

М. Є. Блажеєвський¹, О. В. Ковальська¹, В. В. Дядченко²

¹ Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України, Україна 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: lena05021985@ukr.net

² Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Україна

Новий метод для визначення активності холінестерази

Мета. Опрацювати принципово новий метод визначення активності холінестерази крові, який би дозволив досягнути необхідної точності та відтворюваності результатів аналізу, а також створити безпечні умови праці під час виконання аналізу.

Результати та їх обговорення. Запропонований кінетичний метод визначення активності холінестерази полягає у фотометричному вимірюванні швидкості ензимного гідролізу субстрату ацетилхоліну (за його залишком) у середовищі фосфатного буферу з використанням *p*-фенетидину як індикатора. Швидкість ензимного гідролізу ацетилхоліну вимірювали за тангенсом кута нахилу лінійної ділянки кінетичної кривої у координатах $A-t$ за довжини хвилі 358 нм. Лінійну залежність умовної швидкості реакції ($tg\alpha$) від концентрації ферменту спостерігали в інтервалі концентрацій 0,12–0,36 мг/мл. Метрологічні характеристики опрацьованого способу становили: RSD = 2,0% ($n = 5$; $P = 0,95$), правильність 0,4%. Це свідчить, що запропонований спосіб визначення активності холінестерази крові характеризується високою чутливістю, достовірністю і відтворюваністю результатів.

Експериментальна частина. Досліди з визначення швидкості ензимного гідролізу повторювали тричі з кожною концентрацією ензиму. За отриманими даними будували кінетичні криві в координатах $A-t$, за прямолінійними ділянками яких розраховували тангенси кутів нахилу у xv^{-1} . Градувальний графік будували за усередненими значеннями тангенсів кутів нахилу, які відповідали певній концентрації розчину робочого стандартного зразка ензиму. Розраховували рівняння градувальної залежності $tg\alpha$ – концентрація ензиму за методом найменших квадратів. Рівняння градувальної залежності $tg\alpha$ – концентрація ензиму мало вигляд $tg\alpha (xv^{-1}) = -0,17c + 9,13$ ($r = 0,999$).

Висновки. У результаті проведених досліджень було опрацьовано новий метод визначення активності ферменту холінестерази, який характеризується високою чутливістю, достовірністю і відтворюваністю результатів, а також дозволяє забезпечити безпечні умови праці під час виконання аналізу.

Ключові слова: ацетилхолінестераза; ацетилхолін; фотометричні методи аналізу

М. Ye. Blazheyevskiy¹, O. V. Koval'ska¹, V. V. Diadchenko²

¹ National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine, Ukraine

² National Technical University «Kharkiv Polytechnic Institute», Ukraine

A new method for determining the cholinesterase activity

Aim. To develop a principally new method, which would allow achieving the necessary accuracy and reproducibility of the analysis results, for determining the activity of the blood cholinesterase; to create safe working conditions when performing the analysis.

Results and discussion. The kinetic method proposed for determining the activity of cholinesterase consists in photometric measurement of the rate of the enzymatic hydrolysis of the acetylcholine substrate (by its residue) in the phosphate buffer using *p*-phenetidine as an indicator. The rate of the enzymatic hydrolysis of acetylcholine was determined by the tangent of the inclination angle of the linear part of the kinetic curve in the $A-t$ coordinates at a wavelength of 358 nm. The linear dependence of the conditional reaction rate ($tg\alpha$) on the enzyme concentration was observed in the concentration range of 0.12–0.36 mg/mL. Metrological characteristics of the method developed were: RSD = 2.0% ($n = 5$; $P = 0.95$), correctness 0.4%. These values indicate that the method for determining the activity of blood cholinesterase is sensitive, reliable and reproducible.

Experimental part. The experiments on determining the rate of the enzymatic hydrolysis were repeated three times with a specific concentration of the enzyme. Using the data obtained the kinetic curves were constructed in the $A-t$ coordinates; on their basis the tangents of the angles of inclination in min^{-1} were calculated. The calibration graph was constructed using the average values of the tangents of the angles of inclination, which corresponded to a certain concentration of the solution of the working standard sample of the enzyme. The equation of the calibration dependence of $tg\alpha$ –enzyme concentration was calculated by the method of least squares and found to be $tg\alpha (min^{-1}) = -0.17c + 9.13$ ($r = 0.999$).

Conclusions. As a result of the studies conducted, a new method for determining the activity of the cholinesterase enzyme has been developed. The method is characterized by a high sensitivity, reliability and reproducibility and provides safe working conditions when performing the analysis.

Key words: acetylcholinesterase; acetylcholine; photometric detection

Ацетилхолінестераза – це ключовий ензим нервової системи. Він припиняє передання нервових імпульсів шляхом каталітичного гідролізу нейромедіатора ацетилхоліну. Активність ацетилхолінестерази та її зниження було визнано біологічним маркером отруєння фосforoорганічними сполуками та карбаматними пестицидами, оскільки вона є специфічною молекулярною біомішенню для цих похідних. Упродовж останніх двох десятиліть у професійній та екологічній медицині вимірювання ступеня інгібування активності ацетилхолінестерази використовують як біомаркер її специфічних інгібіторів. Можливість використання цього біомаркера пояснюється тим, що він відповідає низці характеристик, необхідних для успішного застосування біологічної реакції каталітичного гідролізу ацетилхоліну під час біомоніторингу життєдіяльності людини [1–4].

Існує два різновиди холінестерази, які розрізняють за типом субстрату, локалізації в органах та тканинах, а також біологічною роллю в організмі. Ацетилхолінестераза, або ацетилхолін-ацетилгідролаза (К.Ф. 3.1.1.7), міститься в еритроцитах, легенях, селезінці та сірій речовині мозку. Псевдохолінестераза, повна назва ацилхолін-ацилгідролаза (К.Ф. 3.1.1.8), міститься в сироватці крові, печінці, підшлунковій залозі, серці та білій речовині мозку. Визначення холінестерази сироватки крові використовують під час діагностики захворювань печінки (гепатитів, цирозів, метастазів пухлин тощо). У всіх цих випадках активність холінестерази знижується, така ж реакція спостерігається і в разі інтоксикації пестицидами [5].

Найбільш специфічним субстратом для ацетилхолінестерази є ацетилхолін, для псевдохолінестерази – бутирилхолін. Псевдохолінестераза не різниється суворю субстратною специфічністю і гідролізує такі субстрати, як ацетилхолін, бензоїлхолін, сукцинілхолін та інші естери холіну [4].

Сьогодні опрацьовано безліч різноманітних способів визначення активності сироваткової холінестерази, частину з яких активно застосовують у клінічній лабораторній практиці. Найпоширенішими є спектрофотометричні та фотоколориметричні методики, що бувають прямі, у яких як субстрат біохімічної реакції використовують бензоїлхолін або його похідну, та непрямі, у яких як субстрат переважно застосовують власне ацетилхолін.

Прямий УФ-метод Kalow [6], а також його модифікації [7] полягають у безпосередньому вимірюванні зменшення кількості субстрату бензоїлхоліну (або його похідних), завдяки різниці в спектрах світлопоглинання субстрату та продуктів його ензимного гідролізу. Активність холінестерази визначають шляхом реєстрації зменшення світлопоглинання реакційної суміші за довжини хвилі, що відповідає максимуму поглинання субстрату ензимної реакції в УФ-ділянці спектра за 235–240 нм. Однак цей метод характеризується вузьким концентраційним інтервалом лінійності, що зумов-

лено впливом компонентів плазми чи сироватки крові. Інші проблеми пов'язані з, так званим, субстратним гальмуванням, а також з помітною швидкістю реакції неензимного гідролізу субстрату за умов оптимального значення величини рН середовища для ензимної реакції. Цей метод є найбільш придатним для оцінювання активності бутирилхолінестерази в плазмі крові.

Відома низка інших способів визначення активності холінестераз у крові за частиною ацетилхоліну, яка не взяла участь у ензимній реакції. До таких ранніх фотометричних методів визначення активності ацетилхолінестерази крові належить гідроксаматний метод (метод Хестрина) [8]. В основі методу – здатність гідроксиламіну взаємодіяти в лужному середовищі з ацетилхоліном після осадження білка за допомогою трихлорооцтової кислоти. У результаті реакції утворюється гідроксамова кислота, яка в кислому середовищі утворює з ферум(III) хлоридом розчинний жовто-коричневий комплекс. Інтенсивність його забарвлення пропорційна концентрації ацетилхоліну. Активність ензиму визначають за різницею кількості ацетилхоліну, взятого для інкубування (контрольний ацетилхолін), та ацетилхоліну, що не був розщеплений ферментом за час інкубування. Вимірювання оптичної густини розчину здійснюють на фотоелектроколориметрі із зеленим світлофільтром проти води (540 нм; товщина кювети 5 мм). Переваги методу Хестрина під час визначення активності холінестерази полягають у можливості дослідження кінетики ензимної реакції за різних умов, метод достатньо чутливий і дозволяє працювати в широкому інтервалі концентрацій субстрату, є зручним для визначення активності холінестераз різного походження за стандартних умов (певні концентрації ензиму та субстрату, стандартний час реакції за умов дотримання нульового порядку реакції). Але нині в клінічній практиці його практично не застосовують через невисоку точність, адже отримання задовільних результатів можливе лише за зміни концентрації ацетилхоліну не менше, як на 25%, тому метод Хестрина не дозволяє досліджувати початкову ділянку кінетичної кривої. Метод характеризується низькою відтворюваністю та потребує великих трудовитрат [9].

Раніше також було описано метод оцінювання активності холінестераз за залишком ацетилхоліну в ензимній реакції за допомогою системи двох спряжених реакцій:

1) пергідролізу ацетилхоліну (реакція з надлишком гідроген пероксиду);

2) індукованої пергідролізом реакції пероксикислотного окиснення індикаторної речовини *o*-діанізидину утвореною надацетатною кислотою в середовищі фосфатного буферу за рН 7,2 [10].

Активність ензиму оцінюють за концентрацією негідролізованого за час інкубування з ензимом ацетилхоліну, яку визначають за наперед

побудованою градуєвальною залежністю світлопоглинання продукту окиснення індикаторної реакції від концентрації взятого ацетилхоліну після його інкубування за відсутності ензиму (контрольний ацетилхолін 0,04–0,4 мг). Вимірювання оптичної густини розчину здійснюють на фотоелектроколориметрі через 4 хв після додавання до суміші 1 мл стандартного водно-ацетонового (1:1) розчину ацетилхоліну, 3 мл 0,1% розчину *o*-діанізидину в ацетоні та 1 мл 3% гідроген пероксиду 1 мл 0,05 моль/л тризаміщеного натрій фосфату.

Недоліком цього методу є використання як індикатора *o*-діанізидину – високотоксичної речовини, яка володіє канцерогенними властивостями, а тому робота з ним створює шкідливі умови праці й порушує принципи «зеленої хімії».

Мета цієї роботи полягала в опрацюванні принципово нового та водночас простого у виконанні методу визначення активності холінестерази крові, який би дозволив досягнути необхідної точності та відтворюваності результатів аналізу, а також створити безпечні умови праці під час виконання аналізу. Вдалі результати цього дослідження відкривають нові перспективи для майбутнього використання активності холінестерази крові як біомаркера в екологічному та професійному моніторингу здоров'я людей.

Експериментальна частина

Виготовлення розчинів

*0,5% Розчин *n*-фенетидин гідрохлориду* виготовляють за точною наважкою об'ємно-ваговим методом у двічі дистильованій воді, який зберігають у прохолодному місці в щільно закоркованому флаконі з темного скла.

Розчин ацетилхолін хлориду вихідної концентрації $5,4 \cdot 10^{-3}$ моль/л готують шляхом розчинення 40,0 мг ацетилхолін хлориду в 40,0 мл двічі дистильованої води.

Як стандарт використовують *очищений препарат ензиму холінестерази сироватки коня К.Ф. 3.1.1.8 (VI клас)* з питомою активністю 28 АО/мг (за сертифікатом).

Розчин робочого стандартного зразка (РСЗ). Точну наважку порошку холінестерази (80 мг) розчиняють у 20,0 мл двічі дистильованої води за помірною нагрівання.

Розчин випробуваного зразка. Точну наважку порошку холінестерази (80 мг) розчиняють у 20,0 мл двічі дистильованої води за помірною нагрівання.

Термін придатності розчинів холінестерази – 1 доба.

Розчин гідроген пероксиду виготовляють з його 50% розчину кваліфікації «особливо чистий» шляхом відповідного розведення двічі дистильованою водою. Концентрацію робочого розчину гідроген пероксиду контролюють перманганатометрично.

Для виготовлення буферного розчину з рН 8,35 у мірній колбі на 1 л розчиняють 28,2 г натрій фосфату двозаміщеного в 900 мл двічі дистильованої води і додають 20 мл 0,2 моль/л наперед виготовленого з фіксаналу стандарт-титра розчину хлоридної кислоти з подальшим доведенням об'єму до 1000 мл.

Світлопоглинання досліджуваних розчинів вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 (358 нм, $l = 1$ см). Швидкість реакцій характеризували тангенсом кута нахилу лінійної ділянки кінетичної залежності $A-t$ (хв⁻¹). Вимірювання здійснювали за +37°C, стали температуру реакційної суміші забезпечували термостатуванням.

Фотометричне визначення активності холінестерази

Побудова градуєвального графіка. У п'ять пробірок з притертим корком на 20 мл послідовно вносили 10,0 мл 0,2 моль/л фосфатного буферного розчину з рН 8,35, додавали 2,50, 2,25, 2,00, 1,75, 1,50 мл двічі дистильованої води. Відповідно до номера пробірки вносили 0,50, 0,75, 1,00, 1,25, 1,50 мл 4,0 мг/мл розчину РСЗ холінестерази та одразу перемішували їх вміст шляхом перевертання, вмикали секундомір та термостатували 10 хв за +37°C. Потім до одержаної суміші додавали 1,0 мл $5,4 \cdot 10^{-3}$ М розчину ацетилхоліну і знову термостатували ще 10 хв за +37°C. Після цього в пробірку вносили 1,60 мл 10% розчину гідроген пероксиду, перемішували та залишали в термостаті за +37°C. Через 10 хв до розчину додавали 1,0 мл 0,5% розчину *n*-фенетидину. Суміш перемішували та переносили у кварцову кювету спектрофотометра на 1 см. Через кожні 2 хв упродовж 15 хв вимірювали світлопоглинання A за 358 нм. Досліди з кожною концентрацією ензиму повторювали тричі.

Методика визначення. 80 мг порошку випробуваного зразка холінестерази (точна наважка) розчиняли у 20,0 мл двічі дистильованої води за помірною нагрівання. У пробірку з притертим корком на 20 мл послідовно вносили 10,0 мл 0,2 моль/л фосфатного буферного розчину з рН 8,35, 2,0 мл двічі дистильованої води, 1,00 мл випробуваного розчину холінестерази, вмикали секундомір та інтенсивно перемішували отриману суміш шляхом перевертання пробірки й термостатували 10 хв за +37°C. Потім до одержаної суміші додавали 1,00 мл $5,4 \cdot 10^{-3}$ М розчину ацетилхоліну й знову термостатували за +37°C ще 10 хв. Після цього вносили 1,60 мл 10% розчину гідроген пероксиду й знову термостатували 10 хв за +37°C. Через 10 хв до розчину додавали 1,0 мл 0,5% розчину *n*-фенетидину. Суміш ретельно перемішували струшуванням пробірки й одразу переносили у кварцову кювету спектрофотометра на 1 см. Через кожні 2 хв упродовж перших 15 хв вимірювали світло-

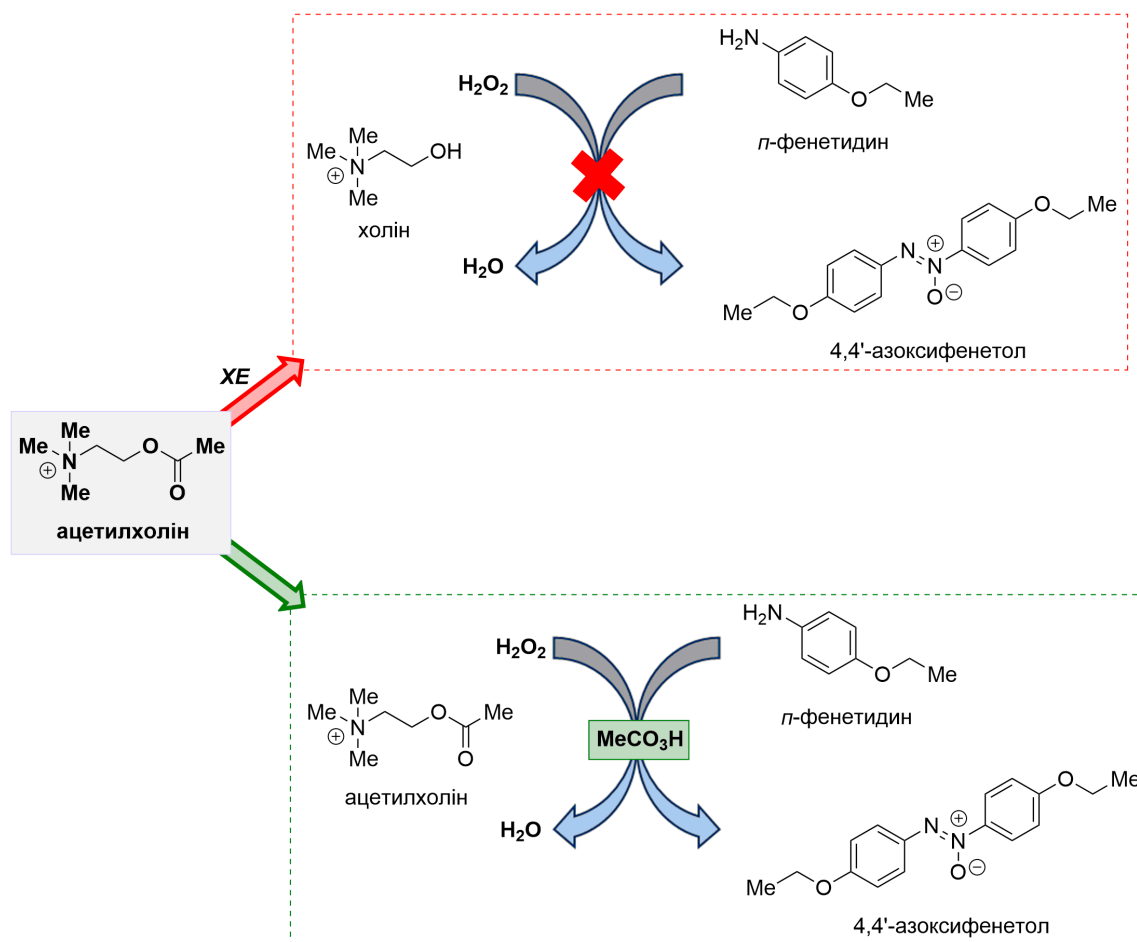


Схема. Гідроліз ацетилхоліну в присутності холінестерази та *p*-фенетидину як індикаторної речовини

поглинання A за 358 нм. Дослід повторювали чотири рази.

Результати та їх обговорення

Нами запропоновано використовувати *p*-фенетидин як індикаторну речовину на ацильну групу в кінетичному методі з фотометричним вимірюванням швидкості ензимного гідролізу субстрату ацетилхоліну за його залишком у середовищі фосфатного буферу за рН 8,35, а швидкість ензимного гідролізу ацетилхоліну вимірювати за тангенсом кута нахилу лінійної ділянки кінетичної кривої за довжини хвилі 358 нм.

Під час гідролізу ацетилхоліну перебігає реакція, зображена на схемі.

p-Фенетидин – менш токсичний та водночас більш стійкий, ніж *o*-діанізидин, у розчинах за зберігання у присутності кисню повітря. Використання як індикаторної речовини *p*-фенетидину дозволяє забезпечити безпечні умови праці та отримувати більш достовірні результати аналізу.

У дослідженні рН реакційної суміші становило 8,35, що є оптимальним одночасно для обох реакцій: ензимного гідролізу ацетилхоліну та індикаторної реакції пергідролізу (з надлишком гідроген пероксиду), що суттєво спрощує виконання аналізу.

Світлопоглинання досліджуваних розчинів визначали фотометричним методом за довжини хвилі 358 нм, оскільки саме за цієї довжини хвилі спостерігається максимальне поглинання УФ-світла продуктом окиснення – 4,4'-азоксифенетолу.

За даними, отриманими за опрацьованим кінетичним фотометричним методом, будували кінетичні криві в координатах $A-t$.

За прямолінійними ділянками побудованих кінетичних кривих розраховували тангенси кутів нахилу у хв^{-1} . Градувальний графік будували за усередненими значеннями тангенсів кутів нахилу, які відповідали певній концентрації розчину РСЗ ензиму. Розраховували рівняння градувальної залежності $\text{tg}\alpha$ – концентрація ензиму за методом найменших квадратів. На рис. наведено градувальний графік залежності умовної швидкості індикаторної реакції від концентрації холінестерази.

Рівняння градувальної залежності $\text{tg}\alpha$ – концентрація ензиму мало вигляд:

$$\text{tg}\alpha (\text{хв}^{-1}) = -0,17c + 9,13 (r = 0,999).$$

Виявлено, що лінійна залежність умовної швидкості реакції ($\text{tg}\alpha$) від концентрації ферменту спостерігається в інтервалі концентрацій 0,12–0,36 мг/мл.

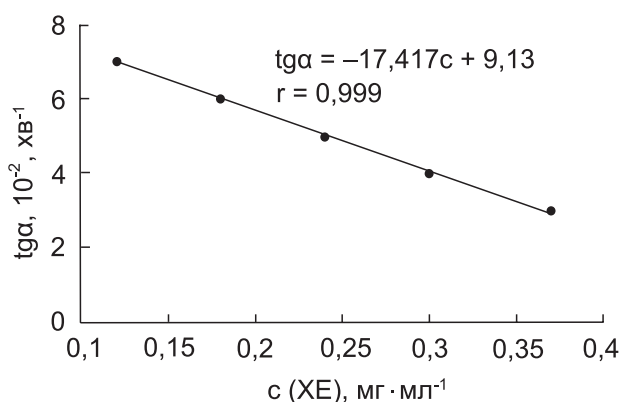


Рис. Градувальний графік залежності тангенса кута нахилу (хв⁻¹) індикаторної реакції від концентрації холінестерази (XE): $c(\text{AX}) = 3,3 \times 10^{-4} \text{ M}$, $w(\text{H}_2\text{O}_2) = 1\%$, $w(\text{п-фенетидин}) = 0,03\%$, $t = 37^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,35$

За отриманими даними будували кінетичні криві в координатах $A-t$, за прямолінійними ділянками яких розраховували тангенси кутів нахилу. За усередненим значенням п'ятьох величин тангенса за допомогою рівняння градувального графіка обчислювали вміст ензиму в розчині. Питому активність випробуваного зразка ензиму (U) розраховували за формулою:

$$U = c \times 16,6 \times 20 \times 0,35 = 27,9 \text{ АО/мг},$$

де: c – усереднене значення вмісту ензиму в розчині, знайдене за градувальним графіком, у мг/мл;

References

- Karasova, J. Z.; Maderycova, Z.; Tumova, M.; Jun, D.; Rehacek, V.; Kuca, K.; Misik, J. Activity of cholinesterases in a young and healthy middle-European population: Relevance for toxicology, pharmacology and clinical praxis. *Toxicol. Lett.* **2017**, *277*, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.04.017>.
- Holas, O.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Kuca, K. The progress in the cholinesterase quantification methods. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2012**, *7* (12), 1207–1223. <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.729037>.
- Ramsay, R. R.; Tipton, K. F. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules* **2017**, *22* (7), 1192. <https://doi.org/10.3390/molecules22071192>.
- Pohanka, M.; Hrabanova, M.; Kuca, K.; Simonato, J.-P. Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method. *International Journal of Molecular Sciences* **2011**, *12* (4), 2631–2640. <https://doi.org/10.3390/ijms12042631>.
- Stepurska, K. V.; Soldatkin, O. O.; Peshkova, V. N.; Dzyadevych, S. V.; Soldatkin, A. P. Possibility of reactivation bioselective element acetylcholinesterase-based biosensor for inhibitory analysis of pesticide. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies* **2013**, *10* (1), 97–105. <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2013.1.112702>.
- Kalow, W.; Lindsay, H. A. A comparison of optical and manometric methods for the assay of human serum cholinesterase. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **1955**, *33* (4), 568–74. <https://doi.org/10.1139/o55-071>.
- Kalow, W.; Genest, K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase; determination of dibucaine numbers. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **1957**, *35* (6), 339–46. <https://doi.org/10.1139/y57-041>.
- Hestrin, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *The Journal of biological chemistry* **1949**, *180* (1), 249–61. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)56740-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)56740-5).
- Яковлев, В. А. *Кинетика ферментативного катализа*; Наука: Москва, 1965; с. 144.
- Hanker, J. S.; Gelberg, A.; Witten, B. Colorimetric Estimation of Some Cholinergic Esters: Application to the Demonstration of Acetylcholinesterase Activity. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)* **1958**, *47* (10), 728–730. <https://doi.org/10.1002/jps.3030471014>.
- Блажеєвський, М. Є.; Ковальська, О. В.; Дядченко, В. В. (Національний фармацевтичний університет). Спосіб визначення активності холінестерази крові. Патент України 117474, 26.06.2017.

Received: 20. 05. 2021

Revised: 03. 06. 2021

Accepted: 07. 06. 2021

Стаття є фрагментом комплексних наукових робіт Національного фармацевтичного університету за темою «Органічний синтез та аналіз БАР, розробка лікарських засобів на основі синтетичних та напівсинтетичних субстанцій» (№ державної реєстрації: 0011U000943)