Номер. **КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА VII**

В настоящей общей фармакопейной статье представлена методика количественного определения фактора свертывания крови человека VII хромогенным методом.

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

За международную единицу принимают активность фактора VII в определенном количестве международного стандартного образца, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения. Международный стандартный образец представляет собой лиофилизированный концентрат фактора свертывания крови человека VII.

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

Активность фактора VII определяют с помощью двухстадийного метода:

- на первой стадии происходит зависимая от фактора VII активация фактора X в смеси, содержащей тканевой фактор, ионы кальция и фосфолипиды,

- на второй стадии фактор Xa расщепляет специфический хромогенный субстрат с образованием окрашенного продукта, который может быть количественно определен методом спектрофотометрии (рисунок номер-1).

Стадия 1

А) фактор VII $\xrightarrow{\text{тканевой фактор, } Ca^{2+}}$ фактор VIIa

Б) фактор X $\xrightarrow[\text{тканевой фактор, фосфолипид}]{\text{фактор VIIa, } Ca^{2+}}$ фактор Xa

Стадия 2

Хромогенный субстрат $\xrightarrow{\text{фактор Xa}}$ пептид + хромофор

Рисунок номер-1 Схема количественного определения фактора VII хромогенным методом

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

На обеих стадиях используют реактивы, которые могут быть приобретены по отдельности или в виде коммерческих наборов, применяемых в соответствии с инструкцией производителя.

РЕАКТИВЫ

Реактив фактора свертывания крови представляет собой смесь частично очищенных белков, состоящую из фактора X и активатора фактора VII (как правило, тромбопластина). Реактив фактора свертывания крови не должен содержать примесей, мешающих активации фактора VII или фактора X. Фактор X, полученный от человека или крупного рогатого скота, содержится в количествах, обеспечивающих конечную концентрацию на первой стадии испытания 10–350 нмоль/л (наиболее предпочтительная концентрация 14–70 нмоль/л). Тромбопластин может быть получен из природных источников (мозг крупного рогатого скота или кролика) или синтетическим путем. Тромбопластин, подходящий для определения протомбинового времени, разводят подходящим буферным раствором в соотношении от 1:5 до 1:50 таким образом, чтобы конечная концентрация ионов кальция составляла 15–25 ммоль/л. На первой стадии используют раствор, содержащий *альбумин человека Р* или *альбумин бычий Р* в концентрации, не допускающей потери адсорбции, и соответствующим образом доведенный до значения pH 7,3–8,0. В окончательной инкубационной смеси фактор VII должен быть единственным компонентом, ограничивающим скорость реакции, и каждый компонент реактива фактора свертывания крови не должен образовывать фактор Ха самостоятельно.

Хромогенный субстрат для фактора Ха представляет собой короткий пептид, состоящий из 3–5 аминокислотных остатков, 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 восстанавливают в *воде Р* в соответствии с инструкцией производителя и используют в конечных концентрациях 0,2–2,0 ммоль/л. Хромогенный субстрат также может содержать соответствующие ингибиторы (например, эдетат) для прекращения образования фактора Ха.

МЕТОДИКА

Восстанавливают стандартный образец и испытуемый образец *водой Р* и используют в течение 1 ч. Разводят восстановленные образцы подходящим растворителем до получения растворов с концентрацией 0,5–2,0 МЕ/мл фактора VII.

Готовят не менее трех подходящих разведений испытуемого образца и стандартного образца в двух повторностях с использованием изотонического нехелатирующего буферного раствора со значением pH 7,3–8,0, содержащего *альбумин человека Р* или *альбумин бычий Р* в концентрации 10 г/л, соответственно. Разведения подбирают таким образом, чтобы конечная концентрация фактора VII составляла менее 0,005 МЕ/мл.

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

Все разведения готовят в пластиковых пробирках и используют в течение часа.

Стадия 1. Смешивают разведения стандартного образца и испытуемого образца с соответствующим объемом предварительно нагретого реактива фактора свертывания крови или со смесью реактивов, его составляющих, и инкубируют смесь в пластиковых пробирках или лунках микропланшета при температуре 37 °С. Концентрации различных компонентов во время образования фактора Ха должны соответствовать указанным выше требованиям. Активацию фактора X проводят в течение подходящего промежутка времени, обычно прерывая реакцию до того, как концентрация фактора Ха достигнет максимального уровня с целью получения приемлемой линейной зависимости «доза-ответ». Подходящее время активации обычно находится в пределах от 2 мин до 5 мин, но допустимы отклонения при условии получения приемлемой линейной зависимости доза-реакция.

Стадия 2. Активацию фактора X прекращают 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 раствора 1 моль/л *натрия цитрата Р* при значении pH 3. Подходящее время гидролиза обычно составляет от 3 мин до 15 мин, но допустимы отклонения от данного интервала с целью достижения линейной зависимости «доза-ответ».

Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают активность фактора VII в испытуемом образце с использованием общепринятых статистических методов *(2.3.12.0)*.