

Закрытое акционерное общество «Вектор-Бест»

**В.К. Старостина
С.А. Дёгтева**

**ХОЛИНЭСТЕРАЗА:
МЕТОДЫ АНАЛИЗА
И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

Информационно-методическое пособие

Новосибирск
2008

Холинэстераза: методы анализа и диагностическое значение: информационно-методическое пособие / В.К. Старостина, С.А. Дегтева : ЗАО «Вектор-Бест». – Новосибирск : «Вектор-Бест», 2008. 35 с.

Пособие содержит сведения о ферментах, гидролизующих сложные эфиры холина и некоторых карбоновых кислот и существующих в двух видах: ацетилхолинэстераза и сывороточная холинэстераза (ХЭ). Наибольшее диагностическое значение имеет определение активности ХЭ, поэтому ей в брошюре уделено основное внимание. Описаны свойства фермента, его роль в организме, клиническая значимость, методы определения активности, приведен ряд практических рекомендаций по использованию результатов анализа сывороточной холинэстеразы.

Пособие предназначено для врачей клинической лабораторной диагностики и практикующих врачей различных специальностей.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. НОМЕНКЛАТУРА ХОЛИНЭСТЕРАЗ	5
2. ЛОКАЛИЗАЦИЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗ	–
3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С СУБСТРАТАМИ И ИНГИБИТОРАМИ	8
4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И ИХ КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ	15
5. ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ	19
6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ	21
7. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ	27
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	30
ЛИТЕРАТУРА	32

ВВЕДЕНИЕ

Холинэстеразы – семейство ферментов из класса гидролаз, природными субстратами которых являются сложные эфиры холина с уксусной, пропионовой или масляной кислотами. Одним из признаков принадлежности ферментов к этому семейству считается их ингибирование алкалоидом эзерином в концентрации 10^{-5} – 10^{-8} М.

Анализ холинэстераз, особенно сывороточного фермента, имеет большое диагностическое значение.

Определение ХЭ необходимо прежде всего у пациентов в предоперационный период для выявления у них атипичных форм фермента. Нормальные формы сывороточной холинэстеразы быстро гидролизуют используемый в анестезии миорелаксант сукцинилхолин, который вызывает кратковременную задержку дыхания. Атипичные формы фермента гидролизуют сукцинилхолин медленно, и это может привести к длительному, до нескольких часов, апноэ.

Активность сывороточной ХЭ – показатель функции печени, снижающийся при ее циррозе, а также гепатите, холецистите и многих других заболеваниях.

Проведение мониторинга ХЭ обязательно для людей, работа которых связана с производством отравляющих веществ, получением и использованием инсектицидов, пестицидов и лекарственных препаратов – ингибиторов фермента. Снижение активности ХЭ, наблюдаемое у этих лиц в течение определенного времени, свидетельствует об отравлении данными соединениями.

Анализ ХЭ позволяет контролировать в крови обследуемых лиц уровень ряда ее ингибиторов, в число которых входят лекарственные препараты, применяемые для лечения болезни Альцгеймера, старческого слабоумия, глаукомы, заболеваний мышц, кишечника и др.

1. НОМЕНКЛАТУРА ХОЛИНЭСТЕРАЗ

Семейство холинэстераз можно разделить на два типа ферментов, один из которых преимущественно гидролизует ацетилхолин (АХ), а второй – такие эфиры холина, как бутирилхолин (БуХ), пропионилхолин (ПХ) и некоторые другие.

Систематическое название первого типа холинэстераз по номенклатуре ферментов – ацетилхолин-ацетилгидролаза (КФ 3.1.1.7.) [1]. Однако чаще используют его тривиальное название ацетилхолинэстераза (синонимы: холинэстераза I и ацетилхолингидролаза). Второй тип ферментов имеет систематическое название ацилхолин-ацилгидролаза (КФ 3.1.1.8.) и тривиальное название холинэстераза, синонимами которого являются: псевдохолинэстераза, бутирилхолинэстераза (БуХЭ), холинэстераза II, пропионилхолинэстераза (ПХЭ).

В настоящей работе используются рекомендованные тривиальные названия: ацетилхолинэстераза (АХЭ) и холинэстераза (ХЭ).

2. ЛОКАЛИЗАЦИЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

Локализация и биологическая роль ацетилхолинэстеразы (3.1.1.7.)

Ацетилхолинэстераза найдена в сером веществе головного мозга, скелетных мышцах, сердце, легких, кишечнике, селезенке и эритроцитах. Фермент локализован в межнейрональных синапсах, концевых двигательных пластинах скелетных мышц, ганглиях вегетативной нервной системы и мембранах эритроцитов [2, 3].

Ацетилхолинэстераза играет ключевую роль в процессах нейроморальной и синаптической передачи: в холинэргических синапсах катализирует гидролиз ацетилхолина и тем самым прекращает действие данного медиатора на холинорецептор, отвечающий за проницаемость постсинаптической мембраны для ионов. При ингибировании АХЭ освобождение рецепторов от ацетилхолина происходит очень медленно (только посредством диффузии), и передача нервных импульсов нарушается. Это вызывает серьезные расстройства в жизнедеятельности организма, а при тяжелых отравлениях может привести к смертельному исходу [4]. Предполагают, что на стадии эмбрионального развития АХЭ участвует в процессе регуляции дифференциации нервных клеток [3].

Локализация холинэстеразы (3.1.1.8.) и ее молекулярные формы

Холинэстераза обнаруживается в сыворотке и плазме крови, белом веществе головного мозга, клетках спинного мозга, сердце, полосатых мышцах, поджелудочной железе, кишечнике, плаценте и других органах [2, 3].

Сывороточная ХЭ синтезируется в печени и оттуда поступает в кровоток. В мозге ХЭ локализована в капиллярных эндотелиальных и глиальных клетках, которые ее синтезируют [3]. Холинэстераза обнаружена в амилоидных бляшках здоровых пациентов преклонного возраста и у пациентов с болезнью Альцгеймера [5, 6], а также в нейронах, которые оказывают влияние на поведение, эмоциональную память и управляющую функцию [7]. В мышцах ХЭ локализована в двигательных пластинках.

Холинэстераза синтезируется в виде полипептидной цепи, состоящей из 574 аминокислотных остатков, к которым присоединены остатки сиаловых кислот и углеводов. Таким образом, субъединица фермента является сиалогликопротеидом, молекулярная масса которого составляет 85 КДа.

Холинэстераза в организме присутствует в нескольких молекулярных формах (рис. 1). Секретируемый в жидкости тела фермент представлен глобулярными, водорастворимыми (гидрофильными) формами G1, G2 и G4, которые состоят, соответственно, из одной (мономер), двух (димер) или четырех (тетрамер) субъединиц. Субъединицы в димере связаны дисульфидными связями. Найдено, что 95% активности ХЭ плазмы приходится на долю тетрамеров. Димеры и мономеры, присутствующие в плазме, по-видимому, являются продуктами деградации тетрамеров.

В мускулах животных обнаружены асимметричные формы ХЭ, содержащие от одного до трех тетрамеров (G4), присоединенных дисульфидными связями к коллагеноподобным «хвостам» и имеющих вытянутую форму. Большая их часть состоит из 12 субъединиц фермента (форма A12). Асимметричные формы ХЭ обнаруживают как в жидкостях тела, так и в мембранах.

В сердце, мозге и шейных ганглиях обнаружены амфифильные формы ХЭ, для которых характерно наличие гидрофильных димеров G2 или тетрамеров G4, присоединенных дисульфидными связями к гидрофобному «якорю». «Якорь» представляет собой гликолипид, которым фермент связывается с фосфолипидной мембраной и закрепляется на ней [3]. Множественность молекулярных форм ХЭ, вероятно, необходима для выполнения различных биологических функций.

Биологическая роль холинэстеразы

Многие функции ХЭ в организме выяснены в течение последних 20 лет благодаря интенсивно проводимым исследованиям. ХЭ вместе с АХЭ участвует в передаче нервных импульсов. Показано, что при прогрессирующей болезни Альцгеймера, когда уровень АХЭ в организме человека снижается, ее роль может играть ХЭ [6]. Предполагают, что холинэстераза гидролизует ацетилхолин в нервно-мышечных соединениях и тем самым защищает их от избытка ацетилхолина [8] (рис. 1).

Сывороточная ХЭ выполняет в организме защитные функции. В частности, она предохраняет от инактивации АХЭ, поскольку с большой скоростью гидролизует ингибитор данного

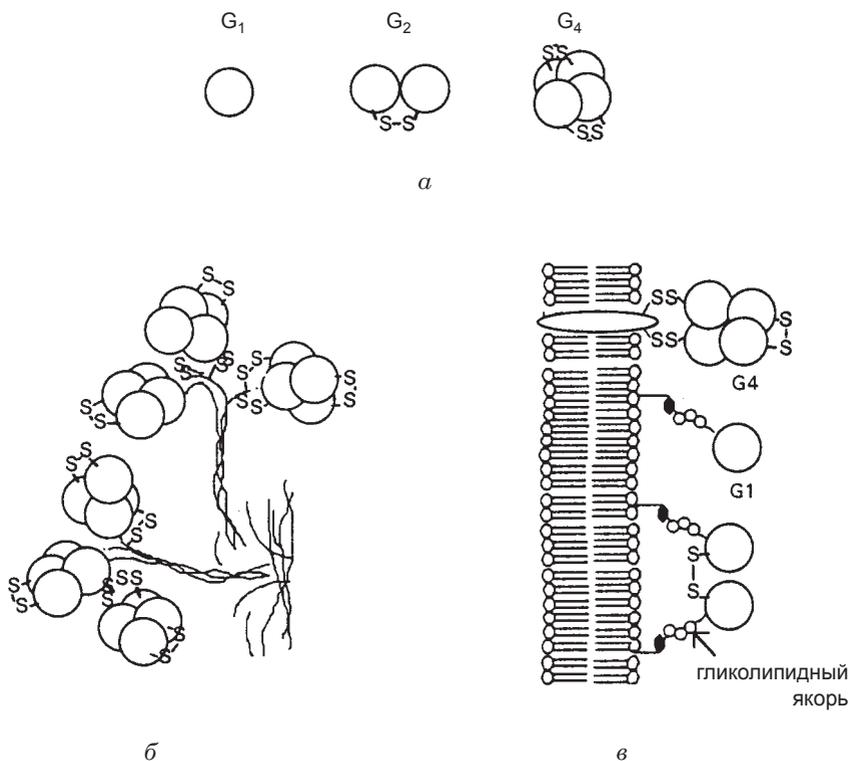


Рис. 1. Молекулярные формы ХЭ: а – глобулярные; б – асимметричные; в – амфифильные.

фермента бутирилхолин, образующийся в процессе метаболизма жирных кислот [4]. Кроме того, ХЭ способна осуществлять гидролиз многих токсичных фосфорорганических веществ и карбаматов, поступивших в организм извне [9]. Установлено, что введение в кровь животным сывороточной ХЭ лошади или рекомбинантной ХЭ человека на 100% защищает их от смертельных доз зарина, зомана и Vx-газов [10]. Холинэстераза является главным ферментом, который метаболизирует кокаин и его производные с образованием нетоксичных продуктов распада. Поэтому препараты на основе ХЭ могут быть использованы при передозировке этого психоактивного вещества [11, 12].

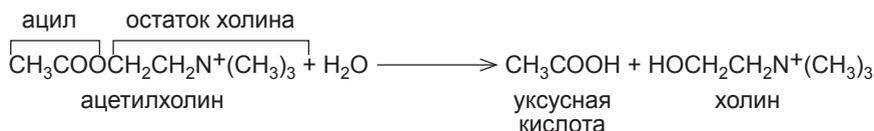
Холинэстераза участвует в регуляции содержания холина в плазме и его метаболизме. Выявлено, что активность фермента коррелирует со степенью ожирения пациентов и липидным профилем сыворотки крови [13]. Холинэстераза также играет роль в регуляции пролиферации клеток при эмбриогенезе [3, 13, 15]. Предполагают, что она осуществляет контроль проницаемости мембран клеток и стенок сосудов [3]. Поскольку в молекуле ХЭ локализован не только эстеразный, но и пептидазный активный центр, то высока вероятность участия фермента в образовании нейропептидов.

Дальнейшее изучение биологических функций ХЭ, очевидно, может привести к получению новых интересных результатов.

3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С СУБСТРАТАМИ И ИНГИБИТОРАМИ

Механизм взаимодействия холинэстеразы с субстратами и структура активного центра холинэстеразы

Природными субстратами ХЭ являются ацетилхолин (АцХ), сложный эфир уксусной кислоты и холина, и бутирилхолин, сложный эфир масляной кислоты и холина. ХЭ катализирует гидролиз субстратов с образованием соответствующей кислоты и холина.



Гидролиз субстратов осуществляется в активном центре фермента, который, как выяснено в результате кристаллографического изучения молекулы ХЭ, локализован на «дне» узкой щели глубиной 20 Å, выстланной внутри аминокислотными остатками, содержащими гидрофобные группы (тирозин, фенилаланин и др.) (рис. 2) [16].

В активном центре ХЭ локализованы:

- «карман», служащий для связывания ацильного остатка молекулы субстрата за счет гидрофобного взаимодействия с валином;
- эстеразный центр, включающий «каталитическую триаду»: серин, гистидин, глутамин;
- анионный центр, в состав которого входит остаток триптофана. Он связывает часть субстрата, содержащую четвертичный азот.

Кроме того, в молекуле фермента имеется периферический анионный центр, локализованный вблизи края щели. Он содержит аспарагин, несущий положительно заряженную амидную группу и ароматическую аминокислоту триптофан. Субстрат имеет более высокое сродство к периферическому центру, чем к эстеразному, и его присоединение к периферическому центру вызывает активацию фермента.

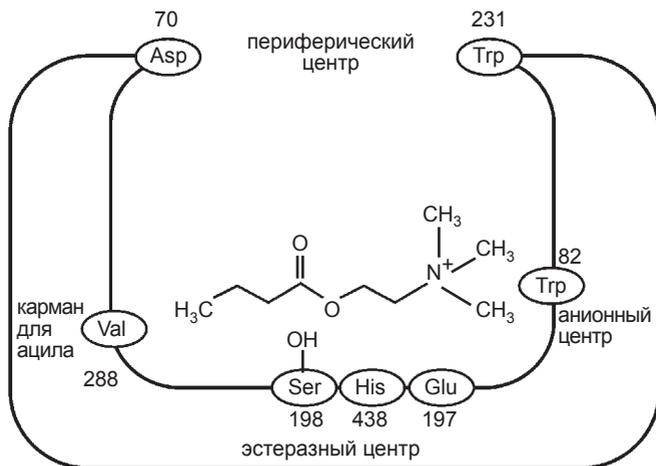


Рис. 2. Схема активного центра ХЭ.

По результатам многих исследований механизм взаимодействия ХЭ с субстратом заключается в следующем:

- субстрат, за счет положительного заряда на атоме азота, связывается с Asp 70 периферического центра, «соскальзывает» в активный центр фермента и ориентируется в нем (рис. 2);
- происходит гидролиз сложноэфирной связи субстрата, и возникает эфирная связь между ацильной группой субстрата и ОН-группой серина активного центра, образуется «ацил-фермент» (Ser-O-OC-R);
ацил
- «ацил-фермент» с большой скоростью гидролизует под действием воды, и молекула фермента освобождается для следующего цикла взаимодействия с субстратом.

Взаимодействие холинэстеразы с ингибиторами и реактиваторами

Ингибиторы ферментов – это вещества, которые снижают их каталитическую активность. Ингибиторами ХЭ являются многие природные и синтетические соединения: фосфорорганические соединения (ФОС); эфиры N-алкилкарбаминовых кислот (карбаматы); четвертичные аммониевые основания; гетероциклические соединения, содержащие третичный или четвертичный атом азота [9]. Некоторые характеристики данных веществ представлены в табл. 1.

ФОС и карбаматы иногда называют «полусубстратами» или «плохими субстратами» [4, 9].

ФОС гидролизуются в активном центре фермента, остаток фосфорила взаимодействует с ОН-группой серина активного центра с образованием «фосфорил-фермента». Следующая стадия катализа – гидролиз «фосфорил-фермента» водой и образование свободного фермента – идет очень медленно, так что активность фермента не восстанавливается. Ингибирование ХЭ ФОС является необратимым. Активность «фосфорил-фермента» можно восстановить при помощи реактиваторов (табл. 2), например дипироксима, который вытесняет остаток фосфорила из связи с ХЭ, и молекула фермента освобождается для взаимодействия с субстратом. Фосфорорганические соединения оказывают мощное отравляющее действие на организм. Причиной отравления является накопление негидролизованного ацетилхолина, которое приводит сначала к ускорению проведения нервных импульсов (возбуждение) и далее к блокированию передачи нервных импульсов (паралич). ФОС используют в качестве боевых отравляющих веществ (БОВ), инсектицидов и лекарственных средств (армин) [17, 18].

Таблица 1

Ингибиторы ХЭ и их взаимодействие с ферментом

Класс соединений	Общая формула	Природа взаимодействия с ХЭ	Ингибирование фермента	Препараты	Область применения
Фосфорорганические соединения	$\begin{array}{c} R_1 \\ \\ R_2 - P - Z \end{array}$ <p>где R₁ и R₂ – алкоксильные, алкильные группы и их комбинации с диалкиламмониевыми группами; Z-группы CN-, F и др.</p>	образование прочной ковалентной связи «фосфорил-серин» в активном центре фермента	необратимое	карбофос, тиофос, хлорофос зарин, зоман, табун армин	инсектициды, акарициды боявые отравляющие вещества лекарственный препарат
Эфиры замещенных карбаминных кислот (карбаматы)	$R_2 - NH - \overset{O}{\parallel} C - O - R_1$ <p>где R₂ – ароматические и гетероциклические соединения, содержащие третичный или четвертичный атом азота; R₂-H, CH₃- и другие</p>	образование ковалентной связи «карбамоил-серин» в активном центре фермента	обратимое	физостигмин и его производные, пиростигмин, неостигмин (прозерин) и др. аминокарб	лекарственные средства инсектицид
Четвертичные аммониевые основания	$R_2 - N^+ - R_4$ <p>где R₁, R₂, R₃, R₄ – органические остатки</p>	образование комплекса с анионным центром фермента	конкурентное	Трис эдрофоний хлорид	буферные растворы лекарственное средство
Гетероциклические соединения, содержащие третичный и четвертичный атомы азота	–	образование комплекса с анионным центром фермента	конкурентное	галантамин, такрин, донепезил дибукаин алкалоиды	лекарственные средства анализ генетических вариантов ХЭ лекарственные средства

**Реактиваторы холинэстеразы, используемые в качестве
лекарственных средств в России**

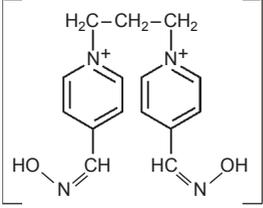
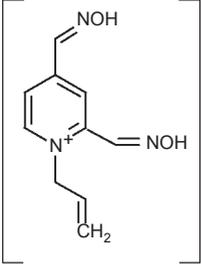
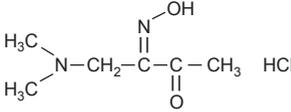
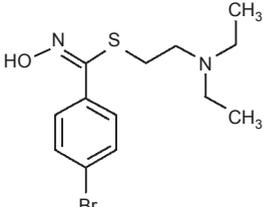
Наименование, формула	Применение
<p align="center">Дипироксим</p>  <p align="center">2Br⁻</p>	<p>В комбинации с атропином, апрофеном при отравлении фосфорорганическими соединениями. Профилактика отравления, когда известно, что произошло воздействие яда на организм. Лечение язвенной болезни кишечника и двенадцатиперстной кишки. Купирование пароксизмальных нарушений ритма сердца</p>
<p align="center">Аллоксим</p>  <p align="center">Br⁻</p>	<p>По действию близки к дипироксиму. При острых отравлениях фосфорорганическими соединениями. Профилактика отравлений, когда известно, что произошло воздействие яда на организм</p>
<p align="center">Изонитрозин</p>  <p align="center">HCl</p>	
<p align="center">Диэтиксим</p>  <p align="center">Br</p>	<p>При отравлениях фосфорорганическими соединениями. Целесообразно сочетание с атропином и дипироксимом</p>

Таблица 3

**Ингибиторы холинэстеразы, используемые в России
в качестве лекарственных средств [12]**

Наименование препарата (синонимы)	Ингибирование	Применение, действие
1	2	3
Физостигмин (эзерин), алкалоид	обратимое	При глаукоме. Вызывает сужение зрачка, снижает внутриглазное давление
Галантамин (нивалин), алкалоид	обратимое	Мышечная дистрофия, двигательные и чувствительные нарушения, остаточные явления после нарушения мозгового кровообращения, ДЦП и др. Болезнь Альцгеймера. Устраняет остаточный нервно-мышечный блок, вызванный сукцинилхолином. Менее токсичен, чем физостигмин
Прозерин (неозерин, неостигмин), синтетическое соединение	обратимое	Атрофия зрительного нерва, глаукома (редко). Используют как антидот миорелаксантов и др. Аналог физостигмина, по свойствам близок к галантамину
Пиридостигмина бромид (калимин, местимон), синтетическое соединение	обратимое	По свойствам близок к прозерину
Оксазил (амбеноний хлорид, тизуран, мителаза хлорид), синтетическое соединение	обратимое	По свойствам близок к прозерину, но более активен. Обладает длительным действием
Хинотимин, синтетическое соединение	обратимое	Снятие остаточного антидеполяризующего блока нервно-мышечной передачи. Более активен, чем прозерин
Дистигмин (убретид, гексамариум бромид), синтетическое соединение	обратимое	Показания к применению, как у прозерина и оксазила. Обладает длительным действием
Аминостигмин, синтетическое соединение	обратимое	По свойствам близок к физостигмину
Такрин, синтетическое соединение	обратимое	Болезнь Альцгеймера, старческое слабоумие. По свойствам близок к прозерину и физостигмину. Антагонист курареподобных препаратов
Амиридин, синтетическое соединение	обратимое	При болезни Альцгеймера. Стимулирует проведение возбуждения в нервных волокнах и синаптическую передачу в нервно-мышечных окончаниях. По свойствам близок к такрину

1	2	3
Стефаглабрин, алкалоид	обратимое	Миопатия, парез лицевого нерва, боковой амиотрофический склероз
Дезоксипеганин, алкалоид	обратимое	Поражение периферической нервной системы, миастения, гемиплегии, гемипарезы, поражения передних рогов спинного мозга
Армин, синтетическое фосфорорганическое соединение	необратимое	Глаукома. Широкого применения не нашёл. Токсичен

Реактиваторы [18] (табл. 2) ХЭ нашли применение в комплексной терапии отравлений ФОС.

Карбаматы, также как и ФОС, гидролизуются в активном центре фермента, отщепленный остаток карбаминовой кислоты взаимодействует с ОН-группой серина с образованием «карбамоил-фермента». Следующая стадия катализа – его гидролиз водой и образование свободного фермента – идет быстрее, чем гидролиз «фосфорил-фермента», но медленнее, чем природных «ацил-ферментов». Активность ХЭ блокируется карбаматами на несколько часов и затем восстанавливается [9]. Это обратимый тип ингибирования.

Карбаматы широко используются в качестве лекарственных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний, при параличах и других болезнях (табл. 3) [18]. Описано также масштабное применение физостигмина – обратимого ингибитора ХЭ – в качестве профилактического средства от возможного отравления БОВ. В 1991 г. в период войны в Аденском заливе физостигмин был введен 400 тыс. американских солдат с целью скоротечного блокирования (и, следовательно, защиты от инактивации) АХЭ и ХЭ, так как ожидалась атака армии Ирака с использованием нервных газов [9].

К обратимым ингибиторам ХЭ относится также ряд соединений, которые не образуют ковалентных связей с молекулой фермента. Это четвертичные аммониевые основания (трис, эдрофоний хлорид) и гетероциклические соединения, содержащие третичный или четвертичный атом азота (табл. 2). Данные вещества образуют комплекс с анионным центром фермента, часто по конкурентному типу, и препятствуют взаимодействию субстрата с ним. К этому типу соединений относятся многие лекарственные средства (галантамин, такрин и другие) и анестетик локального действия дибукаин. Он широко используется в анализе генетических вариантов ХЭ [3, 9, 19]. Наиболее полные данные о взаимодействии ингибиторов с ХЭ приведены в обзоре [4].

4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И ИХ КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Генетические варианты холинэстеразы

Состав и последовательность аминокислот в белке определяется структурой гена, кодирующего белок. Вследствие мутаций (изменений) в нуклеотидной последовательности гена возникают его варианты (аллели), структура которых отличается от исходного гена.

Процесс экспрессии измененных генов приводит к появлению в организме генетических вариантов белка, отличающихся своим строением и свойствами.

К настоящему времени известно более 20 генетических вариантов ХЭ. Синтез ХЭ в плазме определяют два локуса*: E₁, локализованный на 3-й хромосоме, и E₂, локализованный на 16-й хромосоме. Большинство генетических вариантов контролирует локус E₁. Наиболее известны следующие аллели нормального (E₁^н) гена и варианты ХЭ (табл. 4) [20].

Для возникновения фенотипа «молчащий» фермент, помимо указанной в табл. 2, существуют и другие причины [19]:

- отсутствие гена ХЭ в хромосоме. При этом в сыворотке крови не обнаруживается белок ХЭ и его каталитическая активность;
- мутации в структуре гена ХЭ, вследствие которых происходит синтез каталитически неактивных молекул фермента.

Известно, что в клетках человека содержится двойной набор хромосом, наследуемых от родителей. Организм может быть либо гомозиготным по гену ХЭ, т.е. нести в обеих хромосомах одинаковые аллели, либо гетерозиготным, т.е. нести в обеих хромосомах разные аллели. Генетический анализ различных групп населения показал, что, помимо гомозигот (табл. 4), существуют все возможные варианты гетерозигот по аллелям ХЭ. В сыворотке гетерозигот обнаруживают оба фермента, контролируемых разными аллелями.

Из данных, представленных в табл. 4, видно, что замена одной аминокислоты в молекуле белка ХЭ на другую приводит к изменению его свойств. Активность у всех вариантов ХЭ либо ниже, чем у нормального фермента, либо отсутствует. Генетические варианты ХЭ по-разному относятся к ингибиторам. Наиболее изучены свойства атипичной ХЭ [9]. Так, дибукаин ингибирует нормальную ХЭ

* Локус – местоположение определенного гена (его аллелей) на генетической или цитологической карте хромосомы.

на 75%, промежуточные гетерозиготные формы – на 45–72%, а атипичные гомозиготные формы – только на 30%.

Атипичный фермент, в отличие от нормальной ХЭ:

1. Не гидролизует сукцинилхолин, который используют при операциях в качестве мышечного релаксанта. Причиной является замена Asp 70 на глицин в периферическом центре.

2. Много медленнее (~ в 10 раз) реагирует с обратимыми ингибиторами, используемыми при лечении нейродегенеративных заболеваний (физостигмин и другие).

3. Гидролизует кокаин в 4, а прокаин – в 15 раз медленнее.

Выявлены генетические варианты ХЭ, устойчивые к ингибированию фторидом и другими соединениями.

Таблица 4

Данные о генотипах ХЭ

Общепринятое наименование фермента	Генотип	Фенотип* и свойства фермента	Замена аминокислот	Генотип гомозигот
Обычный (usual)	E_1^u	нормальный	нет	$E_1^u E_1^u$
Атипичный (atypical)	E_1^a	устойчив к ингибированию дибукаином, активность снижена на 75%	Asp (70) → Gly	$E_1^a E_1^a$
Неактивный («молчащий») (silent)	E_1^s	«молчащий», нет активности	Gly (117) → сдвиг рамки считывания	$E_1^s E_1^s$
Н-вариант	E_1^h	активность снижена на 90%	Val (142) → Met	$E_1^h E_1^h$
Фторид-1	E_1^f	устойчив к ингибированию фторидом	Thr (243) → Met	$E_1^f E_1^f$
Фторид-2	E_1^f	устойчив к ингибированию фторидом	Gly (390) → Val	$E_1^f E_1^f$
J-вариант	E_1^j	активность снижена на 66%	Glu (497) → Val	$E_1^j E_1^j$
К-вариант	E_1^k	активность снижена на 33%	Ala (539) → Thr	$E_1^k E_1^k$

* Фенотип – внешнее проявление генотипа, совокупность признаков объекта

Работы по изучению распространенности аллелей гена ХЭ проводятся во многих странах. Установлено [21], что 76% людей имеют нормальный генотип ($E_1^u E_1^u$), а остальные 24% несут, по крайней мере, один генетически измененный аллель. Наиболее распространены фенотипы E_1^a (атипичный аллель), E_1^k (вариант К) и E_1^s («молчащий» ген).

В Америке и Европе частота встречаемости гетерозигот по атипичному аллелю составляет около 4%, частота гомозигот $\sim 0,04\%$. Показано, что среди некоторых групп населения частота гетерозигот достигает 11% [9].

Частота встречаемости аллеля варианта К у белого населения Европы и Америки составляет 12,0–12,8% [9, 23].

Носителями «молчащих» вариантов в Америке являются 0,8% обследованных (гомо- и гетерозиготы) [24]. Частота гомозигот по «молчащим» генам в Америке и Европе составляет 0,001%, а в Индии в общине Vuzya – в 4000 раз выше и достигает 4% [25, 26]. Высокая частота «молчащего» варианта ХЭ наблюдается у эскимосов Аляски [19].

Предполагают, что генетические варианты ХЭ возникают в результате «эволюционного давления» природных ингибиторов фермента (алкалоиды пасленовых, антибиотики грибов, производные кокаина и т. д.), попадающих в организм с пищей или из окружающей среды [9, 27]. Установлено, например, что географическое распределение «атипичной» формы ХЭ совпадает с распределением пасленовых (томаты, картофель, баклажаны) [27]. Для выведения этих веществ из организма необходимо большое разнообразие форм ХЭ.

Клиническая значимость генетических вариантов холинэстеразы

Обследование больших групп населения, гомозиготных по «молчащим» генам ХЭ с активностью фермента не более 2% от нормального уровня, показало, что, по общепринятым меркам (вес тела, функции почек, печени и т. д.), они были здоровыми людьми [26]. Однако в дальнейшем было установлено, что лица, несущие измененные гены ХЭ, подвержены риску при операциях под наркозом, при контакте с отравляющими веществами и риску возникновения некоторых заболеваний.

Интерес к изучению вариантов ХЭ возник в середине 1950-х годов, когда в анестезии стали использовать миорелаксант сукцинилхолин для кратковременной остановки дыхания у оперируемых на 3–10 мин. У

пациентов с нормальной активностью сывороточной ХЭ бóльшая часть введенного сукцинилхолина быстро гидролизуеться, и только небольшая его часть достигает нервно-мышечного соединения. Если же активность ХЭ у пациента снижена или отсутствует, то количество миорелаксанта, воздействующее на нервно-мышечное соединение, значительно возрастает и длительность апноэ может составить несколько часов, что может угрожать жизни больного [28]. Возникновение такого апноэ чаще всего наблюдается у людей, в гено типе которых отсутствует нормальный ген ХЭ (E_1^u) [29]. При проведении хирургических операций чувствительными к сукцинилхолину оказываются от 4 до 7% больных. Определение активности ХЭ у пациента в предоперационный период позволяет избежать внештатной ситуации при операции. Если у больного выявлена низкая активность ХЭ, то при анестезии либо отказываются от применения сукцинилхолина, либо перед операцией заранее подготавливают аппаратуру для искусственной вентиляции легких. Холинэстеразу определяют также у родственников пациентов, у которых при операции было зарегистрировано длительное апноэ.

Холинэстераза, как было отмечено ранее, в организме играет роль детоксиканта. Поэтому лица с низко активными генетическими вариантами сывороточной ХЭ обладают повышенной чувствительностью к отравлению фосфорорганическими соединениями, карбаматами и другими веществами, проявляющими нервно-паралитические свойства. Следует отметить, что применение кокаина может вызвать у этих людей серьезные проблемы, поскольку метаболизм этого психоактивного вещества идет слишком медленно [30]. Благодаря успехам в изучении структуры ХЭ и развитию генной инженерии, созданы варианты ХЭ, которые гидролизуют кокаин в 20 раз быстрее, чем нормальный фермент. Такие препараты можно использовать для очистки плазмы при передозировке кокаина [31].

При использовании обратимых ингибиторов ХЭ для защиты от действия БОВ (физостигмин) и для лечения болезни Альцгеймера (такрин) у части лиц, которым вводили препараты, выявлены симптомы, характерные для холинэргического дефицита: депрессия, общая утомляемость, бессонница, потеря веса [9]. Предполагают, что это связано с наличием у них генетических вариантов, в частности атипичной формы фермента.

Осложнения могут возникнуть у больных – носителей генетически измененных вариантов ХЭ – при назначении им стандартной дозировки обратимых ингибиторов данного фермента, используемых для лечения нейродегенеративных заболеваний. За-

частую сродство к ингибиторам у таких вариантов ХЭ снижено [9]. При низкой активности сывороточной ХЭ у пациентов назначение им лекарственных средств, относящихся к ее ингибиторам, невозможно.

Изучению групп населения, несущих генетический К вариант ХЭ, активность которого составляет 70% от нормы, посвящено множество работ. В частности, показано, что у гомозигот по аллелю E_1^k ($E_1^k E_1^k$) в молодом возрасте в 8 раз, по сравнению с контрольной группой, увеличен риск развития нейрофибриллярной патологии [32]. Выявлен также повышенный риск возникновения коронарных артериальных заболеваний в популяциях населения западного Ирана как с гомозиготным генотипом ХЭ ($E_1^k E_1^k$), так и гетерозиготным, несущим только один аллель E_1^k [33]. Показано, что у людей, имеющих ген ХЭ варианта К, в 2 раза увеличен риск заболевания болезнью Альцгеймера в позднем возрасте [22].

Изучение генотипа ХЭ у людей может дать ценную информацию для своевременной постановки правильного диагноза и лечения больных, а также выявить пациентов, чувствительных к введению антихолинэстеразных препаратов.

Предложена схема изучения фенотипа и генотипа ХЭ [9, 19]:

1. Взятие образцов периферической крови;
2. Анализ сыворотки крови на уровень активности ХЭ;
3. Анализ чувствительности к ингибиторам;
4. Скрининг ДНК лейкоцитов на присутствие аллелей гена ХЭ

и установление генотипа пациента.

В Дании в 1972 г. был создан Исследовательский центр ХЭ, в котором к 1990 году прошли обследование более 2000 пациентов из 600 семей с целью обнаружения генетических вариантов фермента.

5. ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Уровень ХЭ в сыворотке крови служит показателем функции печени. У здоровых людей, имеющих нормальный генотип ($E_1^u E_1^u$), активность ХЭ колеблется в широком интервале от 4000 до 12000 Е/л (при использовании для ее определения в качестве субстрата бутирилтиохолина (БТХ)). Величина активности ХЭ является индивидуальной, стабильной характеристикой человека и мало изменяется на протяжении жизни. Ряд заболеваний человека приводит к изменениям активности ХЭ в сыворотке крови [34].

Активность ХЭ снижается при:

- застойных явлениях в печени (вследствие нарушения гемодинамики, нефриты, нефротический синдром);
- механической (обтурационной) желтухе;
- желчнокаменной болезни;
- холецистите;
- холангите;
- циррозе печени;
- воспалительных процессах в печени (агрессивный, острый гепатит – значительно);
- инфаркте миокарда;
- злокачественных новообразованиях;
- ревматизме;
- воспалительных поражениях кожи и мышц (дерматомиозит);
- мышечной дистрофии;
- хронических заболеваниях почек;
- поздних сроках беременности;
- состояниях, связанных со снижением уровня альбумина в плазме (ХЭ синтезируется в клетках печени совместно с альбуминовой фракцией);
- отравлении некоторыми инсектицидами и пестицидами (фосфорорганическими соединениями и карбаматами), применяемыми в сельском хозяйстве; грибами, мышьяком, миорелаксантами;
- использовании ингибиторов ХЭ для лечения глаукомы, болезни Альцгеймера;
- использовании ингибиторов овуляции;
- использовании глюкокортикоидов при противовоспалительной терапии или в качестве иммуносупрессоров.

Активность ХЭ увеличивается при:

- бронхиальной астме;
- тяжелых заболеваниях почек (нефриты, нефротический синдром);
- миоме матки;
- гипертонической болезни;
- воспалительных заболеваниях тонкого кишечника (экссудативный энтерит);
- экссудативной энтеропатии;
- язвенной болезни желудка;
- ожирении;
- гиперлипотеинемии;
- сахарном диабете II типа (у тучных больных);
- алкоголизме.

Во многих случаях низкая активность ХЭ в сыворотке крови обусловлена снижением синтезирующей функции печени при ее инфекционной или онкологической патологиях, которые приводят к разрушению гепатоцитов. Для таких заболеваний характерны также пониженные концентрации альбумина и протромбина, используемых в качестве сывороточных маркёров состояния печени. Поэтому определение ХЭ может заменить лабораторный анализ данных белков.

Фосфорорганические соединения, к которым относятся боевые отравляющие вещества (зарин, зоман), пестициды и инсектициды (карбофос, севин, пропинет), необратимо ингибируют ферментативную активность ХЭ. После прекращения воздействия ингибиторов активность ХЭ восстанавливается в течение 3–6 недель. За это время происходит синтез новых молекул фермента в печени [19].

Следует отметить, что единичный анализ ХЭ имеет ограниченную диагностическую значимость, так как интервал нормальных величин активности фермента у людей весьма широк. Большее значение имеет лабораторный мониторинг ХЭ – данные об изменении активности фермента, полученные при систематическом обследовании пациента в течение определенного периода времени. Так, например, выявленное при профилактических обследованиях снижение активности ХЭ у человека, занятого в производстве или использовании ингибиторов ХЭ, свидетельствует о его хроническом отравлении этими веществами.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ

Сбор и хранение образцов сыворотки и плазмы крови

В ряде случаев, особенно при определении генетических вариантов ХЭ, возникает необходимость длительного хранения и транспортировки образцов сыворотки крови. В связи с этим рядом исследователей изучалось влияние продолжительности и температуры хранения последних на стабильность фермента.

В обзоре R.F. Witter указано, что ХЭ в плазме стабильна в течение нескольких недель при температуре 0–5°C и нескольких месяцев в замороженном состоянии [35]. По данным D.G. Johnston и W.C. Huff, при хранении плазмы в замороженном виде в течение 3–4 месяцев в среднем теряется 31% активности фермента [36].

При систематическом изучении стабильности ХЭ Р.Е. Braid и М. Nix установили, что одной из причин потери активности фермента является медленная коагуляция плазмы, при которой ХЭ аккумулируется в коагуляте [37]. При перемешивании образца плазмы активность фермента восстанавливается. Коагуляцию плазмы предотвращает ее 5-кратное разбавление перед хранением. Другой причиной падения активности ХЭ является бактериальная контаминация образцов плазмы. Авторы показали, что в течение первых 24 часов после отбора образца активность ХЭ возрастает ~ на 10%, но через 48 ч возвращается к исходному значению. Кроме того, установлено, что ХЭ плазмы очень стабильна. После 3 лет хранения при минус 20°C образцы сохраняли более 95% активности, после 7 лет – более 85%, а 8 циклов замораживания/оттаивания в течение 8 дней приводили к потере менее чем 5% исходной активности фермента. При 23°C ХЭ стабильна 80 дней и сохраняет 85% активности в течение 240 дней. Хранение при 37°C приводит к потере 1% активности в день.

После разбавления цельной сыворотки ХЭ постепенно теряет свою активность, поэтому в случае необходимости это нужно делать непосредственно перед проведением анализа.

При определении ХЭ, особенно с использованием в качестве субстрата ацетилхолина или ацетилтиохолина, исследуемые образцы сыворотки (плазмы) не должны быть гемолизированными, чтобы исключить попадание в пробы АХЭ эритроцитов.

При получении плазмы нельзя использовать фторид в качестве антикоагулянта во избежание ингибирования ХЭ.

Транспортирование замороженных образцов сыворотки можно производить в сухом льду.

Е. Schmidt и ее коллеги [47] указывают, что повторное замораживание и оттаивание сыворотки не влияют на активность ХЭ. Рекомендуемые ими сроки хранения сыворотки: 3 дня при 15–20°C, 2 недели при 2–8°C, 6 месяцев при минус 20°C.

Методы определения активности холинэстеразы

К настоящему времени разработано множество различных способов определения активности сывороточной ХЭ, часть из которых нашла практическое применение в клинической лабораторной диагностике.

К наиболее ранним относятся манометрический [38], титриметрический [39], гидроксаматный [40] методы, в которых в качестве субстрата используется ацетилхолин. В настоящее время в клини-

ческой практике они не применяются вследствие тех или иных недостатков: невысокой точности, плохой воспроизводимости, большой трудоемкости, невозможности использования других субстратов, помимо дорогостоящего ацетилхолина.

В дальнейшем развитие получили спектрофотометрические (УФ) методы, которые подразделяются на прямые и непрямые, и колориметрические – неферментные и ферментные. В них широко используются различные синтетические субстраты (табл. 5).

Прямой УФ-метод Kalow, а также его модификации [41, 42] заключаются в непосредственном измерении убыли субстрата (бензоилхолин и его производные), которое основано на различиях в спектрах поглощения субстрата и продуктов его гидролиза. Актив-

Таблица 5

Субстраты ХЭ

Наименование	Формула	Методы определения активности
Ацетилхолин	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \text{---} \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{matrix}$	непрямой УФ-метод, гидроксаматный, титриметрический, манометрический
Ацетилтиохолин	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \text{---} \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{matrix}$	колориметрический неферментный
Бутирилтиохолин	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \text{---} \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{matrix}$	колориметрический неферментный
Пропионилтиохолин	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \text{---} \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{matrix}$	колориметрический неферментный
Бензоилхолин и его производные	$\text{C}_6\text{H}_5-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \text{---} \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{matrix}$	прямой УФ-метод, колориметрический ферментный
Бензоилтиохолин	$\text{C}_6\text{H}_5-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \text{---} \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{matrix}$	колориметрический неферментный

ность ХЭ определяют, регистрируя уменьшение оптической плотности реакционной смеси при длине волны, соответствующей максимуму поглощения субстрата в УФ-области.

В непрямых УФ-методах [43, 44] карбоновая кислота, образующаяся в результате гидролиза субстрата под действием ХЭ, вступает в ряд сопряженных ферментных реакций, последней из которых является окисление коферментов NADH или NADPH в NAD⁺ или NADP⁺, соответственно, что сопровождается уменьшением поглощения в УФ-области при длине волны 340 нм. Скорость снижения оптической плотности при данной длине волны пропорциональна активности ХЭ.

В настоящее время наиболее популярны колориметрические методы, для которых характерны простота постановки анализа, высокая скорость и чувствительность.

Ферментный метод [45] предусматривает использование субстрата – бензоилхолина и ферментной системы ХЭ-ХО-ПО (холинэстераза-холиноксидаза-пероксидаза) с хромогенным комплексом фенол – 4-аминоантипирин. Метод включает в себя три стадии:

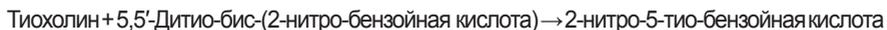


Холинэстераза катализирует гидролиз бензоилхолина до холина и бензойной кислоты. Холин окисляется кислородом воздуха в присутствии холиноксидазы с образованием перекиси водорода, при разрушении которой под влиянием пероксидазы происходит конденсация фенола и 4-аминоантипирина в окрашенное соединение, которое определяется фотометрически при длине волны 500 нм. На результаты определения ХЭ может повлиять наличие в исследуемой пробе гемоглобина; холина, образующегося в организме при метаболизме фосфолипидов; экзогенных восстанавливающих веществ, например аскорбиновой кислоты. К недостаткам метода относятся также высокая стоимость анализа и необходимость использования лиофильно высушенных реагентов, так как в жидком виде они имеют ограниченный срок хранения.

В клинической лабораторной диагностике наибольшее распространение получили неферментные колориметрические способы

анализа ХЭ, которые в качестве субстратов используют тиохолиновые эфиры карбоновых кислот: ацетилтиохолин, бутирилтиохолин, пропионилтиохолин, бензоилтиохолин и другие эфиры, а также их производные. Под действием ХЭ тиохолиновые эфиры гидролизуются до тиохолина и соответствующей карбоновой кислоты. Тиохолин взаимодействует с хромогеном, образуя окрашенное соединение. В качестве хромогена используются реактив Эллмана – 5,5'-дитиобис-(2-нитро-бензойная кислота) (ДТНБ) или гексацианоферрат (III) калия (красная кровяная соль). Наиболее распространенными субстратами являются ацетилтиохолин (АсТХ) и особенно бутирилтиохолин (БуТХ), более специфичный для фермента (средство ХЭ к БуТХ в 2 раза больше, чем к АсТХ) и менее подверженный самораспаду под действием щелочных рН и повышенной температуры.

Немецким обществом клинической химии (DGKC) в 1970 году рекомендовано использовать метод Эллмана для определения активности ХЭ [46]. Холинэстераза гидролизует субстрат бутирилтиохолин до тиохолина и масляной кислоты. Тиохолин взаимодействует с ДТНБ с образованием окрашенной в желтый цвет 2-нитро-5-тио-бензойной кислоты (ТНБ), скорость образования которой пропорциональна активности ХЭ:



Недостатком определения активности ХЭ с использованием реактива Эллмана является излишне высокая чувствительность метода (вследствие высокой поглощающей способности ТНБ: миллимолярный коэффициент экстинкции ТНБ = 13,265), которая требует предварительного разведения сывороток, что неудобно, особенно при проведении анализа в автоматическом режиме.

В 1994 году DGKC рекомендован модифицированный метод с гексацианоферратом (III) калия в качестве хромогена [47]. Холинэстераза катализирует гидролиз бутирилтиохолина до масляной кислоты и тиохолина, который восстанавливает окрашенный гексацианоферрат (III) калия до бесцветного гексацианоферрата (II) калия:



Скорость снижения оптической плотности реакционного раствора при длине волны 405 нм пропорциональна активности ХЭ. Использование гексацианоферрата (III) калия позволяет анализировать сывороточную ХЭ в широком линейном диапазоне без предварительного разведения проб, поскольку миллимолярный коэффициент экстинкции $K_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] = 0,927$, что значительно ниже, чем соответствующий показатель ТНБ. Преимущество метода состоит также в использовании жидких реагентов, которые стабильны в течение длительного срока.

Генетические варианты ХЭ выявляют с помощью дибукаинового показателя, основанного на определении процента ингибирования ферментативной активности в присутствии дибукаина. Дибукаин растворяют в хромогене, определяют активность фермента и сравнивают ее с активностью фермента, полученной без добавления ингибитора в хромоген.

В ЗАО «Вектор-Бест» разработан и с 2008 года серийно выпускается набор жидких реагентов «Холинэстераза-Ново» для определения активности ХЭ в сыворотке и плазме крови кинетическим методом с гексацианоферратом (III) калия в качестве хромогена и йодидом бутирилтиохолина в качестве субстрата (DGKC, 1994 г.).

Все компоненты набора реагентов «Холинэстераза-Ново» жидкие и полностью готовы к применению. Набор рассчитан на 100 определений при расходе 1 мл хромогена на одно определение. Он предназначен для использования на полуавтоматических и автоматических анализаторах. Время проведения анализа – 3–5 мин. Срок годности набора при температуре 2–8°C – не менее года (набор стабилен до двух лет). Линейная область определения активности ХЭ – до 25000 Е/л; коэффициент вариации результатов измерения – не более 5%.

С целью выявления генетических вариантов ХЭ с помощью данного набора запланирован выпуск дибукаина как дополнительного реагента к нему.

Правильность результатов определения активности ХЭ с помощью набора реагентов «Холинэстераза-Ново» подтверждена при исследовании аттестованных контрольных сывороток «Precinorm» и «Precipath», выпускаемых фирмой «Roche» (Германия), «Contronorm» фирмы «Bioson» (Германия), а также сывороток уровня 2 и 3 фирмы «Randox» (Великобритания).

Коэффициенты корреляции результатов параллельного определения активности ХЭ в сыворотке крови человека, полученные на анализаторах «Sapphire-400» и «Riele-5010» с использованием наборов реагентов, выпускаемых ЗАО «Вектор-Бест» и фирмами «Diasys» (Германия) и «Sentinel» (Италия), составили не менее 0,99.

7. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Рекомендации по практическому применению результатов измерений активности фермента приведены в обзоре [19].

В анестезии

Если активность ХЭ у пациента отсутствует или составляет не более 2% от нормы («молчащий» ген), то сукцинилхолин для анестезии использовать не следует. Если активность ХЭ снижена, необходимо провести тест с дибукаином. При наличии у пациента атипичной формы фермента не использовать сукцинилхолин, а заменить его, например, на рокуроний.

Если у пациента в предоперационный период не определяли активность ХЭ, для предупреждения риска развития длительного апноэ, необходимо:

- прежде, чем ввести ему сукцинилхолин, приготовить аппаратуру для длительной вентиляции легких. Известно, что у пациентов с высокой чувствительностью к препарату апноэ нередко наблюдается в течение нескольких часов. Наибольшая продолжительность апноэ составляла 9 ч.
- в случае пролонгированного апноэ у пациента рекомендуется определить фенотип фермента не только у него, но и у его ближайших родственников с целью исключения в дальнейшем применения сукцинилхолина для анестезии лиц, чувствительных к препарату.

При диагностике и лечении различных заболеваний

При ряде тяжелых заболеваний печени (гепатитах, циррозах, опухолях с метастазами в печень), почек, раке, истощении организма диагностическое значение имеет снижение активности сывороточной ХЭ, которое следует рассматривать как результат угнетения синтеза белков в печени. Определение фермента рекомендуется использовать для мониторинга состояния больных с такими заболеваниями.

Монотонное снижение активности ХЭ у больных с заболеваниями печени указывает на прогрессирование печеночной недостаточности, а увеличение активности – на эффективность лечения. На ранних стадиях острых вирусных гепатитов уровень фермента снижается незначительно, однако долговременное понижение активности ХЭ свидетельствует о хронизации заболевания и его пло-

хом прогнозе. У пациентов с печеночной патологией определение ХЭ рекомендуется проводить в сочетании с исследованием аланинаминотрансферазы (АЛТ) и гамма-глутамилтрансферазы (γ -ГТ).

При прогрессировании раковых заболеваний, и особенно с появлением метастазов, активность ХЭ у больных всегда снижается. Исследование ее в динамике позволяет отслеживать изменения в состоянии пациентов и прогнозировать дальнейшее течение болезни.

Изменение активности ХЭ в сыворотке (плазме) крови человека отражает целый ряд патологических состояний и может быть использовано для их диагностики и мониторинга. К таким состояниям относятся:

- Ожирение. С увеличением степени ожирения активность ХЭ возрастает, а в условиях голодания – всегда снижается.
- Ожоговые травмы. Снижение активности сывороточной ХЭ по отношению к ее нормальному значению у пациента, как правило, коррелирует со степенью ожога. Ожоговые травмы, как известно, могут вызывать нарушения функции печени, поэтому результаты исследования фермента в динамике являются прогностическим показателем состояния больного.

При остром инфаркте миокарда активность ХЭ в сыворотке крови в первые сутки заболевания – эффективный прогностический критерий его дальнейшего течения [48]. При нормальном уровне фермента (более 5100 Е/л) у больного наиболее вероятно благоприятное течение постинфарктного периода. Если активность ХЭ менее 5100 Е/л, то риск развития осложнений после перенесенного острого инфаркта миокарда значительно возрастает.

Степень ингибирования ферментативной активности ХЭ (в сыворотке крови и спинномозговой жидкости) при лечении болезни Альцгеймера современными антихолинэстеразными препаратами (см. табл. 3) может использоваться для подбора их дозировки больному, а также в качестве одного из критериев оценки эффективности проводимой терапии [49–55].

В токсикологии

Токсические свойства ряда биологически активных соединений обусловлены тем, что они ингибируют ацетилхолинэстеразу нервных синапсов. Одновременно с АХЭ такие препараты подавляют активность сывороточной ХЭ, что используется в качестве биохимического индикатора их попадания в организм человека.

У лиц, занятых в производстве и хранении отравляющих веществ, а также в работах, связанных с получением и использованием пести-

цидов, инсектицидов, лекарственных препаратов на основе ФОС и карбаматов, для предотвращения хронического отравления этими соединениями необходимо проводить систематический анализ активности ХЭ. Обследование большой группы сельскохозяйственных рабочих в Кении, подвергавшихся воздействию пестицидов (ФОС и карбаматов) в течение длительного периода времени, выявило у них снижение активности фермента [56]. При ингибировании ХЭ и АХЭ более чем на 30% у обследованных лиц наблюдали значительное нарастание таких симптомов отравления, как: поражения респираторных путей, глаз и центральной нервной системы.

Концентрацию токсичных веществ в крови человека можно оценить [57], определив процент ингибирования ими ферментативной активности ХЭ. Пробу сыворотки крови человека, содержащую ингибитор, добавляют в хромоген и в присутствии ингибитора определяют активность ХЭ в стандартном растворе фермента. Полученное значение сравнивают с активностью фермента, измеренной без добавления пробы сыворотки в хромоген и рассчитывают процент ингибирования фермента. Эту величину используют для определения концентрации токсичного вещества в исследуемой сыворотке по калибровочному графику, отражающему зависимость процента ингибирования ХЭ от концентрации ингибитора. Для построения графика используют аттестованный раствор ингибитора.

При единичном отравлении обратимыми ингибиторами, например карбаматами, необходимо установить, присутствуют ли они в крови пострадавшего человека. С этой целью обычно определяют активность ХЭ в нескольких последовательных разведениях сыворотки крови, минимальное и максимальное из которых должны отличаться не менее чем в 10 раз. При большом разбавлении сыворотки и, соответственно, ингибитора, активность фермента восстанавливается. Если активность ХЭ в разбавленной пробе выше, чем в неразбавленной, то это означает, что в сыворотке присутствует обратимый ингибитор фермента.

При отравлении необратимыми ингибиторами (ФОС) установить присутствие ингибитора в крови человека с помощью разбавления сыворотки невозможно. В этом случае пробу сыворотки рекомендуется обработать реактиватором ХЭ и сравнить активность фермента до и после обработки пробы. Если реактиватора в лаборатории нет, восстановить активность ХЭ можно диализом пробы против проточной воды в течение нескольких часов. Учитывая то, что объем пробы при диализе может измениться, для сравнения двух

измерений рассчитывают удельную активность белка в пробе. Возрастание удельной активности ХЭ после обработки пробы является доказательством присутствия в сыворотке ингибитора фермента.

В судебной медицине

В судебной медицине выявление в исследуемой пробе крови человека некоторых фенотипических вариантов белков, особенно атипичного фермента, может быть использовано для идентификации личности. Исследование ХЭ в таких целях имеет преимущества по сравнению с анализом других ферментов, поскольку она отличается высокой стабильностью, а ее активность может быть определена даже в старых образцах крови (при этом время анализа необходимо увеличить с 3–5 до 30–60 мин).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение активности холинэстеразы – простой, удобный и в то же время информативный тест для диагностики и мониторинга ряда заболеваний печени, а также некоторых других органов и систем. Предоперационный анализ активности ХЭ с определением дибукаинового числа позволяет выявить больных с атипичными формами фермента и избежать применения для анестезии миорелаксанта сукцинилхолина, способного вызвать у таких пациентов длительное апноэ. Определение активности ХЭ – чувствительный тест для обнаружения и мониторинга отравлений рядом токсических соединений.

Разработанный и серийно производимый в ЗАО «Вектор-Бест» набор жидких реагентов «Холинэстераза-Ново» для определения ХЭ в сыворотке и плазме крови кинетическим колориметрическим методом соответствует рекомендациям Немецкого общества клинической химии (DGKC) 1994 года. Из всех существующих в настоящее время способов измерения активности фермента данный метод наиболее прост и удобен, имеет хорошие аналитические характеристики: высокую чувствительность, широкую линейную область определения активности, хорошую воспроизводимость. Поэтому наборы реагентов на его основе в настоящее время доминируют в клинико-диагностических лабораториях развитых стран Запада и России. Набор «Холинэстераза-Ново» по своему качеству не уступает ни одному из зарубежных аналогов, представленных на российском рынке.

В настоящее время в ЗАО «Вектор-Бест» ведется освоение производства набора «Дибукаин. Холинэстераза-Ново», в состав которого будет включен лиофильно высушенный реагент для определения дибукаинового числа, что позволит выявлять генетические варианты фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Enzyme Nomenclature. Recommendations (1972) of the Commission on Biochemical Nomenclature of the Nomenclature and Classification of Enzymes. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1973.
2. Silver A. The Biology of Cholinesterases. Amsterdam, 1974. P. 576.
3. Chatonnet A., Lockrige O. // *Biochem. J.* 1989. V. 260. P. 625–634.
4. Бресткин А.П., Кузнецова А.П., Моралев С.Н. и др. Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. Владивосток, 1997.
5. Mesulam M.M., Geula C. // *Ann. Neurology.* 1994. V. 36, № 5. P. 722–727.
6. Giacobini E. // *Neurochem. Res.* 2003. V. 28, № 3–4. P. 515–522.
7. Lane R.M., Potkin S.G., Enz A. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2006. V. 9, № 1. P. 101–124.
8. Girard E., Bernard V., Minic J. et al. // *Life Sci.* 2007. V. 80, № 24–25. P. 2380–2385.
9. United States Patent № 5807671. Publication date 09.15.1998.
10. Lenz D.E., Yeung D., Smith J.R. et al. // *Toxicology.* 2007. V. 233, № 1–3. P. 31–39.
11. Gorelick D.A. // *Drug Alcohol Depend.* 1997. V. 48, № 3. P. 159–165.
12. Zheng F., Zhan C.G. // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2007 (препринт).
13. Iwasaki T., Yoneda M., Nakajima A. et al. // *Intern. Med.* 2007. V. 46, № 19. P. 1633–1639.
14. Mack A., Robitzki A. // *Progr. Neurobiol.* 2000. V. 60, № 6. P. 607–628.
15. Paraoanu L.E., Steinert G., Koehlrir A. et al. // *Life Sci.* 2007. V. 80, № 24–25. P. 2375–2379.
16. Debord J., Laubarie S., Dantoine I. // *Analyt. Biochem.* 2007 (препринт).
17. Краткая химическая энциклопедия. М: Советская энциклопедия, 1961. Т. 1. 282 с.
18. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М: Новая волна, 2002. 201 с.
19. Brown S.S., Kalow W., Pilz W. et al. // *Advances Clinical Chemistry.* 1981. V. 22. P. 1–122.
20. Lockrige O., Bert N. // *Cholinesterases. Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology.* Washington. D.C.: American Chemical Society, 1991. P. 169–171.
21. Lockrige O., Masson P. // *Neurotoxicology.* 2000. V. 21, № 1–2. P. 113–126.
22. United States Patent № 6027899. Publication date 02.22.2000.
23. Bartles C.F., Jensen F.S., Lockrige O. et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 1992. V. 50. P. 1086–1103.
24. Li B., Duysen E.G., Saunders T.L., Lockrige O. // *J. Mol. Neurosci.* 2006. V. 30, № 1–2. P. 193–195.
25. Manoharan I., Wieseler S., Layer P.G. et al. // *Pharmacogenet. Genomics.* 2006. V. 16, № 7. P. 461–468.

26. Manoharan I., Boopathy R., Darvesh S., Lockrige O. // *Clin. Chim. Acta*. 2007. V. 378, № 1–2. P. 128–135.
27. Krasowski M.D., McGehee D.S., Moss J. // *Can. J. Anaesth.* 1997. V. 44, № 5, part. I. P. 525–534.
28. Jensen F.S., Vibi-Mogensen J. *Cholinesterases. Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology*. Washington. D.C.: American Chemical Society, 1991. P. 336–337.
29. Evans R.T., Wroe J. // *Clin. Chem.* 1978. V. 24, № 10. P. 1762–1766.
30. Mattes C.E., Lynch T.J., Singh A. et al. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997. V. 145, № 2. P. 372–380.
31. Sun H., Pang Y.P., Lockrige O. et al. // *Mol. Pharmacol.* 2002. V. 62, № 2. P. 220–224.
32. Ghebremedhin E., Thal D.R., Schultz C. et al. // *Acta Neurophatol.* 2007. V. 114, № 4. P. 359–363.
33. Vaisi-Rayagani A., Rahimi Z., Entezami H. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2007 (препринт).
34. Камышников В.С. *Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике*. Минск, 2000. Т. 2. С. 258–260.
35. Witter R.F. // *Arch. Environ. Health.* 1963. V. 6. P. 537–563.
36. Johnston D.G., Huff W.C. // *Clin. Chem.* 1965. V. 11. P. 729–732.
37. Braid P.E., Nix M. // *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1973. V. 43. P. 360–366.
38. Ammon R. // *Pfügers Arch. Ges Physiol.* 1933. V. 233. P. 487.
39. Michel H.O. // *J. Lab. Clin. Med.* 1949. V. 34. P. 1564.
40. Hestrin S. // *J. Biol. Chem.* 1949. V. 180. P. 249.
41. Kalow W., Genest K. // *Kanad. J. Biochem. Physiol.* 1957. V. 35. P. 341.
42. European Patent № 0155825. Publication date 25.09.1985.
43. European Patent № 0060059. Publication date 25.09.1985.
44. United States Patent № 4596772. Publication date 24.06.1986.
45. Okabe H., Sagesaka K., Nakajima N. et al. // *Clin. Chim. Acta.* 1977. V. 80. P. 87–94.
46. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr. et al. // *Biochemical Pharmacology.* 1961. V. 7. P. 88–95.
47. E. Schmidt et al. // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1992. V. 30. P. 163–170.
48. Российский патент № 2213970. Дата публикации 10.10.2003.
49. Bullock R. // *Int. J. Clin. Pract.* 2002. V. 56, № 3. P. 206–214.
50. Greig N.H., Utsuki T., Yu X. et al. // *Curr Med Res Opin.* 2001. V. 17, № 3. P. 159–165.
51. Giacobini E., Spiegel R., Enz A. et al. // *J. Neural. Transm.* 2002. V. 109. P. 1053–1065.

52. Hakansson L. // *Acta. Neurol. Scand. Suppl.* 1993. V. 149. P. 7–9.
53. Martinez A., Castro A. // *Expert Opin Investig Drugs.* 2006. Jan. V. 15, № 1. P. 1–12.
54. Giacobini E. // *Drugs Aging.* 2001. V. 18, № 12. P. 891–898.
55. Cerbai F., Giovannini M.G., Melani C. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* 2007. V. 572, № 2–3. P. 142–150.
56. Ohayo-Mitoko Grase J.A., Kromhout H., Simwa J.M. et al. // *Occup. Environ. Med.* 2000. V. 57. P. 195–200.
57. Инструкция к набору реагентов ХОЛИНЭСТЕРАЗА, кат. № 10003183, фирма «PLIVA-Lachema Diagnostika», Чехия.

Информационно-методическое пособие

Старостина Вера Константиновна
Дёгтева Светлана Альбертовна

**ХОЛИНЭСТЕРАЗА: МЕТОДЫ АНАЛИЗА
И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

Редактор *В.И. Офицеров*

Подписано в печать 23.12.08. Гарнитура «Century Schoolbook».
Формат 60×84 1/16. Усл. печ. л. 2,25. Тираж 1000 экз.

Отпечатано в типографии ЗАО «Вектор-Бест».
630559, Новосибирская обл., пгт. Кольцово, а/я 121
Тел.: (383) 227-67-68, тел./факс: (383) 336-60-30