



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **40913** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 33/52

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ЗАСТОСУВАННЯ СПОСОБУ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЗАГАЛЬНОЇ КРЕАТИНКІНАЗИ В ПЛАЗМІ КРОВІ ЯК СПОСОБУ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ СЕРЦЕВОЇ ФРАКЦІЇ КРЕАТИНКІНАЗИ В ПЛАЗМІ КРОВІ

1

(21) u200814371

(22) 15.12.2008

(24) 27.04.2009

(46) 27.04.2009, Бюл.№ 8, 2009 р.

(72) ЯВОРСЬКИЙ ОСТАП ГРИГОРОВИЧ, UA, БУ-
ЛАК ОРЕСТ ВОЛОДИМИРОВИЧ, UA, ДРОНИК
ІРИНА СТЕПАНІВНА, UA

2

(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО, UA

(57) Застосування способу визначення активності
загальної креатинкінази в плазмі крові як способу
визначення активності серцевої фракції креатинкі-
нази в плазмі крові.

Корисна модель стосується медицини, зокре-
ма терапії та кардіології, і може бути застосована
для визначення активності серцевої фракції креа-
тинкінази у плазмі крові.

Креатинкіназа (КК) - це фермент, що каталізує
реакцію фосфорилування креатину, який поста-
чає енергетичний субстрат для м'язового скоро-
чення, каталізує зворотне перенесення фосфори-
льного залишку з аденозинтрифосфату на креатин
і з креатинфосфату на аденозиндифосфат[1]. За-
гальна активність КК складається з активності
трьох ізоформ ферменту: КК-ММ - міститься пере-
важно в скелетних та гладких м'язах, КК-BB - ха-
рактерна для тканини мозку, а у міокарді - КК-ММ
(65%), КК-BB (5%) та КК-MB (30%). При пошко-
дженні клітин, що містять креатинкіназу, фермент
надходить у кров. Ізофермент КК-MB відноситься
до ранніх показників ураження серцевого м'яза при
інфаркті міокарда: підвищення його активності
починається через 4-8 год після інфаркту, досягає
піку через 4-12 год, а термін нормалізації активно-
сті триває 24-48 год [2].

Відомий кінетичний спосіб визначення актив-
ності MB-фракції КК, який включає проведення
низки поєднаних ферментних реакцій з визначен-
ням у кінцевому результаті відновленого нікотина-
мідаденіндинуклеотидфосфату (НАДФН) [3]. Цей
метод є високочутливий, швидкий й зручний у ви-
конанні, але, разом з тим, він дорогий і вимагає
дорогоцінної апаратури, через що не в кожній
лабораторії може бути застосований.

Існує також спосіб визначення активності за-
гальної КК за кольоровою реакцією виявлення кіль-
кості неорганічного фосфору, утвореного шляхом
кислотного гідролізу із синтезованого креатинкіна-
зою креатинфосфату. Цей спосіб значно дешев-

ший, вимагає відносно недорогого фотоелектро-
колориметра, але набагато триваліший та
багатостадійний у виконанні. Крім цього, негатив-
ною проблемою є використання для зупинки фер-
ментативної реакції токсичної трихлороцтової кис-
лоти, яка нерідко викликає алергічні реакції.

Відомий спосіб визначення активності загаль-
ної КК в плазмі крові [метод Яворського О.Г.,
1987р.] без названих недоліків, який апробований
багатолітнім використанням в лабораторіях і є
особливо актуальним на сьогоднішній день [4].
Цей спосіб включає визначення неорганічного фо-
сфору, утвореного шляхом кислотного гідролізу із
синтезованого КК креатинфосфату. Для його здій-
снення у дві центрифужні пробірки вносять по
0,05мл сироватки або плазми. Додають по 0,2мл
субстратної суміші, приготованої на трис-
ацетатному буфері з рН 10,6, і ставлять на водяну
баню з температурою 37°C. Через 3хв в дослідну
пробірку вносять 0,1мл розчину креатину і продо-
вжують інкубацію впродовж 30хв. Ферментативну
реакцію зупиняють додаванням в обидві пробірки
по 1мл розчину амонію молібдату в сірчаній кисло-
ті. Після цього додають в контрольну пробірку
0,1мл креатину. Пробірки залишають при кімнатній
температурі на 15хв для гідролізу синтезованого
КК креатинфосфату. Додають в обидві пробірки по
1мл розчину аскорбінової кислоти, ще через 15хв -
по 2мл розчину гідроксиду натрію. Пробірки стру-
шують до повного зникнення помутніння і через
15хв колориметрують з червоним світлофільтром
(довжина хвилі - 625нм) в односантиметровій кю-
веті. За різницею показників екстинції в дослідній і
контрольній пробірках і на основі калібрувального
графіка стандартних розчинів фосфату вирахову-
ють активність КК, яку виражають в мікромолях

(19) **UA** (11) **40913** (13) **U**

креатинфосфату, синтезованого КК за 1хв в 1л сироватки або плазми, тобто в мікромолях фосфату чи фосфору віл сироватки чи плазми за 1хв. Але цей спосіб дає можливість визначити активність лише загальної КК у плазмі крові.

В основу корисної моделі поставлене завдання створення дешевого і доступного способу визначення активності серцевої фракції КК у плазмі крові шляхом застосування способу визначення активності загальної КК в плазмі крові [метод Яворського О.Г., 1987р.]

Поставлене завдання вирішується тим, що спосіб визначення активності загальної креатинкінази в плазмі крові застосовують як спосіб визначення активності серцевої фракції КК в плазмі крові.

Власними дослідженнями встановлено, що в гомогенатах м'яза, міокарда і мозку співвідношення активності КК при двох точках рН 10,6 і 7,6 є різне: активність КК при рН 10,6 співвідноситься до активності КК при рН 7,6 відповідно у м'язах в межах від 2,86:1 до 4,2:1, у мозку в межах від 1,25:1 до 1,7:1 і у міокарді в межах від 1,75:1 до 2,1:1. Таким чином, якщо співвідношення активності КК у крові знаходиться в межах від 1,75:1 до 2,1:1, це свідчить про міокардіальне походження фермента, тобто підвищення активності КК відбувається внаслідок підвищення активності серцевої фракції.

Спосіб визначення активності загальної КК застосовують для визначення активності серцевої фракції КК таким чином.

У чотири центрифужні пробірки вносять по 0,05мл сироватки або плазми. У дві пробірки [N1 (дослід) і N2 (контроль)] додають по 0,2мл субстратної суміші, приготованої на трис-ацетатному буфері з рН 10,6, а в інші дві [N3 (дослід) і N4 (контроль)] пробірки додають по 0,2мл субстратної суміші, приготованої на трис-ацетатному буфері з рН 7,6. Усі чотири пробірки ставлять на водяну баню з температурою 37°C. Через 3хв в дослідні пробірки вносять 0,1мл розчину креатину і продовжують інкубацію протягом 30хв. Ферментативну реакцію зупиняють додаванням в усі пробірки по 1мл розчину амонію молібдату в сірчаній кислоті. Після цього додають в контрольні пробірки 0,1мл креатину. Пробірки залишають при кімнатній температурі на 15хв для гідролізу синтезованого КК креатинфосфату. Додають в чотири пробірки по 1мл розчину аскорбінової кислоти, ще через 15хв - по 2мл розчину гідроксиду натрію. Пробірки струшують до повного зникнення помутніння і через 15хв колориметрують з червоним світлофільтром

(довжина хвилі - 625nm) в односантиметровій кюветі. За різницею показників екстинції в дослідній і контрольній пробірках N1 і N2 і на основі калібрувального графіка стандартних розчинів фосфату вираховують активність A1, а за різницею показників екстинції в дослідній і контрольній пробірках N3 і N4 і на основі калібрувального графіка стандартних розчинів фосфату вираховують активність A2. Активність КК виражають в мікромолях креатинфосфату, синтезованого КК за 1хв в 1л сироватки або плазми, тобто в мікромолях фосфату чи фосфору віл сироватки чи плазми за 1хв. Якщо активність A1 співвідноситься до активності A2 в межах від 1,75:1 до 2,1:1, це свідчить про міокардіальне походження фермента, тобто підвищення активності КК відбувається за рахунок підвищення активності серцевої фракції.

Для клінічних досліджень було обстежено 18 осіб - пацієнтів інфарктного (10 осіб) та II терапевтичного (8 осіб) відділень Клінічної лікарні Львівської залізниці. Цим особам було проведено визначення активності КК при рН 10,6 і при рН 7,6. У 10 осіб активність A1 співвідносилася до активності A2 в межах від 1,75:1 до 2,1:1, і у кожного з них було діагностовано інфаркт міокарда на підставі больового синдрому та ЕКГ-ознак. У 8 осіб активність A1 співвідносилася до активності A2 в межах від 2,86:1 до 4,2:1, і у жодного з них не було діагностовано гостре ураження міокарда (вони були госпіталізовані з приводу гіпертонічної хвороби II ступеня, підвищення активності загальної КК у деяких із них трактуємо як постін'єкційне).

Таким чином, запропонований спосіб визначення активності серцевої фракції креатинфосфокінази у плазмі крові дозволяє здешевити його і розширити діагностичні можливості способу визначення активності загальної креатинкінази в плазмі крові [метод Яворського О.Г., 1987р.]

Визначення активності серцевої фракції креатинфосфокінази у плазмі крові стане доступним навіть у найвіддаленіших від обласних центрів районах і буде підставою для швидкої діагностики інфаркту міокарда і своєчасного надання невідкладної допомоги.

Джерела інформації:

1. <http://www.smed.ru/guides/47725/#article>
2. <http://www.eurolab/pricelist/tests/156/157/405/>
3. Horder, M. et al.: Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 29, p.435, 1991.
4. Е.А. Захария, Ю.И. Децик, И.В. Темник, О.Г. Яворский. Лабораторная диагностика ишемической болезни сердца. - К.: Здоровья, 1969. - 192с.