

IBRAHIM RUZDIC

UTJECAJ OLOVA NA DJELATNOST ACETIL-KOLINESTERAZE*

Istražen je utjecaj olova na djelatnost acetil-kolinesteraze u serumu radnika, koji ne dolaze u dodir s olovom i radnika, koji su otrovani olovom. Nadenno je, da je djelatnost serumske acetil-kolinesteraze kod radnika otrovanih olovom smanjena. Ujedno je istražena djelatnost olovnog nitrata na djelatnost acetil-kolinesteraze in vitro i nadenno, da olovni nitrat pospješuje djelatnost acetil-kolinesteraze.

Sve tvarne i energetske promjene, koje u stvari i jesu odraz cjelokupnog životnog zbivanja, možemo na kraju svesti na niz hidrirajućih i dehidrirajućih, odnosno dehidratacionih i hidratacionih procesa, kojima ravnaju fermenti.

Isto tako, s čisto biokemijskog stanovišta, ni patološke kao ni toksikološke pojave nisu ništa drugo do li posljedice poremećaja, do kojih dolazi bilo u jednom ili u više fermentnih reakcionih sistema, drugim riječima, te su pojave odraz disfunkcije apofermenata ili kofermenata.

Ako je tome tako, onda nam se učinilo vjerojatnim, da bi i neka od oboljenja, koja su izazvana djelovanjem olova, mogla biti posljedice poremećaja u jednom od fermentnih reakcionih sistema našeg organizma.

Da ioni olova mogu takve poremećaje izazvati ili, točnije rečeno, da mogu efektorski djelovati na pojedine fermente, već je prije utvrđeno. Tako su neki autori utvrdili (1), da olovo u određenim koncentracijama pospješuje djelatnost fermentata, rast stanica, i respiracione i oksidacione procese u biljkama. Drugi (2) su pak našli, da olovo koči djelatnost nekih fermentata kao na primjer ureaze. Flury (1) rezimirajući ranija istraživanja zaključuje da manje količine olova pospješuju a veće usporavaju djelatnost fermentata u biljnim i nižim životinjskim organizmima.

Ali ne samo ioni teških metala nego također i ioni nekih drugih dvovaljanih metala efektorski djeluju na pojedine fermente. Tako na primjer ioni Mn, Mg i Ca pospješuju djelatnost acetil-kolinesteraze (3), fermenta, koji ravna izgradnjom i razgradnjom kemijskog intermedijatora acetilkolina, pa prema tome možemo uzeti, da acetil-kolinesteraza posredno utječe i na prenošenje živčanih podražaja.

* Pročitano, kao prethodno saopćenje, na I. sastanku stručnjaka za higijenu rada, Zagreb, 5.—8. jula 1950.

Međutim ioni kalcija pokazuju neku sličnost i s ionima olova. Ova sličnost se očituje i u organizmu, naročito kod slučajeva otrovanja olovom, gdje se olovo skoro na isti način odlaže u kostima kao i sam kalcij.

Iako nismo dosada u nama pristupačnoj literaturi naišli na podatke, da olovo efektorski djeluje i na acetyl-kolinesterazu, ipak su nas naprijed navedene činjenice navele na pomisao, da bi i ioni olova mogli efektorski djelovati na acetyl-kolinesterazu. Na taj bi način i pojave pareza kod kroničnih otrovanja olovom, odnosno pojave kolika kod kroničnih otrovanja olovom s akutnim fazama, mogle biti posljedica efekorskog djelovanja olova na acetyl-kolinesterazu.

Uočivši naime u svakidašnjoj suradnji s liječnicima veliku, danas već praktičnu, važnost utjecaja acetyl-kolinesteraze, kako na senzibilitet tako i na motoričku funkciju živčanog sistema, došli smo do pretpostavke, da su i pareze, koje smo zamijetili kod kroničnog otrovanja olovom, i kolike, koje smo zamijetili kod kroničnog otrovanja olovom s akutnim fazama, posljedice biokemijskog poremećaja, do kojeg dolazi utjecajem raznih količina olova na djelatnost acetyl-kolinesteraze.

Polazeći od ove radne hipoteze pokušali smo najprije odgovoriti na pitanje, da li uopće ima neka razlika u djelatnosti serumske acetyl-kolinesteraze zdravih ljudi i ljudi, koji su otrovani olovom. Za ta smo istraživanja odabrali one radnike, koji po svom poslu ne dolaze u dodir s olovom, i radnike, kojima smo u krvi našli toksične količine olova, t. j. količine veće od 100 mikrograma olova na 100 ml krvi.

Kao supstrat za određivanje djelatnosti kolinesteraze služila je otopina acetyl-kolin klorida »Roche«; kao ferment ljudski serum. Reakciona je smjesa bila uvijek sastavljena ovako: 10 ml boratnog pufera, 0,2 ml seruma, 10 ml 0,5%-ne otopine acetyl-kolinklorida i 4,8 ml redestilirane vode. Ukupno 25 ml. Hidroliza je trajala 3 sata i to na temperaturi 37° C. Veličinu djelatnosti acetyl-kolinesteraze utvrđivali smo fotometričkim mjerenjem (4), (5), i to na taj način, da smo hidrolizom acetyl-kolin-klorida oslobođenu octenu kiselinu vezali na feri-željezo i mjerili intenzitet tako nastale boje u kiveti od 5 cm uz filter S 57 (Stufen Fotometer Zeiss). U ovim mjerenjima veličina djelatnosti kolinesteraze predstavljena je veličinom ekstinkcije.

Na taj smo način dosada odredili djelatnost acetyl-kolinesteraze u serumu od 6 radnika, koji nisu po svom pozivu dolazili u dodir s olovom, i od 9 olovom otrovanih radnika. Redovno smo našli, da je djelatnost acetyl-kolinesteraze slabija kod radnika otrovanih olovom od one, koju smo utvrdili u serumu zdravih ljudi. Djelatnost kolinesteraze u serumu zdravih ljudi kreće se od 0,07 do 0,12, a kod otrovanih od 0,01 do 0,05.

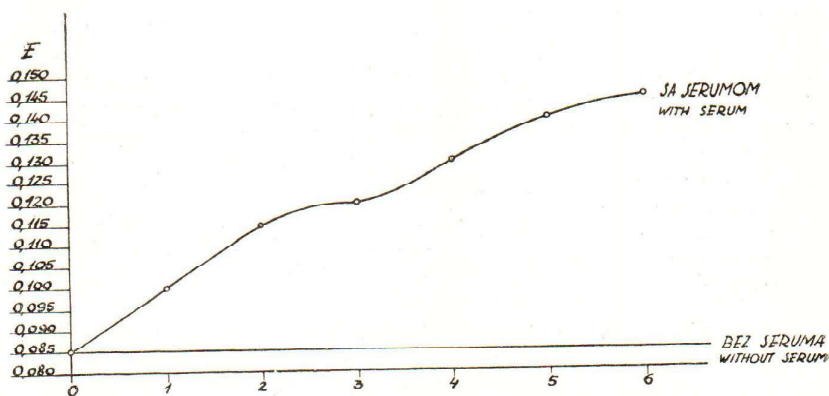
Da provjerimo, koliko je to smanjenje djelatnosti posljedica otrovanja olovom i da li na to smanjenje utječe samo olovo kao takvo ili pak neke druge okolnosti, koje su u organizmu nastale zbog prisutnosti većih količina olova, u nastavku smo svojih istraživanja pristupili određivanju utjecaja raznih olovnih soli na djelatnost acetil-kolinesteraze in vitro.

Kao prvo smo istražili efektorsko djelovanje olovnog nitrata na acetil-kolinesterazu ljudskog seruma. I u ovim je mjerenjima kao supstrat služila otopina acetil-kolina, kao ferment serum zdravih ljudi, a kao efektor otopina olovnog nitrata.

Prema tome sastav reakcione smjese bio je ovaj: 10 ml boratnog pufera, 0,2 ml seruma, 10 ml 0,5%-ne otopine acetil-kolin-klorida, x ml otopine olovnog nitrata, koja u jednom ml sadržava 2 mikrograma olova i 4,8-x ml redestilirane vode, ukupno 25 ml. Svi su ostali reakcioni uvjeti bili isti, kao i u predašnjim pokusima.

Iz podataka, dobivenih takvim načinom određivanja djelatnosti acetil-kolinesteraze u serumu, može se zaključiti, da olovo, koliko se upotrebi u obliku olovnog nitrata i pod naprijed navedenim uvjetima, pospješuje djelatnost acetil-kolinesteraze. Srednje vrijednosti takvog aktiviranja prikazane su ovom krivuljom:

UTJECAJ $Pb(NO_3)_2$ NA DJELATNOST ACETILKOLINESTERAZE
INFLUENCE OF $Pb(NO_3)_2$ ON THE ACTIVITY OF ACETYLCHOLINE ESTERASE



APSCISA: KOLIČINE Pb μg ABSCISS: QUANTITIES OF Pb μg .
 ORDINATA: EKSTINKCIJA ORDINATE: EXTINCTION
 FILTER S57 DEBLJINA SLOJA 5 cm FILTER S57 THICKNESS OF LAYER 5 cm

Kako podaci naših početnih istraživanja *in vitro* nisu u skladu s podacima istraživanja *in vivo*, to smo u svojim istraživanjima pošli korak dalje.

Činjenica, da porfirin — koji je redovni pratilac svakog otrovanja olovom, duboko zadire i u hormonalnu funkciju oboljelih od saturnizma, navela nas je, da istražimo efektorsko djelovanje porfirina na acetil-kolinesterazu. Kao efektor služila nam je otopina hematoporfirina i to u količinama od 0,1, 0,05 i 0,01 mg na 25 ml reakcione smjese. Djelatnost kolinesteraze u tom slučaju odredili smo titrimetrijski, jer dodatak hematoporfirina onemogućuje primjenu fotometričke metode. Na osnovu izvršenih mjerenja može se zaključiti, da hematoporfirin koči djelatnost kolinesteraze. Kako ni titrimetrijska metoda nije prikladna za rad s hematoporfirinom, to zasada ne iznosimo kvantitativne podatke kočenja, sve dok ne nađemo prikladniju metodu za takva određivanja.

Iako naprijed navedeni podaci govore u prilog iznijete hipoteze, ipak se na osnovu samo ovih, tek početnih istraživanja ne želimo upuštati u bilo kakva tumačenja pojave kolika, odnosno pareza perifernog živčevlja. U ovom prethodnom saopćenju iznosimo samo jedan dio podataka čisto kemijskog istraživanja, dok onaj dio, koji zasijeca u domenu liječnika želimo rješavati u već započetoj suradnji s drugim stručnjacima. Osim toga i sama kemijska istraživanja želimo još upotpuniti podacima o efektorskom djelovanju i drugih olovnih soli na sve vrste kolinesteraze, koje dolaze u ljudskom organizmu, kao i to, na koji se način taj utjecaj očituje pod promijenjenim reakcionim uvjetima. To je predmet naših daljnjih istraživanja.

Po završetku naših eksperimentalnih mjerenja naišli smo na kratki referat rada od Frommela i suradnika (6), koji su našli, da toksičke doze olovnih soli snižavaju askorbinsku kiselinu u tkivu i inhibiraju djelatnost serumske kolinesteraze. Pokuse su vršili na zamorčićima.

*Institut za higijenu rada,
Zagreb.*

LITERATURA

1. Cantarow, A. and Trumper, M., Lead poisoning 1944.
2. Sumner, and Somers, Enzymes 1947.
3. Everett, M. R., Medical Biochemistry 1948.
4. Abdon, und Uvnäs. Skand. Archiv f. Physiol. 76 (1937.) 1.
5. Krvavica, S. Vet. Archiv XVIII (1948) 261.
6. Frommel, E., Piquet, J. and Cuenot, C. L., Helv. Physiol. Pharm. Act. 4 (1946) 301. Cit. prema C. A. 40 (1946) 73906.

SUMMARY

INFLUENCE OF LEAD ON THE ACTIVITY OF ACETHYLCHOLINE ESTERASE*

The fact that the properties of lead show certain similarity to those of calcium in human organism, and that the calcium ions enhance the activity of acetylcholine esterase, induced us to suppose that lead ions may have great influence on choline esterase as well, namely, affect the sensibility and nervi-motor functions of the nervous system.

Having this in mind, our first investigations started by finding out whether there is a difference between the activity of acetylcholine esterase serum of healthy people and that of the lead poisoned ones. Tests were carried out with workers who had more than 100 micrograms of lead in 100 ml blood.

The acetylcholine chloride solution »Roche« served as substrate (basis) for determination of the activity of choline esterase; human serum was used as ferment. The reaction mixture always contained: 10 ml borate buffer, 0,2 ml serum, 10 ml 0,5% acetylcholine solution, and 4,8 ml redistilled water, giving the total of 25 ml. The hydrolysis took 3 hours at 37° C. The activity of acetylcholine esterase was determined by photometric measuring carried out in the following way: acetic acid was freed through hydrolysis of acetylcholinechloride and then bound to ferri ions; next we measured the intensity of the colour in a 5 cm cell with a S 57 filter (Stufen Photometer Zeiss). In these measurements the activity of choline esterase was represented by the value of extinction.

Thus we determined the activity of acetylcholine esterase in serums of nine workers poisoned by lead. We found that the activity of acetylcholine esterase in the serum of a poisoned man is smaller than in the serum of a healthy man the former ranging between 0,01—0,05, and the latter between 0,08—0,12.

Then we turned to investigations on the influence of lead nitrates on the activity of acetylcholine esterase in vitro. The reaction mixture contained: 10 ml borate buffer, 0,2 ml serum, 10 ml 0,5% acetylcholine solution, x ml lead nitrate solution containing 2 micrograms lead in one ml, and (4,8-x) ml redistilled water, giving a total of 25 ml. Other experimental conditions were the same as in former tests.

From the data received by such method of determining the activity of acetylcholine esterase serum, we may draw the following conclusion: lead, — inasmuch it is in the form of lead nitrate and under afore-mentioned conditions, — may slightly enhance the activity of acetylcholine esterase. The average values of the activity are shown by curves.

An increase of porphyrine in human organism is also characteristic for lead poisoning. We investigated the effector activity of porphyrine on acetylcholine esterase. It was observed that hematoporphyrine inhibits the activity of acetylcholine esterase. The results were only of qualitative nature since the titrimetric method which was used was not sensitive enough to give quantitative results.

Futher investigations on the activity of other lead salts on all kinds of choline esterase of human organisms are in progress.

Institute of Industrial Hygiene,
Zagreb

* Delivered before the Conference of Industrial Hygiene in Zagreb, July, 5.—8. 1950.