

В.П. Пішак, С.Г. Ярмольчук

ВІДСТРОЧЕНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВИНИ В ЦІЛЬНІЙ  
КРОВІ ТА ЇЇ КОМПОНЕНТАХКафедра медичної біології, генетики та гістології (зав. – проф. В.П. Пішак)  
Буковинської державної медичної академії

**Резюме.** Встановлено, що фенол (карболова кислота) є антимікробним біохімічним стабілізатором цільної крові й компонентів сироватки та еритроцитів і в концентрації 50 ммоль/л стабілізує їх та забезпечує незмінність вмісту сечовини в них протягом 50 діб зберігання при кімнатній температурі. Розроблено спосіб зберігання цього аналіту в цільній крові та її компонентах за допомогою карболової кислоти.

**Ключові слова:** сечовина, стабілізація, фенол, відстрочене визначення, кров, компоненти крові.

**Вступ.** Практично всі біохімічні дослідження потребують свого завершення в день забору біологічних проб у людини та піддослідних тварин [4]. Клінічні аналізи необхідно завершити протягом 4 годин з моменту забору біологічного матеріалу в пацієнтів, що обстежуються [3]. Однак у клінічній практиці і науково-дослідній роботі не завжди є можливість дотримуватися цих вимог [9,13]. Створення централізованих медичних лабораторій потребує різних термінів відстрочення виконання біохімічних аналізів на час транспортування біологічних проб у централізовану лабораторію [8]. Детальний контроль за обміном речовин необхідний в учасників полярних, пустельних, високогірних, підводних експедицій, які не може супроводжувати біохімічна лабораторія. Надзвичайно актуальним є контроль процесів метаболізму в організмі космонавтів і льотчиків під час повітряних і космічних польотів, особливо, довготривалих [10, 13]. Однак біохімічний аналіз біологічних проб, взятих в їх учасників, може бути завершений лише після доставки біоматеріалу на Землю [2]. Кількаденного відстрочення виконання біохімічних досліджень потребує навчальний процес на кафедрах біологічного профілю. У роботі науково-дослідних інститутів і кадрових ВНЗів біологічний матеріал надходить на дослідження практично щодня, однак навчальний процес, лікувально-консультативна робота, суспільно-громадські заходи часто заважають терміново виконати науково-біохімічні дослідження. Крім того, у науково-дослідній роботі доцільно проводити наукові дослідження серійно, що потребує відстрочення аналізів на час накопичення біологічного матеріалу для серійних досліджень. У всіх перерахованих випадках бажано стабілізувати біологічний матеріал, зберегти його необхідний час, доставити в лабораторію для завершення біохімічних досліджень.

**Мета дослідження.** Знайти загальнодоступний біохімічний стабілізатор біологічних проб і з його допомогою розробити відстрочений спосіб кількісного визначення сечовини в цільній крові, її компонентах й інших біологічних об'єктах.

**Матеріал і методи.** Первинний скринінг антимікробного біохімічного стабілізатора провели серед медичних антисептиків [7] за їх здатністю запобігання росту гриба *Aspergillus niger* на 0,1 М розчині  $\alpha$ -D, L-аланіну [9]. У роботі використали цільну кров, сироватку та еритроцити донорів, які були обстежені на предмет відсутності в їх крові збудників сифілісу, СНІДу та гепатитів. Вміст сечовини визначали уніфікованим діацетилмонооксимовим способом [6].

У результаті проведеного скринінгу встановлено, що з числа вивчених сполук фенол (карболова кислота) [7,12] 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.

**Реактиви та обладнання.** 1. Вода, насичена фенолом. До 50 г карболової кислоти приливали 0,5 л дистильованої води, закривали корком, інтенсивно збовтували 15 хв і відстоювали 3 доби при кімнатній температурі. При цьому в суміші утворювалася верхня фаза – вода, насичена фенолом. Концентрація карболової кислоти в ній при 20°C дорівнювала 863 ммоль/л [1]. 2. 0,35 М розчин трихлор-оцтової кислоти. 3. Діацетилмонооксимовий реактив фірми АО "Реагент" (Дніпропетровськ, Україна). 4. Стандартний розчин сечовини з концентрацією 8,32 ммоль/л, приготовлений на 50 мМ розчині фенолу, який запобігає розкладання визначуваного аналіту мікроорганізмами. 5. Магнітна мішалка, центрифуга, водяна баня, фотоспектроколориметр, піпетки, пробірки.

З метою стабілізації 10 мл цільної крові, сироватки або еритроцитів інтенсивно перемішували на магнітній мішалці і дуже повільно з піпетки, носик якої був занурений у біологічну пробу, приливали 0,58 мл води, насиченої фенолом, герметично закривали корком і зберігали при кімнатній температурі. Вміст сечовини визначали до стабілізації, та на 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40-ву і 50-ту доби зберігання стабілізованих проб при кімнатній температурі. З цією метою в центрифужну пробірку приливали 1,5 мл розчину трихлороцтової кислоти, 0,2 мл досліджуваної біологічної проби, перемішували, центрифугували 5 хв із швидкістю 3 000 обертів / хв, переносили 1 мл центрифугату в хімічну пробірку, приливали 4 мл діацетилмонооксидного реактиву, перемішували, поміщали на 10 хв у киплячу водяну баню, охолоджували водою й колориметрували на фотоелектроколориметрі при довжині світлової хвилі 540 нм у кюветах із довжиною оптичного шляху 10 мм проти контрольної проби. Контрольні й стандартні зразки готували як і дослідні, замінивши 0,2 мл біологічної проби таким же об'ємом дистильованої води або стандартного розчину сечовини. Вміст досліджуваного аналіту визначали за правилом пропорції, користуючись формулою:  $\text{Сдос.} = \text{Ст.} \cdot (\text{Адос.} / \text{Аст.}) \cdot 1,058$ , в якій Сдос. і Ст. – концентрації сечовини в дослідній і стандартній пробах, Адос. і Аст. – абсорбція (екстинкції) цих же проб, 1,058 – коефіцієнт розведення досліджуваної біологічної проби водою, насиченою фенолом.

Результати досліджень оброблені статистично за допомогою непарного двостороннього критерію Стьюдента для рівних дисперсій [11]. З метою вирахування ступеня вірогідності (P) використали комп'ютерну програму Student Dv4 (I. Davidenko, 2002).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Проведені експерименти показали, що вміст сечовини в нестабілізованих зразках цільної крові, що зберігалися при кімнатній температурі, прогресивно зменшувався, починаючи з 3-го дня спостереження. Через 7 діб зміни були статистично вірогідними ( $P < 0,02$ ), а на 30-й день досліджуваній показник становив 12% від вихідних величин.

Фенол у концентрації 50 ммоль/л стабілізував цільну кров, її сироватку та еритроцити й зберігав стабільним (незмінним) вміст досліджуваного аналіту в них протягом 50 діб при кімнатній температурі (табл. 1).

Таблиця 1

**Вміст сечовини (в мілімолях на 1 л) в цільній крові та її компонентах, стабілізованих фенолом у концентрації 50 ммоль/л, у динаміці зберігання їх при кімнатній температурі**

Статистичні показники	До стабілізації	Дні після стабілізації							
		2	5	10	15	20	30	40	50
Цільна кров									
M	4,50	4,47	4,44	4,56	4,54	4,42	4,50	4,54	4,60
±m	0,25	0,22	0,26	0,25	0,23	0,25	0,26	0,24	0,23
t	-	0,07	0,15	0,19	0,13	0,21	0,00	0,12	0,31
P	-	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
%*	100	99	99	101	101	98	100	101	102
Сироватка крові									
M	5,13	5,20	5,06	5,24	5,09	5,04	5,16	5,27	5,16
±m	0,26	0,31	0,29	0,31	0,25	0,31	0,25	0,29	0,25
t	-	0,18	0,19	0,27	0,12	0,22	0,07	0,34	0,19
P	-	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
%	100	101	99	102	99	98	101	103	101
Еритроцити									
M	3,04	3,03	3,04	3,07	3,04	3,02	3,06	3,00	3,13
±m	0,15	0,14	0,17	0,15	0,15	0,16	0,16	0,17	0,15
t	-	0,04	0,03	0,18	0,38	0,65	0,13	0,15	0,47
P	-	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
%	100	100	100	101	100	99	101	99	103

Примітка. %\* – Відсотки вираховані з величин "M".

Таблиця 2

**Середня відносна похибка відстроченого способу кількісного визначення сечовини в цільній крові, стабілізованій фенолом у концентрації 50 ммоль/л\***

№ проби	Екстинкції	Вміст сечовини в мілімолях на 1 л	Відхилення від середнього арифметичного	Середня відносна похибка
1	0,198**	4,91	0,36	
2	0,220	5,46	0,19	
3	0,212	5,26	0,01	
4	0,213	5,28	0,01	± 3,6%
5	0,205	5,08	0,19	
6	0,228	5,65	0,38	
Середнє арифметичне		5,27	0,19	

**Примітка.** \* – Проби зберігалися 50 діб при кімнатній температурі. \*\* – Екстинкції стандартних проб з концентрацією сечовини 8,32 ммоль/л дорівнювали 0,335, 0,335, 0,330, 0,341, 0,339, 0,333. Середня арифметична величина дорівнювала 0,3355.

Середня відносна похибка розробленого відстроченого способу кількісного визначення сечовини в біологічних об'єктах у наших дослідках дорівнювала  $\pm 3,6\%$  (табл. 2).

Механізм стабілізуючої дії фенолу на біологічні об'єкти ймовірно пов'язаний з його антимікробною активністю [7], завдяки якій відбувається мікробна деконтамінація і запобігається розкладання біологічних проб і аналітів, що містяться в них, мікроорганізмами-контамінантами [5]. Механізм антимікробної дії карболової кислоти зумовлений її здатністю вступати в хімічні взаємодії з ліпідами мембран і цитоплазми мікроорганізмів [12], що порушує функції клітинних органел, знижує життєздатність мікроорганізмів і, в кінцевому наслідку, викликає деконтамінацію біологічних проб, запобігає розкладання їх мікроорганізмами й стабілізує вміст біохімічних аналітів [14].

**Висновки.** 1. Фенол у концентрації 50 ммоль/л стабілізує вміст сечовини в цільній крові та її компонентах протягом 50 діб.

2. Розроблено відстрочений спосіб кількісного визначення сечовини в цільній крові, сироватці та еритроцитах.

**Перспективи подальших досліджень.** Розроблена методика відстроченого визначення сечовини в цільній крові та її компонентах може використовуватися в перерахованих вище випадках, коли неможливо виконати аналіз у день забору біологічних проб. Крім того, виявлена нами здатність фенолу стабілізувати сечовину крові, сироватки та еритроцитів буде застосована з метою розроблення методики виготовлення референтних матеріалів для контролю якості визначення досліджуваного аналіту в перерахованих біологічних об'єктах.

**Література.** 1. Гороновский И.Т., Назаренко Ю.П., Некряч Е.Ф. Краткий справочник по химии.– К.: Наук. думка, 1987.– С.688. 2. Влияние длительного космического полета на биохимический статус организма человека / А.И. Григорьев, В.Б. Носков, И.А. Попова и др. // Клин. лаб. диагност.– 1994.– №1.– С.19–20. 3. Кишкун А.А., Ченцова М.И. Технология лабораторных исследований при неострых состояниях (сообщение 2) // Клин. лаб. диагност.– 2002.– №1.– С.35–39. 4. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике.– Элиста: АПП «Джангар», 1999.– 250 с. 5. Красильников А.П. Справочник по антисептике.– Минск: Выш. школа, 1995.– 367 с. 6. Лифшиц В.М., Сидельникова В.И. Биохимические анализы в клинике: Справочник.– М.: МИА, 1998.– 303 с. 7. 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. 8. Мошкин А.В. Особенности организации преаналитического этапа в централизованной лаборатории // Клин. лаб. диагност.– 2001.– №9.– С.22. 9. Пишак В.П., Ярмольчук Г.М. Первинний скринінг антифунгальних біохімічних стабілізаторів // Мікробіол. ж.– 1997.– Т. 59, №5.– С.41–46. 10. Пишак В.П., Ярмольчук С.Г. Способ консервации мочи для последующего определения креатинина // Авиакосмическая и экологическая медицина.– 1999.– №4.– С.69–70. 11. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях.– М.: ГЭОТАР Медицина, 2000.– 256 с. 12. Трипус Ф.П. Фармакотерапевтический справочник.– 7-е изд., испр.– К.: Здоров'я, 1993.– 592 с. 13. Ярмольчук С.Г. Методика збирання добової сечі та відстроченого визначення глюкози в ній // Ендокринологія.– 1999.– Т. 4, №1.– С.67–70. 14. Kieime T.O., Albrecht J., Zofel 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.

## DELAYED DETERMINATION OF UREA IN THE WHOLE BLOOD AND ITS COMPONENTS

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

**Abstract.** It has been established that phenol (carbolic acid) is an antimicrobial biochemical stabilizer of the whole blood and the components of its serum and erythrocytes. It stabilizes them in a concentration of 50 mmol/l ensuring stability (invariability) of their urea content during 50 days of storing at room temperature. A delayed method of a quantitative assessment of this analysis in the whole blood and its components has been developed by means of carbolic acid.

**Key words:** urea, stabilization, phenol, delayed determination blood, blood components.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)

Buk. Med. Herald.– 2003.– Vol.7, №3.– P.128–131.

*Надійшла до редакції 13.05.2003 року*

---