

Мы оценили эффективность этих серологических тестов при исследовании сывороток крови от здоровых лиц и пациентов с подтвержденным позитивным результатом выявления анти-HCV. Полученные данные демонстрируют, что эффективность скрининга и прогнозируемая значимость позитивного теста ИФА широко варьировали в зависимости от распространенности инфекции. Соотношение S/CO не может служить критерием позитивности результатов скрининга.

THE EFFECTIVENESS OF HCV INFECTION SEROLOGICAL MARKERS' DETECTION IN HEALTHY PERSONS AND PATIENTS WITH DIFFERENT PATHOLOGICAL CONDITIONS

T.A. Sergeeva, O.K. Benkovskaya, V.R. Shaginian, M.Yu. Dzogan

The most practical screening test for hepatitis C virus antibodies is third generation enzyme linked immunoassay. We have evaluated the effectiveness of these serological tests in blood serums researches from healthy individuals and patients with confirmed positive results for anti-HCV detection. Our data demonstrated that the effectiveness of screening as well as positive predictive value of EIA, widely varied depending on the infection prevalence. The S/CO ratio cannot be a criterion of screening results positivity.

УДК 612.616:544.726:591.46

Г.В. Максим'юк, Л.Є. Лаповець

МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ВІЛЬНИХ І ЗВ'ЯЗАНИХ Ca^{2+} , K^+ , Na^+ У ФРАКЦІЯХ ВОДНИХ ЕКСТРАКТІВ ПРОБ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів

Безперечно, що функціональна діяльність клітин, тканин і органів живих істот значною мірою пов'язана із особливостями гомеостазу іонів макро- і мікроелементів в неорганічних і органічних сполуках [8]. Однак, відомі сучасні способи [9–11] оцінки їх позитивного або негативного впливу на інтенсивність перебігу фізико-хімічних процесів, що регулюють рівень життєздатності ізольованих та неізольованих клітин організму, базуються переважно на визначенні сумарних показників концентрації іонів [1–5, 7].

Наведена ситуація стала підставою до пошуку нового методичного рішення, яке б дозволило розробити об'єктивну, економічно вигідну, доступну і зручну методику визначення концентрації вільних іонів, що беруть безпосередню участь

в регуляції фізико-хімічних процесів, а також іонів, функціональний стан яких пов'язаний із легко-, важко- та нерозчинними у воді неорганічними і органічними комплексними сполуками. Вірогідно, що наявність зв'язку іонів з комплексними сполуками зумовлена генетично, а рівень їх концентрації у системі “клітина—середовище” відповідає за створення умов, які регулюють інтенсивність перебігу фізико-хімічних процесів [6, 12].

Для досягнення вказаного результату застосували послідовність операцій відокремлення іонів водних екстрактів від екстрагованих проб, що дозволяє визначити в екстрактах фракції: № 1 — концентрацію вільних іонів; № 2 — зв'язаних з легкорозчинними у воді комплексними сполуками макро- і мікроелементів; № 3 — зв'язаних з важкорозчинними комплексами; № 4 — зв'язаних з нерозчинними комплексами.

Сподіваємось, що запропоновану методику визначення концентрації вільних і зв'язаних іонів лужно-земельного та лужних металів (Ca^{2+} , K^+ , Na^+) у водних екстрактах проб біологічного матеріалу з різною метою використовують аспіранти, наукові співробітники і практичні спеціалісти різних галузей народного господарства. Отримані результати експериментальних досліджень допоможуть обґрунтувати компенсаторні механізми формування гомеостазу (рівноваги вмісту) іонів в системі “клітина-середовище” та розробити нові способи об'єктивної діагностики, прогнозування, оцінки, корекції функціонального стану (норма, патологія) клітин, тканин і органів людини, тварин, рослин.

Метою даної роботи є отримання нових знань про механізми формування гомеостазу Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у системі “клітина—середовище”, розширення можливостей об'єктивної діагностики, прогнозування, оцінки, корекції функціонального стану (норма, патологія) клітин, тканин, органів людини, тварин, рослин за визначеними параметрами концентрації іонів розчинних і нерозчинних у воді комплексних сполук неорганічних та органічних речовин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом проведених досліджень є концентрація вільних і зв'язаних іонів лужно-земельного та лужних металів у водних екстрактах паренхіми (генеративно-секреторної тканини) яечка бугая.

Для визначення застосовують:

а) **вимірвальну техніку і допоміжне обладнання** — сушильна шафа, витяжна шафа, муфельна піч, аналітичні демпферні терези (АДТ), електричний млинок або гомогенізатор, лабораторна центрифуга, центрифужні кварцові пробірки, штатив для пробірок, агатова (фарфорова) ступка, скляні бюкси з притертою кришкою, ексикатор, скальпель, скляні палички;

б) **реактиви та матеріали** — бідистильована вода, соляна кислота, азотна кислота, етиловий спирт, вата, марля, фільтрувальний папір.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Підготовка проб до аналізу та визначення концентрації іонів. Середню пробу дослідного органу відбирають відразу після забою тварини. Її первинна маса повинна бути не меншою ніж 5,0 г. Відібрану для досліджень пробу розрізають скальпелем на дрібні частини, які поміщають у скляний бюкс з притертою кришкою. Бюкс із пробую зважують з точністю до 0,01 г, переносять у сушильну шафу і знімають кришку.

Пробу висушують за температури 105°C до постійних значень її маси. Контроль за зміною величини маси здійснюють впродовж 7–8 діб через 24 годинний інтервал часу. Для цього закритий кришкою бюкс із пробую переносять з сушильної шафи в ексикатор, охолоджують і АДТ зважують з точністю до 0,0001 г.

Висушену до постійної маси пробу розмелюють електричним млинком і ретельно розтирають в агатовій ступці або гомогенізують до дрібнодисперсного порошку. Від гомогенізованої маси у центрифужну кварцову пробірку відбирають 0,5 г дрібнодисперсного порошку. За умов кімнатної температури (15–18°C) до порошку доливають 4,5 см³ бідистильованої води. Залиті водою проби ретельно розмішують і одразу центрифугують за 800 g протягом 5 хвилин. У відокремленій від екстрагованої маси порошку рідині (**фракція № 1**) за методикою [4] визначають концентрацію вільних іонів кальцію, калію, натрію.

Екстраговану масу проби другий раз заливають бідистильованою водою на 24 години. За наведених умов дослідну пробу розділяють на дві фази. Відокремлену рідину (**фракція № 2**) використовують для визначення концентрації іонів, які зв'язані з легкорозчинними у воді неорганічними та органічними речовинами, а відокремлену екстраговану масу третій раз заливають бідистильованою водою на 48 годин. Через

вказаний інтервал часу пробу знову розділяють на дві фази і, у відокремленій від екстрагованої маси рідині (**фракція № 3**), визначають концентрацію іонів, які зв'язані з важкорозчинними у воді сполуками хімічних речовин.

До залишків екстрагованої проби доливають 2,0 см³ “царської водки”. Реагенти ретельно змішують і витримують їх у витяжній шафі впродовж 24 годин за умов кімнатної температури. Непрореагований з компонентами проб об'єм “царської водки” дуже обережно випаровують на відкритому вогні газового пальника (пісочній бані) у витяжній шафі.

Позбавлену кислоти масу проби, що залишилась у центрифужній кварцовій пробірці, озонують у муфельній печі за температури 450°C. До отриманої золи в пробірку доливають 4,5 см³ бідистильованої води і визначають концентрацію іонів, які зв'язані з нерозчинними у воді неорганічними та органічними сполуками (**фракція № 4**).

Переведення показників абсолютної концентрації іонів у відносні здійснюють таким чином: отримані для фракцій водних екстрактів № 1, 2, 3 і 4 величини додають. Суму концентрацій іонів приймають за 100%, а величину кожної окремо взятої фракції — за x . Складають пропорцію і визначають її відносний показник для кожної фракції водного екстракту проби.

Приклад визначених абсолютних (мМ) і відносних (%) показників концентрації вільних і зв'язаних Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у фракціях тканин яєчка бугая наведений в таблиці.

У водних екстрактах проби (фракція № 1) за дуже широкою межі показників абсолютної концентрації вільних Ca^{2+} , K^+ , Na^+ (5,5...157 мМ) діапазон мінімальних і максимальних значень її відносного показника — найвищий і подібний (61...67%). Абсолютні і відносні значення концентрацій іонів легкорозчинних сполук в екстрактах фракцій № 2 в 2–3 рази менші, ніж вільних іонів у фракції № 1. Однак, якщо кількість кальцію зв'язаного з важкорозчинними сполуками тканин проби в екстракті фракції № 3 в 4 рази менша, ніж з легкорозчинними у фракції № 2, та калію і натрію — відповідно менше лише в 1,6–2,5 рази. При цьому за різних абсолютних (0,4...12 мМ) та майже однакових відносних (3...5%) значень показників концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , які зв'язані з нерозчинними сполуками проби, їх кількість в екстракті фракції № 4 зменшується щодо фракції № 3 неоднаково: Ca^{2+} і Na^+ — в 1,5–1,7, а K^+ — в 4,3–4,8 рази.

Абсолютні і відносні показники концентрації вільних і зв'язаних іонів, мМ

Показники концентрації	Іони	Фракції водних екстрактів, №				Сума визначених показників
		1	2	3	4	
Абсолютні, мМ	Ca ²⁺	5,5	2,5	0,6	0,4	9
	K ⁺	113	39	24	5	181
	Na ⁺	157	47	19	12	235
Відносні, %	Ca ²⁺	61	28	7	4	100
	K ⁺	63	21	13	3	100
	Na ⁺	67	20	8	5	100

Застосовані для визначень реактиви мають бути кваліфікації х.ч. або ч.д.а. Розчини готують самостійно або користуються набором стандартних реактивів. Можна використовувати іншу вимірвальну техніку, яка за якісними характеристиками не гірша за наведену.

За кінцевий результат приймають отриману з трьох визначень середньоарифметичну величину (М). Похибка результатів визначень не повинна перевищувати $\pm 5\%$.

ЛІТЕРАТУРА

1. Берри М., Таун М.-Г., Крессе Дж.-Б., Германи У. Пат. 2081411 РФ, G01N33/4. Композиція для визначення іонів натрія (варіанти); Заявл. 03.12.1991; Опубл. 10.06.1997. — 11 с.
2. Берри М. Н., Таун М.-Г., Крессе Дж.-Б., Германи У. Пат. 2054674 РФ, G01N33/52 Способи визначення концентрації іонів калію в біологічному матеріалі. Заявл. 02.04.1988; Опубл. 20.02.1996. — 9 с.
3. Власова Е.Г., Медведева Л.Н. // Пат. 2030744 РФ, G01N31/16 Способ визначення кальцію в присутстві фосфат-іонів: Заявл. 20.12.1991; Опубл. 10.03.1995. — 3 с.
4. Максим'юк Г.В. Оцінка впливу умов кріоконсервації на гомеостаз Ca²⁺, K⁺, Na⁺ у сперматозоїдах і спермальній плазмі // Клінічна та експериментальна патологія. — 2005. — Т. 4, № 1. — С. 116–120.
5. Никитин А. К. // Пат. 2101696 РФ, G01N27/42, G01N21/00. Способ визначення концентрації іонів в жидкостях: Заявл. 06.08.1996; Опубл. 10.01.1998. — 6 с.
6. Darszon A., Labarca P., Nishigaki T., Espinosa F. Ion channels in sperm physiology // *Physiological Reviews*. — 1999. — V. 79, № 2. — P. 481–510.
7. D'Orazio P., Miller W.G., Myers G.L. and all. Standardization of Sodium and Potassium Ion-Selective Electrode Systems to the Flame Photometric // *Reference Method; Approved Standard — Second Edition. NCCLS document C29-A2 V. 20, № 17. — USA, 2000. — 21 p.*
8. Costello S., Michelangeli F., Nash K. and all. Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions // *Reproduction*. — 2009. — V. 138 (3). — P. 425–437.
9. Khalil S.A.H., Moody G.J., Thomas J.D.R. Ion-selective electrode determination of sodium and potassium in blood

and urine // *Anal. Lett.* — 1986. — № 19. — P. 1809–1830.

10. Kùlpmann W.R. Determination of electrolytes in serum and plasma // *Wien Klin. Wochenschr. Suppl.* — 1992. — V. 192. — P. 37–41.
11. Murphy V.A. Method for determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, chloride and phosphate in the rat choroid plexus by flame atomic absorption and visible spectroscopy // *Anal. Biochem.* — 1987. — V. 161. — P. 144–51.
12. Otto M. *Analytische Chemie / New York: Weinheim, 1995. — 668 s.*

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ СВОБОДНЫХ И СВЯЗАННЫХ Ca²⁺, K⁺, Na⁺ В ФРАКЦИЯХ ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ПРОБ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Г.В. Максим'юк, Л.Е. Лаповец

Разработали методику определения концентрации ионов макро- и микроэлементов с легко-, трудно- и нерастворимыми в воде комплексными неорганическими и органическими соединениями. Полученные результаты исследований могут быть использованы для обоснования компенсаторных механизмов формирования гомеостаза (равновесия содержания) ионов в системе “клетка–среда”, применении новых способов объективной диагностики, прогнозирования, оценки, коррекции функционального состояния (норма, патология), клеток, тканей и органов человека, животных, растений.

METHOD TO DETERMINE CONCENTRATION OF THE FREE AND BOUND CA²⁺, K⁺, NA⁺ IN THE WATER EXTRACT FRACTIONS OF BIOLOGICAL MATERIAL ASSAYS

H.V. Maksymjuk, L.E. Lapovets

We have developed a method for determining the ions of macro- and microelements concentration with easily water soluble, sparingly soluble and insoluble complex inorganic and organic compounds. The research results will be used for study of compensatory mechanisms for the formation of ions homeostasis (equilibrium of the content) in the “cell-environment” system and implementation of the new objective diagnosis, prognosis, evaluation and correction method of the functional state (normal, pathological) of human, animal and plant cells, tissues and organs.