

4. *Bentivoglio M., Kuypers H. G. J. M., Catsman-Berrevoets C. E.* Retrograde neuronal labeling by means of bisbenzimidazole and nuclear yellow (Hoechst S 769121). Measures to prevent diffusion of the tracers out of retrogradely labeled neurons.— *Neurosci. Lett.*, 1980, 18, N 1, p. 19—24.
5. *Bentivoglio M., Kuypers H. G. J. M., Catsman-Berrevoets C. E. et al.* Two new fluorescent retrograde neuronal tracers which are transported over long distances.— *Ibid.*, 1980, 18, N 1, p. 25—30.
6. *Kristensson K., Olsson Y.* Retrograde axonal transport of protein.— *Brain Res.*, 1971, 29, N 2, p. 363—365.
7. *Kuypers H. G. J. M., Catsman-Berrevoets C. E., Padt R. E.* Retrograde axonal transport of fluorescent substances in the rat's forebrain.— *Neurosci. Lett.*, 1977, 6, N 3, p. 127—135.
8. *La Vail J. H., La Vail M. M.* Retrograde axonal transport in the central nervous system.— *Science*, 1972, 176, N 4042, p. 1416—1417.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила 25.10.84

УДК 577.15.154.4.082

О. А. Бойко, Л. А. Курбаков

ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИДРИРУЮЩЕЙ КАРБАНГИДРАЗЫ КРОВИ

Активность карбангидразы (КФ 4.2.1.1) является важным показателем состояния газообмена, кислотно-основного состояния и метаболизма. Карбангидраза принимает участие в осуществлении функций нервной системы, пищеварения и др. [3]. Однако этот тест используется нешироко из-за множества недостатков в методах определения. Важнейшими из них являются визуальная оценка активности фермента по времени (в секундах) изменения окраски индикаторно-буферной смеси при колориметрическом способе определения [1, 4, 8] или сложность установок в электрометрических методах [8].

Принцип метода. В основе предлагаемого метода лежит классический принцип определения активности карбангидразы по скорости гидрирования углекислого газа, сопровождающегося изменением величины pH, а следовательно, и окраски индикаторно-буферной смеси [1, 4]. Но переходная точка величины pH определяется не визуально, а с помощью фотоэлектроколориметра. Углекислый газ подается в стандартные и опытные пробы из газового баллона непосредственно в кювету фотоэлектроколориметра через соединительную полихлорвиниловую трубку, регулятор расхода газа, инъекционную иглу. В экспедиционных условиях или при отсутствии баллонного газа можно пользоваться выдыхаемым альвеолярным воздухом, содержащим $\approx 5,5\%$ углекислого газа. При модификации метода использованы элементы определения активности карбангидразы, описанные другими авторами [1, 2, 4, 5, 9].

Реактивы: 1) индикаторно-буферная смесь готовится перед началом опыта. К 99,5 мл боратного буфера pH 9,0 доливают 0,5 мл 1,0 % спиртового раствора фенолфталеина. Боратный буфер pH 9,0: к 80,0 мл буры (тетраборат натрия) концентрации 0,017 моль/л доливают 20,0 мл борной кислоты в концентрации 0,07 моль/л. Буфер можно хранить в холодильнике длительное время; 2) углекислый газ (5 % CO_2 в азоте) в газовом баллоне. В экспедиционных условиях при отсутствии баллонного газа можно пользоваться выдыхаемым «альвеолярным» воздухом, содержащим $\approx 5,5\%$ CO_2 [6, с. 240—241].

Оборудование и приборы: 1) фотоэлектроколориметр (ФЭК-М); 2) секундомер; 3) газовый баллон, заполненный CO_2 (5,0 % CO_2 в азоте) с регулятором расхода газа (скорость 1000 мл/ч)*, газопроводящей

* — в качестве регулятора расхода газа можно использовать устройство, показанное на рисунке.

трубкой и инъекционной иглой с рамкой-фиксатором на кювете; 4) установка для наполнения газового баллона выдыхаемым «альвеолярным» воздухом [6] **; 5) установка для отмеривания индикаторно-буферной смеси (бюретка должна быть с резиновой насадкой).

Ход опыта: 1) кровь разбавить дистиллированной водой в 100 раз; 2) приготовить индикаторно-буферную смесь (реактивы, п. 1); 3) нейтрализовать (визуальная оценка) углекислым газом $\approx 10,0$ мл индикаторно-буферной смеси (в соответствии с количеством проб).

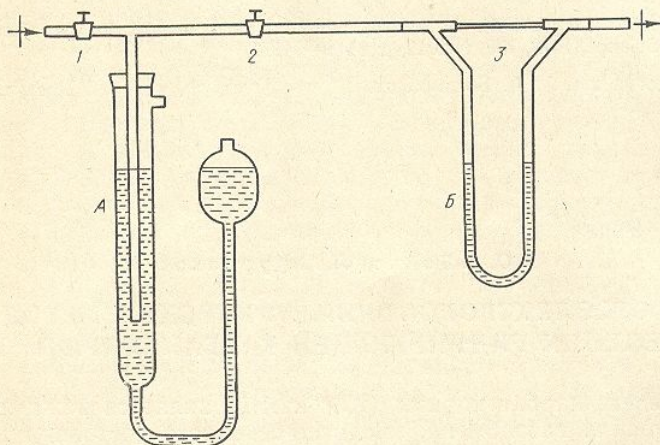


Схема регулирования расхода газа поддержанием постоянного давления.

А — моностат; Б — реометр; 1, 2 — краны регулировки потока газа; 3 — капилляр.

(Не перетитровать!); 4) приготовить смеси для определения экстинкции эталонов: а) стандарт-эталон — к 3,2 мл дистиллированной воды добавить 1,0 мл нейтрализованной индикаторно-буферной смеси; б) кровь-эталон — к 0,2 мл разбавлений (1:100) крови добавить 3,0 мл дистиллированной воды и 1,0 мл нейтрализованной индикаторно-буферной смеси; 5) приготовить смеси-задачи для определения времени нейтрализации пробы с индикаторно-буферной смесью до экстинкции эталона: а) стандарт-задача — к 3,2 мл дистиллированной воды добавить 1,0 мл индикаторно-буферной смеси; б) кровь-задача — к 0,2 мл разбавленной (1:100) крови добавить 3,0 мл дистиллированной воды и 1,0 мл индикаторно-буферной смеси.

Все пробирки со смесями-эталонами и смесями-задачами закрыть резиновыми пробками, перемешать содержимое, поставить в холодильник на 25—30 мин для стабилизации температуры смесей; 6) колориметрировать каждую задачу против «своего» эталона непосредственно после извлечения их из холодильника в кювете с рабочей длиной 10 мм при синем светофильтре (длина волны 110 мкм) в положении рукоятки чувствительности «открыто» вначале на малой, затем на большой чувствительности, учитывая по секундомеру время, необходимое для нейтрализации задачи (до обесцвечивания) в такой последовательности: а) обычным способом работы на левом барабане фотоэлектроколориметра провести колориметрирование стандарт-эталона. После выравнивания световых потоков барабаном отсчета устанавливается определенная для данной пробы экстинкция (барабан к нулю отсчета не возвращать!); б) при нулевом положении рукоятки чувствительности и положении барабана отсчета, установленном как указано в п. 6-а, поместить в световой поток стандарт-задачу; в) не возвращая барабан отсчета на нулевую отметку, переключить рукоятку на малую чувстви-

** — используется в экспедиционных условиях или при отсутствии баллонного углекислого газа.

тельность. Отклонив процессе нейтрализации углекислого стрелку, отклонившую чувствительность. Учит (обесцвечивания) с малой чувствительно

Таким же образом осуществления реакции «кровь-эталон».

Активность гидрирующ

Объект исследования	Разведен крови
Человек	1:2000
Человек	1:2200
Крыса	1:2200
Крыса	1:4000

До начала колориметрирования скорость течения газа в колориметре так, чтобы «дарт-задача» осуществлялась из отверстия, не касаясь изображения. Краном (1) регулировать расход газа, чтобы выходил избыток газа. Краном (2) регулировать расход газа в реометру (Б). Капилляр представляет собой образцом выходящий из отверстия входящего потока газа.

Мерой активности осуществления реакции «дарт-задача» ко времени нейтрализации (пробы «стандарт-задача» в условных единицах

где А — активность осуществления реакции «дарт-задача» для осуществления реакции. Результаты, полученные по формуле (1), позволяют считать

1. Вендт В. П., Кондратенко В. П. Дыхательная функция углерода. — Труды Института физиологии, 1944, вып. 1, с. 14—15.
2. Гуйтюр М. И. Колориметрирование жидкостей. — Журнал физиологии и патологии — Укр. биол. журн., 1944, вып. 1, с. 14—15.
3. Крепс Е. М. Дыхательная функция углерода. — Укр. биол. журн., 1944, вып. 1, с. 14—15.
4. Крепс Е. М., Ченыйка В. М. Колориметрирование жидкостей. — Укр. биол. журн., 1944, вып. 1, с. 14—15.
5. Лукьяничук И. И., Гоцманский В. Е. Колориметрирование жидкостей. — Укр. биол. журн., 1944, вып. 1, с. 14—15.
6. Предеченский В. Е., Шильдс А., Джеффри С. В. Колориметрирование жидкостей. — Укр. биол. журн., 1944, вып. 1, с. 14—15.
7. Shields A., Jeffery S. V. in rat tissues. — Biochem.

тельность. Отклонившуюся стрелку гальванометра довести до нуля в процессе нейтрализации (обесцвечивания) раствора в кювете пропуская углекислого газа. Таким же образом возвращают к нулю стрелку, отклонившуюся при переключении рукоятки на большую чувствительность. Учитывается по секундомеру время нейтрализации (обесцвечивания) среды за период пропускания газа при большой и малой чувствительности.

Таким же образом, начиная с п. 6-а, провести учет времени осуществления реакции гидратации в пробе «кровь-задача» против пробы «кровь-эталон».

Активность гидрирующей карбангидразы крови, определяемая различными методами

Объект исследования	Разведение крови	Активность карбангидразы, определяемая по методу			
		авторов	Лукьянчук Гоцуляк [5]	Вендт [5]	Покровский Тутелян [5]
Человек	1:2000		1,98	1,99	2,02
Человек	1:2200	1,80			
Крыса	1:2200	1,91			
Крыса	1:4000		2,02	2,07	1,98

До начала колориметрирования (нейтрализации) надо отрегулировать скорость тока струи углекислого газа в кювету фотоэлектроколориметра так, чтобы нейтрализация (обесцвечивание) пробы «стандарт-задача» осуществлялась в течение 140—160 с. Струя газа, выходящего из отверстия инъекционной иглы в раствор кюветы, не должна касаться изображения светового пучка на кювете (см. рисунок). Краном (1) регулируют поток газа так, чтобы количество его несколько превышало необходимое для течения реакции. Через моностаг (А) выходит избыток газа и осуществляется первичная регулировка потока газа. Краном (2) осуществляют тонкую регулировку потока газа по реометру (Б). Капилляр (3), имея определенный диаметр и длину, представляет собой значительное сопротивление потоку газа и таким образом выходящий поток мало зависит от некоторых изменений входящего потока газа.

Мерой активности карбангидразы является отношение времени осуществления реакции гидратации (нейтрализации) пробы «кровь-задача» ко времени осуществления реакции гидратации (нейтрализации) пробы «стандарт-задача». Активность фермента выражается в условных единицах (А) и рассчитывается по формуле [3]: $A = \frac{t_{сз} - t_{кз}}{t_{кз}}$, где А — активность фермента в условных единицах, $t_{сз}$ — время (с) для осуществления реакции гидратации в «стандарт-задаче»; $t_{кз}$ — время (с) для осуществления реакции гидратации в «кровь-задаче».

Результаты, полученные предлагаемым нами методом (см. таблицу) позволяют считать возможным его использование в эксперименте.

Список литературы

1. Вендт В. П., Кондрар Ф. А., Елисеева Г. Д. Катализаторы реакции гидратации двуокиси углерода. — Тр. Киргиз. фил. АН СССР, 1943, 1, с. 15—20.
2. Гуйтур М. И. Колориметрическое определение активности карбангидразы в церебральной жидкости. — Лаб. дело, 1976, № 4, с. 251.
3. Крепс Е. М. Дыхательный фермент — угольная ангидраза и его значение в физиологии и патологии — Успехи соврем. биологии, 1944, 17, вып. 2, с. 125—156.
4. Крепс Е. М., Ченыхаева Е. К. Определение карбангидразы в крови. — Воен.-мед. сб., 1944, вып. 1, с. 14—38.
5. Лукьянчук И. И., Гоцуляк Л. Е. Определение карбангидразной активности в эритроцитах крови. — Укр. биохим. журн., 1978, 50, № 5, с. 655—658.
6. Предтеченский В. Е., Боровская В. М., Марголина Л. Т. Руководство по лабораторным методам исследования. — М.: Медгиз, 1950. — 804 с.
7. Shiels A., Jeffery S., Wilson C., Carter N. Radioimmunoassay of carbonic anhydrase in rat tissues. — Biochem. J., 1984, 218, N 2, p. 281—284.