

тягом 3 хв та отримують середню швидкість зміни оптичної густини ( $\Delta A/xv$ ). За неможливості безперервного моніторингу реєструють оптичну густину за довжини хвилі 405 нм із придатними послідовними інтервалами, наприклад, тривалістю 40 с; будують лінійний графік залежності оптичної густини від часу та обчислюють  $\Delta A/xv$  як кут нахилу отриманої прямої. Із значень  $\Delta A/xv$  для кожного розведення стандартного та випробовуваного препаратів обчислюють активність випробовуваного препарату та перевіряють  $\blacktriangledown$  придатність кількісного  $\blacktriangle$  визначення звичайними статистичними методами (5.3).

### 2.7.19. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРА ЗГОРТАННЯ КРОВІ ЛЮДИНИ Х

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

МО – активність фактора Х, що міститься в зазначеній кількості міжнародного стандарту, що складається з ліофілізованого концентрату фактора згортання крові людини Х. 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 Х із подальшим ферментативним розщепленням хромогенного субстрату фактора Ха з утворенням хромофора, який кількісно визначається спектрофотометрично. У відповідних умовах випробування існує лінійна залежність між швидкістю утворення фактора Ха та розщепленням хромогенного субстрату.

#### РЕАКТИВИ

*Специфічний активатор фактора Х із отрути ланцюгової гадюки (RVV).* Білок, одержуваний із отрути ланцюгової гадюки (*Vipera russelli*)<sup>N</sup>(*Daboia russelli*, дабойя Рассела)<sup>N</sup>, що специфічно активує фактор Х. Відновлюють відповідно до інструкцій виробника. Відновлений препарат зберігають при температурі 4 °С та використовують протягом 1 місяця.

*Хромогенний субстрат фактора Ха.* Специфічний хромогенний субстрат для фактора Ха, наприклад *N*- $\alpha$ -бензилоксикарбоніл-D-аргініл-L-гліцил-L-аргініну-4-нітроаніліду дигідрохлорид, *N*-бензоіл-L-ізолейцил-L-глутаміл-гліцил-L-аргінін-4-нітроаніліду гідрохлорид, метансульфоніл-D-лейцил-гліцил-L-аргініну-4-нітроанілід, метоксикарбоніл-D-циклогексилаланіл-гліцил-L-

аргініну-4-нітроаніліду ацетат. Відновлюють відповідно до інструкцій виробника.

*Буфер для розведення.* Розчин, що містить 3.7 г/л *трис(гідроксиметил)амінометану Р*, 18.0 г/л *натрію хлориду Р*, 2.1 г/л *імідазолу Р*, 0.02 г/л *гексаметричну броміду Р* та 1 г/л *альбуміну бика Р* або *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 0.18 МО/мл фактора Х. Готують не менше трьох подальших розведень з використанням того ж буфера.

*Стандартний розчин.* Стандартний препарат розбавляють буфером для розведення, отримуючи розчин із вмістом 0.18 МО/мл фактора Х. 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 відносяться до визначення за допомогою  $\blacktriangledown$  мікропланшета  $\blacktriangle$ . Якщо кількісне визначення проводять у пробірках, об'єми коригуються за умови збереження пропорцій у суміші.

У кожному лунку  $\blacktriangledown$  мікропланшета  $\blacktriangle$ , витриманого за температури 37 °С, додають 12.5 мкл кожного розведення випробовуваного або стандартного розчинів. До вмісту кожної лунки додають 25 мкл RVV та інкубують точно 90 с. У кожному лунку додають 150 мкл хромогенного субстрату фактора Ха, розведеного у співвідношенні 1:6 буфером для розведення.

Реєструють швидкість зміни оптичної густини (2.2.25) за довжини хвилі 405 нм безперервно протягом 3 хв та отримують середню швидкість зміни оптичної густини ( $\Delta A/xv$ ). За неможливості безперервного моніторингу, реєструють оптичну густину за довжини хвилі 405 нм із придатними послідовними інтервалами, наприклад, тривалістю 40 с; будують лінійний графік залежності оптичної густини від часу та обчислюють  $\Delta A/xv$  як кут нахилу отриманої прямої. Із значень  $\Delta A/xv$  для кожного розведення стандартного та випробовуваного препаратів обчислюють активність випробовуваного препарату та перевіряють  $\blacktriangledown$  придатність кількісного  $\blacktriangle$  визначення звичайними статистичними методами (5.3)