

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПРОТЕИНА S

В настоящей общей фармакопейной статье приведен пример методики количественного определения человеческого протеина S.

Человеческий протеин S представляет собой витамин K-зависимый белок плазмы, который действует как кофактор активированного протеина C (*activated protein C, APC*). Активность человеческого протеина S может быть определена по реакции свертывания, которая чувствительна к способности человеческого протеина S ускорять инактивацию фактора Va под действием APC. Испытание заключается в прибавлении человеческого протеина S к смеси реактивов, содержащей APC, фактор Va и человеческую плазму, дефицитную по протеину S. Увеличение времени свертывания пропорционально концентрации человеческого протеина S в образце. Методики, в которых APC добавляется непосредственно как реактив, предпочтительнее по сравнению с теми, в которых APC генерируется во время проведения испытания путем добавления специфического активатора человеческого протеина C, выделенного из яда змеи. Активация свертывания инициируется добавлением активирующего реактива, такого как тромбопластин или активированный фактор X, вместе с фосфолипидами и кальция хлоридом. Во время испытания фактор Va генерируется из фактора V в человеческой плазме, дефицитной по протеину S, с последующей активацией свертывания. Процедура испытания должна обеспечивать, чтобы единственным фактором ограничения реакции свертывания являлся человеческий протеин S.

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

Реактивы для испытания могут быть приобретены по отдельности или в составе коммерческих наборов. Методики и реактивы могут отличаться в разных наборах, поэтому следует придерживаться инструкций производителя набора.

### РЕАКТИВЫ

*Буферный раствор для разведения с pH 7,4.* Изотонический буфер, не содержащий хелатирующих соединений, приготовленный следующим

образом: 6,08 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р* и 8,77 г *натрия хлорида Р* растворяют в *воде Р* и при необходимости корректируют рН раствора (2.1.2.3); прибавляют 10 г *альбумина бычьего Р* или *альбумина человека Р* и доводят *водой Р* до объема 1000,0 мл.

*Человеческая плазма, дефицитная по протеину S*. Цитратная плазма человека с содержанием человеческого протеина S ниже определяемого уровня и, желателно, не содержащая С4b-связывающего белка.

*Активатор коагуляции*. Реактив используется для того, чтобы инициировать свертывание человеческой плазмы, дефицитной по протеину S, а также обеспечить появление активированного фактора V. Активатор может состоять из тканевого фактора, активированного фактора X или агента, способного прямо активировать фактор X. Такой агент может быть выделен из яда гадюки Рассела (*Vipera russelli*). Реактив также содержит *APC*, фосфолипиды и *кальция хлорид Р*, или кальция хлорид может быть добавлен отдельно после определенного периода активации.

## МЕТОДИКА

Испытуемый образец восстанавливают или размораживают согласно инструкциям производителя. Готовят не менее трех отдельных разведений до получения концентраций в диапазоне 0,020 – 0,100 МЕ/мл в двух повторностях с использованием буферного раствора для разведения с рН 7,4. Аналогичным образом готовят разведения восстановленного стандартного образца.

Смешивают по 1 объему каждого разведения с 1 объемом человеческой плазмы, дефицитной по протеину S, предварительно нагретых до температуры 37 °С. Прибавляют 2 объема активатора свертывания, нагретого до температуры 37 °С, и отмечают время свертывания.

Альтернативная процедура может предусматривать использование активатора коагуляции без кальция хлорида и требовать точного измерения периода активации перед добавлением кальция хлорида и времени свертывания.

Время свертывания (образования сгустка) пропорционально концентрации человеческого протеина S в каждом разведении. Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают активность испытуемого образца с использованием общепринятых статистических методов (2.3.12.0).