

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

**Определение активности факторов  
свертывания крови**

ОФС.1.8.2.0003.15  
**Вводится впервые**

---

Настоящая фармакопейная статья распространяется на методы определения активности факторов системы свертывания крови человека I, II, VII, VIII, IX, X, XI, фактора Виллебранда, антитромбина III в плазме и препаратах крови.

### ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Определение активности факторов свертывания базируется на 2 подходах:

1. Одностадийный метод. Восстановление процесса свертывания крови в дефицитной по фактору плазме после добавления препарата этого фактора (клоттинговый метод).

2. Двухстадийный метод. На первой стадии с использованием специфического кофактора активируется протеолитическая активность фактора II или фактора X с образованием соответственно активированного фактора IIa или Xa. На второй стадии количество образовавшегося активированного фактора определяют по реакции расщепления им специфического хромогенного пептида (хромогенный метод).

Возможно проведение хромогенного метода 2 способами: по кинетике образования хромогена под действием активированного фактора или по конечной точке накопления хромогена за определенное время инкубации.

Для проведения обоих методов возможно использование пластиковых пробирок, планшетов, оптико-механических, механических полуавтоматических и полностью автоматизированных коагулометров.

Во всех методах расчет активности производят при сравнении активности тестируемого образца с активностью Международного стандарта

NIBSC или вторичного стандартного образца фактора свертывания, откалиброванного относительно международного стандарта в международных единицах активности (МЕ). Эквивалентность международного стандарта в МЕ устанавливается ВОЗ. За 1 МЕ (100%) принимают активность фактора свертывания в 1,0 мл свежей нормальной пулированной плазме крови от 300 доноров. Активность может быть выражена в МЕ/мл, МЕ/флакон, МЕ/мг белка и в % от заявленного производителем количества.

## ФАКТОРЫ

### **Фактор I (фибриноген)**

#### ***Клоттинговый метод***

Определение активности фибриногена проводят методом Клаусса.

#### *Принцип метода*

При добавлении тромбина к образцу, содержащему фибриноген, наблюдается образование сгустка фибрина. При использовании тромбина с высокой активностью (~10 МЕ/мл) и образцов с низкой концентрацией фибриногена (ниже 100 мг/дцл) можно получить линейную зависимость.

Для определения фибриногена используют коммерческие тестовые системы, в состав которых входит реагент тромбина, содержащий ингибитор гепарина, и буфер для разведения образцов или коммерческий тромбин-реагент.

Концентрация фибриногена выражается в мг/дцл. Для построения калибровочного графика используют стандартный образец фибриногена или аттестованную по международному стандарту плазму-калибратор. Стандартный образец или образец плазмы-калибратора растворяют в дистиллированной воде согласно инструкции. Готовят 5 последовательных разведений стандартного образца, начиная с концентрации ~ 100 мг/дцл, с помощью буфера для разведения образцов  $pH = 7,3 \pm 0,1$ . Анализ проводят при температуре 37°C согласно инструкции к набору. Для каждого разведения трижды определяют время образования сгустка. По полученным

результатам в логарифмических координатах строят калибровочный график зависимости времени образования сгустка от концентрации фибриногена.

Готовят 2 разведения испытуемого образца с концентрацией ниже 100 мг/дцл. Для каждого разведения время образования сгустка определяют трижды. Количество фибриногена в каждом разведении определяют по калибровочному графику.

## **Фактор II (тромбин)**

### ***1. Клоттинговый метод***

Определение активности фактора II проводят с использованием в качестве субстрата человеческой плазмы, дефицитной по фактору II. Процесс свертывания активируется добавлением к смеси кальция тромбопластина.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буфер рН  $7,3 \pm 0,1$  с добавлением 0,1% бычьего или человеческого альбумина. Для построения калибровочного графика готовят серию последовательных разведений стандарта фактора II в интервале активности от 0,3 до 1 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации менее 1 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят в течение 1 ч после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . В пластиковую пробирку вносят 50 мкл плазмы, дефицитной по фактору II, и 50 мкл разведения стандарта или препарата. Смесь инкубируют при  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 120 – 240 с. Время свертывания определяют с момента добавления к смеси 200 мкл предварительно нагретого до температуры  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  кальция тромбопластина. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах. По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора II, по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора II для каждого разведения испытуемого

образца находят по калибровочному графику. Активность ФП ( $A$ ) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где  $A_x$  – активность соответствующего разведения исследуемого образца, найденная по калибровочному графику;

$k$  – разведение исследуемого образца.

## **2. Хромогенный метод**

Метод основан на сравнении ферментативной активности фактора Па, образованного после специфической активации фактора П, в отношении специфического хромогенного пептидного субстрата с такой же активностью стандартного образца (международного или аналогичного).

Фактор П активируется с помощью активатора экарина, выделенного из яда гадюки. Активированный фактор П (тромбин) селективно расщепляет хромогенный субстрат (Н-D-фенилаланин-L-пипеколил-L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид, 4-толуолсульфонилглицил-пролил-L-аргинин-4-нитроанилид, Н-D-циклогексилглицил- $\alpha$ -аминобутирил-L-аргинин-4-нитроанилид, D-циклогексилглицил-L-аланил-L-аргинин-4-нитроанилида диацетат) с образованием *n*-нитроанилина. Кинетику реакции исследуют фотометрическим методом при 405 нм. При этом значение оптической плотности пропорционально активности фактора П.

Определение фактора П хромогенным методом осуществляют с помощью специальных тестовых наборов. Анализ выполняется в соответствии с инструкцией к набору. Стандартный образец и препарат предварительно разводят плазмой, дефицитной по фактору П, до концентрации  $\sim 1$  МЕ/мл (основное разведение). Из основного разведения готовят 3 разведения стандартного образца и 3 разведения препарата трис-солевым буферным раствором рН 8,4. Каждое разведение стандартного образца определяют двукратно, полученные значения используют для построения калибровочного графика. Испытуемые образцы определяют трехкратно.

Испытания проводят в ручном режиме с использованием микропланшет и спектрофотометра, поддерживающего температуру в диапазоне  $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$  или в автоматическом режиме с использованием коагулометра.

Для проведения испытаний в ручном режиме в лунки микропланшета вносят по 25 мкл каждого разведения испытуемого препарата или стандартного образца. В каждую лунку прибавляют по 125 мкл буфера для разведения, по 25 мкл экарина и инкубируют при температуре  $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 2 мин. По истечении времени инкубации в каждую лунку вносят по 25 мкл хромогенного субстрата фактора IIa.

Определяют скорость изменения оптической плотности при длине волны 405 нм непрерывно в течение 3 мин и рассчитывают среднюю скорость изменения оптической плотности ( $\Delta A/\text{мин}$ ).

Если непрерывное измерение оптической плотности невозможно, определяют оптическую плотность при длине волны 405 нм через последовательные интервалы времени (например, через 40 с) и строят график зависимости оптической плотности от времени и рассчитывают  $\Delta A/\text{мин}$  как угол наклона прямой. Из значений  $\Delta A/\text{мин}$  каждого индивидуального разведения стандартного образца и испытуемого препарата рассчитывают активность испытуемого препарата.

### **3. Тест на отсутствие тромбина**

Определение проводят коагулометрическим методом.

Для испытаний готовят восстановленный в соответствии с инструкцией раствор препарата. При наличии в препарате гепарина его нейтрализуют добавлением протамина сульфата из расчета 10 мкг протамина сульфата на 1 МЕ гепарина.

#### *Приготовление раствора фибриногена*

0,3 г фибриногена растворяют в 100 мл, перемешивают и выдерживают 15 – 20 мин при комнатной температуре.

Срок хранения раствора 1 мес при температуре от 2 до  $8^\circ\text{C}$ .

#### *Приготовление раствора тромбина*

Лиофилизат растворяют в соответствии с инструкцией производителя, выдерживают 15 – 20 мин при комнатной температуре и разводят 0,9% раствором натрия хлорида до содержания тромбина 1 МЕ/мл.

Срок хранения раствора 6 мес при температуре минус 20°C. Раствор после оттаивания повторному замораживанию не подлежит.

#### *Ход определения*

В 2 пробирки вносят равные объемы восстановленного препарата и раствора фибриногена. В третью пробирку (контрольная проба) вносят равные объемы раствора тромбина и раствора фибриногена, перемешивают содержимое пробирок вращательными движениями. Одну пробирку с восстановленным препаратом инкубируют на водяной бане с температурой 37°C в течение 6 ч, другую пробирку с восстановленным препаратом – при комнатной температуре в течение 24 ч. Отмечают наличие или отсутствие коагуляции (сгустка).

Контрольную пробу инкубируют на водяной бане при температуре 37°C и отмечают время образования сгустка.

Критерием приемлемости результатов является коагуляция в контрольной пробе через 30 с.

### **Фактор VII**

#### ***1. Клоттинговый метод***

Определение активности фактора VII проводят с использованием человеческой плазмы, дефицитной по фактору VII. Процесс свертывания активируется добавлением к смеси кальция тромбопластина.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буфер pH 7,3 с добавлением 0,1% раствора альбумина человеческого или бычьего. Для построения калибровочного графика готовят серию последовательных разведений стандарта образца фактора VII в интервале от 0,3 до 1 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации менее 1 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца

измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят непосредственно после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . В пластиковую пробирку вносят 50 мкл плазмы, дефицитной по фактору VII и 50 мкл разведения стандарта или препарата. Смесь инкубируют при  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 120 – 240 с. Время свертывания определяют с момента добавления к смеси 200 мкл предварительно прогретого до температуры  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  кальция тромбопластина. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах. По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора VII, по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора VII для каждого разведения испытуемого образца находят по калибровочному графику. Активность FVII ( $A$ ) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где  $A_x$  – активность соответствующего разведения исследуемого образца, найденная по калибровочному графику;

$k$  – разведение исследуемого образца.

## **2. Хромогенный метод**

В присутствии тканевого фактора (TF) и ионов  $\text{Ca}^{2+}$  происходит активация фактора VII (образование FVIIa). Комплекс FVIIa, TF,  $\text{Ca}^{2+}$  и фосфолипида активирует фактор X. Активированный фактор X (FXa) селективно расщепляет хромогенный субстрат FXa-1 метоксикарбонил-D-циклогексилаланил-глицил-L-аргинин-*n*-нитроанилид-ацетат с образованием *n*-нитроанилина. Исследование образца проводят фотометрическим методом при 405 нм. Значение оптической плотности (или увеличение поглощения) пропорционально количеству фактора VII.

Определение фактора VII хромогенным методом осуществляют с помощью специальных тестовых наборов. Анализ выполняется в

соответствии с инструкцией к набору. Стандартный образец и препарат предварительно разводят плазмой, дефицитной по фактору VII, до концентрации ~ 1 МЕ/мл (основное разведение). Из основного разведения готовят с помощью буферного раствора 3 разведения стандартного образца и 3 разведения препарата трис-солевым буфером pH 7,3 – 8,0 с добавлением 0,1% человеческого или бычьего альбумина. Каждое разведение стандартного образца определяют двукратно, полученные значения используют для построения калибровочного графика. Испытуемые образцы определяют трехкратно.

Испытания проводят в ручном режиме с использованием пластиковых пробирок или микропланшет при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  или в автоматическом режиме с использованием коагулометра.

В лунки микропланшет вносят разведения испытуемого препарата или стандартного образца, добавляют кальций-тромбопластиновую смесь, раствор фактора X и инкубируют при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  от 2 до 5 мин, после чего вносят раствор хромогенного субстрата фактора Xa.

Измеряют изменение оптической плотности при длине волны 405 нм либо в кинетическом режиме, либо прерывают реакцию гидролиза через 3 – 15 мин добавлением 20% (об/об) раствора уксусной кислоты ледяной и измеряют оптическую плотность.

## **Фактор VIII**

### ***1. Клоттинговый метод***

Определение активности фактора VIII проводят с использованием человеческой плазмы, дефицитной по фактору VIII. Источником фосфолипидов, необходимых для осуществления свертывания, является АЧТВ-реагент.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буферный раствор pH  $(7,3 \pm 0,1)$ , с добавлением 0,1% раствора человеческого или бычьего альбумина. Для построения калибровочного графика готовят серию последовательных разведений стандарта, начиная от

концентрации 2 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации ~ 0,5 – 2 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят в течение 1 ч после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . В пластиковую пробирку вносят 100 мкл плазмы, дефицитной по фактору VIII, 100 мкл разведения стандарта или препарата и 100 мкл АЧТВ-реактанта и инкубируют при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 2 мин. Время свертывания фиксируют с момента прибавления к смеси 100 мкл предварительно прогретого до температуры  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  0,025 М раствора кальция хлорида. В зависимости от техники постановки анализа объемы реактивов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах. По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора VIII, по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора VIII для каждого разведения испытуемого образца находят по калибровочному графику. Активность FVIII ( $A$ ) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где  $A_x$  – активность соответствующего разведения исследуемого препарата, найденная по калибровочному графику;

$k$  – разведение исследуемого образца.

## **2. Хромогенный метод**

Количественное определение фактора VIII проводят с помощью набора реактивов, в котором фактор VIII является кофактором для фактора IXa при активации фактора X в форму Xa, расщепляющего хромогенный субстрат.

### *Принцип метода*

В присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и фосфолипидов фактор X под действием фактора IXa активируется в Xa. При избытке фактора X и оптимальных количествах  $\text{Ca}^{2+}$ , фосфолипидов и фактора IXa скорость активации фактора X

линейно зависит от количества фактора VIII. Фактор Ха гидролизует хромогенный субстрат S-2765 (N-a-Z-DArg-Gly-Arg-pNA) с высвобождением хромогенной группы pNA, окраску которой регистрируют спектрофотометрически при 405 нм. Количество образовавшегося фактора Ха и, следовательно, интенсивность окрашивания, пропорциональны активности фактора VIII в образце.

Набор реактивов для определения активности фактора VIII стабилен в течение срока, указанного производителем при температуре хранения от 2 до 8°C.

Набор реактивов содержит:

1. 7,7 мг хромогена S-2765 с добавкой синтетического ингибитора тромбина I-2581. Реактив восстанавливают в 6,0 мл стерильной воды для инъекций. Восстановленный раствор стабилен в течение 1 мес при температуре от 2 до 8°C. Перед использованием нагревают до температуры 37°C.
2. Реактив бычьих факторов: 0,3 Ед фактора IX, 2,7 МЕ фактора X и 1 НИН Ед тромбина, лиофилизированных в присутствии 40 ммоль CaCl<sub>2</sub> и 0,2 ммоль фосфолипидов. Реактив восстанавливают в 2,0 мл стерильной воды для инъекций. Восстановленный раствор стабилен в течение 12 ч при температуре от 2 до 8°C, 2 нед при температуре минус 30 °C и 1 мес при температуре минус 80°C. Не следует хранить при температуре минус 20°C. Перед использованием нагревают до температуры 37°C.
3. Концентрат ×10 трис-буфера. Стабилен в течение 1 мес при температуре от 2 до 8°C. Перед употреблением разводят стерильной водой для инъекций в соотношении 1:10.

Дополнительные реактивы:

1. Международный стандартный образец – раствор концентрата фактора свертывания VIII человека (NIBSC, Eur.Pharm.Ref.Std. BRP

Н 0920000) или плазма, откалиброванная по международному стандарту фактора VIII.

2. Контрольная нормальная или патологическая плазма, откалиброванная по международному стандарту фактора VIII.
3. 0,9% раствор натрия хлорида.
4. 20% уксусная кислота или 2% лимонная кислота (используются в методике конечной точки накопления хромогена).
5. Вода лабораторная деионизованная MillyQ.

Оборудование:

1. Пластиковые пробирки;
2. Микропланшеты;
3. Термостат 37°C;
4. Спектрофотометр 405 нм или ридер микропланшет 405 нм;
5. Калиброванные пипетки;
6. Вортекс;
7. Секундомер.

Исследуемый образец перед определением разводят до ожидаемой активности 1 МЕ/мл.

Определение можно проводить в кинетическом режиме и по конечной точке, в пробирках (макрометод) и в микропланшетах (микрометод).

#### *Калибровка*

При проведении каждого определения проводят построение калибровочной кривой. Разведение стандартного образца готовят в 2 этапа: предварительное разведение до активности 1 – 2 МЕ/мл и конечные разведения для построения калибровочной зависимости в диапазоне 0 – 2 МЕ/мл. После разведения определение следует провести в течение 30 мин.

#### *Ход определения*

##### Определение в пробирках

200 мкл разбавленного стандартного, контрольного или исследуемого образца вносят в пробирки, инкубируют в течение 3-4 мин при температуре

37°C, прибавляют 50 мкл предварительно прогретого реактива факторов, инкубируют в течение 2-4 мин при температуре 37°C и прибавляют 50 мкл раствора хромогена.

#### Определение в микропланшетах

В лунки микропланшета вносят по 50 мкл разбавленного стандартного, контрольного или исследуемого образца, инкубируют в течение 3-4 мин при 37°C, прибавляют 50 мкл предварительно прогретого реактива факторов, инкубируют в течение 2-4 мин при температуре 37°C и прибавляют 50 мкл раствора хромогена.

#### Кинетический метод определения

После прибавления раствора хромогена в течение 2 – 10 мин измеряют изменение оптической плотности раствора при 405 нм.

#### Определение по конечной точке

После прибавления раствора хромогена смесь продолжают инкубировать при температуре 37°C в течение 2 – 10 мин, после чего для остановки реакции прибавляют 50 мкл 20% уксусной или 2% лимонной кислоты. Измеряют оптическую плотность раствора против буфера при 405 нм.

#### *Расчеты*

Строят зависимость изменения оптической плотности в минуту (для кинетического метода) или оптической плотности (для определения по конечной точке) разведений стандартного раствора от концентрации в них фактора VIII. Активность в исследуемом образце определяют по калибровочной кривой с учетом предварительного разведения образца.

### **Фактор IX**

#### ***1. Клоттинговый метод***

Определение активности фактора IX проводят с использованием человеческой плазмы, дефицитной по фактору IX. Источником фосфолипидов, необходимых для осуществления свертывания, является АЧТВ-реагент.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буферный рН 7,3 с добавлением 0,1% раствора бычьего или человеческого альбумина. Для построения калибровочного графика готовят серию последовательных разведений стандарта в интервале от 0,3 до 1 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации менее 1 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят в течение 1 ч после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . В пластиковую пробирку вносят 100 мкл плазмы, дефицитной по фактору IX, 100 мкл разведения стандарта или препарата и 100 мкл АЧТВ-реактента и инкубируют при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 2 мин. Время свертывания фиксируют с момента прибавления к смеси 100 мкл предварительно прогретого до температуры  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  0,025 М раствора кальция хлорида. В зависимости от техники постановки анализа объемы реактентов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах. По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора IX, по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора IX для каждого разведения испытуемого образца находят по калибровочному графику. Активность FIX ( $A$ ) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где  $A_x$  – активность соответствующего разведения исследуемого образца, найденная по калибровочному графику;

$k$  – разведение исследуемого образца.

## **Фактор X**

### **1. Клоттинговый метод**

Определение активности фактора X проводят с использованием человеческой плазмы, дефицитной по фактору X. Процесс свертывания

активируется добавлением к смеси кальция тромбопластина.

Для разведения стандарта и препаратов используют NaCl-имидазоловый буферный раствор рН 7,3 с добавлением 0,1% раствора человеческого или бычьего альбумина. Для построения калибровочного графика готовят серию последовательных разведений стандарта фактора X в интервале от 0,3 до 1 МЕ/мл. Препарат разводят до концентрации менее 1 МЕ/мл. Анализируют 3 разведения препарата. Для каждого образца измерение времени свертывания проводят минимум 2 раза. Измерение проводят непосредственно после разведения препарата.

Анализ проводят при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . В пластиковую пробирку вносят 50 мкл плазмы, дефицитной по фактору X, и 50 мкл разведения стандарта или препарата. Смесь инкубируют при  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 120 – 240 с. Время свертывания определяют с момента добавления к смеси 200 мкл предварительно прогретого до температуры  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  кальция тромбопластина. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут варьироваться в соответствующей пропорции.

Калибровочный график строят в полулогарифмических координатах. По логарифмической оси абсцисс откладывают значения активности фактора X, по оси ординат – время свертывания соответствующих разведений стандарта. Активность фактора X для каждого разведения испытуемого образца находят по калибровочному графику. Активность фактора X ( $A$ ) в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$A = A_x \cdot k,$$

где  $A_x$  – активность соответствующего разведения исследуемого образца, найденная по калибровочному графику;

$k$  – разведение исследуемого образца.

## **2. Хромогенный метод**

Фактор X активируют с помощью полученного из змеиного яда FX-активатора. Активированный фактор X (FXa) селективно расщепляет хромогенный субстрат FXa-1 N- $\alpha$ -бензилоксикарбонил-D-аргинил-L-глицил-

L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид, N-бензоил-L-изолейцил-L-глутамил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида гидрохлорид, метансульфонил-D-лейцил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилид, метоксикарбонил-D-циклогексилаланил-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида ацетат с образованием *n*-нитроанилина. Образцы исследуют фотометрическим методом при 405 нм. Количество фактора X пропорционально увеличению оптической плотности раствора.

Определение фактора X хромогенным методом осуществляют с помощью специальных тестовых наборов. Анализ выполняется в соответствии с инструкцией к набору. Стандартный образец и препарат предварительно разводят плазмой, дефицитной по фактору X, до концентрации ~ 1 МЕ/мл (основное разведение). Из основного разведения готовят с помощью буферного раствора 3 разведения стандартного образца (в соответствии с инструкцией) и 3 разведения препарата. Каждое разведение стандартного образца определяют двукратно, полученные значения используют для построения калибровочного графика. Испытуемые образцы определяют трехкратно.

Испытания проводят в ручном режиме с использованием пластиковых пробирок или микропланшет при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  или в автоматическом режиме с использованием коагулометра.

Для проведения испытаний в ручном режиме в лунки микропланшета вносят по 12,5 мкл каждого разведения испытуемого препарата или стандартного образца, в каждую лунку прибавляют по 25 мкл специфического активатора фактора X из яда гадюки Рассела и инкубируют при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 90 с, после чего в каждую лунку вносят по 150 мкл рабочего разведения хромогенного субстрата фактора X.

Определяют скорость изменения оптической плотности при длине волны 405 нм непрерывно в течение 3 мин и рассчитывают среднюю скорость изменения оптической плотности ( $\Delta A/\text{мин}$ ) или измеряют оптическую плотность при длине волны 405 нм через последовательные

интервалы времени (например, через 30 с) и строят график зависимости оптической плотности от времени и рассчитывают  $\Delta A/\text{мин}$  как угол наклона прямой. Из значений  $\Delta A/\text{мин}$  каждого индивидуального разведения стандартного образца и испытуемого препарата рассчитывают активность испытуемого препарата.

### **Фактор Виллебранда**

Определение активности фактора Виллебранда проводят методом агглютинации или иммуноферментным методом.

Активность фактора Виллебранда определяется путем сравнения его активности с активностью стандартного образца.

#### *Метод агглютинации*

Метод основан на определении коферментной активности фактора Виллебранда при агглютинации суспензии тромбоцитов в присутствии ристоцетина А.

Испытание может проводиться количественными методами с использованием автоматизированного оборудования или полуколичественным методом путем визуальной оценки агглютинации в серии разведений.

#### *Полуколичественный метод*

Из стандартного образца и восстановленного раствора препарата готовят последовательные разведения в 0,9% растворе натрия хлорида с 1–5% раствором альбумина человека до ожидаемого содержания фактора Виллебранда 0,5, 1,0 и 2,0 МЕ/мл. По 0,05 мл каждого разведения стандартного образца и исследуемого препарата наносят на предметное стекло, добавляют по 0,1 мл суспензии тромбоцитов с ристоцетином и перемешивают в течение 1 мин. В качестве отрицательного контроля используют раствор разведения. После 1 мин инкубации при комнатной температуре визуально оценивают агглютинацию тромбоцитов. Максимальное разведение, при котором происходит агглютинация

тромбоцитов, является титром ристоцетиновой коферментной активности образца.

#### *Количественный метод*

Готовят не менее 2 серий последовательных разведений стандартного и испытуемого образцов с помощью буфера для разведения до ожидаемого содержания фактора Виллебранда 0,5, 1,0 и 2,0 МЕ/мл.

Определение проводят в соответствии с инструкцией производителя автоматизированного оборудования. Получают значения зависимости изменения оптического поглощения (степени мутности раствора) от активности фактора Виллебранда.

Определение содержания фактора Виллебранда в испытуемом препарате осуществляют с использованием коэффициентов линейного уравнения зависимости оптической плотности раствора от содержания фактора Виллебранда в стандартном образце.

#### *Иммуноферментный метод*

Метод основан на определении коллаген-связывающей активности фактора Виллебранда. При специфическом связывании фактора Виллебранда с фибриллами коллагена и последующем связывании поликлональных антител к фактору Виллебранда, конъюгированных с ферментом, после добавления хромогенного субстрата образуется хромофор, который может быть количественно определен спектрофотометрическим методом. Существует линейная зависимость между связыванием коллагена с фактором Виллебранда и оптической плотностью.

Определение проводят с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России в соответствии с инструкциями по применению.

Для испытаний готовят не менее 3 последовательных серий разведений стандартного и испытуемого образцов с помощью буфера для разведения до ожидаемого содержания фактора Виллебранда 1,0 МЕ/мл. Далее проводят

испытания в соответствии с инструкцией производителя используемой тест-системы.

### **Активированные факторы свертывания крови**

Определение проводят коагулометрическим методом.

Для испытаний готовят восстановленный раствор препарата. При наличии в препарате гепарина его нейтрализуют добавлением протамина сульфата из расчета 10 мкг протамина сульфата на 1 МЕ гепарина. Готовят разведения препарата 1:10 и 1:100 с помощью трис-буферного раствора рН 7,5.

В 3 пробирки вносят по 0,1 мл стандартной плазмы человека и по 0,1 мл раствора фосфолипидов, помещают в водяную баню с температурой  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  на 60 с, после чего в первую пробирку добавляют 0,1 мл трис-буферного раствора (контрольная проба), во вторую – 0,1 мл испытуемого препарата в разведении 1:10, в третью пробирку – 0,1 мл испытуемого препарата в разведении 1:100. Далее к содержимому каждой пробирки немедленно добавляют по 0,1 мл нагретого до температуры  $37^\circ\text{C}$  раствора кальция хлорида 3,7 г/л. Отмечают время формирования сгустка от момента добавления раствора кальция хлорида.

Критерием приемлемости результатов является время коагуляции в контрольной пробе в интервале от 200 до 350 с.

### **Специфическая удельная активность**

Специфическую активность факторов свертывания рассчитывают по формуле:

$$\text{Специфическая активность} = \frac{\text{Активность фактора свертывания крови, МЕ/мл}}{\text{Содержание белка, мг/мл}}$$

### **Определение активности антитромбина III**

#### ***Хромогенный метод***

Метод определения активности АТIII основан на его способности нейтрализовать тромбин в присутствии гепарина. К образцу, содержащему

АТШ, добавляют избыточные количества гепарина и тромбина. Образующийся комплекс АТШ-гепарин нейтрализует количество тромбина, пропорциональное количеству АТШ. Оставшийся тромбин селективно расщепляет хромогенный субстрат с образованием *n*-нитроанилина, абсорбцию которого определяют при 405 нм. Таким образом, количество АТШ обратно пропорционально величине поглощения свободного *n*-нитроанилина в образце.

Определение активности АТШ проводят с помощью коммерческих тестовых систем. Для построения калибровочного графика используют стандартный образец АТШ или плазму-калибратор, аттестованную по международному стандарту. Стандартный образец или плазму-калибратор растворяют в дистиллированной воде согласно указаниям в инструкции. Зависимость величины оптической плотности от активности АТШ линейна в интервале активности АТШ от 0,1 до 1,0 МЕ/мл. Используя буфер с гепарином, готовят 4 разведения стандартного образца или плазмы-калибратора с активностью АТШ от 0,1 до 1,0 МЕ/мл. Анализ проводят при температуре 37°C согласно схеме, приведенной в инструкции к набору. Для каждого разведения трижды определяют величину оптической плотности при 405 нм и в линейных координатах строят калибровочный график зависимости абсорбции от активности АТШ.

Готовят 2 разведения исследуемого образца с ориентировочной активностью АТШ менее 1,0 МЕ/мл. Определение активности АТШ в испытуемых образцах проводят при температуре 37°C согласно указаниям в инструкции к набору. Активность АТШ в испытуемых разведениях находят по калибровочному графику. Активность АТШ в исследуемом образце определяют как:

$$A = A_x \cdot k,$$

где  $A_x$  – активность АТШ в соответствующем разведении;

$k$  – разведение образца.

### **Количественное определение гепарина**

## **1. Клоттинговый метод**

Метод основан на способности гепарина за счет ингибирования ряда факторов удлинять время свертывания нормальной плазмы.

Для проведения анализа используют нормальную человеческую плазму, стандартный образец гепарина, АЧТВ-реагент и раствор хлористого кальция 0,025М. В качестве разбавителя стандартного и испытуемых образцов используют 0,9% раствор натрия хлорида. Стандартный образец гепарина растворяют в дистиллированной воде согласно указаниям в инструкции. Готовят 3 разведения стандартного образца с активностью гепарина 0,3, 0,4 и 0,5 МЕ/мл. Образцы стандарта с данными активностями должны удлинять время свертывания нормальной плазмы минимум в 1,5 раза, в противном случае следует использовать разведения с большей активностью гепарина. Параллельно готовят 3 разведения исследуемого образца таким образом, чтобы ориентировочно активность гепарина в данных разведениях попадала в интервал активности гепарина в разведениях стандартного образца.

Анализ проводят с помощью автоматического или полуавтоматического коагулометра в пластиковых пробирках при температуре 37°C. В пробирку вносят 100 мкл нормальной человеческой плазмы, 100 мкл разведения стандартного или исследуемого образца или 100 мкл 0,9% раствора натрия хлорида (холостой опыт), добавляют по 100 мкл АЧТВ-реагента и инкубируют смесь в течение 120 – 240 с при температуре (37±0,1)°С. Затем в пробирку вносят 100 мкл предварительно прогретого до температуры 37°C 0,025М раствора кальция хлорида и фиксируют время свертывания образца. В зависимости от техники постановки анализа объемы реагентов могут быть изменены с соблюдением пропорции. Время свертывания нормальной плазмы (холостой опыт) должно составлять 25 – 40 с. Для каждого разведения стандартного и исследуемого образцов время свертывания определяют трижды.

## **2. Хромогенный метод**

Метод основан на расщеплении хромогенного субстрата, специфического для активированного фактора X (FXa). При внесении в образец, содержащий гепарин, избыточных количеств АТШ и FXa происходит ингибирование количества FXa, пропорционального количеству гепарина. Оставшийся FXa отщепляет от специфического хромогенного субстрата *n*-нитроанилин, абсорбцию которого определяют при 405 нм. Таким образом, величина абсорбции обратно пропорциональна количеству гепарина. Данным методом определяют содержание как нефракционированного, так и низкомолекулярного гепарина в анти-Ха единицах.

Количество гепарина хромогенным методом определяют с помощью коммерческих тестовых систем. Для построения калибровочного графика используют стандартный образец гепарина или плазму-калибратор, аттестованную по международному стандарту. Стандартный образец или плазму-калибратор разводят в дистиллированной воде согласно инструкции. Готовят 4 разведения стандартного образца с концентрацией гепарина менее 1 анти-Ха ед/мл, используя буфер для разведения рН 8,4. Анализ проводят при температуре 37°C в соответствии с инструкцией к набору. Для каждого разведения трижды определяют абсорбцию при 405 нм, после чего в линейных координатах строят калибровочный график зависимости величины поглощения от концентрации гепарина. Зависимость линейна в диапазоне концентраций гепарина 0 – 1,0 анти-Ха ед/мл.

Для исследуемого образца готовят 2 разведения с концентрацией гепарина менее 1 анти-Ха ед/мл. Анализ проводят согласно инструкции к набору при температуре 37°C. Для каждого разведения величину абсорбции определяют трижды.

Определение проводят в ручном режиме с использованием пластиковых пробирок, микропланшет или в автоматическом режиме с использованием коагулометра.

Для проведения испытаний в ручном режиме в лунки микропланшета вносят по 20 мкл стандартной плазмы человека и 20 мкл раствора антитромбина III. Далее в эти лунки вносят соответственно по 20 , 60 , 100 и 140 мкл испытуемого или стандартного препарата и доводят объем раствора в каждой лунке до 200 мкл буфером (активность гепарина в конечной реакционной смеси 0,02 - 0,08 МЕ/мл).

По 40 мкл из каждой лунки планшета переносят во вторую серию лунок, в которые добавляют по 20 мкл раствора бычьего фактора Ха и инкубируют при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 30 с, после чего в лунки добавляют по 40 мкл раствора хромогенного субстрата фактора Ха и вновь инкубируют при температуре  $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 3 – 15 мин, измеряя скорость расщепления субстрата путем постоянного измерения оптической плотности при длине волны 405 нм (кинетический режим) или после остановки реакции добавлением 20% (об/об) раствора уксусной кислоты ледяной (конечная точка определения).

Содержание гепарина в испытуемом разведении определяют по калибровочному графику с учетом разведения.

При проведении исследований в автоматическом режиме с использованием коагулометра получают значения зависимости изменения оптической плотности от концентрации гепарина.