

УДК 616.153.1.048-07



О.Г. Яворський

## Визначення активності креатинкінази в плазмі або сироватці крові

Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького

**Ключові слова:** креатинкіназа, кольорова реакція, визначення активності.

Відомо, що визначення активності креатинкінази є провідним у лабораторній діагностиці інфаркту міокарда, дерматоміозиту чи поліміозиту, міопатій.

У добре оснащених лабораторіях переважно використовують кінетичний спосіб визначення активності креатинкінази, який ґрунтується на використанні низки поєднаних ферментних реакцій з визначенням відновленого нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (НАДФ). Цей метод є високочутливим, швидким і зручним. Проте він передбачає використання апаратури, що дорого коштує, тому лише в окремих лабораторіях застосовують цей метод.

Існують також способи визначення активності креатинкінази за кольоровою реакцією виявлення кількості неорганічного фосфору, утвореного шляхом гідролізу із синтезованого за допомогою креатинкінази креатинфосфату. Ці способи значно дешевші, передбачають застосування відносно дешевого фотоелектроколориметра, але набагато триваліші й багатостадійні. Основним їх недоліком є використання для зупинки ферментативної реакції токсичної трихлороцтової кислоти, яка нерідко спричиняє алергійні реакції. Крім цього, після осадження білка використовують центрифугування, а потім необхідно відібрати точну кількість надосадової рідини для виявлення неорганічного фосфору.

Ще у 1987 р. нами було запропоновано спосіб визначення активності креатинкінази, який був позбавлений зазначених недоліків. На основні принципи нашого способу було отримано авторське свідоцтво на винахід [1], а потім патент України [2]. У цій публікації наведено детальний опис оптимізованого способу визначення активності креатинкінази, апробованого багаторічним використанням у лабораторіях.

**Реагенти.** 1. Суха субстратна суміш із 8,35 ммоль/л АТФ і 10,6 ммоль/л унітіолу. Розчиняють безпосередньо перед проведенням аналізу в розчині трис-(оксиметил)-амінометану і ацетату

магнію. В сухому вигляді субстратна суміш може зберігатися тривалий час. 2. Трис-магнієвий водний розчин, який містить 150 ммоль/л трис-(оксиметил)-амінометану і 11,3 ммоль/л ацетату магнію (рН=10,6). Термін зберігання в холодильнику – 2 тижні. 3. Водний розчин креатину з концентрацією 86,3 ммоль/л. Розчиняють у день аналізу за температури 80 °С. 4. 0,6 %-ний розчин амонію молібдату в сірчаній кислоті з концентрацією 0,4 моль/л (може зберігатися тривалий час за кімнатної температури). 5. 1 %-ний розчин аскорбінової кислоти в хлористоводневій кислоті з концентрацією 0,1 моль/л. Аскорбінову кислоту розчиняють безпосередньо перед проведенням аналізу (перед внесенням). 6. Водний розчин гідроксиду натрію з концентрацією 1 моль/л.

### Хід приготування реагентів

**Трис-магнійацетатний буферний розчин (рН=10,6).** У 80 мл бідистильованої або ампульної води для ін'єкцій (!!!) розчиняють 1820 мг трис-(оксиметил)-амінометану і 241,8 мг ацетату магнію, що містить 4 молекули води. Об'єм доводять до 100 мл, додаючи бідистильовану воду. У холодильнику буферний розчин зберігається 2 тижні.

**Суша субстратна суміш АТФ (13,8 мг) і унітіолу (4,8 мг).** Зберігається тривалий час. Розчиняють у 3 мл трис-магнійацетатного буферного розчину безпосередньо перед проведенням аналізу (реактив А).

**Креатин (33,9 мг).** Розчиняють у 3 мл гарячої (80 °С) бідистильованої води (або води для ін'єкцій!!!) перед проведенням аналізу. Охолоджують до кімнатної температури (реактив Б).

**Молібдат амонію в сірчаній кислоті.** 3 г амонію молібдату розчиняють у 400 мл дистильованої води, додають 11,67 мл концентрованої (92 % з густиною 1,825) сірчаної кислоти. Об'єм доводять до 500 мл, додаючи дистильовану воду. Зберігається тривалий час.

**Розчин аскорбінової кислоти в хлористоводневій кислоті.** Безпосередньо перед внесенням у пробірки (!!!) розчиняють 100 мг аскорбінової кислоти в

Таблиця

## Хід визначення активності креатинкінази

Реагент	Пробірка 1 (Е1)	Пробірка 2 (Е2)	Пробірка 3 (Е3)	Пробірка 4 (Е4)
Сироватка або плазма крові	50 мкл	50 мкл	-	-
Калібрувальний фосфатний розчин	-	-	50 мкл	-
Бідистильована вода	-	-	-	50 мкл
Реактив А	0,2 мл	0,2 мл	0,2 мл	0,2 мл
Акуратно змішати й витримати 3 хв на водяній бані за температури 37 °С				
Реактив Б	0,1 мл	-	0,1 мл	0,1 мл
	Акуратно змішати	-	Акуратно змішати	Акуратно змішати
Витримати 30 хв на водяній бані за температури 37 °С				
Молібдат амонію в сірчаній кислоті	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл
	Змішати!	Змішати!	Змішати!	Змішати!
Реактив Б	-	0,1 мл	-	-
Гідроліз впродовж 15 хв за кімнатної температури				
Аскорбінова кислота	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл
	Змішати!	Змішати!	Змішати!	Змішати!
Кольорова реакція при кімнатній температурі впродовж 15 хв				
Гідроксид натрію	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл
	Інтенсивно змішати до розчинення осаду	Інтенсивно змішати до розчинення осаду	Інтенсивно змішати до розчинення осаду	Інтенсивно змішати до розчинення осаду
Через 15 хв прозорі розчини колориметрують в односантиметрових кюветках при довжині хвилі 625 нм (червоний світлофільтр)				

**Примітка.** Активність креатинкінази =  $(E1 - E2)/(E3 - E4) \cdot 40$  мкмоль/хв-л.  
У здорових осіб величина цього показника — в межах 5–40 мкмоль/хв-л.

10 мл 0,1 Н хлористоводневої (соляної) кислоти (для приготування 0,1 Н хлористоводневої кислоти взяти 4 мл концентрованої (36%-ної) хлористоводневої кислоти й довести об'єм дистильованою водою до 500 мл).

**Гідроксид натрію.** 1М гідроксиду натрію готують, розчиняючи 20 г гідроксиду натрію в 400 мл дистильованої води, об'єм доводять до 500 мл, додаючи дистильовану воду.

**Калібрувальний фосфатний розчин (1,2 ммоль/л).** Розчиняють 170,4 мг  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  безводного (М.м. 141,96) в 100 мл дистильованої води. Відбирають 1 мл цього розчину і доводять об'єм до 10 мл, додаючи бідистильовану воду. У закритому посуді у холодильнику зберігається тривалий час.

Хід визначення активності креатинкінази наведено у таблиці. У дві центрифужні пробірки вносять по 0,05 мл сироватки або плазми. Додають 0,2 мл реактиву А і ставлять на водяну баню з температурою 37 °С. Через 3 хв у дослідну пробірку вносять 0,1 мл розчину креатину й продовжують інкубацію впродовж 30 хв. Ферментативну реакцію зупиняють додаванням в обидві пробірки по 1 мл розчину амонію молібдату в сірчаній кислоті. Після цього додають у контрольну пробірку 0,1 мл

креатину. Пробірки залишають при кімнатній температурі на 15 хв для гідролізу синтезованого за участю креатинкінази креатинфосфату.

Після цього додають в обидві пробірки по 1 мл розчину аскорбінової кислоти. Через 15 хв — по 2 мл розчину гідроксиду натрію. Пробірки струшують до повного зникнення помутніння і через 15 хв колориметрують при червоному світлофільтрі (довжина хвилі — 625 нм) в односантиметровій кюветі. За різницею показників екстинкції в дослідній і контрольній пробірках та на основі калібрувального графіка стандартних розчинів фосфату або порівняно зі стандартним контрольним розчином фосфату вираховують активність креатинкінази, яку виражають у мікромолях креатинфосфату, синтезованого за 1 хв у 1 л сироватки або плазми, тобто в мікромолях фосфату чи фосфору в 1 л сироватки чи плазми за 1 хв.

**Примітка.** Замість унітіолу без зниження чутливості й відтворюваності способу можна використовувати відновлений глутатіон або дитіотрейтол у такій самій концентрації.

Для доброї відтворюваності способу необхідно чітко дотримуватися наведеного описання. Особливу увагу слід звернути на хімічну чистоту



лабораторного посуду та точність приготування розчинів!

Перевага запропонованого способу визначення активності креатинкінази над іншими колориметричними методами полягає у відсутності етапу центрифугування і перенесення надосадової рідини в пробірки, що значно спрощує і здешевлює аналіз, а також підвищує відтворюваність результатів. Крім того, у нашому способі не використовується токсична трихлороцтова кислота. Оптимізація рН реакції, а також застосування як донора сульфгідрильних груп унітіолу (дитіотрейтолу, глутатіону) значно (у 8–10 разів) підвищили чутливість аналізу.

#### *Застереження.*

1. Враховуючи малі об'єми розчинів, не допускати розбризкування їх на стінках пробірки! Використовувати точні дозатори!

3. Витримувати всі рекомендовані часові інтервали!

#### *Можливі причини помилок.*

1. Мутний розчин на заключному етапі свідчить про низьку концентрацію гідрату окису натрію.

2. Поява насиченого синього кольору свідчить про використання нижчої, ніж потрібно, концентрації сірчаної кислоти.

## Література

1. Яворский О.Г., Байса В.Д. Способ определения активности креатинфосфокиназы в крови. Авторське свідоцтво № 1462204 від 1.11.88 р. (Заявка № 4239432 від 31.03.87 р.).
2. Яворський О.Г., Байса В.Д. Спосіб визначення активності креатинкінази. — Патент України на винахід № 2226 від 14.01.94 р.

*О.Г. Яворский*

### Определение активности креатинкиназы в плазме или сыворотке крови

Описан способ определения активности креатинкиназы, основанный на выявлении количества неорганического фосфора, образовавшегося в процессе кислотного гидролиза креатинфосфата, синтезированного при участии креатинкиназы. В предлагаемом способе не используется токсическая трихлоруксусная кислота, не применяется центрифугирование для получения надосадочной жидкости, что удешевляет анализ. Применение в качестве донора сульфгидрильных групп унитиола, глутатиона или дитиотрейтола значительно повышает чувствительность способа.

*O.G. Yavorskiy*

### Determination of creatine kinase activity in blood plasma or serum

The article describes the method of determination of creatine kinase activity based on the measurement of the levels of non-organic phosphorus produced in the acidolysis process of creatine phosphate synthesized with participation of creatin kinase. The proposed approach allows avoiding the use of toxic 3-chloroacetic acid and centrifugation for supernatant obtaining that makes the analysis cheaper. The use of unithiol, glutathione or dithiothreitol as sulfhydryl groups' donors resulted in considerable increases of the method sensitivity.

