

2.1.11.28. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА ЧЕЛОВЕКА

В настоящей общей фармакопейной статье представлено количественное определение фактора Виллебранда человека методами агглютинации (метод 1) и иммуноферментного анализа (метод 2).

Активность фактора Виллебранда человека (фактор Виллебранда) определяют в конкретных условиях испытания путём сравнения активности испытуемого образца (ристоцетин-кофакторной или коллаген-связывающей) с такой же активностью стандартного образца, калиброванного в международных единицах, если применимо. За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца фактора Виллебранда, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения. Международный стандартный образец представляет собой лиофилизированный концентрат фактора Виллебранда человека.

МЕТОД 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИСТОЦЕТИН-КОФАКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА

Определение фактора Виллебранда основано на его способности в качестве кофактора вызывать агглютинацию тромбоцитов в присутствии ристоцетина А. Испытание можно проводить для количественного определения с использованием автоматизированного оборудования или для полуколичественного определения путём визуальной оценки агглютинации в серии разведений. Предпочтительно использование методики количественного определения.

Реактивы

Суспензия тромбоцитов. Стандартизированные свежевыделенные и промытые тромбоциты человека, возможно обработанные формальдегидом или параформальдегидом. Суспензия тромбоцитов может быть лиофильно высушена. Перед испытанием в суспензию добавляют соответствующее количество ристоцетина А (при необходимости, поскольку некоторые готовые реагенты тромбоцитов могут содержать ристоцетин А в своём составе).

В качестве стандартного образца используют международный стандартный образец фактора Виллебранда человека концентрат.

Методика

Полуколичественное определение

Восстанавливают стандартный образец и испытуемый образец, затем готовят подходящие последовательные разведения, используя в качестве растворителя раствор, содержащий 9 г/л *натрия хлорида Р* и 10-50 г/л *альбумина человека Р*.

К каждому разведению испытуемого образца и стандартного образца прибавляют соответствующее количество суспензии тромбоцитов и, при необходимости, ристоцетин А. Перемешивают на предметном стекле, осторожно перемещая его круговыми движениями в течение 1 мин. Инкубируют при комнатной температуре в течение 1 мин и визуально оценивают агглютинацию тромбоцитов на темном фоне с боковым освещением. Последнее разведение, при котором четко видна агглютинация тромбоцитов, соответствует титру ристоцетин-кофакторной активности фактора Виллебранда.

В качестве отрицательного контроля используют растворитель.

Количественное определение

Восстанавливают содержимое одной ампулы со стандартным образцом и испытуемый образец в соответствующем количестве подходящего растворителя (например, *воды Р*). Немедленно готовят с помощью буфера для разведения не менее чем в двух повторностях последовательные разведения стандартного образца и испытуемого образца для получения растворов с содержанием фактора Виллебранда от 0,5 МЕ/мл до 2,0 МЕ/мл. Разведений должно быть такое количество, чтобы в линейном диапазоне находилось не менее трех концентраций.

В качестве буфера для разведения используют изотонический нехелатирующий раствор содержащий 10-50 г/л *альбумина человека Р* или *альбумина бычьего Р* и трис(гидроксиметил)аминометан или имидазол, забуференный подходящим способом.

Определение проводят в соответствии с инструкцией производителя автоматизированного оборудования. Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают активность фактора Виллебранда в испытуемом образце с использованием общепринятых статистических методов (2.3.12.0).

МЕТОД 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛЛАГЕНСВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА

Фактор Виллебранда определяют по связыванию коллагена методом иммуноферментного анализа на планшетах с адсорбированным коллагеном. Метод основан на специфическом связывании фактора Виллебранда с фибриллами коллагена, последующем связывании с поликлональными антителами к фактору Виллебранда, конъюгированных с ферментом, способным расщеплять специфический хромогенный субстрат с образованием окрашенного продукта (хромофора), который может быть

количественно определён методом спектрофотометрии. При подходящих условиях проведения испытания должна наблюдаться линейная зависимость между связыванием коллагена с фактором Виллебранда и поглощением (оптической плотностью).

Реактивы и материалы

Коллаген. Используют нативные лошадиные или человеческие фибриллы коллагена типа I или III. Для облегчения работы допустимо использование растворов коллагена.

Растворитель для коллагена. Растворяют 50 г глюкозы *P* в воде *P*, доводят pH раствором 103 г/л хлороводородной кислоты *P* до значения 2,7–2,9 и доводят тем же растворителем до объёма 1000 мл.

Фосфатно-солевой буферный раствор. Растворяют 8,0 г натрия хлорида *P*, 1,05 г динатрия гидрофосфата дигидрата *P*, 0,2 г натрия дигидрофосфата *P* и 0,2 г калия хлорида *P* в воде *P*, доводят pH раствором 40 г/л натрия гидроксида *P* или раствором 103 г/л хлоридной кислоты *P* до значения 7,2 и доводят тем же растворителем до объёма 1000 мл.

Промывочный буферный раствор. Фосфатно-солевой буферный раствор, содержащий 1 г/л полисорбата 20 *P*.

Блокирующий раствор. Фосфатно-солевой буферный раствор, содержащий 1 г/л полисорбата 20 *P* и 10 г/л альбумина бычьего *P*.

Буферный раствор для разведения. Фосфатно-солевой буферный раствор, содержащий 1 г/л полисорбата 20 *P* и 50 г/л альбумина бычьего *P*.

Конъюгат. Конъюгат пероксидазы хрена с сывороткой крови кролика против фактора Виллебранда. Используют в соответствии с инструкцией производителя.

Раствор хромогенного субстрата. Непосредственно перед применением растворяют таблетку о-фенилендиамина дигидрохлорида и таблетку пероксида мочевины в 20 мл воды *P*. Вместо пероксида мочевины допустимо использование подходящего объёма водорода пероксида. Готовый раствор защищают от света.

Микропланшеты. Используют плоскодонные полистироловые планшеты с поверхностью, оптимизированной для иммуноферментного анализа, и высокой способностью связывать белок.

Методика

Испытуемые растворы. Восстанавливают испытуемый образец в соответствии с инструкцией по медицинскому применению. Разводят восстановленный испытуемый образец буферным раствором для разведения до получения раствора с расчетной

концентрацией фактора Виллебранда 1 МЕ/мл. Готовят не менее трех подходящих разведений испытуемого образца в двух повторностях с использованием буферного раствора для разведения.

Растворы сравнения. Восстанавливают стандартный образец в соответствии с указаниями по применению. Разводят восстановленный стандартный образец буферным раствором для разведения до получения раствора с расчетной концентрацией фактора Виллебранда 1 МЕ/мл. Готовят не менее трех подходящих разведений стандартного образца в двух повторностях с использованием буферного раствора для разведения.

Раствор коллагена нагревают до комнатной температуры, разводят растворителем для коллагена до содержания 30-75 мкг/мл коллагена, осторожно перемешивают до получения однородной суспензии. Помещают по 100 мкл суспензии в каждую лунку микропланшета, накрывают микропланшет клейкой плёнкой и инкубируют при 37 °С в течение ночи. Удаляют содержимое лунок, перевернув на бумажное полотенце, затем в каждую лунку помещают по 250 мкл промывочного буферного раствора и снова удаляют содержимое лунок. Повторяют операцию три раза.

В каждую лунку помещают по 250 мкл блокирующего раствора, накрывают микропланшет полиэтиленовой плёнкой и инкубируют при 37 °С в течение часа. Удаляют содержимое лунок, перевернув на бумажное полотенце, затем в каждую лунку помещают по 250 мкл промывочного буферного раствора и снова удаляют содержимое лунок. Повторяют операцию три раза.

В отдельные серии лунок помещают по 100 мкл испытуемых растворов или растворов сравнения, а также в отдельную серию лунок помещают 100 мкл буферного раствора для разведения в качестве отрицательного контроля. Накрывают планшет клейкой плёнкой и инкубируют при 37 °С в течение двух часов. Удаляют содержимое лунок, перевернув на бумажное полотенце, затем помещают в каждую лунку по 250 мкл промывочного буферного раствора и снова удаляют содержимое лунок. Повторяют операцию три раза.

Готовят подходящее разведение конъюгата (например, с коэффициентом разведения от 1 до 4000) в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 5 г/л альбумина бычьего Р, и помещают по 100 мкл полученного раствора в каждую лунку. Накрывают планшет клейкой плёнкой и инкубируют при 37 °С в течение двух часов. Удаляют содержимое лунок планшета, перевернув на бумажное полотенце, затем помещают в каждую лунку по 250 мкл промывочного буферного раствора и снова удаляют содержимое лунок. Повторяют операцию три раза.

Помещают в каждую лунку по 100 мкл раствора хромогенного субстрата, инкубируют при комнатной температуре в течение 20 мин в защищенном от света месте, затем прибавляют в каждую лунку по 100 мкл раствора 103 г/л *хлороводородной кислоты* *P*.

Измеряют поглощение (оптическую плотность) при длине волны 492 нм и рассчитывают коллаген-связывающую активность испытуемого образца с использованием общепринятых статистических методов (2.3.12.0).

Результаты испытания считаются недостоверными, если значение поглощения (оптической плотности) в лунках с отрицательным контролем, превышает 0,05.