

MJERENJE AKTIVNOSTI SERUMSKE KOLINESTERAZE: USPOREDBA  
KOMERCIJALNIH I VLASTITIH TEST-REAGENCIJA, ENZIMSKI  
STANDARDI I NUMERIČKA OBRADA REZULTATA

V. Simeon

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb*

*Primljeno 1. IX. 1988.*

Uspoređene su komercijalne garniture test-reagencija (Test-Combination, Cholinesterase, Boehringer, Mannheim i Test-reagencije, Kolinesteraza EC 3.1.1.8, Pliva, Zagreb) i vlastiti pripravci test-reagencija za mjerenje aktivnosti serumske kolinesteraze (Ellmanova metoda) s obzirom na ponovljivost mjerenja i međusobnu zamjenjivost te s obzirom na stabilnost. Pokazalo se da su te garniture međusobno zamjenjive i da su reagencije stabilne nekoliko tjedana. Stabilnost nekih enzimskih standarda (Precinorm E, Precinorm U, NBS-serum i nativni ljudski serum) za kontrolu kvalitete mjerenja također je proučena; najstabilnija je aktivnost nativnog ljudskog seruma. Iz izmjerenih aktivnosti izračunata je nepreciznost mjerenja tom metodom: koeficijent varijacije unutar mjerenja je 2 – 3% a između mjerenja do 6%.

Aktivnost serumske kolinesteraze (EC 3.1.1.8) određuje se u mnogim laboratorijima sa svrhom da se utvrdi ekspaniranost osoba antikolinesterazama (organofosfatima i karbamatima). Ti spojevi upotrebljavaju se kao pesticidi, pa se profesionalna i akcidentalna trovanja mogu očekivati. Sniženje aktivnosti toga enzima može upozoriti i na poremetnju u funkcioniranju jetre, pa se i s toga razloga aktivnost određuje u kliničkim laboratorijima.

Za mjerenje aktivnosti serumske kolinesteraze (EC 3.1.1.8) u nas se upotrebljavaju dvije garniture reagencija (»assay kit«, test-paket) komercijalne proizvodnje: Test-Combination, Cholinesterase, Boehringer, Mannheim i Test-reagencije, Kolinesteraza EC 3.1.1.8, Pliva Zagreb. Objе garniture test-reagencija priređene su za mjerenje aktivnosti po metodi *Ellmana i suradnika* (1). Mjerenje aktivnosti serumske kolinesteraze tom metodom može se dakako obaviti i s kemikalijama koje se komercijalno mogu nabaviti, što je povoljno ako je dobava gotovih garnitura otežana.

Svrha ovoga rada bila je ustanoviti slaganje izmjerenih aktivnosti s reagensijama priređenim u laboratoriju i s dvije garniture test-reagensija komercijalne proizvodnje Boehringer i Pliva. Također, praćena je stabilnost tih reagensija u toku pohranjivanja i višekratne upotrebe. Ustanovljena je i prikladnost različitih standarda za kontrolu kvalitete mjerenja. Rezultati su numerički obrađeni i utvrđena je nepreciznost mjerenja aktivnosti između dana i unutar mjerenja uzorka na pojedinačnim uzorcima i na velikom broju različitih uzoraka.

## MATERIJAL I METODE

Mjerena je aktivnost serumske kolinesteraze uzoraka nativnoga ljudskog seruma, standardnih uzoraka seruma namijenjenih nadzoru kvalitete mjerenja: Precinorm E (govedi serum) i Precinorm U (ljudski serum) proizvodnje Boehringer, Mannheim te uzoraka NBS-seruma (ljudski serum) – Standard Reference Material 909 proizvodnje National Bureau of Standards, Washington.

Aktivnost je mjerena pri temperaturi od 25 °C po metodi *Ellmana i suradnika* (1) prema postupku opisanom u uputama priloženim uz komercijalne test-reagensije. Ta metoda osniva se na mjerenju koncentracije tiokolina, koji nastaje enzimskom hidrolizom acetiltiokolina. Tiokolin reagira s 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojevom kiselinom (DTNB-reagens) i nastaje anion 5-tio-2-nitrobenzoat, čija se apsorbancija mjeri na 405 nm. Aktivnost enzima prema analognim supstratima, butiriltiokolinu i propioniltiokolinu, može se mjeriti istom metodom.

Za mjerenje aktivnosti uzete su garniture test-reagensija proizvodnje Boehringer GmbH, Mannheim i SOUR Pliva, Zagreb te reagensije (IMI-reagensije) priređene od kemikalija, koje su bile nabavljene od raznih proizvođača. Pokusi su s prekidima radeni tijekom tri godine i za to vrijeme uzeto je nekoliko šarži kemikalija i komercijalnih test-reagensija. Komercijalne test-reagensije priređene su otapanjem kemikalija u bočicama kako je navedeno u uputama. Pripravci tih dvaju proizvođača razlikuju se u tome što su u Plivinu proizvodu sve tri kemikalije (pufer, DTNB-reagens i supstrat) u zasebnim bočicama, a Boehringer isporučuje pufer i DTNB-reagens u istoj bočici, a supstrat zasebno. Izgled kemikalija bio je nešto različit. Plivine kemikalije izgledaju pahuljasto i brzo se otapaju. Boehringerove kemikalije kristalinične su i slične su onima koje smo uzimali za pripremanje vlastitih reagensija. Njihovo otapanje bilo je nešto sporije. Vlastite reagensije (IMI-reagensije) priređene su od ovih kemikalija: fosfatni pufer, Kemika, Zagreb, acetiltiokolin-jodid i DTNB-reagens, Fluka, Buchs SG ili Sigma Chemical Co St. Louis. Konačne koncentracije u reakcijskoj smjesi bile su jednake onima deklariranim za komercijalne test-reagensije: 50 mM fosfatni pufer pH=7,2, 5,0 mM acetiltiokolin i 0,26 mM DTNB-reagens. Postupak mjerenja bio je isti za sve tri garniture reagensija i slijedene su upute proizvođača. Reagensije su u tamnim bočicama pohranjivane na +4 °C. Na sobnoj su temperaturi stajale samo za vrijeme mjerenja aktivnosti. Garniture komercijalnih reagensija predviđene su za mjerenje 30 uzoraka. Većina mjerenja načinjena je na spektrofotometru Unicam SP 500, Cambridge.

Za mjerenje aktivnosti uzimano je za svaku probu po 20 µL nativnoga ljudskog seruma. Liofilizirani serum (Precinorm E, Precinorm U i NBS-serum) otapani su prema

priloženim uputama a za mjerenje je uziman također uzorak od 20  $\mu$ L. Uzorcima seruma mjerena je aktivnost 2–8 puta uzastopno u jednom danu, s test-reagensijama priređenim iz sva tri izvora.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### *Nepreciznost mjerenja aktivnosti*

Nepreciznost mjerenja aktivnosti određena je pomoću jednadžbi /1/ do /3/ (2, 3). Varijanca unutar mjerenja (within-run) jednog uzorka izračunana je po jednadžbi /1/:

$$V_{WR} = \left[ \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 \right] / (M - k) \quad /1/$$

Varijanca mjerenja jednog uzorka iz dana u dan (between-run) izračunana je po jednadžbi /2/:

$$V_{BR} = \left\{ \sum_{j=1}^k [n_j (\bar{x}_j - \bar{x})^2] \right\} / (k - 1) \quad /2/$$

U jednadžbama  $x$  označava  $i$ -to mjerenje u  $j$ -tom uzorku,  $k$  je broj uzoraka (odnosno broj navrata u kojima je uzorak mjereno),  $n_j$  je broj mjerenja u  $j$ -tom uzorku,  $\bar{x}$  je srednja vrijednost  $j$ -tog uzorka,  $\bar{x}_j$  je srednja vrijednost svih mjerenja, čiji je ukupni broj  $M$ . Mjerenje jednog te istog uzorka u replikatama tijekom nekoliko ( $k$ ) dana uobičajeni je postupak za određivanje nepreciznosti mjerenja nekom metodom.

Prosječna nepreciznost mjerenja može se odrediti i iz većeg broja uzoraka različitih aktivnosti, mjerenih u dvije ili više replikata tijekom dužeg razdoblja. Varijance za uzorke različitih vrijednosti računane su po jednadžbi /3/:

$$V = \left\{ \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} [(x_{ij} - \bar{x}_j) / \bar{x}_j]^2 \right\} / (M - 1) \quad /3/$$

Koeficijent varijacije (% varijacije) iz jednadžbe /1/ i /2/ dobije se vadenjem korijena iz dobivene varijance i računanjem udjela (postotka) te vrijednosti u srednjoj vrijednosti svih mjerenja. Koeficijent varijacije iz jednadžbe /3/ dobiven je vadenjem korijena iz varijance i množenjem sa 100. Koeficijent varijacije za mjerenja unutar dana (jednadžbe /1/ i /3/) iznosio je 2–3%. Koeficijent varijacije mjerenja uzoraka dan na dan iznosio je do 6%. Za tu metodu vrijednosti koeficijentata varijacije drugih autora su slične ili nešto niže (4, 5).

### *Stabilnost uzoraka i reagensija*

Prema vlastitim pokusima i prema literaturnim podacima (5, 6) aktivnost kolinesteraze u zamrznutih uzoraka ljudskog seruma stabilna je godinu dana. Ostali enzimski pre-

parati, upotrijebljeni u ovom radu, zadržali su stalnu aktivnost mjesec dana kada su bili zamrznuti na  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Stajanjem na  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  preparati su izgubili oko 10% aktivnosti tijekom nekoliko dana. Aktivnost zamrznutih preparata praćena je reagensijama koje nisu bile starije od 14 dana.

Prema uputi proizvođača, reagensije za mjerenje aktivnosti mogu se rabiti još 6 tjedana nakon otapanja. Opaženo je da reagensije bez obzira na porijeklo stajanjem tijekom nekoliko tjedana daju intenzivniju žutu boju. Iz promjene intenziteta boje reagensija u periodu od četiri tjedna izračunana je koncentracija izreagiralog acetiltiokolina i ona je iznosila manje od 1% početne koncentracije (maksimalna promjena apsorbancije reakcijske otopine bila je 0,6). To smanjenje u skladu je s podatkom za konstantu brzine spontane hidrolize acetiltiokolina ( $k = 5,7 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ ) (7). Smanjenje koncentracije supstrata i za nekoliko posto ne utječe na aktivnost enzima pri koncentraciji supstrata 5.0 mM, koja je više od pet puta veća od Michaelisove konstante za taj enzim (8–10).

Pouzdanost mjerenja otopinama, koje su nekoliko tjedana bile pohranjene provjeravana je u slijedećem pokusu. Pet uzoraka nativnog ljudskog seruma bilo je podijeljeno u po 6 jednakih obroka i pohranjeno na  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  do najviše 35 dana. U tom vremenu uzorcima je mjerena aktivnost u 5–6 navrata uzimajući svaki put po jedan obrok uzorka. Svim obrocima jednog te istog uzorka izmjerena je aktivnost jednom te istom šaržom Boehringer i IMI-reagensija, koje su bile pohranjivane kao što je ranije opisano. Od pet uzoraka od kojih je svaki mjereno s obje garniture reagensija, četiri uzorka su imala manju aktivnost u drugoj polovici pohranjivanja. Za svaki je uzorak izračunana srednja vrijednost izmjerenih aktivnosti do 14. dana pohranjivanja i srednja vrijednost aktivnosti u preostala 2–3 mjerenja (do najviše 35. dana). U drugoj polovici pohranjivanja aktivnost je bila u prosjeku manja za 5%. Taj pad aktivnosti bio je jednak s obje garniture reagensija. Opaženo je također da je relativna standardna pogreška mjerenja u drugoj polovici pohranjivanja bila veća nego u prvoj. To se može protumačiti time što su starije reagensije davale više početne apsorbancije, tj. u području skale instrumenta, koje je grublje i nesigurnije za očitavanje (Unicam SP 500). Ako se koriste otopine koje imaju visoku osnovnu (početnu) apsorbanciju, treba načiniti slijepu probu, koja sadrži sve osim enzima, i apsorbanciju slijepe probe, automatski ili ručno, odbijati od prave probe. To je uputa koju je korisno primijeniti bez obzira na izvor reagensija, koje se koriste.

#### *Usporedba test-reagensija*

Uspoređene su aktivnosti serumske kolinesteraze izmjerene s dvije komercijalne i jednom vlastitom garniturom reagensija. Na tablici 1. korelacijska analiza pokazuje da vrijednosti izmjerene tim trima garniturama reagensija međusobno dobro koreliraju. Korelacija je dobra bez obzira na vrstu preparata, kojemu je mjerena aktivnost. Najbolja je korelacija u mjerenjima Boehringerovim i Plivinim reagensijama ( $R = 0,996$ ) i pravci koreliranih vrijednosti /Boehringer (x) vs Pliva (y) ima jedinični nagib s nesigurnim odsječkom na koordinatama (tablica 1)/. Odnos aktivnosti IMI (x) vs Boehringer (y) i IMI (x) vs Pliva (y) daje malo lošiju korelaciju. Pravci nemaju signifikantan odsječak na ordinati, ali su nagibi pravaca kroz ishodište za 9% (IMI-Boehringer i IMI-Pliva) i

Tablica 1

Odnos izmjerenih aktivnosti komercijalnim (Boehringer, Pliva) i vlastitim (IMI) test-reagensijama izraženim linearnom regresijskom analizom i korelacijama

|                                 | IMI (x) vs<br>Boehringer (y) | IMI (x) vs<br>Pliva (y) | Boehringer (x) vs<br>Pliva (y) |
|---------------------------------|------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| N(m)                            | 28 (108)                     | 22 (90)                 | 22 (90)                        |
| $\bar{x}/(\Delta A/\text{min})$ | 0,164                        | 0,168                   | 0,176                          |
| $\bar{y}/(\Delta A/\text{min})$ | 0,175                        | 0,179                   | 0,179                          |
| $a \pm SE(a)$                   | $-0,0156 \pm 0,0099$         | $-0,0192 \pm 0,0075$    | $0,0053 \pm 0,0038$            |
| $b \pm SE(b)$                   | $1,169 \pm 0,055$            | $1,181 \pm 0,040$       | $0,991 \pm 0,019$              |
| R                               | 0,978                        | 0,988                   | 0,996                          |
| $b_0 \pm SE(b_0)$               | $1,0889 \pm 0,0005$          | $1,0871 \pm 0,0004$     | $1,0148 \pm 0,0001$            |

N – ukupan broj uzoraka  
 m – ukupan broj mjerenja  
 x, y – srednje vrijednosti na apscisi odnosno ordinati  
 $a \pm SE(a)$ ,  $b \pm SE(b)$  – odsječak i nagib pravca  
 R – koeficijent korelacije  
 $b_0 \pm SE(b_0)$  – nagib pravca koji prolazi ishodištem

Tablica 2

Aktivnost kolinesteraze u preparatima ljudskog i animalnog seruma izmjerena komercijalnim test-reagensijama i vlastitim IMI-reagensijama

| Preparat              | IMI      | Aktivnost / %     |                 | n |
|-----------------------|----------|-------------------|-----------------|---|
|                       |          | Boehringer        | Pliva           |   |
| Nativni ljudski serum | 100 (11) | $116 \pm 11$ (11) | $110 \pm 8$ (6) | 7 |
| Precinorm E           | 100 (7)  | $106 \pm 10$ (7)  | $108 \pm 7$ (6) | 6 |
| Precinorm U           | 100 (5)  | $91 \pm 5$ (5)    | $93 \pm 9$ (5)  | 4 |
| NBS-serum             | 100 (5)  | $107 \pm 5$ (5)   | $107 \pm 7$ (5) | 4 |

Broj uzoraka pojedinog preparata označen je u zagradi  
 n – broj šarži reagensija načinjenih za mjerenje

Aktivnost izmjerena IMI-reagensijama uzeta je kao 100%, a ostale aktivnosti su izražene kao njihov postotak. Račun je proveden sa srednjim vrijednostima aktivnosti dobivenim mjerenjem aktivnosti uzoraka u 2 do 8 replikata.

1% (Boehringer-Pliva) veći od jediničnog nagiba. To znači da su aktivnosti izmjerene komercijalnim preparatima veće od onih izmjerenih IMI-reagensijama. Analiza aktivnosti po vrstama uzoraka (tablica 2) također pokazuju da su na svim uzorcima, osim na Precinorm U, izmjerene 6 do 16% veće aktivnosti s komercijalnim garniturama reagensija. Aktivnost uzoraka Precinorm U izmjerena komercijalnim reagensijama je 9% manja nego izmjerena vlastitim reagensijama (IMI). Aktivnosti kolinesteraze izmjerene različitim garniturama međusobno se preklapaju unutar 1–2 standardne devijacije (tablica 2), a ta je razlika unutar očekivane nepreciznosti.

## ZAKLJUČAK

Aktivnost serumske kolinesteraze izmjerena Ellmanovom metodom s reagensijama koje su ili pripremljene od kemikalija u laboratoriju ili su iz komercijalnih garnitura (Boehringer, Pliva) međusobno se dobro slažu. Za rutinsko mjerenje aktivnosti, dakle, jednako dobro služi bilo koja od upotrijebljenih reagensija.

Reagensije su stabilne unutar mjesec dana, pa su mjerenja pouzdana u tom vremenu. Komercijalni standardi za praćenje kakvoće mjerenja (Boehringer i NBS) otopljeni i zamrznuti pokazali su se stabilnima mjesec dana. Kao standard jednako dobro može poslužiti nativni ljudski serum (jedan ili smjesa nekoliko seruma) jer je aktivnost nativnog seruma (smrznutog) stabilna godinu dana. Ako se kao standard za praćenje kakvoće mjerenja upotrijebi takav stabilan preparat, niz mjerenja tijekom duljeg perioda može ujedno poslužiti za računanje nepreciznosti mjerenja iz dana u dan. Iz dnevnih mjerenja uzoraka (u dvije ili više replikata) može se odrediti prosječna nepreciznost unutar mjerenja uzorka. Tako određena nepreciznost ove metode u nizu pokusa s različitim šaržama triju garnitura reagensija iznosila je do 3% unutar mjerenja i do 6% u mjerenjima iz dana u dan.

*Zabvala* – Zahvaljujem dr. E. Reiner za interes i kritičko čitanje rukopisa te M. Kralj za tehničku pomoć.

## LITERATURA

1. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88–95.
2. Cooper BE. *Statistics for experimentalists*. Oxford: Pergamon Press, 1969.
3. Varley H, Gowenlock AH, Bell M. *Practical Clinical Biochemistry*. London: William Heinemann Medical Books Ltd. 1980;Vol 1.
4. Den Blaauwen Von DH, Poppe WA, Tritschler W. Cholinesterase (EC 3.1.1.8) mit Butyrylthiocholin-iodid als Substrat: Referenzwerte in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht unter Berücksichtigung hormonaler Einflüsse und Schwangerschaft. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:381–6.
5. Huizenga JR, Van der Belt K, Gips CH. The effect of storage at different temperatures on cholinesterase activity in human serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985;23:283–5.
6. Turner JM, Hall RA, Whittaker M, Kricka LJ. Effects of storage and repeated freezing and thawing on plasma cholinesterase activity. *Ann Clin Biochem* 1983;21:363–5.
7. Simeon V, Radić Z, Reiner E. Inhibition of cholinesterases by the oximes P2AM and Toxogonin. *Croat Chem Acta* 1981;54:473–80.
8. Simeon V. Michaelis constants and substrate inhibition constants for the reaction of acetylthiocholine with acetylcholinesterase and cholinesterase. *Croat Chem Acta* 1974;46:137–44.
9. Das PK. On genetically determined human serum cholinesterases. *Enzyme* 1976;21:253–74.
10. Radić Z, Reiner E. Effect of atropine on esterases from human blood and pig liver. *Acta Pharmacol Jugosl* 1986;36:1–7.

*Summary*

MEASUREMENTS OF SERUM CHOLINESTERASE ACTIVITY: COMPARISON OF  
COMMERCIALY AVAILABLE ASSAY KITS AND LABORATORY PREPARED  
REAGENTS, ENZYME QUALITY CONTROL STANDARDS AND THE IMPRECISION  
OF THE METHOD

The commercially available kits (Test-Combination, Cholinesterase, Boehringer, Mannheim and Test-reagent, Cholinesterase EC 3.1.1.8, Pliva, Zagreb) and reagents prepared in own laboratory for measuring cholinesterase activity (Ellman method) were tested with respect to their stability and the reproducibility of the activity measurements. The reagents of the three sources were shown to be interchangeable and equally stable over a few weeks. The coefficient of variation for within-run measurements by the Ellman method was 2–3% and that for between-run measurements 6%. The stability of the few enzyme standards (Precinorm E, Precinorm U, NBS-serum and native human serum) for the quality control of the measurements was also tested: the most stable was native human serum.

*Institute for Medical Research and Occupational Health, University of  
Zagreb, Zagreb*