

6. Bryant M. P., Robinson I. M.: Studies on the nitrogen requirements of some ruminal cellulolytic bacteria. *Appl. Microbiol.*, 9, 2, 1961, 96.
7. Cakata S.: Zagadnienia fizjologii przewodu pokarmowego u przeżuwaczy. *Med. Wet.*, XIX, 3, 1963, 121.
8. Campbell T. C., Loosli J. K., Warner R. G., Tasaki I.: Utilization of biuret by ruminants. *J. Anim. Sci.*, 22, 1, 1963, 139.
9. Chomyszyn M., Bieliński K.: Badania nad zastosowaniem pasz amoniakowanych w żywieniu przeżuwaczy. 2. Zastosowanie różnych ilości amoniaku w dawce dla skopów. *Roczniki Nauk. Roln.*, 74 — B-4, 1959, 527.
10. Crasemann E.: Synthetische Vorgänge im Pansen. *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk.*, 19, 1—2, 1964, 68.
11. Czeresznijska S. M., Czajka N. F.: Nasz opyt primienienija moczewiny dojnym krowam. *Ziwtownowodstwo*, 12, 1963, 27.
12. Demaux G., Le Bars H., Molle J., Rerat A., Stimmone H.: Absorption des acides aminés au niveau du rumen de l'intestin grele et du cœcum chez le mouton. *Bull. Acad. Vet. France*, 34, 2, 1961, 85.
13. Felińska C., Feliński L.: Wykorzystanie energetycznych składników paszy w przewodzie pokarmowym owiec. *Acta Physiol. Pol.*, XIII, 1962, 177.
14. Feliński L., Baranow-Baranowski S.: Synteza wolnych aminokwasów azotu aminowego przez bakterie żwacza. *Roczniki Nauk Roln.*, 74 B-2, 1959, 379.
15. Hörnicke H.: Der Stoffaustausch durch die Wand des Wiederkäuermagens. *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk.*, 19, 1—2, 1964, 92.
16. Hörnicke H., Williams E. R., Waldo D. R., Flatt W. P.: Die Resorption von Methan und Kohlendioxyd aus dem Pansen. *Ibidem*. 118.
17. Johnson R. R., McClure K. E.: In vitro and in vivo studies and the adaptation of sheep to biuret. *J. Anim. Sci.*, 22, 1963, 1123.
18. Landis J.: Über den im Pansen vor sich gehende Einbau des Schwefels in Mikroproteine. *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk.*, 19, 1—22, 1964, 83.
19. Lewis D., McDonald I. W.: The inter-relationships of individual proteins and carbohydrates during fermentation in the rumen of the sheep. I. The fermentation of casein in the presence of starch and other carbohydrate material. *J. Agr. Sci.*, 51, 1958, 103.
20. Lewis D.: Digestive physiology and nutrition of the ruminant. London 1961, Butterworths, 68—76, 140—150, 226—234.
21. Lewis D.: The reduction of sulphate in the rumen of the sheep. *Bioch. J.*, 56, 3, 1954, 391.
22. Loosli J. K., Williams H. H., Thomas W. E., Ferris F. H., Maynars L. A.: Synthesis of aminoacids in the rumen. *Science*, 110, 1949, 144.
23. McDonald I. W.: The role of ammonia in ruminal digestion of protein. *Bioch. J.*, 51, 1952, 86.
24. McDonald I. W.: The extent of conversion of food protein to microbial protein in the rumen of the sheep. *Bioch. J.*, 56, 1954, 120.
25. McDonald I. W.: The absorption of ammonia from the rumen of the sheep. *Bioch. J.*, 42, 1948, 584.
26. McLaren G. A., Campbell C. D., Welch J. A., Anderson G. C., Smith G. S.: A microbiological assay for the determination of the utilization of NPN compounds by rumen bacteria. *J. Anim. Sci.*, 7, 1958, 1191.
27. McNaught M. L., Owen E. E., Henry K. M., Kon S. K.: The utilization of non-protein nitrogen in the bovine rumen. 8. The nutritive value of the proteins of preparations of dried rumen bacteria, rumen protozoa and Brewer's yeast for rats. *Bioch. J.*, 56, 1, 1954, 151.
28. Mielke H.: Untersuchungen zur quantitativen Einbeziehung des Stickstoffes aus oral verabreichten Ammoniumcarbonat in die Milchproteinsynthese des Rindes. Sonderdruck aus „Dritte Arbeitstagung über stabile Isotope“, Abhandlungen der Deutscher Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Akademie — Verlag, Berlin, 1965, 607.
29. Passow H.: Passive Permeabilität von Zellmembranen. Zur Frage der Penetration durch Poren. *Klin. Wochenschrift* 41, 3, 1963, 130.
30. Pennington R. J.: The metabolism of short-chain fatty acids in the sheep. 2. Further studies with rumen epithelium. *Bioch. J.*, 56, 3, 1954, 410.
31. Stangel H.: Urea and non-protein nitrogen in ruminant nutrition. *Publ. Nitrogen Division, Allied Chemical Corp.*, 1964.
32. Tangl H.: Versuche mit Harnstoff bei Milchkühen, Mastrindern und Mastschafen. *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk.*, 19, 1—2, 1964, 91.
33. Tkaczew I. F.: Niekateryje waproisy ispolzowanija moczewiny. *Ziwtownowodstwo*, 25, 1, 1963, 19.
34. Warren K. S.: Ammonia toxicity and pH. *Nature*, 195, 1962, 47.
35. Węgrzynowicz R.: Farmakologiczna analiza neurohormonalnej regulacji ukrwienia żwacza w badaniach fotohemotachometrycznych bez narkozy. *Praca habilitacyjna*, WSR, Wrocław, 1965.
36. Wilbrandt W.: Aktiver Transport durch Grenzflächen. *Klin. Wochenschrift.*, 41, 3, 1963, 138.
37. Zutacki G.: Nerwowa regulacja ruchów żwacza u owiec. Streszczenia referatów i komunikatów z IX Zjazdu PTF, Toruń, 1963, 313.

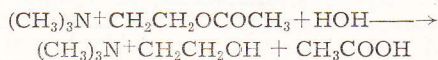
Adres autora: doc. dr Marian Pytasz, Lublin, ul. Akademicka 11.

BOGDAN MIZAK

Esteraza acetylocholinowa u zwierząt i metody jej oznaczania

Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Lecznictwa I. Wet. w Puławach
Kierownik: doc. dr TEODOR JUSZKIEWICZ

Esteraza acetylocholinowa zwana inaczej cholinesterazą swoistą jest enzymem katalizującym hydroлизę estru kwasu octowego i cholinę, powszechnie znanej pod nazwą acetylocholinę.



W ustroju żywym rozróżnia się dwa zasadnicze rodzaje esterazy cholinowej: właściwą, która zawarta jest głównie w krwinkach czerwonych i niewłaściwą, która występuje głównie w osoczu. Esteraza cholinowa właściwa nazywana jest różnie przez różnych autorów: cholinesteraza swoista, specyficzna, acetylocholinesteraza, e-cholinesteraza, EChE, typ I. Posiada ona specyficzne niemal powinowactwo do biologicznie wytworzonego substratu acetylocholinę, aczkolwiek hydrolizuje niektóre inne syntetycznie otrzymane estry cholinę. Esteraza cholinowa niewłaściwa nazywana jest niekiedy: cholinesteraza nieswoista, niespecyficzna, pseudocholinesteraza, butyrylocholinesteraza, s-cholinesteraza, SChE, typ II. Ma ona właściwości hydrolizowania syntetycznie i biologicznie wytworzonych estrów cholinę łącznie z acetylocholiną (3, 7, 8, 21, 36, 56).

Koelle i Steiner (35) dzielą poza tym cholinesterazę właściwą na funkcjonalną (zewnątrzkomórkową) i rezerwową (wewnątrzkomórkową). Przypuszcza się, że

oddziela je od siebie błona lipidopodobna komórki. Zdaniem tych autorów esteraza funkcjonalna jest odpowiedzialna za hydrolizę acetylocholinę. Esteraza rezerwowa, która jest prawdopodobnie syntetyzowana w endo plazmie (35), w miarę potrzeby jest przenoszona poprzez błonę komórkową. Niektórzy autorzy twierdzą, że w normalnej surowicy krwi możliwa jest obecność dwu i więcej cholinesteraz. Heilbronn (24) przy pomocy elektroforezy i badań kinetycznych stwierdził obecność dwu cholinesteraz we frakcji proteinowej plazmy krwi. Berry (5) badając kinetyczny efekt koncentracji substratu, wnioskuje o możliwości istnienia trzech cholinesteraz w surowicy krwi.

Cholinesteraza erytrocytów jest białkiem, którego punkt izoelektryczny znajduje się w zakresie pH 4,65—4,70 (3). Cholinesteraza surowicy jest mukopolisacharydem o ciężarze cząsteczkowym ok. 165000 (1). W polu elektrycznym wędruje ona w 95% z alfa-2-globulinami, a w ok. 5% z albuminami. Hamowanie endogennej syntezy albumin w wątrobie powoduje zahamowanie aktywności cholinesterazy w surowicy krwi (1). Cholinesteraza właściwa oprócz hydrolizy naturalnego substratu, jakim jest acetylocholinę, może również hydrolizować „tio” analogi acetylocholinę, czyli tzw. acetylotiocholinę (17), propionylcholinę (61), acetylo-beta-metylocholinę (8,61) i acetylo-beta-metylotiocholinę (49). Cholinesteraza surowicy katalizuje hydrolizę acetylocholinę i jej „tio” analogi, butyrylocholinę, propionylcholinę i jej „tio” analogi, oraz

Metody oznaczania aktywności esterazy cholinowej

Aktywność esterazy cholinowej w żywym ustroju możemy oznaczyć metodami fizyko-chemicznymi, histochemicznymi i biologicznymi. Najbardziej specyficzne i szeroko stosowane są metody fizyko-chemiczne. Szczególnie dokładne i czułe są metody polarograficzne (15,44), ze względu jednak na drogą aparaturę są one jeszcze do tej pory mało stosowane. Większość metod fizyko-chemicznych polega na oznaczaniu ilości kwasu octowego albo butyrylowego, które powstają w czasie hydrolizy acetylocholin, acetylo-beta-metylocholin albo butyrylocholin. Niektóre inne metody do oznaczania aktywności enzymu używają acetylo- albo butyrylotiocholin, oznaczając tioester powstały w czasie hydrolizy substratu. Inne z metod oznaczają ilość niehydrolizowanego substratu.

Cholinesteraza surowicy krwi hydrolizuje również inne substraty i może być oznaczana przy pomocy benzoilocholin (33), karbonaftoksycholiny (61), prokainy (estru N,N-dwuetylaminoetylowego kwasu p-aminobenzoowego) (31), estru dwucholin z kwasem heksanodwukarboksylowym—1,6 (33), maślanu beta-naftyłu (19) i maślanu o-nitrofenolu (40). Sama cholina jest trudna do oznaczania i metody polegające na jej oznaczaniu są rzadko stosowane (42,65).

A. Metody oparte na oznaczaniu ilości kwasu powstałego z rozczepienia acetylocholin, acetylo-beta-metylocholin albo butyrylocholin

Ilość kwasu rozczepiona z acetylocholin, acetylo-beta-metylocholin albo butyrylocholin może być oznaczona metodą: miareczkową, manometryczną, elektrometryczną (pH-metryczną), albo wskaźnikową (indykatorową).

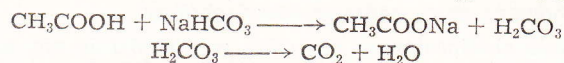
Metoda miareczkowa. Zasada tej metody polega na miareczkowaniu zasadą wytworzonego kwasu, który powstaje w czasie hydrolizy estru cholin. W metodzie tej, dla uchwycenia końca miareczkowania, używa się wskaźnika, albo też posługuje się w tym celu potencjometrem. Przy użyciu wskaźnika można napotkać pewne trudności (59); zmiana koloru wskaźnika w mieszaninie reakcyjnej jest często trudno uchwytne. W dodatku, zabarwienie naturalne krwi czy plazmy, a także na przykład obecność inhibitorów lub aktywatorów, mogą mieć wpływ na kolor obserwowanej mieszaniny. Sprawia to trudność porównywania zabarwienia mieszaniny z zabarwieniem wskaźnika standardowego. Można temu zapobiec używając do miareczkowania potencjometru. Przy zastosowaniu do miareczkowania automatycznego titrografu dokładność wyników dorównuje metodzie manometrycznej Warburga (29). Użycie titrografu umożliwia wdmuchiwanie azotu nad roztwór reakcyjny, co zapobiega błądom pomiaru wynikłym z absorpcji dwutlenku węgla. W celu wyeliminowania błędów, powstałych na skutek hydrolizy nieenzymatycznej, powinno się przeprowadzić wstępne miareczkowanie jeszcze przed dodaniem do roztworu acetylocholin. Ilość dodawanej zasady nie powinna być zbyt duża, aby nie powiększać objętości mieszaniny reakcyjnej. W przeciwnym przypadku następuje zmniejszenie się szybkości reakcji na skutek spadku stężenia enzymu. Ze względu na minimalną ilość, albo całkowitą nieobecność buforu, metoda miareczkowa może być stosowana do oznaczania stężenia substratu, a także wpływu pH, soli metali i innych czynników na aktywność esterazy cholinowej. Metoda ta jest szczególnie przydatna do badania kinetyki początkujących stadiów reakcji esterazy cholinowej z inhibitorami lub reaktorami.

Metody potencjometryczne opisane zostały między innymi przez *Augustinssona* (4). Zasada oznaczania aktywności esterazy cholinowej w tej metodzie oparta jest na odmiareczkowaniu 0,01 N ługiem sodowym kwasu octowego, zawartego w badanej próbce, a powstałego na skutek rozłożenia dodawanej do próbki

acetylocholin. Ilość wydzielonego kwasu octowego w mikroekwiwalentach (μ Eq) jest miarą aktywności zawartej w próbce esterazy cholinowej (28).

W piśmiennictwie polskim zastosowanie miareczkowania potencjometrycznego do oznaczania esterazy cholinowej zostało opisane przez *Jasińskiego* (28).

Metoda manometryczna. *Ammon* użył pierwszy aparatu Warburga do oznaczania aktywności esterazy cholinowej w plazmie i erytrocytach krwi ludzkiej w 1933 r. (2), a następnie metoda ta została użyta przez innych badaczy (3, 16, 18, 32, 38, 43). Metoda manometryczna jest jedną z najbardziej dokładnych metod określania aktywności esterazy cholinowej. W metodzie tej hydrolizę substratu przeprowadza się w zamkniętym naczyniu z manometrem w aparacie Warburga stosując bufor: kwaśny węglan sodowy — kwas węglowy w atmosferze azotu z dwutlenkiem węgla. Wyzwolony podczas hydrolizy kwas reaguje z kwaśnym węglanem sodowym tworząc kwas węglowy, który rozkłada się na dwutlenek węgla i wodę.



Powstały dwutlenek węgla powoduje zmianę objętości gazu, co jest mierzone w różnych odstępach czasu przy pomocy manometru. Ciągły wzrost objętości gazu w czasie hydrolizy estru można przedstawić w postaci krzywej.

Bardziej szczegółowe omówienie teorii i praktyczne posługiwanie się metodą Warburga zostało opisane przez *Augustinssona* (4). Enzym oznaczyć można w pełnej krwi przy użyciu acetylo-beta-metylocholin, jako swoistego substratu dla cholinesterazy erytrocytów, albo przy użyciu butyrylocholin, która jest swoistym substratem dla cholinesterazy surowicy. W metodzie tej uzyskuje się zależność prostolinią pomiędzy koncentracją enzymu a jego aktywnością, jeśli używa się od 0,03 do 0,1 ml plazmy lub erytrocytów. Stężenie acetylocholin w badanej próbce nie może być niższe od 0,0004 M, ponieważ w niższej koncentracji tworzy się zbyt mała ilość gazu, ażeby przy jego pomocy prowadzić pomiary. Najbardziej korzystne jest stężenie acetylocholin od 0,3 do 0,04 M dla cholinesterazy plazmy i od 0,003 do 0,004 M dla cholinesterazy erytrocytów. Przy wysokich stężeniach istnieje konieczność zrobienia poprawki dla nieenzymatycznej hydrolizy acetylocholin. W metodzie tej aktywność enzymu najczęściej wyraża się ilością mikrolitrów CO_2 , która wydziela się w czasie 30, albo 60-minutowej hydrolizy enzymatycznej z 100 mikrolitrów plazmy (erytrocytów), albo ze 100 mg tkanki.

Metoda elektrometryczna (pH-metryczna). Metoda ta opiera się na określaniu w badanym roztworze buforowym ilości wytworzonego kwasu w czasie hydrolizy substratu. Ilość kwasu określamy zmianą pH buforu, co mierzy się pH-metrem przy pomocy elektrod, najczęściej szklanych. Oryginalna metoda została opisana przez *Michela* (51). Przemyte fizjologicznym roztworem krwinki inkubuje się w buforze fosforanowo-barbiturowym o pH 8,1. Pomiary pH buforu przeprowadza się na samym początku i na końcu doświadczenia, po ściśle określonym czasie trwania hydrolizy w temperaturze 25°. Aktywność enzymu wylicza się z różnicy pH i wyraża się w Δ pH/godz. Aktywność można również wyrazić ilością mikromoli kwasu octowego, wydzielonego w czasie hydrolizy acetylocholin w ciągu 1 godz. w temp. 25°. Dla określania aktywności cholinesterazy erytrocytów potrzebna jest acetylocholina, w stężeniu nieznacznie hamującym aktywność enzymu. Jest to niestety, konieczne dla wyrażenia aktywności enzymu w czasie hydrolizy substratu w formie liniowej (51). Aktywność cholinesterazy plazmy określamy jest w podobny sposób jak krwinek, z wyjątkiem tego, że używamy wyższych stężeń acetylocholin, a bufor jest bardziej rozcieńczony (pH 8,0) dla wyrównania słabszej aktywności enzymu w plazmie. Jako aktywatory enzymu

stosuje się jony K^+ . Jony Mg^{++} i Ca^{++} są rzadziej stosowane w roztworach buforowych, gdyż tworzą z fosforanami osady (51). Jako antykoagulant powinna być używana heparyna, a nie szczawiany i cytryniany, które tworzą kompleksy z jonami Mg^{++} i Ca^{++} obecnymi we krwi. W licznych mikromodyfikacjach metody, postępowanie jest podobne jak w metodzie Michela, z wyjątkiem tego, że używa się mniejszych ilości krwi do oznaczeń (12, 20, 41, 48, 52). W porównaniu z metodą Michela, wyniki otrzymywane przy pomocy mikrometod są dokładniejsze. Metoda ta nadaje się do oznaczeń seryjnych i przy optymalnych warunkach dokładność waha się od $\pm 0,02$ do $\pm 0,03 \Delta pH$ jednostek. Metoda ta jednak nie jest tak dokładna jak manometryczna Warburga.

Metoda indykatorowa (wskaźnikowa). W metodzie tej ilość wytworzonego kwasu w czasie hydrolizy substratu, określa się zmianą intensywności zabarwienia wskaźnika. Intensywność ta zmienia się wraz z przejściem indykatora z formy obojętnej w formę kwaśną.



Intensywność zabarwienia jest zależna od pH roztworu badanego. Indykator łącząc się z białkiem, szczególnie z albuminami surowicy może zmienić zabarwienie roztworu. Błędy te można ograniczyć do minimum, jeżeli używa się rozcieńczonych buforów i roztworów plazmy. Tylko taki indykator może być obecny w czasie hydrolizy acetylocholinoi, który nie jest inhibitorem enzymu; w przeciwnym wypadku indykator należy wprowadzić przy końcu reakcji hydrolizy. W przypadku indykatorów, które nie hamują reakcji enzymatycznej, gęstość optyczną powinno się oznaczać po ściśle określonym czasie hydrolizy. Można również zatrzymać bieg reakcji dodając do roztworu inhibitora enzymu.

Większość metod kolorymetrycznych, w których stosuje się indykatory kwasolubne jest opracowana dla surowicy krwi. Najczęściej używanym wskaźnikiem jest czerwien fenolowa (10, 46, 62). W metodzie Caraway (10) hydroliza acetylocholinoi jest przeprowadzana w buforze fosforanowym. Gęstość optyczna jest określana przy długości fali 540 m μ , a aktywność enzymu wylicza się jako funkcję stosunku gęstości optycznej próbki z acetylocholiną przed hydrolizą do gęstości optycznej po hydrolizie. Z krzywej kalibracyjnej przygotowanej z buforów o znanym pH, zawierających znaną ilość kwasu, czerwieni fenolowej i surowicy odczytuje się aktywność enzymu. Wzrost stężenia kwasu octowego o 0,01 N odpowiada 10 jednostkom aktywności cholinesterazy w 1 ml surowicy. W innych modyfikacjach metody z czerwienią fenolową aktywność enzymu wyraża się przez $\Delta pH/\text{godz.}$ (62). Metodą tą otrzymuje się nieco niższe wyniki niż przy pomocy metody Michela. Większe różnice występują w surowicach o niższej aktywności enzymu. Niektórzy autorzy stosują automatyczne pipetowanie roztworów, co zwiększa dokładność i szybkość metody. Surowice zhemolizowane, żółtaczkowe lub lipemiczne nie nadają się do oznaczania.

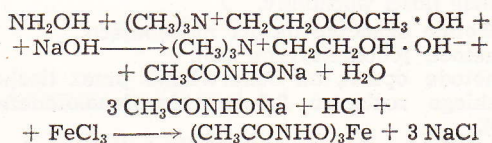
Rappaport (60) do oznaczania aktywności cholinesterazy surowicy krwi użył jako indykatora m-nitrofenolu. Wskaźnik ten wiąże się z albuminami surowicy krwi (60). Ze względu na zabarwienie erytrocytów metoda indykatorowa nie znalazła szerszego zastosowania do oznaczania aktywności cholinesterazy erytrocytów. Jedynie błękit bromotymolowy, którego maksimum absorpcji jest przy długości fali 620 m μ został użyty do oznaczania aktywności enzymu w erytrocytach i surowicy (6,53). W metodzie podanej przez Biggsa i współprac. (6) aktywność enzymu jest oznaczana w pełnej krwi i oddzielnie w surowicy. Z różnicy wartości otrzymuje się aktywność enzymu w erytrocytach.

Metoda półilościowa. W celu bardzo szybkiego oznaczenia aktywności esterazy cholinowej

(u osób stykających się z truciznami fosforoorganicznymi, np. u rolników, robotników zatrudnionych przy produkcji związków fosforoorganicznych), zwłaszcza tam gdzie nie mamy specjalnych urządzeń dla badań laboratoryjnych, stosuje się testy półilościowe. Wskaźnikiem używanym do tego rodzaju testu jest najczęściej błękit bromotymolowy (11, 45, 54, 56, 57). Daje on różne zabarwienie roztworu w zależności od ilości zhydrolizowanej przez enzym acetylocholinoi. Przez porównanie zabarwienia ze standardem odczytuje się przybliżoną aktywność enzymu. Do oznaczeń półilościowych najczęściej służą papierki testowe nasycone roztworem błękitu bromotymolowego i acetylocholinoi. Naniesiona na te papierki surowica krwi zmienia ich kolor; papierki porównuje się z papierkami standardowymi. Metody te nie są dokładne, a błąd waha się w granicach 12,5—25%.

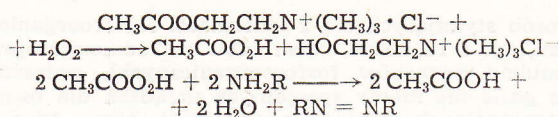
B. Metody oparte na oznaczaniu ilości niezhydrolizowanej acetylocholinoi

Metoda Hestrina. Acetylocholina tworzy z alkalicznym roztworem hydroksylaminy kwas acetohydroksamowy, który następnie w kwaśnym roztworze reaguje z roztworem chlorku żelazowego, tworząc rozpuszczalny związek kompleksowy o zabarwieniu czerwono-brunatnym (25). Metoda ta nie jest jednak specyficzna, gdyż dają ją również inne estry i bezwodniki (25).



Metoda Hestrina została przystosowana do oznaczania aktywności esterazy cholinowej w erytrocytach (50), plazmie (14, 26, 37, 6) i pełnej krwi (64). Inkubuje się próbki zawierające enzym, bufor i acetylocholinę i próbki zawierające sam bufor i acetylocholinę. Po skończonej inkubacji przeprowadza się reakcję barwną. Ilość acetylocholinoi, która została zużyta w reakcji enzymatycznej hydrolizy, oblicza się z różnicy gęstości optycznej próbki kontrolnej i badanej. Dokładność metody wynosi $\pm 1\%$. Do analizy brane są próbki wielkości 0,2—0,5 ml. Mieszanina barwna ma być stabilna przez ok. 6 godz i dłużej (27), jednak niektórzy autorzy twierdzą, że przy długim staniu następuje zanikanie barwy i roztwór należy kolorymetryzować bezpośrednio po dodaniu chlorku żelazowego. Między stężeniem enzymu a jego aktywnością stwierdza się w metodzie tej wprostproporcjonalną zależność, a hydroliza substratu posiada wartość liniową w czasie. Najlepsze wyniki uzyskuje się oznaczając acetylocholinę w takich warunkach, kiedy różnica jej stężeń przed i po hydrolizie próbki wynosi przynajmniej 25%. Należy pamiętać, że nadmiar jonów fosforanowych i boranowych może mieć wpływ na zabarwienie roztworu (25). Sabine (64) oznacza aktywność cholinesterazy erytrocytów w pełnej krwi hamując aktywność cholinesterazy plazmy specyficznym inhibitorem chinidyną. Przy wykonaniu reakcji Hestrina sprawia pewną trudność tworzenie się bąbelczek gazu, który utrudnia oznaczenie gęstości optycznej. Aktywność enzymu określa się w metodzie Hestrina w mikromolach cholinesterazy, która hydrolizuje równoważną ilość mikromoli acetylocholinoi w 1 ml surowicy (krwi) w ciągu 1 godz. w temp. 37°.

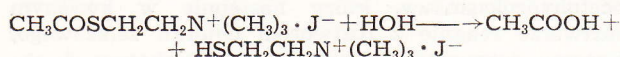
Reakcja Schönemanna. Acetylocholina reaguje w zasadowym roztworze z nadtlenkiem wodoru (perhydrolem) wytwarzając nadkwas, który utlenia różne aminy tworząc barwny produkt oksydacji (22).



Reakcja ta była po raz pierwszy opisana przez *Schönemanna* (65) do wykrywania fosforoorganicznych gazów bojowych. *Hanker* i wspópr. (22) zastosowali ją do oznaczania aktywności cholinesterazy. Przy pomocy tej reakcji, podobnie jak w metodzie *Hestrina* oznacza się ilość niehydrolizowaną acetylocholinę. Według autorów, czułość metody jest podobna do metody *Hestrina* i ilość 0,1—0,4 μM acetylocholinę w 1 ml roztworu tworzy zabarwienie dające się kolorymetrować. Acetylo-beta-metylocholina i sukcylocholina w reakcji tej też tworzą barwne produkty oksydacji i mogą być używane do oznaczania aktywności esterazy cholinowej (22).

C. Metody oparte na hydrolizie estrów tiocholiny

Istota reakcji polega na hydrolizie acetylotiocholin lub butyrylotiocholinę według równania:



Ilościowo enzym oznaczać można przez: a) oznaczenie niehydrolizowanej ilości estru tiocholiny przy długości fali 229 μm (17), b) oznaczenie powstałej po hydrolizie ilości tiocholiny.

Tiocholiny oznaczać można następująco:

- metodą jodometryczną (49),
- metodą opartą na odbarwianiu przez tiocholinę niebieskiego roztworu 2,6-dwuchlorofenoloindofenolu (17, 49),
- metodą opartą na reakcji tiocholiny w dwutio-

bisnitrobenzoenamem, która tworzy żółty kolor związku wewnątrzkompleksowego (13),

d) metodą opartą na utlenieniu tiocholiny przez nitroprusydek sodowy, który z kolei redukując się daje żółto-pomarańczowe zabarwienie (30, 47).

Przy pobieraniu krwi do oznaczania aktywności esterazy cholinowej należy mieć na uwadze to, by nie zanieczyszczać próbek śladami kwasów lub zasad, lub też inhibitorami enzymu będącymi ewentualnie na skórze zwierzęcia. Wpływa to ujemnie na wynik oznaczenia. Jeżeli enzym oznacza się tylko w samej plazmie, lub w samych erytrocytach, należy jak najszybciej oddzielić od siebie te składniki. Erytrocyty przechowywane powinny być w roztworze izotonicznym. Tak erytrocyty, jak i plazmę należy przechowywać w temp. 0°—5° w lodówce. W tej temperaturze enzym jest stabilny przez kilka tygodni, a w stanie zamrożonym przez kilka miesięcy. W temperaturze pokojowej aktywność enzymu szybko obniża się.

W związku ze stosowaniem obecnie w rolnictwie na coraz szerszą skalę pestycydów fosforoorganicznych, a także ze względu na wprowadzenie do lecznictwa ludzi i zwierząt szeregu związków o właściwościach antycholinoesteraz oznaczenie aktywności esterazy cholinowej jest przedmiotem zainteresowania wielu laboratoriów. W świetle przedstawionych tu danych widać, że aczkolwiek istnieje dotychczas wiele metod, każda z nich jest obciążona większymi lub mniejszymi niedogodnościami, a w dodatku brak jest prac unifikacyjnych, które ułatwiłyby porównanie wyników, otrzymanych przez poszczególnych autorów po zastosowaniu różnych metod.

Pismienictwo, obejmujące 69 pozycji, znajduje się u autora.

Adres autora: mgr Bogdan Mizak, Puławy, ul. Partyzantów 55.

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

ZDZISŁAW LARSKI

Puławy

Preparaty hamujące rozwój zakażenia wirusowego

Do niedawna dość pesymistycznie oceniano możliwości znalezienia preparatów wpływających hamująco na przebieg zakażenia wirusowego. Taki pogląd wydawał się całkiem uzasadniony, biorąc pod uwagę ściśle wewnątrzkomórkowy proces namnażania się wirusów, oraz zakładając konieczność bezpośredniego działania preparatu na wirus dla uzyskania efektu leczniczego.

Leki przeciwbakteryjne wprowadzone do ustroju niszczyć mogą wybiórczo bakterie (mające własną niezależną przemianę materii) dzięki bezpośredniemu oddziaływaniu na nie, nie uszkadzając komórek gospodarza. Preparaty przeciwwirusowe dla wywołania tego samego efektu musiałyby przenikać do wnętrza komórki, która jednak posiada szereg mechanizmów przeszkadzających dostawianiu się tam obcych substancji. Już pierwsze próby leczniczego użycia surowic odpornościowych dostarczyły na to wyraźnych dowodów. Z drugiej strony przeniknięcie do wnętrza komórki pewnych preparatów powodować może jej uszkodzenie, a trudno byłoby mówić w tym przypadku o działaniu leczniczym, nawet gdyby występowała przy tym również inaktywacja wirusa.

W miarę dokładniejszego poznawania właściwości wirusów oraz zjawisk zachodzących w czasie zakażenia, zebrano szereg danych wskazujących na możliwość wpływania na przebieg tego procesu. Okazało się, że można w tym celu wykorzystać właśnie ten „u-

pełny brak „samodzielności” wirusa i jego zależność od komórek organizmu gospodarza. Jest ona tak wielka, że nawet nieznaczne odchylenia od normalnego metabolizmu tego ostatniego, mieszczące się w granicach fizjologicznych, wywierają wpływ na namnażanie się wirusa.

Stwierdzono na przykład, że pewne braki pokarmowe u ludzi i zwierząt wyrażają się zwiększoną opornością na zakażenie wirusowe — zjawisko pozornie paradoksalne i krańcowo odmienne niż przy zakażeniach bakteryjnych. Według *Schradera* (19) niedożywienie i awitaminozy u dzieci wyrażają się większą opornością na zakażenie, lub zahamowaniem namnażania się wirusa polio (choroby Heinego—Medina) w organizmie. Zarówno krowy jak i świnki morskie skąpo żywione wykazują mniejszą wrażliwość na zakażenie wirusem przyszczyicy. Przykładów takich można znaleźć więcej. *Stefański* i *Zebrowski* (22) stwierdzili większą oporność na zakażenie wirusem choroby Newcastle u kur wykazujących silną inwazję pasożytniczą. Także w roślinach uprawianych na glebach ubogich oraz w bakterjach hodowanych w pożywkach o niedostatecznej ilości składników odżywczych namnażanie się wirusów jest znacznie słabsze. Istnieją też inne czynniki o podobnym działaniu i *Horsfall* (8) podkreśla ogólną zasadę, że im bardziej nienormalne są warunki środowiskowe, lub metaboliczne tym bardziej wyraźny jest hamujący wpływ na namnażanie się wirusa.