

Комплемент-ініційований гемоліз

Для вимірювання ступеня гемолізу за умови використання методу А до випробовуваного зразка додають 600 мкл попередньо нагрітого до температури 37 °С барбітал-альбумінового буферного розчину, обережно ресуспендують клітини повторними піпетуваннями (не менше 5 разів). Поміщають кювету в спектрофотометр з тримачем кювет, що термостатується. Через 2 хв додають 200 мкл розведеного комплементу мурчака (125-200 СН₅₀/мл), ретельно перемішують двократним піпетуванням. негайно після другого піпетування починають реєстрацію оптичної густини в залежності від часу (за довжини хвилі 541 нм), як компенсаційну рідину використовують барбітал-альбуміновий буферний розчин. Вимірювання припиняють за умови очевидного проходження графіком точки перегину залежності оптичної густини від часу ▽ (якщо оптична густина як функція часу явно перевищила точку перегину) ▲.

Для вимірювання ступеня гемолізу за умови використання методу Б до кожної пробірки додають 900 мкл попередньо нагрітого до температури 37 °С барбітал-альбумінового буферного розчину, обережно ресуспендують клітини повторними піпетуваннями (не менше 5 разів). ▽ Мікропланшети ▲ перед початком випробування, мають бути попередньо нагріті до температури 37 °С. Переносять 240 мкл кожного розчину в 4 лунки ▽ мікропланшета ▲, потім інкубують планшет протягом 6 хв за температури 37 °С, обережно перемішують кожні 10 с. Додають до кожної лунки ▽ мікропланшета ▲ 60 мкл розведеного комплементу мурчака (150 СН₅₀/мл). Перемішують протягом 10 с та негайно починають реєстрацію оптичної густини за довжини хвилі 541 нм за температури 37 °С. Вимірювання проводять кожні 20 с. Вимірювання припиняють за умови очевидного проходженні графіком точки перегину залежності оптичної густини від часу ▽ (якщо оптична густина як функція часу явно перевищила точку перегину) ▲.

Аналіз даних. Для кожної кювети/пробірки/лунки визначають нахил (S) гемолізої кривої в ▽ приблизній ▲ точці перегину шляхом сегментації ділянки з найбільш крутим нахилом у відповідні проміжки часу (наприклад, $\Delta t = 1$ хв), та обчислюють значення S між сусідніми точками перетину, яке виражається як ΔA на хвилину. Найбільше значення для S приймають як S_{exp} . Крім того, визначають оптичну густина на початку вимірювання (A_0) екстраполяцією кривої, яка майже лінійна та паралельна осі часу, протягом перших декількох хвилин. Корегують значення S_{exp} , використовуючи формулу:

$$S' = \frac{S_{\text{exp}}}{A_0}$$

Обчислюють середнє арифметичне значень S' для кожного ▽ препарату ▲ (випробовуваного та стандартного розчинів).

Обчислюють індекс Fc-функції (I_{Fc}) за формулою:

$$I_{Fc} = \frac{100 \times (\bar{S}' - \bar{S}'_c)}{\bar{S}'_1 - \bar{S}'_c}$$

\bar{S}' = середнє арифметичне коригованого кута нахилу випробовуваного ▽ препарату ▲;

\bar{S}'_1 = середнє арифметичне коригованого кута нахилу стандартного ▽ препарату ▲;

\bar{S}'_c = середнє арифметичне коригованого кута нахилу контролю комплементу.

Обчислюють індекс Fc-функції для випробовуваного препарату: значення має бути не менше зазначеного в листку-вкладиші, що додається до стандартного препарату.

2.7.12. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕПАРИНУ В ФАКТОРАХ ЗГОРТАННЯ КРОВІ

Кількісне визначення гепарину проводять як комплексу з антитромбіном III (АТ) за його здатності інгібувати фактор згортання крові Ха (анти-Ха-активність). У реакційній суміші підтримують надлишок АТ для забезпечення постійної концентрації комплексу гепарину з АТ. Фактор Ха нейтралізують комплексом гепарину з АТ, а залишок фактора гідролізується Ха-специфічним хромофорним пептидним субстратом із вивільненням хромофора. Кількість хромофора зворотньопропорційна активності гепарину.

Хромогенний субстрат фактора Ха. Специфічний хромогенний субстрат для фактора Ха, наприклад *N*-бензоіл-L-ізолейцил-L-глутаміл-гліцил-L-аргініну-4-нітроаніліду гідрохлорид. Відновлюють відповідно до інструкції виробника.

Буфер для розведень. Розчин 6.05 г/л *трис(гідроксиметил)амінометану Р*. За потреби доводять значення рН до 8.4 з використанням *хлористоводневої кислоти Р*.

Випробовуваний розчин. Випробовуваний препарат розбавляють буфером для розведень до отримання розчину з очікуваним вмістом 0.1 МО/мл гепарину.

Стандартний розчин. Стандартний препарат гепарину розбавляють буфером для розведень, отримуючи розчин з очікуваним вмістом 0.1 МО/мл гепарину.

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

Перед початком випробування всі розчини ■ нагрівають на водяній бані до температури 37 °С.