

2.1.11.25. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА VIII

В настоящей общей фармакопейной статье представлена методика количественного определения фактора свертывания крови человека VIII хромогенным методом в плазме крови человека, в лекарственных препаратах факторов свертывания крови, получаемых из плазмы крови человека, и в лекарственных препаратах факторов свертывания крови, получаемых с использованием технологии рекомбинантной ДНК.

Количественное определение фактора свертывания крови человека VIII (фактор VIII) основано на способности активированного фактора VIII в качестве кофактора активировать фактор свертывания крови человека X (фактор X) фактором свертывания крови человека IXa (фактор IXa) в присутствии ионов кальция и фосфолипидов. Активность фактора VIII оценивают путем сравнения количества испытуемого образца, необходимого для достижения определенной скорости образования фактора свертывания крови человека Xa (фактор Xa), с количеством международного стандартного образца или подходящего стандартного образца, калиброванного в международных единицах, необходимым для получения такой же скорости образования фактора Xa.

За международную единицу активности фактора VIII в плазме крови человека принимают активность фактора VIII в определенном количестве международного стандартного образца фактора свертывания крови человека VIII в плазме, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения. Международный стандартный образец для фактора свертывания крови человека VIII в плазме представляет собой лиофилизированную пулированную нормальную плазму крови человека. В качестве стандартного образца может быть использован *СО ФЕАЭС факторов свертывания крови человека V, VIII, XI и XIII плазмы*, калиброванный в международных единицах.

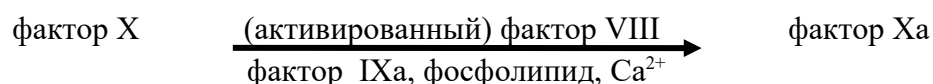
За международную единицу активности фактора VIII в лекарственных препаратах принимают активность фактора VIII в определенном количестве международного стандартного образца фактора свертывания крови человека VIII (концентрат), устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения. Международный стандартный образец для фактора VIII представляет собой лиофилизированный концентрат фактора свертывания крови человека VIII.

В качестве стандартного образца может быть использован *СО ФЕАЭС фактора свертывания крови человека VIII концентрат*, калиброванный в международных единицах.

Активность фактора VIII определяют с помощью двухстадийного метода:

- на первой стадии происходит зависящая от фактора VIII активация фактора X в реактиве фактора свертывания крови, состоящем из очищенных белков;
- на второй стадии фактор Xa расщепляет специфический хромогенный субстрат с образованием окрашенного продукта (хромофора), который может быть количественно определен методом спектрофотометрии (рисунок 2.1.11.25.-1).

Стадия 1



Стадия 2



Рисунок 2.1.11.25.-1.-*Схема количественного определения фактора VIII хромогенным методом*

В подходящих условиях испытания должна наблюдаться линейная зависимость между скоростью образования фактора Ха и концентрацией фактора VIII.

На обеих стадиях используют реактивы, которые могут быть приобретены по отдельности или в виде коммерческих наборов, применяемых в соответствии с инструкцией производителя. Основные свойства реактивов должны соответствовать указанным ниже; отклонения могут быть допустимы при условии отсутствия существенных различий в результатах испытаний с применением в качестве стандартного образца международного стандартного образца для фактора VIII,

Необходимо подтвердить валидационными исследованиями пригодность используемого набора реактивов, в частности проверкой времени образования фактора Ха, необходимого для достижения 50 % от максимального количества образовавшегося фактора Ха.

РЕАКТИВЫ

Реактив фактора свертывания крови представляет собой смесь частично очищенных (предпочтительно не менее чем на 50 %) белков, полученных от человека или крупного рогатого скота, состоящую из фактора X, фактора IXa и активатора фактора VIII (обычно, тромбина). Реактив фактора свертывания крови не должен содержать примесей, мешающих активации фактора VIII или фактора X. Тромбин может присутствовать в форме протромбина при условии, что его активация в реактиве протекает с достаточной скоростью для практически мгновенной и полной активации фактора VIII при количественном определении. Фосфолипид может быть получен из природных источников или синтетическим путем и должен состоять преимущественно из фосфатидилсерина. Компоненты реактива фактора свертывания крови обычно разделены как минимум на два отдельных реактива, каждый из которых не способен активировать фактор X самостоятельно. Один из реактивов содержит ионы кальция. После восстановления реактивы могут быть объединены при условии, что в отсутствии фактора VIII не происходит образования существенных количеств фактора Ха. В инкубационной смеси фактор VIII должен быть единственным компонентом, ограничивающим скорость реакции.

Хромогенный субстрат для фактора Ха представляет собой дериватизированный короткий пептид, состоящий из 3–5 аминокислот, присоединенный к хромофорной группе. При отщеплении данной группы от пептидного субстрата, ее максимум поглощения смещается в сторону длины волны, при которой становится возможным произвести определение спектрофотометрическим методом. Хромогенный субстрат также может содержать соответствующие ингибиторы для прекращения образования фактора Ха (например, хелатообразующие вещества) и для подавления активности тромбина.

МЕТОДИКА

Испытуемый образец и стандартный образец разводят подходящим разбавителем до концентрации фактора VIII 0,5–2,0 МЕ/мл. Полученные растворы должны быть стабильны в течение времени, необходимого для проведения количественного определения. Разбавитель представляет собой плазму от пациента с гемофилией А или искусственно приготовленный реактив, содержащий достаточное количество фактора Виллебранда, который приводит к получению результатов испытаний, существенно не отличающихся от результатов, получаемых при использовании плазмы от пациента с гемофилией А.

Для количественного определения фактора VIII в плазме крови человека разведение испытуемого образца в плазме от пациента с гемофилией А не требуется.

Готовят не менее трех подходящих разведений разведенного испытуемого образца и разведенного стандартного образца в двух повторностях с использованием

нехелатирующего буферного раствора, например, раствора *трис(гидроксиметил)аминометана Р* или *имидазола Р*, содержащего *альбумин человека Р* или *альбумин бычий Р* в концентрации 10 г/л, соответственно. Разведения готовят таким образом, чтобы конечная концентрация фактора VIII на стадии образования фактора Ха была менее 0,01 МЕ/мл.

Готовят контрольный раствор, включающий все компоненты, кроме фактора VIII.

Все разведения готовят в пластиковых пробирках и используют немедленно.

Стадия 1. Разведения испытуемого образца и стандартного образца нагревают, смешивают с соответствующим объемом предварительно нагретого реактива факторов свертывания крови и инкубируют в пластиковых пробирках или лунках микропланшета при температуре 37 °С. Активацию фактора X проводят в течение подходящего промежутка времени, прерывая реакцию (стадия 2), когда концентрации фактора Ха достигнет примерно 50 % от ее максимального уровня (плато). Подходящее время активации обычно составляет от 2 мин до 5 мин.

Стадия 2. Активацию останавливают добавлением предварительно нагретого хромогенного субстрата для фактора Ха. Определяют скорость расщепления хромогенного субстрата, которая должна быть в линейной зависимости от концентрации образовавшегося фактора Ха, путем измерения изменения поглощения (оптической плотности) при соответствующей длине волны (2.1.2.24). Скорость расщепления хромогенного субстрата может быть рассчитана путем постоянного измерения поглощения (оптической плотности) или прерыванием реакции гидролиза по истечении подходящего промежутка времени путем снижения pH реакционной смеси добавлением подходящего реактива, например, раствора 50 % (об/об) *уксусной кислоты ледяной Р* или 1 М раствора *натрия цитрата Р* при значении pH 3. Время гидролиза подбирают таким образом, чтобы получить линейную зависимость образования окрашенного продукта (хромофора) от времени. Подходящее время гидролиза обычно составляет от 3 мин до 15 мин, но допустимы отклонения от данного интервала при условии получения приемлемой линейной зависимости «доза – ответ».

Рассчитывают активность фактора свертывания крови VIII в испытуемом образце с использованием общепринятых статистических методов (например, 2.3.12.0).