буфером А за 20 мл/см²/год.

Елюат збирають порціями та реєструють оптичну густину за довжини хвилі 280 нм (2.2.25). Об'єднують порції, які містять перший білковий пік, таким чином, щоб об'єм об'єднаних порцій становив приблизно 1.2 об'єму плазми зі зниженим вмістом тромбоцитів.

Випробовують пул субстрату на відсутність калікреїнової активності, змішуючи 1 частину з 20 частинами попередньо нагрітого розчину хромогенного субстрату, який будуть використовувати в кількісному визначенні, та інкубують за температури 37 °С протягом 2 хв. Субстрат придатний, якщо зростання оптичної густини становить менше 0.001 на хвилину. Додають до об'єданого розчину 7 г/л *натрію хлориду Р* та фільтрують через мембранний фільтр (номінальний розмір пор — 0.45 мкм). Заморожують фільтрат порціями та зберігають за температури –25 °С; субстрат перед зберіганням може бути підданий ліофілізації.

Усі процедури виконують протягом одного робочого дня від початку хроматографування до заморожування фільтрату порціями.

МЕТОД

Кількісне визначення може бути виконане з використанням автоматичного аналізатора ферментів або відповідного ▽ мікропланшету ▲, що дозволяє визначати кінетичні параметри, та відповідного програмного забезпечення для обчислення результатів. Стандарти, зразки та субстрат прекалікреїну можуть, за потреби, бути розведені буфером В.

Розведені стандарти або зразки з субстратами прекалікреїну інкубують протягом 10 хв. Щоб уникнути помилок, зумовлених зміною іонної сили та рН інкубаційної суміші, виконують умову – об'єм нерозбавленого зразка має складати не більше 1/10 повного об'єму інкубаційної суміші. Інкубаційну суміш або її частину інкубують як мінімум з рівним об'ємом розчину з підходящим синтетичним хромогенним субстратом, розчиненим у буфері В, про який відомо, що він специфічний для калікреїну (наприклад, *N-бензоїл-L-проліл-L-фенілаланіл-L-аргініну 4-нітроаніліду ацетат Р* або *D-проліл-L-фенілаланіл-L-аргінін-4-нітроаніліду-дигідрохлорид Р*). Реєструють швидкість зміни оптичної густини на хвилину протягом 2-10 хв за довжини хвилі, специфічної для використовуваного субстрату. Готують контрольний розчин для кожної суміші із випробовуваним зразком або стандартом, використовуючи буфер В замість субстрату прекалікреїну.

Залежно від методу, що використовується, ΔА/хв має бути скоригована відніманням величини, одержаної для відповідного контрольного розчину, який не містить субстрат прекалікреїну. Результати можна обчислити (використовуючи стандартну криву, метод паралельних ліній або визначення коефіціє-