

METODE ZA ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KOLINESTERAZA

VERA SIMEON

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti, Zagreb*

(Primljeno 8. XII 1967)

Prikazane su metode za određivanje aktivnosti kolinesteraza. Posebna je pažnja posvećena novijim metodama. Metode su prikazane s posebnim obzirom na njihovu primjenljivost u laboratorijskima i terenskim toksikološkim analizama te u kliničko-kemijskom radu.

Metode za određivanje aktivnosti kolinesteraza počele su se razvijati pred gotovo 40 godina, i još se uvijek pojavljuju u enzimološkoj i toksikološkoj literaturi radovi u kojima se ili predlažu nove metode ili modificiraju do sada poznate. Svrha je ovoga članka dati prikaz novijih metoda za određivanje aktivnosti kolinesteraza, osobito onih, koje su prihvaćene od većeg broja istraživača – toksikologa, kliničkih kemičara ili enzimologa. Starijim metodama posvećeno je ovdje manje pažnje, jer su one ili već ranije prikazane u ovom časopisu (1, 2) ili su manje upotrebljavane, pa će u ovom prikazu biti spomenute samo radi potpunosti.

U uvodnom dijelu bit će prikazane osnovne biokemijske značajke i sistematika kolinesteraza. U pregledu metoda biti će izložena načela na kojima se pojedina metoda zasniva, područje primjene i praktičnost metode. Neke od tih metoda već se dulje vremena upotrebljavaju u laboratorijima ovog Instituta (3, 4, 5).

NOMENKLATURA I SISTEMATIKA KOLINESTERAZA

Kolinesterazama naziva se skupina enzima, koji hidroliziraju kolinske estere brže nego druge estere karboksilnih kiselina. Prema fizikalno-kemijskim i biokemijskim značajkama te prema fiziološkoj funkciji mogu se kolinesteraze svrstati u dvije skupine. Prva se skupina u literaturi vrlo često naziva eritrocitna kolinesteraza, a druga serumska ko-

linesteraza. Prema preporuci Komisije za enzime Međunarodne unije za biokemiju (6) eritrocitna kolinesteraza naziva se ili trivijalnim imenom acetilkolinesteraza ili sistematskim imenom acetilkolin-acetilhidrolaza (EC 3. 1. 1. 7), a u literaturi se još upotrebljavaju i ova imena za eritrocitnu kolinesterazu: prava kolinesteraza, specifična kolinesteraza, kolinesteraza tipa I, α -kolinesteraza i acetokolinesteraza (7). Za serumsku kolinesterazu preporučuje se (6) ili trivijalno ime kolinesteraza ili sistematsko ime acilkolin-acilhidrolaza (EC 3. 1. 1. 8), ali se u literaturi upotrebljavaju osim imena serumska kolinesteraza još i ova imena: pseudo-kolinesteraza, nespecifična kolinesteraza, kolinesteraza tipa II, β -kolinesteraza i butirokolinesteraza (7). U ovom prikazu upotrebljavat će se imena eritrocitna i serumska kolinesteraza, jer su ona još uvijek najčešća u literaturi. Obje skupine kolinesteraza hidroliziraju osim svojega fiziološkog supstrata – acetilkolina – još i neke druge kolinske ili nekolinske supstrate većom ili manjom brzinom. Neki autori razlikuju kolinesteraze od drugih esteraza (alijesteraza, arilesteraza) osim po specifičnim supstratima još i po njihovoj osjetljivosti prema eserinu: kolinesteraze inhibitorane su potpuno 10^{-5} do 10^{-6} M eserinom, dok druge esteraze to nisu (8).

BIOKEMIJSKE I FIZIOLOŠKE ZNAČAJKE KOLINESTERAZA

Kolinesteraze nalaze se u organizmu svih životinjskih vrsta, čak i kod jednostaničnih organizama, ali su u sisavaca osobito rasprostranjene (9, 10). Eritrocitna kolinesteraza nalazi se u živčanim tkivima, mišićnim tkivima, u stromi eritrocita, u otrovu nekih zmija i u električnom organu jegulja. Taj enzim hidrolizira acetilkolin u nervnim i neuromuskularnim sinapsama u kojima acetilkolin vrši funkciju kemijskog medijatora impulsa (9). Serumsku kolinesterazu nalazi se pak u svim tkivima u organizmu, u manjim ili većim količinama, a osobito je koncentrirana u serumu (11). Fiziološka uloga serumske kolinesteraze nije poznata, ali postoji nekoliko teorija o ulozi te skupine enzima u organizmu (11, 12). U ljudskoj krvi nalaze se obje skupine enzima; u stromi eritrocita nalazi se eritrocitna kolinesteraza, a u plazmi gotovo samo serumska kolinesteraza. Te dvije skupine enzima razlikuju se osim po distribuciji u organizmu i fiziološkoj funkciji još i po nekim biokemijskim karakteristikama. Eritrocitna i serumska kolinesteraza razlikuju se po brzini hidrolize njihovih supstrata (acetilkolina, butirilkolina, acetyl- β -metilkolina i dr.). Nadalje se te dvije skupine enzima razlikuju po funkcionalnoj zavisnosti njihove aktivnosti o koncentraciji supstrata. Kod velikih koncentracija acetilkolina suvišak supstrata inhibira aktivnost eritrocitne kolinesteraze, dok se aktivnost serumske kolinesteraze povećava s povećanjem koncentracije acetilkolina, do neke granične vrijednosti, a onda ostaje nepromijenjena bez obzira na povećanje koncentracije acetilkolina (10). Ove dvije skupine enzima razlikuju se također i po svojim specifičnim inhibitorima (7).

Kako je spomenuto, kolinesteraze razgrađuju u organizmu acetilkolin, koji je fiziološki posrednik prijenosa impulsa u nervnim i neuromuskularnim sinapsama.

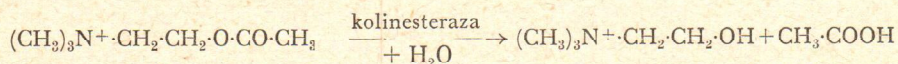
Unošenjem u organizam otrova (organofosforni spojevi, karbamati), koji blokiraju djelovanje kolinesteraze, dolazi do nagomilavanja acetilkolina u količinama, koje su toksične za organizam, što se očituje odgovarajućim simptomima (9, 13, 14, 15, 16). Budući da se organofosforni spojevi i karbamati mnogo upotrebljavaju u poljoprivredi i u javnom zdravlju, važno je imati uvid u promjenu aktivnosti kolinesteraze ljudi, koji su prilikom primjene tih toksičnih supstancija eksponirani njihovu djelovanju. Na taj se način ljudi mogu zaštititi ili prilikom otrovanja provesti odgovarajuća terapija. Inhibicija aktivnosti kolinesteraza pokazuje stupanj eksponiranosti organizma spomenutim otrovima. Mjerenje aktivnosti kolinesteraza zanimljivo je također i za kliničkog kemičara, jer indirektno pokazuje stanje jetre u organizmu. Za anestetičara zanimljiva je posebno prisutnost serumske kolinesteraze, jer ona razgrađuje sukcinil-dikolin, koji se upotrebljava za anestetske svrhe. Mjerenjem aktivnosti kolinesteraza prema različitim supstratima u prisutnosti i odsutnosti različitih inhibitora i aktivatora, te u različitim eksperimentalnim uvjetima, enzimolozi istražuju mehanizam djelovanja tih enzima. Otkrivanje mehanizma djelovanja tih enzima ima i praktičnu svrhu u terapiji otrovanja inhibitorima kolinesteraza.

NACELA ODREĐIVANJA AKTIVNOSTI KOLINESTERAZA

Aktivnost kolinesteraza mjeri se određivanjem količine supstrata, koju kolinesteraza ishidrolizira u jedinici vremena. Prema preporuci Komisije za enzime (6) aktivnost enzima izražava se u mikromolima izreagiralog supstrata na minutu i na jedinicu količine preparata. Aktivnost enzima dobivena nekim (najčešće terenskim) metodama ne može se izraziti u takvim, apsolutnim jedinicama, već se izražava u proizvoljnim, relativnim jedinicama (postotci, vremenske jedinice ili dr.).

Budući da kolinesteraze imaju prema acetilkolinu kao svojem fiziološkom supstratu veliki afinitet, kod velikog broja metoda upotrebljava se za određivanje aktivnosti acetilkolin, a u posljednje vrijeme i njegov tio-analog – acetiltiokolin.

Acetilkolin se djelovanjem kolinesteraza cijepa na alkohol (kolin) i kiselinu (octena kiselina):



Metode određivanja aktivnosti kolinesteraza mogu se svrstati u tri glavne skupine, i to prema tome da li se određuje enzimskom hidrolizom nastala kiselina ili alkohol ili se pak određuje neizreagirali supstrat (17, 18, 19).

U te tri skupine svrstane su metode dane u ovom prikazu. U uvodu svake skupine metoda dan je princip navedenih metoda, a onda su me-

tode svrstane po tehnikama koje se koriste. Na kraju svake skupine metoda dana je tablica u kojoj su navedene najvažnije metode iz dotične skupine i glavne značajke tih metoda.

Izbor metoda za određivanje aktivnosti zavisi o vrsti preparata kojemu se želi odrediti aktivnost i o svrsi istraživanja toga preparata (toksikološke ili kliničko-kemijske analize, enzimološke studije). Zahtjevi, koji se postavljaju na metode uglavnom su ovi: mogućnost mjerenja aktivnosti kolinesteraza što prije (ili neposredno) nakon dodatka supstrata, što kraće vrijeme mjerenja, upotreba malih količina enzimskog preparata, mogućnost mjerenja pri niskim koncentracijama supstrata. Za kliničke kemičare i toksikologe nadalje je važna jednostavnost postupka mjerenja aktivnosti kolinesteraze te jednostavna i standardna oprema. U ovom prikazu pokušalo se ukazati na one karakteristike pojedine metode, po kojima ona zadovoljava ili ne zadovoljava gore navedene zahtjeve.

METODE ZASNOVANE NA ODREĐIVANJU KISELINE NASTALE ENZIMSKOM HIDROLIZOM

Te se metode zasnivaju na mjerenju količine kiseline nastale enzimskom hidrolizom acetilkolina ili drugih kolinskih i nekolinskih estera. Tim metodama izravno se mjeri aktivnost enzima, kontinuiranim mjerenjem količine nastalog produkta. Nekima od tih metoda može se aktivnost mjeriti gotovo neposredno po dodatku supstrata, tj. mjeri se početna aktivnost enzima.

Manometrijske metode

Princip manometrijske metode jest taj da se enzimsko hidroliza estera vrši u bikarbonatnom puferu zasićenom ugljikovim dioksidom. Kiseline oslobođene hidrolizom estera reagira s bikarbonatnim ionima, tako da se oslobađa ekvivalentna količina ugljikova dioksida, koja se mjeri manometrijski. Iscrpni prikazi tih metoda dani su u priručnicima (20, 21).

Najčešće upotrebljavana manometrijska metoda za određivanje aktivnosti kolinesteraze jest Warburgova manometrijska tehnika. Ta se tehnika zasniva na naprijed opisanom principu, a iscrpan prikaz mjerenja aktivnosti objavljen je ranije u ovom časopisu (2).

Prvi je Warburgovu manometrijsku tehniku primijenio za mjerenje aktivnosti kolinesteraze ljudskih eritrocita i plazme *Ammon*, 1933 (22). Različiti autori modificirali su ovu metodu mijenjajući sastav pufera, volumen i oblik reakcijske posude, količinu enzima i supstrata (17), ili način dodavanja reaktanata u reakcijsku posudu (23). Warburgovom manometrijskom tehnikom može se mjeriti aktivnost uzoraka uzetih na terenu i osušenih na filter-papiru (24). *Goldstein* je 1949 (25) opisao manometrijsku tehniku sa »slobodnim manometrima« u kojoj se mijenja ne samo tlak nego i volumen plinske faze pa je metoda pogodna i za primjenu automatske registracije.

Warburgova manometrijska metoda još je uvijek jedna od najpouzdanijih i najraširenijih tehnika za određivanje aktivnosti kolinesteraze pa stoga često služi kao referentna metoda pri procjeni pouzdanosti i preciznosti novih metoda. Metoda nije prikladna za rad s niskim koncentracijama supstrata, a također nije primjenljiva u širem pH području (17).

Za mjerenje aktivnosti male količine enzimskog preparata upotrebljava se manometrijska tehnika s »kartezijskim ronilom«. Princip metode jest da se stakleno ronilo napuni reakcijskom smjesom (enzim i supstrat u bikarbonatnom puferu) i malim mjehurom plina, koji omogućava da ronilo pliva u vodi. Ugljikov dioksid razvija se u toku reakcije jednako kao u Warburgovu aparatu. S povećanjem volumena plina ronilo se počinje dizati. S pomoću spojenog manometra ronilo se može vratiti na početnu razinu. Očitanje povećanog pritiska na manometru predstavlja količinu izlučenog ugljikova dioksida, pa se prema tome može izračunati i količina hidroliziranog estera (17). Prvi su tu tehniku za mjerenje aktivnosti kolinesteraza upotrijebili *Linderström-Lang* i *Glick* (26). Drugi autori su razradili postupak za mjerenje aktivnosti kolinesteraze jedne stanice (27) ili čak uzorak jedne stanice ne veći od 1 pikolitra (28). *Brzin* i sur. (29, 30) modificirali su ovu metodu razradivši tehniku s magnetskim ronilom.

pH-metrijske metode

U tu skupinu spadaju metode koje se osnivaju na mjerenju brzine stvaranja kiseline iz estera mjereći promijenu pH slabo puferirane reakcijske smjese. Pufer je odabran tako, da je smanjenje aktivnosti enzima zbog pada pH (od 8,0 na 6,0) kompenzirano smanjenjem kapaciteta pufera, pa se opaža samo blago odstupanje od linearne zavisnosti promjene pH o vremenu reakcije (19). Pregled tih metoda dali su *Augustinsson* (17) i *Witter* (19).

Elektrometrijsku pH-metodu za određivanje aktivnosti kolinesteraze prvi je opisao *Michel* (31). Mjerenje se izvodi tako, da se eritrociti ili plazma stave u pufer (pH = 8,0) i zabilježi se pH reakcijske smjese nakon dodatka supstrata. Nakon točno određenog vremena ponovno se izmjeri pH. Aktivnost se računa iz razlike tih dviju pH vrijednosti, a izražava se kao Δ pH/sat.

Aktivnost određena tom metodom može se iskazati i u mikromolima hidroliziranog supstrata na minutu i jedinicu preparata (32), a može se adaptirati i za automatsku registraciju promjene pH (33). Metoda se može primijeniti i pri nižim koncentracijama supstrata (2.5×10^{-3} M) pa se tada može u punoj krvi mjeriti uglavnom aktivnost eritrocitne kolinesteraze (34). *Witter* i sur. (35) izostavili su mjerenje početnog pH reakcijske smjese, našavši da prisutnost uzorka ne utječe bitno na početni pH pufera. Neke modifikacije *Michelove* metode razlikuju se od izvorne metode samo po načinu vadenja krvi i količini upotrijebljenog uzorka (36). Neki autori mjerili su namjesto Δ pH/sat, vrijeme potrebno da se pH promijeni od 8,2 na 7,8 (37).

Elektrometrijske metode prikladne su za mjerenje aktivnosti velikog broja uzoraka, ali njihova je preciznost manja nego u titrimetrijske metode ili Warburgove manometrijske metode.

Indikatorske pH-metode zasnivaju se na istom principu kao i elektrometrijske, ali se tu pH mjeri promjenom boje indikatora, bilo vizualno ili fotometrijski. Tim se metodama najčešće određuje aktivnost kolinesteraze seruma.

Za fotometrijsko određivanje promjene boje indikatora uzima se često fenolno crvenilo (38, 39). Osim fenolnog crvenila upotrebljava se kao indikator *m-nitrofenol* (40) i bromtimol-plavilo (41).

Vizualne indikatorske metode mnogo se upotrebljavaju za terenski toksikološki rad. Mjerenje aktivnosti vrši se obično tako da se puna krv ili plazma pusti reagirati sa supstratom, a prati se promjena boja indikatora uspoređujući je sa standardima priređenim u laboratoriju ili obojenim staklima komparatora, koji se mogu komercijalno dobiti. Najčešće se mjeri vrijeme potrebno da se boja istraživanog uzorka izjednači s nekom određenom bojom na standardu (42, 43) ili se pak nakon određenog vremena boja uspoređuje sa staklima komparatora i tako utvrđuje postotak preostale aktivnosti (44, 86).

U ovu skupinu terenskih metoda mogu se ubrojiti i metode za određivanje aktivnosti serumske kolinesteraze pomoću test-papirića. U ovom časopisu opisana je nedavno takva terenska metoda (45). Posljednjih nekoliko godina objavljeno je još nekoliko takvih metoda s test-papirima (46, 47).

Spomenute terenske metode su relativno jednostavne za izvođenje, zahtijevaju jednostavnu opremu, malo reagencija. Ipak terensko mjerenje nije tako tačno kao laboratorijsko. Pogreška je reda veličine 25% (19). Kompariranje boje mnogo je teže u terenskim uvjetima, jer je za to potrebna jednolična rasvjeta. Druga teškoća leži u nestabilnosti reagensa. Otopine indikatora i supstrata moraju biti podešene na određeni pH. Mora se vršiti korekcija aktivnosti po temperaturnim tablicama, jer je u terenskim uvjetima teško raditi određivanje aktivnosti uvijek kod iste temperature.

Titrimetrijske (acidimetrijske) metode

Princip ove skupine metoda jest da se oslobođena kiselina titrira standardiziranom lužinom održavajući pH konstantnim, što se kontrolira pomoću indikatora ili potenciometrijski.

Titrimetrijske metode s indikatorom dosta su nespretne, jer je teško mijenjanje boje indikatora u reakcijskoj smjesi stalno uspoređivati s indikatorskim standardom, a istovremeno dodavati potrebnu količinu lužine za neutralizaciju nastale kiseline. Daljnje teškoće uzrokuje obojenost krvi ili plazme.

Pregled indikatorskih titracijskih metoda dao je *Augustinsson* (17).

Postupak za potencijometrijsko (titrimetrijsko) određivanje aktivnosti kolinesteraza opisali su *Chouteau* i sur. (48), *Jørgensen* (49) te *Jensen-Holm* i sur. (50). *Jørgensen* (49) opisao je postupak za mjerenje aktivnosti kolinesteraze ljudskog seruma s pomoću titratora s automatskom registracijom. *Jensen-Holm* i sur. (50) razradili su sličan titrimetrijski postupak za mjerenje aktivnosti serumske kolinesteraze te ljudskih eritrocita i tkivnih homogenata. *Jensen-Holm* (51) opisao je također postupak za mjerenje aktivnosti kolinesteraza pri veoma niskim koncentracijama supstrata (do 2×10^{-6} M). Isti je autor (52) razradio titrimetrijski postupak za određivanje aktivnosti eritrocitne i serumske kolinesteraze uzastopno, u istom uzorku, koristeći različite ovisnosti aktivnosti tih dvaju skupina enzima o koncentraciji supstrata.

Automatskim titrimetrijskim metodama može se započeti mjerenje enzimске aktivnosti neposredno po dodatku supstrata, a također se može studirati i utjecaj pH na aktivnost. Za provedbu takvih mjerenja potrebna je veća količina kako preparata tako i supstrata. Izvođenje analize dosta je dugotrajno, iako samo mjerenje traje relativno kratko vrijeme (2–10 min).

Spektrofotometrijske metode

Princip te skupine metoda jest da kiselina nastala enzimskom hidrolizom estera s nekim reagensom daje obojeni spoj kojeg se optička gustoća određuje spektrofotometrijski.

Ravin i sur. (53) opisali su takvu metodu za određivanje aktivnosti serumske kolinesteraze s karbonaftoksi-kolinom kao supstratom. Hidrolizom nastaje 1-naftil-ugljična kiselina, koja se spontano dekarboksilira, i nastaje 1-naftol, a taj daje s diazonijevim solima boju koja se, pošto se ekstrahira etilacetatom, može mjeriti fotometrom. Tačnost metode je oko $\pm 5\%$, a upotrebljivost metode ograničena je osim složenošću postupka (diazotacija i ekstrakcija) još i slabom topljivošću supstrata (54).

Radiometrijske metode

Princip metode je da se enzimskom hidrolizom radioaktivnog acetilkolina, nastala radioaktivna octena kiselina ekstrahira u organskom otapalu i mjeri radioaktivnost scintilacijskim spektrometrom, u prisutnosti tekućeg scintilatora.

Metodu je opisao *Potter* (55) za mjerenje aktivnosti kolinesteraze u pročišćenom preparatu acetilkolinesteraze električnog organa jegulje i esteraza prisutnih u homogenatu štakorskog mozga. Metoda se može primijeniti za određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze u mozgu štakora u rasponu količina preparata od 1×10^{-3} do 1×10^{-4} mikrograma preparata. Kao supstrati upotrijebljeni su ovi radioaktivni preparati: ^3H - i ^{14}C -acetilkolin, ^3H -acetil- β -metilkolin i ^{14}C -benzoilkolin. Optimalna koncentracija supstrata (acetilkolina) bila je 2×10^{-3} M. Autor smatra da se njegova metoda može usporediti s obzirom na mogućnost

Tablica 1.
Metode zasnovane na određivanju kiseline nastale enzimskom hidrolizom

Metode	Preparat	Supstrat, c_s (M)	Vrijeme trajanja reakcije (min.)	pH-područje	Napomena
<i>Manometrijske metode</i> Warburgova manometrijska metoda Augustinsson (10)	E, P, Tkv.	Ach i dr. $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-4}$	20-30 (3 min)*	7.4	Može se raditi u pH području od 7.2-7.7 (19) Pogreška 2-3%
Manometrijska metoda s ronilom Giacobini (28)	Stanični dijelovi	Ach, 5.3×10^{-3}	240 (30 min)*	7.5	Osetljivost $1 \times 10^{-6} \mu\text{l CO}_2$ Pogreška $\pm 15\%$
<i>pH-metrijske metode</i> Elektrometrijska Michel (31)	E, P	Ach, 1×10^{-2} do 1.5×10^{-2}	30	8.0	Mogu se upotrijebiti i drugi supstrati (19) Pogreška 5-6%
Indikatorska Grégoire i sur. (39)	E, P	Ach i dr. $2 \times 10^{-2} - 2 \times 10^{-4}$	2-5 (30 sek.)*	7.5	Pogreška 5%
<i>Titrimetrijske metode</i> Jensen-Holm (51)	E, P Tkv.	Ach, 5×10^{-2} do 2×10^{-6}	2-10 (0 sek)	7.4	Može se raditi i kod drugih pH-vrijednosti

* Vrijeme prvog očitavanja aktivnosti nakon dodatka supstrata.

E, P, Tkv. = eritrociti, plazma, homogenati tkiva

Ach, Ach-S, dr. = acetilkolin, acetilokolin, drugi supstrati

mjerenja malih količina preparata s manometrijskom tehnikom s »kar-tezijanskim ronilom«. Također se ova metoda može dobro usporediti s drugim mikrometodama za određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze (59, 77, 83). Metoda nema prednosti u usporedbi s postojećim metodama koje upotrebljavaju veće količine preparata. Velika je prednost metode, da se biološki materijal ne razređuje za vrijeme reakcije.

METODE ZASNOVANE ZA ODREĐIVANJU ALKOHOLA (TIOALKOHOLA) NASTALOG ENZIMSKOM HIDROLIZOM

Te se metode zasnivaju na mjerenju količine alkohola ili tioalkohola nastalog enzimskom hidrolizom tiokolinskih i nekolinskih estera. Tim metodama izravno se mjeri aktivnost enzima kontinuiranim mjerenjem nastalog produkta. Nekima od tih metoda može se aktivnost mjeriti go-tovo neposredno po dodatku supstrata, tj. mjeri se početna aktivnost enzima.

Titrimetrijske metode

Princip metode je da se nastali alkohol titrira nekim reagensom, a utrošak reagensa predstavlja količinu nastalog alkohola. *Meyer* i *Wil-brandt* (56) opisali su metodu, u kojoj se tiokolin nastao enzimskom hi-drolizom acetiltiokolina titrira jodometrijski. Ta metoda ne daje krivu-lju aktivnosti nakon dodatka supstrata, jer se hidroliza mora zaustaviti da bi se izvršila jodometrijska titracija. Čini se da ta metoda nema ni-kakvih prednosti pred acidimetrijskim titracijama (19).

Spektrofotometrijske metode

Princip ove skupine metoda jest da enzimskom hidrolizom nastali al-kohol ima boju koja se može mjeriti spektrofotometrom ili se nastali alkohol (tioalkohol) pusti reagirati s nekim reagensom pri čemu nastaje boja, koje se optička gustoća fotometrira.

Gal i *Roth* (57) objavili su metodu u kojoj enzimskom hidrolizom na-stali tiokolin reagira s indofenolom, koji se na taj način reducira, a ne-stanak njegove boje prati se na fotometru. Drugi autori nisu provjeravali ovu metodu.

Po metodi *McOsker* i *Daniela* (58) nastali tiokolin oksidira se natrije-vim nitroprusidom. Nastaje žuta boja, koja je nestabilna i mora se od-mah fotometrirati. Metoda je primijenjena samo za određivanje aktiv-nosti kolinesteraze štakora (19).

U posljednje vrijeme mnogo se upotrebljava metoda po *Ellmanu* i sur. (59). Princip metode je da enzimskom hidrolizom nastali tiokolin reagira s ditiobisnitrobenzojevom kiselinom, pa se stvara žuti produkt, kojega se boja fotometrira pri 412 m μ . *Salvador* i *Kuntzman* (60) primi-jenili su tu spektrofotometrijsku metodu na različita tkiva životinja (šta-

kor, miš, kunić, zamorac), upotrijebivši različite tiokolinske supstrate. *Garry* i *Routh* (61) opisali su mikrometodu za određivanje aktivnosti kolinesteraze seruma ljudi, a za razliku od izvorne metode po *Ellmanu* i sur. (59), aktivnost se ne mjeri kontinuirano, već se reakcija hidrolize supstrata zaustavlja specifičnim inhibitorom, a onda se mjeri optička gustoća razvijene boje. Zaustavljanje reakcije inhibitorom nije nužno, jer se aktivnost može vrlo elegantno mjeriti pola minute po dodatku supstrata i kontinuirano pratiti daljnjih jednu do dvije minute. Na taj način *Škrinjarić* i *Wilhelm* (62) izmjerile normalne aktivnosti kolinesteraze seruma 108 ljudi. *Salafsky* (63) je usporedio metodu po *Ellmanu* i sur. s Warburgovom manometrijskom metodom i sa spektrofotometrijskom metodom po *Krameru* i *Gamsonu* (64) i upozorio na razlike u aktivnosti kolinesteraze izmjerene s različitim šaržama komercijalnog acetiltiokolina. *Humiston* i *Wright* (65) opisali su automatizirani postupak za određivanje aktivnosti kolinesteraze, koji se zasniva na metodi po *Ellmanu* i sur. (59). *Ridgway* i *Mark* (66) usporedili su metodu po *Ellmanu* i sur. (59) s polarografskom metodom.

Spektrofotometrijska metoda po *Ellmanu* i sur. (59) veoma je jednostavna i brzo se može odrediti aktivnost uzoraka; aktivnost se može pratiti već 5–10 sekunda po dodatku supstrata. Metoda dopušta široki raspon koncentracija supstrata. Metoda je prikladna za enzimološka istraživanja, a i za kliničko-kemijska i toksikološka određivanja aktivnosti kolinesteraza.

Osim acetiltiokolina, u spektrofotometrijskim metodama koriste se i drugi, nekolinski supstrati kolinesteraza. *Kramer* i *Gamson* (64) opisali su metodu u kojoj se aktivnost pročišćenog preparata acetilkolinesteraze mjeri s indofenilacetatom kao supstratom, koji se pri $\text{pH} = 8.0$ enzimski hidrolizira i daje plavu boju indofenola. Metoda je ograničena uskim područjem koncentracije supstrata ($2,5 \times 10^{-4}$ do $2,5 \times 10^{-5}$ M) i zbog toga malom aktivnosti enzima. Metoda je primijenjena na čišćeni preparat.

Main i sur. (54) opisali su metodu za mjerenje aktivnosti kolinesteraze ljudskog seruma s o-nitrofenil-butiratom kao specifičnim supstratom. Enzimskom hidrolizom nastali o-nitrofenol određuje se spektrofotometrijski. Aktivnost mjerena ovom metodom izračunava se iz razlike količine o-nitrofenola nakon 30 minuta reakcije i količine o-nitrofenola na početku reakcije. Ovom se metodom ne može mjeriti početna aktivnost enzima (odmah po dodatku supstrata).

Prince (67) opisao je metodu kojom se mjeri aktivnost acetilkolinesteraze prema 1-metilacetoksikinolin-jodidu kao specifičnom supstratu. Enzimskom hidrolizom nastaje 1-metilhidroksikinolin, kojega se optička gustoća fotometrira. Autor je našao da brzina hidrolize nije linearno zavisna o koncentraciji preparata. Metoda je primijenjena samo na pročišćene preparate. Autor je metodu poboljšao mjereći razgradni produkt fluorometrijski (68).

Fluorometrijske metode

Princip metode jest da enzimskom hidrolizom stvoreni alkohol pri određenoj valnoj duljini ekscitacije emitira svjetlo veće valne duljine, pri čemu nehidrolizirani ester ne smije fluorescirati.

Guilbault i Kramer (69) opisali su fluorometrijsku metodu za određivanje antikolinesteraznih spojeva u zraku i vodi. Enzimskom hidrolizom 2-naftilacetata nastaje 2-naftol, koji pri valnoj duljini ekscitacije od 320 m μ emitira svjetlo valne duljine 410 m μ . Autor je konstruirao aparaturu u kojoj se nalazi imobilizirani preparat kolinesteraze. U aparaturu ulazi supstrat i istraživani zrak ili voda. Prestanak fluorescencije (koja se automatski registrira) označuje pojavu antikolinesteraznih spojeva. Metoda je zanimljiva za automatsku kontrolu kontaminacije vode i zraka antikolinesteraznim spojevima.

Metoda ima nekoliko ograničenja. Bilo kakva fluorescentna kontaminacija u vodi i zraku, koja ima ekscitaciju i emisiju svjetla pri valnoj duljini u području sličnom kao 2-naftol, interferira jer će fluorescencija biti i nadalje vidljiva, unatoč inhibiciji enzima. Spojevi, koji postaju inhibitori kolinesteraze tek pošto se metaboliziraju, ne mogu se registrirati ovom metodom (paration, malation).

Fluorometrijska metoda, koju je opisao *Prince* (68) koristi 1-metilacetoksikinolin-jodid kao supstrat. Enzimskom hidrolizom nastaje 1-metilhidroksikinolin, koji pri ekscitaciji kod valne duljine od 406 m μ emitira svjetlo valne duljine 505 m μ . Intenzitet fluorescencije proporcionalan je koncentraciji enzima.

Polarografske metode

Princip polarografske metode jest da enzimskom hidrolizom nastali tiokolin daje anodni polarografski val, dok je acetiltiokolin – koji se upotrebljava kao supstrat – polarografski neaktivan. Visina polarografskog vala, dotično veličina granične struje, proporcionalna je koncentraciji stvorenog tiokolina.

Fišerová-Bergerová (70) opisala je postupak mjerenja aktivnosti eritrocitne i serumske kolinesteraze, te pune krvi čovjeka na polarografu s automatskom registracijom. Odredivši anodni val tiokolina, autor je odredio radni napon kod kojega se postiže granična struja vala. Kod tako odabranog napona granična se struja kontinuirano bilježi u zavisnosti o vremenu reakcije. Dobiva se pravac iz čijeg se nagiba može odrediti aktivnost. S pomoću baždarnog dijagrama može se aktivnost izraziti i u mikromolima ishidroliziranog supstrata na minutu i količinu preparata.

Amperometrijske metode

Princip metode amperometrijske titracije jest da se tiokolin, nastao enzimskom hidrolizom, titrira nekim reagensom, pri čemu se završetak titracije očituje naglim porastom struje.

Tablica 2.
Metode zasnovane na određivanju alkohola (tioalkohola) nastalog enzimskom hidrolizom

Metode	Preparat	Supstrat, ϵ_s (M)	Vrijeme trajanja reakcije (min.)	pH-područje	Napomena
<i>Spektrofotometrijske</i> Ellman i sur. (59)	E, Tkv. E (čišč.)	Ach-S, 7.5×10^{-2} do 5×10^{-5}	5-6 (30 sek)*	8.0	P. Garry i Routh (61); pH područje 7.3 do 9.2 pH Salvador i Kuntzman (60) Vrijeme određivanja aktiv. može biti 1.0 min.
Main i sur. (54)	P	o-nitrofenilbuitrat, 1×10^{-3}	30	6.0 do 9.2	Aktivnost se ne mjeri konti- nuirano po dodatku supstrata
<i>Fluorometrijske</i> Guilbault i Kramer (69)	P	2-naftilacetat 1×10^{-2} do 5×10^{-7}	2	7.0 do 8.0	
Prince (68)	acetilkolin- esteraza	1-metilacetoksiki- nolin, 1×10^{-7}	4-5 (60 sek)*	7.0	
<i>Polarografska metoda</i> Fišerová-Bergerová (70)	E, P. puna krv	Ach-S, 1×10^{-3}	3 (20 sek)*	5.5-9.2	Počtna aktivnost može se mjeriti već 5-10 sek. po dodatku supstrata, Ridgway i Mark (66)
<i>Potenciometrijska</i> Courtain (72)	P	Ach, 2×10^{-2} do 2×10^{-6}	3 (30 sek)*	7.4	

* Vrijeme prvog očitavanja aktivnosti nakon dodatka supstrata.

Metodu amperometrijske titracije za određivanje aktivnosti kolinesteraza opisali su *Ho* i sur. (71). Enzim i acetilkiolin puste se reagirati neko vrijeme, a zatim se doda eserin, čime se reakcija zaustavi. Nastali tiokolin titrira se metilživinim (II) jodidom. U reakcijskoj posudi nalazi se kapajuća živina elektroda i Ag/AgCl – elektroda. Za vrijeme titracije prati se difuzijska struja. Pred kraj titracije difuzijska struja naglo poraste, pa se tako odredi završna tačka titracije. Titracijom se stvara $\text{CH}_3\text{HgS-kolin}$. Metoda ne daje tok aktivnosti odmah po dodatku supstrata, a upotreba posebnog titranta čini je dosta neprikladnom.

Potenciometrijske metode

Princip metode jest da se s povećanjem koncentracije tiokolina nastalog enzimskom hidrolizom, povećava napon između tiol-srebrne elektrode i Ag/AgCl – elektrode. Povećanje napona proporcionalno je logaritmu koncentracije nastalog tiokolina.

Courtain (72) opisao je potenciometrijsku metodu za određivanje aktivnosti serumske kolinesteraze ljudi. Metoda dopušta veliki raspon koncentracija supstrata. Autor smatra da je metoda prikladna za određivanje aktivnosti velikog broja uzoraka.

METODE ZASNOVANE NA ODREĐIVANJU KOLIČINE NEIZREAGIRALOG ESTERA

Ta se skupina metoda zasniva na određivanju količine enzimskom hidrolizom još neizreagiralog supstrata (acetilkolina ili drugih estera). Aktivnost mjerena ovim metodama, za razliku od većine metoda u prve dvije skupine, izračunava se iz razlike količine supstrata na početku reakcije i nakon određenog vremena. Većina ovih metoda ne mjeri početnu aktivnost enzima (odmah po dodatku supstrata), već se ona izračunava. Da bi se aktivnost mogla pouzdano odrediti, potrebno je da se ishidrolizira najmanje 25% estera. Ako je aktivnost uzorka mala, male su i razlike, pa je pogreška određivanja velika.

Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrijske metode dijele se u dvije skupine. Prva skupina zasniva se na principu da neishidrolizirani supstrat reagira s nekim spojem i nastaje boja koje se optička gustoća fotometrira. U drugoj skupini preostali supstrat (tiokolin, benzoilkiolin) fotometrira se u ultravioletnom dijelu spektra.

Hestrin (73) opisao je reakciju acetilkolina s hidrosilaminom pri čemu nastaje acethidrosilaminska kiselina, koja zatim reagira u kiselom mediju s željeznim(III) kloridom dajući purpurno-crveni kompleks, kojeg se apsorbira mjeri na fotometru.

Metodu su različiti autori modificirali i primijenili za određivanje eritrocitne i serumske kolinesteraze u ljudskoj krvi (74), za punu krv

Tablica 3.
Metode zasnovane na određivanju neizreagiralog estera

Metode	Preparat	Supstrat, c_s (M)	Vrijeme trajanja reakcije (min.)	pH-područje	Napomena
<i>Spektrofotometrijske</i> Hestrin (73), Bonting i Featherstone (77)	E, P	Ach i dr. 2×10^{-2} do 5×10^{-3}	60	5.5-10	Vrijeme trajanja reakcije može biti 1-2 min. Wilson i sur., (79)
UV metode Gal i Roth (57)	E (čišč.) P, mozak	Ach-S 2.8×10^{-3} do 1.7×10^{-4}	3 (30 sek)*	7.4	Metodom se može mjeriti početna aktivnost enzima
<i>Radiometrijske</i> Winteringham i Fowler (85)	E (čišč.)	$1-^{14}\text{C}$ -Ach 2.5×10^{-2} - 5×10^{-8}	0.5-3.0	8.0	Puna krv, Winteringham i Disney (83)

E, P, Tkv. = eritrociti, plazma, homogenati tkiva

Ach, Ach-S, dr. = acetilkolin, acetiltiokolin, drugi supstrati

(75), za eritrocitnu kolinesterazu u punoj krvi (76) za ljudski serum i homogenate tkiva (77). *Melchiori* i *Maffei* (78) razradili su ultramikro-postupak za određivanje aktivnosti kolinesteraza u biološkim tekućinama i tkivu životinja i ljudi.

Određivanje aktivnosti vrši se tako da enzim reagira s acetilkolinom određeno vrijeme, pa se zatim u reakcijsku smjesu doda hidroksilamin, solna kiselina i željezni(III) klorid. Razvije se boja, koja je dosta nestabilna. Iz razlike optičke gustoće probe, koja sadrži supstrat bez enzima i probe s enzimom izračuna se aktivnost uzorka. Metoda dopušta mjerenje aktivnosti u širokom području pH, a može se upotrijebiti i za enzimološka istraživanja (79).

Na mjerenju promjene apsorpcije supstrata u ultravioletnom dijelu spektra zasnivaju se metode koje upotrebljavaju kao supstrat acetiltiokolin i butiriltiokolin (57, 80) ili benzoiltiokolin (81). Za izvođenje tih metoda potreban je spektrofotometar s dobrom resolucijom, jer serum i jodid-ion imaju maksimum apsorpcije u blizini radne valne duljine.

Radiometrijske metode

Princip metode jest da se uzorak kolinesteraze u puferu pomiješa s $1-^{14}\text{C}$ -acetilkolinom na mikroskopskom staklu. Nakon određenog vremena reakcija se zaustavi zakiseljavanjem. Reakcijska smjesa se osuši, pri čemu ishlapi radioaktivna octena kiselina nastala enzimskom hidrolizom. Preostalom radioaktivnom acetilkolinu izmjeri se aktivnost Geiger-Müllerovim brojačem. Aktivnost se izračuna iz razlike aktivnosti uzorka u kojemu nije bilo enzimske hidrolize acetilkolina i aktivnosti uzorka u kojemu se enzimski hidrolizirao supstrat.

Radiometrijsku metodu za određivanje aktivnosti kolinesteraze opisali su *Winteringham* i *Disney* (82). Autori su objavili niz modifikacija svoje izvorne metode (83, 84, 85). *Uandekar* i *Svetličić* (86) opisali su u ovom časopisu primjenu radiometrijske metode u terenskim uvjetima. *Disney* (87) usporedio je radiometrijsku metodu s elektrometrijskom metodom po *Michelu* (31).

Radiometrijska metoda ima sve nedostatke navedene za ovu skupinu metoda. Dodatni joj je nedostatak što za provođenje enzimske reakcije zahtijeva termostatoranu prostoriju ili se izmjerene aktivnosti moraju korigirati po temperaturnim tablicama.

Zahvaljujem dr E. Reiner za savjete pri pisanju ovoga rada kao i za kritičko čitanje rukopisa.

Literatura

1. *Reiner, E.*: Kolinesteraze. Biokemijske karakteristike i metode određivanja aktivnosti, Arh. hig. rada, 9 (1958) 25.
2. *Uuudekar, M., Reiner, E.*: Warburgov aparat, Arh. hig. rada, 13 (1962) 127.
3. *Reiner, E., Simeon-Rudolf, U.*: The Kinetics of Inhibition of Erythrocyte Cholinesterase by Monomethylcarbamates, Biochem. J., 98 (1966) 501.
4. *Simeon, U.*: Studies in the Toxicology of N-methylcarbamates. II. Correlation between Anticholinesterase Activity and Acute Toxicity, XV Internat. Congress Occup. Health, Vienna, A III-94, 521.
5. *Wilhelm, K.*: Inhibitorni učinak nekih karbamatnih insekticida na eritrocitnu i serumsku kolinesterazu čovjeka, II Jugoslavenski kongres za medicinu rada, Split, 1967.
6. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry. I. U. B. Symposium Series, Vol. 20. Oxford, 1961.
7. *Hardegg, W.*: Cholinesterasen, u Lang, K. i Lehnartz, F.: Handbuch der Physiologisch – und Patologisch-Chemischen Analyse, Hoppe-Seyler/Thierfelder, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 10 izd., Vol. VI., Enzyme, dio B, 1966.
8. *Myers, D. K.*: Studies on Selective Esterase Inhibitors, Disertacija, 1954.
9. *Koelle, G. B.*: Cholinesterases and Anticholinesterase Agents, u Ficheler, O., Farah, A. (izd.): Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk vol. 15. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1963.
10. *Augustinsson, K. B.*: Cholinesterases. A Study in Comparative Enzymology, Acta Physiol. Scand. 15, Suppl. 52, (1948) 1.
11. *Goedde, H. W., Doenicke, A., Atland, K.*: Pseudocholinesterasen. Pharmacogenetik. Klinik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967.
12. *Svensmark, O.*: Molecular Properties of Cholinesterases, Acta Physiol. Scand. 64, Suppl. 245, 1.
13. *O'Brien, R. D.*: Toxic Phosphorus Esters, Academic Press, New York, 1960.
14. *Heath, D. F.*: Organophosphorus Poisons, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris, 1961.
15. *Casida, J. F.*: Mode of Action of Carbamates, Ann. Rev. Entomol. 8 (1963) 39.
16. *Uandekar, M.*: Toksikologija organofosfornih insekticida, Arh. hig. rada 9 (1958) 35.
17. *Augustinsson, K. B.*: Assay Methods for Cholinesterases. u Glick, D.: Methods of Biochemical Analysis, Interscience Publishers Ltd, London, 5 (1957) 1–63.
18. *Augustinsson, K. B.*: Classification and Comparative Enzymology of the Cholinesterases and Methods for their Determination, u Koelle, G. B. (sub-editor): Cholinesterases and Anticholinesterase Agents. Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk, vol. 15, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, (1963), 89.
19. *Witter, R. F.*: Measurement of Blood Cholinesterases, A Critical Account of Methods of Estimation Cholinesterase with Reference to their Usefulness and Limitations under Different Conditions, Arch. Envir. Health, 6 (1963) 537.
20. *Dixon, D. R.*: Manometric Methods, The University Press, Cambridge, 3. izd. 1951.
21. *Umbreit, W. W., Burris, R. H., Stauffer, J. F.*: Manometric Techniques and Tissue Metabolism, Burgess Publishing Co., Minneapolis 7. izd. 1951.
22. *Ammon, R.*: Die fermentative Spaltung des Acetylcholins, Pflügers Arch. ges. Physiol. 233 (1933) 486, – cit. po Augustinsson (18).
23. *Adie, P. A., Tubu, J.*: A New Type of Warburg Vessel and its Application to the Study of some Kinetics of Cholinesterase Inhibition, Biochem. Biophys. Acta 50 (1961) 70.

24. *Augustinsson, K.-B., Holmstedt, B.*: Determination of Cholinesterase in Blood Samples Dried on Filter-Paper and its Practical Application, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **17** (1965) 573.
25. *Goldstein, A.*: A »Free Manometer« Method of Using the Standard Warburg Apparatus, *Science*, **110** (1949) 400.
26. *Linderström-Lang, K., Glick, D.*: *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.* **22** (1938) 300; cit. po Augustinsson (17).
27. *Zajicek, J., Zeuthen, E.*: *Exptl. Cell Research.* **11** (1956) 568, – cit. po Augustinsson (17).
28. *Giacobini, E.*: Determination of Cholinesterase in the Cellular Components of Neurons, *Acta Physiol. Scand.* **45** (1959) 311.
29. *Brzin, M., Kovič, M., Oman, S.*: The Magnetic Diver Balance, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg*, **34** (1964) 407.
30. *Brzin, M.*: Aktivnost i lokalizacija holinesteraza u nervnim ćelijama i živčanim vlaknima, III simpozium o holinesterazama i antiholinesteraznim supstancijama, Beograd, Kratki sadržaj saopštenja (1966) 17.
31. *Michel, O. H.*: An Electrometric Method for the Determination of Red Blood Cell and Plasma Cholinesterase Activity, *J. Lab. Clin. Med.*, **34** (1949) 1564.
32. *Tammelin, L. E., Löw, H.*: Calibration of an Electrometric Method for the Determination of Cholinesterase Activity, *Acta Chem. Scand.*, **5** (1951) 322.
33. *Tammelin, L. E.*: An Electrometric Method for the Determination of Cholinesterase Activity. I. Apparatus and Cholinesterase in Human Blood, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **5** (1953) 267.
34. *MacDonald, X. F., Pollard, C. B., Gropp, A. H.*: A Rapid Micromethod for Electrometric Determination of Red Cell Cholinesterase Activity in Whole Blood, *A M. A. Arch.*, **6** (1952) 271.
35. *Witter, R. F., Grubbs, L. M., Farrior, W. L.*: A Simplified Version of the Michel Method for Plasma or Red Cell Cholinesterase, *Clin. Chim. Acta*, **13** (1966) 76.
36. *Stubbs, J. L., Fales, J. T.*: *Am. J. Med. Tch.*, **26** (1961) 25, cit. po Witter (19).
37. *Courville, D. A., Ledington, W.*: A New Method of Assay for Serum Esterase, *J. Biol. Chem.*, **190** (1951) 575.
38. *Reinhold, J. G., Tourigny, L. G., Yonan, U. L.*: Measurement of Serum Cholinesterase Activity by a Photometric Indicator Method. Together with a Study of the Influence of Sex and Race, *Amer. J. Clin. Path.*, **23** (1953) 645., – cit. po Augustinsson (18).
39. *Grégoire, J., Grégoire, J., Limozin, N.*: Méthode de dosage spectrophotométrique de l'activité des cholinestérases, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37** (1955) 65.
40. *Rappaport, F., Fischl, J., Pinto, N.*: An Improved Method for the Estimation Cholinesterase Activity in Serum, *Clin. Chim. Acta*, **4** (1959) 227.
41. *Biggs, H. C., Carey, S., Morrison, D. B.*: *Am. J. Clin. Path.*, **30** (1958) 181, – cit. po Winter (19).
42. *Limperos, G., Ranta, K. E.*: A Rapid Screening Test for the Determination of the Approximate Cholinesterase Activity of Human Blood, *Science*, **117** (1953) 453.
43. *Davies, D. R., Nicholls, J. D.*: A Field Test for the Assay of Human Whole Blood Cholinesterase, *Brit. Med. J.*, **1** (1955) 1373.
44. *Edson, F. F.*: Blood Tests for Users of O. P. Insecticides, *World Crops*, February, (1958).
45. *Pleština, R.*: Naša iskustva u primjeni Acholest-metode za određivanje aktivnosti kolinesteraze plazme čovjeka, *Arh. hig. rada*, **17** (1966) 291.
46. *Wang, R. I. H.*: Determining Cholinesterase Activity in Human Plasma, *J. Am. Med. Ass.*, **183** (1963) 792.
47. *Härtel, A., Gross, W., Lang, H.*: Schnellbestimmung der Cholinesterase, *Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.*, **1** (1967) 26.
48. *Chouteau, J., Rancien, P., Karamanian, A.*: Recherches sur les estérases du sérum sanguin. I. Méthodes de détermination des activités cholinestérasiqque et tributyrinasiqque sérique, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **38**, (1956) 1329.

49. *Jørgensen, K.*: Automatic Recording of Cholinesterase Activities, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, *11*, (1959) 282.
50. *Jensen-Holm, J., Lausen, J. H., Milthers, K., Müller, K. O.*: Determination of the Cholinesterase Activity in Blood and Organs by Automatic Titration. With Some Observations on Serious Errors of the Method and Remarks of the Photometric Determination, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, *15* (1959) 384.
51. *Jensen-Holm, J.*: The Cholinesterase Activity, Alone and in the Presence of Inhibitors, at Low Substrate Concentrations, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, *18* (1961) 379.
52. *Jensen-Holm, J.*: A Titrimetric Method for Separate Determination of Specific and Non-Specific Cholinesterase Activity in the Absence and Presence of Irreversible Inhibitors (Paroxan and DFP), *Acta Pharmacol. Toxicol.*, *23* (1965) 73.
53. *Ravin, H. A., Tsou, K. C., Seligman, A. M.*: *J. Biol. Chem.*, *191* (1951) 843, — cit. po Witter (19).
54. *Main, A. R., Miles, K. E., Braid, P. E.*: The Determination of Human-Serum-Cholinesterase Activity with *o*-Nitrophenyl Butyrate, *Biochem. J.*, *78* (1961) 769.
55. *Potter, L. T.*: A Radiometric Microassay of Acetylcholinesterase, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, *156* (1967) 500.
56. *Meyer, A., Wilbrandt, W.*: Zur Bestimmung der Aktivität der Cholinesterasen im menschlichen Blute, *Helv. Physiol. Pharmacol.*, *12* (1954) 206, cit. po Augustinsson (18).
57. *Gal, F. M., Roth, E.*: Spectrophotometric Methods for Determination of Cholinesterase Activity, *Clin. Chim. Acta*, *2* (1957) 316.
58. *McOsker, D. E., Daniel, I. J.*: A Colorimetric Micro Method for the Determination of Cholinesterase, *Arch. Biochem. Biophys.*, *79* (1959) 1.
59. *Ellman, G. L., Courtney, Diane, K., Andres, U., Featherstone, R. M.*: A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity, *Biochem. Pharmacol.*, *7* (1961) 88.
60. *Salvador, R. A., Kuntzman, R.*: Cholinesterase of Adipose Tissue, *J. Pharmacol. Expt. Ther.*, *150* (1965) 84.
61. *Garry, Phil J., Routh, J. I.*: A Micro Method for Serum Cholinesterase, *Clin. Chem.*, *11* (1965) 91.
62. *Škrinjaric, M., Wilhelm, K.*: Adaption of the Spectrophotometric Method with Disulphide Reagent for Determining Human Plasma Cholinesterase, XV Internat. Congress Occup. Health, Wien, II-1, (1966) 489.
63. *Salafsky, B.*: A Comparison of Several Methods for the Determination of Acetylcholinesterase, *Arch. int. Pharmacodyn.*, *154* (1965) 184.
64. *Kramer, D. N., Gamson, R. M.*: Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity, *Anal. Chem.*, *30* (1958) 251.
65. *Humiston, C. G., Wright, G. J.*: An Automated Method for the Determination of Cholinesterase Activity, *Toxicol Appl. Pharmacol.* *10* (1967) 467.
66. *Ridgway, T. H., Mark, H. B.*: A Polarographic Method for Following the Rates of Cholinesterase-Catalysed Hydrolysis of Acetylthiocholine, *Anal. Biochem.*, *12* (1965) 357.
67. *Prince, A. K.*: Spectrophotometric Study of the Acetylcholinesterase-Catalysed Hydrolysis of 1-Methyl-Acetoxyquinolinium Iodides, *Arch. Biochem. Biophys.*, *118* (1966) 195.
68. *Prince, A. K.*: A Sensitive Fluorometric Procedure for the Determination of Small Quantities of Acetylcholinesterase, *Biochem. Pharmacol.*, *15* (1966) 411.
69. *Guilhault, G. G., Kramer, D. N.*: Fluorometric System Employing Immobilized Cholinesterase for Assaying Anticholinesterase Compounds, *Anal. Chem.*, *37* (1965) 1675.
70. *Fišerová-Bergerová, U.*: Polarographic Determination of Cholinesterase Activity, *Arch. Envir. Health*, *9* (1964) 437.

71. *Ho, A. K., Paddle, B. M., Freeman, S. E.*: The Estimation of the Activity of Acetylcholinesterase and Other Esterases in the Rat Brain by an Amperometric Method, *Biochem. Pharmacol.*, *14* (1965) 151.
72. *Courtain, C. C.*: Measurement of Hydrolysis of Acetylthiocholine with the Silver Thiol Electrode. Its Use in the Study of Serum Pseudocholinesterase Inhibition, *Anal. Biochem.*, *8* (1964) 184.
73. *Hestrin, S.*: The Reaction of Acetylcholine and Other Carboxylic Acid Derivatives with Hydroxyl-amine and its Analytical Application, *J. Biol. Chem.*, *180* (1949) 249.
74. *Metcalf, R. L.*: The Colorimetric Microestimation of Human Blood Cholinesterases and Its Application to Poisoning by Organic Phosphate Insecticides, *J. Econ. Ent.*, *44* (1951) 883.
75. *Fleischer, J. H., Pope, E. J.*: Colorimetric Method for Determination of Red Blood Cell Cholinesterase Activity in Whole Blood, *Arch. Ind. Hyg. Occupational Med.*, *9* (1954) 232.
76. *Sabine, J. C.*: The Clinical Significance of Erythrocyte Cholinesterase Titrers. A Method Suitable for Routine Clinical Use, and the Distribution of Normal Values, *Blood*, *10* (1955) 1132.
77. *Bonting, S. L., Featherstone, R. M.*: Ultramicro Assay of the Cholinesterases, *Arch. Biochem. Biophys.*, *61* (1956) 89.
78. *Melchiorri, P., Maffei, F.*: Ultramicro method for Determination of Cholinesterase in Biological Liquids and in Tissue of Test Animal and Human, *Arch. Ital. Sci. Farmacol.*, *3* (1963) 217. - cit. po *Chem. Abstr.*, *66* (1967).
79. *Wilson, I. B., Hatch, M. A., Ginsburg, S.*: Carbamylation of Acetylcholinesterase, *J. Biol. Chem.*, *235* (1960) 2312.
80. *Tabachnick, I. I. A.*: A Rapid, Spectrophotometric Assay of Purified Cholinesterase, *Biochem. Biophys. Acta*, *21* (1956) 580.
81. *Kalow, W., Lindsay, H. A.*: A Comparison of Optical and Manometric Methods for the Assay of Human Serum Cholinesterase, *Canad. J. Biochem. Physiol.*, *33* (1955) 568.
82. *Winteringham, F. P. W., Disney, R. W.*: Radiometric Assay of Acetylcholinesterase, *Nature*, *195* (1962) 1303.
83. *Winteringham, F. P. W., Disney, R. W.*: Radiometric Method for Estimating Blood Cholinesterase in the Field, *Bull. Wld Hlth Org.*, *30* (1964) 119.
84. *Winteringham, F. P. W., Disney, R. W.*: A Simple Method for Estimating Blood Cholinesterase, *Lab. Pract.*, *13* (1964) 739.
85. *Winteringham, F. P. W., Fowler, K. S.*: Substrate and Dilution Effects on the Inhibition of Acetylcholinesterase by Carmabates, *Biochem. J.*, *101* (1966) 127.
86. *Uandekar, M., Svetličić, B.*: Observations of the Toxicity of Three Anticholinesterase Insecticides in a Village-Scale Trial and Comparison of Methods Used for Determining Cholinesterase Activity, *Arh. hig. rada*, *17* (1966) 135.
87. *Disney, R. W.*: A Comparison of Two Methods of the Measurement of Cholinesterase Inhibition in Human Blood, *Biochem. Pharmacol.*, *15* (1966) 361.

Summary

METHODS OF ESTIMATING CHOLINESTERASE ACTIVITY

A review of the methods for measuring cholinesterase activity is presented, special emphasis being laid upon the methods developed in the past few years. Each method is discussed with regard to its applicability in toxicological (laboratory and field) analyses as well as in clinico-chemical work.

*Institute for Medical Research
Incorporating
the Institute of Industrial Hygiene,
Zagreb*

*Received for publication
December 8, 1967*