and changes the relationships between their free and bonded forms. It is discussed the participation of quantitative changes of investigated amino acids in formation of tetany under hypoparathyroidism.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белкина Л. Г., Златоверов А. Н.* Гематоэнцефалический барьер. М—Л., 1935, с. 214.
2. *Бехтерева Н. П., Камбарова Д. К., Позднеев В. К.* В кн.: Устойчивое патологическое состояние при болезнях мозга. Л., 1978, с. 102.
3. *Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н.* Функциональная биохимия синапсов. М., 1978, с. 278.
4. *Легга Н. Дж.* Нейротрансмиттерные системы М., 1982, с. 102.
5. *Сафарян Л. А.* Ж. экспер. и клин. мед. АН АрмССР, 1977, 17, 6, с. 45.
6. *Худавердян Д. Н.* Бюлл. экспер. биол. и мед., 1978, 12, с. 659.
7. *Худавердян Д. Н., Азгалдян Н. Р., Бакунц Г. Г.* Биол. ж. Армении, 1981, 34, 8, с. 824.
8. *Gold Barry J., Huger Francis P.* Biochem. Pharmacol., 1982, 31, 5, 882.
9. *Lovell R. A., Elliott K. A. C.* J. Neurochem., 1963, 10, 7, 479.
10. *Roberts Eugene* Sci. and Sci. Essays Biochem., Biol. and Chem., Tokyo e. a., 1981 227.
11. *Siesjo B. K.* Brain energy metabolism. J. Willey and Sons, N. Y., 1978.
12. *Sokoloff L.* J. Neurochem., 1977, 29, 13.
13. *Steiner F. A., Ruf K.* Brain Res., 1966, 3, 214.

УДК 577.158.45 : 616—008.9—074

И. Л. СААКЯН, Д. А. ГЕВОРКЯН, П. С. СИМАВОРЯН, Э. З. АРУСТАМЯН

МОДИФИКАЦИЯ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЛЕЙЦИН-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ В ТКАНЯХ

Предложен модифицированный метод определения активности лейцин-аминотрансферазы в тканях. Показаны преимущества метода, что позволяет использовать его не только в экспериментальных исследованиях, но и в клинико-биохимических лабораториях.

Большинство тканей организма человека и животных обладает выраженной активностью трансаминирования разветвленных аминокислот—лейцина, изолейцина, валина [2, 4]. Изучение этой активности в норме и при патологии позволяет сделать ряд теоретических и практических выводов [2, 3, 5]. Однако применение существующего метода затруднено из-за сложности его выполнения.

Известный метод определения лейцин-аминотрансферазы (Л-лейцин: 2-оксоглутарат аминотрансфераза, КФ 2. 6. 1. 6, Лей-АТ) в тканях основан на проведении ферментативной реакции путем инкубации гомогената с субстратами—лейцином, альфа-кетоглутаровой кислотой (α-КГ) и коферментом—пиридоксаль-5-фосфатом и на фотометрическом определении образовавшейся альфа-кетоизокапроновой кислоты (α-КИК) динитрофенилгидразиновым методом при длине волны 440 *нм* [1]. Так как 2,4-динитрофенилгидразин дает окрашенные продукты как с образовавшейся α-КИК, так и с непрореагировавшей α-КГ, вышеука-

занный способ определения активности фермента включает разделение 2,4-динитрофенилгидразонов этих двух кетокислот с помощью экстракции динитрофенилгидразона α-КИК толуолом. Такое разделение включает целый ряд трудоемких и длительных операций.

Цель настоящей работы—упрощение известного метода определения активности Лей-АТ в тканях.

В модифицированной методике исключаются стадии осаждения белка, разделения гидразонов двух кетокислот, а также используется в качестве стандарта пировиноградная кислота вместо дефицитной α-КИК.

Материал и методы

Реактивы. 1) 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,8; 2) Л-лейцин (20 *мкмоль* в 0,3 *мл* буфера); 3) α КГ (15 *мкмоль* в 0,15 *мл* буфера); 4) пиридоксаль-5-фосфат (0,02 *мкг* в 0,15 *мл* буфера)—готовится каждый раз перед употреблением; 5) 2,4-динитрофенилгидразин (0,02% раствор в 0,1 N HCl); 6) 0,4 N раствор NaOH; 7) стандартный раствор пирувата натрия (11 *мг* кристаллического пирувата натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 *мл*; 1 *мл* раствора содержит 110 *мкг* пирувата натрия, что соответствует 88 *мкг* пировиноградной кислоты).

Ход определения. Надосадочную жидкость после центрифугирования тканевого гомогената, приготовленного в натрий-фосфатном буфере (соотношение ткани к буферу от 1 : 50 до 1 : 150 для различных органов), в объеме 0,15 *мл* инкубируют с субстратной смесью, содержащей 0,3 *мл* лейцина (20 *мкмоль*), 0,15 *мл* α-КГ (15 *мкмоль*), 0,15 *мл* пиридоксаль-5-фосфата (0,02 *мкг*). Одновременно ставят контрольный образец, который содержит все компоненты, кроме лейцина, вместо чего берут 0,3 *мл* фосфатного буфера. Общий объем инкубационной смеси составляет 0,75 *мл*. Инкубацию проводят при 37°С в течение 60 минут; пробирки вынимают из ультратермостата и сразу же во все опытные и контрольные пробы добавляют по 0,5 *мл* раствора 2,4-динитрофенилгидразина для приостановления реакции. Пробы оставляют 20 минут при комнатной температуре, затем прибавляют по 5 мл раствора NaOH и через 10 минут измеряют оптическую плотность при длине волны 500—560 *нм*. Колориметрирование проводят против холостой пробы, содержащей: дистиллированную воду—0,75 *мл*, раствор динитрофенилгидразина—0,5 *мл*, NaOH—5 *мл*.

Построение калибровочной кривой. Из стандартного раствора пирувата натрия готовят ряд разведений, как указано в табл. 1. Затем в пробирки со стандартным раствором разных разведений добавляют по 0,5 *мл* раствора 2,4-динитрофенилгидразина, оставляют 20 минут, после чего добавляют по 5 *мл* раствора едкого натра, оставляют 10 минут, затем колориметрируют при длине волны 500—560 *нм*. Колориметрирование проводят против холостой пробы, содержащей вместо стандартного раствора пирувата натрия 0,75 *мл* дистиллированной воды.

Расчет результатов. За единицу активности фермента принимают то количество микромолей α-КИК, которое образуется при инкубации 1 г ткани в течение 1 часа. Расчет активности фермента проводят по формуле: $A = (C_1 - C_2) \times P \times 1{,}1$, где А—активность фермента, C_1—количество микромолей пировиноградной кислоты, найденное по калибровочному графику в опытном образце, C_2—то же в контрольном образце, Р—коэффициент пересчета на 1 *г* ткани, 1,1—коэффициент пересчета на α-КИК.

Таблица 1

Приготовление образцов для построения калибровочной кривой пировиноградной кислоты

№ пробы	Стандартный раствор пирувата натрия (*мл*)	Дистиллированная вода (*мл*)	Содержание пировиноградной кислоты в пробе (*мкмоль*)
1	0,05	0,70	0,05
2	0,10	0,65	0,10
3	0,15	0,60	0,15
4	0,20	0,55	0,20
5	0,25	0,50	0,25
6	0,30	0,45	0,30
7	0,35	0,40	0,35
8	0,40	0,35	0,40
9	0,45	0,30	0,45
10	0,50	0,25	0,50

Результаты и обсуждение

Как уже было сказано выше, описанная модификация имеет то преимущество перед известным методом [1], что исключает этап разделения 2,4-динитрофенилгидразонов двух кетокислот, каковыми являются образовавшаяся α-КИК в ходе ферментативной реакции и непрореагировавшая α-КГ. Это становится возможным благодаря тому, что измерение оптической плотности проводят в области спектра 500—560 *нм* (точнее при $\lambda = 510$ *нм*), т. е. измерение оптической плотности сдвинуто с области максимума поглощения чистого гидразона α-КИК. Для измерения нами выбрана именно эта область спектра, т. к., с одной стороны, измеряемая величина оптической плотности в данном диапазоне длины волны находится в независимости от концентрации α-КГ, с другой—$\lambda = 500$—560 нм—это именно та область спектра, где имеется большая разница в спектрах поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов α-КИК и α-КГ. Приводим экспериментальное подтверждение предложенной модификации.

На рис. 1 приведены спектры поглощения динитрофенилгидразона α-КГ (растворенной в натрий-фосфатном буфере), взятой в разных концентрациях. Из рисунка видно, что в области спектра 340—400 *нм* оптическая плотность чувствительна к концентрациям α-КГ, что нельзя сказать для диапазона длины волны 500—560 *нм*, где независимо от концен-

траций α-КГ (хотя они различаются в 30 раз—15 и 0,5 *мкмоль*) практически имеется одинаковая оптическая плотность—фон. По этой же причине значения оптической плотности в контрольных пробах образцов различных органов (рис. 2 а, б, в) различаются между собой незна-

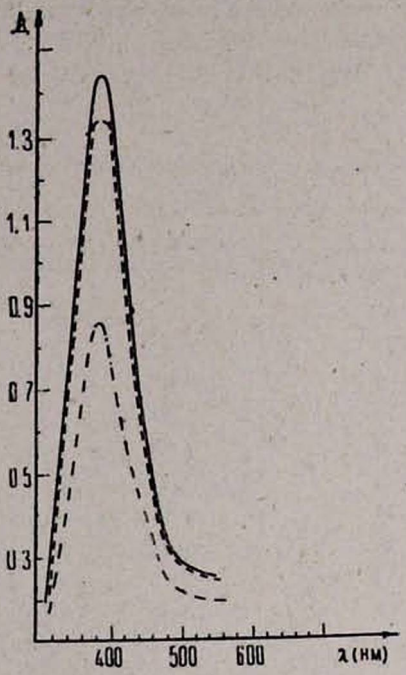

Рис. 1. Спектры поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов α-КГ в зависимости от ее концентрации.————15 *мкмоль*— — — —2 *мкмоль*—.—.—0,5 *мкмоль*.

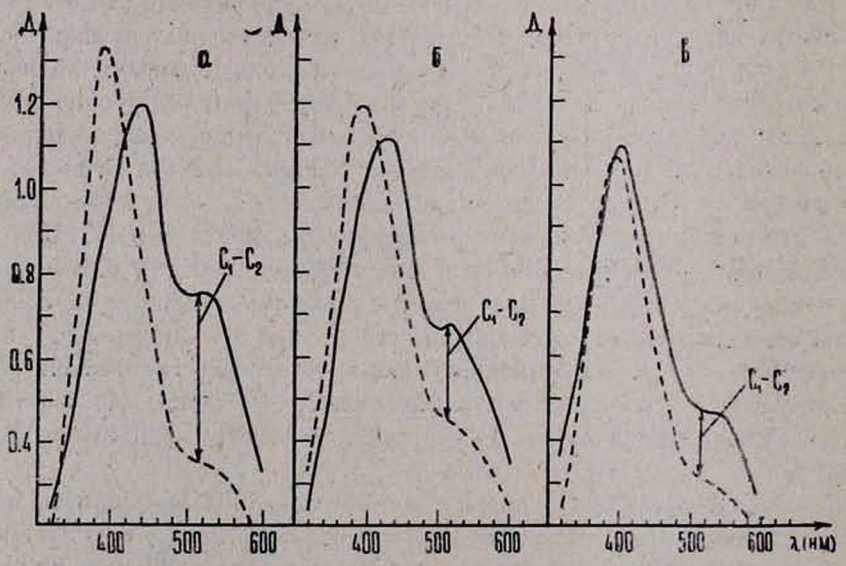

Рис. 2. Спектры поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов опытной и контрольной проб поджелудочной железы (а), сердечной ткани (б) и ткани печени (в) интактной крысы.———опытная проба (C_1);— — —контрольная проба (C_2).

чительно; в них значения оптической плотности меняются только в зависимости от количества эндогенного изокапроата. Вышеизложенное дает нам основание пренебречь изменением концентраций α-КГ, если измерение проводят в области спектра 500—560 *нм*.

Вместе с тем при сравнении спектров поглощения в опытных пробах различных тканей, приведенных на рис. 2 (а, б, в), видно, что чем больше количество образовавшейся α-КИК (например, в ткани поджелудочной железы), тем больше разница в оптической плотности между опытной и контрольной пробами в области спектра 500—560 *нм*. Таким образом, изменения оптической плотности при длине волны 500—560 *нм* обусловлены практически только изменением концентрации α-КИК в результате ферментативной реакции, поэтому в данных условиях проведения ферментативной реакции и при измерении в этой области спектра нет необходимости в удалении гидразона α-КГ.

Такой подход к решению вопроса, когда остаток α-КГ не удаляется и для измерения гидразонов выбирается менее чувствительная область спектра, не новый он применяется также и другими авторами, например, для количественной оценки 2,4-динитрофенилгидразонов пирувата и оксалоацетата при определении активности аланин- и аспартатаминотрансфераз в сыворотке крови по методу Reitman, Frankel [6].

Описанная модификация предлагает использование пировиноградной кислоты вместо дефицитной α-КИК для построения калибровочной кривой и расчета активности Лей-АТ. Такая замена реактива становится возможной благодаря перерасчету, исходящему из закона Бера: $Д = Ecl$, где Д—оптическая плотность, Е—молярная экстинкция, с—концентрация, l—толщина слоя раствора. Для двух разных растворов при одинаковой концентрации и толщине слоя отношение оптических плотностей равно отношению молярных экстинкций:

$$\frac{Д_1}{Д_2} = \frac{E_1}{E_2} = K$$

В нашем случае:

$$K = \frac{\text{молярная экстинкция гидразона α-КИК } (E_1)}{\text{молярная экстинкция гидразона пировиноградной кислоты } (E_2)}$$

$$= \frac{17,48}{16,00} = 1,09 \approx 1,1,$$

где значение E_1 заимствовано из работы Cappuccino et al [1], E_2 получено нами экспериментально. Таким образом, умножая активность фермента, рассчитанную по пировиноградной кислоте на 1,1 (коэффициент пересчета), получаем активность по α-КИК.

Модифицированным методом нами определялась активность Лей-АТ в ткани поджелудочной железы у 10 интактных крыс. Для сравнения активность фермента определялась также с помощью хроматографического определения второго продукта ферментативной реакции—глутаминовой кислоты. В табл. 2 приведены сравнительные данные по определению активности Лей-АТ предложенной модификацией и по количеству образовавшейся глутаминовой кислоты.

Таблица 2

Активность Лей-АТ в ткани поджелудочной железы интактных крыс, определенная разными методами

Образцы ткани поджелудочной железы, взятые у разных животных	Активность, полученная модифицированным методом (*мкмоль* α-КИК/*г* тк./час)	Активность, полученная хроматографическим методом (*мкмоль* глутаминовой кислоты/*г* тк./час)
1	180,96	171,94
2	178,58	180,90
3	187,57	176,89
4	180,85	190,80
5	187,88	173,80
6	192,52	200,95
7	173,84	208,87
8	164,92	180,55
9	193,95	200,97
10	195,52	180,95
M±m	183,66±2,86	186,66±4,03

Приведенные в табл. 2 данные дают основание считать, что использование модифицированной методики позволяет получить значения активности фермента в пределах допустимых колебаний.

Таким образом, в результате предложенной модификации значительно упрощается метод определения активности Лей-АТ, что позволяет использовать его не только в экспериментальных исследованиях, но и в клинико-биохимических лабораториях при определении активности фермента в биопсийном материале.

ЦНИЛ Ереванского ИУВ

Поступила 22/II 1985 г.

Ի. Լ. ՍԱՀԱԿՅԱՆ, Ջ. Ա. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Գ. Ս. ՍԻՄԱՎՈՐՅԱՆ, Է. Ջ. ԱՌՈՒՍՏԱՄՅԱՆ

ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ ԼԵՅՑԻՆ–ԱՄԻՆՈՏՐԱՆՍՖԵՐԱԶԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ՄԵԹՈԴԻ ՄՈԴԻՖԻԿԱՑԻԱՆ

Առաջարկվում է հյուսվածքներում լեյցին-ամինոտրանսֆերազի ակտիվության որոշման պարզեցված և մատչելի մեթոդ։ Մոդիֆիկացված մեթոդը հայտնի մեթոդի համեմատությամբ ունի այն առավելությունը, որ նրանում սպիտակուցի նստեցում, ինչպես նաև տակա երկու կետոթթուների՝ առաջացած կետոհոդակապրոնաթթվի և մնացորդ կետոգլուտարաթթվի հիդրազոնների բաժանում չի կատարվում։ Դա իրականացվում է շնորհիվ այն բանի, որ ֆերմենտի ակտիվության չափման համար ընտրվում է ալիքի երկարության այլ մարզ, որը շեղվում է կլանման մաքսիմումից։ Բացի դրանից, առաջարկված մեթոդում որպես ստանդարտ օգտագործվում է պիրոխաղողաթթու՝ թանկարժեք և հազվագյուտ α-կետոհոդակապրոնաթթվի փոխարեն։

Առաջարկված մեթոդն ենթադրվում է օգտագործել ինչպես կլինիկա-բիոքիմիական լաբորատորիաներում, այնպես էլ գիտական հետազոտությունների նպատակով։

I. L. SAHAKIAN, J. A. GEVORKIAN, P. S. SIMAVORIAN, E. Z. AROUSTAMIAN

MODIFICATION OF COLORIMETRIC METHOD OF DETERMINATION OF LEUCINE AMINOTRANSFERASE ACTIVITY IN TISSUES

The modificated method of determination of leucine aminotransferase activity in tissues is suggested. The advantages of this method allow to apply it in experimental investigations as well as in clinico-biochemical laboratories.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cappuccino C. C., Kadowaki H., Knox W. E.* Enzyme. 1978, 23, 5, 328.
2. *Goto M., Shinno H., Ichihara A.* Gann. Jap. J. Cancer Res., 1977, 68, 5, 663,
3. *Ichihara A.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, 259, 347.
4. *Ichihara A., Noda C., Goto M.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 67, 4, 1313.
5. *Ogawa K., Yokojima A., Ichihara A.* J. Biochem., 1970, 68, 6, 901.
6. *Reitman S., Frankel S.* Am. J. Clin. Pathol., 1957, 28, 56.

УДК 615.451.22 : 543.876 : 612.12

П. Т. ШАХБАЗЯН, Р. К. ТАМРАЗЯН

ИССЛЕДОВАНИЕ СУСПЕНЗИОННОЙ СТАБИЛЬНОСТИ КРОВИ ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ

Проведено исследование суспензионной стабильности форменных элементов крови и плазмы при экстремальных состояниях в эксперименте. Установлено, что при указанных состояниях происходят расстройства суспензионной стабильности крови с развитием внутрисосудистой агрегации ее форменных элементов. Эти изменения во многом связаны с нарушениями физико-химических свойств плазмы, что необходимо учитывать при разработке средств адекватной терапии экстремальных состояний.

Кровь является сложной концентрированной суспензией форменных элементов в плазме, которая, в свою очередь, служит коллоидной суспензией белков в электролите. Адекватная гемоциркуляция возможна лишь при условии пребывания частиц крови во взвешенном состоянии, отсутствии их агрегации [12]. Потеря кровью суспензионной стабильности приводит к повышению вязкости, блокаде сосудов клеточными агрегатами с нарушением периферического кровообращения и развитием гипоксии тканей. Известно, что при экстремальных состояниях нарушения периферического кровообращения, особенно на уровне микроциркуляции, являются одним из ведущих моментов патогенеза [3]. Механизмы этого явления во многом неясны. Исследованию в основном подвергалась индуцированная агрегация клеток крови—тромбоцитов и эритроцитов методом Born [14]. Однако этот метод далеко не всегда отражает реальную картину изменения суспензионной стабильности крови. Изменение способности клеток к агрегации не означает однозначного внутрисосудистого изменения агрегатообразования, и наоборот [18, 15]. Более известны в этом плане методы оценки внутрисосудистой агрегации клеток in vivo, но эти методические приемы, предложен-