

## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 577.15.08

Б.Ю. Альтшуллер

### МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФУРИЛАКРИЛОИЛФЕНИЛАЛАНИЛГЛИЦИЛГЛИЦИНА ДЛЯ ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

Б.Ю. АЛЬТШУЛЕР

Городская клиническая больница №29 им. Н.Э. Баумана, 111020, Москва,  
Госпитальная площадь, д.2, тел: (095) 263-06-47, факс (095) 263-26-30.

Проанализированы различные аспекты фотометрического определения активности ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) сыворотки крови с использованием синтетического хромогенного субстрата фурилакрилоилфенилаланилглицилглицина (ФАПГГ). Исследованы спектральные особенности ФАПГГ. Установлено, что при любых рабочих концентрациях субстрата закон Бугера-Ламберта-Бэра не выполняется. Обнаружено, что расширение спектральной полосы пропускания сопровождается линеаризацией графика зависимости абсорбции от концентрации раствора ФАПГГ. В этих условиях, скорость изменения оптической плотности реакционной среды сильно зависит от особенностей оптической системы анализатора. В результате наблюдается многократная межприборная вариация. Это затрудняет стандартизацию метода и делает целесообразным использование аттестованных калибраторов. Показано, что линейная зависимость между сигналом фотопреобразователя и активностью АПФ теоретически достигается при концентрации ФАПГГ  $1,0 \pm 0,2$  мМ. Для устранения интерферирующих влияний рекомендуется использование синтетических ингибиторов АПФ.

**Ключевые слова:** ангиотензинпревращающий фермент, фотометрия, определение, метод, фурилакрилоил-фенилаланилглицилглицин, активность.

**ВВЕДЕНИЕ.** Для определения АПФ предложены радиоиммунные, хроматографические, иммуноферментные и флуориметрические методы [1-5].

Будучи высоко чувствительными, эти методы остаются малодоступными для большинства клинико-диагностических лабораторий из-за отсутствия необходимой приборной базы. Наибольший практический интерес вызывают спектрофотометрические методы, некоторые из которых осуществимы при наличии простейшей фотометрической аппаратуры [1,2]. В их основе лежит взаимодействие АПФ с синтетическими хромогенными субстратами, обладающими определенными спектральными характеристиками. Наиболее перспективным синтетическим субстратом для спектрофотометрического определения активности АПФ представляется фурилакрилоил-фенилаланилглицилглицин (ФАПГТ) [1,2,6-9]. АПФ расщепляет ФАПГТ до фурилакрилоилфенилаланина и глицилглицина, что сопровождается уменьшением оптической плотности реакционной среды. Впервые этот субстрат был предложен Holmquist et al. в 1979 году [7].

Несмотря на кажущуюся изученность вопроса, обращает на себя внимание практически полное отсутствие публикаций, посвященных технологии использования ФАПГТ для лабораторного определения активности АПФ. До настоящего времени, в рамках Международной федерацией клинической химии (IFCC) или аналогичных национальных ассоциаций не выработано общепринятой унификации спектрофотометрического метода определения активности этого фермента.

**МЕТОДИКА.** *Квалификация реактивов.* В работе использованы фурилакрилоил-фенилаланилглицилглицин, трис(гидроксиметил)-аминометан, хлорид натрия, каптоприл производства SIGMA, (США); концентрированная соляная кислота (Реахим, Россия). Субстрат растворяли в 50 мМ трис-НСl буфере (рН 8,1-8,3), содержащем 300 мМ NaCl [1,2]. После добавления азида натрия (конечная концентрация 0,01 %) раствор ФАПГТ сохранял стабильность при 4-8° С более 2-х месяцев. Активность АПФ определялась в сыворотке крови здоровых людей и пациентов различных отделений ГКБ №29.

*Оборудование.* Для изучения ферментативной реакции и оптических характеристик растворов использованы биохимические дискретные автоанализаторы карусельного типа COBAS MIRA PLUS и COBAS MIRA E (длина оптического пути 0,6 см; ширина спектральной полосы пропускания  $20 \pm 2$  нм.; точность установки максимума эффективной полосы пропускания спектральной полосы пропускания  $\pm 3$  нм.) производства фирмы Hofmann La Roche (Швейцария), проточный биохимический автоанализатор AVTOLAB (длина оптического пути 1,0 см; ширина спектральной полосы пропускания  $10 \pm 2$  нм.; точность установки максимума эффективной полосы пропускания  $\pm 3$  нм.) производства Boehringer Mannheim GmbH (ФРГ) и отечественный спектрофотометр СФ-46 (длина оптического пути 1,0 см; ширина спектральной полосы пропускания от 1,0 до 6,5 нм.; точность установки максимума эффективной полосы пропускания  $\pm 0,5$  нм.).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Наиболее важные особенности субстрата связаны с его спектральной характеристикой. Максимум поглощения раствора ФАПГТ в трис-НСl буфере с рН 8,1-8,3 при температуре 20-37°С регистрируется на длине волны 307 нм (рис. 1). Спектральная характеристика

растворов ФАПГГ отличается выраженной зависимостью оптической плотности от длины волны. В этих условиях, отсутствие монохромности проходящего через фотометрическую кювету светового потока, приводит к тому, что калибровочная зависимость сигнала фотопреобразователя от концентрации хромогена имеет нелинейный характер [10]. Чем больше относительное изменение экстинкции раствора в диапазоне спектральной полосы пропускания фотометра, тем более нелинейной становится эта зависимость. Степень нелинейности зависит от ширины и расположения максимума эффективной полосы пропускания светофильтра. Тем не менее, калибровочный график, связывающий концентрацию с оптической плотностью раствора ФАПГГ, демонстрирует обратную зависимость от ширины спектральной полосы пропускания светофильтра. Максимальная нелинейность

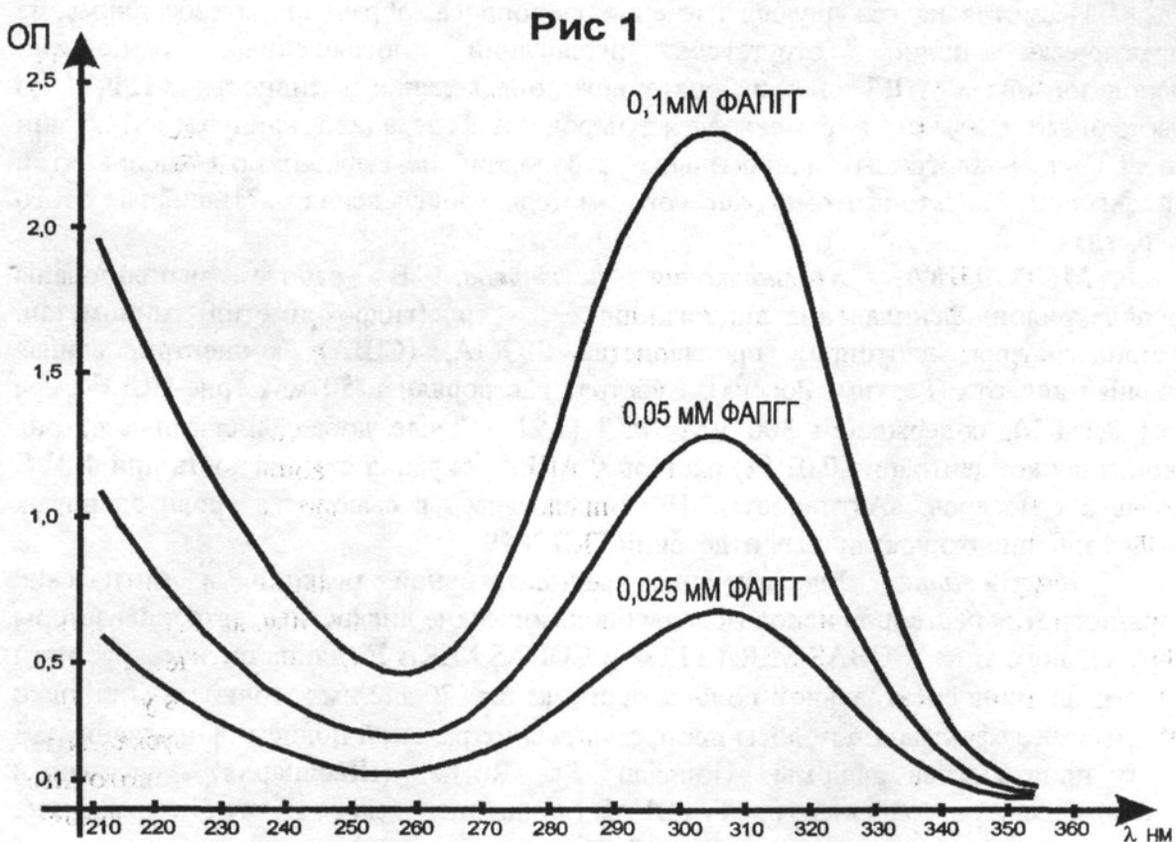


Рисунок 1  
Спектральная характеристика раствора ФАПГГ в трис буфере, рН 8,3; при 25 °С; длина оптического пути 1,0 см., спектрофотометр "СФ-46". Контроль — буферный раствор.

отмечается при спектральной полосе пропускания в 1 нм (рис. 2). Последнее объясняется тем, что, при некоторой концентрации, для любого хромогена, в соответствие с законом Бугера-Ламберта-Бэра, калибровочный график становится нелинейным. Потеря линейности наступает уже при относительно низких концентрациях ФАПГГ (выше 0,025 мМ), которые не имеют практического значения

для лабораторного определения активности АПФ в сыворотке крови. Возможно, что это явление связано с полимеризацией субстрата при увеличении его концентрации. В отсутствие монохромности проходящего через фотометрическую кювету светового потока происходит линейаризация калибровочной зависимости. Поэтому для растворов ФАПГГ расширение спектральной полосы пропускания сопровождается уменьшением нелинейности калибровочного графика.

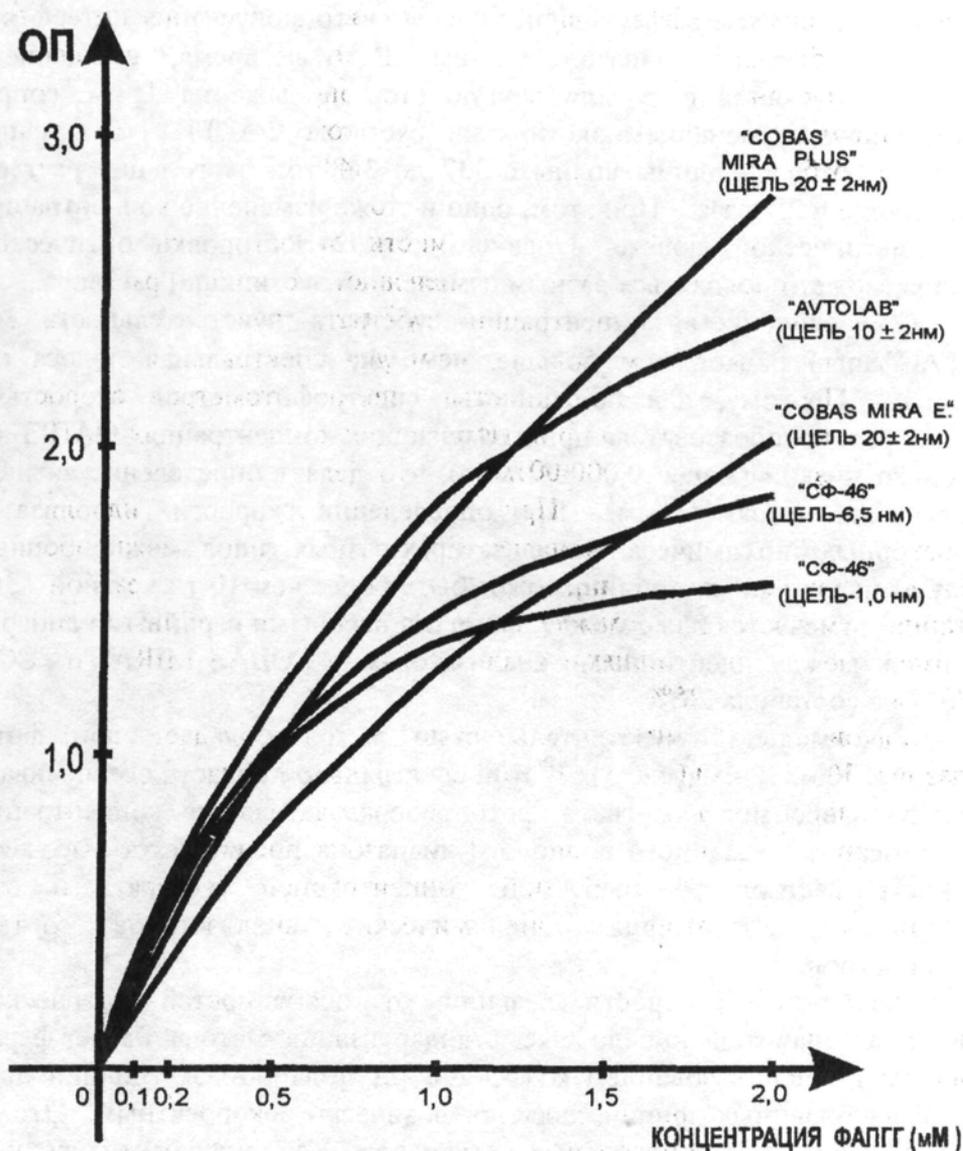


Рисунок 2

Зависимость оптической плотности раствора при 340 нм от концентрации ФАПГГ при различной ширине спектральной полосы пропускания. Длина оптического пути 1,0 см.; Контроль — буферный раствор. Измерения проводили при 37°C.

Большинство используемых лабораторных фотометров и биохимических анализаторов снабжены интерференционными фильтрами с минимальной рабочей длиной волны 340 нм. Проходящий через них световой поток не является монохроматичным. Ширина спектральной полосы пропускания у таких фильтров чаще всего составляет 10–20 нм. Некоторые биохимические анализаторы снабжены встроенными спектрофотометрами, монохроматоры которых формируют более узкую спектральную полосу пропускания. Как правило, точность заводской установки максимума эффективной полосы светопропускания интерференционного фильтра колеблется в диапазоне  $\pm 3$  нм. В то же время, смещение максимума полосы пропускания в ту или другую сторону даже на 1 нм. сопровождается существенным изменением экстинкции раствора ФАПГТ. Так, например, при изменении рабочей длины волны с 337 до 343 нм. экстинкция раствора ФАПГТ уменьшается в 2,7 раза. При этом, одно и то же изменение концентрации субстрата в фотометрической кювете, в зависимости от юстировки оптической системы прибора, может проявляться разным изменением экстинкции раствора.

С увеличением концентрации субстрата чувствительность метода (т.е.  $\Delta\text{ОП}/\Delta\text{СфАПГТ}$ ) падает, тем больше, чем уже спектральная полоса пропускания прибора. Поэтому, для большинства спектрофотометров скорость изменения сигнала фотопреобразователя при насыщающих концентрациях ФАПГТ оказывается настолько низкой (менее 0,000001/мин), что делает определение активности АПФ практически, невозможным. При определении скорости гидролиза ФАПГТ на лабораторных биохимических анализаторах разных типов, межприборная вариация, в силу вышеуказанных причин, может быть более чем 10-ти кратной. Значительная вариация, отмечается даже между двумя одинаковыми серийными аппаратами. Так, например, между идентичными анализаторами "COBAS MIRA" и "COBAS MIRA PLUS" она составила 25%.

Максимальной чувствительностью метод обладает при фотометрии в диапазоне 300–330 нм (рис. 3). В этой спектральной области обеспечивается и более линейная зависимость сигнала фотопреобразователя от концентрации ФАПГТ. Использованию указанного волнового диапазона препятствует высокая оптическая плотность раствора с требуемой концентрацией субстрата и отсутствие у большинства лабораторных биохимических анализаторов соответствующих светофильтров.

Зависимость скорости реакции от особенностей оптической системы анализатора значительно осложняет стандартизацию метода. Расчет ферментативной активности с использованием коэффициента молярной экстинкции для ФАПГТ, в силу вышеуказанных причин, является физически некорректным. Это затрудняет и создание каких-либо контрольных материалов. Кардинальным решением проблемы стало бы применение аттестованного калибратора с известной ферментативной активностью.

Нельзя исключить, что в процессе инкубации реакционной среды гидролиз ФАПГТ может происходить не только под действием АПФ, но и под влиянием других компонентов сыворотки крови. Необходимо также учитывать вклад в

суммарное изменение экстинкции оптических свойств самой сыворотки. Известно, что содержащиеся в ней крупномолекулярные белки, липопротеины, криопреципитаты, IgM и циркулирующие иммунные комплексы могут вызывать значительное светорассеяние. Все эти факторы особенно важны потому, что доля образца в объеме реакционной среды должна составлять 10-20%, а концентрация общего белка 6-18 г/л [11].

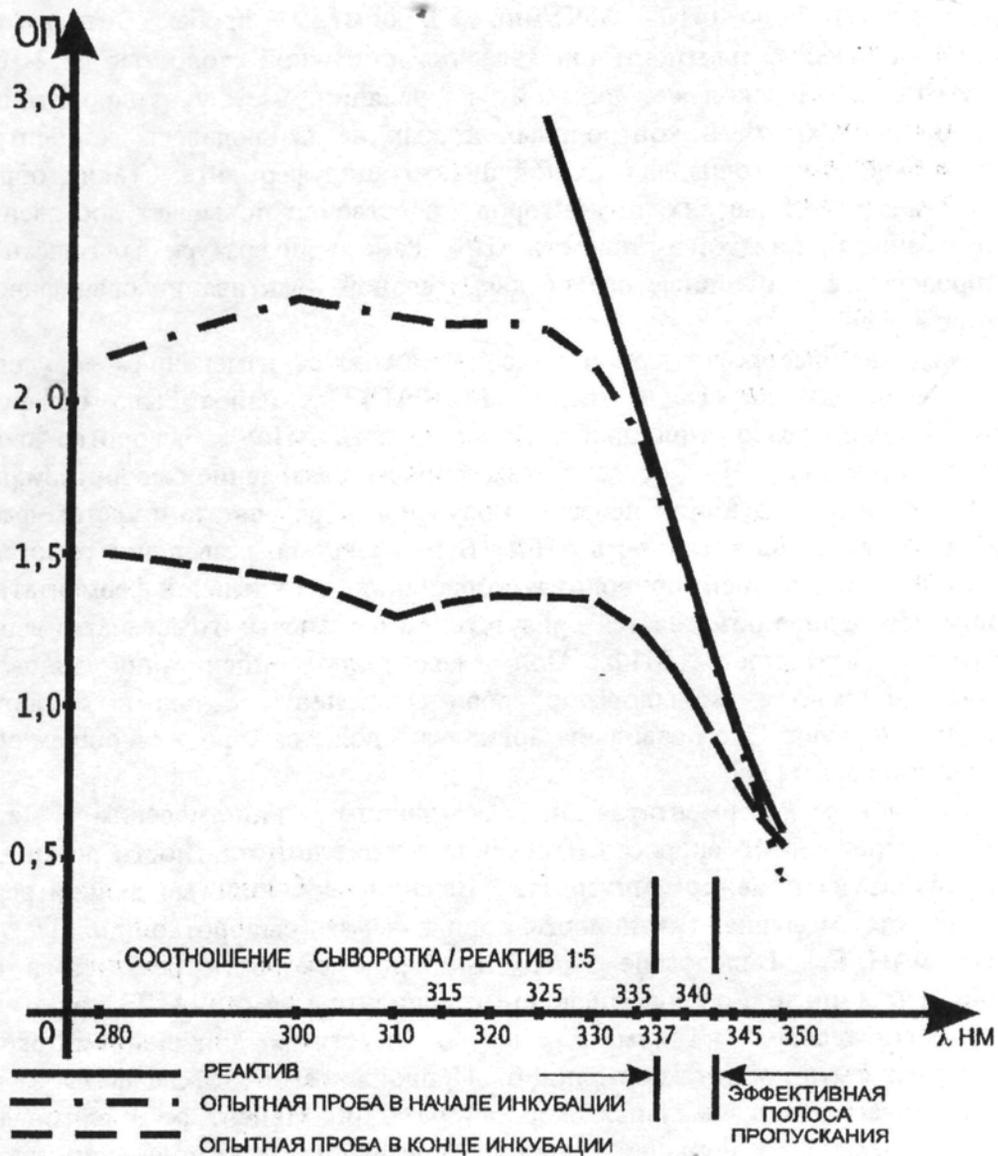


Рисунок 3

Изменение спектральной характеристики опытной пробы в процессе 12-ти часовой инкубации. Начальная концентрация ФАПГТ — 1,0 мМ; рН 8,3; длина оптического пути 1,0 см., спектрофотометр "СФ-46". Контроль опытной пробы — раствор сыворотки в буфере при соотношении 1:5. Измерения проводили при 25 °С.

Чтобы избежать интерференции, активность АПФ ингибировали 1 мкМ раствором специфического ингибитора каптоприла ( $K_i=4 \cdot 10^{-8}$  М) в инкубационном буфере. Для контроля каждая сыворотка в той же пропорции смешивалась с буферным раствором не содержащим каптоприла. После часовой инкубации проб при комнатной температуре, их гидролитическая активность измерялась с насыщающей концентрацией ФАПТГ. В контрольных пробах скорость реакции составляла от  $7 \cdot 10^{-4}$  до  $6 \cdot 10^{-3}$  ΔОП/мин.\* В опытных пробах, в присутствии каптоприла, оптическая плотность снижалась с остаточной скоростью от  $2 \cdot 10^{-4}$  до  $5 \cdot 10^{-4}$  ΔОП/мин. Поскольку никакой корреляции между гидролитической активностью в опытных и контрольных пробах не наблюдалось, концентрация каптоприла была достаточна для полной инактивации фермента. Таким образом, использование специфических ингибиторов существенно повышает достоверность метода, особенно при низкой активности АПФ. Ранее в литературе был описан иной метод определения АПФ после его предварительной инактивации специфическим ингибитором [12].

Разведение сыворотки крови не сопровождается изменением ее удельной гидролитической активности в отношении ФАПТГ. Ранее было обнаружено различное влияние разведения пробы на активность АПФ в сыворотке крови и тканевых гомогенатах [13]. Согласно этим данным, разведение сыворотки крови в 20, 50, 100 раз и последующий пересчет полученного результата с учетом фактора разведения не влияет на активность АПФ. В то же время, разведение гомогенатов различных органов и тканей приводит к возрастанию их удельной ферментативной активности. Последнее объясняется присутствием в тканевых гомогенатах веществ, ингибирующих активность АПФ. При разведении концентрация эндогенных ингибиторов снижается. В сыворотке крови компоненты с такими свойствами, очевидно, отсутствуют. Это позволяет варьировать долю сыворотки в общем объеме инкубационной среды [11].

Определение ферментативной активности кинетическим методом предполагает постоянную скорость изменения оптической плотности реакционной среды в расчетном временном интервале. Важной особенностью данной реакции является низкая молярная активность, проявляемая сывороткой *in vitro* при гидролизе ФАПТГ. Вследствие этого, изменение скорости реакции за время инкубации, в том числе и с ненасыщающими концентрациями ФАПТГ, оказывается крайне незначительным. Таким образом, с известным допущением, скорость реакции, может быть принята постоянной. Продолжительность лаг-фазы, за время которой развивается максимальная скорость реакции, зависит от анализируемого образца и, в несколько меньшей степени, определяется соотношением пробы и реактива. На графике абсорбция/время кинетическая кривая асимптотически приближается к прямой, построенной по измеренным точкам методом наименьших квадратов. Угол наклона этой прямой отражает ферментативную активность образца и зависит как от начальной концентрации субстрата в рабочем реактиве, так и от особенностей оптической системы анализатора (рис. 4). Воспроизводимость результатов при этом определяется числом измерений оптической плотности среды

за время инкубации. Естественная вариация скорости гидролиза мала и при достаточно продолжительной инкубации не вносит существенной погрешности в общее (или рассчитанное за одну минуту) изменение экстинкции раствора. Использование многоточечной кинетики, по сравнению с методом "конечной точки" предпочтительно еще и потому, что при многократном измерении экстинкции в ходе инкубации эффект от случайной ошибки практически полностью нивелируется. Помимо этого, снимается проблема приращения абсорбции в "конечной точке" за счет эндогенных и экзогенных интерферентов.

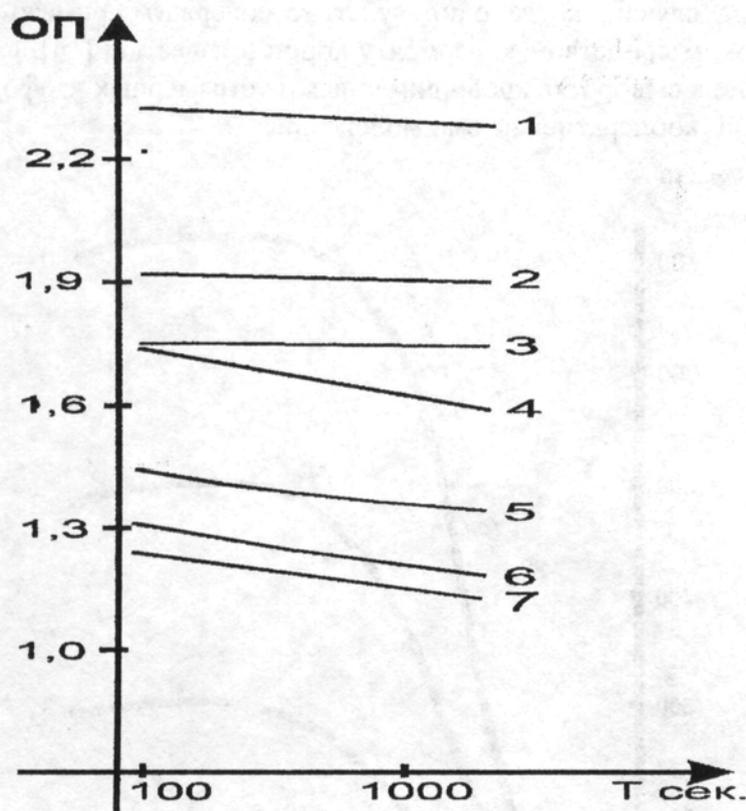


Рисунок 4

Кинетика оптической плотности реакционной смеси в процессе инкубации, 340 нм.; длина оптического пути 1,0 см.

Примечание: 1. AVTOLAB; 1,6 мМ ФАПГГ. 2. СФ-46; 1,6 мМ ФАПГГ; ширина спектральной полосы пропускания 6,5 нм. 3. СФ-46; 1,6 мМ ФАПГГ; ширина спектральной полосы пропускания 1,0 нм. 4. COBAS MIRA PLUS; 1,6 мМ ФАПГГ. 5. СФ-46; 0,71 мМ ФАПГГ; ширина спектральной полосы пропускания 1,0 нм. 6. COBAS MIRA PLUS; 1,0 мМ ФАПГГ. 7. "COBAS MIRA E"; 1,6 мМ ФАПГГ. Измерения проводили при 37 °С.

Реакционная кинетика исследовалась в инкубационных системах с начальными концентрациями ФАПГГ от 0,05 до 2,0 мМ. Графические зависимости начальной скорости гидролиза от концентрации ФАПГГ, полученные для различных образцов сыворотки, отличаются от стандартных гиперболических — и

характеризуются более сложной S-образной (сигмоидной) формой (рис. 5). Одно из возможных объяснений этого может заключаться в следующем. Поскольку из сыворотки крови предварительно не удалялись низкомолекулярные компоненты, в ней наверняка содержатся и различные эндогенные субстраты. *In vivo* АПФ катализирует протеолитическое расщепление ангиотензина, брадикинина и некоторых других пептидов. Поэтому, отклонение от гиперболической кинетики при низких концентрациях ФАПГТ может быть обусловлено конкуренцией последнего с эндогенными субстратами. Это тем более вероятно, что разведение сыворотки невелико. Такого рода случаи, когда один субстрат содержит примеси другого субстрата с более высоким сродством к ферменту хорошо известны [14]. В то же время, учитывая наличие в сыворотке крови димерных и тетрамерных изоформ АПФ [15], могут иметь место и кооперативные взаимодействия.

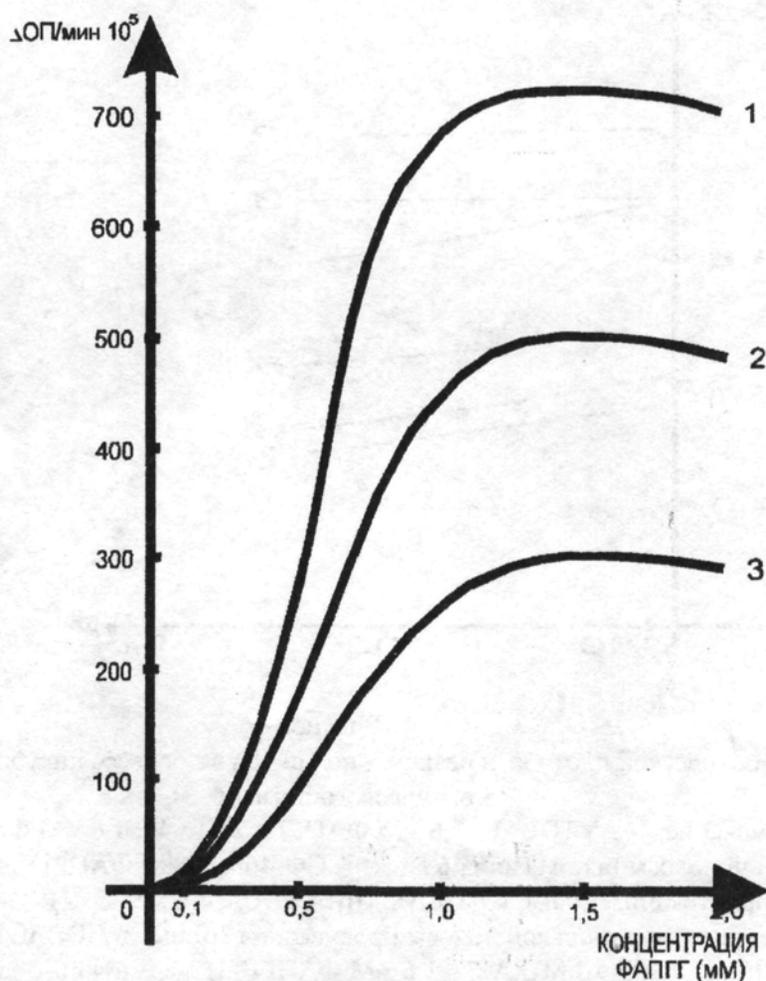


Рисунок 5

Зависимость начальной скорости гидролиза от концентрации ФАПГТ в реакционной смеси для трех различных образцов сыворотки крови.

Примечание: Длина оптического пути 0,6 см., длина волны считывания  $340 \pm 3$  нм., ширина спектральной полосы пропускания  $20 \pm 2$  нм., pH 8,3; COBAS MIRA PLUS. Измерения проводили при 37°C.

Максимальная скорость реакции достигается при концентрации ФАПГТ  $1,4 \pm 0,2$  мМ. При более высокой концентрации субстрата интенсивность гидролиза несколько снижается, что, очевидно, обусловлено субстратным ингибированием. Константа Михаэлиса составляет  $0,35 \pm 0,05$  мМ. Значения минимальной насыщающей концентрации субстрата и  $K_m$  могут несколько варьировать, в зависимости от соотношения изоформ АПФ, вида буфера и присутствия в реакционной среде регуляторов ферментативной активности [16,17]. Сходные данные ( $K_m = 0,30 \pm 0,03$  мМ.) были получены и другими исследователями [18].

Важнейшим условием определения ферментативной активности, является соблюдение прямой пропорциональности между количеством фермента и изменением экстинкции реакционной среды в единицу времени. Математический характер подобной зависимости изучался при различных концентрациях субстрата от 0,05 до 2,0 мМ. Будучи представленной в графической форме, она линеаризуется при концентрации ФАПГТ  $1,0 \pm 0,2$  мМ. Увеличение концентрации субстрата с 1,0 до 2,0 мМ отражается только незначительным изменением угла наклона но не формы графика. График строился по 8-и точкам с использованием методов линейной регрессии, экспотенциального и лог-логарифмического анализа [19].

Методом линейной регрессии:

$$R_0 = ([ \sum (E(n)^2) \cdot \sum (R(n)) ] - [ \sum (E(n) \cdot R(n)) \cdot \sum (E(n)) ]) : ([ \sum (E(n)^2) \cdot N ] - [ \sum E(n) ]^2)$$

при условии, что:

$$F = ([ \sum (E(n)) \cdot \sum (R(n)) ] - [ \sum (E(n) \cdot R(n)) \cdot N ]) : ([ \sum (E(n)) ]^2 - [ \sum (E(n)^2) \cdot N ]^2)$$

Методом LOGIT/LOG:

$$R(n) = R_0 + K_c : (1 + \exp [ - ( a + b \cdot \ln E(n) + c \cdot E(n) ) ])$$

Экспотенциальным методом:

$$R(n) = R_0 + D \cdot \exp ( a \cdot \ln E(n) + b \cdot (\ln E(n))^2 + c \cdot (\ln E(n))^3 ),$$

где:

**F** — теоретический фактор в методе линейной регрессии;

**R** — средняя скорость гидролиза за время инкубации, рассчитанная методом наименьших квадратов;

**R<sub>0</sub>** — теоретическая расчетная скорость гидролиза при отсутствии АПФ в образце;

**K<sub>c</sub>** — теоретическая разница в скорости реакции между образцом с бесконечно большим содержанием АПФ и **R<sub>0</sub>**;

**D** — эмпирический элемент в экспотенциальной модели расчета;

**a, b, c** — переменные параметры, детерминирующие нелинейный характер математической функции;

**E(n)** — количество АПФ в определенном образце;

**R(n)** — скорость ферментативного гидролиза полученная с определенным образцом;

**N** — номер определенного образца;

Соответствие всех этих теоретических моделей экспериментальным результатам оценивалось в процентах ошибки между действительным и расчетным количеством АПФ для каждой точки графика (рис. 6, таблица). Объективным критерием линеаризации было такое приближение графика линейной регрессии к истинным значениям, при котором процент ошибки в каждой точке оказывался сопоставим с процентом ошибки для нелинейных графических моделей, не превышая достижимой аналитической вариации метода. Процент ошибки рассчитывался по формуле [19]:

$$\% \text{ ошибки} = (E(n) \text{ теоретич.} - E(n)) : (E(n) \text{ max.} - E(n) \text{ min.}) \cdot 100, \text{ где:}$$

$E(n) \text{ теоретич.}$  — количество АПФ в образце (с 1-го по 8-й), рассчитанное по построенному графику;

$E(n)$  — действительное количество АПФ в образце (с 1-го по 8-й);

$E(n) \text{ min.}$  — количество АПФ в образце с минимальным содержанием фермента;

$E(n) \text{ max.}$  — количество АПФ в образце с максимальным содержанием фермента;

*Таблица.* Процент ошибки между действительным количеством АПФ и рассчитанным по методу линейной регрессии при различной концентрации ФАПТГ в реакционной среде.

Количество АПФ (в %)	КОНЦЕНТРАЦИЯ ФАПТГ (мМ)						
	0,2	0,3	0,5	0,7	1,0	1,5	2,0
10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	-6,36	-4,87	-2,64	-1,22	+0,17	-0,58	-0,65
20	-7,22	-2,64	-1,56	-1,12	-0,85	+0,65	-0,79
25	+9,53	+3,59	-1,71	+0,89	+0,42	+1,56	+1,30
33	+12,78	+9,32	+2,88	+1,82	+1,54	-1,35	+1,24
50	+19,67	+11,13	+6,29	+3,94	+1,78	+0,46	+1,47
67	+11,13	+5,38	+3,25	+2,12	-0,18	+1,06	-2,21
100	-18,94	-10,33	-4,87	-2,78	-1,09	-0,82	0,00

По результатам работы можно сформулировать следующие методические рекомендации:

1) Опытная проба должна анализироваться двукратно - первый раз с основным рабочим реактивом (ФАПТГ в буферном растворе), а второй - с раствором каптоприла в рабочем реактиве того же состава. Разница скоростей первой и второй реакций, выраженная в ДОП/мин, используется для расчета активности АПФ. Инкубация образца с раствором каптоприла в рабочем реактиве одновременно выполняет функцию индивидуальной холостой пробы. Холостая проба самого реактива не нужна, поскольку ее изменения в первой и второй реакции однонаправленны и практически одинаковы.

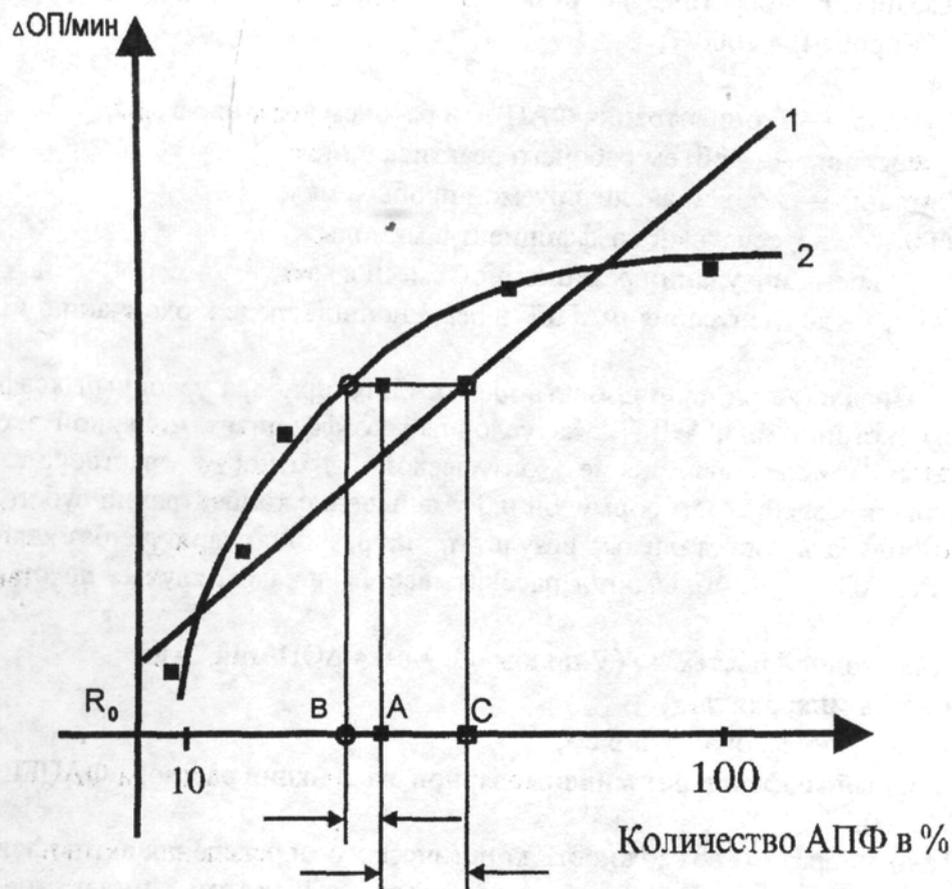


Рисунок 6

Зависимость скорости ферментативного гидролиза от количества АПФ.

Примечание: 1 — график, построенный методом линейной регрессии; 2 — график, построенный с использованием нелинейных методов математического анализа.

Точка А — истинное количество АПФ в образце; В — количество АПФ в образце, рассчитанное по нелинейной модели; С — количество АПФ в образце, рассчитанное методом линейной регрессии.

2) Оптимальное соотношение проба/реактив от 1:5 до 1:10, время инкубации, за которое рассчитывается  $\Delta OP/\text{мин}$  от 10 до 20 минут, лаг-фаза 1-2 минуты.

3) Предельная допустимая концентрация ФАПГ в фотометрической кювете — 1,6 мМ. Концентрация ФАПГ в реакционной среде к окончанию инкубации — не менее 1,0 мМ. Поскольку желательно чтобы скорость гидролиза была максимально близка к постоянной, изменение концентрации ФАПГ в реакционной среде за время инкубации не должно превышать 0,3 мМ. Наибольшая ферментативная активность, которая может быть измерена при этих ограничениях, определяется соотношением проба/реактив, временем инкубации и рассчитывается в мкмоль/мин/л по формуле:

$$\left( \frac{C_{\text{ФАПГ}} \cdot V_{\text{реактива}}}{V_{\text{реактива}} + V_{\text{пробы}}} - C_{\text{min}} \right) \cdot \left( \frac{V_{\text{реактива}} + V_{\text{пробы}}}{V_{\text{пробы}}} \right) \cdot 1000/T,$$

где:

**C<sub>ФАПГ</sub>** — концентрация ФАПГ в рабочем реактиве в мМ;

**V<sub>реактива</sub>** — объем рабочего реактива в мкл;

**V<sub>пробы</sub>** — объем анализируемой пробы в мкл;

**1000** — пересчетный коэффициент в мкмоль;

**T** — время инкубации реакционной смеси в мин;

**C<sub>min</sub>** — концентрация ФАПГ в реакционной среде к окончанию инкубации в мМ.

4) Предлагается использовать для каждого прибора условный коэффициент молярной экстинкции ФАПГ. За условный коэффициент молярной экстинкции принимается такое изменение оптической плотности раствора, которое сопровождается разрешенное формулой п.3 уменьшение концентрации субстрата. Это позволит получать сопоставимые результаты на разной аппаратуре без калибратора. Активность АПФ в мкмоль/мин/л рассчитывается, в таком случае, по стандартной формуле:

$$A = (V_{\text{реакционной системы}} : (V_{\text{пробы}} \cdot L \cdot \epsilon)) \cdot \Delta \text{ОП/мин, где:}$$

**V** — объем в микролитрах;

**L** — длина оптического пути в см;

**ε** — условный коэффициент миллимолярной экстинкции раствора ФАПГ на длине волны 340 нм.

Таким образом возможность кинетического определения активности АПФ в условиях неполного насыщения фермента субстратом имеет не только теоретическое, но и большое практическое значение, поскольку создание насыщающих концентраций ФАПГ в значительной степени затрудняется техническими характеристиками многих лабораторных фотометров. Помимо этого, очень высокая абсорбция реакционной среды может снижать точность и воспроизводимость фотометрического определения.

Современные биохимические анализаторы с высокой разрешающей способностью фотопреобразователя и/или уменьшенной длиной оптического пути, позволяют создавать насыщающие концентрации ФАПГ в реакционной среде. Проведение гидролиза при насыщающей концентрации ФАПГ возможно с использованием любого лабораторного фотометра, который обеспечивает линейность сигнала фотопреобразователя в диапазоне  $\pm 2,5$  ОП, имеет ширину спектральной полосы пропускания светофильтра не менее 10, но не более 25 нм, точность установки рабочей длины волны 340 нм не ниже 3 нм и длину оптического пути фотометрической кюветы не свыше 10 мм.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Голиков П.П., Николаева Н.Ю. (1993) Пат. физиол. exper. тер., №1, 28-31.
2. Голиков П.П., Николаева Н.Ю. (1998) Клин. лаб. диагностика, №1, 11-13.
3. Павлихина Л. В., Елисеева Ю.Е., Позднев В.Ф., Орехович В.Н. (1975) Вопр. мед. химии, 21, №1, 54-60.
4. Павлихина Л. В., Елисеева Ю.Е., Позднев В.Ф., Орехович В.Н. (1977) В кн. Современные методы в биохимии., М., с. 147-151.
5. Черкасова О.П., Федоров В.И. (1989) Лаб. дело, № 7, 72-74.
6. Tietz N.W., Pruden E.L., McPherson R.A., Fuhrman S.A. (1997) Clinical guide to laboratory tests. Third edition, 32-33.
7. Holmquist B., Biinning P., Riordan J.F. (1979) Anal. Biochem., 95, 540-548.
8. Maquire G.A. (1985) Ann. Clin. Biochem., 22, 204-210.
9. Roulston J., Allan D. (1987) Clin. chim. Acta., 168, 187-198.
10. Захаров К.А., Ованесов Е.Н., Сецко И.В. и НПП Техномедика (1998) Лаб. медицина, №1, 28-32.
11. Brice E.W., Friedlander W., Baternan E.D., Kirsh R.E. (1995) Chest, 107, 706-710.
12. Yang Y., Macdonald G.J. (1998) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 25(7-8), 637-639.
13. Koiter J., Navis G., de-Jong P.E., van-Gilst W.H., de-Zeeuw D. (1998) J. Pharmacol-Toxicol-Methods. Feb; 39(1), 45-49.
14. Диксон М, Уэбб Э. (1982) Ферменты, т.1, 415-416.
15. Гринштейн С.В., Никольская И.И., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Кост О.А. (1999) Биохимия, 64, 686-696.
16. Данилов С.М. (1994) Структурно-функциональный анализ ангиотензин-превращающего фермента с помощью моноклональных антител. Автореферат докт. дисс. в форме научного доклада. Москва.
17. Елисеева Ю.Е. (1994) Свойства и регуляторные функции карбоксикатепсина. Автореферат докт. дисс., Москва.
18. Faure-Delanef L., Baudin B., Beneteau-Burnat B., Beaudoin J.C., Giboudeau J., Cohen D. (1998) Clin. Chem., Oct; 44(10), 2083-2087.
19. Roche Diagnostic Systems (1994) COBAS MIRA operator's manual, First Edition, March, 7.22-7.34.

Поступила 5.04.00.

**METHODOLOGICAL ASPECTS OF THE EMPLOYMENT OF N-(3-[2-FURYL]ACRYLOYL)-PHE-GLY-GLY FOR PHOTOMETRIC ASSAY OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME ACTIVITY.**

**B.Y. ALTCHOUER**

Bauman Clinical Hospital №29, Hospital sq., 2, 111020, Moscow,  
tel: (095) 263-06-47, fax (095) 263-26-30.

Different aspects of photometric assay of angiotensin converting enzyme (ACE) with synthetic chromogenic substrate N-(3-[2-furyl]-acryloyl)-phe-gly-gly (FAPGG) were evaluated. At FAPGG concentration exceeding 0,025 mM the absorbance does not follow Burger-Lambert-Bar dependences. Under these conditions the rate of absorbance of the reaction medium strongly depends on properties of spectral weight band. This explains dramatic interanalyser variations and complicates standardization of the method. Linear dependence between photometric response and ACE activity. The employment of special inhibitor is recommended for elimination of interference.

**Key words:** angiotensin converting enzyme, photometric, assay, method, FAPGG, activity, analysis