

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ФАКТОРА ЗСІДАННЯ КРОВІ VIII (IX) У КОНЦЕНТРАТАХ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА ГЕМОФІЛІЮ А ТА В

В.В. Красівська¹, В.І. Семеняка², О.В. Стасишин¹

¹ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», Львів,

²ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

Резюме. Мета – встановити особливості застосування одностадійного методу при проведенні визначення активності факторів зсідання крові у лікарських препаратах факторів зсідання крові.

Матеріали і методи. Визначення активності факторів VIII та IX одностадійним методом. Проведено дослідження зразків препаратів фактору VIII та IX.

Результати. Показано можливість застосування одностадійного методу без використання спеціальних стандартних плазм та достатня точність дослідження.

Висновки. Методика визначення специфічної активності (вмісту) фактора зсідання VIII (IX) у концентраті препарату одностадійним методом є простою, не трудомісткою, інформативною та достатньо стандартизованою. Однією з переваг якої є можливість мануального визначення.

Ключові слова: фактор VIII (IX), гемофілія А та В, препарати.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ VIII (IX) В КОНЦЕНТРАТАХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ А И В

В.В. Красивская¹, В.И. Семеняка², А.В. Стасишин¹

¹ГУ «Институт патологии крови и трансфузионной медицины НАМН Украины», Львов,

²ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины», Киев

Резюме. Цель – установить особенности применения одностадийного метода при проведении определения активности факторов свертывания крови в лекарственных препаратах факторов свертывания крови.

Материалы и методы. Определение активности факторов VIII и IX одностадийным методом. Проведено исследование образцов препаратов фактора VIII и IX.

Результаты. Показана возможность применения одностадийного метода без использование специальных стандартных плазм и достаточная точность исследования.

Выводы. Методика определения специфической активности (содержания) фактора свертывания VIII (IX) в концентрате препарата одностадийным методом является простым, не трудоемким, информативной и достаточно стандартизированной. Одним из преимуществ которой является возможность мануального определения.

Ключевые слова: фактор VIII (IX), гемофилия A и B, препараты.

DETERMINATION OF COAGULATION FACTORS VIII (IX) ACTIVITY IN THE CONCENTRATES OF PREPARATIONS FOR TREATMENT OF PATIENTS WITH HEMOPHILIA A AND B

V.V. Krasivska¹, V.I. Semeniaka², O.V. Stasyshyn¹

¹SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine», Lviv,

² SI «Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Summary. Aim. *Install the particular application of the one-step method when making the determination of the activity of coagulation factors in drugs of coagulation factors.*

Materials and methods. *The determination of the activity of factors VIII and IX of the one-step method. The study sample preparations of factor VIII and IX.*

Results. *A possibility of using of the one-step method without the use of a special standard plasmas and accurate research.*

The conclusions. *The method of determination of specific activity (content) of coagulation factor VIII (IX) in concentrate preparation of the one-step method is simple, not time consuming, informative and fairly standardized. One of the advantages is the possibility of manual definition.*

Key words: *factor VIII (IX), hemophilia a and b drugs.*

Завдяки прогресу в області терапії гемофілії розробляються та виробляються все нові препарати, в яких концентрацію фактора зсідання VIII (IX) (ф. VIII (IX)) можна визначати за допомогою біоаналізу (кількісного визначення активності) та імунологічного методу (найчастіше – імуноферментний аналіз). Серед методів біоаналізу виділяють одностадійне та двостадійне коагулологічне визначення, а також амідолітичний метод із використанням хромогенних субстратів [2, 4, 5].

Метою дослідження було встановити особливості застосування одностадійного методу при проведенні визначення активності факторів зсідання крові у лікарських препаратах факторів зсідання крові.

Матеріали і методи досліджень. Методологія визначення специфічної активності (вмісту) фактора зсідання VIII (IX) одностадійним методом у концентраті препарату для лікування хворих на гемофілію [1, 3, 6, 7]. **Принцип** кількісного визначення рівня активності ф. VIII (IX)

грунтується на вимірюванні активованого часткового тромбoplastинового часу (АЧТЧ) при достатній активності інших факторів коагуляції, коли час зсідання залежить тільки від активності ф. VIII (IX) у досліджуваній плазмі. Активність ф. VIII (IX) визначається за калібрувальним графіком у відсотках від його вмісту в калібрувальній плазмі за стандартною кривою розведення. Що стосується ф. VIII, таким методом визначають його прокоагулянтну активність – VIII:С. **Необхідні реактиви:** дефіцитна за ф. VIII плазма (для визначення активності ф. IX використовують дефіцитну за ф. IX плазму), калібрувальна (стандартна) плазма (виробником вказується активність ф. VIII (IX)), АЧТЧ-реагент, розчин імідазольного буферу, розчин 0,025 моль/л кальцію хлориду. Для кожного реактиву вказується назва, виробництво, країна, серія (лот), термін придатності. Всі реактиви готуються відповідно до інструкції виробника. **Побудова калібрувальної кривої.** Приготування розведень референтної плазми для побудови калібрувальної кривої подано у табл. 1. Початкове розведення може бути 1:9 або 1:5, що умовно приймається за 100% активності ф. VIII (IX). Кількість точок може бути більшою, ніж 5, що залежить від класу коагулометра.

Таблиця 1

Приготування розведень для калібрувальної кривої

Пробірка №	1	2	3	4	5
Буфер, мл	0,9	0,5	0,5	0,5	0,5
Калібрувальна плазма, мл	0,1	–	–	–	–
Перемішати і перенести 0,5 мл у наступну пробірку					
Розведення	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
Активність ф. VIII, %	100,0	50,0	25,0	12,5	6,25

Визначення проводять на коагулометрі або мануальним методом. У кювету вносять 50 мкл калібрувальної плазми, 50 мкл дефіцитної по ф. VIII (або ф. IX) плазми, 50 мкл АЧТЧ-реагенту. Суміш інкубують протягом 3 хв. і додають 50 мкл розчину кальцію хлориду. Реєструють час утворення згустку. При роботі на коагулометрі послідовність внесення реактивів та час інкубації вказується виробником у методиці визначення. При мануальному визначенні всі об'єми проби та реагентів збільшують у 2 рази. Кожну пробу для кожного розведення повторюють двічі і враховують середнє значення, яке вносять у прилад для побудови калібрувальної кривої або наносять на логарифмічному папері і з'єднують точки. Крива в діапазоні від 1 до 100% має бути лінійною. На вісі ординат

(Y) відкладають секунди, на вісі абсцис (X) – відповідна концентрація ф. VIII (IX). Для кожної іншої серії кожного з реагентів необхідно будувати нову калібрувальну криву.

Перед визначенням вмісту ф. VIII (IX) у препараті необхідно провести контроль якості за допомогою контрольних плазм – нормальної та патологічної, які тестуються виробником. Отримані значення повинні співпадати (або потрапляти у діапазон) із вказаними у паспортах.

Результати та їх обговорення.

Приклад. Підготовка досліджуваного зразка на прикладі концентрату препарату ф. VIII «N», у якому виробник декларує активність 250 од у 1 флаконі (розчинником є 5 мл води).

1. Перше розведення зразка препарату здійснюють згідно з інструкцією виробника. Вміст флакону з препаратом розчиняють у 5 мл води кімнатної температури, обережно перемішують і отримують концентрацію ф. VIII 50,0 МО/мл.

2. Наступне (друге) розведення проводиться виходячи з того, що 1 МО дорівнює вмісту ф. VIII в 1 мл нормальної донорської пульованої плазми і становить 100% активності. Після отриманого першого розведення 50,0 МО/мл зразок розводять дефіцитною по ф. VIII плазмою або імідазольним буфером у 50 разів і готують пробу з кінцевою активністю ф. VIII 1 МО/мл (100%). У даному прикладі до 0,1 мл суміші додають 4,9 мл імідазольного буферу. Припускають, що у досліджуваному препараті міститься 1 МО ф. VIII у 1 мл (або активність становить 100%).

3. У подальшому наданий зразок розводять третій раз імідазольним буфером у співвідношенні 1:9 і визначають дійсну активність ф. VIII. Для цього до 0,1 мл розведеного препарату додають 0,9 мл буферу (або розводять у 5 разів, якщо при побудові калібрувальної кривої перше розведення становило 1:5).

Визначення проводять як при побудові калібрувальної кривої, тільки замість калібрувальної плазми вносять досліджуваний зразок. Пробу повторюють двічі. Якщо у калібрувальній плазмі вміст ф. VIII (IX) становить більше або менше 100%, то отримане значення активності необхідно помножити на відповідний коефіцієнт. Наприклад: активність ф. VIII у калібрувальній стандартній плазмі становить 96,0%. У такому випадку, отримане за калібрувальною кривою значення 112,0% множать на 0,96 і після заокруглення отримують активність ф. VIII – 108,0%. Враховують середнє значення двох проб. Повторюють процедуру, описану вище, для досліджуваних зразків. Усі розведення для аналізу слід використати впродовж 15 хв. з моменту приготування.

Розрахунок дійсної активності ф. VIII у препараті концентрату фактора «N». Розрахована активність у відповідності до опису препарату (надається виробником) має бути не нижче 80% і не вище 125% номінального значення (від 200 до 312,5 МО). Результати наведені у табл. 2.

Таблиця 2

Активність фактора VIII у відібраній пробі флакона 1 препарату «N»

Декларована активність у флаконах препарату «N», МО	Від 200 МО до 312,5 МО
Середній час зсідання у пробі № 1, с	61,7
Активність ф.VIII у пробі, %	108,0
Активність ф.VIII у пробі, МО	1,08
Дійсна активність ф.VIII препарату «N», МО/фл	270,0

Формула розрахунку дійсної активності ф. VIII у препараті «N», МО/фл.:

$$\text{Активність ф. VIII у пробі, МО } 1,08 \times 50 \text{ (друге розведення)} \times 5 \text{ (перше розведення – кількість води 5 мл)} = 270,0 \text{ МО/фл.}$$

Отже, дійсна активність у відібраній пробі флакона 1 ф. VIII препарату «N» дорівнює 270 МО/фл, що відповідає активності, заявленій виробником.

Методика визначення специфічної активності (вмісту) фактора зсідання VIII (IX) у концентраті препарату одностадійним методом є простою, не трудомісткою, інформативною та достатньо стандартизованою. Однією з переваг її є можливість мануального визначення.

Література

1. Баркаган З.С. Основы диагностики нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот– М. : Ньюамед – АО, 1999. – 213 с.
2. Diagnosis of factor VIII deficiency/ B. Verbruggen, P. Meijer, I. Nova [et al.] // Haemophilia. – 2008. – Vol. № 14, Suppl. 3. – P. 76–82.
3. Difficulties and pitfalls in laborator y diagnosis of bleeding disorders / P.H.B. Bolton Maggs, E.J. Favaloro, A. Hillarp [et al.] // Haemophilia. – 2012. – Vol. 18, № 4. – P. 66–72.
4. Franchini M. The modern treatment of haemophilia: a narrative review / M. Franchini // Blood Transfus. – 2013. – № 1. – P. 178–182.
5. Keeling D. Guideline on the selection and use of therapeutic products to treat haemophilia and other hereditary bleeding disorders. A united kingdom haemophilia center doctors' organization (UKHCDO) guideline approved by the British committee

for standards in haematology standards in haematology / D. Keeling, C. Tait, M. Makris // Haemophilia. – 2008. – № 14. – P. 671-684.

6. Kitchen S. Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders. A laboratory manual / S. Kitchen, A. McCraw– Canada, Montreal: World Federation of Hemophilia (WFH), 2000. – 108 p.

7. Kitchen S. Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders. A laboratory manual / S. Kitchen, A. McCraw, M. Echenagucia– [Second Edition]. – Canada, Montreal: World Federation of Hemophilia (WFH), 2010. – 144 p.

УДК 612.815+616-001.08

ЗАЛІЗОДЕФІЦИТ ПРИГНІЧУЄ АКТИВНІСТЬ ОКСИДУ АЗОТУ

І.І. Лановенко

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

Резюме. При обстеженні хворих на залізодефіцитну анемію (ЗДА) та в дослідях на щурях на моделі ЗДА комбінованого генезу встановлено взаємозв'язок порушень обміну заліза і реактивності оксиду азоту (NO) крові. Залізодефіцит викликає зменшення вмісту стабільних метаболітів NO (NO_2^- і NO_3^-) в плазмі й еритроцитах крові (у хворих: у плазмі – в 2,69 рази, в еритроцитах – в 3,04 рази; у щурів: у плазмі – в 2,74 рази, в еритроцитах – в 3,40 рази) і порушення кисневотранспортної функції (КТФ) крові. Зростання залізодефіциту призводить до поглиблення депресії (розвитку недостатності) систем NO і КТФ крові. Обґрунтована можливість корекції гемічної гіпоксії за допомогою застосування донорів оксиду азоту.

Ключові слова: залізодефіцитна анемія, кров, залізодефіцит, оксид азоту, гемічна гіпоксія.

ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТ УГНЕТАЕТ АКТИВНОСТЬ ОКСИДА АЗОТА

И.И. Лановенко

ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины», Киев

Резюме. При обследовании больных железodefитной анемией (ЖДА) и в опытах на крысах на модели ЖДА комбинированного генеза установлена взаимосвязь нарушений обмена железа и реактивности оксида азота (NO) крови. Железодефицит вызывает уменьшение содержания стабильных метаболитов NO (NO_2^- и NO_3^-) в плазме и эритроцитах крови (у больных: в плазме – в 2,69 раза, в эритроцитах – в 3,04 раза; у крыс: в плазме – в 2,74 раза, в эритроцитах – в