

## 2.7. Біологічні методи кількісного визначення

стерилізуючою фільтрацією (0.2 мкм) та зберігають за температури 2-8 °С до 2 тижнів.

### МЕТОД

Готують 2 серії з 4 або 5 розведень у відповідному інтервалі концентрацій інгібітора  $\alpha$ -1-протеїнази людини для обох зразків – випробовуваного та стандартного – з використанням трис-альбумін буферного розчину.

Переносять 50 мкл розведень стандартного розчину в лунки  $\blacktriangledown$  мікропланшета  $\blacktriangleleft$  та в кожен лунку додають 150 мкл розчину панкреатичної еластази свині, розведеного до відповідної концентрації трис-альбумін буферним розчином. Інкують протягом заданого періоду часу (3-10 хв) за кімнатної температури. Оскільки активність розчинів різної панкреатичної еластази свині може відрізнятися, концентрацію еластази можна скорегувати відповідно до активності контрольного розчину, що містить еластазу, але без інгібітора  $\alpha$ -1-протеїнази людини, щоб розчин демонстрував потрібну зміну оптичної густини за довжини хвилі 405 нм у реальних умовах проведення аналізу.

Додають у кожен лунку 100 мкл розчину хромогенного субстрату *N*-сукциніл-три-*L*-аланіл 4-*p*-нітроаніліду (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA), відновленого в *диметилсульфоксиді P*, для отримання розчину з концентрацією 4.5 мг/мл, потім доводять трис-альбумін буферним розчином до концентрації 0.45 мг/мл. негайно починають вимірювання зміни оптичної густини (2.2.25) за довжини хвилі 405 нм із використанням  $\blacktriangledown$  мікропланшета-рідера  $\blacktriangleleft$ , продовжуючи вимірювання не менше 5 хв. Обчислюють швидкість змінення оптичної густини ( $\Delta A/xv$ ). Як альтернативний метод можна використовувати кількісне визначення в кінцевій точці зупиненням реакції кислотою оцтовою та вимірюванням оптичної густини за довжини хвилі 405 нм. Якщо аналіз проводять у пробірках із застосуванням спектрофотометрів для контролю зміни оптичної густини за довжини хвилі 405 нм, то об'єми розчинів реактивів змінюються пропорційно.

Швидкість змінення оптичної густини ( $\Delta A/xv$ ) зворотньо пропорційна активності інгібітора  $\alpha$ -1-протеїнази людини.

Перевіряють  $\blacktriangledown$  придатність випробування та обчислюють активність випробовуваного препарату  $\blacktriangleleft$ , використовуючи звичайні методи статистичного аналізу (5.3).

### 2.7.34. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ІНГІБІТОРА С1-ЕСТЕРАЗИ ЛЮДИНИ

Кількість інгібітора С1-естерази людини у випробовуваному препараті визначають порівнянням його здатності інгібувати С1-естеразу із відповідною

здатністю стандартного препарату, каліброваного в Міжнародних одиницях (МО). МО — активність, що міститься у зазначеній кількості міжнародного стандартного препарату концентрату інгібітора С1-естерази плазми людини. Еквівалент МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня організація охорони здоров'я. Різні кількості випробовуваного препарату змішують із надлишком С1-естерази та визначають залишкову активність С1-естерази за допомогою придатного хромогенного субстрату.

Можна використовувати реактиви, які містяться в складі комерційних наборів або окремо. Методики та реактиви можуть відрізнятися в різних наборах, тому потрібно точно дотримуватись інструкції фірми-виробника. Істотні вимоги методики наведені нижче в прикладі кінетичного методу з використанням  $\blacktriangledown$  мікропланшета  $\blacktriangleleft$ .

Відновлюють препарат відповідно до зазначень на етикетці. Готують відповідну серію не менше трьох розведень випробовуваного та стандартного препаратів, починаючи з концентрації 1 МО/мл інгібітора С1-естерази із використанням придатного буферного розчину рН 7.4, що містить 9 г/л *натрію хлориду P* та або 10 г/л *альбуміну людини P*, або 10 г/л альбуміну бика *P*. Усі розведення доводять до температури 37 °С. У лунки  $\blacktriangledown$  мікропланшета  $\blacktriangleleft$  додають придатну кількість одного з розведень випробовуваного або стандартного розчинів, інкують за температури 37 °С. У кожен лунку додають придатну кількість розчину С1-естерази та інкують за температури 37 °С протягом 5 хв. Додають відповідну кількість придатного специфічного хромогенного субстрату, наприклад метоксикарбоніл-*L*-лізил ( $\epsilon$ -бензилоксикарбоніл) -гліцил-*L*-аргінін-4-нітроаніліду. Реєструють швидкість зміни оптичної густини ( $\Delta A/xv$ ) за довжини хвилі 405 нм. У позитивному контролі замість інгібітора С1-естерази використовують буферний розчин рН 7.4. Для препаратів, які можуть проявляти протеолітичну активність, випробування проводять використовуючи придатну холосту пробу, що складається з випробовуваного препарату, буферного розчину рН 7.4 та хромогенного субстрату.

Обчислюють кількість інгібітора С1-естерази, використовуючи звичайні методи статистичного аналізу, наприклад модель відношення кутових коефіцієнтів (5.3).