

616.15[:577.153.9]—074:544.83

MIKROMODIFIKACE STANOVENÍ ACETYLCHOLINESTERÁZY V LIDSKÉ KRVÍ**Srovnání s běžně používanými metodami**

Kpt. MUDr. Jiří BAJGAR, CSc., RNDr. Jiří PATOČKA, pplk. MUDr. Antonín JAKL, CSc.

Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav J. E. Purkyně, Hradec Králové

Stanovení aktivity acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7) v lidské krvi je uznávanou klinicko-laboratorní metodou pro určení tíže intoxikace nervově paralytickými látkami [1,9—11, 14, 19]. V minulém sdělení byla námi popsána mikromodifikace stanovení aktivity AChE v 2,5 μ l lidské krve, odebrané punkcí břiška prstu [2]. Mikromodifikace vyhovuje požadavkům na přesnost, citlivost a je nenáročná i z hlediska přístrojového vybavení. **K tomu, aby bylo možno tuto metodu převzít v širším měřítku, je nezbytné její detailnější srovnání s metodami běžně používanými; kromě toho je nutno znát eventuální shody či rozdíly v aktivitě tohoto enzymu v krvi kapilární, odebrané punkcí břiška prstu, a v krvi venózní, odebrané punkcí ze žíly. V neposlední řadě je také důležité znát změny aktivity AChE při skladování v různých podmínkách. Na tyto tři otázky odpovídá naše práce.**

Pokusná část**Materiál**

Lidská krev byla získána od 40 zdravých mužů ve věku 18—24 let. Po punkci břiška prstu injekční jehlou bylo mikropipetou odebráno 5 μ l krve a ihned hemolyzováno přidáním do 0,4 ml destilované vody. Venózní krev byla odebrána z loketní žíly do zkumavky vysypané heparinem. Pro měření aktivity AChE byla venózní krev hemolyzována destilovanou vodou (5 μ l krve ad 0,4 ml destilované vody).

Stanovení aktivity AChE

Aktivita AChE v krvi venózní byla stanovována třemi metodami:

a) popsanou kolorimetrickou semiautomatickou mikrometodou [2] za použití 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (Serva Heidelberg, NSR);

b) elektrometrickou metodou podle Michela [8] v modifikaci Tulacha a Patočky [15];

c) metodou na automatickém kolorimetru Auto-Analyzer (Technicon, Chauncey, New York, USA) podle Wintera [18].

Jako substrát bylo použito acetylthiocholin jodidu (Lachema Brno) u metody sub a), a acetylcholin chloridu (Lachema Brno) u metod sub b) a c).

Aktivita AChE v krvi kapilární byla stanovena kolorimetrickou mikrometodou, uvedenou sub a).

Stálost materiálu

Z venózní krve byly připraveny hemolyzáty (50 μ l krve ad 4,0 ml destilované vody), které byly rozděleny do tří alikvotních podílů, z nichž jeden byl uchováván při laboratorní teplotě (18°—22° C), druhý v lednici při + 4° C a třetí byl zmrazen na teplotu - 40° C. V různých intervalech z nich bylo odebíráno 0,05 ml hemolyzátu a v něm měřena aktivita AChE. Ke každému časovému intervalu pro uvedené tři podmínky skladování bylo použito hemolyzátní od 10 různých jedinců, vybraných z pokusného souboru obálkovou metodou.

Statistické vyhodnocení

Ke srovnání aktivit AChE v krvi kapilární a venózní, měřené kolorimetrickou mikrometodou, uvedenou sub a) a ke srovnání aktivit

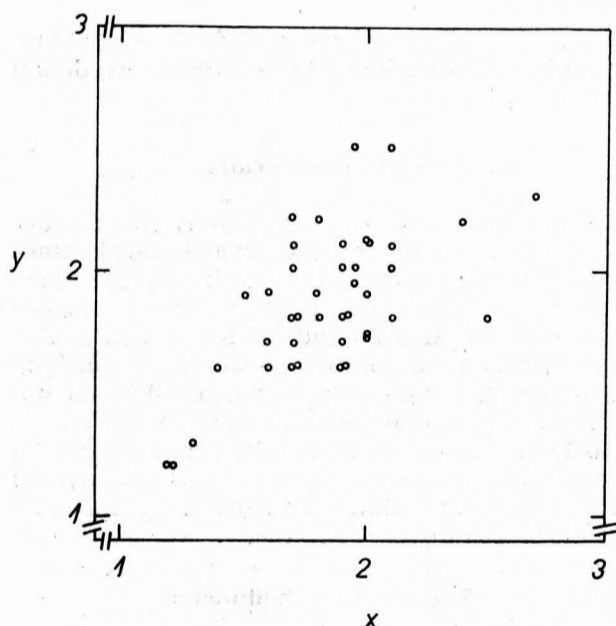
AChE ve venózní krvi, měřené různými metodami [sub b) a c)], s aktivitou AChE v krvi kapilární, měřené kolorimetrickou mikrometodou, bylo použito korelační analýzy. Proložení přímky bylo provedeno metodou nejmenších čtverců na počítači MINSK 22 podle programů Hrašky a Tulacha (5). Pro určení rozdílů v aktivitě AChE při různém způsobu skladování bylo použito dvoufaktorové analýzy rozptylu, opět s použitím příslušných programů pro počítač MINSK 22 (5).

Výsledky

Z našich výsledků je zřejmé, že aktivita AChE v krvi venózní odpovídá aktivitě AChE v krvi kapilární (graf 1). Podobná korelace byla nalezena mezi stanovením aktivity AChE v krvi kapilární, měřené popsanou mikrometodou (a), a v krvi venózní, měřené metodami elektrometrickou (b) a kolorimetrickou na automatickém kolorimetru (c). Výsledky jsou shrnuty na grafech 2–4.

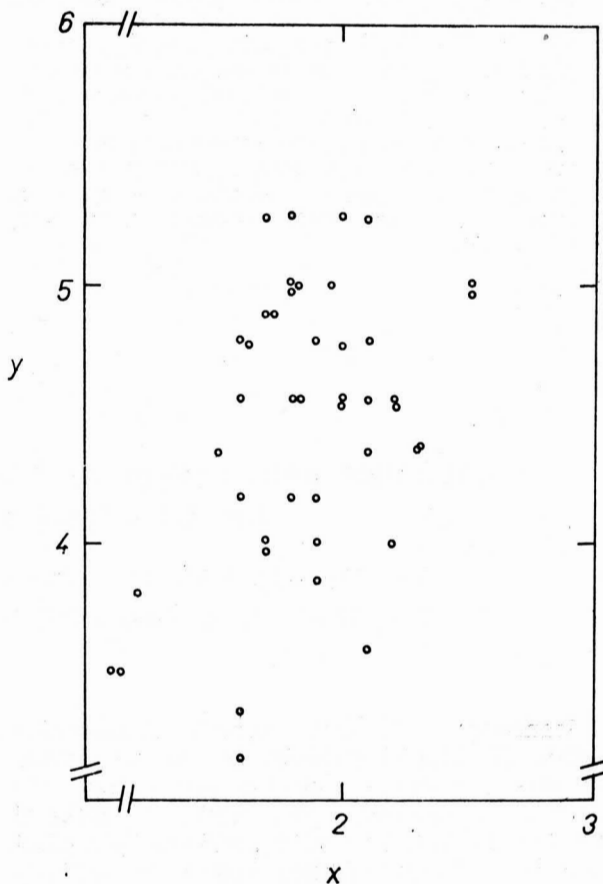
Na grafu 5 je demonstrována stálost materiálu (hemolyzát lidské krve) v čase za různých podmínek. Je vidět, že i při skladování v laboratorní teplotě se aktivita AChE asi 20 hodin neměnila. Po této době však rychle klesala, zatímco aktivita AChE hemolyzátu skladovaného při $+4^{\circ}\text{C}$ a -40°C v lednici se prakticky nemění. Průměry normální aktivity AChE lidské krve s 95% intervaly spolehlivosti u daného souboru 40 mladých lidí činily $7,28 \pm 0,38 \mu\text{mol/min/1 ml}$ celé krve pro krev kapilární a $7,42 \pm 0,34 \mu\text{mol/min/1 ml}$ celé krve

Graf 1



Korelace mezi aktivitou AChE v krvi venózní (y) a kapilární (x), měřené kolorimetrickou mikrometodou
 $y = 0,09 + 0,98x$ $r_{xy} = 0,5257$ $p < 0,05$

Graf 2



Korelace mezi aktivitou AChE v krvi venózní, měřenou pomocí elektrometrické metody (y), a v krvi kapilární, měřenou kolorimetrickou mikrometodou (x).

$$y = 0,15 + 2,3x \quad r_{xy} = 0,4647 \quad p < 0,05$$

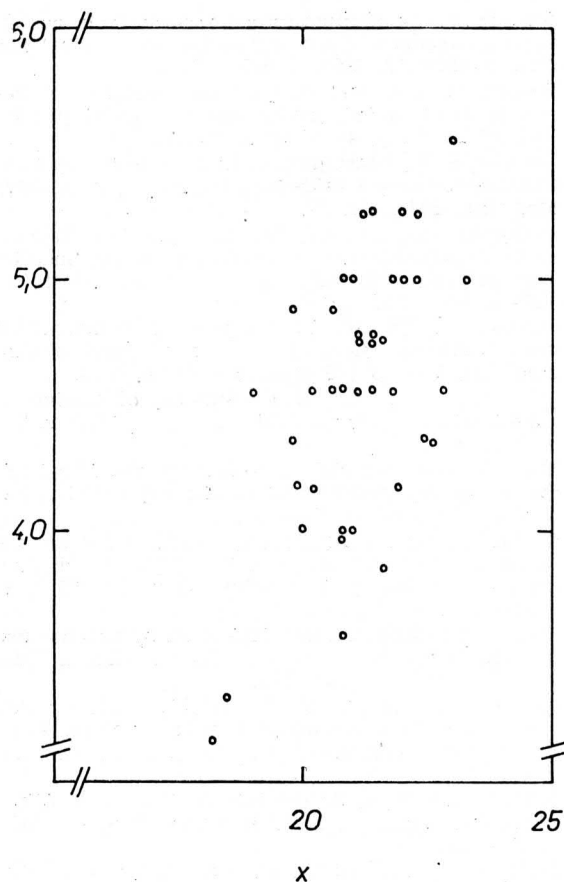
pro krev venózní. Mezi oběma typy vzorků nebyly zjištěny podle dvoufaktorové analýzy rozptylu statisticky významné rozdíly.

Diskuse

Ze získaných výsledků je jasné, že aktivita AChE lidské krve je konstantní jak v kapilární, tak ve venózní krvi. Rozdíly v sycení krve O_2 či CO_2 v kapilární, resp. venózní krvi nejsou zřejmě tak velké, aby ovlivnily aktivitu AChE. Malé snížení aktivity AChE (asi o 10 %), pozorované Metzlem (7) u psů, bylo prováděno za extrémních podmínek (pokles pH pod 7,15, zvýšení pCO_2 nad 100 mm Hg), které v našem pokusném uspořádání nepřicházejí v úvahu. Kromě toho je toto působení nespecifické — různá tenze plynů nepůsobí na aktivitu AChE, ale ovlivňuje průnik substrátu membránou, jak dokázal Wilson a Filbert (17), po účinku inertních plynů. Pokud je používána jako zdroj enzymu hypotonicky rozrušená membrána, tento faktor by nepřicházel v úvahu stejně tak jako v normální praxi.

Mezi jednotlivými metodami stanovení aktivity AChE existuje korelace — je možné tedy považovat popsanou metodu za dostatečně cit-

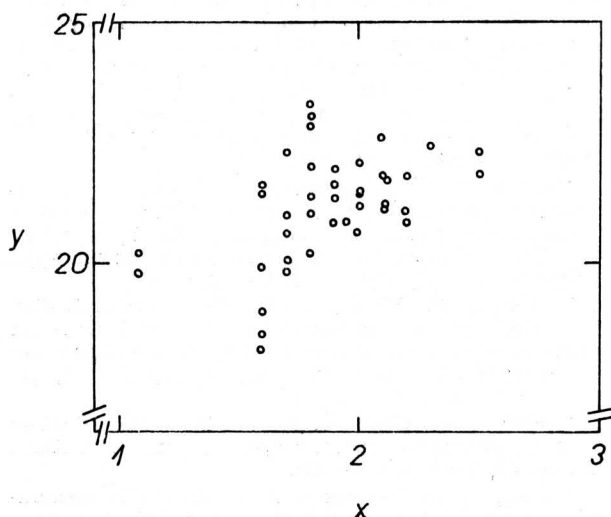
Graf 3



Korelace mezi aktivitou AChE v krvi venózní, měřenou pomocí elektrometrické metody (y) a pomocí automatické kolometrické metody (x)

$$y = -1,2 + 0,27x \quad r_{xy} = 0,5747 \quad p < 0,05$$

Graf 4

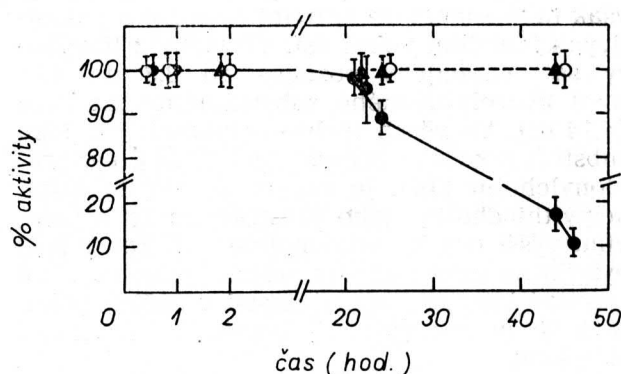


Korelace mezi aktivitou AChE v krvi venózní, měřenou pomocí automatické kolorimetrické metody (y), a v krvi kapilární, měřenou kolometrickou metodou (x)

$$y = 17,8 + 1,77x \quad r_{xy} = 0,4499 \quad p < 0,05$$

livou i přesnou pro alternativní stanovení aktivity AChE. Nižší hodnoty korelačních koeficientů jsou způsobeny nahuštěním experimen-

Graf 5



Aktivita AChE v hemolyzátu lidské krve, skladovaném při laboratorní teplotě (●), při +4 °C (○) a při -40 °C (▲).

tálních dat v poměrně úzkém rozmezí aktivit AChE, což je zdůrazněno výběrem poměrně homogenní skupiny dobrovolníků. I přes nízké hodnoty korelačního koeficientu je korelace mezi testovanými metodami statisticky významná na 5% hladině významnosti.

Posuzováno podle velikosti korelačního koeficientu se ukazuje nejtěsnější korelace mezi stanovením aktivity AChE metodou elektrometrickou a metodou na automatickém kolorimetru; o něco nižší je koeficient korelace při srovnání aktivity AChE v krvi venózní a kapilární, měřené kolorimetrickou mikrometodou. Hlavním důvodem bude asi toto: v prvním případě jde o tentýž princip metody — měření změny koncentrace H^+ iontů, jednou detekováno elektrometricky, po druhé s indikátorem pH. Ve druhém jde o metody shodné, pouze materiál je různý (kapilární a venózní krev). Nižší korelační koeficienty pro srovnání kolorimetrické mikrometody s metodami ostatními jsou způsobeny použitím rozdílných substrátů (acetylthiocholin — acetylcholin). Přesto i tyto hodnoty ukazují korelaci statisticky významnou pro $p < 0,05$.

Při sledování stálosti materiálu je vidět pro praxi dostačující stabilitu AChE pro skladování v lednici při +4 °C a méně. Důležité je však i zjištění, že aktivita AChE je stálá i při skladování v pokojové teplotě, a to necelý den. Bylo by proto možné exponovaným jedincům odebrat krev, hemolyzovat ji a bez zvláštních opatření (chlazení) ji dopravit na místo, kde by byla měřena aktivita. Je možno doporučit, aby toto měření bylo provedeno nejdéle do 15 hodin po odběru. Tyto výsledky jsou v soulase s údaji Siderse et al. (13), kteří pozorovali pro sérovou cholinesterázu pouze variace $\pm 3 \%$ v průběhu tří týdnů při skladování za různých podmínek. Pro AChE byla demonstrována její stálost při 0° do 120 hodin (12). V našich pokusech jsme v soulase se Sidersem et al. (13) nepozorovali změny AChE při zmrazení a rozmrazení, jak je popsáno Johnstonem a Huffem (6).

Při srovnání normální aktivity AChE v lidské krvi je možno vycházet z více údajů; je však také známo, že aktivita AChE se u jednotlivých individuí velmi liší. Výsledky z literatury se pohybují v rozmezí od 3,3 do 4,93 μmol hydrolyzovaného substrátu/min./ml krve [4,14,16]. Ve všech těchto případech byl jako substrát používán acetylcholin [4,14], ev. propionylcholin [16]. Je známo, že afinita AChE acetylthiocholínu jako substrátu je asi o polovinu vyšší než k acetylcholinu [3]. Tento fakt vysvětluje vyšší hodnoty našich výsledků. Malé rozmezí intervalu spolehlivosti v našich pokusech je možné vysvětlit poměrně homogenní skupinou.

Závěr

1. Kolorimetrická mikrometoda stanovení aktivity AChE dává srovnatelné výsledky s metodami běžně používanými.
2. Aktivita AChE v krvi kapilární a venózní se neliší.
3. Aktivita AChE v hemolyzátu lidské krve je při skladování v laboratorní teplotě stálá nejméně 15 hodin, při skladování při $+4^\circ\text{C}$ a méně je stálá nejméně týden.

Souhrn

V práci jsou srovnány výsledky měření aktivity acetylcholinesterázy v lidské kapilární krvi, odebrané punkcí bříška prstu, a v krvi venózní, odebrané punkcí z loketní žíly u 40 mladých mužů ve věku 18–24 let. Aktivita byla měřena kolorimetrickou mikrometodou v 2,5 μl celé krve. Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v aktivitě tohoto enzymu v kapilární a venózní krvi. Současně byla korelována aktivita acetylcholinesterázy v kapilární krvi venózní měřenou metodou elektrometrickou nebo kolorimetrickou na automatickém kolorimetru Auto-Analyzer. Všechny použité metody měření aktivity navzájem korelují ($p < 0,05$). Aktivita acetylcholinesterázy v lidské krvi je stálá při skladování v laboratorní teplotě nejméně 15 hodin, při skladování v teplotě $+4^\circ\text{C}$ a méně nejméně týden.

PODĚKOVÁNÍ

Autoři děkují s M. Zechovské, M. Gregorové a s O. Ochrymoviči za technickou spolupráci.

Literatura

1. Aldrich, F. D.: Cholinesterase assays: their usefulness in diagnosis of anticholinesterase intoxications. *Clin. Toxicol.*, 2, 1969, s. 445–448.
2. Bajgar, J.: Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi — možná modifikace pro polní použití. *Voj. zdrav. Listy*, 41, 1962, s. 78–80.
3. Golikov, S. N., Rozengart, V. I.: Cholinesterazy i anticholinesterazy ve věšestva. Leningrad, Izdatelstvo Medicina, 1964, str. 27.
4. Heilbronn, E., Mikiver, M., Thorsell, W.: Electrometric cholinesterase methodology in the monitoring of biocide workers. *Arch. Environ. Health*, 25, 1972, s. 370–373.
5. Hraška, M., Tulach, J.: Příspěvek k automatizaci zpracování experimentálních dat v experimentální medicíně. VLVDÚ JEP Hradec Králové, 1966.
6. Johnston, D. G., Huff, W. C.: Stability of cholinesterase in frozen plasma. *Clin. Chem.*, 11, 1965, s. 729 až 732.
6. Metz, B.: High arterial pCO_2 , low pH, the ACh-AChE system in the medulla and respiratory activity. *Neurology*, 14, 1964, s. 425–433.
8. Michel, H. O.: An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J. Lab. Clin. Med.*, 34, 1949, s. 1564–1568.
9. Namba, T.: Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and its clinical effects. *Bull. WHO*, 44, 1971, s. 289–307.
10. Namba, T., Nolte, C. T., Jackrel, J., Grob, D.: Poisoning due to organophosphate insecticides. Acute and chronic manifestations. *Am. J. Med.*, 50, 1971, s. 475–492.
11. Pasi, A., Leuzinger, S.: Die Intoxikation durch Alkylphosphate. *Schweiz. Z. f. Militärmedizin*, 47, 1970, s. 127–150.
12. Siakotos, A. N., Filbert, M., Hester, R.: A specific radioisotopic assay for acetylcholinesterase and pseudocholinesterase in brain and plasma. *Biochem. Med.*, 3, 1969, s. 1–12.
13. Siders, D. B., Batsakis, J. G., Stiles, D. E.: Serum cholinesterase activity. A colorimetric microassay and some clinical correlations. *Am. J. Clin. Pathol.*, 50, 1968, s. 344–350.
14. Stavinocha, W. B., Ryan, L. C., Endecott, B. R.: A study of the measurement of cholinesterase by constant-pH titration: the effect of hemolysins and a comparison with the electrometric technique. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 14, 1969, s. 469–474.
15. Tulach, J., Patočka, J.: Zařízení pro studium kinetiky enzymů. Sborník věd. prací VLVDÚ JEP, Hradec Králové, 32, 1968, s. 361–369.
16. 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, s. 764–772.
17. Wilson, K. M., Filbert, M. G.: Inert gas activation of cholinesterase in sub-cellular particles from rat brain. IIIrd International Meeting of the International Society for Neurochemistry, Budapest 1971, Abstracts p. 222.
18. Winter, G. D.: Cholinesterase activity determination in an automated analysis system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 87, 1960, s. 629–635.
19. Winter, R. F.: Measurement of blood cholinesterase. *Arch. Environ. Health*, 6, 1963, s. 537–563.