

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

## **Вопросы медицинской химии**

*ISSN 0042-8809*

1989

**Внимание!** Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

## **Voprosy meditsinskoi khimii**

*ISSN 0042-8809*

1989

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ 35

БЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989

# ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. А. ТУТЕЛЬЯН

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)  
БЫЧКОВ С. М. (Москва)  
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)  
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)  
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)  
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)  
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)  
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)  
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)  
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

штамме I, тогда как в нормальных клетках он практически не изменяется. Постепенное снижение кривых накопления  $^3\text{H-GM}_1$  во всех клеточных штаммах при концентрации 200 мкг/мл и выше свидетельствует, по-видимому, о цитотоксическом действии высоких концентраций  $^3\text{H-GM}_1$ .

На рис. 2 приведены результаты нагрузочного теста на более широком спектре штаммов при концентрации  $^3\text{H-GM}_1$ , равной 20 мкг/мл. Эти результаты свидетельствуют о способности нагрузочного теста к аллельной дифференциации  $\text{GM}_1$ -ганглиозидозов, что позволяет его использовать в пре- и постнатальной диагностике этой нозологической единицы. Кривые кинетики накопления  $^3\text{H-GM}_1$  образуют 3 группы, соответствующие контрольным штаммам ( $n=5$ ), штаммам от больных с инфантильной формой  $\text{GM}_1$ -ганглиозидоза ( $n=2$ ) и штамму от больной с ювенильной формой  $\text{GM}_1$ -ганглиозидоза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ахунов В. С., Краснополяская К. Д. // *Вопр. мед. химии.* — 1987. — № 4. — С. 115—119.
2. Краснополяская К. Д., Аронович Е. Л., Терехов С. М. // Там же. — 1982. — № 3. — С. 50—55.
3. Ando S., Chang N., Yu R. K. // *Analyt. Biochem.* — 1978. — Vol. 89. — P. 437—450.
4. Higashi H., Basu S. // *Ibid.* — 1982. — Vol. 120. — P. 159—164.

5. Hoffman L. M., Schneck L. // *Gangliosidoses.* — New York, 1975. — P. 223—231.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. J. // *J. biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
7. O'Brien J. S. // *The Metabolic Basis of Inherited Disease* / Ed. I. B. Stanbury. — New York, 1983. — P. 945—969.
8. Regab H., Beck C., Dillard C., Tappel A. L. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1967. — Vol. 148. — P. 501—505.
9. Sandhoff K., Christomanou E. // *Hum. Genet.* — 1979. — Vol. 50. — P. 107—143.
10. Svennerholm L. // *Biochim. biophys. Acta.* — 1957. — Vol. 24. — P. 604—611.
11. Trevelyan W. E., Harrison J. S. // *Biochem. J.* — 1952. — Vol. 50. — P. 298—303.

Поступила 13.07.88

#### USE OF LOADING TEST INVOLVING LABELLED $\text{GM}_1$ -GANGLIOSIDE IN DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF $\text{GM}_1$ -GANGLIOSIDOSIS

V. S. Akhunov, K. D. Krasnopol'skaya, T. V. Mirenberg

Institute of Medical Genetics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Kinetics of  $\text{GM}_1$ -ganglioside accumulation was studied in fibroblast cultures from patients with various forms of  $\text{GM}_1$ -gangliosidosis using the labelled native substrate  $\text{GM}_1$ -ganglioside isolated from human brain. A shape of accumulation curves in the plot was shown to depend on  $\text{GM}_1$ -ganglioside concentration in a medium in juvenile form of the disease. Use of a number of the fibroblast strains and optimal concentration of  $\text{GM}_1$ -ganglioside 20  $\mu\text{g/ml}$  enabled to carry out allele differentiation of the juvenile form of  $\text{GM}_1$ -gangliosidosis from infantile and normal forms, thus suggesting that the loading tests could be applied to pre- and postnatal diagnosis of  $\text{GM}_1$ -gangliosidosis.

## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616.154:577.175.539]-074:543.544

А. М. Хоха

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОРТИКОСТЕРОНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС МЕТОДОМ АДсорбЦИОННОЙ МИКРО-ВЭЖХ

Институт биохимии АН БССР, Гродно

Кортикостерон является важнейшим продуктом секреторной активности коры надпочечников. Его содержание в плазме крови крыс служит надежным критерием функционального состояния

этих эндокринных желез. Наиболее перспективным способом количественного определения кортикостерона в плане быстроты и специфичности анализа является ВЭЖХ [1, 10]. К насто-

ящему времени в литературе описаны различные варианты метода, включающие адсорбционную [5, 12] и обращенно-фазную [11] ВЭЖХ с ультрафиолетовой детекцией, пред- и постколоночную дериватизацию с детекцией по флюоресценции [7, 9], градиентное элюирование с последующим радиоимунологическим определением [4] и др. Наряду с несомненными достоинствами все эти методы имеют и недостатки: либо чрезмерно сложны [4] и продолжительны в постановке [11], либо требуют использования малодоступной дорогостоящей аппаратуры и реактивов [7, 9, 12].

Критически оценив существующие варианты метода, мы поставили задачу добиться оптимизации условий анализа, в частности на этапах способа экстракции, внутренней стандартизации и хроматографического разделения стероидов.

### Методика

Использовали кортикостерон и кортизол фирмы «Serwa», 11-дезоксикортикостерон, 11-дезоксикортизол, 11-дегидрокортикостерон, кортизон и альдостерон фирмы «Koch Light». Преднизолон, метилпреднизолон, дексазон, дексаметазон и триамцинолон — фармакопейные препараты, освобожденные от наполнителя. Хлороформ и метилхлорид их терморегоняли с дефлегматором. Метанол подвергали дополнительной очистке по следующей схеме: к 1 л приливали 50 мл 5 % метанольного раствора КОН и 5 мл 20 %  $\text{AgNO}_3$ . Перемешивали на магнитной мешалке 5 ч и затем дважды перегоняли с дефлегматором [2]. Остальные реактивы были квалификации не ниже х.ч. и использовались без дополнительной очистки.

В экспериментах использовали беспородных белых крыс-самцов массой 120—140 г. Подопытные животные получали однократную внутривенную инъекцию 25 % этанола в дозе 4 г на 1 кг массы, а контрольные — эквивалентный объем 0,85 % раствора хлорида натрия. Животных забивали в 14 ч под эфирным наркозом. Кровь собирали после декаптации из шейных сосудов, гепаринизировали для предотвращения свертывания и хранили замороженной в жидком азоте. После размораживания пробы центрифугировали и слегка гемолизированную плазму использовали для анализа. Такая последовательность операций была продиктована особенностями эксперимента. Более целесообразно, однако, замораживать уже готовую плазму.

**Экстракция стероидов.** К 0,5 мл плазмы добавляли 25 мкл 10 мкМ кортизона (внутренний стандарт), 50 мкл 1 М NaOH и 1 мл метилхлорида. Смесь осторожно встряхивали в течение 1 мин, избегая образования стойкой эмульсии. Водную и органическую фазы разделяли центрифугированием при 1500 об/мин в течение 3 мин. Плазму отсасы-

вали водоструйным насосом, а метилхлорид переносили в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл и упаривали досуха в токе азота. Непосредственно перед анализом содержимое пробирок растворяли в 20 мкл подвижной фазы и полностью наносили на колонку.

ВЭЖХ стероидов проводили на отечественном микроколоночном хроматографе «Милихром». Колонку (2×62 мм) упаковывали в лабораторных условиях сорбентом «Silasorb 600» с размером частиц 7,5 мкм («Lachema», ЧССР). Для этого 200 мг сорбента суспендировали в 5 мл бутанола и обрабатывали ультразвуком в течение 3 мин при 22 кГц. Суспензию помещали в предколоночный резервуар и подавали на вход гидравлическое давление порядка 250 атм при помощи насоса МСА-4 («Microtechna», ЧССР). Наилучшие результаты были получены при использовании в качестве вытесняющей фазы ацетона. После набивки колонку прокачивали обратным градиентом ацетона (100—0 %) в хлороформе и уравнивали элюентом. Эффективность колонки тестировали по кортикостерону в описанных ниже хроматографических условиях. Приведенная величина ВЭТТ составила 307, а полная эффективность колонки — 2700 теоретических тарелок.

В качестве подвижной фазы использовали 1,25 % метанол в хлороформе. Скорость подачи 200 мкл/мин. Этот же раствор прокачивали через сравнительную кювету хроматографа. Элюат анализировали по поглощению УФ-света с длиной волны 242 нм.

Кортикостероиды идентифицировали по времени удерживания и методом внесения в пробу известных соединений. Содержание кортикостерона определяли по калибровочному графику, представляющему собой зависимость концентрации данного стероида от соотношения на хроматограмме высот пика и пика внутреннего стандарта. Построение такого графика осуществляли добавлением в плазму с известной концентрацией гормона 100—500 пмоль кортикостерона с последующей экстракцией и хроматографическим анализом (рис. 1).

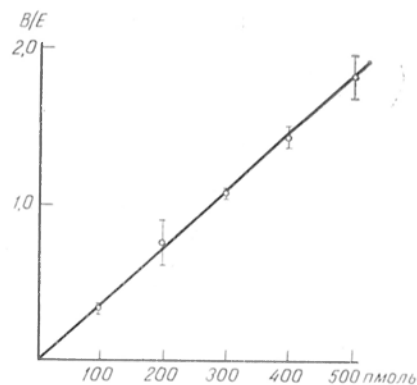


Рис. 1. Калибровочный график для определения кортикостерона.

По оси ординат — отношение высот пиков кортикостерона и кортизона; по оси абсцисс — количество добавленного в пробу кортикостерона (в пмолях). Каждая точка соответствует среднему значению из 3 определений.

## Результаты и обсуждение

Недостатком адсорбционной хроматографии кортикостероидов на силикагеле является то, что неполярные метаболиты кортизола и кортикостерона слабо удерживаются сорбентом и элюируются совместно с интенсивно поглощающими УФ-лучи примесями в начале хроматограммы. Это делает почти невозможным их детектирование. Снижение элюирующей силы подвижной фазы приводит к чрезмерному увеличению времени удерживания кортикостерона, что снижает чувствительность определения. Использование же градиентного элюирования дает хорошие результаты, но увеличивает время анализа и усложняет его. При обращенно-фазной хроматографии стероидов порядок их выхода обратный, но использованные нами сорбенты (Resolv C<sub>18</sub> и Silasorb C<sub>18</sub>) в системе метанол — вода не обладали достаточной селективностью и не позволяли достичь удовлетворительного разделения некоторых пар стероидов. В рамках поставленной задачи (определение кортикостерона) мы предпочли адсорбционный вариант хроматографии с изократическим элюированием.

При выборе подвижной фазы мы испытывали следующие системы: хлороформ — гексан — метанол (1:7:1) [11], метилхлорид — этанол — вода (90:6:4) [6, 7] и хлороформ — метанол [1]. Последняя в наших условиях дала наилучшие результаты. Время удерживания стероидов легко оптимизировалось изменением концентрации метанола в подвижной фазе. Для кор-



Рис. 2. Зависимость времени удерживания кортикостерона от концентрации метанола в подвижной фазе.

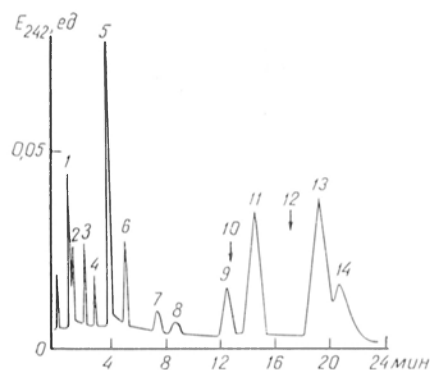


Рис. 3. Разделение смеси природных и синтетических стероидов.

1 — неидентифицированные соединения; 2 — 11-дезоксикортикостерон; 3 — 11-дегидрокортикостерон; 4 — 11-дегидрокортизол; 5 — кортикостерон; 6 — неидентифицированная примесь в кортикостероне; 7 — альдостерон; 8 — примесь в альдостероне; 9 — дексаметазон; 10 — дексазон; 11 — кортизол; 12 — триамцинолон; 13 — метилпреднизолон; 14 — преднизолон.

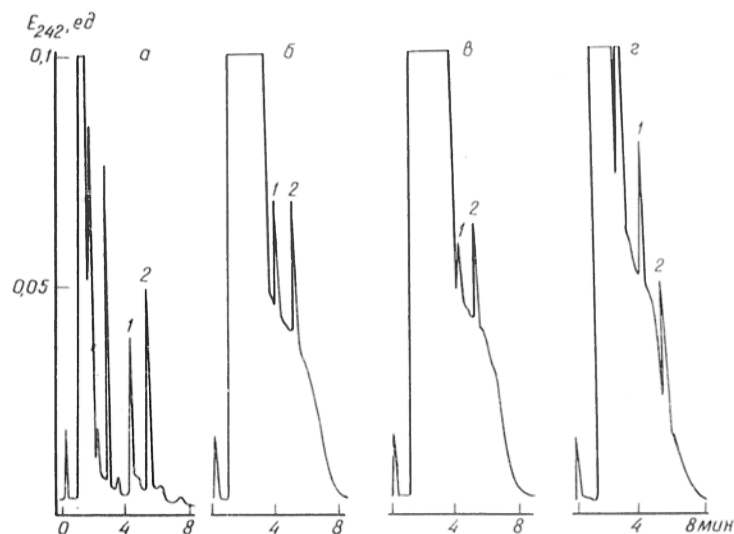
тикостерона такая зависимость приведена на рис. 2.

Как видно на рис. 3, достигнуто хорошее разделение стандартной смеси стероидов. Из 12 исследованных соединений лишь дексазон и дексаметазон имели весьма близкие значения времени удерживания: 11-дезоксикортикостерон — 1 мин 11 с, 11-дегидрокортикостерон — 1 мин 50 с, 11-дегидрокортизол — 2 мин 40 с, кортикостерон — 3 мин 38 с, кортизол — 4 мин 56 с, альдостерон — 6 мин 54 с, дексаметазон — 11 мин, дексазон — 11 мин 4 с, кортизол — 12 мин 56 с, триамцинолон — 15 мин 1 с, метилпреднизолон — 17 мин 13 с, преднизолон — 19 мин 8 с. Данная хроматографическая система, таким образом, может быть использована для изучения фармакодинамики ряда природных и синтетических кортикостероидов, а также для определения кортикостерона в их присутствии.

Выбрав кортизол в качестве внутреннего стандарта, мы руководствовались следующими соображениями. Во-первых, кортизол характеризуется близким с кортикостероном коэффициентом распределения между водой и метилхлоридом [3]. Во-вторых, оба соединения имеют близкое время удерживания и вместе с тем хорошо отделяются друг от друга (коэффициент разделения 1,91; коэффициент селективности 1,36). В-третьих, кортизол практически отсутствует в плазме крыс (по крайней мере его концентрация нахо-

Рис. 4. Влияние способа подготовки экстракта на качество разделения кортикостерона (1) и кортизона (2).

*а* — экстракция плазмы метиленхлоридом; *б* — экстракция после предварительной промывки плазмы гексаном; *в* — промывка метиленхлоридного экстракта 0,1 н. NaOH; *г* — экстракция подщелоченной до 0,1 н. NaOH плазмы метиленхлоридом.



дится ниже чувствительности данного метода) и не накладывается на хроматограмме ни на один из пиков присутствующих там соединений. Использование преднизолона в качестве внутреннего стандарта, как это предлагается в ряде работ [4, 12], более удобно для определения кортизола. В данном случае это приведет к неоправданному увеличению времени анализа.

Критическим этапом в определении кортикостерона в плазме крови явилась подготовка проб для анализа. Обычная экстракция метиленхлоридом (рис. 4) дает неудовлетворительные результаты. Кортикостерон выходит в виде пика «на хвосте» интенсивно поглощающих УФ-свет примесей. Предварительная промывка плазмы гексаном, которая используется для удаления холестерина и ряда других неполярных соединений, помимо снижения выхода стероидов при экстракции, эффекта не дала. Несколько лучшие результаты были получены при однократной промывке метиленхлоридного экстракта 0,1 н. NaOH (0,5 мл 0,1 н. NaOH на 2 мл метиленхлорида). Оптимальный результат был получен при использовании метода Yamada [12], согласно которому плазма перед экстракцией подщелачивается NaOH до конечной концентрации 0,1 М. В отличие от оригинальной методики экстракцию плазмы лигроином мы не проводили. После добавления щелочи все манипуляции следует проводить максимально быстро, поскольку кортикосте-

роиды, хотя и в меньшей степени, чем другие классы стероидов, все же разрушаются в щелочной среде.

В процессе отработки метода мы исследовали также два твердофазных способа очистки экстракта. В первом варианте после упаривания его растворяли в хлороформе, содержащем 10 % гексана, и нанесли на микроколонку с «Silasorb 600» (размер частиц 30 мкм, 100 мг). После промывки тем же раствором стероиды элюировали 0,3 мл 10 % метанола в хлороформе. Во втором варианте метиленхлоридный экстракт упаривали и растворяли в 10 % водном метаноле. Слегка опалесцирующий раствор пропускали через колонку, заполненную 60 мг сорбимого патрона «Sep-pack C<sub>18</sub>» («Waters», США). Стероиды смывали 0,3 мл метанола. Оба варианта при значительном усложнении схемы анализа существенного эффекта не дали.

Хранение плазмы крови перед анализом при  $-196^{\circ}\text{C}$  в течение месяца не сопровождалось изменениями хроматографической картины. В то же время при хранении экстракта через некоторое время появлялся пик не идентифицированного нами вещества, накладывающийся на пик кортикостерона и мешающий в ряде случаев его определению.

Уровень кортикостерона в плазме крови крыс-самцов в 14 ч составил  $391 \pm 64$  пмоль/мл ( $n=5$ ). Это хорошо согласуется с данными литературы [11, 12]. Стандартная ошибка анализа

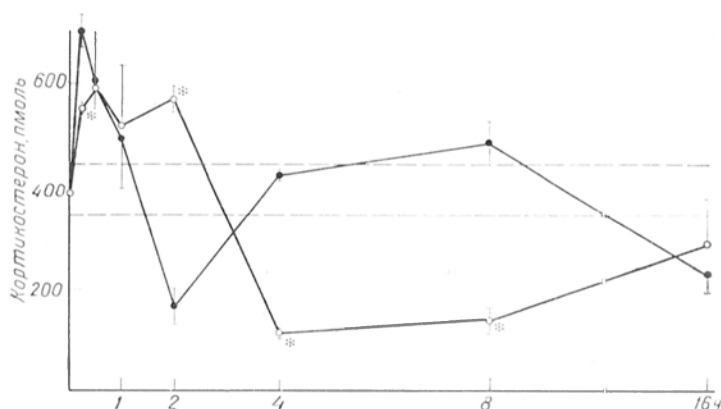


Рис. 5. Концентрация кортикостерона в плазме крови крыс в динамике развития острой алкогольной интоксикации.

Темные кружки — контроль; светлые — опыт. Звездочка —  $p < 0.05$ .

при  $n=5$  составляет  $3,86 \pm 0,92$  %. Чувствительность по кортикостерону достигает 10 пмоль в пробе, т. е. в принципе для 1 определения достаточно 0,1 мл плазмы. Время хроматографического разделения 6 мин. Полная продолжительность анализа 1 пробы составляет около 20 мин и уменьшается при увеличении числа образцов, обрабатываемых одновременно. Таким образом, в течение 8-часового рабочего дня можно проанализировать около 40 проб. Выход стероидов при экстракции был не очень велик, но достаточно воспроизводим ( $53 \pm 3$  %). При необходимости он может быть увеличен реэкстрагированием плазмы новой порцией метилхлорида. Небольшой объем экстрагента был выбран с целью упрощения анализа: для уменьшения объемов токсичных растворителей, с которыми приходится манипулировать, для уменьшения продолжительности стадии упаривания. В данных хроматографических условиях после 100 анализов время удерживания кортикостерона на колонке не изменялось.

Метод был опробован при определении уровня кортикостерона в плазме крыс в динамике острой алкогольной интоксикации (рис. 5). Увеличение концентрации гормона в течение 1-го часа после инъекции в крови как подопытных, так и контрольных животных подвержено значительным индивидуальным колебаниям и отражает, вероятно, стрессовую реакцию на манипуляции, связанные с внутрибрюшинным введением растворов. Реакция подопытных животных менее выражена, но более продолжительна. Ко 2-му часу уровень кортикостерона у них в 3,5 раза выше, чем в контроле. Начи-

ная с 4-го часа, реализуется антистрессорный эффект этанола. Уровень гормона устойчиво и значительно снижается, возвращаясь к норме лишь к 16 ч.

Таким образом, предлагаемый метод позволяет быстро и точно определять концентрацию кортикостерона в плазме крови крыс и может служить альтернативой для флуориметрических и радиоиммунологических методов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Герег III. Количественный анализ стероидов: Пер. с англ. — М., 1985.
2. Резников А. Г. Методы определения гормонов: Справочное пособие. — Киев, 1980.
3. Юдаев Н. А. Химические методы определения стероидных гормонов в биологических жидкостях. — М., 1961.
4. Eibs G., Schoneshofer M. // J. Chromatogr. Biomed. appl. — 1984. — Vol. 310, N 2. — P. 386—389.
5. Ishii D., Hibi K., Asai K. et al. // J. Chromatogr. — 1978. — Vol. 156, N 1. — P. 173—180.
6. Kawasaki T., Maeda M., Tsui A. // J. Chromatogr. Biomed. appl. — 1982. — Vol. 232, N 1. — P. 1—11.
7. Kawasaki T., Maeda M., Tsui A. // J. clin. Chem. clin. Biochem. — 1981. — Vol. 19, N 8. — P. 727.
8. Matsuzawa T., Sugimoto N., Ishiguro I. // Analyt. Biochem. — 1981. — Vol. 115, N 2. — P. 250—253.
9. Seki T., Yamaguchi Y. // J. Liquid Chrom. — 1983. — Vol. 6, N 6. — P. 1131—1138.
10. Shackleton C. H. L. // J. Chromatogr. Biomed. appl. — 1986. — Vol. 379. — P. 91—156.
11. Thomas P., Wofford H. W. // Comp. Biochem. Physiol. — 1984. — Vol. 78-B, N 2. — P. 473—479.
12. Yamada K., Aizawa Y. // J. pharmacol. Meth. — 1984. — Vol. 11, N 4. — P. 291—297.

Поступила 24.05.88

# ESTIMATION OF RAT BLOOD PLASMA CORTICOSTERONE BY MEANS OF ADSORPTION MICRO-HPLC

A. M. Khokha

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grodno

A simple and sensitive procedure is developed for estimation of corticosterone in rat blood plasma. The procedure involved extraction

of the substance with methylene chloride in alkaline medium followed by adsorption micro-HPLC on Silasorb 600 in the system of chloroform-methanol using cortisone as an internal standard. The assay enabled to estimate as low as 10 pmole of corticosterone per a sample within 20 min (including 6 min for the chromatographic separation). Efficiency of the assay was confirmed by dynamic estimations of corticosterone content in rat blood during acute alcohol intoxication.

УДК 616.151.55-078.73

О. А. Маркова, В. В. Калашников, В. Б. Хватов

## ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТРОМБИНА III

Институт скорой медицинской помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва

Антитромбин III (АТ III), или кофактор гепарина, — регулятор свертывающей системы крови человека. Определение его содержания имеет важное значение при ряде заболеваний [2, 9, 12, 17]. Установлено, что снижение уровня АТ III является ранним диагностическим признаком появления тромбофилического состояния и начальных признаков синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови [2, 10].

В настоящее время в клинических целях АТ III определяют с помощью ряда методик: коагулологических [1, 7], спектрофотометрических с применением хромогенных субстратов [8, 16] и иммунохимических [11, 15, 18].

Недостатком коагулологических и спектрофотометрических методов является неадекватность исследования АТ III при проведении гепаринотерапии. Кроме того, низкая чувствительность не позволяет оценить уровень этого ингибитора в биологических жидкостях (спинномозговая, слезная, моча) с низким его содержанием. Эти методы также характеризуются относительной специфичностью, так как регистрируют общую антитромбиновую активность. В последние годы все шире распространяются и внедряются в клиническую лабораторную службу иммунохимические методы, которые лишены отмеченных недостатков и позволяют дать количественную оценку антигена АТ III.

Целью настоящей работы явились разработка, стандартизация иммуноферментного метода (ИФМ) определе-

ния АТ III и его апробация при ряде заболеваний.

### Методика

В работе использовали очищенный препарат АТ III человека, выделенный из плазмы крови методом аффинной хроматографии на гепаринсефарозе 4В [4].

Антисыворотку к АТ III получали на кроликах породы шиншилла массой 4,0—6,0 кг. Применяли следующую схему иммунизации: 2 мг АТ III в 1 мл воды в смеси с равным объемом полного адъюванта Фрейнда вводили подкожно в оба глаза и подкожно в 5—6 точек. Впоследствии проводили 3 инъекции этого же количества белка с интервалом 9 дней, чередуя способы введения (подкожно, внутримышечно, подкожно).

Кровь забирали на 7-й день после последней инъекции из краевой вены уха кролика, в течение 20 дней. Полученную антисыворотку консервировали азидом натрия (0,2 %) и хранили в течение 2—3 лет без потери активности при 4 °С.

Анализ антисывороток проводили с помощью перекрестного иммуоэлектрофореза по Лауреллю [13] и иммунодиффузионного анализа со стандартной тест-системой по Н. И. Храмковой и Г. И. Абселеву [6]. Содержание общего белка определяли по методу Лоури [14].

Антитела к АТ III выделяли из антисывороток методом аффинной хроматографии на иммуносорбенте, приготовленном на основе CN—Br-сефарозы и очищенного препарата белка. Затем их лиофильно сушили и хранили при 4 °С.

Конъюгирование антител с пероксидазой из хрена (Олайнский завод химреактивов, марка А, активность 659 ед.) проводили методом периодатного окисления [19]. Полученный конъюгат хранили с добавлением 0,5 % бычьего сывороточного альбумина и 40 % глицерина при —20 °С в течение 1 года без потери активности.

Выбор оптимальной концентрации антител для иммобилизации на твердой фазе и определение разведения конъюгата проводили