ACTA PHYSIOLOGICA POLONICA
1961, XII, 2, 303

BOLESŁAW PIEKARSKI

MODYFIKACJA METODY OZNACZANIA AKTYWNOŚCI ANHYDRAZY WĘGLANOWEJ KRWINEK CZERWONYCH

Z II Kliniki Chorób Wewnętrznych Śląskiej A. M.
Kierownik: prof. dr *W. Zahorski*

Istniejące współcześnie metody oznaczania ilościowego aktywności anhydrazy węglanowej (karboanhydraza — CAH) oparte są na dwu zasadniczych reakcjach katalizowanych przez ten enzym:

1. $H_2CO_3 \rightarrow H_2O + CO_2$
2. $CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3 \rightleftharpoons H^{\cdot} + HCO_3$

Metody oparte na pierwszej reakcji mają na celu pomiar ilości wywiązującego się dwutlenku węgla bądź na drodze manometrycznej (*Meldrum, Roughton* i *Booth, Leiner* i *Leiner, Kiese, Stadie* i *O'Brien, Maetz*), bądź na drodze objętościowej (*Van Goor*).

Metody oparte na drugiej reakcji mają na celu pomiar szybkości zmiany pH w roztworze buforu wskutek tworzenia się kwasu węglowego (*Philpot, Brinkmann, Van Goor, Leiner, Krebs* i *Czenykajewa*).

W swej modyfikacji sposobu oznaczania aktywności anhydrazy węglanowej oparłem się na metodzie Krebsa i Czenykajewej polegającej, jak metoda Brinkmanna, na pomiarze czasu uwodnienia dwutlenku węgla wobec czerwieni fenolowej jako wskaźnika.

Zmiany, które wprowadziłem do tej metody oznaczania aktywności anhydrazy polegają na:

1) wprowadzeniu zamiast U-rurki z rtęcią, probówek serologicznych, w których ciekła parafina odgrywa rolę zarówno dzielącą roztwory, jak i chroniącą je od wpływu powietrza zawierającego dwutlenek węgla. Poza tym zastosowanie probówek pozwala na szybsze przeprowadzenie całego szeregu prób — nie jest się skrępowanym ilością U-rurek;

2) dodaniu do roztworu z czerwienią fenolową błękitu toluidyny przez co spowodowano, że obserwuje się nie zmianę barwy z czerwonej na pomarańczową, ale z intensywnie fioletowej na zieloną, co jest bardziej kontrastowe. Przy tym w metodzie posługującej się czystą czerwienią fenolową zmiana zabarwienia z czerwonego na pomarańczowe odbywa się z jed-

nakową szybkością przez cały czas reakcji, co utrudnia uchwycenie momentu zakończenia reakcji nawet wobec próbki o żądanym zabarwieniu. Natomiast zmiana zabarwienia z fioletowego na zielone zachodzi bardziej nagle przy końcu reakcji. Ten fakt nie tylko czyni tę metodę wygodniejszą, ale i dokładniejszą, ponieważ ułatwia kontrolę czasu;

3) mieszaniu roztworów roboczych (w metodzie Krebsa i Czenykajewej przez wstrząsanie, względnie kilkakrotne odwracanie U-rurki) — pałeczką szklaną, co pozwala na uniknięcie gwałtownych poruszeń roztworów, a ma to bardzo istotne znaczenie. Okazuje się, że nawet sam roztwór nr 1 świeżo przyrządzony, kilkakrotnie energicznie wstrząśnięty, tak dalece traci H_2CO_3 i CO_2, że w ogóle nie nadaje się do pomiaru: ilość wydzielanego CO_2 po zmieszaniu z roztworem nr 2 jest zbyt mała, by powstały H_2CO_3 obniżył pH do zmiany zabarwienia czerwieni fenolowej. Te straty H_2CO_3 obniżają prawdopodobnie dosyć znacznie dokładność metody.

PRZEBIEG OZNACZENIA W FORMIE ZMODYFIKOWANEJ

Odczynniki

Do ich sporządzenia używa się wody destylowanej wolnej od dwutlenku węgla. W tym celu należy wodę destylowaną gotować około dwóch godzin.

1) 0,1 N kwas solny;

2) 0,1 N roztwór dwuwęglanu sodu ($NaHCO_3$). Należy odważyć 1,68 g suchego dwuwęglanu sodu i dopełnić w kolbie miarowej do 200 ml objętości wodą;

3) 0,02 N roztwór $NaHCO_3$. Należy odważyć 0,336 g suchego $NaHCO_3$ i dopełnić w kolbie miarowej do 200 ml objętości wodą;

4) 0,02 N roztwór obojętnego węglanu sodu (Na_2CO_3). Należy odważyć 0,572 g $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ i dopełnić w kolbie miarowej do 200 ml objętości wodą;

5) czerwień fenolowa;

6) błękit toluidyny;

7) ciekła parafina;

8) woda destylowana wolna od dwutlenku węgla do sporządzania roztworów roboczych i do pobierania krwi.

Trwałość roztworów węglanów, przechowywanych we flaszkach zamkniętych doszlifowanym korkiem, wynosi około dwóch tygodni.

Z tych roztworów sporządzamy dwa roztwory robocze. Roztwór roboczy nr 1 (0,005 M CO_2 w wodzie) ma następujący skład:

0,1 N kwas solny	5 ml
0,1 N roztwór $NaHCO_3$ . . .	5 ml
H_2O dest. wolna od CO_2 do .	100 ml

Trwałość tego roztworu wynosi około 6—8 godzin, a więc należy go przyrządzać przed każdym oznaczeniem. Roztwór roboczy nr 2 (buforowo-wskaźnikowy) ma następujący skład:

0,02 N roztwór $NaHCO_3$ . .	200 ml
0,02 N roztwór Na_2CO_3 . .	9 ml
czerwień fenolowa	0,015 g
błękit toluidyny	0,020 g

Trwałość tego roztworu, przechowywanego we flaszce zamkniętej doszlifowanym korkiem wynosi około 2 tygodni.

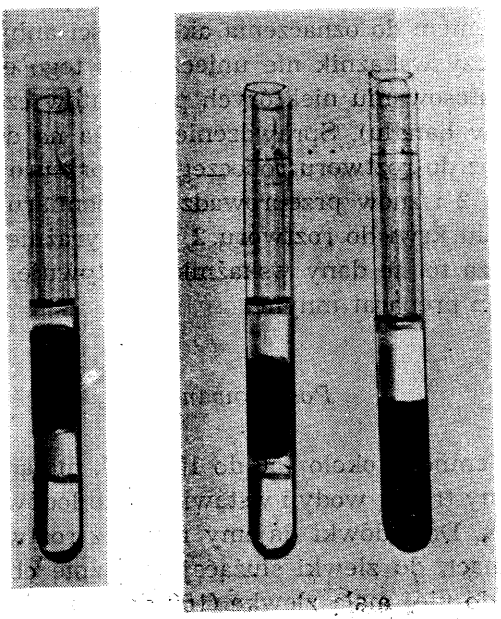
Przed przystąpieniem do oznaczenia aktywności anhydrazy należy najpierw sprawdzić, czy wskaźnik nie unieczynnia tego enzymu (zdarza się to niekiedy przy stosowaniu niektórych preparatów czerwieni fenolowej, znajdujących się w handlu). Sprawdzenie polega na dodaniu kropli rozcieńczonej krwi raz do roztworu roboczego 1 i przeprowadzeniu pomiaru, a raz do roztworu 2 i znów przeprowadzeniu pomiaru. Jeżeli czas oznaczania przy dodaniu krwi do roztworu 2 jest wyraźnie dłuższy niż — do roztworu 1, oznacza to, że dany wskaźnik inaktywuje anhydrazę. Należy zamienić wtedy ten preparat innym.

Postępowanie

Do zlewki o pojemności około 750 do 1000 ml, mającej służyć za łaźnię chłodzącą, wlewamy trochę wody i wstawiamy do lodówki celem obniżenia temperatury wody. Do lodówki dajemy również roztwory robocze 1 i 2. Po około 2 godzinach do zlewki służącej za łaźnię chłodzącą wkładamy lód i wstawiamy do niej małą zlewkę (100 do 200 ml pojemn.), w której będziemy ustawiać probówki. Małą zlewkę napełniamy również lodowatą wodą. Należy zawsze sprawdzić, czy temperatura wody jest około 0 do najwyżej 2°C. Stałość tej niskiej temperatury ma decydujące znaczenie dla dokładności oznaczenia. W temperaturze pokojowej zmiana zabarwienia po zmieszaniu czystych roztworów 1 i 2 zachodzi w ciągu około 3 sek., a w temperaturze +1°C w ciągu około 120 sek.

Najpierw przystępujemy do oznaczenia czasu próbki kontrolnej. W tym celu nabieramy 1 ml roztworu nr 1 (zawsze tą samą pipetą), osuszamy zewnętrzną powierzchnię pipety czystą ściereczką i wprowadzamy do probówki tak, by nie zwilżyć jej ścian. Ażeby opróżnić całkowicie pipetę nie wolno jej wydmuchiwać, natomiast należy dotknąć końcem pipety powierzchnię roztworu i delikatnie wyjąć pipetę, by znów nie zwilżyć ścian probówki nad roztworem, ponieważ wtedy parafina źle przylega do ścian probówki i roztwór nr 2 może samorzutnie przedostać się do roztworu nr 1.

Następnie wprowadzamy do probówki pipetą około 1.5 ml parafiny już bez tych ostrożności. Z kolei inną pipetą (ale zawsze tą samą, jeśli chodzi o roztwór nr 2) nabieramy 1 ml roztworu nr 2 i wprowadzamy ją do probówki zanurzając koniec pipety nieco poniżej powierzchni parafiny, wprowadzając roztwór nr 2 do parafiny. Tworzy on w parafinie pęcherz widoczny na fotografii. Tak przygotowaną probówkę wstawiamy do łaźni chłodzącej. Ponieważ pod wpływem zimnych roztworów 1 i 2 parafina również ochładza się i zwiększa swoją lepkość, roztwór nr 2 nie przedostaje się przez nią do roztworu nr 1. Przy tym obydwa roztwory są całkowicie odizolowane



a *b*

Ryc. 1a, b

od kontaktu z CO_2 z powietrza. Po upływie około 10 min., gdy mamy pewność, że temperatura roztworów jest około 0 do +2°C, mieszamy dokładnie za pomocą pałeczki szklanej, wolnymi ruchami w górę i w dół, obydwa roztwory i naciskamy równocześnie stoper. Zabarwienie mieszaniny jest początkowo intensywnie fioletowe, przy końcu pomiaru zaczyna jaśnieć i nagle zmienia barwę na zieloną. W tym momencie naciskamy znowu stoper — pomiar jest skończony. Czas reakcji powinien wynosić od 110 do 130 sek. Jeśli był krótszy, należy do roztworu 2 dodać 1 do 2 ml 0,02 N roztworu Na_2CO_3 lub więcej. Jeśli przebiega zbyt powoli (nie zdarza się przy właściwie przyrządzonych roztworach), można dodać kroplami 0,1 N HCl.

Próbę z krwią przeprowadzamy w sposób następujący. Krew pobieramy z opuszki palca jak na krwinki czerwone z tym, że rozcieńczamy nie płynem Hayema, lecz destylowaną wodą wolną od CO_2. Następnie do probówki dajemy 1 ml roztworu nr 1 i kroplę zhemolizowanej krwi z mieszalnika z opisanymi poprzednio ostrożnościami, by nie zwilżyć ścian probówki nad roztworem. Następnie wprowadzamy do probówki parafinę i roztwór nr 2 w opisany poprzednio sposób. Dalszy przebieg oznaczenia jak poprzednio.

Miarą aktywności anhydrazy węglanowej jest stosunek czasu reakcji z krwią do czasu reakcji próby kontrolnej (bez krwi), mierzymy ją w jednostkach (E):

$$E = \frac{\text{czas próby kontrolnej} - \text{czas reakcji z krwią}}{\text{czas reakcji z krwią}}$$

Prócz tego w praktyce stosuje się wskaźnik anhydrazy węglanowej ($Ix_{anh.}$), który oblicza się ze wzoru:

$$Ix_{anh.} = 2\,000\,000 \cdot \frac{\text{ilość anhydrazy w jedn. (E) badanego}}{\text{ilość erytrocyt. w 1 mm}^3\text{ krwi bad.}}$$

Wzór ten wyprowadzony został z następującego stosunku:

$$Ix_{anh.} = \frac{\dfrac{\text{ilość anhydrazy w jednostkach (E) badanego}}{2{,}5}}{\dfrac{\text{ilość erytrocytów w 1 mm}^3\text{ krwi badanego}}{5\,000\,000}}$$

2,5 — przeciętna, fizjologiczna zawartość anhydrazy w jedn. (E),
5 000 000 — przeciętna, fizjologiczna ilość erytrocytów w 1 mm^3 krwi.

Ażeby uzyskać jak największą dokładność należy pilnie przestrzegać warunków temperatury, nabierać ten sam roztwór tą samą pipetą zarówno do próby kontrolnej jak i przy oznaczaniu próby z krwią, nie mieszać zbyt gwałtownie, by nie wprowadzać kropelek roztworu do parafiny (gwałtowne zresztą mieszanie utrudnia sama parafina).

Błąd próby kontrolnej wynosi 6,5% (przy 15 pomiarach $\sigma = \pm 3{,}24$), a błąd próby z krwią 14,5% (przy 13 pomiarach $\sigma = \pm 0{,}36$).

Б. Пекарски

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРБОАНГИДРАЗЫ В КРОВИ

Резюме

Автор излагает модификацию метода определения карбоангидразы в крови на фоне работ Кребса и Ченикаевой. Этот метод основывается на определении скорости

смены pH стандартного раствора в связи с гидратацией определенного количества CO_2 в присутствии фермента. Определение проводится в серологических пробирках. Растворы от воздуха охроняют теклым парафином. Допускаемая ошибка в методе 14,5 %.

B. Piekarski

THE MODIFICATION OF THE METHOD OF DETERMINATION THE CARBOANHYDRASE ACTIVITY OF RED CELL

Summary

Author presents the own modification of the method of determination the carboanhydrase activity of red cell. This method is based on the method of Krebs and Czenykajewa which determines the velocity of pH change of standart solution in the course of hydration of carbon dioxide in the presence of this enzym. One executes the determination in serological tubes in which the solutions are isolated from the air by liquide paraphine. The method's error is 14,5%.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bałachowski S., Bałachowski J.:* Metody chimiczeskogo analiza krowi. Med. G. Iz. 1953, 639.
2. *Abderhalden R.:* Klinische Enzymologie. Georg Thiene Verlag. Stuttgart 1958, 152
3. *Keller H.:* Zschr. f. Vit. Horm. Vorsch. 1957, 9, 297.
4. *Keller H.:* Hoppe Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 1955, 299, 104.
5. *Keller H.:* Hoppe Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 1955, 299, 85.
6. *Keller H.:* Klin. Wschr. 1953, 31, 617.
7. *Keller H.:* Naturwiss. 1952, 39, 109.
8. *Krebs H. A.:* Biochem. J. 1948, 43, 525.
9. *Krebs H. A., Roughton F. J. W.:* Biochem. J. 1948, 43, 550.
10. *Miller W. H., Dessert A. M., Roblin R. O.:* J. Amer. Chem. Soc. 1950, 72, 4895.
11. *Zipf H. F., Keller H.:* Arch. Exper. Pharm. 1952, 214, 242.
12. *Szot Z.:* Acta Biochim. Pol. 1952, 2, 135.

Otrzymano: 9. V. 1960 r.

Adres autora: Zabrze-Rokitnica, ul. Karola Marksa 19, Śląska A. M., II Klinika Chorób Wewnętrznych.