

Відновлюють окремо випробовуваний препарат та стандартний препарат відповідно до зазначень на етикетці та використовують негайно. ▽ Якщо доречно ▲, визначають кількість присутнього гепарину (2.7.12) та нейтралізують гепарин, наприклад, додаванням *протаміну сульфату P* (10 мкг протаміну сульфату нейтралізують 1 МО гепарину). Проводять попереднє розчинення випробовуваного препарату та стандартного препарату в плазмі, дефіцитній за фактором XI (наприклад, *плазми субстрат P3*) до отримання розчинів, що містять 0.5-2.0 одиниць/мл. Готують кожен препарат як мінімум у 3 розведеннях бажано в 2 повторностях, використовуючи придатний буферний розчин (наприклад, *імідазольний буферний розчин рН 7.3 P*), що містить 10 г/л альбуміну бика або альбуміну людини. Використовують ці розчини негайно.

Для визначення часу згортання використовують відповідний прилад або проводять аналіз у пробірках, що інкубуються у водяній бані за температури 37 °С. У кожен пробірку вносять по 0.1 мл плазми, дефіцитної за фактором XI (наприклад, *плазми субстрат P3*), та по 0.1 мл одного з розведень стандартного препарату або випробовуваного препарату. У кожен пробірку додають по 0.1 мл придатного реактиву активатора часткового тромбoplastинного часу (АРТТ), що містить фосфоліпід та контактний активатор, та інкубують суміш протягом рекомендованого часу за температури 37 °С. У кожен пробірку додають по 0.1 мл 3.7 г/л розчину *кальцію хлориду P*, попередньо підігрітого до температури 37 °С. Використовуючи секундомір, вимірюють час згортання, тобто інтервал часу між додаванням кальцію хлориду та першими ознаками утворення фібрину. Наведені в тексті об'єми можуть бути адаптовані до АРТТ-реактиву та апаратури, що використовується. Обчислюють активність, використовуючи звичайні методи статистичного аналізу (наприклад, 5.3).

### 2.7.25. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ІНГІБІТОРА ПЛАЗМІНУ ЛЮДИНИ

Інгібітор плазміну людини, що також має назву  $\alpha 2$ -антиплазмін людини, є білком плазми, який інгібує шлях активації фібринолізу за участю плазміну (серинової протеази) швидким утворенням комплексу з вільним плазміном. Крім того, в процесі згортання крові інгібітор плазміну людини утворює поперечний зв'язок з фібриновими нитками за допомогою фактора XIII та перешкоджає зв'язуванню проферменту плазміногена з фібрином.

Активність інгібітора плазміну людини визначають порівнянням здатності випробовуваного препарату інгібувати розщеплення специфічного хромогенного субстрату під дією плазміну з такою самою здатністю стандартного зразка інгібітора плазміну людини. Розщеплення хромогенного субстрату плазміном

дає вихід хромофорів, кількісний вміст яких може бути визначений спектрофотометрично.

Окремі реактиви для кількісного визначення можуть бути придбані окремо або у складі комерційних наборів. Допускається застосовувати як метод кінцевої точки, так і кінетичний метод. Методики та реактиви можуть відрізнятися в різних наборах, тому потрібно точно виконувати інструкцію виробника. Основні вимоги методики наведені нижче на прикладі кінетичного методу з використанням ▽ мікропланшета ▲.

### РЕАКТИВИ

*Буфер для розведення рН 7.5.* Відповідно до інструкцій виробника використовують придатний буфер. За потреби коригують значення рН.

*Плазмін.* Перевага надається препарату плазміну людини, який не містить значних кількостей інших протеаз. Проводять розчинення та зберігають відповідно до інструкції виробника.

*Хромогенний субстрат для плазміну.* Використовують відповідний придатний специфічний для плазміну хромогенний субстрат: *H-D-циклогексилаланіл-норваліл-лізил-p-нітроаніліну гідрохлорид (H-D-СНА-Nva-Lys-pNA.HCl)* або *L-піроглутаміл-L-фенілаланіл-L-лізил-p-нітроаніліну гідрохлорид (Glp-Phe-Lys-pNA.HCl)*. Розчиняють у воді *P* для отримання придатної концентрації відповідно до інструкції виробника.

### МЕТОД

▽ Різну кількість випробовуваного препарату змішують із заданою кількістю плазміну, та визначають залишкову активність плазміну із використанням відповідного придатного хромогенного субстрату. ▲

■ Випробовуваний препарат розводять або розморожують відповідно до інструкції виробника. Розводять буфером для розведення рН 7.5 та готують не менше 2 незалежних серій у 3 або 4 розведеннях для обох зразків — випробовуваного та стандартного.

Змішують 0.020 мл кожного розведення з 0.020 мл буфера для розведення рН 7.5 та отриманий розчин нагрівають до температури 37 °С. Додають 0.040 мл розчину плазміну (концентрація, яку використовують у випробуванні, знаходиться в інтервалі значень 0.2 нкат/мл — 1.6 нкат/мл), нагрітого до 37 °С, та витримують за температури 37 °С протягом 1 хв. Додають у кожен суміш 0.020 мл розчину хромогенного субстрату, підігрітого до температури 37 °С. Негайно вимірюють зміну оптичної густини за довжини хвилі 405 нм (2.2.25), використовуючи рідер для мікропланшетів. Обчислюють швидкість зміни оптичної