

### 2.7.21. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРА ФОН ВІЛЛЕБРАНДА ЛЮДИНИ

Біологічні функції фактора фон Віллебранда людини численні. В даний час для його кількісного визначення використовують активність кофактора ристоцетину та колаген-зв'язуючу активність. Де це застосовується, рівень активності фактора фон Віллебранда людини визначають порівнянням (в заданих умовах) його активності з активністю стандартного препарату, каліброваного в Міжнародних одиницях (МО).

МО – активність, що міститься у зазначеній кількості міжнародного стандарту, що складається з ліофілізованого концентрату фактора фон Віллебранда людини. Еквівалент МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня організація охорони здоров'я.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КОФАКТОРА РІСТОЦЕТИНУ

Активність кофактора ристоцетину фактора фон Віллебранда визначають вимірюванням аглютинації суспензії тромбоцитів у присутності ристоцетину А. Визначення активності кофактора ристоцетину для кількісних методів аналізу можна проводити за допомогою автоматичних приладів, а також для напівкількісних методів аналізу візуальною оцінкою кінцевої точки аглютинації в серії розведень. Перевагу надають кількісному методу аналізу.

#### РЕАКТИВИ

*Суспензія тромбоцитів.* Використовують стандартизовані та, наприклад, фіксовані формальдегідом або параформальдегідом препарати свіжовиділених та відмитих тромбоцитів людини. Суспензія також може бути ліофілізованою. За потреби додають відповідну кількість ристоцетину А. Деякі реактиви тромбоцитів вже можуть містити ристоцетин А.

*Стандартний препарат.* Стандартним препаратом фактора фон Віллебранда є міжнародний стандарт ВООЗ концентрату фактора фон Віллебранда.

#### МЕТОД

*Напівкількісний метод аналізу.* Готують придатні розведення випробовуваного препарату та стандартного препарату, використовуючи як розріджувач розчин, що містить 9 г/л натрію хлориду Р та 10-50 г/л альбуміну людини Р. До кожного розведення додають придатну кількість суспензії тромбоцитів та, за потреби, ристоцетин А. Змішують на предметному склі за допомогою обережних кругових рухів протягом 1 хв. Витримують 1 хв та зчитують результат на темному тлі з боковим освітленням. Останнє розведення, в якому чітко спостерігається помітна аглютинація, вказує титр кофактора ристоцетину у

зразку. Як негативний контроль використовують розчинник.

*Кількісний метод аналізу.* Відновлюють весь вміст 1 ампули випробовуваного препарату та стандартного препарату додаванням відповідної кількості рекомендованого розчинника (наприклад, води Р); використовують негайно. До відновлених препаратів додають достатню кількість попереднього розчинника для отримання розчинів із концентрацією 0.5-2.0 МО/мл. Попередній розчинник складається з ізотонічного нехелатуючого буфера, що містить, наприклад, 1-5 % альбуміну людини або альбуміну бика та трис(гідроксиметил)амінометан або імідазол, забуферений відповідним чином.

Випробування виконують відповідно до інструкцій виробника з використанням не менше 2 серій розведень та такою кількістю розведень, які потрібні для отримання у сукупності не менше 3 різних концентрацій у лінійному ряді кількісного визначення.

Перевіряють ▽ придатність результатів випробування та обчислюють ▲ активність випробовуваного препарату, використовуючи звичайний метод статистичного аналізу (наприклад, 5.3).

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОЛАГЕНУ

Зв'язування колагену визначають методом сорбційного імуноферментного аналізу на покритих колагеном ▽ мікропланшетах ▲. Метод заснований на специфічному зв'язуванні фактора фон Віллебранда з фібрилами колагену та подальшому зв'язуванні поліклонального кон'югованого антитіла до фактора фон Віллебранда з ферментом, що за умови додавання хромогенного субстрату дає продукт, який можна кількісно визначити спектрофотометрією. У певних умовах існує лінійна залежність між колаген-зв'язуючою активністю фактора фон Віллебранда та оптичною густиною.

#### РЕАКТИВИ

*Колаген.* Використовують нативні фібрили коня або людини, що утворюють колаген типу I або III. ▽ За належних умов ▲, можна використовувати розчини колагену.

*Розчинник колагену.* 50 г глюкози Р розчиняють у воді Р, доводять значення рН 1 М розчином хлористоводневої кислоти до значення рН 2.7-2.9 та доводять до 1000 мл водою Р.

*Фосфатно-сольовий буфер (PBS).* 8.0 г натрію хлориду Р, 1.05 г динатрію гідрофосфату дигідрату Р, 0.2 г натрію дигідрофосфату Р та 0.2 г калію хлориду Р розчиняють у воді Р. Доводять значення рН до 7.2, використовуючи 1 М розчин натрію гідроксиду або 1 М розчин кислоти хлористоводневої та доводять до 1000 мл водою Р.