

NAŠA ISKUSTVA U PRIMJENI
ACHOLEST-METODE ZA ODREĐIVANJE
AKTIVNOSTI KOLINESTERAZE PLAZME
ČOVJEKA

R. PLEŠTINA

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada JAZU, Zagreb
(Primljeno 22. IV 1966)*

Utvrđeni su najpovoljniji uvjeti u kojima se dobivaju dosljedni rezultati pri određivanju aktivnosti kolinesteraze plazme Acholest-metodom. Provjeren je i proširen korekcionni faktor za temperaturu okoline pri kojoj se vrši mjerenje. Zbog svoje jednostavnosti metoda je prikladna za semikvantitativno određivanje aktivnosti kolinesteraze plazme velikog broja uzoraka, a napose u terenskim uvjetima.

Metode za određivanje aktivnosti kolinesteraze plazme nalaze sve veću primjenu ne samo pri ocjeni profesionalne odnosno akcidentalne ekspozicije antikolinesteraznim spojevima, već i kao pomoć pri dijagnostici- ranju različitih bolesti u kojih je poremećena sinteza proteina u jetri. S ciljem da se omogući rutinsko određivanje aktivnosti kolinesteraze plazme u manjim laboratorijima pa i na terenu, *Herzfeld* i *Stumpf* (1) izradili su jednostavan postupak, koji danas poznajemo pod imenom Acholest-metoda. Ta je metoda u relativno kratko vrijeme iskušana u Austriji (2, 3), Engleskoj (4), Švicarskoj (5, 6) i drugim zemljama (7, 8, 9). Budući da će ona zbog određenih prednosti vrlo vjerojatno naći i u nas primjenu, smatramo korisnim opisati je i iznijeti iskustva što smo ih stekli u našem laboratoriju pri njezinu uvođenju. U uvodu su iznesene osnovne karakteristike kolinesteraza kao i pregled metoda za mjerenje njihove aktivnosti.

OPĆENITO O KOLINESTERAZAMA I O PRINCIPIMA
METODA MJERENJA NJIHOVE AKTIVNOSTI

Kolinesteraze su grupa enzima koji hidroliziraju acetilkolin ili kolin- ske estere brže negoli druge estere. S obzirom na funkciju, distribuciju u organizmu, kao i s obzirom na njihove biokemijske karakteristike, di- jelimo ih u dvije podgrupe: specifične i nespecifične. Fiziološka funkcija specifične ili prave kolinesteraze je razgradnja acetilkolina pošto je on

izvršio svoju funkciju transmisije impulsa. Zato se specifična kolinesteraza nalazi na mjestima fiziološkog djelovanja acetilkolina, tj. u blizini nervnih sinapsa i mioneuralnih ploča. Nije, međutim, poznato zbog čega se specifična kolinesteraza nalazi u eritrocitima. Nespecifična kolinesteraza, nazvana još i pseudokolinesteraza nalazi se u serumu u različitim aktivnostima, zavisno od životinjske vrste (serumska kolinesteraza), a u većoj ili manjoj mjeri u gotovo svim tkivima. Serumska kolinesteraza stvara se u jetri, a njezina fiziološka funkcija nije razjašnjena.

Premda se osjetljivost serumske i mozgovne kolinesteraze često znatno razlikuju u odnosu na djelovanje kolinesteraznih inhibitora, mjerenje aktivnosti serumske kolinesteraze može nam dati uvid u aktivnost specifične kolinesteraze mozga u osoba eksponiranih antikolinesteraznim spojevima (10). Pored toga, smanjena aktivnost serumske kolinesteraze, ukoliko se ne radi o inhibiciji, ukazuje na smetnju njezina stvaranja u jetri i time indirektno na neka patološka stanja u organizmu, koja ometaju sintezu proteina. Tako smanjenu aktivnost serumske kolinesteraze nalazimo kod nekih bolesti jetre (11, 12), žestokih infekcija i neoplazmi (12). Lijekovi koji se ne smatraju izrazitim antikolinesterazama – sukcinil-kolin, neki opijati, barbiturati, largaktil, kinidin i drugi (13, 14) – također mogu izazvati smanjenje aktivnosti serumske kolinesteraze.

Kolinesteraza katalizira hidrolizu acetilkolina na kolin i octenu kiselinu. Metode za određivanje aktivnosti kolinesteraze temelje se bilo na mjerenju brzine nestajanja supstrata, ili na mjerenju brzine nastajanja jednog od razgradnih produkata hidrolize. Neke metode mjere brzinu hidrolize acetilkolina spektrofotometrijskim (15) ili radiometrijskim (16) određivanjem preostalog supstrata. Neke se metode baziraju na hidrolizi tiokolinskih estera i mjeri se produkt hidrolize – tiokolin (17). Većina metoda zasniva se, međutim, na mjerenju hidrolizom stvorene octene kiseline, a njezina je količina u direktnoj zavisnosti od aktivnosti enzima i može se mjeriti elektrometrijski (18), manometrijski (19, 20) i kolorimetrijski uz pomoć indikatora (21–24). Indikatorske metode mjere promjenu boje indikatora, tako da se u određenom vremenu pomoću komparatorske skale očita aktivnost enzima ili da se mjeri potrebno vrijeme da indikatorom obojena reakcijska smjesa poprimi određenu boju.

Jedna od novijih indikatorskih metoda je Acholest-metoda.

OPIS ACHOLEST-METODE

Princip metode

U Acholest-metodi koriste se indikatorski papirići, tzv. kontrolni i test-papirići, koji su naročito pripremljeni u tu svrhu. Test-papirić je impregniran supstratom i indikatorskom bojom (kemijski sastav spomenutih komponenata proizvođač* ne deklarira).

* Österreichische Stickstoffwerke AG. Linz/Donau, Austria, E. Fougere & Company, Inc., Hicksville, N. Y.

Kolinesteraza seruma hidrolizira supstrat, te se boja test-papirića uslijed stvaranja octene kiseline postepeno mijenja iz početne plave u žuto-zelenu. Kontrolni papirić – nakvašen serumom – poprima odmah žuto-zelenu boju, koja se više ne mijenja. Vrijeme potrebno da se boja test-papirića izjednači s bojom kontrolnog papirića je mjera aktivnosti kolinesteraze.

Materijal i pribor

- (1) Acholest-papirići (test-papirići i kontrolni) u originalnom pakovanju. (Za analizu se koristi po jedna polovica svakog papirića).
- (2) Predmetna stakalca (besprijekorno čista) i kvačice
- (3) Mikropipete
- (4) Termometar
- (5) Zaporna ura (štoperica)
- (6) Mala šiljata pinceta i škarice
- (7) Petrijeve šalice s filtrir-papirima
- (8) Pribor za vadenje krvi iz prsta (ili vene) i pribor za odvajanje plazme.

Postupak

Pri vadenju krvi iz prsta koriste se heparinizirane kapilare (2×100 mm), koje se nakon punjenja zatale na jednom kraju i zatim se plazma odvoji centrifugiranjem (25).

Na sredinu lijeve i desne polovice predmetnog stakalca stavi se mikropipetom po 50 μ l plazme. Pri ispuhivanju treba paziti da se ne stvore mjehurići. Nanesena kap plazme uzdužno se razvuče, tako da poprimi elipsoidni oblik. Zatim se pincetom položi kontrolni papirić na jednu kap seruma, a u »0« vrijeme na isti se način stavi test-papirić na drugu kap. Sve se pokrije drugim predmetnim stakalcem, komprimira i stavi u vlažnu komoricu (Petrijeva šalica s vlažnim filtrir-papirom na dnu). Zapornom urom registrira se vrijeme koje je potrebno da se boja test-papirića izjednači s bojom kontrolnog papirića.

Izračunavanje rezultata

Izmjereno vrijeme je mjera aktivnosti kolinesteraze. Prema priloženim uputama proizvođača (Osterreichische Stickstoffwerke AG) vrijeme do 5 minuta odgovara povećanoj aktivnosti, od 6–18 minuta normalnoj, od 19–35 sniženoj, a od 36–150 minuta jako sniženoj aktivnosti kolinesteraze plazme. Vrijednosti koje navodi drugi proizvođač (E. Fougere & Company) neznatno se razlikuju.

Aktivnost kolinesteraze plazme može se izraziti proizvoljnim jedinicom, koristeći se formulom (5):

$$\text{Jedinica aktivnosti} = \frac{1000 \cdot f}{\text{minute}}$$

gdje je f korekcionni faktor za temperaturu okoline pri kojoj se mjeri. *Richerich* (5) je u tu svrhu izradio tablicu korekcionnih faktora za temperature od 15–30° C, pomoću kojih se izmjerene aktivnosti mogu svesti na aktivnost pri 20° C.

NAŠA ISKUSTVA PRI UVOĐENJU ACHOLEST-METODE

Utvrđivanje najpovoljnijih uvjeta za mjerenje

Pri uvođenju Acholest-metode zapazili smo da je za *jednolikost* razvijanja boje od velikog značaja snaga pritiska kojom je test-papirić komprimiran između stakalaca i količina dodane plazme. Da bismo utvrdili najpovoljnije uvjete za primjenu Acholest-metode, varirali smo u našim pokusima bilo jačinu kompresije ili količinu dodane plazme.

Upotrijebili smo 4 uzorka ljudske plazme različite kolinesterazne aktivnosti, kako smo to prije utvrdili titrigrafskom metodom. Krv smo uzeli venepunkcijom u heparinizirane epruvete, i plazmu odvojili centrifugiranjem. Aktivnost kolinesteraze određivali smo pri $20 (\pm 0.5)^{\circ} \text{C}$ i postupak se nije razlikovao od prije opisanog. U 4 serije pokusa varirali smo volumen plazme i kompresiju stakalaca, kao što je navedeno u tablici 1. U seriji pokusa I i II (*»bez kompresije«*) kontrolni i test-papirić samo smo pokrili drugim predmetnim stakalcem, pri čemu su papirići bili pritisnuti samo težinom stakalca. U seriji pokusa III i IV (*»s kompresijom«*) izvršili smo relativno jaku kompresiju na taj način da smo, pokrivši papiriće drugim predmetnim stakalcem, stisnuli oba stakalca sa tri snažne kvačice za rublje (sl. 1). Učinak volumena aplicirane plazme i kompresije stakalaca na brzinu reakcije i jednolikost razvijanja boje sumarno je prikazan u tablici 1.

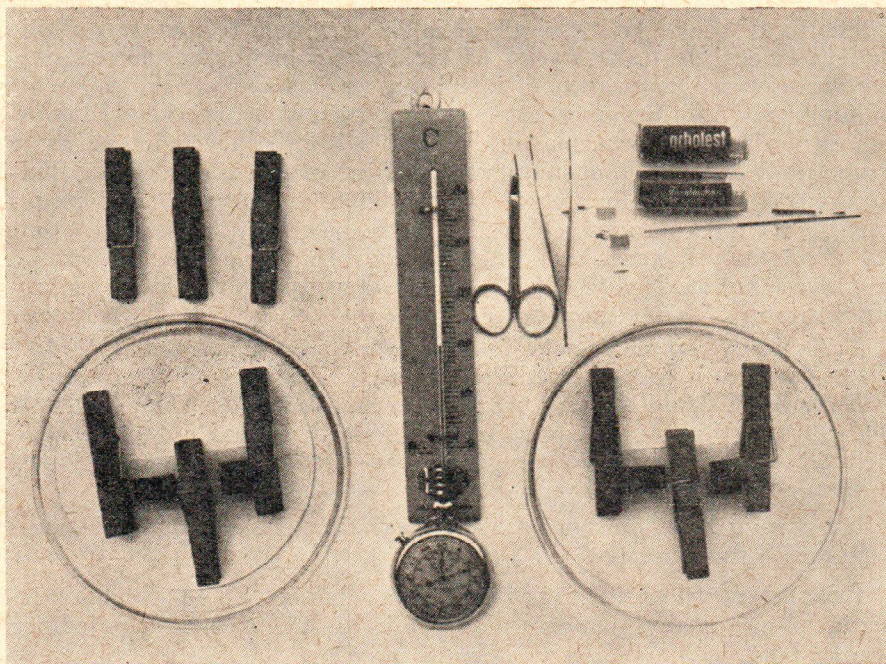
Tablica 1.

Učinak volumena aplicirane plazme i kompresije stakalaca na brzinu reakcije i jednolikost razvijanja boje

Serija	Eksperimentalni uvjeti		Trajanje reakcije (min.)				Opaska
	Volumen plazme (μl)	Kompresija	Uzo-rak 1	Uzo-rak 2	Uzo-rak 3	Uzo-rak 4	
I	25	—	43.5	30.0	21.5	26.0	Reakcija spora; na jednom papiriću nešto teže očitavanje zbog nejednolikog razvijanja boje
II	50	—	46.0	30.0	?	23.0	Reakcija spora; na svim papirićima očitavanja vrlo teška zbog nejednolikog razvijanja boje
III	25	+	25.5	23.5	14.0	13.5	Reakcija brza; na svim papirićima očitavanja teška zbog nejednolikog razvijanja boje
IV	50	+	23.0	20.5	9.5	11.5	Reakcija brza; jednoliko razvijanje boje; očitavanje bez teškoća

Za sva 4 uzorka plazme mogli smo utvrditi ove zajedničke karakteristike:

Brzina reakcije ne zavisi od volumena plazme, dok se reakcija znatno ubrzava primijeni li se kompresija papirića. Jednolikost razvijanja boje zavisi, međutim, i od volumena plazme i od jačine kompresije. Kad se u postupku upotrijebi 25 μ l plazme »bez kompresije«, u reakciju ulazi $\frac{1}{3}$ do $\frac{1}{2}$ test-papirića i boja se na toj površini jednoliko mijenja. U po-



Sl. 1. Način kompresije papirića pri mjerenju aktivnosti kolinesteraze plazme Acholest-metodom

kusima sa 25 μ l plazme »s kompresijom« reagira gotovo cijela površina papirića; ali, natopljenost pojedinih dijelova papirića nije posvuda jednaka, a to uzrokuje nejednoliko razvijanje boje i otežava očitavanje rezultata. Kad se pokus vrši sa 50 μ l plazme »bez kompresije«, razvijanje boje je do te mjere nejednoliko, da je očitavanje rezultata gotovo nemoguće. Najujednačnije vrijednosti postižu se sa 50 μ l plazme uz primjenu kompresije pomoću kvačica (IV serija pokusa). Razvijanje boje je brzo i jednoliko i očitavanja se mogu vršiti bez teškoća. Pokazalo se, međutim, da je volumen od 50 μ l plazme nešto prevelik u odnosu na veličinu papirića i da zbog toga nakon kompresije dolazi do razlijevanja plazme i ispiranja boje s papirića u okolinu. Premda ta pojava nije utjecala ni na brzinu reakcije ni na jednolikost razvijanja boje, za dalje

pokuse odabrali smo kao najprikladniji volumen plazme od 40 μ l. Tako odabrani eksperimentalni uvjeti davali su dosljedne rezultate u svim daljnim pokusima.

Provjeravanje korekcionog faktora za različite temperature okoline

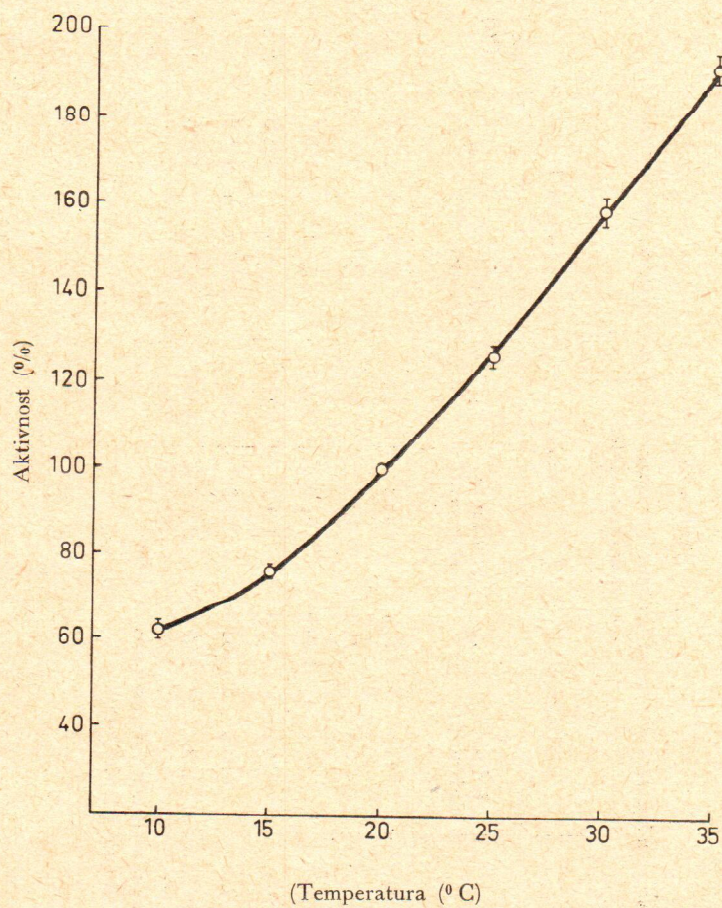
Budući da brzina svake enzimске reakcije zavisi od temperature, pri mjerenju aktivnosti kolinesteraze Acholest-metodom temperatura okoline igra veliku ulogu. *Richterich* (5) daje eksperimentalno dobivene korekzione faktore za preračunavanje rezultata dobivenih Acholest-metodom pri različitim temperaturama okoline. Spomenuti korekcionni faktori bili su korišteni za izračunavanje rezultata mjerenja vršenih na dvije grupe ljudi (26) i pri tom su nađene značajne razlike u srednjim vrijednostima aktivnosti kolinesteraze. Budući da su mjerenja bila vršena pri različitim temperaturama, dobivene razlike mogle su se tumačiti i time da *Richterichovi* korekcionni faktori nedovoljno kompenziraju razliku u temperaturama. Naš je cilj bio da taj faktor provjerimo i da ga proširimo na niže i više temperature.

Kao i u prije opisanim pokusima, i ove smo pokuse radili na 4 ljudske plazme različitih kolinesteraznih aktivnosti. Prostoriju od 12 m³ održavali smo na zadanoj temperaturi (10, 15, 20, 25, 30 i 35° C) uz oscilacije od $\pm 0.5^{\circ}$ C. Plazmu i sav potrebni pribor držali smo na određenoj temperaturi do uspostavljanja temperaturnog izjednačenja, i prije samog mjerenja provjerili smo temperaturu svakog uzorka plazme.

Na osnovu prije opisanog iskustva, primijenili smo 40 μ l plazme i kompresiju stakalaca pomoću 3 kvačice.

Pri temperaturi od 20° C, za svaki smo uzorak izvršili 4 paralelna mjerenja, a pri ostalim temperaturama mjerili smo aktivnost pojedinog uzorka po 2 puta. Srednje vrijednosti mjerenja aktivnosti u minutama izrazili smo u jedinicama aktivnosti, pomnoživši njihovu recipročnu vrijednost sa 1000. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 2. Pri tom su, pored jedinica aktivnosti, prikazani procenti aktivnosti za određenu temperaturu. Procenete smo izračunali na osnovu aktivnosti izmjerene pri 20° C, koju smo uzeli kao 100% vrijednost. Zadnje dvije kolone prikazuju srednje vrijednosti dobivenih postotaka i njihove standardne pogreške. Grafički prikaz tih vrijednosti dan je na sl. 2.

Iz krivulje (sl. 2) dobivene povlačenjem kroz tačke srednjih vrijednosti postotaka aktivnosti grafički smo očitali aktivnost enzima za svaki stupanj C. Izračunani korekcionni faktori (f) u odnosu na temperaturu od 20° C prikazani su na tablici 3. Oni se neznatno razlikuju od faktora koje navodi *Richterich* (5). Prema tome, korekcionni faktori nisu razlog spomenutih neslaganja koja su dobivena pri terenskim mjerenjima aktivnosti kolinesteraze Acholest-metodom (26).



Sl. 2. Zavisnost aktivnosti kolinesteraze plazme od temperature okoline. Aktivnosti su izražene u postocima, pri čemu je aktivnost određena na 20° C uzeta kao 100%. Svaka tačka predstavlja srednju vrijednost (sa standardnom pogreškom) dobivenu na 4 različita uzorka plazme

Tablica 2.
 Aktivnost kolimesteraze plazme čovjeka određena Acholest-metodom pri različitim
 temperaturama okoline

Tempe- ratura (°C)	Uzorak 1		Uzorak 2		Uzorak 3		Uzorak 4		\bar{x} (%)	s_x
	Jedinice aktivnosti*	%	Jedinice aktivnosti*	%	Jedinice aktivnosti*	%	Jedinice aktivnosti*	%		
10	28.0	64.7	35.5	65.6	48.8	56.1	40.6	60.4	61.7	2.19
15	32.8	75.7	42.3	78.2	62.5	71.8	52.5	77.7	75.8	1.44
20	43.3	100.0	54.1	100.0	87.0	100.0	67.2	100.0	100.0	—
25	55.6	128.6	70.2	129.8	111.1	127.8	81.3	121.0	126.8	1.98
30	69.0	159.5	90.9	168.0	137.9	158.5	100.0	148.9	158.7	3.65
35	83.3	192.3	108.1	199.5	160.0	184.0	129.0	192.0	192.0	3.32

* Recipročna vrijednost trajanja reakcije u minutama $\times 1000$
 (srednja vrijednost od 2 odnosno 4 mjerenja)

Tablica 3.

Korekcionni faktori za različite temperature okoline dobiveni na osnovu mjerenja aktivnosti 4 različita uzorka plazme

Temperatura okoline (°C)	f	Temperatura okolice (°C)	f
10	1.62	23	0.86
11	1.57	24	0.82
12	1.51	25	0.79
13	1.45	26	0.75
14	1.39	27	0.72
15	1.32	28	0.69
16	1.25	29	0.66
17	1.18	30	0.63
18	1.12	31	0.61
19	1.06	32	0.58
20	1.00	33	0.56
21	0.95	34	0.54
22	0.91	35	0.52

DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Metoda što smo je uveli u naš laboratorij ima nekoliko obilježja po kojima se izdvaja od ostalih. Zamišljena kao rutinska metoda, ona zahtijeva jednostavan pribor, a sam postupak moguće je brzo i lako savladati. Budući da spada u mikrometode, potrebnu količinu krvi možemo dobiti iz jagodice prsta. Za razliku od svih ostalih metoda, aktivnost enzima se mjeri u nerazrijeđenoj plazmi, a to može biti od značaja pri određivanju aktivnosti kolinesteraze inhibirane reverzibilnim inhibitorima (4). Treba, međutim, istaći i neke nedostatke. Metoda je samo semikvantitativna. Povrh toga, trajanje reakcije zavisi od aktivnosti kolinesteraze, pa će vrijeme mjerenja jače inhibiranih uzoraka biti neprikladno dugačko. Acholest-metodom može se mjeriti samo aktivnost kolinesteraze plazme, ali ne i eritrocita ili pune krvi. Na kraju, naoko nevažni faktori u samom postupku mogu izazvati nejednoliko razvijanje boje i time onemogućiti očitavanje rezultata.

Vrijednosti koje smo mi dobili – izražene u minutama trajanja reakcije – bile su u pravilu za oko 5 minuta duže od onih koje navode proizvođači. Ni modificiranjem postupka nismo uspjeli dobiti bolje slaganje. Treba, međutim, istaknuti da proizvođači dopuštaju relativno široki raspon temperature (19–25° C) unutar kojeg se može raditi, a da pri tom ne spominju korekcionu faktor za temperaturu.

Našim smo pokusima utvrdili najpovoljnije eksperimentalne uvjete pri kojima se dobivaju dosljedni rezultati. Za optimalni volumen plazme, koji se nanosi na stakalce, smatramo 40 μ m plazme; uz to je potrebno primijeniti snažnu kompresiju papirića.

Držimo da će Acholest-metoda zbog svoje jednostavnosti korisno poslužiti za rutinsko mjerenje velikog broja uzoraka, napose u nepovoljnim terenskim uvjetima, gdje je dovoljna samo gruba ocjena aktivnosti enzima.

Literatura

1. Herzfeld, E., Stumpf, C.: Wien. klin. Wschr., 67 (1955) 874.
2. Sailer, S., Braunsteiner, H.: Klin. Wschr., 37 (1959) 986.
3. Kellen, J.: Wien. klin. Wschr., 73 (1961) 34.
4. Churchill-Davidson, H. C., Griffiths, W. J.: Brit. Med. J., 2 (1961) 994.
5. Richterich, R.: Schweiz. med. Wschr., 92 (1962) 263.
6. Rieder, H. P.: Schweiz. med. Wschr., 95 (1965) 969.
7. Jabsa, Z., Schönfelder, M., Breuer, H.: Klin. Wschr., 39 (1961) 966.
8. Decik, Ju. I.: Laboratornoje djelo, 10 (1963) 34.
9. Lapis, J., Alina, M., Szymanska, H.: Pol. tyg. lek., 16 (1961) 1848.
10. Pleština, R., Vandekar, M.: neobjavljeni rezultati.
11. Lamotta, R. U.: Gastroenterology, 33 (1957) 50.
12. Williams, H. M., Lamotta, R. U., Wetstone, H. J.: Gastroenterology, 33 (1957) 58.
13. Lane, A. C., MacFarlane, I. R., McCoubrey, A.: Biochem. Pharmacol., 15 (1966) 122.
14. Kalow, W., Maykut, M. O.: J. Pharm. Exptl. Therap., 116 (1956) 418.
15. Hestrin, Sh.: J. Biol. Chem., 180 (1949) 249.
16. Winteringham, F. P. W., Disney, R. W.: Bull. Wld Hlth Org., 30 (1964) 119.
17. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, U., Featherstone, R. M.: Biochem. Pharmacol., 7 (1961) 88.
18. Michel, H. O.: J. Lab. Clin. Med., 34 (1949) 1564.
19. Ammon, R.: Arch. ges. Physiol., 233 (1933) 486.
20. Aldridge, W. N.: Biochem. J., 46 (1950) 451.
21. Wolfsie, J. H., Winter, G. D.: Arch. Ind. Hyg. Occupational Med., 9 (1954) 396.
22. Davies, D. R., Nicholls, J. D.: Brit. Med. J., 1 (1955) 1373.
23. Limperos, G., Ranta, K. E.: Science, 117 (1953) 453.
24. Edson, E. F.: World Crops, 10 (1958) 49.
25. Stubbs, J. L., Fales, J. T.: Amer. J. med. Technol., (1960) 25.
26. Vandekar, M., Svetličić, B.: Arh. hig. rada, 17 (1966) 135.

*Summary*OUR EXPERIENCE IN APPLYING ACHOLEST METHOD
FOR DETERMINATION OF HUMAN PLASMA
CHOLINESTERASE ACTIVITY

Optimum experimental conditions for obtaining reliable results in determination of plasma cholinesterase activity by Acholest method have been described. Correction factor for environmental temperature at which the measurement is taking place has been checked.

Owing to its simplicity the method has proved convenient for semiquantitative determination of plasma cholinesterase activity in a large number of samples particularly under field conditions.

Received for publication
April 22, 1966

Institute for Medical Research
incorporating the Institute of
Industrial Hygiene, Zagreb

Kemijski kombinat

CHROMOS - KATRAN - KUTRILIN

ZAGREB

proizvodi u bogatom asortimanu i priznatoj kvaliteti

PREMAZNA SREDSTVA ZA

- METALNU INDUSTRIJU
- DRVNU INDUSTRIJU
- BRODOGRADNJU
- SPECIJALNE NAMJENE

ŠTAMPARSKE BOJE

POMOĆNA SREDSTVA ZA TEKSTILNU, KOŽARSKU, GUMARSKU
I SAPUNSKU INDUSTRIJU

ORGANSKE KEMIKALIJE I BOJE

UMJETNE MATERIJE

MIRISE I MIRISNE KOMPOZICIJE

SREDSTVA ZA ZAŠTITU BILJA

PIGMENTE

BRUSNE PROIZVODE

BITUMENSKO KATRANSKE PROIZVODE

Za detaljne informacije izvolite se obratiti na našu adresu:

Kemijski kombinat CHROMOS-KATRAN-KUTRILIN
ZAGREB, RADNIČKA CESTA ĐURE ĐAKOVIĆA BROJ 43