

Жоров О.В., Кравчук З.И., Коцюбко В.М., Власов А.П.

Набор реагентов для количественного определения фактора свертывания крови VII человека в плазме крови человека и лекарственных средствах хромогенным методом

ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск,
Республика Беларусь

В настоящее время в лабораторной диагностике и производстве лекарственных средств из плазмы крови человека широко применяются коагуляционные и хромогенные наборы реагентов для определения активности факторов свертывания крови человека. Согласно Государственной фармакопее Республики Беларусь хромогенный метод является основным для контроля качества лекарственных средств, содержащих фактор свертывания крови VII.

Использование наборов с хромогенным субстратом позволяет определять активность фактора свертывания крови VII и назначать необходимую терапию пациентам, что приводит к уменьшению расхода дорогостоящих препаратов, а также позволяет оценивать более точно состояние гемостаза и избежать возможных осложнений при травмах и хирургических вмешательствах.

Цель. Разработать макет набора реагентов для количественного определения фактора свертывания крови VII человека в плазме, продуктах крови и лекарственных средствах хромогенным методом.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись: фактор свертывания крови VII человека (FVII), фактор свертывания крови X человека (FX), плазма крови доноров, препарат протромбинового комплекса, тромбопластин собственного производства.

Результаты. В основу определения активности FVII положен двустадийный фотометрический метод. На первой стадии фактор FVII в комплексе с тромбопластином и катионами кальция активируется и переходит в форму FVIIa, которая, в свою очередь, активирует фактор X (FX) и переводит его в активную форму FXa. На второй стадии FXa селективно расщепляет хромогенный субстрат бензилоксикарбонил-D-аргинин-глицил-аргинин-*n*-нитроанилид с образованием *n*-нитроанилина. Исследование образца проводят фотометрическим методом при длине волны 405 нм. Значение оптической плотности прямо пропорционально количеству фактора VII.

Основной компонент набора реагентов – FX, был выделен и очищен из плазмы крови доноров анионообменной и гидрофобной хроматографией. Удельная активность реагента составила 120 международных единиц активности (МЕ) на миллиграмм белка. Все компоненты

набора (хромогенный субстрат, тромбопластин, FX) лиофилизованы, стандартизованы и стабилизированы для длительного хранения.

Определение активности фактора VII проводили, используя разработанный набор реагентов, следующим образом. Во флаконы, содержащие фактор X и тромбопластин, вносили по 2,0 мл очищенной воды. Во флакон, содержащий хромогенный субстрат, вносили по 4,0 мл очищенной воды. Содержимое флакона с концентратом буферного раствора переносили в мерный термостойкий химический стакан объемом 50 мл и доводили объем до 50 мл очищенной водой. Калибровочные пробы готовят путем серийных разведений калибровочной пробы, содержащей 2 МЕ/мл. Для определения активности фактора VII образцы плазмы необходимо развести в 1000 раз. Калибровочные пробы и разведенные образцы плазмы вносили по 50 мкл в лунки микропланшета и инкубировали при 37 °С в течение 5 мин. Затем добавляли комбинированный реагент, содержащий тромбопластин, хлорид кальция и фактор X, и инкубировали при 37 °С в течение 10 минут. Затем во все лунки добавляли раствор хромогенного субстрата и инкубировали при 37 °С в течение 10 минут. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл раствора 20% уксусной кислоты. Измеряли оптическую плотность при длине волны 405 нм на планшетном спектрофотометре. Активность фактора свертывания крови VII в МЕ/мл определяли по калибровочной кривой.

Набор позволяет количественно определять фактор свертывания крови VII в широком диапазоне и с высокой чувствительностью.

Выводы. Разработан лабораторный макет набора для количественного определения фактора свертывания крови VII человека с диапазоном измерений 0,01 – 1,5 МЕ/мл, чувствительностью 0,01 МЕ/мл.