

PLAZMA PSÖDOKOLİNESTERAZ ETKİNLİĞİ  
ÜZERİNDE METODOLOJİK ÇALIŞMALAR

YENİSEY, Ç., TÖRE, İ.R.

**ÖZET:** Bu çalışmada, 18-69 yaşlarında 72 kadın ile 15-75 yaşlarında 36 erkekten oluşan toplam 108 kişilik bir gurubun üyelerinde plazma kolinesteraz etkinlikleri elektrometri, spektrofotometri ve otoanalizör yöntemleri ile ölçülmüştür. Etkinlik sınırları, elektrometrik yöntemde 0.331-1.087  $\Delta$ pH/s, spektrofotometrik yöntemde 0.17-1.27 kU/L, otoanalizörde 4288-13004 U/L olarak belirlenmiştir. Bu değerler, genelde referans değerleri ile uyum göstermiştir. Ayrıca, aynı gruptan 56 kişide, dibukain ve florid sayıları belirlenerek fenotiplerine göre deneklerin sınıflandırılmasına çalışılmıştır. Bireysel değerlerin istatistik analizinde, kadın ve erkeklerde belirlenen ortalama aktiviteeler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiş ve bu husus kadın deneklerin önemli bir bölümünün post menopozal dönemde bulunmaları ile açıklanmıştır. Gerçekten, kadınlarda plazma aktiviteeleri menopoz öncesi ve sonrasında bulduklarına göre gruplanarak karşılaştırıldığı takdirde, manuel ve otomatik spektrofotometrik yöntemlerde  $p < 0.01$  düzeyinde anlamlı bir fark gözlenmektedir. Her üç yöntemle elde edilen verilerin karşılaştırılması ile, elektrometrik yöntemin minor farklılıkları duyarlı olarak belirlemeye uygun olmasına karşın, spektrofotometrik yöntemlerin daha duyarlı ve güvenilir sonuçlar verdikleri görüşüne ulaşılmıştır.

**ABSTRACT:** Çiğdem YENİSEY, İ.Ruhi TÖRE, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir. Methodological Study of Plasma Cholinesterase activity.

In this work, plasma pseudocholinesterase levels were measured in a group consisting of 72 women (18-69 years old) and 36 men (15-75 years old) by using electrometric and spectrophotometric (manual and autoanalytic) technics. Plasma pseudocholinesterase activity values ranged between 0.331-1.087  $\Delta$ pH/s for the electrometric, between 0.17-1.27 kU/L for the spectrophotometric technics and between 4288-13004 U/L by autoanalyzer. These values generally conformed with the reference ranges. Also, dibucaine and fluorid numbers were determined for 56 of the individuals, and, by using these values, the subjects were grouped according to their phenotypes. No significant sex differences were found between the group averages. This finding can be explained by considering that a large majority of the female subjects

were post menapausal. Some significant differences ( $p < 0.001$ ) were in fact found between the pre and post-menapausal females by using the spectrophotometric technics.

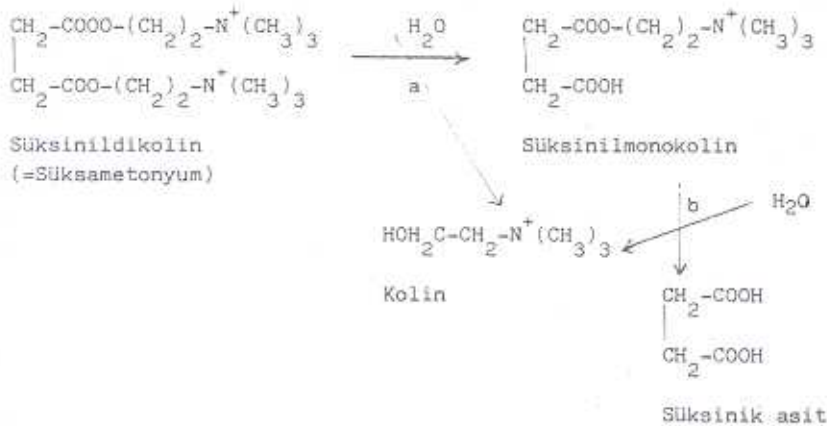
By comparing the results obtained through these 3 technics, it has been concluded that the electrometric method is not suitable for detecting minor differences, while the spectrophotometric (manual or automatic) methods can be used in a more sensitive and dependable way.

**Anahtar sözcükler:** Psödokolinesteraz, genetik varyantlar, dibukain inhibisyonu, florid inhibisyonu.

**Key words:** Pseudochoolinesterase, genetic variants, dibucaine inhibition, fluoride inhibition.

**GİRİŞ:** Anestezide en çok yararlanılan kas gevşeticilerinden biri süksinildikolin (süksametonyum)'dir. Ancak, anestezi sonrasında, çeşitli nedenlere bağlı olarak zaman zaman görülebilen solunumun yetersiz restorasyonu ya da hiç restore olmamasının, süksametonyuma bağlı olarak sıklıkla ortaya çıkması bu olayın mekanizmasının ve sözü geçen kas gevşeticisinin metabolik özelliklerinin araştırılması gereğini doğurmuştur.

Süksinildikolin organizmada plazma psödokolinesterazı (EC 3.1.1.7) aracılığı ile iki basamaklı bir hidrolize uğratılarak metabolize edilir.



Süksametonyum'a duyarlık iki biçimde ortaya çıkabilmektedir:

1. Süksinildikolin hidrolizinin psödokolinesteraz'ın genetik defekti nedeniyle aksaması (Doğuştan Duyarlık),

2.Karaciğer hastalığı ya da malnütrasyon gibi koşullarda yetersiz enzim sentezi (Kazanılmış Duyarlık).

Kimi olgular, ilacın standart dozda verilmesini izleyerek daha uzun süreli bir apne gösterirler. Böylelerinin, ilacı hızla metabolize edenlere göre, daha düşük psödokolinesteraz aktivitesine sahip oldukları bu özelliğin, çoğu kez, kalıtsal olarak aktarıldığı saptanmıştır. Hidroliz oranındaki küçük bir düşme bile, süksametonyum'un nöromusküler "end plate"e ulaşan miktarında ve sonuç olarak blokun süre ve ağırlığında önemli artışlara neden olabilmektedir (3,4,11,12).

Doğuştan duyarlı kişilerin normal kişilerde bulunmayan bir gen ( $E_1^a$ ) için homozigot oldukları ( $E_1^a E_1^a$ ) ve doğuştan duyarlılığın resessif biçimde kalıtıldığı anlaşılmaktadır. Genetik yapı nedeniyle oluşan atipik ve floride dirençli varyantların, süksinildikolin duyarlılığı ile ilgili olduğu, bunlardan elde edilen örneklerin ölçümde kullanılan substratları in vitro hidrolize edebilmesine karşın, olguların, in vivo koşullarda süksinildikolin hidrolizini sağlayamadıkları ileri sürülmüştür (15). Heterozigotların ( $E_1^u E_1^a$ ) duyarlılığı ise tartışmalıdır. Genelde duyarlık göstermedikleri bildirilen heterozigotlarda gevseme süresinin, yaklaşık 2-4 dakika olan normal değere göre, oldukça uzun olmakla birlikte 10 dakikayı geçmediği gözlenmiştir. Ancak, hamilelik ya da erken puerperium gibi, plazma psödokolinesteraz aktivitesinde kayda değer bir düşme gözlenen durumlarda, daha uzun süreli bir apne ortaya çıkabilmektedir (6,17). Öte yandan, heterozigotlarda, ilacın yinelenen enjeksiyonları ile, normal bireylere göre daha kolay apne geliştiği de bildirilmektedir (9,14).

Duyarlılığın önceden kesin biçimde tahmin edilememesine ve her zaman kalıtsal anormalliklerin sonucu olmamasına karşın, yine de, psödokolinesteraz aktivitesi ile dibukain ve florid sayılarının düşük bulunduğu olgularda, süksametonyum'a karşı apnoik yanıtın normalden uzun sürebileceği dikkate alınmalıdır (7,13).

**GEREÇ VE YÖNTEM:** Araştırma gurubumuz, 18-69 yaşlarında 72 kadın ile 15-75 yaşlarında 36 erkekten oluşmakta idi. Denekler, Dokuz Eylül Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastahanesi'nin çeşitli kliniklerinde yatan ameliyat öncesi olgulardan seçilmişti. Örnek alımından önce, deneklerin yaşları, karaciğer hastası olup olmadıkları, hipertansiyonları bulunup bulunmadığı, kadınların doğum kontrol hapi kullanıp kullanmadıkları not edildi.

Örnekler, 12 saatlik açlıktan sonra ve hemen ameliyat öncesinde, sabah 6.00-7.00 saatleri arasında, kol venasından heparinize enjektörle alındı. Plazma örnekleri pastör pipetleri ile temiz deney tüplerine



aktarıldı, tüplerin ağzı parafilm ile kapatıldı ve -12°C'de dondurularak "deepfreeze"de saklandı. Örneklerde psödokolinesteraz etkinliği üç ayrı teknikle belirlendi.

**ELEKTROMETRİK TEKNİK'te** , Psödokolinesteraz katalizi ile asetilkolin hidrolize edilerek serbest kalan asetik asidin, tamponun pH değerinde neden olduğu değişim ölçüldü (8).

**MANUEL SPEKTROFOTOMETRİK TEKNİK'te**, aktivite, benzoilkolin'in enzimatik katalizle benzoik asit ve kolin'e hidrolizini izleyerek, ortama katılan kolin oksidaz ile kolin'in betain'e oksitlenmesi sırasında oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin pembe-kırmızı renkte bir kromofor oluşturulması ve rengin spektrofotometrede 500 nm dalga boyunda okunması ile belirlendi (1).

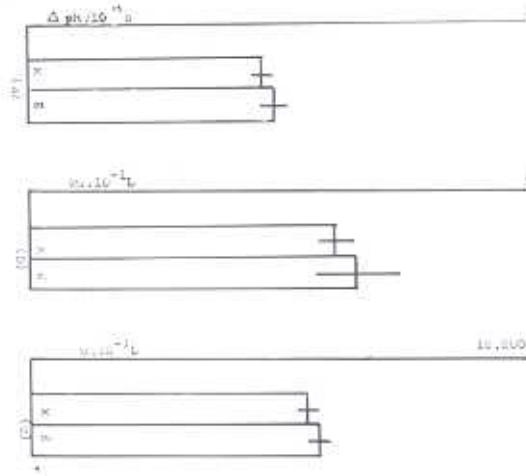
**OTOANALİZÖR'de** kullanılan metodolojik prensip ise, psödokolinesteraz aracılığı ile, bütiriltiyokolin'in, bütirik asit ve tiyokolin'e degradasyonu, tiyokolin'in DTNB (5,5-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit) ile tepkileşerek 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit ayrılması ile oluşan renk değişiminin otoanalizörde 405 nm'de değerlendirilmesidir (2).

Ayrıca, yine manuel spektrofotometrik teknikten yararlanılarak, ortama katılan DİBUKAIN veya FLUORID'in, aktivitede neden olduğu inhibisyon yüzdesini belirlemek suretiyle dibukain ve fluorid sayıları da saptandı (1).

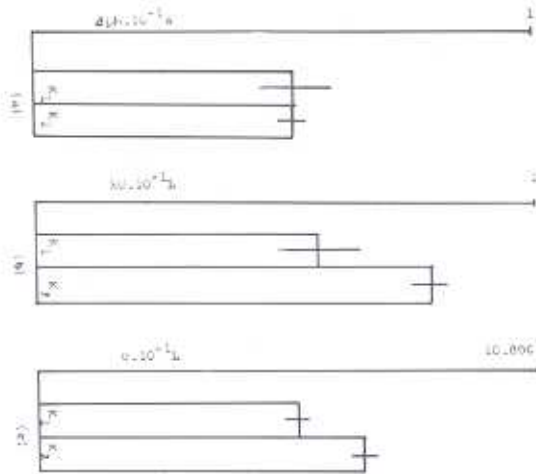
**BULGULAR:** Bu çalışmada elde edilen bulgular, aşağıda Tablo 1. Şekil 1 ve 2 'de özetlenmiştir:

Tablo 1. Plazmada psödokolinesteraz aktivitesi.

	Elektrometrik teknik ile $\Delta$ pH/s	Spektrofotometrik teknik ile, kU/L	Otoanalizör ile, U/L
N	108	108	108
X	0.7089	0.9478	8646
S	0.1892	0.3884	2179
S <sub>x</sub>	0.0182	0.0374	210
Min.	0.3341	0.20	663
Max.	1.26	2.02	17774



Şekil 1. Plazma psödokolinesteraz aktivitesinin cinsiyet guruplarında değişimi (a=elektrometrik, b=spektrofotometrik, c=otoanalizör, k=kadın, e=erkek).



Şekil 2. Kadınlarda plazma psödokolinesteraz aktivitesinin pre- ve post-menapozal altguruplarda değişimi (a, b ve c=Şekil 2.deki gibi, k<sub>1</sub> premenapoz, k<sub>2</sub>-postmenapoz altgurupları).

**TARTIŞMA:** Araştırma grubumuzu oluşturan bireyler, plazmada psödokolines-teraz aktivitesini modifiye edebilecek bir hastalığı bulunmayanlar arasından seçildiklerinden normal ya da sağlıklı popülasyonu temsil ettikleri varsayılabilir. Kaynaklarda belirtilen referans aralıkları: her üç teknik için, sırasıyla, 0.409-0.997 ΔpH/s, 015-1.8 kU/L ve 4700-14100 U/L, bu çalışmada her üç teknik ile, sırasıyla, 0.333-1.087 pH/s, 0.17-1.27 kU/L ve 4288-13004 U/L'lik değerler elde edildiğine göre, bu çalışmanın verilerinin genelde referans değerleriyle uyumlu bulunduğu ifade edilebilir.

Kadınlarda, her üç yöntem ile plazma psödokolines-teraz aktivite-leri sırasıyla ortalama 0.7097 ΔpH/s, 0.9226 kU/L ve 8696 U/L olarak gözlenirken aynı değerler erkeklerde 0.7098 pH/s, 0.9478 kU/L ve 8646 U/L olarak bulunmuştur. Cinsiyet gruplarında gözlenen farklılıkların istatistik açıdan anlamlı olmadığı Student's t-testi ile kanıtlanmıştır. Bu sonucun, kadın deneklerin önemli bir bölümünü (%44) postmenapozal bireylerin oluşturmasından ileri gelebileceği düşünüldüğünden, kadın denekler menapoz öncesi ve sonrasında bulduklarına göre sınıflandırılıp ortalama aktivitelerin karşılaştırılması yoluna gidilmiştir. Menapoz öncesi ve sonrası altgrupları için elektrometrik teknikle 0.7682 ve 0.7674 ΔpH/s olarak saptanan ortalama plazma psödokolines-teraz aktiviteleri anlamlı bir farklılık göstermemişler, buna karşı, manuel spektrofotometrik teknikle ortalama plazma psödokolines-teraz aktiviteleri 0.8635 ve 1.2258 kU/L, otoanalizörle aynı değerler 7619 ve 9720 U/L olarak belirlendiği gibi aralarında istatistik açıdan ileri düzeyde ( $p < 0.001$ ) bir farklılık bulunduğu da gözlenmiştir.

Türk toplumunda daha önce yapılan bir çalışmada, gen sıklıkları olarak  $E_2^u$  geni için 0.9682  $E_1^a$  geni için 0.0331 ve  $E_1^i$  geni için 0.0041 değerleri elde edilmiştir (15). Bu çalışmada ise, sadece 56 bireyde yapılabilen fenotipleme çalışması sonucunda, popülasyonumuz için gen sıklıkları, Hardy-Weinberg denklemi ile,  $E_1^u$  geni için 0.5451,  $E_1^i$  geni için 0.1408 ve  $E_1^a$  geni için 0.3141 olarak hesaplandı. Literatür verileriyle karşılaştırıldığında oldukça farklı oldukları görülen bu değerlerin varyant sayısının farklılığı yanında popülasyonun yöreselliğinden de kaynaklanmış olduğu düşünülebilir. Daha yeterli bir varyant sayısı ile daha geniş ve daha temsil edici bir popülasyonda yapılacak çalışmaların bu konuda daha gerçeğe uygun sonuçlar verebileceği kanısındayız.

Plazma örneklerinin kan hücrelerinden ayrıldıktan sonra, oda derecesinde daha düşük ısılarda saklandığında aktivitenin uzun süre stabilitesini koruduğu, -20°C'de saklandığında ise bir yılı aşan sürelerde katalitik aktivitesinde bir değişim gözlenmediği belirtilmiştir (5,10,15,16). Bu çalışmada, dondurulduktan sonra -12°C'de saklanmış

plazma örneklerinde üç ay sonra yinelenen analizlerde örneklerin pek küçük bir bölümde önemsiz bir düşme gözlemlenmesine karşın dibukain ve florid sayıları hemen hemen aynı kalmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Abernathy, N.H. George, P.M. Herron, J.L. and Evans, R.T.: Plasma cholinesterase phenotyping with use of visible-region spectrophotometry. *Clin. Chem.* 1986; 32(1); 194-197.
2. Anon.: Cholinesterase. Sclavo S.P.A. Div. Diagnostici, Siena, 1985.
3. Clithero, J.W. Mitchard, M. and Harper, N.J.: The possible biological function of cholinesterase. *Nature*, London 1963; 199, 1000-1001.
4. Evans, R.T.: Choice of the most appropriate methods for the investigation of serum cholinesterase status. *J. Med. Diagn.* 1986; 27: 245-248.
5. Huizenga, J.R. Belt van der, K. and Gibs, C.H.: The effect of storage at different temperatures on cholinesterase activity in human serum. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1985; 23: 283-285.
6. Jans, H.S. Brons, D. and Warrings, M.G.P.J.: Chemical nature of the DFP-binding site of pseudocholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta* 1959; 34: 563-575.
7. King, J. and Griffin, D.: Relationship between suxamethonium apnoea serum cholinesterase activity and inhibitor numbers. *Br. J. Anaesth.* 1974; 46: 908-911.
8. Michaelis, H.O.: An electrometric method for determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J. Lab. Clin. Med.* 1949; 34: 1564-1568.
9. Schuh, F.T.: Serum cholinesterase: Effect on the action of suxamethonium following administration to a patient with cholinesterase deficiency. *Br. J. Anaesth.* 1977; 49: 269-272.
10. Turner, J.M. Hall, R.A. and Whittaker, M.: Effects of storage and repeated thawing on plasma cholinesterase activity. *Ann. Clin. Biochem.* 1984; 21: 363-365.
11. Viby-Mogensen, J.: Correlation of succinylcholine duration of action with plasma cholinesterase activity in subjects with genotypically normal enzyme. *Anesthesiology* 1980; 53: 517-520.

12. Viby-Mogensen, J.: Succinylcholine muscular blockade in subjects heterozygous for abnormal plasma cholinesterase. *Anaesthesiology* 1981; 55: 231-235.
13. Wakid, N.W., Tubbeh, R. and Baraka, A.: Assay of serum cholinesterase with succinylcholine and propionylthiocholine as substrates. *Anaesthesiology* 1985; 62: 509-512.
14. Whittaker, M.: Plasma cholinesterase variants and anaesthetist. *Anaesthesia* 1980; 35: 174-179.
15. Whittaker, M.: Cholinesterase. *Monographs in Human Genetics*. Vo.11, Karger, Basel-München-Paris-London-New York-New Delhi-Singapore-Tokyo-Sydney. 1986; IX 132.
16. Witter, R.F.: Measurement of blood cholinesterase. *Archs. Envir. Health* 1963; 6: 537-563.