

В.К. Старостина, к.х.н., С.А. Дегтева, ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск

ХОЛИНЭСТЕРАЗА: диагностическое значение и методы анализа

Активность сывороточной холинэстеразы (ХЭ) — показатель функции печени, снижающийся при её циррозе, а также гепатите, холецистите и многих других заболеваниях.

Проведение мониторинга ХЭ обязательно для людей, занятых в производстве и использовании отравляющих веществ, инсектицидов, пестицидов и лекарственных препаратов, которые являются ингибиторами ХЭ. Снижение активности ХЭ, наблюдаемое у этих лиц в течение определенного времени, свидетельствует об отравлении данными соединениями.

Определение ХЭ необходимо 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. Холинэстераза — тривиальное название фермента (синонимы: псевдохолинэстераза, бутирилхолинэстераза (БуХЭ), холинэстераза II, пропионилхолинэстераза (ПХЭ). Систематическое название — ацилхолин-ацилгидролаза (КФ 3.1.1.8.).

Холинэстераза обнаруживается в сыворотке и плазме крови, белом веществе головного мозга, клетках спинного мозга, сердце, полосатых мышцах, поджелудочной железе, кишечнике, плаценте и других органах [24, 5]. В мозге ХЭ локализована в капиллярных эндотелиальных и глиальных клетках, которые ее синтезируют [5]. Холинэстераза обнаружена в амилоидных бляшках здоровых пациентов преклонного возраста и у пациентов с болезнью Альцгеймера [21, 9], а также в нейронах [14]. В мышцах ХЭ локализована в двигательных пластинках.

Биологическая роль холинэстеразы

Многие функции ХЭ в организме выяснены в течение последних 20 лет благодаря интенсивно проводимым исследованиям. Холинэстераза вместе с ацетилхолинэстеразой (АХЭ) участвует в передаче нервных импульсов. Показано [9], что при прогрессирующей болезни Альцгеймера, когда уровень АХЭ в организме человека снижается, ее роль может играть ХЭ. Предполагают, что ХЭ гидролизует избыток ацетилхолина в нервно-мышечных соединениях [10].

Сывороточная ХЭ выполняет в организме защитные функции. В частности, она предохраняет от инактивации АХЭ, поскольку с большой скоростью гидролизует ингибитор АХЭ бутирилхолин, возникающий в процессе метаболизма жирных кислот. Кроме того, ХЭ способна осуществлять гидролиз многих отравляющих фосфорорганических веществ и карбаматов, поступивших в организм извне. 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 [3, 15]. Холинэстераза — главный фермент метаболизма кокаина, при котором образуются нетоксичные продукты его распада, поэтому считают, что препараты на основе ХЭ могут быть использованы при передозировке этого психоактивного вещества [11, 26].

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 [5, 13, 18, 22]. Холинэстераза также играет роль в регуляции пролиферации клеток при эмбриогенезе [5]. Предполагают, что она осуществляет контроль проницаемости мембран клеток и стенок сосудов [5]. 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.

Генетические варианты ХЭ

Состав и последовательность аминокислот в белке определяется структурой кодирующего его гена. Вследствие мутаций (изменений) в структуре гена возникают отличные от исходного варианты гена (аллели). Изменения в структуре гена вызывают изменения в составе белка, и, таким образом, возникают генетические варианты молекул белка. К настоящему времени известно более 20 таких вариантов ХЭ.

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 (аллели в хромосомах разные). Генетический анализ различных групп населения на разных континентах показал, что, помимо гомозигот (табл. 1), существуют все возможные варианты гетерозигот по аллелям ХЭ [16]. В сыворотке гетерозигот обнаруживаются оба фермента, контролируемые разными аллелями.

Таблица 1. Характеристика наиболее распространенных генетических вариантов ХЭ

Общепринятое наименование варианта ХЭ	Генотип	Фенотип*	Замена аминокислот	Генотип гомозигот
Обычный (usual)	E_1^u	нормальный	нет	$E_1^u E_1^u$
Нетипичный атипичный (atypical)	E_1^a	устойчив к ингибированию дибукаином**	70 аспарагиновая кислота→глицин	$E_1^a E_1^a$
Неактивный «молчащий» (silent)	E_1^s	молчащий, активность отсутствует	1) 117 глицин→сдвиг рамки 2) отсутствие гена и др.	$E_1^s E_1^s$
Н вариант	E_1^h	активность снижена на 90%	142 валин→метионин	$E_1^h E_1^h$
Фторид-1	E_1^f	устойчив к ингибированию фторидом	243 треонин→метионин	$E_1^f E_1^f$
Фторид-2	E_1^f	устойчив к ингибированию фторидом	390 глицин→валин	$E_1^f E_1^f$
Ј-вариант	E_1^j	активность снижена на 66%	497 глутаминовая кислота→валин	$E_1^j E_1^j$
К вариант	E_1^k	активность снижена на 33%	539 аланин→треонин	$E_1^k E_1^k$

*фенотип — внешнее проявление генотипа, совокупность признаков объекта;

**дибукаин — локальное, длительного действия анестезирующее средство.

Из табл. 1 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. Так, дибукаин ингибирует нормальную ХЭ на 75%, промежуточные гетерозиготные формы — на 45–72%, а атипичные гомозиготные формы — только на 30%. Выявлены варианты ХЭ, устойчивые к фториду и другим ингибиторам. Приведенные выше различия в свойствах генетических вариантов ХЭ используют для обнаружения их у обследуемых лиц, наряду с другими, более сложными методами.

Работы по изучению распространенности аллелей гена ХЭ проводятся во многих странах. Установлено, что 76% людей имеют нормальный генотип ($E_1^u E_1^u$), а остальные 24% несут, по крайней мере, один генетически измененный аллель [17].

Клиническая значимость генетических вариантов ХЭ

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 [19]. 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 большая часть введенного сукцинилхолина быстро

гидролизруется, 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 [13]. Возникновение такого апноэ чаще всего наблюдается у людей, в генотипе которых отсутствует нормальный ген ХЭ (E_1^u) [7]. При проведении хирургических операций чувствительными к сукцинилхолину оказываются от 4 до 7% больных. Определение активности ХЭ у пациента в предоперационный период позволяет избежать нештатной 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 люди с низкоактивными генетическими вариантами сывороточной ХЭ обладают повышенной чувствительностью к отравлению фосфорорганическими соединениями, карбаматами и другими веществами, проявляющими нервно-паралитические свойства. Кроме того, применение кокаина может вызвать у них серьезные проблемы, поскольку он метаболизируется слишком медленно [20].

Изучению групп населения, несущих генетический «К-вариант» ХЭ, активность которого снижена на 33% 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 [8]. 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 одну аллель E_1^k [25]. Изучение генотипа людей в отношении ХЭ может дать ценную информацию для своевременной постановки правильного диагноза и лечения больных. В развитых европейских странах уделяют большое внимание исследованию ХЭ. Так, еще в 1972 году в Дании был создан Исследовательский центр холинэстеразы.

Изменение активности сывороточной ХЭ 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 4 000 до 12 000 Е/л (при использовании для ее определения в качестве субстрата бутирилтиохолина (БуТХ)). Величина активности ХЭ является индивидуальной, стабильной характеристикой человека и мало изменяется на протяжении жизни. Ряд заболеваний человека приводит к изменениям активности ХЭ в его крови [1].

Активность ХЭ снижается при застойных явлениях в печени (вследствие нарушения гемодинамиком), 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.

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 маркеров 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 ХЭ в печени [4]. Следует отметить, что единичный анализ ХЭ имеет ограниченную диагностическую значимость, так как интервал нормальных величин активности фермента весьма широк. Большее значение имеет лабораторный мониторинг ХЭ – данные об изменении ее активности, полученные при систематическом измерении активности фермента 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.

Определение активности ХЭ в сыворотке и плазме крови

Из многих разработанных к настоящему времени способов определения активности сывороточной ХЭ наиболее популярны колориметрические методы, для которых характерны простота постановки анализа, высокая скорость и чувствительность. Эти методы подразделяют на неферментные и ферментные. В клинической лабораторной диагностике наибольшее распространение получили неферментные методы анализа ХЭ, основанные на применении таких хромогенов, как 5,5'-дитио-бис-(2-нитро-бензойная кислота) (реактив Элмана) [6] или гексацианоферрат (III) калия (красная кровяная соль) [23]. В качестве субстрата для ХЭ при этом используют ацетилтиохолин (АсТХ), но преимущественно – бутирилтиохолин (БуТХ), так как он более специфичен для фермента (средство ХЭ к БуТХ в 2 раза больше, чем к АсТХ) и менее подвержен самораспаду под действием щелочных рН и повышенной температуры.

Для ХЭ характерна высокая стабильность в неразбавленной сыворотке крови. Рекомендуемые сроки хранения сыворотки: 1 неделя при 15–20°C, 2 недели при 2–8°C, 6 месяцев при минус 20°C. После разбавления цельной сыворотки ХЭ постепенно теряет свою активность, поэтому в случае необходимости разведение необходимо проводить непосредственно перед анализом. Недостатком определения активности ХЭ с использованием реактива Элмана является излишне высокая чувствительность метода, которая требует предварительного разведения сывороток, что неудобно, особенно при проведении анализа в автоматическом режиме.

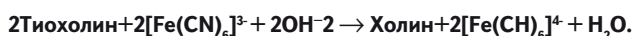
Генетические варианты ХЭ идентифицируют с помощью «дибукаинового показателя», основанного на определении процента ингибирования ферментативной активности в присутствии дибукаина. Последний растворяют в хромогене, определяют активность фермента и сравнивают ее с активностью фермента, полученной без добавления 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. Этот метод рекомендован Немецким обществом клинической химии (DGKC) в 1994 году.

При проведении анализа ХЭ катализирует гидролиз бутирилтиохолина до масляной кислоты тиохолина, который восстанавливает окрашенный гексацианоферрат (III) калия до бесцветного гексацианоферрата (II) калия.

Схема анализа:



Скорость снижения оптической плотности реакционного раствора при длине волны 405 нм пропорциональна активности ХЭ в анализируемой пробе.

Все компоненты набора реагентов «Холинэстераза-Ново» представлены в жидком виде и полностью готовы к использованию. 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. Набор стабилен не менее полутора лет при температуре 2–8°C. Линейная область определения активности ХЭ – до 25 000 Е/л; коэффициент вариации результатов измерения – не более 5%. С целью выявления генетических вариантов ХЭ с помощью данного набора ЗАО «Вектор-Бест» выпускает дополнительный дибукаиновый реагент «Дибукаин. Холинэстераза-Ново». Реагент лиофильно высушен и рассчитан на 100 определений при расходе 1 мл хромогена на одно определение [2].

Литература

1. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск, 2000. Т. 2. С. 258–260.
2. Старостина В.К., Дегтева С.А. Холинэстераза: методы анализа и диагностическое значение / Информационно-методическое пособие. Новосибирск, 2008.
3. Bajgar J., Bartosova L., Kuca K. et al. Changes of cholinesterase activities in the rat blood and brain after sarin intoxication pretreated with butyrylcholinesterase. // *Drug Chem. Toxicol.* 2007. V. 30, № 4. P. 351–359.
4. Brown S.S., Kalow W., Pilz W. et al. The plasma cholinesterases: a new perspective. // *Advances Clinical Chemistry.* 1981. V. 22, P 1–122.
5. Chatonnet A., Lockrige O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. // *Biochem. J.* 1989. V. 260. P. 625–634.
6. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. // *Biochemical Pharmacology.* 1961. V. 7. P. 88–95.
7. Evans R.T., Wroe J. Is Serum Cholinesterase Activity a Predictor of Succinyl Choline Sensitivity? An Assessment of Four Methods. // *Clin. Chem.* 1978. V. 24, № 10. P. 1762–1766.
8. Ghebremedhin E., Thal D.R., Schultz C. et al. Homozygosity for the K variant of BCHE gene increases the risk for development of neurofibrillary pathology but not amyloid deposits at young ages. // *Acta Neuropathol.* 2007. V. 114, № 4. P. 359–363.
9. Giacobini E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. // *Neurochem. Res.* 2003. V. 28, № 3–4. P. 515–522.
10. Girard E., Bernard V., Minic J. et al. Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice. // *Life Sci.* 2007. V. 80, № 24–25. P. 2380–2385.
11. Gorelick D.A. Enhancing cocaine metabolism with butyrylcholinesterase as a treatment strategy. // *Drug Alcohol Depend.* 1997. V. 48, № 3. P. 159–165.
12. Iwasaki T., Yoneda M., Nakajima A. et al. Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. // *Intern. Med.* 2007. V. 46, № 19. P. 1633–1639.
13. Jensen F.S., Vibi-Mogensen J. // *Cholinesterases. Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology.* Washington. D.C.: American Chemical Society. 1991. P. 336–337.
14. Lane R.M., Potkin S.G., Enz A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2006. V. 9, № 1. P. 101–124.
15. Lenz D.E., Yeung D., Smith J.R. et al. Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: A mini review. // *Toxicology.* 2007. V. 233, № 1–3. P. 31–39.
16. Lockrige O., Bert N. // *Cholinesterases. Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology.* Washington. D.C.: American Chemical Society. 1991. P. 169–171.
17. Lockrige O., Masson P. Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. // *Neurotoxicology.* 2000. V. 21, № 1–2. P. 113–126.
18. Mack A., Robitzki A. The key role butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase – DNA study. // *Progr. Neurobiol.* 2000. V. 60, № 6. P. 607–628.
19. Manoharan I., Boopathy R., Darvesh S., Lockrige O. A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. // *Clin. Chim. Acta.* 2007. V. 378, № 1–2. P. 128–135.
20. Mattes C.E., Lynch T.J., Singh A. et al. Therapeutic use of butyrylcholinesterase for cocaine intoxication. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997. V. 145, № 2. P. 372–380.
21. Mesulam M.M., Geula C. Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. // *Ann. Neurology.* 1994. V. 36, № 5. P. 722–727.
22. Paraoanu L.E., Steinert G., Koehler A. et al. Expression and possible functions of the cholinergic system in a murine embryonic stem cell line. // *Life Sci.* 2007. V. 80, № 24–25. P. 2375–2379.
23. Schmidt E., Gerhardt W., Henkel E. et al. Proposal of Standard Methods for the Determination of Enzyme Catalytic Concentrations in Serum and Plasma at 37°C II. Cholinesterase (acetylcholine acylhydrolase, EC 3.1.1.8). // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1992. V. 30. P. 163–170.
24. Silver A. *The Biology of Cholinesterases*, Amsterdam. 1974. P. 576.
25. Vaisi-Rayagani A., Rahimi Z., Entezami H. Butyrylcholinesterase K variants increase the risk of coronary artery disease in the population of western Iran. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2007 (npenpnm).
26. Zheng F., Zhan C.G. Rational design of an enzyme mutant for anti-cocaine therapeutics. // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2007 (npenpnm).