

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПРОТЕИНА С

В настоящей общей фармакопейной статье приведены примеры методики количественного определения человеческого протеина С методом определения в конечной точке с использованием планшетов для микротитрования и методики количественного определения человеческого протеина С по времени свертывания.

1. ХРОМОГЕННЫЙ МЕТОД

Человеческий протеин С представляет собой витамин К-зависимый плазменный белок, который после активации (активированный протеин С (*activated protein C*, *APC*)) подавляет свертывание крови путем протеолитического расщепления факторов Va и VIIIa. Активность человеческого протеина С определяют с помощью двухстадийного метода:

– на первой стадии человеческий протеин С в образце активируют специфическим активатором, выделенным из яда змеи;

– на второй стадии *APC* расщепляет специфический хромогенный субстрат с образованием окрашенного продукта, который может быть количественно определен спектрофотометрически.

Стадия 1



Стадия 2



Количественное определение человеческого протеина С, основано на его способности расщеплять хромогенный субстрат с образованием окрашенного продукта и оценивается путем сравнения активности испытуемого образца с активностью стандартного образца человеческого протеина С, выраженной в международных единицах.

За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца человеческого протеина С, устанавливаемого Всемирной организацией здравоохранения.

Реактивы для испытания могут быть приобретены по отдельности или в виде коммерческих наборов. Для количественного определения человеческого протеина С применяют как метод определения в конечной

точке, так и кинетический метод.

Методики и реактивы могут отличаться в разных наборах, поэтому следует придерживаться инструкции производителя набора.

РЕАКТИВЫ

Буферный раствор для разведения с рН 8,4. Растворяют 6,055 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р* и 16,84 г *цезия хлорида Р* в *воде Р*, при необходимости корректируют рН раствора (2.1.2.3) и доводят *водой Р* до объема 1000,0 мл.

Активатор человеческого протеина С. Белок, который специфично активирует человеческий протеин С, выделяют из яда гадюки *Agkistrodon contortrix contortrix*. Восстанавливают и хранят в соответствии с инструкциями производителя. Перед использованием в испытании разводят *водой Р* до концентрации 0,25 ЕД/мл.

Хромогенный субстрат для активированного протеина С. Специфический хромогенный субстрат для АРС, например, L-пироглутамил-L-пролил-L-аргинин-паранитроанилина гидрохлорид (пироGlu-Pro-Arg-pNA·HCl), растворяют в *воде Р* и доводят *водой Р* до получения концентрации 4,5 ммоль/л. Перед использованием разводят буферным раствором для разведения с рН 8,4 до концентрации 1,1 ммоль/л.

МЕТОДИКА

Испытуемый образец восстанавливают или размораживают согласно инструкциям производителя. Готовят с использованием *воды Р* не менее трех отдельных разведений до концентраций в диапазоне 0,050 – 0,200 МЕ/мл в двух повторностях. Аналогичным образом готовят разведения восстановленного стандартного образца.

Стадия 1. Смешивают по 0,025 мл каждого разведения с 0,050 мл активатора человеческого протеина С, предварительно нагретых до температуры 37 °С, и инкубируют при температуре 37 °С точно 10 мин. Для каждого разведения проводят контрольный опыт, используя *воду Р* вместо активатора человеческого протеина С.

Стадия 2. К каждой смеси прибавляют по 0,150 мл разбавленного хромогенного субстрата, предварительно нагретого до температуры 37 °С, и инкубируют точно 10 мин при температуре 37 °С. При необходимости время инкубации должно быть скорректировано таким образом, чтобы получить линейную зависимость образования хромофора от времени. Останавливают реакцию добавлением 0,050 мл раствора 50 % (об/об) *уксусной кислоты ледяной Р*.

При расщеплении хромогенного субстрата под действием АРС образуется окрашенный продукт в количестве, пропорциональном

концентрации человеческого протеина С в образце. Измеряют оптическую плотность при длине волны 405 нм. Оптическую плотность контрольного опыта вычитают из оптической плотности испытуемого образца.

Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают активность человеческого протеина С в испытуемом образце с использованием общепринятых статистических методов (2.3.12.0).

2. КЛОТТИНГОВЫЙ МЕТОД

Активность человеческого протеина С устанавливают после расщепления его до APC специфическим активатором, выделенным из яда гадюки *Agkistrodon contortrix contortrix*. Полученный APC инактивирует факторы Va и VIIIa и таким образом удлиняет активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) системы, в которой присутствуют все факторы свертывания на постоянном избыточном уровне, за исключением человеческого протеина С, который поступает в систему с добавляемым образцом. Увеличение времени свертывания пропорционально концентрации человеческого протеина С в образце.

Количественное определение человеческого протеина С, основано на его способности увеличивать время свертывания и оценивается путем сравнения активности испытуемого образца с активностью стандартного образца человеческого протеина С, выраженной в международных единицах. За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца человеческого протеина С, устанавливаемого Всемирной организацией здравоохранения.

Реактивы для испытания могут быть приобретены по отдельности или в виде коммерческих наборов.

Методики и реактивы могут отличаться в разных наборах, поэтому следует придерживаться инструкции производителя набора.

РЕАКТИВЫ

Буферный раствор для разведения с рН 7,4. Изотонический буфер, не содержащий хелатирующих соединений.

Человеческая плазма, дефицитная по протеину С. Цитратная плазма человека с содержанием человеческого протеина С ниже определяемого уровня. Восстанавливают и хранят в соответствии с инструкциями производителя.

Активатор человеческого протеина С. Белок, выделенный из яда гадюки *Agkistrodon contortrix contortrix*, который специфически

активирует человеческий протеин С. Восстанавливают и хранят в соответствии с инструкциями производителя.

Активатор свертывания. Может быть использован подходящий реактив для АЧТВ, содержащий фосфолипиды и контактный активатор. Он может быть комбинирован с активатором человеческого протеина С.

МЕТОДИКА

Испытуемый образец восстанавливают или размораживают согласно инструкциям производителя. Готовят не менее трех отдельных разведений до получения концентраций в диапазоне 0,010 – 0,150 МЕ/мл в двух повторностях с использованием буферного раствора для разведения с рН 7,4. Аналогичным образом готовят разведения восстановленного стандартного образца.

Смешивают 1 объем каждого разведения с 1 объемом человеческой плазмы, дефицитной по человеческому протеину С, и 1 объемом активатора человеческого протеина С (объединенного с реагентом для АЧТВ). Все растворы должны быть предварительно нагреты до температуры 37 °С. Прибавляют 1 объем 0,025 М раствора кальция хлорида Р, предварительно нагретого до температуры 37 °С, и регистрируют время свертывания.

Время свертывания пропорционально концентрации человеческого протеина С в каждом разведении.

Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают активность человеческого протеина С в испытуемом образце с использованием общепринятых статистических методов (2.3.12.0).