

KOLINESTERAZE
BIOKEMIJSKE KARAKTERISTIKE I METODE
ODREĐIVANJA AKTIVNOSTI

ELSA REINER

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

(Primljeno 20. IV. 1958.)

Prikazane su neke biokemijske karakteristike kolinesteraza s osvrtom na mehanizam hidrolize supstrata. Opisane su laboratorijske i terenske metode za određivanje aktivnosti kolinesteraza kao i primjena tih metoda u kliničkim laboratorijima.

Grupu enzima, koja hidrolizira acetilkolin i kolinske estere brže nego bilo koje druge estere, zovemo kolinesteraze. Posljednjih godina postoji za tu grupu enzima sve veći interes u vezi s primjenom organofosfornih pesticida u poljoprivredi i javnom zdravstvu. Biokemijska i farmakološka istraživanja tih pesticida pokazuju, da se toksični učinak organofosfornih spojeva može tumačiti njihovim inhibitornim djelovanjem na kolinesterazu.

DISTRIBUCIJA I KLASIFIKACIJA KOLINESTERAZA

Grupa kolinesteraza veoma je raširena kod životinja, dok je biljke uopće nemaju. Ona je nađena kod gotovo svih životinjskih vrsta, pače i kod jednostaničnih organizama sa cilijarnim pokretnim aparatom. U organizmu sisavaca gotovo nema tkiva, koje ne sadržava kolinesterazu (4, 28, 30). Svojstva pojedinih članova grupe kolinesteraza među sobom se razlikuju, ali se unatoč tome kolinesteraze dijele u dvije podgrupe, i to na specifične i nespecifične kolinesteraze. Ta je razdioba donekle opravdana s obzirom na njihovu dosad poznatu fiziološku funkciju i s obzirom na određene fizikalno-kemijske i biokemijske karakteristike.

Specifična kolinesteraza vezana je gotovo isključivo uz živčani i mišićni sistem. Ona je naročito koncentrirana u nervnim i ganglijskim sinapsama. Velike količine specifične kolinesteraze nalaze se u svojoj supstanciji mozga, a vrlo mnogo specifične kolinesteraze imaju električni organi nekih riba. Fiziološka funkcija specifične kolinesteraze je hidroliza acetilkolina u nervnim i ganglijskim sinapsama. Specifična kolinesteraza hidrolizira acetilkolin u retraktornoj periodi između dva impulsa. Dokazivanje acetilkolina, koji se oslobađa u sinapsama, moguće je samo ako se prethodno inhibira specifična kolinesteraza, jer je enzimatska hidroliza izlučenog acetilkolina veoma brza.

Osim na mjestima, gdje specifična kolinesteraza vrši svoju fiziološku funkciju, nalazimo velike količine specifične kolinesteraze i u stromi eritrocita i u nekim tkivima, za koja se pretpostavlja da uopće nemaju živaca, kao na primjer u placenti. Uloga specifične kolinesteraze na tim mjestima nije zasad poznata.

Nespecifična kolinesteraza nalazi se također u centralnom i perifernom nervnom sistemu, ali u mnogo manjim koncentracijama nego specifična. Osim toga se nespecifična kolinesteraza nalazi u gotovo svim tkivima u manjoj ili većoj količini, a naročito je koncentrirana u serumu. Fiziološka funkcija nespecifične kolinesteraze nije poznata.

Specifična i nespecifična kolinesteraza ne razlikuju se samo po fiziološkoj funkciji i odgovarajućoj distribuciji u organizmu nego i prema nekim drugim karakteristikama. Jedna od osnovnih razlika između specifične i nespecifične kolinesteraze je zavisnost njihove aktivnosti od koncentracije supstrata (4, 30). Specifična kolinesteraza ima velik afinitet prema acetilkolinu i hidrolizira pod optimalnim uvjetima acetilkolin brže nego bilo koji drugi ester. Kao optimalni uvjeti razumijeva se određena temperatura, pH i, u prvom redu, određena koncentracija acetilkolina. Koncentracije acetilkolina, koje su veće od optimalne, inhibiraju specifičnu kolinesterazu. Većina supstrata, a ne samo acetilkolin, inhibira u velikim koncentracijama specifičnu kolinesterazu.

Nespecifična kolinesteraza ima najveći afinitet prema butirilkolinu, a manji afinitet prema acetilkolinu. Za razliku od specifične kolinesteraze, aktivnost nespecifične kolinesteraze nema optimalno područje koncentracije supstrata. Aktivnost nespecifične kolinesteraze povećava se s povećanjem koncentracije supstrata do neke maksimalne vrijednosti, a daljnjim povećanjem koncentracije supstrata aktivnost ostaje nepromijenjena.

Nazivi specifična i nespecifična kolinesteraza nisu jedini, koji se upotrebljavaju za te dvije podgrupe kolinesteraza. Specifična kolinesteraza često se naziva acetilkolinesteraza, da se istakne njezin veliki afinitet prema acetilkolinu. Analogno tome zove se nespecifična kolinesteraza butirilkolinesteraza. Ostali nazivi za specifičnu kolinesterazu su prava ili alfa-kolinesteraza, a za nespecifičnu serumska, tkivna, pseudo ili beta kolinesteraza.

BIOKEMIJSKE KARAKTERISTIKE KOLINESTERAZA

Kolinesteraza nije izolirana u čistom stanju, a o kemijskom sastavu toga enzima zna se zasad veoma malo. Ispitivanjem afiniteta kolinesteraza prema različitim supstratima i inhibitorima došlo se međutim do određene predodžbe o strukturi aktivnog centra, dakle onog dijela kolinesteraze, na koji se veže supstrat prilikom hidrolize.

Aktivni centar kolinesteraze sastoji se iz dva dijela, a to su esterska strana i anionska strana (7, 10, 24, 31). Esterska strana aktivnog centra je onaj dio enzima, na kojemu se hidrolizira esterska veza, i zato se svaki supstrat kolinesteraze mora vezati na taj dio enzimske molekule. Esterska strana privlači i veže karbonilnu grupu estera i smatra se, da u vezanju supstrata na estersku stranu sudjeluju elektrostatske sile. Kolinesteraza ima veći afinitet prema onim supstancijama, koje imaju jače polariziranu karbonilnu vezu, a to je među ostalima dokazano na seriji derivata nikotinske kiseline (9).

Vežanje supstrata na anionsku stranu aktivnog centra nije bitni dio procesa hidrolize. Anionska strana ima izrazito nukleofilni karakter i ona privlači one supstrate, koji imaju u molekuli pozitivan naboj ili pozitivnu atomsku skupinu (24, 31). Iako anionska strana ne sudjeluje u procesu hidrolize, ona povećava afinitet kolinesteraze prema pozitivno nabijenim supstratima. Tako na primjer kolinesteraza ima veoma veliki afinitet prema acetilkolinu, koji je kvarterna amonijeva baza, a znatno manji afinitet prema gama-dimetilbutiril-acetatu, koji namjesto kvarternog dušika ima neutralni ugljik (30).

Esterska i anionska strana kolinesteraze nalaze se na određenoj udaljenosti jedna od druge, pa pristajanje supstrata uz aktivni centar zavisi od udaljenosti karbonilne grupe od pozitivnog naboja u molekuli supstrata (8, 10).

Istraživanje kemijskog sastava aktivnog centra dovelo je posljednjih godina do određene predodžbe o mogućoj kemijskoj strukturi tog dijela kolinesteraze. *Bergman* i *Wilson* (7, 32) zaključuju prema promjeni aktivnosti kolinesteraze sa pH-om, da bi se u aktivnom centru kolinesteraze mogao nalaziti histidin.

Specifična i nespecifična kolinesteraza razlikuju se u mnogim svojstvima i zato je vjerojatno, da se one razlikuju i u strukturi aktivnog centra. Prema *Michaelis-Mentenovoj* teoriji o djelovanju enzima na supstrat (22) veže se u prvoj fazi reakcije jedna molekula supstrata na jednu molekulu enzima stvarajući nestabilni kompleks. Taj kompleks odgovara kod kolinesteraze vezanju estera na estersku i anionsku stranu aktivnog centra (5). Tako nastali nestabilni kompleks brzo se raspada na reakcione produkte i slobodni enzim. To kod kolinesteraze odgovara hidrolizi estera na kiselinu, alkohol i slobodnu kolinesterazu. Općenito

vrijedi, da je brzina enzimskih reakcija to veća, što je veća koncentracija kompleksa enzim-supstrat, a to znači, što je veća koncentracija supstrata. Ta postavka vrijedi samo za nespecifičnu kolinesterazu, jer je samo kod nespecifične kolinesteraze aktivnost proporcionalna koncentraciji supstrata, a maksimalna kod velikih koncentracija supstrata. Aktivnost specifične kolinesteraze raste s povećanjem koncentracije supstrata do neke maksimalne vrijednosti, a s daljim povećanjem koncentracije supstrata aktivnost pada. Specifična kolinesteraza ima prema tome područje optimalne aktivnosti, a koncentracije veće od optimalne inhibiraju specifičnu kolinesterazu.

S obzirom na strukturu aktivnog centra ta se činjenica tumači tako, da se specifičnoj kolinesterazi pripisuju dvije anionske i jedna esterska strana, a nespecifičnoj kolinesterazi jedna anionska i jedna esterska strana (7, 8, 10). Inhibicija specifične kolinesteraze sa suviškom supstrata tumači se tako, da se pretpostavlja, da se dvije molekule supstrata vežu svaka na jednu anionsku stranu preko svojih pozitivnih naboja, a zbog prostornih smetnja ne može nijedna molekula supstrata doći do esterske strane. Kompleks kolinesteraze sa dvije molekule supstrata je prema tome neaktivan.

Mnoge supstancije inhibiraju kolinesterazu kompetitivno ili nekompetitivno (5). Kompetitivni inhibitori su one supstancije, koje se vežu samo na aktivni centar enzima, a nekompetitivni inhibitori vežu se na bilo koje mjesto u enzimu. U pravilu kompetitivno inhibiraju enzim one supstancije, koje imaju određenu sličnost sa supstratom, s obzirom na strukturu molekule i raspodjelu naboja. Zbog te se sličnosti kompetitivni inhibitori mogu vezati na aktivni centar kao i supstrati, a to znači, da se oni sa supstratom natječu za isto mjesto u enzimu. Stupanj inhibicije kod kompetitivnih inhibitora zavisi zato od koncentracije supstrata tako, da velike koncentracije supstrata mogu spriječiti kompetitivnu inhibiciju. Kompetitivni inhibitori kolinesteraze vežu se ili na estersku stranu ili na anionsku stranu ili na obje strane aktivnog centra, a mogu biti reverzibilni ili ireverzibilni. Reverzibilni inhibitori stvaraju s enzimom nestabilni kompleks, a ireverzibilni inhibitori stabilno se vežu na aktivni centar kolinesteraze.

Kompetitivni reverzibilni inhibitori kolinesteraze, koji se vežu samo na estersku stranu aktivnog centra, jesu na primjer uretani. Uretani se vežu na estersku stranu preko karbonilne grupe kao i supstrati kolinesteraze. Amonijeve baze inhibiraju kolinesterazu vežući se na anionsku stranu aktivnog centra preko elektropozitivnih atoma ili atomskih skupina u molekuli poput kvarternog dušika u acetilkolinu. Naročito su efikasni oni kompetitivni inhibitori, koji se mogu vezati na estersku i na anionsku stranu aktivnoga centra, kao na primjer prostigmin.

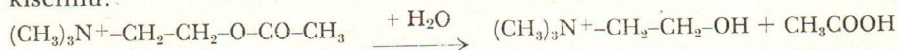
Kompetitivni ireverzibilni inhibitori kolinesteraze su organofosforni spojevi, koji se vežu na estersku stranu preko elektrofilnog fosfora. O djelovanju organofosfornih spojeva na kolinesterazu bit će govora na drugom mjestu (29).

ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KOLINESTERAZE

Određivanje aktivnosti kolinesteraze ima veliko značenje u higijeni rada i toksikologiji, jer se tom metodom određuje stupanj ekspozicije i potvrđuje dijagnoza otrovanja organofosfornim spojevima. Organofosforni spojevi mnogo se upotrebljavaju kao insekticidi, pa se zbog njihove velike primjene u poljoprivredi naglo povećava broj otrovanja. Zbog toga se javila potreba da se razviju pouzdane kliničke i terenske metode za određivanje aktivnosti kolinesteraze.

Aktivnost kolinesteraze mjeri se određivanjem količine supstrata, koji kolinesteraza hidrolizira u jedinici vremena (27). Brzina hidrolize supstrata mjeri se određivanjem koncentracije supstrata na početku i na kraju hidrolize ili mjerenjem jednog od raspadnih produkata supstrata na kraju hidrolize. Budući da specifična i nespecifična kolinesteraza imaju prema acetilkolinu veliki afinitet, a acetilkolin je i fiziološki supstrat specifične kolinesteraze, kod većine metoda upotrebljava se za određivanje aktivnosti acetilkolin. To naročito vrijedi pri određivanju u kliničkim laboratorijima.

Acetilkolin se djelovanjem kolinesteraze raspada na kolin i octenu kiselinu:



Određivanje aktivnosti kolinesteraze svodi se u principu na određivanje koncentracije acetilkolina, kolina ili octene kiseline, odnosno koncentracije vodikovih iona.

Metode, kod kojih se aktivnost kolinesteraze mjeri određivanjem koncentracije kolina, za sada se ne upotrebljavaju.

Koncentracija acetilkolina može se odrediti biološkim ili kemijskim metodama. Kod bioloških metoda (5) se koncentracija acetilkolina određuje mjerenjem djelovanja acetilkolina na kontrakciju mišića ili na sniženje krvnog tlaka. Tim se metodama mogu odrediti veoma male koncentracije acetilkolina, ali se unatoč tome biološke metode danas rijetko upotrebljavaju, jer su ih zamijenile brže i pouzdanije kemijske metode.

Kod kemijskih metoda (5) se upotrebljavaju preparati s malom količinom enzima, a koncentracije supstrata su visoke. Aktivnost kolinesteraze obično se mjeri na temperaturi između 37° i 40° C, jer je u tom intervalu aktivnost kolinesteraze maksimalna. Kolinesteraza ima optimalnu aktivnost kod pH između 7,5 i 8,5. Aktivnost kolinesteraze određuje se zato u puferiranim otopinama, kako bi se spriječilo smanjenje pH u reakcionoj smjesi zbog stvaranja kiseline, koja nastaje hidrolizom estera. Pufferi su obično veronalni, fosfatni ili karbonatni. Preparat kolinesteraze može biti svako tkivo, koje sadržava enzim u količini, koja se može mjeriti. Iz nekih su tkiva pripremljeni čišćeni preparati, koji imaju nekoliko stotina puta veću aktivnost od ishodnog preparata. Tako

je pripremljen čišćeni i koncentrirani preparat specifične kolinesteraze iz električnog organa jegulje i preparat nespecifične kolinesteraze iz konjskog seruma (3).

SPEKTROFOTOMETRIJSKA METODA

Postoji samo jedna kemijska metoda, kod koje se aktivnost kolinesteraze određuje mjerenjem brzine raspada acetilkolina, a to je *Hestrinova* spektrofotometrijska metoda (20, 26). Hestrinova metoda osniva se na reakciji acetilkolina s hidrosilaminom. Pritom nastaje hidrosamska kiselina. Hidrosamska kiselina daje s trovalentnim željezom obojeni kompleks, koji se može fotometrirati. Tu reakciju s hidrosilaminom daju i drugi karboksilni esteri, pa se Hestrinova metoda može primijeniti za određivanje aktivnosti kolinesteraze i prema drugim supstratima, a ne samo prema acetilkolinu. *Bonting* i *Featherstone* (11) modificirali su Hestrinovu metodu u ultramikrometodu, s obzirom na količinu preparata i koncentraciju acetilkolina.

Ako se namjesto kolinskih estera upotrebe esteri tiokolina kao supstrati kolinesteraza, može se aktivnost također odrediti spektrofotometrijski. Tioesteri imaju visoku apsorpciju u ultravioletu, pa se brzina hidrolize tih estera očituje kao smanjenje apsorpcije (21).

Spomenute dvije metode su jedine, kod kojih se aktivnost kolinesteraze mjeri određivanjem koncentracije acetilkolina, dakle supstrata kolinesteraze. Kod svih se ostalih metoda određuju koncentracije raspadnih produkata supstrata, a to su kiseline, odnosno vodikovi ioni.

INDIKATORSKA METODA

Ima nekoliko metoda, kod kojih se koncentracija vodikovih iona mjeri indikatorom. *Gregoire* et al. (17) upotrebili su fenol-crvenilo kao indikator i mjerili spektrofotometrijski promjenu boje indikatora u toku hidrolize supstrata. Vrlo se često upotrebljava brom-timol indikator (12, 15, 34). Kod većine se metoda ne fotometrira boja brom-timola, nego se ona ocjenjuje vizuelno. Budući da je vizuelno ocjenjivanje boje veoma neprecizno, te metode daju samo približnu ocjenu aktivnosti preparata.

POTENCIOMETRIJSKA METODA

Za određivanje aktivnosti kolinesteraze su veoma precizne i točne potencijometrijske metode. Kod tih se metoda određuje koncentracija vodikovih iona ili potencijometrijskom titracijom ili pH-metrijski.

Kod potencijometrijske metode titriraju se vodikovi ioni, koji su nastali hidrolizom supstrata, s lužinom poznate koncentracije na konstantnom pH-u. Budući da kontinuirano neutraliziranje kiseline lužinom osigu-

rava konstantnost pH, potenciometrijska metoda je jedina metoda, kod koje se određivanje aktivnosti kolinesteraze ne treba provesti u puferiranim otopinama (25).

Za razliku od metode potenciometrijske titracije, kod koje se u toku hidrolize supstrata održava konstantna pH reakcione smjese, kod pH-metrijske se metode upravo koristi promjena pH u toku hidrolize. Kod pH-metrijske metode mjeri se promjena pH, u slabo puferiranim otopinama u području maksimalne aktivnosti kolinesteraze, a to znači između pH 8,5 do 7,5 ili najviše 7,0. pH-metrijsku metodu izradio je *Michel*. (13, 18, 19, 23).

MANOMETRIJSKA METODA

Jedna od najpreciznijih metoda određivanja aktivnosti kolinesteraze je manometrijska metoda. Kod te metode se manometrijski mjeri količina ugljičnog dioksida, koju iz otopine natrijeva hidrokarbonata izlučuje kiselina, nastala hidrolizom supstrata kolinesteraze. Količina izlučenog ugljičnog dioksida ekvivalentna je količini hidroliziranog supstrata. Određivanje aktivnosti provodi se u *Warburgovom* respirometru. (1).

U naučno-istraživačkom radu upotrebljavaju se gotovo isključivo potenciometrijske i manometrijske metode. U kliničkim se laboratorijima upotrebljavaju metode, koje su relativno brze i tehnički jednostavne, a to su spektrofotometrijske i neke potenciometrijske metode. Terenske metode za određivanje aktivnosti kolinesteraze su indikatorske metode.

U kliničkim se laboratorijima određuje aktivnost kolinesteraze u krvi ili u eritrocitima i serumu posebno. Određivanje kolinesteraze u krvi mnogo je brže nego određivanje u eritrocitima i serumu posebno, jer otpada odvajanje seruma od eritrocita. Za dijagnostiku otrovanja organofosfornim spojevima važnija je aktivnost specifične kolinesteraze, t. j. kolinesteraze eritrocita, nego nespecifične serumske kolinesteraze. Kako bi u krvi odredili aktivnost samo eritrocita, *Fleischer* i *Pope* (14) upotrebili su selektivni supstrat acetil-beta-metilkolin ili su odredili aktivnost kolinesteraze kod relativno niske koncentracije acetilkolina. Autori su našli, da je kod niske koncentracije acetilkolina aktivnost eritrocita mnogo veća od aktivnosti seruma, pa se prema tome svaka varijacija u aktivnosti eritrocitne kolinesteraze veoma izrazito manifestira u promjeni aktivnosti krvi.

Kod apsorpcije organofosfornih spojeva najprije se smanjuje aktivnost kolinesteraze u krvi, zatim u tkivima, a simptomi otrovanja se javljaju, kad je inhibirana kolinesteraza u nervnim i ganglijskim sinapsama. Određivanje aktivnosti kolinesteraze ima zato veliku praktičnu vrijednost, jer je smanjenje aktivnosti u krvi prvi znak apsorpcije organofosfornih spojeva. Simptomi otrovanja inhibitorima kolinesteraze nisu uvijek specifični, pa određivanje aktivnosti kolinesteraze u krvi po-

maže i kod diferencijalne dijagnoze otrovanja. Nakon preboljelog otrovanja kolinesteraza krvi još dulje vremena ostaje na niskom nivou, a svaka je osoba u tom intervalu preosjetljiva na dalju ekspoziciju otrova, pa je određivanje aktivnosti kolinesteraze u tom vremenskom intervalu također od velike važnosti (2, 6).

Varijacije u aktivnosti kolinesteraze pojedinaca manje su od varijacija populacije. Prema tome kolinesteraza pojedinca može biti inhibirana znatno ispod njegova vlastitog prosjeka, a da još uvijek bude u granicama normale za populaciju. Ne preporučuje se zato iz krivulje normalnih vrijednosti populacije odrediti stupanj ekspozicije pojedinca, nego se za svakog pojedinca moraju poznavati njegove vlastite normalne vrijednosti i prema tim podacima odrediti stupanj inhibicije (16, 26, 33).

Literatura

1. Aldridge, W. B.: Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by E 605 and analogues, *Biochem. J.*, **46** (1950) 451.
2. Aldridge, W. N., Davies, D. R.: Determination of cholinesterase activity in human blood, *Brit. Med. J.*, **1** (1952) 945.
3. Augustinsson, K. B.: Studies on blood cholinesterase, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, **18A** (1945) No 24.
4. Augustinsson, K. B.: Cholinesterases. A study in comparative enzymology, *Acta physiol. Scand.*, **15** (1948) suppl. 52.
5. Augustinsson, K. B.: Acetylcholine esterase and cholinesterase, u »The Enzymes« ed. Sumner and Myrbäck, 1950, vol. I., part I, p. 443.
6. Barnes, J. M., Hayes, W. S., Kay, K.: Control of health hazards likely to arise from the use of organo-phosphorus insecticides in vector control, *Bull. World Health Organisation*, **16** (1957) 41.
7. Bergmann, F.: Fine structure of the active surface of cholinesterase and the mechanism of enzymatic ester hydrolysis, *Discussions Faraday Soc.*, No 20 (1955) 126.
8. Bergmann, F., Wilson, I. B., Nachmansohn, D.: The inhibitory effect of stilbamidine, curare and related compounds and its relationship to the active groups of acetylcholine esterase, *Biochim. et Biophys. Acta* **6** (1950) 217.
9. Bergmann, F., Wilson, I., Nachmansohn, D.: Acetylcholinesterase. IX. Structural features determining the inhibition by amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* **186** (1950) 693.
10. Bergmann, F., Wurzel, M.: The structure of the active surface of serum cholinesterase. *Biochim. et Biophys. Acta*, **13** (1954) 251.
11. Bonting, S. L., Featherstone, R. M.: Ultramicro assay of the cholinesterases, *Arch. Biochem. Biophys.* **61** (1956) 89.
12. Davis, D. R., Nicholls, J. D.: A field test for the assay of human whole-blood cholinesterase, *Brit. Med. J.*, **1** (1955) 1373.
13. Diamant, H., Tammelin, L. E.: An electrometric method for the determinations of cholinesterase activity, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **5** (1953) No 3.
14. Fleisher, J. H., Pope, F. J.: Colorimetric method for determination of red blood cell cholinesterase activity in whole blood, *Arch. Ing. Hyg. Occupational Med.* **9** (1954) 323.
15. Fleisher, J. H., Woodson, G. S., Simet, L.: A visual method for estimating blood cholinesterase activity, *Arch. Ing. Health*, **14** (1956) 510.

16. *Gage, J. C.*: Blood cholinesterase values in early diagnosis of excessive exposure to phosphorus insecticides, *Brit. Med. J.*, *1*, (1955) 1370.
17. *Gregoire, J., Gregoire, J., Limozin, N.*: Activity of cholinesterases, I. Method for spectrophotometric measurement of the activity of cholinesterases, *Bull. soc. chim. biol.* *37* (1955) 65.
18. *Hansson, C. H.*: Cholinesterase and muscle-relaxing compounds. I. Electrometric estimation of the cholinesterase activity in common domestic animals, *Acta Pharmacol. Toxicol.* *12* (1956) 142.
19. *Heilbronn, E.*: Electrometric method for the determination of cholinesterase activity. III. Cholinesterase in blood spots on filter paper, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* *5* (1953) 308.
20. *Hestrin, Sh.*: Reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application, *J. Biol. Chem.* *180* (1949) 249.
21. *Irving, I. A. T.*, A rapid spectrophotometric assay of purified cholinesterase, *Biochim. et Biophys. Acta* *21* (1956) 580.
22. *Laidner, K. J.*: »Introduction to the chemistry of enzymes«, 1954.
23. *Michel, H. O.*: An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity, *J. Lab. Clin. Med.* *34* (1949) 1564.
24. *Nachmansohn, D., Wilson, I. B.*: The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine, *Advances in Enzymology* *12* (1951) 259.
25. *Sabine, J. C.*: A continuous titration method for cholinesterase determinations. U. S. Atomic Energy Com., Tech. Inform. Service, Oak Ridge, Tenn. AECU - 2575 (1953).
26. *Sabine, J. C.*: The clinical significance of erythrocyte cholinesterase titers. I. A method suitable for routine clinical use, and the distribution of normal values, *Blood*, *10* (1955) 1132.
27. *Stumpf, C.*, Methods for the determination of cholinesterase activity in blood, *Z. Vitamin-Hormon- und Fermentforsch.* *8* (1956) 36.
28. *Thompson, R. H. S.*, Cholinesterases and anti-cholinesterases, u «Lectures on the Scientific Basis of Medicine», vol. II., 1952-3.
29. *Vandekar M.*: Toksikologija organofosfornih insekticida, *Arh. hig. rada* *9* (1958).
30. *Whittaker, V. P.*: Specificity, mode of action and distribution of cholinesterases, *Physiol. Reviews*, *31* (1951) 312.
31. *Wilson, I., Bergmann, F.*: Cholinesterase VII. The active surface of acetylcholine esterase derived from effects of pH on inhibitors, *J. Biol. Chem.* *185* (1950) 479.
32. *Wilson, I. B., Bergmann, F.*: Cholinesterase VIII. Acetylcholinesterase dissociation constants of the active groups, *J. Biol. Chem.* *186* (1950) 683.
33. *Wolfsie, J. H., Winter, D.*: Statistical analysis of normal human red blood cell and plasma cholinesterase activity values. *Arch. Ind. Hyg. Occupational Med.* *6* (1952) 43.
34. *Wolfsie, J. H., Winter, G. D.*: Bromthymol blue screening test. Value for determination of blood cholinesterase activity, *Arch. Ind. Hyg. Occupational Med.* *9* (1954) 396.

Summary

CHOLINESTERASES. BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND METHODS FOR DETERMINATION OF THEIR ACTIVITY

Some biochemical properties of cholinesterases with special reference to the mechanism of substrate hydrolysis are discussed. Laboratory and field test methods for the determination of cholinesterase activity are described as well as the application of these methods in clinical laboratories.

*Institut for Medical Research
Zagreb*

*Received for publication
April 20, 1958*