**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
| ОФС.0.0.0000 |
| **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕИНА S ЧЕЛОВЕКА** |

В общей фармакопейной статье приведена методика количественного определения протеина S человека (протеин S) клоттинговым методом.

Протеин S представляет собой витамин К-зависимый белок плазмы человека, действующий как кофактор активированного протеина С человека (активированный протеин С). Активность протеина S определяют по реакции свёртывания крови, которая чувствительна к способности протеина S ускорять инактивацию фактора свёртывания крови человека Va (фактор Va) под действием активированного протеина С. Испытание заключается в прибавлении протеина S к смеси реактивов, содержащей активированный протеин С, фактор Va и плазму крови человека, дефицитную по протеину S. Увеличение времени свёртывания крови пропорционально концентрации протеина S в испытуемом образце. Методики, в которых активированный протеин Сдобавляют непосредственно в качестве реактива, более предпочтительны чем те, в которых активированный протеин Собразуется во время проведения испытания путём прибавления специфического активатора протеина S, выделенного из яда змеи. Свёртывание инициируется прибавлением активирующего реактива, например тромбопластин или активированный фактор свёртывания крови человека X (фактор Ха), вместе с фосфолипидами и кальция хлоридом. Во время испытания фактор Va образуется из фактора V в плазме крови человека, дефицитной по протеину S, с последующей активацией свёртывания. В методике испытания единственным фактором, ограничивающим реакцию свёртывания, должен быть протеин S.

Количественное определение протеина S основано на его способности увеличивать время свёртывания. Активность протеина S оценивают путём сравнения активности испытуемого образца с активностью стандартного образца протеина S, выраженной в международных единицах (МЕ).

За международную единицу принимают активность определённого количества международного стандартного образца протеина S человека, устанавливаемую Всемирной организацией Здравоохранения.

Реактивы для испытания могут быть приобретены по отдельности или в виде наборов. Методики и реактивы могут отличаться в разных наборах, поэтому следует придерживаться инструкции производителя набора.

КЛОТТИНГОВЫЙ МЕТОД

*РЕАКТИВЫ*

*Плазма крови человека, дефицитная по протеину S.* Цитратная плазма крови человека с содержанием протеина S ниже определяемого уровня и, предпочтительно, не содержащая С4b-связывающего белка.

*Активатор свёртывания крови.* Реактив применяют для инициации свёртывания плазмы крови человека, дефицитной по протеину S, а также для обеспечения образования фактора Va. Активатор может состоять из тканевого фактора, фактора Ха или агента, способного активировать фактор Х, который выделен из яда гадюки Рассела *(Vipera russelli).* Реактив также содержит активированный протеин С, фосфолипиды и кальция хлорид, или альтернативно, кальция хлорид может быть добавлен отдельно после определённого периода активации.

*МЕТОДИКА*

## Испытуемый образец восстанавливают или размораживают согласно инструкции по медицинскому применению. Готовят не менее трёх отдельных разведений до получения концентрации в диапазоне 0,020–0,100 МЕ/мл в двух повторностях с использованием *трис(гидроксиметил)аминометана—натрия хлорида буферного раствора рН 7,4*. Аналогичным образом готовят разведения восстановленного стандартного образца.

Смешивают по 1 объёму каждого разведения с 1 объёмом плазмы крови человека, дефицитной по протеину S. Все растворы предварительно нагревают до температуры 37 °С. Прибавляют 2 объёма активатора свёртывания крови, нагретого до температуры 37 °С и регистрируют время свёртывания.

Альтернативная процедура может предусматривать использование активатора коагуляции без кальция хлорида и требовать точного измерения периода активации перед прибавлением кальция хлорида и регистрации времени свёртывания.

Время свёртывания пропорционально концентрации протеина S в каждом разведении.

Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают активность протеина S в испытуемом образце с использованием статистических методов *(ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами»)*.