

616.153[577.153.9.084]—074:355.41

STANOVENÍ AKTIVITY CHOLINESTERÁZY V LIDSKÉ KRVÍ — MOŽNÁ MODIFIKACE PRO POLNÍ POUŽITÍ

Npor. MUDr. Jiří BAJGAR

Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav JEP v Hradci Králové

Věnováno k 50. narozeninám plk. doc. MUDr. V. Vondráčka, CSc.

Toxický účinek organofosfátů (OF) je založen na jejich schopnosti inhibovat cholinesterázy v různých částech nervového systému. Z metabolického modelu intoxikace OF vyplývá (3), že koncentrace OF a tedy i stupeň inhibice cholinesteráz je nejvyšší v transportním systému — v krvi. Je pochopitelné, že inhibice je závislá na mnoha faktorech, především na typu použitého OF.

Z hlediska včasné diagnostiky otrav OF je velmi důležité znát stupeň inhibice cholinesteráz v krvi — a to v co nejkratší době po intoxikaci. Je známo, že v krvi jsou přítomny minimálně dva druhy cholinesteráz — acetylcholinesteráza (AChE, EC 3.1.1.7) v erythrocytech a butyrylcholinesteráza (BuChE, EC 3.1.1.8) v plazmě. Pro přesnější diagnostiku je nejlepší měřit v krvi aktivitu obou těchto enzymů, což předpokládá její centrifugaci a tím i časové ztráty. Je-li měřena aktivita cholinesteráz v celé krvi, výsledky nejsou zcela přesné, protože jde o společný účinek obou enzymů, jak AChE, tak BuChE. Přesto je však tento způsob výhodný, protože umožňuje zpracování materiálu bez předchozí centrifugace. Přitom je dostačujícím pro určení diagnózy otravy OF.

Metod pro stanovení cholinesteráz bylo popsáno mnoho. Je možno však říci, že nejrozšířenější jsou modifikace tří metod:

- kolorimetrické metody, které určují změnu zabarvení indikátoru při změně pH (20), nebo nerozštěpený substrát (10), popř. štěpné produkty reakce (13, 17);
- elektrometrické metody, založené na měření změny potenciálu, způsobené H^+ ionty kyseliny uvolňované při štěpení substrátu (14);
- manometrické metody, určující objem CO_2 uvolněného kyselinou (9, 21).

Kromě uvedených metod existuje řada dalších, založených na jiném principu, např. metody radiometrické (5), polarografické (8), fluorimetrické (16) a jiné.

V poslední době byly metody stanovení aktivity cholinesteráz obohaceny o modifikaci kolorimetrické metody za pomoci 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB, a jeho zbytek — 5-merkapt-2-nitrobenzoová kyselina — je fotometrován (1, 7, 11, 18, 19, 22). Výhodou této

metody je specifita reakce, jednoduchost provedení a vysoká citlivost.

V této práci je popsána mikromodifikace metody stanovení aktivity AChE v lidské krvi za použití DTNB.

Pokusná část

Použité chemikálie a roztoky

- 0,2 M TRIS-HCl pufr:
24,2 g 1,1,1-tris-(hydroxymethyl) aminomethan (Lachema Brno, ČSSR) se rozpustí v 1000,0 ml destilované vody. 50,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 38,4 ml 0,2 M HCl, doplní se destilovanou vodou na 200,0 ml a pH se upraví na 7,6.
- DTNB — činidlo na SH- skupiny:
0,1 g DTNB (Serva Heidelberg, NSR) se rozpustí v 50,0 ml 0,2 M TRIS pufru.
- Substrát:
0,029 g acetylthiocholin jodidu (Lachema Brno, ČSSR) se rozpustí v 10,0 ml destilované vody.
- Kalibrační roztok:
Vodný roztok cystein-HCl (Koch-Light Lab., Anglie) v koncentracích od 1×10^{-4} do 5×10^{-6} M.
- Vzorek pro měření:
Z prstu se mikropipetou odebere 5,0 μ l krve a hemolyzuje se přidáním 0,4 ml destilované vody. Tento hemolyzát je použit pro stanovení aktivity AChE.

Přístroje

Univerzální spektrofotometr Vitatron (Sci. Instr., Holandsko), skleněné kyvety (l = 0,999).

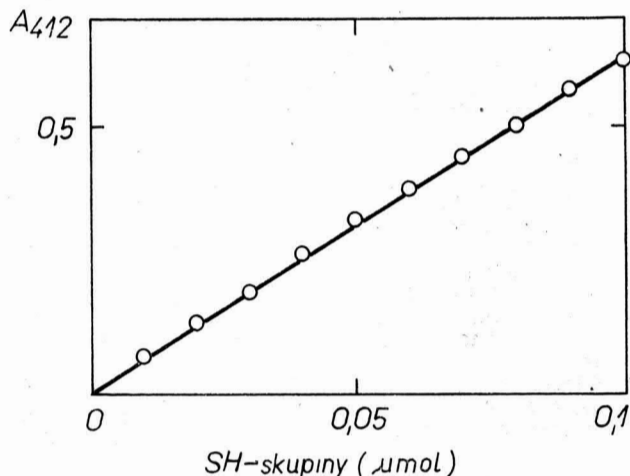
Pracovní postup

Do kyvety se k 0,2 ml hemolyzátu přidá 0,4 ml DTNB a 1,2 ml TRIS pufru. Reakce je zahájena přidáním 0,2 ml substrátu. Fotometruje se při 412 μ m a delta extinkce je registrována. Pro kalibraci se místo hemolyzátu do kyvety pipetuje roztok různých koncentrací cysteinu. Fotometruje se proti slepému vzorku, který je zpracován stejně, jen místo cysteinu je přidána destilovaná voda.

Výsledky

Kalibrační křivka

Na obr. 1 je vidět kalibrační křivku cysteinu.



Obr. 1
Kalibrační křivka pro odečet SH- skupin. Pro kalibraci byl použit cystein

Z hodnot extinkce je možno odečíst odpovídající množství SH- skupin v μ molech v reakční směsi.

Závislost hydrolýzy substrátu na pH

Jak spontánní, tak enzymatická hydrolýza substrátu je závislá na pH. Při pH 7, 6—7, 8 je dosaženo optima pro enzymatické štěpení acetylthiocholinu (obr. 2). Se zvyšujícím se pH však roste i neenzymatická hydrolýza acetylthiocholinu (obr. 3). Pro měření aktivity AChE bylo proto vybráno pH 7, 6, kdy je spontánní hydrolýza substrátu zanedbatelná.

Závislost aktivity AChE na ředění materiálu

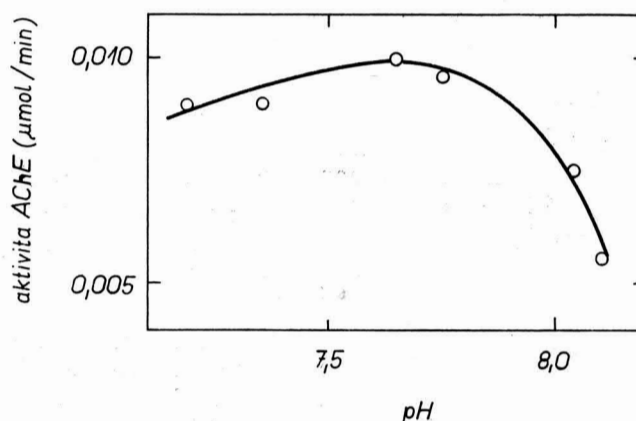
Aktivita AChE se zvyšuje se vzrůstem množství krve v reakční směsi (obr. 4). Závislost je lineární do 3 μ l krve, pak je intenzita zabarvení reakční směsi příliš vysoká, a není možné proto měřit.

Koncentrace substrátu

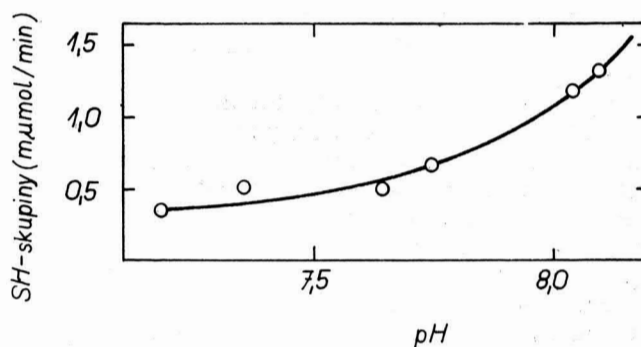
Závislost hydrolýzy acetylthiocholinu AChE lidské krve byla sledována více autory [11, 15, 18, 22]. Z jejich i z našich minulých výsledků vyplývá, že substrátové optimum se pohybuje kolem 2×10^{-3} M. Proto byla pro měření aktivity AChE vybrána výsledná koncentrace substrátu 1×10^{-3} M, kdy je rychlost štěpení dostatečně vysoká a inhibice nadbytkem substrátu nepřichází v úvahu.

Chyba stanovení

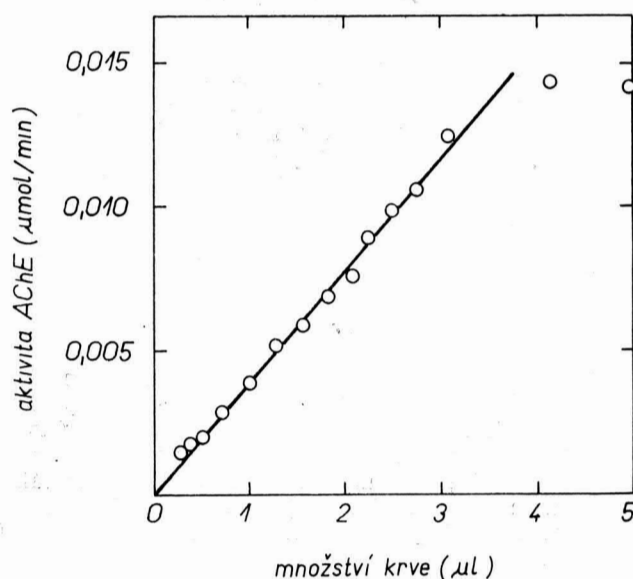
Vzorky od těchto jedinců byly měřeny v různé dny. Je možné konstatovat, že se aktivita AChE v průběhu 7 dní při skladování v lednici ($+4^\circ\text{C}$)



Obr. 2
pH optimum enzymatické hydrolýzy acetylthiocholinu acetylcholinesterázou lidské krve



Obr. 3
Spontánní hydrolýza acetylthiocholinu. Závislost na pH



Obr. 4
Závislost aktivity acetylcholinesterázy na množství krve v reakční směsi

neměnila. Relativní chyba stanovení z 12 měření byla $\pm 4,1\%$.

Normální aktivita

Normální aktivita AChE u 31 lidí obojího pohlaví (13 mužů a 18 žen) byla $4,52 \mu\text{molu/min./ml}$ celé krve, s mezemi spolehlivosti ($p=95\%$) $3,15\text{—}5,86$.

Diskuse

Popsaná metoda je modifikací klasické Ellmanovy metody [7] pro stanovení aktivity AChE. Její výhodou je rychlé provedení jak samotného měření, tak i přípravy materiálu — není nutná centrifugace krve. Citlivostí většinu všech metod v současné době používaných předčí (1) — např. kolorimetrická metoda na automatickém kolorimetru (Auto-Analyzer), kdy je detekována změna pH fenolčervení jako indikátorem podle Wintera [20], je asi 160krát méně citlivá, klasická metoda pH-metrická podle Michela [14] asi 40krát méně citlivá než metoda popsaná v této práci [1].

Vysoká citlivost metody dovoluje zaznamenat i minimální změny aktivity, popř. proměřit i materiál s velmi nízkou aktivitou AChE, jako např. krev či orgány některých laboratorních zvířat. Hodí se proto velmi dobře i pro experimentální sledování aktivity AChE, např. v částech mozku [2, 4] apod.

Při sledování aktivity AChE touto metodou u pracovníků s OF je optimální — stejně jako i u jiných metod — určit individuální normy každého jedince, které mohou kolísat v dosti velkém rozmezí ještě normálních hodnot. Metodu je možno použít i pro měření aktivity AChE v krvinkách či plazmě, jak bylo demonstrováno dříve [18, 19, 22]. Stejně je možné ji modifikovat pro stanovení BuChE obměnou substrátu — acetylthiocholinu za butyrylthiocholin. Tyto modifikace jsou výhodné zejména tehdy, je-li dostatek času pro oddělení plazmy a krvinek, nebo je-li nutné přesně odlišit aktivitu AChE či BuChE.

Pro její rychlost a jednoduchost je možné velmi reálně uvažovat i o modifikaci této metody pro polní použití, které se jeví z hlediska rychlé diagnostiky otrav OF při bojovém použití pro armádu velmi žádoucí.

Souhrn

Byla popsána modifikace metody pro stanovení acetylcholinesterázy z $5 \mu\text{l}$ lidské krve za použití acetylthiocholinu jako substrátu a 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou jako chromogenu, určený optimální podmínky pro stanovení a normální aktivita u 31 lidí. Metoda je svou jednoduchostí a citlivostí velmi perspektivní pro eventuální polní použití.

Poděkování

Autor si dovoluje poděkovat s. Marti Zechovské za technickou spolupráci a s. Věře Pacovské za pomoc při statistickém zpracování.

Literatura

1. Bajgar, J., Patočka, J.: Srovnání citlivosti tří metod stanovení aktivity cholinesteráz. Sborník věd. prací VLVDÚ, 44, 1969, 3—8.
2. Bajgar, J.: Inhibition of acetylcholinesterase in different parts of the brain of mice by isopropyl methylphosphonofluoridate in vitro and in vivo. Arch. Toxikol. 27, 1971, 233—241.
3. Bajgar, J., Tulach, J., Jakl, A., Patočka, J.: Differences in anticholinesterase action of some organophosphorus compounds in vivo. Acta biol. med. germ., 27, 1971, 171—178.
4. Bennett, E. L., Diamond, M. C., Morimoto, H., Hebert, M.: Acetylcholinesterase activity and weight measures in fifteen brain areas from six lines of rats. J. Neurochem. 13, 1966, 562—572.
5. Berg, S. V., Maickel, R. P.: A simplified method for determination of brain acetylcholinesterase activity. Life Sci. 7, 1968, 1197—1202.
6. Degrelle, H., Tillement, J.: Les cholinesterases. Determination d'activité. Ann. Pharm. Franc. 22, 1964, 505 až 509.
7. Ellman, G. L., Courtney, D. K., Andres, V., Featherstone, R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 1961, 88—95.
8. Fišerová-Bergerová, V.: Polarographische Bestimmung der Cholinesterase- und Acetylcholinesterase-Aktivität. Kinetische Daten der enzymatischen Hydrolyse des Acetylcholine. Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 28, 1963, 3311—3325.
9. Goyer, G. R.: Evaluation par méthode manométrique des cholinésterases des muscles diaphragme et tibial antérieur chez le rat. Rev. Canad. Biol. 27, 1968, 209—216.
10. Hestrin, S.: The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. J. Biol. Chem. 180, 1949, 249 až 241.
11. Humiston, C. G., Wright, G. J.: An automated method for the determination of cholinesterase activity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 10, 1967, 467—480.
12. Jakovlev, V. A., Agabekjan, R. J.: Investigation of the conformational changes in choline esterase by the fluorescence method. Mol. Biol. (SSSR), 2, 1968, 859 až 863.
13. Kalow, W., Lindsay, H. A.: Abnormal behavior of human serum cholinesterase. J. Pharmacol. 116, 1956, 34.
14. Michel, H. O.: An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. J. Lab. Clin. Med. 34, 1949, 1564—1568.
15. Patočka, J., Bajgar, J.: Some enzymatic properties of human brain acetylcholinesterase. FEBS lett. 2, 1969, 195—197.
16. Prince, A. K.: A sensitive fluorimetric procedure for the determination of small quantities of acetylcholinesterase. Biochem. Pharmacol. 15, 1966, 411—417.
17. Sasaki, M.: An ultra-micro assay of serum cholinesterase with m-nitrophenol indicator. Rinsko Byori. 12, 1964, 555—558.
18. Szasz, G.: Cholinesterase Bestimmung im Serum mit Azetyl- und Butyrylthiocholin als Substrat. Clin. Chim. Acta, 19, 1968, 191—204.
19. Voss, G., Sachsse, K.: Red cell and plasma cholinesterase activities in microsamples of human and animal blood determined simultaneously by a modified acetylthiocholine/DTNB procedure. Toxicol. Appl. Pharmacol. 16, 1970, 764—772.
20. Winter, G. D.: Cholinesterase activity determination in an automated analysis system. Ann. N. Y. Acad. Sci. 87, 1960, 629—635.
21. Witter, R. F.: Measurement of blood cholinesterase: A critical account of methods of estimating cholinesterase with reference to their usefulness and limitations under different conditions. Arch. Environ. Hlth. 6, 1963, 537—563.
22. Zechovská, M., Bajgar, J.: Mikrometoda pro stanovení cholinesterázy v krvi. Sborník 7. celostátní konference biochemických laborantů, Kladno 1970, str. 51—55.