

додаванням 0.050 мл 50 % (об/об) розчину кислоти льодяної оцтової Р.

Розщеплення хромогенного субстрату активованим білком С (АРС) обумовлює виділення хромофора рНА в кількості, пропорційній вмісту білка С людини в препараті. Вимірюють оптичну густина за довжини хвилі 405 нм. Віднімають оптичну густина холостого розчину від оптичної густини випробовуваного зразка. Перевіряють ▽ придатність кількісного визначення та обчислюють активність випробовуваного препарату ▲, використовуючи звичайні методи статистичного аналізу (5.3).

## 2. ВИЗНАЧЕННЯ ЗГОРТАННЯ

Активність білка С людини оцінюють після розщеплення до АРС за допомогою активатора, виділеного з отрути *Agkistrodon contortrix contortrix*. ▽ Отриманий ▲ АРС інактивує фактори Va та VIIIa і, таким чином, пролонгує АРТТ-активованій частковий тромбoplastиновий час системи, в якій наявні всі фактори згортання, постійно та в надлишку, крім білка С людини, який отримують із випробовуваного препарату. Пролонгація часу згортання пропорційна концентрації білка С людини в препараті.

Активність білка С людини визначають порівнянням здатності випробовуваного препарату подовжувати час згортання з такою самою здатністю стандартного препарату білка С людини, каліброваного в Міжнародних одиницях (МО). МО — це активність зазначеної кількості міжнародного стандарту білка С людини. Еквівалент МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня організація охорони здоров'я.

Реактиви можуть бути придбані окремо у різних виробників або у складі комерційних наборів. Методики та реактиви можуть істотно відрізнятися залежно від виробника, тому потрібно точно дотримуватися інструкції фірми-виробника. Основні вимоги випробування наведені в прикладі, представленому нижче.

### РЕАКТИВИ

*Буфер для розведення рН 7.4.* Ізотонічний нехелатуючий буфер.

*Плазма, дефіцитна за білком С людини.* Цитратна плазма людини, що не містить кількості білка С людини, що піддається вимірюванню. Відновлюють та зберігають відповідно до інструкції виробника.

*Активатор білка С людини.* Білок, виділений з отрути *Agkistrodon contortrix contortrix*, є специфічним активатором білка С людини. Відновлюють та зберігають відповідно до інструкції виробника.

*Активатор згортання.* Можна використовувати підходящий АРТТ-реактив, що містить фосфоліпиди та

контактний активатор. Його можна комбінувати з активатором білка С людини.

### МЕТОД

Відновлюють або розморожують випробовуваний препарат відповідно до інструкції виробника. Додають розчин буфером для розведення з рН 7.4 для отримання не менше 3 окремих розведень для кожного препарату в інтервалі концентрації 0.010–0.150 МО/мл, бажано в двох повторностях.

Змішують 1 об'єм кожного розведення з 1 об'ємом плазми, дефіцитної за білком С людини, та з 1 об'ємом активатора білка С людини (якщо доцільно, в поєднанні з АРТТ-реактивом). Усі змішувані компоненти заздалегідь нагрівають до температури 37 °С. Додають 1 об'єм 0.025 М розчину кальцію хлориду Р, заздалегідь нагрітого до 37 °С, та реєструють час згортання.

Час згортання пропорційний концентрації білка С людини в кожному розведенні. Перевіряють ▽ придатність кількісного визначення та обчислюють активність випробовуваного препарату ▲, використовуючи звичайні методи статистичного аналізу (5.3).

#### 2.7.31. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА S ЛЮДИНИ

Білок S людини — це вітамін К-залежний білок плазми, що діє як кофактор антикоагуляційних функцій під час активації білка С (АРС). Активність білка S людини може визначатися за допомогою аналізу коагулюючої активності, що наведений нижче та чутливий до здатності білка S людини прискорювати інактивацію фактора Va за допомогою АРС. На практиці кількісне визначення передбачає додавання білка S людини до суміші реактивів, яка містить АРС, фактор Va та плазму дефіциту за білком S людини. Збільшення часу згортання пропорційно концентрації білка S людини в препараті. Методам, в яких АРС додається безпосередньо як реактив, надається перевага порівняно з методами, в яких АРС отримують у процесі аналізу під час додавання специфічного активатора білка С людини, виділеного зі зміїної отрути. Активацію згортання ініціюють додаванням активуючого реактиву, наприклад тромбoplastину або активованого фактора X, разом із фосфоліпидами та кальцію хлоридом. У процесі аналізу в плазмі дефіцитної за білком S людини після активації процесу згортання крові фактор Va утворюється з фактора V. Методика кількісного визначення має гарантувати, що білок S людини є єдиним обмежуючим фактором.

Активність білка S людини оцінюють порівнянням здатності випробовуваного препарату збільшувати час згортання крові з аналогічною здатністю стандартного препарату білка S людини, відкаліброваного