

*В.П.Пішак, С.Г.Ярмольчук*

## АКТИВНІСТЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМІНУ ТА ВІДСТРОЧЕНИЙ СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЙІ У СИРОВАТЦІ КРОВІ

Кафедра медичної біології, генетики та гістології (зав. – чл.-кор. АПН України, проф. В.П.Пішак)  
Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці

**Резюме.** Фенол (карболова кислота) є антимікробним біохімічним стабілізатором сироватки крові та ферменту церулоплазміну і в концентрації 50 ммоль/л стабілізує їх. При цьому активність досліджуваного ензиму не змінювалася протягом 30 діб зберігання стабілізованої сироватки крові при кімнатній температурі.

Це дозволяє використати дану сироватку як референтний матеріал для контролю та відстроченого визначення показника біохімічними лабораторіями.

**Ключові слова:** церулоплазмін, сироватка крові, фенол, референтні матеріали, відстрочене визначення активності.

**Вступ.** Нині на порядку денному медичної науки гостро встало питання про точність виконання біохімічних аналізів. Основним шляхом досягнення поставленої мети є контроль якості виконання лабораторних досліджень, який потребує референтних (контрольних, еталонних) матеріалів. В Україні референтні матеріали не виробляються [10]. На міжнародному ринку набір контрольних матеріалів коштує 150-400 доларів США [9], а 1 мл тестованого контрольного матеріалу, виготовленого з біологічних рідин і тканин людини, коштує 1,6-2,4 долара США [5].

**Мета дослідження.** Знайти загальнодоступний біохімічний стабілізатор сироватки крові і з його допомогою розробити еталонний матеріал для контролю якості визначення активності церулоплазміну, а також спосіб відстроченого визначення даного показника.

**Матеріал і методи.** Первинний скринінг антимікробного біохімічного стабілізатора провели серед медичних антисептиків [4] за їх здатністю запобігати росту гриба *Aspergillus niger* на 0,1 М розчині  $\alpha$ -D,L-аланіну [8]. У роботі використали сироватки крові донорів, які обстежені на предмет відсутності в їх крові збудників сифілісу, СНІДу та гепатитів. Активність церулоплазміну визначали за методом Н.А.Равін. У результаті проведеного скринінгу встановлено, що з числа вивчених сполук фенол (карболова кислота) [4,12] відповідає всім вимогам до антимікробних

біохімічних стабілізаторів, і в концентрації 50 ммоль/л стабілізує біологічні проби та їх біохімічні показники протягом 50 діб зберігання при кімнатній температурі [8].

**Реактиви та обладнання.** 1. Вода, насичена фенолом, містить при 20°C 863 ммоль/л карболової кислоти [2]. 2. 0,1 М ацетатний буферний розчин з  $pH=6,0\pm 0,05$ . 3. 0,5% водний розчин п-фенілендіаміну хлориду. 4. 0,5% водний розчин натрію азиду. 5. 3% розчин натрію хлориду.

У свіжозабраних сироватках крові донорів визначали активність церулоплазміну (мідьоксидаза, залізо (II): кисень-оксидоредуктаза [КФ 1.16.3.1]). Після цього досліджувані сироватки крові інтенсивно перемішували на магнітній мішалці та приливали до них воду, насичену фенолом, з розрахунку 6,2 мл на 100 мл біологічної рідини, герметично закупорювали і зберігали при кімнатній температурі. Активність мідьоксидази визначали до стабілізації, через 2 год після додавання фенолу, а також у терміни, вказані в табл. 1. З цією метою в хімічні пробірки доливали 2 мл буферного розчину, 0,1 мл сироватки крові та 1 мл розчину п-фенілендіаміну хлориду. Суміш перемішували, помішали на 1 год у водяний ультратермостат з температурою  $37\pm 0,1^\circ C$ , після чого доливали 1 мл розчину натрію азиду та 10 мл розчину натрію хлориду, перемішували і колориметрували в кюветах із довжиною оптичного шляху 30 мм при довжині світлової хвилі

Таблиця 1

Показники активності церулоплазміну (в ум. од. на 1 мг білка)  
в сироватці крові донорів, стабілізованій фенолом у концентрації 50 ммоль/л,  
у динаміці зберігання її при кімнатній температурі

Порядкові номери сироваток та статистичні показники	До стабілізації	Через 2 год після стабілізації	Дні після стабілізації							
			2	5	10	15	20	30	40	50
1	8,54	8,75	8,99	8,60	8,19	8,87	8,22	8,72	7,83	7,00
2	7,29	6,85	7,26	7,02	6,77	7,42	7,26	6,94	6,85	6,06
3	7,94	7,99	7,91	8,13	7,76	8,27	8,38	8,15	7,77	6,82
4	8,74	9,15	8,80	8,57	8,94	8,71	8,43	8,45	8,50	7,51
5	8,88	9,42	8,68	8,97	8,53	9,19	8,82	9,21	7,93	7,62
6	7,65	7,94	7,80	7,50	7,71	7,81	7,34	7,86	7,11	6,41
7	8,28	8,68	8,38	8,53	8,48	8,38	8,15	8,24	7,72	6,57
8	9,14	9,58	9,15	8,88	9,44	9,01	8,80	8,79	8,68	7,68
9	9,27	8,85	9,61	9,32	9,46	9,19	9,59	9,25	8,58	7,48
M	8,44	8,58	8,51	8,39	8,36	8,54	8,33	8,40	7,89	7,02
±m	0,23	0,29	0,25	0,24	0,29	0,21	0,24	0,24	0,21	0,20
t	–	0,38	0,20	0,15	0,21	0,32	0,33	0,12	1,78	4,71
P	–	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,05	<0,001
%*	100	102	101	99	99	101	99	100	93	83

Примітка. \* – Відсотки вираховані з величин „M”

Таблиця 2

Середня відносна похибка кількісного визначення активності церулоплазміну  
в сироватці крові донорів, стабілізованій фенолом (50 ммоль/л),  
на 30-й день зберігання її при кімнатній температурі (дослід проведений із сироваткою крові № 1)

№ проби	Одержані екстинкції	Активність церулоплазміну в умовних одиницях на 1 мг білка *	Відхилення від середньої арифметичної величини	Середня відносна похибка
1	0,598	8,79	0,062	± 3,14%
2	0,630	9,26	0,532	
3	0,560	8,24	0,488	
4	0,580	8,53	0,198	
5	0,600	8,82	0,092	
Середнє арифметичне		8,728	0,2744	

Примітка. \* – Вміст білка в 0,1 мл сироватки крові дорівнював 6,80 мг

540 нанометрів проти контрольної проби. Її готували, як і дослідну, з тою різницею, що розчин натрію азиду приливали зразу ж після доливання розчину п-фенілендіаміну хлориду. З метою вирахування активності церулоплазміну в ум. од. на 1 мг білка одержані екстинкції множили на 100 і ділили на кількість міліграмів загального білка, яка містилася в 0,1 мл досліджуваної сироватки крові [6].

Результати досліджень обробляли статистично за допомогою непарного двобічного критерію Стьюдента для рівних дисперсій [11]. З метою вирахування ступеня вірогідності (P) використали комп'ютерну програму Student Д4 (I.Davidenko, 2002), яка складена за алгоритмом, описаним В.И.Сергиенко та И.Б.Бондаревой [11]. Вважали, що між контрольними і дослідними біохімічними показниками відсутня різниця при показниках „P” рівних 0,95 і більше.

#### Результати дослідження та їх обговорення.

Проведені дослідження показали, що активність церулоплазміну в нестабілізованих зразках сироватки крові людини, які зберігалися при кімнатній температурі, прогресивно зменшувалася, починаючи з 2-го дня дослідження. На 5-й день вони статистично значимі (P<0,05), а через 15 діб досліджувані показники становили 55% від вихідних величин.

Фенол у концентрації 50 ммоль/л стабілізував сироватку крові та її церулоплазмін протягом 30 діб зберігання досліджуваної біологічної рідини при кімнатній температурі (табл. 1).

Середня відносна похибка методики визначення активності мідьоксидази в сироватці крові в наших дослідженнях дорівнювала ±3,14% (табл. 2).

Механізм стабілізуючої дії фенолу на біологічні об'єкти ймовірно пов'язаний з його антимікробною активністю [4], завдяки якій відбувається мікробна деконтамінація і запобігається роз-

кладанню біологічних проб і аналітів, що містяться в них, мікроорганізмами-контамінатами [3]. Механізм антимікробної дії карболової кислоти зумовлений її здатністю вступати в хімічні взаємодії з ліпідами мембран і цитоплазми мікроорганізмів [12], що порушує функції мікробних органел, знижує життєздатність мікроорганізмів і, в кінцевому підсумку, викликає деконтамінацію біологічних проб, запобігає розкладанню їх мікроорганізмами й стабілізує біохімічні аналіти [13].

Механізми стабілізації активності церулоплазміну сироватки крові ймовірно пов'язані з електростатичними та гідрофобними взаємодіями молекул фенолу з відповідними ділянками поліпептидного ланцюга мідьоксидаз [1].

#### Висновок

Фенол у концентрації 50 ммоль/л стабілізує активність церулоплазміну сироватки крові протягом 30 діб.

Розроблено референтний матеріал контролю якості визначення активності церулоплазміну та відстрочений спосіб кількісного визначення її в сироватці крові.

**Перспективи подальших досліджень.** Здатність фенолу стабілізувати активність церулоплазміну буде основою для подальшого вивчення впливу цього антимікробного біохімічного стабілізатора на активність інших ензимів сироватки крові.

#### Література

1. Взаємодія нуклеїнових кислот з неінтеркалянтами, що містять бісчетвертинні азоти / В.О.Сорокін, В.О.Валєєв, Г.О.Гладченко та ін. // Синтез, експериментальне вивчення та клінічне застосування четвертинних амонієвих сполук: Матеріали симпозиуму. – Чернівці, 10-12 жовтня 1995 р. – Чернівці, 1995. – С. 72.
2. Гороновский И.Т., Назаренко Ю.П., Некряч Е.Ф. Краткий справочник по химии. – К.: Наук. думка, 1987. – 688 с.
3. Красильников А.П. Справочник по антисептике. – Минск: Высш. школа, 1995. – 367 с.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства: Пособие для врачей. В 2 т. – Т.2. – 14-е изд., перер., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2000. – 608 с.
5. Меньшиков В.В., Прудник И.М., Кадашева О.Г. Экономическое обоснование затрат на проведение внутрилабораторного контроля качества // Клин. лаб. диагност. – 2004. – № 10. – С. 49-51.
6. Методы клинических лабораторных исследований / В.С. Камышников, О.А. Вологовская, А.Б. Ходюкова и др. / Под ред. В.С. Камышникова. – 2-е изд., перераб. и доп. – Минск: Бел. наука, 2003. – 775 с.
7. Пішак В.П., Ярмольчук Г.М. Первинний скринінг антифунгальних біохімічних стабілізаторів // Мікробіол. ж. – 1997. – Т. 59, № 5. – С. 41-46.
8. Пішак В.П., Ярмольчук С.Г. Відстрочене визначення сечовини в цільній крові та її компонентах // Бук. мед. вісник. – 2003. – Т. 7, № 3. – С. 128-131.
9. Програма внешней оценки качества микробиологических исследований / В.С. Михайлова, Е.Н. Гаранина, В.Н. Малахов и др. // Клин. лаб. диагност. – 1996. – № 1. – С. 26-30.
10. Проценко В.М. Зовнішня оцінка якості лабораторних досліджень (ЗОЯ). Досвід проведення регіональних циклів // Лаб. діагност. – 2000. – № 2. – С. 57-60.
11. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. – М.: ГЭОТАР. Медицина. – 2000. – 256 с.
12. Тринус Ф.П. Фармакотерапевтический справочник. – 7-е изд., испр. – К.: Здоров'я, 1993. – 592 с.
13. Kieine T.O., Albrecht J., Zöfel P. Flow cytometry of cerebrospinal fluid (CSF) lymphocytes: alterations of blood / CSF ratios of lymphocyte subsets in inflammation disorders of the human central nervous system (CNS) // Lab. Med. – 1999. – Vol. 37, № 3. – P. 231-241.

### THE ACTIVITY OF CERULOPLASMIN AND A DELAYED METHOD OF ITS QUANTITATIVE EVALUATION IN THE BLOOD SERUM

*V.P.Pishak, S.G.Yarmolchuk*

**Abstract.** Phenol (carbolic acid) is an antimicrobial biochemical stabilizer of the blood serum and ceruloplasmin enzyme and in a concentration of 50 mmol/l stabilizes them. The activity of the studied enzyme did not change during 30 days of storing stabilized blood serum at room temperature. This makes it possible to use it as a reference material for controlling and a delayed evaluation of the index by biochemical laboratories.

**Key words:** ceruloplasmin, blood serum, phenol, reference materials, delayed activity evaluation.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Buk. Med. Herald. – 2006. – Vol.10, №2.- P.105-107

Надійшла до редакції 6.03.2006 року