

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 547—550, September 1969

Eine Mikromethode zur gleichzeitigen Bestimmung der Acetylcholinesterase und der Butyrylcholinesterase im Säugetierblut

VON R. ZECH, K. FRANKE UND G. F. DOMAGK

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Göttingen (Direktor: Prof. Dr. W. Seubert)

(Eingegangen am 3. Juni 1969)

Eine Mikromethode zur gleichzeitigen Bestimmung der Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) und der Butyrylcholinesterase (E.C. 3.1.1.8) wird beschrieben. Beide Enzymaktivitäten werden an einer einzigen Blutprobe (0,05—5 μ l) ohne vorheriges Zentrifugieren in einem Ansatz gemessen. Die Reproduzierbarkeit der Methode und die Normalaktivitäten im Meerschweinchenblut werden untersucht.

A micromethod for simultaneous determination of acetylcholinesterase (E. C. 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (E. C. 3.1.1.8) in mammalian blood

A micromethod for the simultaneous determination of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase is described. Both enzymes are determined in a single blood-sample (0.05—5 μ l) without previous centrifugation. The reproducibility of the method and normal activities in guinea-pig blood were investigated.

Die Aktivitätsbestimmung der Cholinesterasen des Blutes — Butyrylcholinesterase im Plasma und Acetylcholinesterase in der Erythrocytenmembran — ist von großer diagnostischer Bedeutung bei Alkylphosphatvergiftungen. Für manche spezielle Fragestellung ist es wichtig, in kurzer Zeit an kleinen Blutmengen ohne vorheriges Zentrifugieren die Aktivitäten der Plasma-Butyrylcholinesterase und der Erythrocyten-Acetylcholinesterase getrennt zu bestimmen. Die hier mitgeteilte Methode sollte es gestatten, auch an kleinen Versuchstieren die beiden Enzyme innerhalb kurzer Zeit beliebig oft zu messen, ohne daß das Tier dadurch belastet oder geschädigt wird.

Ergebnisse

Die Esteraseaktivität wird durch die Hydrolyse von Thioestern nachgewiesen, der entstehende Thioalkohol wird mit ELLMAN's Reagenz (DTNB) umgesetzt (1). Das

Anion der bei dieser Umsetzung freiwerdenden Thionitrobenzoesäure zeigt eine Absorption bei 405 nm, über die die Enzymaktivität direkt verfolgt werden kann; Abbildung 1 zeigt das Prinzip der Enzymbestimmung. Die Hydrolyse von Acetylthiocholin durch gereinigte Acetylcholinesterase aus Rindererythrocyten und durch angereicherte Plasma-Butyrylcholinesterase des Pferdes bei verschiedenen Substratkonzentrationen ist in Abbildung 2 dargestellt. Das Erythrocyten-Enzym ist durch

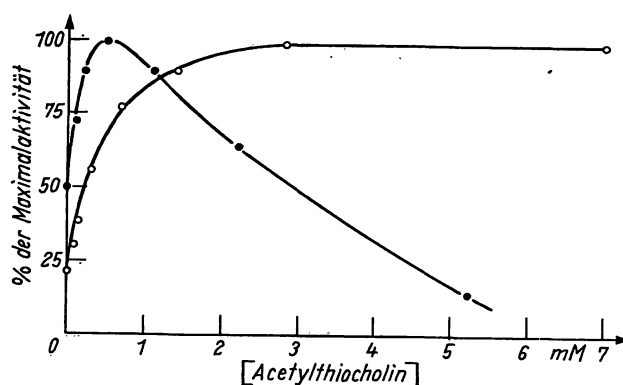


Abb. 2

Substratabhängigkeit der enzymatischen Acetylthiocholinhydrolyse. \circ = Plasma — Butyrylcholinesterase. \bullet = Erythrocyten — Acetylcholinesterase. Standard-Esteraseteste pH 7,0 mit verschiedenen Substratkonzentrationen. Ordinate: Enzymaktivität in % der Maximalaktivität

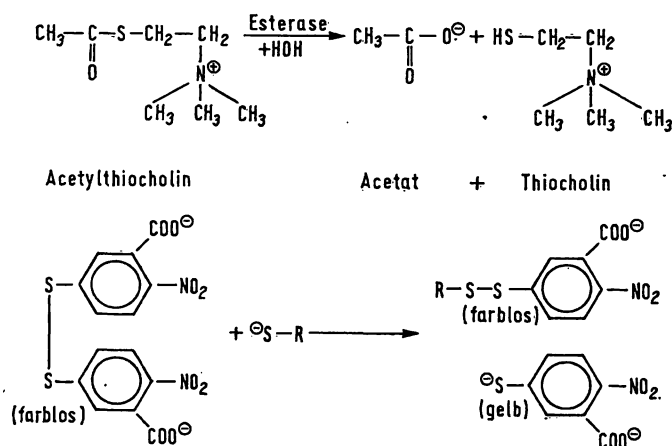


Abb. 1

Prinzip der Esterasebestimmung mit Thioestern. Oberer Teil: Enzymatische Hydrolyse von Acetylthiocholin. Unterer Teil: Nachweis des freien Thioalkoholat-Ions durch ELLMAN's Reagenz

hohe Substratkonzentrationen hemmbar, während das Plasma-Enzym diese Eigenschaft nicht zeigt. Das unterschiedliche Verhalten gegenüber hohen Substratkonzentrationen kann zu einer Unterscheidung beider Enzyme in einer Simultan-Bestimmung verwendet werden (2), doch läßt der hohe Anteil der Spontanhydrolyse nur bei relativ großen Enzymkonzentrationen eine genaue Aktivitätsbestimmung zu.

Die Abbildung 3 zeigt die Hydrolyse von Butyrylthiocholin durch Plasma-Butyrylcholinesterase in Abhängig-

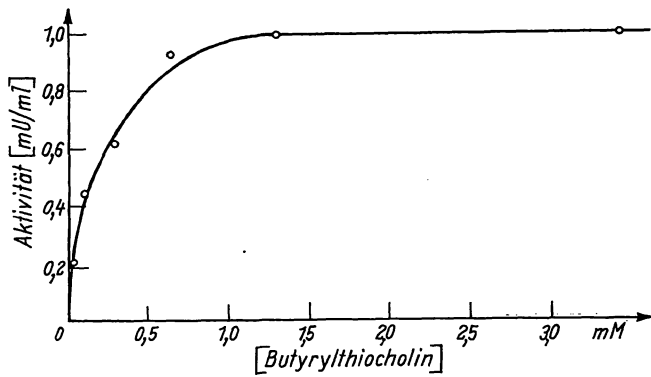


Abb. 3

Spaltung von Butyrylthiocholin durch Plasma-Butyrylcholinesterase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

keit von der Substratkonzentration. Dieser Thioester wird von der Erythrocyten-Acetylcholinesterase nicht umgesetzt. Für die Acetylthiocholinspaltung durch Acetylcholinesterase ist das Butyrylthiocholin ein kompetitiver Inhibitor. Die Abbildung 4 zeigt die Wirkung steigender Butyrylthiocholinkonzentrationen auf die

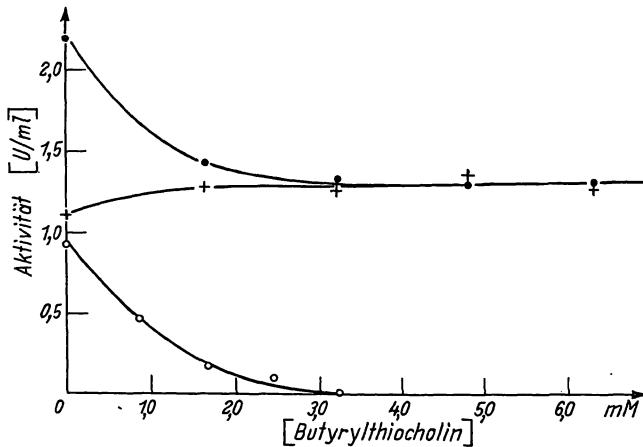


Abb. 4

Einfluß von Butyrylthiocholin auf die enzymatische Hydrolyse von Acetylthiocholin. Acetylthiocholinkonzentration 0,7 mM, pH 7,0
 • = Aktivität im Vollblut
 × = Aktivität im Serum
 ○ = Aktivität der Erythrocyten

Acetylthiocholinhydrolyse durch Vollblut, Serum und gewaschene Erythrocyten. Dieselbe Blutprobe wurde für alle drei Kurven verwendet. Nach der Trennung in Erythrocyten (mehrfache Waschung mit Ringerlösung) und Plasma wurde auf das ursprüngliche Blutvolumen mit Ringerlösung aufgefüllt. Die Abbildung 4 zeigt, daß bei 0,7 mM Acetylthiocholin ohne Butyrylthiocholin die Erythrocyten-Acetylcholinesterase und die Plasma-Butyrylcholinesterase sich zu der Gesamtcholinesterase der nicht aufgetrennten Blutprobe (Vollblut) addieren. Wird in denselben Ansatz zusätzlich Butyrylthiocholin gegeben, so ist das Erythrocytenenzym schon ab einer Konzentration von 3,5 mM Butyrylthiocholin vollständig gehemmt. Die jetzt im Vollblut gemessene Aktivität ist die des Plasmaenzyms.

In unserem Standardtest wird dementsprechend erst mit 0,7 mM Acetylthiocholin die Gesamtcholinesteraseaktivität bestimmt. Durch Zusatz von Butyrylthiocholin (4,8 mM) wird dann das Erythrocytenenzym gehemmt

und damit die Butyrylcholinesteraseaktivität bestimmt. Die Differenz zwischen Gesamtcholinesterase und Plasma-Butyrylcholinesterase ergibt dann die Aktivität der Erythrocyten-Acetylcholinesterase. Die Abbildung 4 zeigt, daß nach Zugabe von Butyrylthiocholin das Plasmaenzym etwas aktiver wird. Der Korrekturfaktor zum Ausgleich dieser Aktivitätssteigerung beträgt $0,8 \pm 0,027$ (ermittelt aus 10 Bestimmungen).

Bei Verwendung eines Photometers mit Schreiber und einer 4fachen Skalenspreizung können noch die Aktivitäten sehr kleiner Blutproben gemessen werden. Die Abbildung 5 zeigt zwei Eichkurven. Ein Abmessen so kleiner Blutvolumina ist über die 412 nm-Extinktion nach Methämoglobinbildung durch Wasserstoffperoxyd möglich. Diese Bestimmung kann in der Meßküvette vor der Substratzugabe erfolgen. Die Abbildung 6 zeigt

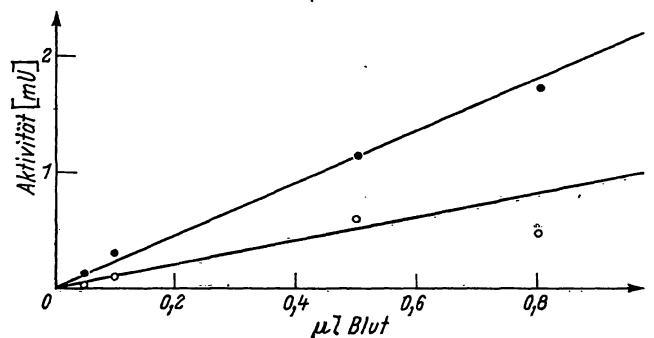
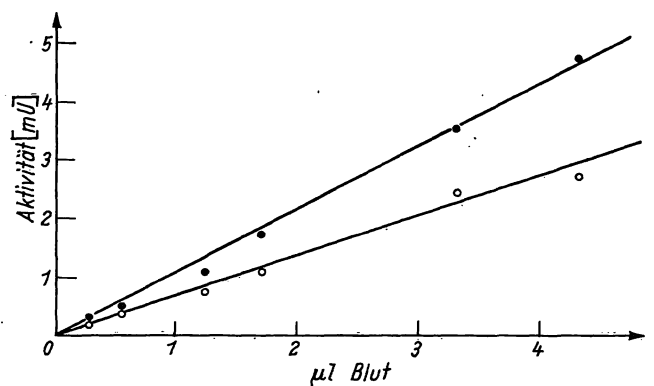


Abb. 5

Simultanbestimmung der Acetylcholinesterase und der Butyrylcholinesterase im Meerschweinchenblut. Oberer Teil: Normalküvette. Unterer Teil: Semimikroküvette

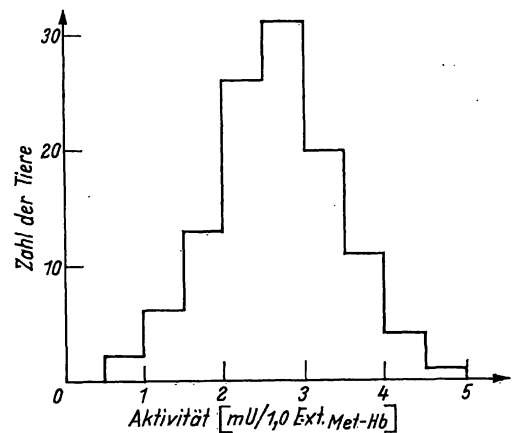


Abb. 6

Bestimmung der Erythrocyten-Acetylcholinesterase von Meerschweinchen. Aktivität in mU bezogen auf eine Methämoglobinextinktion von 1,0

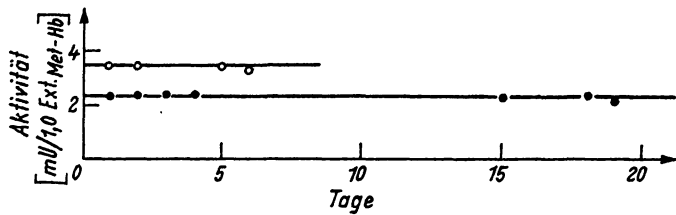


Abb. 7
Wiederholte Bestimmung der Erythrocyten-Acetylcholinesterase an zwei Meerschweinchen

das Ergebnis der Bestimmung der Erythrocyten-Acetylcholinesterase von 114 Meerschweinchen. Die Abbildung 7 zeigt das Ergebnis einer wiederholten Messung an zwei Meerschweinchen.

Methodik

Reagenzien und Geräte

Acetylcholinesterase aus Rindererythrocyten	Mann Res. Corp.
Katalase krist. aus Rinderleber	Mann Res. Corp.
5.5' Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) = DTNB	Sigma Chem.
Acetylthiocholin	Fa. Schuchardt [Comp.]
Butyrylthiocholin	Fa. Schuchardt
Cystein	Merck AG.
H ₂ O ₂	Merck AG.
EDTA (Titrplex III)	Merck AG.
Heparin (Vetreen)	Chem. Fabrik Promonta

Lösung I Phosphatpuffer pH 7,0 0,2M
NaCl 0,05M
EDTA-Na₂ 0,001M

Lösung II Phosphatpuffer pH 7,0 0,1M
NaHCO₃ 0,018M
DTNB 0,01M

Lösung III Acetylthiocholin 0,086M

Lösung IV Butyrylthiocholin 0,1M

Lösung V Heparin 0,001%
H₂O₂ 0,1%

Alle Reagenzien werden eingefroren aufbewahrt.

Reinigung der Thiocholinester

Die Konzentrationen der Lösungen III und IV werden mit der Hydroxylaminmethode (3) bestimmt, dann erfolgt eine Bestimmung der freien SH-Gruppen mit DTNB (1). Liegt die Konzentration der freien SH-Gruppen über 0,3% der Esterkonzentration (Spontanhydrolyse, Verunreinigungen), muß das freie Thiocholin mit dreifachem Überschuß H₂O₂ oxydiert werden, da die in den Test eingesetzte Menge DTNB nur bis zu einer Extinktion von 1,0 lineare Werte ergibt. Das Oxydationsprodukt fällt nach 3 Min. gelb-rot aus. Es wird Katalase zum Entfernen des überschüssigen H₂O₂ zugesetzt und zentrifugiert. Nach dem Dekantieren werden Thioester-Konzentration und freie SH-Gruppen kontrolliert.

Photometrische Bestimmungen erfolgten im Photometer „Eppendorf“ mit temperierbarem Küvettenhalter bei 25° und Kompensationsschreibern bei 4-facher Skalenspreizung. Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten wurden im Spektralphotometer Zeiss PMQ II bestimmt.

Überprüfung der Reagenzien

2,9 ml Puffer (I)
+0,1 ml DTNB (II)
+10 µl 0,01M Cystein
soll bei 405 nm und 1 cm Schichtdicke eine Extinktion von 0,415 ergeben.
(1 µMol SH/3 ml = E₄₀₅^{1cm} 4,15).

Bestimmung der Spontanhydrolyse

2,9 ml Puffer (I)

+0,1 ml DTNB (II)

+25 µl Acetylthiocholin (III)

soll eine Extinktionsänderung pro Minute von 0,0008—0,001 ergeben.

(Spontanhydrolyse 0,7 mM Acetylthiocholin = ΔE_{405}^{1cm} 0,0009 · Min.⁻¹).

In dieselbe Küvette werden

150 µl Butyrylthiocholin (IV)

gegeben; die Extinktionsänderung pro Min. soll jetzt 0,0034—0,0038 betragen (Spontanhydrolyse 7 mM Acetylthiocholin + 4,8 mM Butyrylthiocholin = ΔE_{405}^{1cm} 0,0036 · Min.⁻¹).

Die Werte der Spontanhydrolyse werden bei der Korrektur der enzymatischen Hydrolyse verwendet.

Enzymbestimmung

Die Blutprobe wird in eine mit Hämolyse (V) benetzte Kapillarpipette aufgenommen und in 0,2 ml Hämolyse ausgeblasen. Im Kühlschrank kann die Probe mehrere Wochen ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

Es wird soviel Bluthämolyse in die Pufferlösung (I) gegeben, daß in einem Volumen von 2,9 ml bei 1 cm Schichtdicke die Methämoglobinextinktion (412 nm) zwischen 0,03 und 1,5 liegt. Es kann eine Eichkurve µl Blut gegen MetHb-Extinktion angelegt werden, oder die Enzymaktivitäten werden direkt auf die Extinktion des Methämoglobin bezogen.

Nach Zugabe von 0,1 ml DTNB (II) wird 2 Min. die Reaktion der Sulfhydrylgruppen des Blutes mit DTNB abgewartet, dann erfolgt Zugabe von 25 µl Acetylthiocholinlösung (III) zur Bestimmung der Gesamtcholinesteraseaktivität bei 0,7 mM Acetylthiocholin. Bei 4-facher Skalenspreizung wird die Extinktionsänderung bei 405 nm bis zur Extinktion 0,1 gegen die Zeit registriert. Nach Zugabe von 150 µl Butyrylthiocholinlösung (IV) wird auf Extinktion 0 kompensiert und jetzt bei 0,7 mM Acetylthiocholin + 4,8 mM Butyrylthiocholin die Aktivität des Plasmanzyms registriert.

Berechnung

Die Extinktionsänderungen pro Min. mit Bluthämolyse werden durch die beiden Werte der Spontanhydrolyse korrigiert. 1 Enzymeinheit (U) = 1 µMol Substrat hydrolysiert pro Minute = ΔE 4,15.

Gesamtcholinesterase (0,7 mM Acetylthiocholin)

$$U_{\text{ges.}} = \frac{\Delta E \cdot \text{Min.}^{-1}}{4,15}$$

Plasma-Butyrylcholinesterase (0,7 mM Acetylthiocholin + 4,8 mM Butyrylthiocholin). Durch Volumenkorrektur (3,175 ml) und Aktivitätssteigerung nach Butyrylthiocholin-Zugabe (Abb. 4) Faktor 0,8 ergibt 1U

$$\Delta E \text{ von } \frac{3,0 \cdot 0,8 \cdot 4,15}{3,175} = 3,14$$

$$U_{\text{Butyrylcholinesterase}} = \frac{\Delta E \cdot \text{Min.}^{-1}}{3,14}$$

Erythrocyten-Acetylcholinesterase

$$U_{\text{Acetylcholinesterase}} = U_{\text{ges.}} - U_{\text{Butyrylcholinesterase}}$$

Diskussion

Das Problem einer getrennten Bestimmung von Acetylcholinesterase und Butyrylcholinesterase in einem Gemisch beider Enzyme wurde meistens mit Hilfe spezifischer Substrate oder spezifischer Inhibitoren gelöst (4, 5, 6). Die Substrate und Hemmstoffe sind jedoch nicht immer vollständig spezifisch für die eine der beiden

Cholinesterasen. Außerdem müssen meistens zur Ermittlung beider Aktivitäten mehrere Bestimmungen durchgeführt werden. JENSEN-HOLM (2) hat eine Methode beschrieben, bei der beide Enzyme in einem Ansatz bestimmt werden können. Diese Methode, die auf der automatischen Titration der freiwerdenden Essigsäure beruht, verbindet jedoch mit dem Vorteil großer Genauigkeit den Nachteil des aufwendigen Apparates, der relativen Unempfindlichkeit (0,3 m/Blut pro Bestimmung) und des hohen Zeitaufwandes (15—20 Min. pro Bestimmung). Reversible Inhibitoren machen darüber hinaus eine Messung völlig unmöglich, da in Substratbereichen gemessen wird, in denen die Acetylcholinesterase nur zu 60% gehemmt ist. Reversible Inhibitoren würden diesen Wert, der die Grundlage der Berechnung ist, verändern. Eine von MEINECKE und OETTEL (7) angegebene Mikromethode beruht auf der elektrometrischen Methode von MICHEL (8). Die Bestimmung beginnt etwa beim pH-Optimum der Enzyme und endet in pH-Bereichen, in denen die Aktivität nur noch 50% beträgt. Dadurch ist die Methode relativ störanfällig. Hinzu kommt, daß bei dieser Methode 0,1 m/Blut benötigt wird, das zudem vorher noch zentrifugiert werden muß. Ein Nachteil auch der meisten anderen bisher benutzten Bestimmungsmethoden ist

die relativ große Blutmenge, die in den Test eingesetzt werden muß, die zum Beispiel am Meerschweinchen durch Herzpunktion oder retrobulbäre Punktion gewonnen werden muß, Eingriffe, die notwendigerweise zu einer sehr starken Belastung führen und nicht beliebig oft am selben Tier wiederholt werden können. Die hier beschriebene Methode kann dagegen auch an kleinen Labortieren beliebig oft durchgeführt werden, da wegen der großen Empfindlichkeit im Extremfall 50 n/ für die Bestimmung beider Enzyme ausreichen. Die getrennten Aktivitätswerte für die Acetylcholinesterase und die Butyrylcholinesterase liegen schon wenige Minuten nach der Blutentnahme vor. Durch Einsetzen so kleiner Blutproben ist die Methode praktisch nicht anfällig gegenüber Störungen durch Hemmstoffe oder Arzneimittel (z. B. Oxime) in der Blutprobe, da im Inkubationsansatz eine Verdünnung über mindestens 3 Zehnerpotenzen erfolgt.

Bei Verwendung eines Photometers mit Mehrküvettenwechselautomatik können 6 Bestimmungen gleichzeitig durchgeführt werden. Es besteht außerdem die Möglichkeit zu vollständiger Automatisierung im Autoanalyzer (9).

Wir danken der Fraunhofer-Gesellschaft, München, für Unterstützung dieser Arbeit.

Literatur

1. ELLMAN, G. E., *Biochem. Pharmacol.* 7, 88 (1961). — 2. JENSEN-HOLM, J. H., *Acta pharmat. tox. K'havn.* 23, 73 (1965). — 3. HESTRIN, S., *J. biol. Chemistry* 180, 249 (1949). — 4. GORDON, A., G. A. ALLES und R. C. HAWES, *J. biol. Chemistry* 133, 375 (1940). — 5. MENDEL, B. und H. RUDNEY, *Biochem. J.* 37, 59 (1943). — 6. NACHMANSOHN, D. und M. A. ROTHENBERG, *J. biol. Chemistry* 158, 653 (1945). — 7. MEINECKE, K. H. und H. OETTEL, *Arch. Toxicol.* 21, 321 (1966). — 8. MICHEL, H. O., *J. Laborat. Clin. Med. S. Louis* 34, 1564 (1949). — 9. ABOU-DONIA, M. B. und D. B. MENZEL, *Comparat. Biochem. Physiol.* 21, 99 (1967).

Dr. R. Zech
34 Göttingen
Humboldtallee 7