



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГИИТ СССР

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

## К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1  
(21) 4436831/14  
(22) 06.06.88  
(46) 23.01.91. Бюл. № 3  
(71) Институт биохимии АН БССР и  
Гродненский государственный медицин-  
ский институт  
(72) В.С. Васильев, Г.К. Новицкий,  
И.П. Черныкевич, Ф.С. Ларин  
и В.М. Цыркунов  
(53) Лабораторное дело, 1988,  
№ 1, с. 16-19.

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ  
КАТАЛАЗЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

(57) Изобретение относится к биохимии  
и медицине и позволяет определять ак-  
тивность каталазы плазмы крови в нор-

2  
ме и при гипербилирубинемии. Цель  
изобретения - сокращение времени оп-  
ределения при одновременном создании  
возможности определения активности ка-  
талазы в плазме при гипербилирубинемии.  
Готовят стандартную и исследуе-  
мую пробы. В стандартную пробу к плаз-  
ме крови добавляют в конечной концент-  
рации 0,009-0,09%-ный раствор азида  
натрия и перекись водорода, а в ис-  
следуемую пробу - перекись водорода.  
После инкубации в течение 55-60 с в  
исследуемую пробу плазмы крови вносят  
азид натрия, а затем в обе пробы -  
молибдат аммония. Спектрофотометричес-  
ки определяют разность экстинкций и  
рассчитывают активность каталазы плаз-  
мы крови.

Изобретение относится к биохимии  
и медицине и может быть использовано  
в эксперименте и клинике для опреде-  
ления активности каталазы плазмы кро-  
ви.

Цель изобретения - сокращение вре-  
мени и создание возможности определе-  
ния активности каталазы в плазме при  
гипербилирубинемии.

Способ осуществляется следующим  
образом.

Венозную кровь (3 мл) центрифугируют  
10 мин при 3000 об/мин, при этом в  
качестве антикоагулянта используют  
гепарин из расчета 50 ЕД/мл крови.  
Для приготовления стандартного образ-  
ца к 0,1 мл плазмы крови добавляют  
0,1 мл раствора азиды натрия 0,2-2%-  
ной концентрации и 2 мл 0,03%-ного

раствора перекиси водорода ( $H_2O_2$ ). В  
исследуемой пробе к 0,1 мл плазмы  
крови добавляют 2,0 мл 0,03%-ного  
раствора  $H_2O_2$ . Обе пробы ставят на  
инкубацию при 25°C на 55-60 с. После  
минутного инкубирования в исследуемую  
пробу добавляют 0,1 мл раствора азиды  
натрия 0,2-2%-ной концентрации с  
целью ингибирования реакции разложе-  
ния  $H_2O_2$  каталазой плазмы крови (ко-  
нечная концентрация азиды 0,009-0,09%).  
В стандартную и исследуемую пробы  
вносят 1,0 мл 4%-ного раствора молиб-  
дата аммония, который с непрореагиро-  
вавшей  $H_2O_2$  образует окрашенный ком-  
плекс. Интенсивность цветной реакции  
измеряют спектрофотометрически на при-  
боре "Specol 21" (ВНР) при длине вол-  
ны 410 нм. Определяют разницу экстинк-



ции между стандартной и опытной пробами и производят расчет активности каталазы плазмы крови по формуле

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot K}{\epsilon \cdot t}$$

где A - активность каталазы, мкмоль · с<sup>-1</sup> · л<sup>-1</sup>;

$\Delta E$  - разность экстинкций контрольной и опытной проб;

V - объем пробы, мл (3,2);

K - коэффициент пересчета на 1 л плазмы крови (10000);

$\epsilon$  - коэффициент молярной экстинкции перекиси водорода, мкмоль (22,2);

t - время инкубации проб, с (60).

Для определения оптимальной ингибирующей концентрации азидата натрия (в 0,1 мл раствора) проведено исследование, результаты которого показывают, что 0,2%-ный раствор азидата натрия обладает максимальной ингибирующей способностью и превышение указанного верхнего предела концентрации азидата натрия не приводит к большому угнетению активности фермента, а влечет повышенный расход данного реактива. Использование концентраций азидата натрия меньше 0,2% приводит к снижению ингибирования каталазы. Следовательно, 0,2-2%-ный раствор азидата натрия является оптимальной концентрацией данного вещества в целях достаточного угнетения каталазы плазмы крови (конечная концентрация азидата 0,009-0,09%).

Проведенное изучение выраженности ингибирующего эффекта азидата натрия показывает, что полная каталазная активность плазмы крови (без добавления азидата натрия) равна  $0,50 \pm 0,06$  мкмоль · с<sup>-1</sup> · л<sup>-1</sup>, а остаточная (после добавления 0,2-2%-ного раствора азидата натрия)  $0,016 \pm 0,003$  мкмоль · с<sup>-1</sup> · л<sup>-1</sup>, что составляет 3,34% от полной. Следовательно, выраженность ингибирующего эффекта азидата натрия на каталазу плазмы крови достигает 96,66%.

Для выбора оптимального времени инкубации изучена кинетика активности каталазы. Линейная зависимость активности фермента от времени инкубации сохраняется в течение 55-60 с. При дальнейшем увеличении времени инкубации скорость разложения перекиси водорода каталазой плазмы крови пос-

тепенно снижается. Сокращение времени инкубации менее 55 с ведет к уменьшению разницы экстинкций контрольной и опытной проб, а при увеличении времени инкубации более 60 с зависимость активности каталазы от времени инкубации теряет линейный характер.

**Пример 1.** 3 мл венозной крови практически здорового человека (общий билирубин 14,7 мкмоль/л), взятой с использованием гепарина из расчета 50 ЕД/мл, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученную плазму крови отсасывают в чистую пробирку. Для приготовления стандартного образца к 0,1 мл плазмы добавляют 0,1 мл 0,2%-ного раствора азидата натрия (конечная концентрация 0,009%) и 2 мл 0,03%-ной перекиси водорода. В исследуемой пробе к 0,1 мл плазмы крови - 2,0 мл 0,03%-ного раствора перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Обе пробы ставят на инкубацию при 25°C на 60 с. После выдерживания 1 мин при этой температуре в исследуемую пробу добавляют 0,1 мл 0,2%-ного раствора азидата натрия. Затем как в стандартную, так и в исследуемую пробы вносят по 1,0 мл 4%-ного раствора молибдата аммония. После 2-минутного центрифугирования при 3000 об./мин измеряют экстинкцию стандартной и опытной проб на спектрофотометре "Spesol 21" (ВНР) при длине волны 410 нм. Разница экстинкций ( $\Delta E$ ) между контрольной и опытной пробами в конкретном случае равна 0,042. Используя указанную формулу, определяют активность каталазы плазмы крови:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot K}{\epsilon \cdot t} = 1,009 \text{ мкмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$$

**Пример 2.** Взятие крови и получение плазмы крови здорового человека проводят идентично примеру 1. Для приготовления стандартной пробы к 0,1 мл плазмы крови добавляют 0,1 мл 1%-ного раствора азидата натрия (конечная концентрация 0,045%) и 2,0 мл 0,03%-ного раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Исследуемую пробу готовят как в примере 1. Обе пробы ставят на инкубацию при 25°C на 58 с. После инкубации в исследуемую пробу добавляют 0,1 мл 1%-ного раствора азидата натрия. Затем в стандартную и опытную пробы вносят по 1,0 мл 4%-ного раствора молибдата аммония. Последующие операции прово-



дят как в примере 1. Разница экстинкций между стандартной и исследуемой пробами в данном случае 0,040. Активность каталазы плазмы крови

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot K}{\epsilon \cdot t} = 0,994 \text{ мкмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$$

**Пример 3.** У здорового человека проводят забор венозной крови и выделяют плазму как в примере 1. Для приготовления стандартной пробы к 0,1 мл плазмы крови добавляют 0,1 мл 2%-ного раствора азиды натрия (конечная концентрация 0,09%) и 2,0 мл 0,03%-ного раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Исследуемую пробу готовят как в примере 1. Обе пробы ставят на инкубацию при  $25^\circ\text{C}$  на 55 с. После инкубации в исследуемую пробу добавляют 0,1 мл 2%-ного раствора азиды натрия. В стандартную и опытную пробы вносят по 1,0 мл 4%-ного раствора молибдата аммония. Последующие операции проводят как в примере 1. Разница экстинкций между стандартной и исследуемой пробами в данном случае 0,038. Активность каталазы плазмы крови

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot K}{\epsilon \cdot t} = 0,996 \text{ мкмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$$

**Пример 4.** У больного среднетяжелой формой вирусного гепатита В (общий билирубин плазмы крови 129,4 мкмоль/л) проводят забор крови и выделение плазмы способом, описанным в примере 1. Для приготовления стандартной пробы к 0,1 мл плазмы крови добавляют 0,1 мл 0,2%-ного раствора азиды натрия и 2,0 мл 0,03%-ного раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Исследуемую пробу готовят как в примере 1. Обе пробы ставят на инкубацию при  $25^\circ\text{C}$  на 60 с. После инкубации в исследуемую пробу добавляют 0,1 мл 0,2%-ного раствора азиды натрия. В стандартную и опытную пробы вносят по 1,0 мл 4%-ного раствора молибдата аммония. Последующие операции проводят как в примере 1. Разница экстинкций между стандартной и опытной пробами в данном случае 0,08. Активность каталазы плазмы крови

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot K}{\epsilon \cdot t} = 1,92 \text{ мкмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$$

**Пример 5.** У больного среднетяжелой формой вирусного гепатита В (общий билирубин плазмы крови

129,4 мкмоль/л) проводят забор крови и выделяют плазму как в примере 1. Для приготовления стандартной пробы к 0,1 мл плазмы крови добавляют 0,1 мл 1%-ного раствора азиды натрия и 2,0 мл 0,03%-ного раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Исследуемую пробу готовят как в примере 1. Обе пробы ставят на инкубацию при  $25^\circ\text{C}$  на 58 с. После инкубации в исследуемую пробу добавляют 0,1 мл 1%-ного раствора азиды натрия. В стандартную и опытную пробы вносят по 1,0 мл 4%-ного раствора молибдата аммония. Последующие операции проводят как в примере 1. Разница экстинкций между стандартной и опытной пробами в данном случае 0,077. Активность каталазы плазмы крови

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot K}{\epsilon \cdot t} = 1,91 \text{ мкмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$$

**Пример 6.** У этого же больного проводят взятие крови и получение плазмы крови как в примере 1. Для приготовления стандартной пробы к 0,1 мл плазмы крови добавляют 0,1 мл 2%-ного раствора азиды натрия и 2,0 мл 0,03%-ного раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Исследуемую пробу готовят как в примере 1. Обе пробы ставят на инкубацию при  $25^\circ\text{C}$  на 55 с. После инкубации в исследуемую пробу добавляют 0,1 мл 2%-ного раствора азиды натрия. Затем в обе пробы вносят по 1,0 мл 4%-ного раствора молибдата аммония. Последующие операции осуществляют как в примере 1. Разница экстинкций между стандартной и исследуемой пробами в данном случае 0,073, что позволяет определить активность каталазы плазмы крови:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot K}{\epsilon \cdot t} = 1,91 \text{ мкмоль} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$$

Используя известный и предлагаемый способы изучена активность каталазы крови больных вирусным гепатитом В (ВГВ) различной степени тяжести и практически здоровых доноров в сопоставлении с уровнем билирубинемии. Исследования, аналогичные предлагаемому способу, проведены с использованием и других известных ингибиторов каталазы.

Результаты определения активности данного фермента с применением в качестве ингибиторов азиды натрия и цианида калия приведены в таблице.



Полученные данные свидетельствуют о практической идентичности активности каталазы в одинаковых группах обследованных лиц при использовании различных ингибиторов предлагаемого способа (учитывая очень высокую токсичность цианида калия, в лабораторной практике следует отдать предпочтение азиду натрия).

Используя предлагаемый способ в плазме крови больных ВГВ средней и тяжелой формами активность каталазы была значительно повышена, однако при известном способе такого повышения обнаружено не было, что указывает на неадекватность известного технического решения.

Существенно, что у отдельных больных с высокой билирубинемией определить активность каталазы плазмы крови известным способом оказалось невозможным, что подтверждается следующим наблюдением.

**Пример 7.** Больная Ч., 48 лет, находилась на лечении в Гродненской областной инфекционной больнице в 1988 году. Биохимическое исследование крови показало, что уровень общего билирубина равен 260 мкмоль/л ч (норма - до 20,5), активность аланинаминотрансферазы 4,5 мкмоль/л ч (норма - до 0,7), обнаружен поверхностный антиген вируса гепатита В. Поставлен диагноз: вирусный гепатит В, тяжелая форма. При использовании известного способа определение активности каталазы провести не удалось, поскольку экстинкция (0,475) холостой пробы (с максимальной концентрацией окрашенного

5 комплекса перекиси водорода с молибдатом аммония) оказалась меньше экстинкции опытной пробы (0,684), содержащей плазму крови больной Ч. Однако предлагаемым способом активность каталазы была успешно определена (2,16 мкмоль · с<sup>-1</sup> · л<sup>-1</sup>).

10 Таким образом, предлагаемый способ обеспечивает по сравнению с известным сокращение срока инкубации в 10 раз, тем самым в 3 раза уменьшая длительность определения, более высокую специфичность и адекватность исследования за счет создания возможности определения активности каталазы в плазме крови при гипербилирубинемии.

#### Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

20 Способ определения активности каталазы в плазме крови путем инкубации контрольной пробы, содержащей перекись водорода, и опытной пробы, содержащей плазму и перекись водорода, с последующим добавлением к обеим пробам молибдата аммония и регистрацией оптической плотности, отличающийся тем, что, с целью сокращения времени при одновременном создании возможности определения при гипербилирубинемии, в контрольную и опытную пробы дополнительно вводят азид натрия в конечной концентрации 0,009-0,09%, причем в контрольную пробу азид натрия вводят перед началом инкубации, в опытную пробу - после окончания инкубации перед введением молибдата аммония, а инкубацию проводят в течение 55-60 с.

Показатель	Контроль (n=14)	Больные ВГВ легкая форма (n = 18)	Средняя форма (n=19)	Тяжелая форма (n = 8)
Общий билирубин, мкмоль/л	16,5±3,1	41,2±9,65*	114,6±17,3*	192,4±21,7*
Активность каталазы, мкмоль · с <sup>-1</sup> · л <sup>-1</sup>	0,56±0,06	0,84±0,07*	0,35±0,06*	0,03±0,004*
Предлагаемый способ с использованием азид натрия	1,01±0,07	1,44±0,09*	1,91±0,13*	2,42±0,18*
Предлагаемый способ с использованием цианида калия	0,98±0,07	1,39±0,08*	1,92±0,15*	2,51±0,20*

\* Достоверные различия показателей по отношению к контролю (p < 0,05).