

Метод. Готують дві незалежні серії з трьох або чотирьох розведень випробовуваного та стандартного препаратів у діапазоні від 1/75 до 1/200 виходячи з концентрації 1 МО/мл із використанням *буферного розчину трис-ЕДТА BSA рН 8,4 Р*, що містить 15 МО/мл гепарину.

По 200 мкл кожного розведення витримують за температури 37 °С протягом 1-2 хв. Додають до кожного розведення 200 мкл розчину, що містить 2 МО/мл *тромбіну бика Р* у *буферному розчині трис-ЕДТА BSA рН 8,4 Р*. Перемішують та витримують за температури 37 °С рівно протягом 1 хв. Додають 500 мкл придатного хромогенного субстрату (наприклад, D-фенілаланіл-L-піпекोलіл-L-аргінін-4-нітроанлід, відновленого у воді Р) для отримання розчину, що містить 4 ммоль/л і далі розводять до концентрації, придатної для кількісного визначення із використанням *трис-ЕДТА BSA рН 8,4 Р* без альбуміну). Відразу починають вимірювання зміни оптичної густини за довжини хвилі 405 нм (2.2.25), продовжуючи вимірювання щонайменше 30 с. Обчислюють швидкість зміни оптичної густини ($\Delta A/xv$). (Як альтернатива, визначення може проводитись методом кінцевої точки, зупинкою реакції оцтовою кислотою та вимірюванням оптичної густини за довжини хвилі 405 нм).

Швидкість зміни оптичної густини ($\Delta A/xv$) обернено пропорційна активності антитромбіну III.

Проводять перевірку придатності кількісного визначення та обчислюють активність випробовуваного препарату звичайними статистичними методами (5.3).

2.7.18. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРА ЗГОРТАННЯ КРОВІ ЛЮДИНИ II

Кількісне визначення фактора згортання крові людини II проводять за подальшою специфічною активністю утворення фактора IIa. Активність фактора IIa оцінюють порівнянням кількості, необхідної для розщеплення специфічного хромогенного пептидного субстрату, з кількістю міжнародного стандарту або стандартного препарату, каліброваного в Міжнародних одиницях (МО).

МО – активність фактора II, що міститься у зазначеній кількості міжнародного стандарту, що складається з ліофілізованого концентрату фактора згортання крові людини II. Еквівалент МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня організація охорони здоров'я.

Хромогенний метод кількісного визначення включає два послідовні етапи: залежна від зміїної отрути активація фактора II із подальшим ферментативним розщепленням хромогенного субстрату фактора IIa з утворенням хромофора, який кількісно визначається спектрофотометрично. У відповідних

умовах випробування існує лінійна залежність між швидкістю утворення фактора IIa та розщепленням хромогенного субстрату.

РЕАКТИВИ

Специфічний активатор фактора II із зміїної отрути (екарин). Білок, одержаний із отрути піщаної ефи (*Echis carinatus*), що специфічно активує фактор II. Відновлюють відповідно до інструкцій виробника. Відновлений препарат зберігають за температури 4 °С та використовують протягом 1 місяця.

Хромогенний субстрат фактора IIa. Специфічний хромогенний субстрат для фактора IIa, наприклад H-D-фенілаланіл-L-піпекोलіл-L-аргінину-4-нітроанліду дигідрохлорид, 4-толуолсульфоніл-гліцил-пролів-L-аргінину-4-нітроанліду, H-D-циклогексилгліцил- α -амінобутирил-L-аргінину-4-нітроанліду, D-циклогексилгліцил-L-аланіл-L-аргінину-4-нітроанліду діацетат. Відновлюють відповідно до інструкцій виробника.

Буфер для розведення. Розчин, що містить 6.06 г/л *трис(гідроксиметил)амінометану Р*, 17.53 г/л *натрію хлориду Р*, 2.79 г/л (*етилендинітрило*)*тетраоцтової кислоти Р* та 1 г/л *альбуміну бика Рабо альбуміну людини Р*. За потреби доводять значення рН до 8.4 із використанням *хлористоводневої кислоти Р*.

МЕТОД

Випробовуваний розчин. Випробовуваний препарат розбавляють буфером для розведення, отримуючи розчин із вмістом 0.015 МО/мл фактора II. Готують не менше трьох подальших розведень із використанням того ж буфера.

Стандартний розчин. Стандартний препарат розбавляють буфером для розведень, отримуючи розчин із вмістом 0.015 МО/мл фактора II. Готують не менше трьох подальших розведень із використанням того ж буфера.

Усі розчини безпосередньо перед випробуванням нагрівають на водяній бані до температури 37 °С.

Наведені нижче умови стосуються визначення з використанням мікропланшета. Якщо кількісне визначення проводять у пробірках, об'єми коригуються за умови збереження пропорцій у суміші.

У кожному лунку мікропланшета, витриманого за температури 37 °С, додають 25 мкл кожного розведення випробовуваного або стандартного розчинів. До вмісту кожної лунки додають 125 мкл буфера для розведення, потім 25 мкл екарину та інкубують точно 2 хв. У кожному лунку додають 25 мкл хромогенного субстрату фактора IIa.

Реєструють швидкість зміни оптичної густини (2.2.25) за довжини хвилі 405 нм безперервно про-