

БИОХИМИЯ

Г. А. ПАНОСЯН

ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ХОЛИНЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Современные методы определения холинэстеразной активности подразделяются на биологические, химические и физико-химические. В настоящее время большинство исследователей предпочитает химические и физико-химические методы, так как биологический метод, несмотря на некоторые преимущества, очень громоздкий, требует много времени и, вследствие этого, почти невозможно ставить серийные исследования.

Химический метод определения холинэстеразной активности основан на измерении количества образуемого при ферментативном гидролизе ацетилхолина уксусной кислоты, которое можно производить либо манометрически (по количеству углекислоты, вытесненной из бикарбоната), либо титриметрически (нейтрализацией уксусной кислоты щелочью).

Наиболее употребительным в настоящее время является манометрический метод. Однако он имеет ряд недостатков, затрудняющих проведение серийных исследований.

Аппарат Варбурга сложен и дорогостоящ, занимает много места, требует дополнительной установки для получения газовой смеси и поэтому мало доступен многим лабораториям.

В 1949 г. Хестрин [1] определил активность холинэстеразы колориметрическим методом. Для этой цели он использовал дополнительную реакцию ацетилхолина с гидроксиламином. Однако этот метод, по определению самого автора, не очень точен и фактически неприменим при больших концентрациях ацетилхолина и малой активности холинэстеразы.

В 1953 г. А. А. Покровский [2] для колориметрического метода определения активности холинэстеразы применил бромтимоловый синий, который имеет интервал перехода рН 6,0—7,6, что лежит ниже оптимума сывороточной и истинной холинэстераз. Кроме того недостатком метода Покровского является невозможность ставить серийные опыты, так как холинэстеразная активность измеряется временем, необходимым для образования определенного количества уксусной кислоты при ферментативном гидролизе ацетилхолина.

Наличие в настоящее время фотоэлектродетекторной аппаратуры делает возможным точно и объективно уловить те небольшие

изменения цвета индикатора, по которым обычно судят о холинэстеразной активности.

В нашей работе мы использовали фотоэлектроколориметр типа ФЭК-М. Он очень удобен, довольно точен, занимает сравнительно небольшое место и не требует особых навыков работы*.

Принцип метода. При расщеплении ацетилхолина, образующаяся уксусная кислота изменяет рН среды. Изменение рН отражается на окраске индикатора. Степень изменения окраски служит показателем холинэстеразной активности. В правую и левую кюветы помещаются растворы, имеющие одинаковую окраску. Определенное показание на шкале барабана фотоэлектроколориметра принимается за нуль (за нуль можно принять любое деление шкалы, желательно в области средних значений). Включая гальванометр, необходимо при помощи рукоятки грубой и тонкой настройки клина довести стрелку гальванометра до нуля. Всякое изменение, происходящее в одной из кювет, обуславливающее изменение цвета, отражается на стрелке гальванометра. Вращением рукоятки барабана стрелка гальванометра доводится до нуля. Отклонение от принятой нулевой точки на барабане служит мерилем тех изменений, которые имели место. В данном случае эти изменения будут обусловлены количеством образовавшейся уксусной кислоты. Чем больше этой кислоты, тем сильнее изменение рН, которое влечет за собой изменение цвета индикатора и что, в конечном счете, отражается на степени отклонения от нулевой точки на шкале барабана.

Данным методом возможно определить активность как ложной, так и истинной холинэстеразы с подбором соответствующих индикаторов и буферных растворов.

Реактивы. а) Для сывороточной холинэстеразы. Нами применялись те же реактивы, которые предлагают в своем методе П. И. Борисов и В. И. Розенгарт [3].

1. Индикатор: 0,04% водный раствор крезолового красного (перед опытом разбавляется в 5 раз).
2. Боратный буфер: рН 8,9 (перед опытом разбавляется в 2 раза).
3. 1% раствор ацетилхолинхлорида.
4. Раствор уксусной кислоты — 0,01 М
5. Сывотка крови человека (перед опытом разбавляется в 2 раза).

Все растворы готовятся на дистиллированной воде, лишенной CO_2 .

Реактивная смесь, имеющая объем 10 мл, состоит из: 0,5 мл сывотки, 0,5 мл крезолрота, 1 мл раствора буфера, 7 мл H_2O и 1 см³ ацетилхолинхлорида. В стандартный раствор вместо ацетилхолина добавляется вода.

б) Для холинэстеразы гомогената мозга.

1. Индикатор: 0,1% водный раствор фенолового красного (перед опытом разбавляется в 10 раз).

* Подробное описание фотоэлектроколориметра типа ФЭК-М см. у С. А. Балаховского и Н. С. Балаховского в книге „Методы химического анализа крови“, Медгиз, 1953 г.

2. Фосфатный буфер рН 8,0.
3. 1% раствор ацетилхолинхлорида.
4. Гомогенат мозга лягушки (суспензируется в дистиллированной воде в объеме 1 : 10), через час центрифугируется; употребляется надосадочная жидкость).

Реактивная смесь, имеющая объем 10 мл, состоит из 0,2 мл гомогената, 0,5 мл фенолрота, 1 мл раствора буфера, 0,2 мл ацетилхолинхлорида и 8,1 мл H_2O .

Определение калибровочной кривой. Прежде чем приступить к опыту, необходимо иметь калибровочную кривую, по которой возможно определить какому количеству уксусной кислоты соответствует то или иное отклонение стрелки гальванометра.

Калибровочную кривую можно получить, если вместо раствора ацетилхолина в реактивную смесь ввести заведомо известное количество уксусной кислоты — данное отклонение от нулевой точки будет соответствовать данному количеству уксусной кислоты. Однако в этом случае необходимо учесть следующий момент. Если в правую и левую кюветы ввести стандартные растворы и вращением рукоятки клина довести стрелку гальванометра до нуля (при нулевой точке на шкале барабана), то смена одного стандартного раствора в левой кювете на другой стандартный раствор приводит к отклонению стрелки гальванометра (табл. 1).

Таблица 1

Различные показания стандартных растворов

№ стандартного раствора	1	2	3	4	5	6
Показание на шкале барабана	30,0*	30,2	29,7	30,1	30,9	30,3

Такая разница имеет место вследствие того, что при приготовлении стандартных растворов в отдельные пробирки невозможно поместить точно равное количество всех компонентов стандартного раствора воды, сыворотки (или гомогената) и особенно индикатора.

Учитывая этот момент, мы попытались построить калибровочную кривую следующим образом: в левую и правую кюветы помещаются растворы стандартной смеси; кюветы помещаются в гнезда; стрелка гальванометра при помощи клина приводится к нулю (нулевая точка шкалы барабана—30,0). Затем в каждую кювету, в правую и левую, вводится одинаковое количество воды—0,1 мл, 0,2 мл и т. д. При этом стрелка гальванометра либо не отклоняется, либо отклоняется незначительно (табл. 2).

* 30,0—это принятая нами нулевая точка на левой шкале барабана, соответствующая 30% светопропускания. Все определения нами были проведены со светофильтром № 2, толщина кювет—20 мм.

Т а б л и ц а 2

Показания шкалы при добавлении в обе кюветы одинакового объема воды

Дополнительное количество воды (в мл)	0,0	0,1	0,2	0,5	0,7	1,0	1,5
Показания шкалы . . .	30,0	30,0	30,0	30,1	30,0	30,0	30,0

Следовательно, если в левую кювету вместо воды вводить равный объем уксусной кислоты, то можно получить калибровочную кривую, почти свободную от дополнительных ошибок, которые приведены в табл. 1. Результат определения калибровочных кривых для сыворотки и гомогената приведен в табл. III, а калибровочные кривые—на рис. 1.

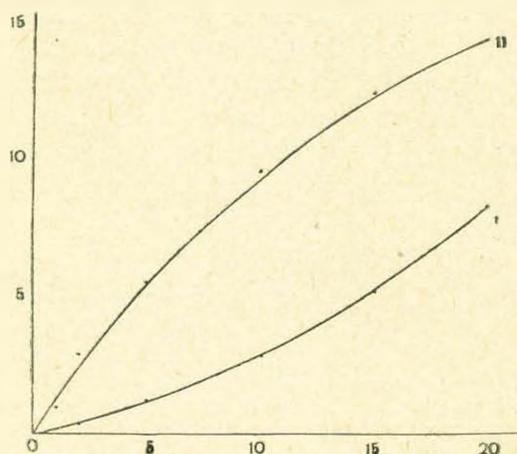


Рис. 1. Калибровочные кривые. По оси абсцисс—количество уксусной кислоты (в 0,0001 М). По оси ординат—единицы деления шкалы барабана (светопропускание по левой шкале, нулевая точка = 30,0), I— для сывороточной холинэстеразы, II—для холинэстеразы гомогената мозга.

Таким образом, 0,1 делению на шкале барабана, которое возможно регистрировать, соответствует в среднем 0,00003 М уксусной кислоты для боратного буфера, и около 0,00001 М—для фосфатного.

Ход определения активности холинэстеразы. Готовятся две пробирки со стандартными растворами; содержимое после размешивания переливается в левую и правую кюветы. Барабан приводится к выбранной нулевой точке и вращением рукояток клина стрелка гальванометра доводится до нуля. Затем стандартный раствор из левой кюветы выбрасывается. В пробирку помещается 7,0 мл H_2O (в случае гомогената 8,1 мл), 0,5 мл крезолрота и 0,5 мл сыворотки или 0,2 гомогената. Затем пробирка ставится в термостат с температурой 37°C на несколько минут. Далее в эту же пробирку быстро доливается 1 мл ацетилхолина. Содержимое пробирки переливается в левую кювету. Кювета ставится в гнездо и вращением рукоятки барабана стрелка гальванометра дово-

Таблица 3

а) Получение калибровочной кривой для сывороточной холинэстеразы

Показатели	1		2		3		4		5		6	
	Левая	Правая	Левая	Правая	Левая	Правая	Левая	Правая	Левая	Правая	Левая	Правая
Начальный объем воды (в мл)*	7,9		7,8		7,5		7,0		6,5		6,0	
Добавление (в мл)	воды	— 0,1	— 0,2	— 0,5	— 1,0	— 1,5	— 2,0	—				
	уксусной кислоты в мл 0,01 М	0,1	— 0,2	— 0,5	— 1,0	— 1,5	— 2,0	—				
Разница между нулевой точкой и показанием шкалы**	0,2		0,4		1,2		2,8		5,1		8,2	

* плюс 0,5 мл крезолрота, 0,5 мл сыворотки и 1 мл буфера.

** нулевая точка во всех случаях равна 30,0.

б) Получение калибровочной кривой для холинэстеразы гомогената мозга

Показатели	1		2		3		4		5		6	
	Левая	Правая	Левая	Правая	Левая	Правая	Левая	Правая	Левая	Правая	Левая	Правая
Начальный объем воды (в мл)*	8,2	—	8,1	—	7,8	—	7,3	—	6,8	—	6,3	—
Добавление (в мл)	воды	— 0,1	— 0,2	— 0,5	— 1,0	— 1,5	— 2,0	—				
	уксусной кислоты 0,01 М	0,1	— 0,2	— 0,5	— 1,0	— 1,6	— 2,0	—				
Разница между нулевой точкой и показанием шкалы	1,0		2,9		5,5		9,5		12,3		14,2	

* плюс 0,5 мл фенолрота, 0,2 мл гомогената и 1 мл буфера.

дится до нуля. При этом необходимо, чтобы разница между нулевой точкой и показанием шкалы барабана не превышала 2,0—3,0, т. е. от 30,0 до 32,0 или 33,0, так как сильное подкисление среды раствором ацетилхолинхлорида может привести к более или менее значительным ошибкам. В тот момент, когда стрелка гальванометра доводится до нуля, включается секундомер и записывается показание на шкале гальванометра. Затем содержимое левой кюветы снова переливается в пробирку и ставится в термостат на определенный промежуток времени (удобнее всего на 10 минут для сывороточной холинэстеразы и на 30 минут для холинэстеразы гомогената мозга). По истечении десяти минут (или тридцати минут) содержимое пробирки снова переливается в кювету (обязательно ту же самую) и снова регистрируется показание шкалы (после доведения стрелки гальванометра до нуля). По разнице между первым и вторым показаниями можно судить о холинэстеразной активности

данной сыворотки. Для этого достаточно определить по калибровочной кривой какому количеству уксусной кислоты соответствует данная разница. Пример определения холинэстеразной активности сыворотки человека приведен в табл. 4, а гомогената мозга—в табл. 5.

Холинэстеразная активность сыворотки

Таблица 4

Количество сыворотки (в мл)	Показания шкалы		Разница в делениях шкалы	Пересчет на 0,001М уксусной кислоты	С вычетом спонтанного гидролиза	В подчете на 0,1 мл сыворотки (в 0,001М уксусной кислоты)
	в начале опыта	через 10'				
0,5—прокипячен- ная (спонтанный гидролиз)	30,0	30,4	0,4	0,20	—	—
0,1	30,0	31,0	1,0	0,40	0,20	0,20
0,2	29,8	31,3	1,5	0,66	0,46	0,23
0,5	31,2	35,0	3,8	1,20	1,00	0,20
0,5	31,2	34,9	3,7	1,18	0,98	0,196
0,5	31,6	35,3	3,7	1,18	0,98	0,196
0,5	31,1	34,9	3,8	1,20	1,00	0,20
1,0	30,3	36,5	6,2	1,67	1,47	0,147

Таблица 5

Холинэстеразная активность гомогената мозга

Количество гомогената (в мл)	Показания шкалы		Разница в данных шкалы	Пересчет на 0,001М уксусной кислоты	С вычетом спонтанного гидролиза	В подчете на 0,1 мл гомогената (в 0,001М уксусной кислоты)
	в начале опыта	через 30'				
0,2-прокипяченный (спонтанный гидролиз)	30,0	30,8	0,8	0,10	—	—
0,05	30,5	33,3	2,8	0,20	0,10	0,2
0,1	31,2	34,5	3,55	0,32	0,22	0,22
0,2	30,1	35,85	5,75	0,55	0,45	0,225
0,2	29,8	35,45	5,65	0,525	0,425	0,212
0,2	30,2	35,85	5,65	0,525	0,425	0,212
0,2	30,0	35,56	5,55	0,515	0,415	0,208
0,3	29,0	36,30	7,30	0,75М	0,65	0,217

Нулевую точку можно устанавливать прямо по одной из опытных растворов, если заведомо известно, что раствор ацетилхолина не очень кислый. Нулевую точку можно брать в любом месте шкалы, однако она должна совпадать с нулевой точкой калибровочной кривой. Каждый раз при приготовлении нового буферного раствора рекомендуется, если нет соответствующих возможностей для измерения рН раствора, построить новую калибровочную кривую (для большей точности).

Далее, необходимо, чтобы вся процедура, от добавления ацетилхолина в опытную пробирку до приведения стрелки гальванометра до ну-

ля, не продолжалась бы более 30 секунд. После этого также необходимо быстро перелить содержимое кюветы в пробирку и поместить в термостат, так как температура в фотоэлектроколориметре гораздо ниже, чем в термостате.

Подобным же образом обратное переливание опытного раствора, взятого из термостата в кюветы, необходимо проделать за 30 секунд до истечения 10 минут (или 30 минут) для того, чтобы успеть во время отметить показание шкалы барабана. Соблюдая эти условия, возможно сразу ставить опыты с десятью опытными растворами (в каждую минуту одно определение).

Этот метод особенно пригоден для серийных исследований, в частности, для определения ингибиторов холинэстеразы, требует очень мало времени, легко доступен, не требует дополнительной сложной установки и оборудования.

Данный метод может быть использован также для определения холинэстеразной активности других неокрашенных или слабоокрашенных тканевых жидкостей и экстрактов.

Институт тонкой органической химии
Академии наук Армянской ССР

Поступило 15 I 1958 г.

Կ Լ Փ Ա Ն Ա Ս Ա Ն

ՆՈՒՐԱԷՍԹԵՐԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ՖԱՏՈՒԷԿՏՐՈԿՈՐԻՄԵՏՐԻԿ Մ Ե Թ Ո Դ

Ա մ փ ո փ ո ս մ

Առաջարկվում է խղինձսթերազային ակտիվության որոշման նոր մեթոդ՝ հիմնված սեպակով խառնուրդի մեջ ինդուկատորի գույնի փոփոխության չափման վրա, ընդ որում աչք փոփոխությունը պարմանավորված է լուծույթի pH-ի փոփոխմամբ՝ կախված առաջացած քաղախաթթվի քանակից: Իհակտիվ խառնուրդի մեջ գույնի փոփոխությունը պրանցվում է ՓՅԿ-Մ տիպի ֆոտոէլեկտրակոլորիմետրով: Շիճուկային խղինձսթերազայի համար կիրառվում է բորատային բուֆեր (pH 8,9) և, որպես ինդեկատոր, կրեզոլի կարմիրը, իսկ ուղեղի համոզենատի խղինձսթերազայի համար՝ ֆոսֆատային բուֆեր (pH 8,0) և ֆենոլի կարմիրը: Տվյալ մեթոդը հարմար է սերիական հետազոտությունների համար, զանազան նյութերի խղինձսթերազային հատկությունները որոշելու համար և կիրառելի է չնեղիված կամ թույլ նեղիված հեղուկների ու էքստրակտների խղինձսթերազային ակտիվությունը որոշելու համար:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Hestrin, Sh. J. Biol. Chem. 189, 1. 249, 1949.
2. Покравский А. А., Военно-мед. журн. 9, стр. 61, 1953.
3. Борнсон П. И. и Розенгарт В. И., Вопросы медиц. химии, т. 2, 53, 1950.