

Методи дослідження

УДК 616.15-07

І.Ф.Мецишен, Т.В.Куртян

МЕТОД КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КРЕАТИНУ ТА КРЕАТИНІНУ В ОДНІЙ ПРОБІ СИРОВАТКИ (ПЛАЗМИ) КРОВІ

Кафедра медичної хімії (зав. – проф. І.Ф.Мецишен)
Буковинського державного медичного університету, м.Чернівці

Резюме. Розроблено простий, добре відтворюваний, доступний для виконання в клінічних біохімічних лабораторіях метод кількісного визначення креатину і креатиніну в одній пробі сироватки (плазми) крові.

Ключові слова: креатин, креатинін, кількісне визначення, сироватка, плазма крові.

Вступ. Креатин і креатинін є постійними компонентами плазми і залишкового азоту крові. Основним місцем синтезу креатину в організмі людини є печінка. Із неї він надходить у м'язи, де за участю ферменту креатинфосфокінази піддається фосфорилуванню з утворенням креатинфосфату, який є субстратом для синтезу АТФ (креатинкіназний шлях ресинтезу АТФ). При цьому із креатинфосфату утворюється креатинін, який виводиться з організму нирками. Крім того, креатинін може утворюватися з креатину спонтанно (неферментативно) за рахунок дегідратації (відщеплення молекули води) [2].

На частку креатину і креатинфосфату припадає до 60% небілкового азоту м'язів. Креатинфосфат і креатин відносяться до тих азотистих екстрактивних речовин м'язів, які беруть участь у хімічних процесах, пов'язаних з м'язовим скороченням [3]. Порушення (зміни) у функціональній активності м'язів насамперед відображаються в показниках креатину і креатиніну в сироватці (плазмі) крові, а тому їх кількісне визначення служить маркером стану м'язів.

Існуючий метод визначення креатину [1] базується на перетворенні його в креатинін за наявності хлоридної кислоти і температури 130°C (автоклавування). При цьому використовується 3 мл сироватки крові. Ці умови обмежують використання даного методу в клініці.

Мета дослідження. Розробити простий, доступний для використання в клінічних лабораторіях метод кількісного визначення креатину і креатиніну в одній пробі сироватки (плазми) крові.

Принцип методу. Креатинін у лужному середовищі взаємодіє з пікриновою кислотою з утворенням забарвлених сполук. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації креатиніну. Визначення креатину в сироватці (плазмі) крові засновано на його властивостях перетворюватися гідролітичним шляхом у креатинін. Знаючи вихідний вміст креатиніну в пробі і ту кількість його, яка визначається в аналогічній пробі після перетворення в ній креатину в креатинін, за приростом концентрації останнього судять про концентрацію креатину. Із кількості креатиніну,

отриманого при визначенні суми креатин-креатинін, вираховують рівень креатиніну й отриману різницю перемножують на 1,16 (коефіцієнт переведення креатиніну в креатин).

Хід виконання. У центрифужну пробірку вносять 1,5 мл сироватки (плазми) крові, 0,5 мл дистильованої води і 1,0 мл 10% трихлороцетової кислоти, перемішують скляною паличкою і через 10 хв центрифугують 10 хв при 3000 об/хв.

Визначення креатиніну. До 1 мл центрифугати, що відповідає 0,5 мл сироватки (плазми) крові, додають 0,5 мл 2% розчину пікринової кислоти, 0,5 мл 10% розчину NaOH і струшують впродовж 3-5 хв. До проб додають 1,5 мл дистильованої води, струшують чи перемішують скляною паличкою і через 15 хв колориметрують при зеленому світлофільтрі (довжина хвилі 530 нм; 500-560 нм) у кюветі з робочою шириною 10 мм проти контрольної проби.

Контрольна проба. До 3 мл води додають 0,5 мл 2% розчину пікринової кислоти і 0,5 мл 10% розчину NaOH.

Розрахунок концентрації креатиніну в сироватці (плазмі) крові можна проводити як за калібрувальним графіком, так і за стандартним розчином креатиніну.

Визначення креатину. До 1 мл одержаної центрифугати додають 0,5 мл 2н HCl, пробірки закривають алюмінієвою фольгою і ставлять на киплячу водяну баню на 3 год. Після охолодження в пробі послідовно вносять 0,5 мл 2н NaOH, 0,5 мл 2% розчину пікринової кислоти, 0,5 мл 10% розчину NaOH, струшують, додають 1 мл води і колориметрують при 530 нм проти контрольної проби. Отримане значення екстинкції за калібрувальним графіком чи стандартним розчином креатиніну знаходять вміст суми креатинін-креатин. Із цієї величини вираховують рівень креатиніну і різницю множать на коефіцієнт 1,16.

Побудова калібрувального графіка. Готують три водних розчини креатиніну: 10 мг/л (88,5 мкмоль/л), 20 мг/л (177 мкмоль/л) і 50 мг/л (442,5 мкмоль/л). До 0,5 мл кожного розчину вносять 0,5 мл 2% розчину пікринової кислоти, 0,5 мл 10% розчину NaOH, струшують і додають

2,5 мл води. Колориметрують проти контрольної проби при 530 нм. За одержаними даними будують калібрувальний графік.

Розрахунок за стандартним розчином креатиніну. Готують стандартний розчин креатиніну (20 мг/л, 177 мкмоль/л). Проводять визначення екстинкції в сироватці (плазмі) крові і стандартному розчині, як описано вище. Вміст креатиніну в пробі знаходять за формулою:

$$C = 177 \times E / E \text{ ст. мкмоль/л, де:}$$

C – вміст креатиніну в сироватці (плазмі) крові (мкмоль/л);

177 – стандартний розчин креатиніну (мкмоль/л);

E д – екстинкція сироватки (плазми) крові;

E ст. – екстинкція стандартного розчину.

За нашими даними вміст креатиніну в плазмі крові в практично здорових чоловіків, віком від

35 до 50 років, склав $185 \pm 16,7$ мкмоль/л, а креатиніну – $171,0 \pm 12,6$ мкмоль/л.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому доцільно вивчати особливості зміни рівня креатину та креатиніну при різних патологічних станах.

Література

1. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Т.1. – Минск: Беларусь, 2000. – 495 с.
2. Клінічна біохімія. Навчальний посібник, за ред. О.П.Тимошенка. – К.: ВД “Професіонал”, 2005. – 288 с.
3. Мешишен І.Ф., Пішак В.П., Григор’єва Н.П. Основи обміну речовин та енергії. Навчальний посібник. – Чернівці: Медуніверситет, 2005. – 192 с.

МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРЕАТИНА И КРЕАТИНИНА В ОДНОЙ ПРОБЕ СЫВОРОТКИ (ПЛАЗМЫ) КРОВИ

И.Ф.Мешишен, Т.В.Куртян

Резюме. Разработан простой, хорошо воспроизводимый, доступный для использования в клинических биохимических лабораториях метод количественного определения креатина и креатинина в пробе сыворотки (плазмы) крови.

Ключевые слова: креатин, креатинин, количественное определение, сыворотка, плазма крови.

A METHOD OF QUANTIFYING CREATINE AND CREATININE IN ONE SAMPLE OF BLOOD SERUM (PLASMA)

I.F.Meshchysheh, T.V.Kurtian

Abstract. A simple, well-recreated, available to be carried out in clinical biochemical laboratories method of quantifying creatine and creatinine in one blood serum (plasma) sample has been elaborated.

Key words: creatine, creatinine, quantification, serum, blood plasma.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. В.Ф.Мислицький

Buk. Med. Herald. – 2007. – Vol.11, №3.- P.164-165

Надійшла до редакції 10.07.2007 року

УДК 577.1:616.15-071

І.Ф.Мешишен, В.П.Пішак, В.П.Польовий

МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ПЛАЗМИ (СИРОВАТКИ) КРОВІ

Кафедра медичної хімії (зав. – проф. І.Ф.Мешишен)
Буковинського державного медичного університету, м.Чернівці

Резюме. Розроблено метод визначення загальної антиоксидантної активності плазми (сироватки) крові. Він заснований на гальмуванні плазмою (сироваткою) крові пероксидного окиснення ліпідів головного мозку

щурів і характеризується простотою виконання, доступністю реактивів і доброю відтворюваністю.

Ключові слова: загальна антиоксидантна активність, плазма, сироватка крові, метод визначення.

Вступ. На сьогодні не викликає сумніву той факт, що виникнення і розвиток широкого кола захворювань людини і тварин супроводжується активацією вільнорадикальних реакцій пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків [1,2,3]. Основними механізмами активації таких реакцій є значне збільшення генерації радикалів кисню, так званих активних форм кисню

(АФК) – супероксидного аніонрадикалу ($O_2^{\cdot-}$), гідроксильного радикалу (HO^{\cdot}), синглетного кисню (1O_2), пероксиду водню (H_2O_2), гіпохлоританіону ($ClO^{\cdot-}$) тощо, а також вивільнення іонів заліза (Fe^{2+}) із його клітинних депо.

Процесові запуску і розвитку вільнорадикальних реакцій протидіють антиоксиданти. Основні антиоксиданти плазми крові та механізм їх дії