
Z Pracowni Fizjopatologii Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie
Kierownik: prof. dr Jarosław Billewicz-Stankiewicz

Jarosław BILLEWICZ-STANKIEWICZ
i Włodzimierz TYBURCZYK

**Badania doświadczalne nad wpływem pracy fizycznej na zmiany
aktywności esteraz cholinowych krwi**

**Экспериментальные исследования по влиянию труда на изменения
в активности холинэстераз в крови.**

**Experimental Investigations on the Influence of Physical Effort on the
Changes in Activity of Cholinesterase in Blood**

Enzymatyczny rozkład acetylocholinę ma zasadnicze znaczenie w przewodzeniu impulsów między neuronami a także z zakończeń nerwowych do efektorów, jak mięśnie prążkowane i gładkie oraz gruczoły. Stąd zainteresowanie, które okazali badacze zagadnieniem zmian esteraz cholinowych we krwi w przebiegu pracy fizycznej. Według jednych (Hall i Lucas (6), Stoner i Wilson (7)) wysiłek fizyczny nie powoduje zmian aktywności esteraz cholinowych w surowicy krwi człowieka, natomiast inni (Croft i Richter (1) oraz Pecora (6)) zarówno w surowicy, jak i w mięśniach (Pecora (6)) stwierdzili wzrost aktywności. Z polskich autorów Romanowski i Siedelnik (6) stwierdzili po pracy zarówno wzrost, jak i zmniejszanie się aktywności cholinesterazy surowicy, ponadto dokonali ciekawego spostrzeżenia, że w początkowym okresie pracy (pierwsze 5 minut) aktywność zawsze wzrasta. Niestety liczba pomiarów była nieduża (8 pomiarów) i, jak wykazała przeprowadzona przez nas analiza, spostrzeżona różnica nie jest statystycznie znamienne, gdyż leży w granicach wahań przypadkowych.

W dostępnym nam piśmiennictwie nie znaleźliśmy prac, które opisywałyby zmiany aktywności esterazy krwinek. Jak wiadomo, w krwinkach w przeciwieństwie do surowicy znajduje się przede wszystkim swoista esteraza, rozkładająca intensywnie wyłącznie acetylocholinę, acetylocholinesteraza (AChE) Richterich (4). Zmiany aktywności tej swoistej esterazy w czasie wysiłku mogą być bardziej istotne w ocenie zjawisk, związanych z pracą nerwów i mięśni. Uwzględniając powyższe, uważaliśmy za celowe podjęcie niniejszej pracy.

METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadziliśmy na białych szczurach wagi około 150 g. O wyborze szczura jako zwierzęcia doświadczalnego zdecydowały łatwość wykonywania licznych pomiarów i możliwość ich oceny metodą statystyczną oraz nieskomplikowany sposób obciążania wysiłkiem przy pomocy wymuszonego pływania. W tym celu umieszczano zwierzęta w naczyniu o ścianach prostopadłych, wypełnionym wodą o ciepłocie 36—37°C. W niektórych seriach doświadczeń wykonywano krótkotrwałe obciążenia zwierząt zmuszając je do pływania w ciągu 15—16 minut. W większości doświadczeń zwierzęta pływały od 45 minut do 1 godziny, przy czym pierwsze 15 minut z ciężarkiem o wadze 15 g. Próbę wysiłkową przerywano już po 45 minutach, gdy u zwierząt pojawiały się oznaki zmęczenia i groziło im utonięcie. Jeżeli mieliśmy do czynienia z osobnikami silniejszymi, próba pływania trwała 1 godzinę. Doświadczenia te w dalszym opisie figurują wszystkie w grupach obciążeń pracą jednogodzinną.

Cholinesterazę w osoczu i w krwinkach oznaczano mikrometodą pH-metrycznego miareczkowania według Jasińskiego (2) na pH-metrze lampowym LBS — 3A (Elektromatyka). Zasada oznaczenia oparta jest na odmiareczkowaniu 0,01 N NaOH kwasu octowego, zawartego w badanej próbce, a powstałego na skutek rozłożenia dodanej do próbki acetylocholin. Ilość kwasu octowego w mikroekwiwalentach (μEq) rozłożonej acetylocholin jest miarą aktywności zawartej w próbce esterazy cholinowej.

Odczynniki. 1) 0,01 N NaOH, 2) 0,9% NaCl buforowany przez dodanie Na_2HPO_4 do pH 7,6, 3) 5% wodny roztwór chlorowodoru acetylocholin, 4) 0,01% roztwór saponiny, 5) 0,4% wodny roztwór salicylanu ezeryny (fizostygminy). Do dwóch próbek odpipetowywano po 6 ml buforu i do każdej dodawano po 0,02 ml krwi, pobranej z żyły ogonowej. Zawartość próbek dokładnie mieszano i wirowano przez 5 minut przy 2500 obr./min. Po odwirowaniu płyn z nad osadu, zawierający osocze, zlewano do naczynek (oznaczonych S_1 i S_2). Pozostały w próbkach osad erytrocytów rozpuszczano w 1 ml 0,01% roztworu saponiny i dodawano po 5 ml buforu. Po wymieszaniu całość zlewano do naczynek (oznaczonych E_1 i E_2). Do naczynek S_1 i E_1 dodawano następnie po 0,04 ml 5% roztworu acetylocholin i wszystkie 4 naczynka wstawiano na 45 minut do cieplarki o temp. 37°C. Po inkubacji przerywano działanie esterazy cholinowej przez dodanie do każdego z naczynek po 0,04 ml roztworu ezeryny i miareczkowano każdą próbę 0,01 N NaOH przy pomocy mikrobiurety pod kontrolą pH-metru przy użyciu elektrody szklanej i kalomelowej do pH buforu = 7,6. Wyniki obliczano ze wzoru

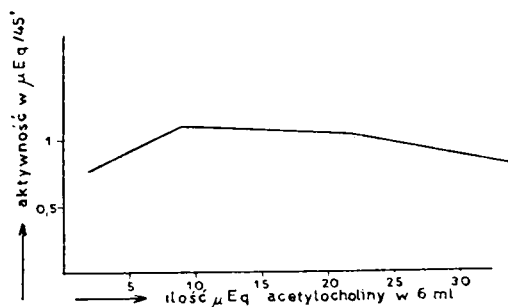
$$(l_1 - l_2) \cdot V : 100 = C \mu\text{Eq}$$

gdzie l_1 — posuw śruby mikrometrycznej w milimetrach dla próbki S_1 lub E_1 , l_2 — posuw śruby w mm dla próbki S_2 lub E_2 , V — objętość mikrobiuretki.

Jak wykazały wielokrotne badania kontrolne przy używanej ilości acetylocholin w czasie inkubacji nie zachodziła widoczna samoistna nieenzymatyczna jej hydroliza.

Jak wiadomo, aktywność enzymu może zmieniać się w zależności od stężenia podłoża. W celu zorientowania się w jakim stopniu czynnik ten może wpływać na dokładność naszych oznaczeń wykonaliśmy pomiary aktywności cholinesterazy

(ChE) przy różnych stężeniach acetylocholin. Stwierdziliśmy, że przy początkowym wzroście koncentracji substratu aktywność ChE wzrasta, przy dalszym zwiększaniu się stężenia utrzymuje się na stałym poziomie, a dopiero przy stężeniach stosunkowo dużych aktywność enzymu maleje (ryc. 1). Uzyskana przez nas krzywa jest podobna do tej, którą podał w swej pracy Pilz (4). W naszych pomiarach stężenie acetylocholin było tak dobrane, że zachodzące zmiany jej stężenia, wywołane rozkładem, nie wpływały na aktywność esterazy ($10-11\mu\text{Eq}/6\text{ml}$). Dzięki temu uzyskane wyniki dotyczyły zmian aktywności ChE powodowanych wyłącznie przez obciążanie ustroju szczura wysiłkiem fizycznym.



Ryc. 1. Zależność aktywności acetylocholinesterazy erytrocytów od stężenia substratu. Na osi x oznaczono ilość μEq acetylocholin w 6 ml, na osi y oznaczono aktywność w $\mu\text{Eq}/45'$

Dependence of activity of erythrocyte cholinesterase on concentration of substrate. Abscissae: amount of acetylcholine (μEq in 6 ml); ordinates: activity ($\mu\text{Eq}/45'$)

Aktywność esteraz nieswoistych w osoczu i w krwinkach oznaczano w sposób podobny z tym, że jako substratu zamiast acetylocholin używano 5% zawiesinę tributyriny (estru masłowego gliceryny). Wyniki obliczano ze wzoru

$$(I_1 - I_2) \cdot V : 300 = C \mu\text{Eq}$$

Znaczenie poszczególnych symboli to samo co we wzorze poprzednim.

Procentowe objętości krwinek i osocza oznaczano zwykłą metodą przy pomocy hematokrytu. Do miseczki porcelanowej odpipetowywano 4 pipetki po 0,02 ml 0,9% roztworu NaCl i 4 pipetki 0,1% wodnego roztworu szczawianu sodu. Do tych roztworów dodawano 8 pipetek (po 0,02 ml) krwi pobranej z ogona szczura. Po dokładnym wymieszaniu wypełniano rurki hematokrytu, umieszczano je w uchwycie metalowym i wirowano przez 20 minut przy 3000 obrotach na minutę. Wyniki obliczano, mnożąc odczytany poziom krwinek przez 2.

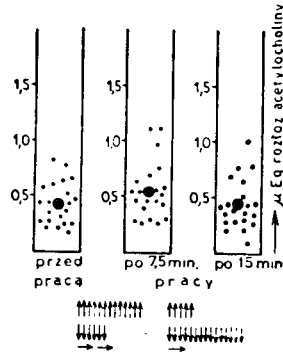
Liczbowe wyniki pomiarów opracowywano metodą statystyczną. Obok wartości średnich (M) serii pomiarów obliczano również ich średnie błędy ($S m$). Istotność (znamienność) różnic wartości średnich ($D = M_1 - M_2$) badano przy pomocy znanego sprawdzianu znamienności „t” dla małej próby. Różnicę średnich (D) dzielono przez średni błąd różnicy ($S_{diff} = \sqrt{Sm_1^2 + Sm_2^2}$) i sprawdzano, czy uzyskany iloraz jest większy od odpowiadającej danej liczebności szeregów pomiarowych wartości „t”, którą odczytywano z tablic statystycznych Kollera.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ WŁASNYCH

I.

W pierwszej serii doświadczeń badaliśmy wpływ wysiłku fizycznego na aktywność ChE osocza krwi.

W początkowych doświadczeniach pobieraliśmy krew przed wysiłkiem, oraz w 8 minucie i 16 minucie wysiłku. Z wykonanych 21 potrójnych pomiarów wynika, że w 8 minucie w 13 pomiarach wystąpił wzrost aktywności, w 2 aktywność pozostała bez zmian, w 6 nastąpiło zmniejszenie aktywności w porównaniu z wartościami spoczynkowymi. Różnica średnich aktywności ChE w spoczynku i w 8 minucie wysiłku nie wykazuje statystycznej znamienności. W 16 minucie pracy stwierdziliśmy w 5 pomiarach wzrost aktywności w porównaniu z 8 minutą, w 1 pomiarze brak zmian, w 15 pomiarach spadek aktywności. Różnice między średnimi aktywnościami w 8 i 16 minucie oraz w spoczynku i w 16 minucie również nie są statystycznie istotne (ryc. 2). W dalszych doświadczeniach pobieraliśmy krew przed pływaniem oraz po 1 godzinie pływania. Wykonaliśmy ogółem 30 tego rodzaju



Ryc. 2. Zachowanie się esteraz cholinowych w osoczu w pierwszych minutach pracy. Strzałki skierowane w górę oznaczają wzrost aktywności enzymatycznej w poszczególnych pomiarach, skierowane w dół spadek aktywności, strzałki poziome brak zmian. Wartość średnia oznaczona większą kropką.

$$M_1 = 0,42 \quad M_2 = 0,56 \quad M_3 = 0,45$$

$$(M_1 - M_2) : \sqrt{S^2 m_1 + S^2 m_2} = 2,03; \quad (M_2 - M_3) : \sqrt{S^2 m_2 + S^2 m_3} = 1,48$$

$$(M_1 - M_3) : \sqrt{S^2 m_1 + S^2 m_3} = 0,47$$

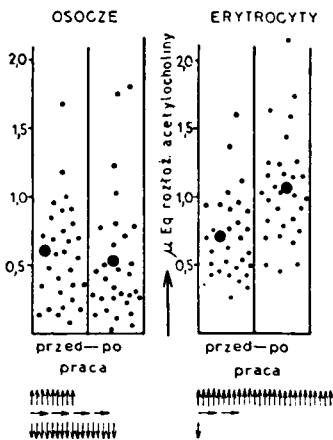
$$T_{40} = 3,20$$

Ponieważ $2,03 < 3,20$ różnica $M_1 - M_2$ jest statystycznie nieznamienna; ponieważ $1,48 < 3,20$ różnica $M_2 - M_3$ jest statystycznie nieznamienna; ponieważ $0,47 < 3,20$ różnica $M_3 - M_1$ jest statystycznie nieznamienna.

Activity of plasma cholinesterase after several minutes of exertion. Arrows pointing upwards represent the increase of enzymatic activity in separate measurements; arrows pointing downwards show the decrease; horizontal arrows: no change. Larger dot represents the mean value

Because $1,48 < 3,20$, the difference $M_2 - M_3$ is statistically insignificant; because $0,47 < 3,20$, the difference $M_3 - M_1$ is statistically insignificant

doświadczeń, przy czym w 9 doświadczeniach wystąpił nieznaczny wzrost aktywności, w 4 brak zmian, a w 17 nieznaczny spadek aktywności ChE. Średnia arytmetyczna wszystkich wyników po pracy była nieco niższa od średniej przed pracą, jednak ta różnica nie jest statystycznie znamiennej (ryc. 3 „osocze”).



Ryc. 3. Zachowanie się aktywności esteraz cholinowych osocza i erytrocytów po jednogodzinnym wysiłku. Oznaczenia jak na ryc. 2.

Activity of plasma and erythrocyte cholinesterase after 1-hour exertion

Explanations as in Fig. 2

$$M_1 = 0,65 \quad M_2 = 0,53 \quad M_3 = 0,71 \quad M_4 = 1,07$$

$$(M_1 - M_2) : \sqrt{S^2 m_1 + S^2 m_2} = 1,02 : \quad (M_3 - M_4) : \sqrt{S^2 m_3 + S^2 m_4} = 3,93$$

$$T_{58} = 3,14$$

Ponieważ $1,02 < 3,14$ różnica $M_1 - M_2$ jest statystycznie nieznamiennej; ponieważ $3,93 > 3,14$ różnica $M_3 - M_4$ jest statystycznie znamiennej.

Because $1,02 < 3,14$, the difference $M_1 - M_2$ is statistically insignificant; because $3,93 > 3,14$, the difference $M_3 - M_4$ is statistically significant

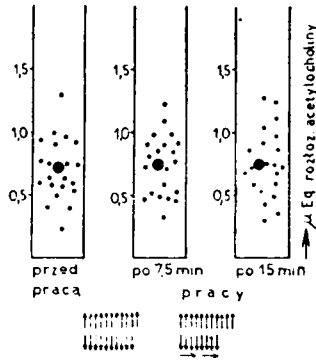
II.

W drugiej serii doświadczeń oznaczaliśmy aktywność acetylocholinesterazy krwinek (AchE) przed i po wysiłku fizycznym.

W początkowych pomiarach, podobnie jak w serii pierwszej, pobieraliśmy krew przed pracą oraz w 8 i 16 minucie wysiłku, przy czym wykonaliśmy 21 potrójnych oznaczeń. W 8 minucie wystąpił w 11 pomiarach wzrost aktywności AchE, a w 10 jej zmniejszenie. W 16 minucie w 11 oznaczeniach wystąpił dalszy, nieznaczny wzrost aktywności, w 2 oznaczeniach aktywność nie zmieniła się w porównaniu z 8 minutą, w 8 pomiarach aktywność nieco zmniejszyła się. Średnie wartości aktywności AchE krwinek przed wysiłkiem oraz w 8 i w 16 minucie wysiłku wykazują nieznaczne, statystycznie nieznamienne różnice (ryc. 4). W dalszych pomiarach pobieraliśmy krew przed pracą oraz po 1 godzinie pływania. Wykonaliśmy 30 tego rodzaju podwójnych oznaczeń. W 27 doświadczeniach wystąpiło wzmoczenie aktywności cholinesterazy krwinek, w 2 doświadczeniach aktywność pozostała bez zmian, a w 1 doświadczeniu uległa zmniejszeniu. Średnia aktywności cholinesterazy krwinek po

wysiłku wyraźnie wzrasta, przy czym wzrost ten jest statystycznie znamieny (ryc. 3 „erytrocyty”).

W następnych doświadczeniach oznaczaliśmy wyłącznie aktywność cholinesterazy krwinek czerwonych.



Ryc. 4. Zachowanie się esteraz cholinowych w krwinkach w pierwszych minutach pracy. Oznaczenia jak na ryc. 2.

$$M_1 = 0,71 \quad M_2 = 0,75 \quad M_3 = 0,76$$

$$(M_2 - M_1) : \sqrt{S^2m_1 + S^2m_2} = 0,53; \quad (M_3 - M_2) : \sqrt{S^2m_2 + S^2m_3} = 0,13$$

$$(M_3 - M_1) : \sqrt{S^2m_1 + S^2m_3} = 0,62$$

$$T_{40} = 3,20$$

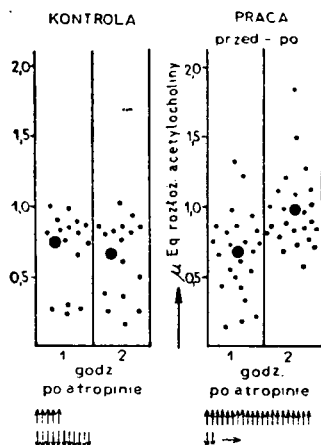
Ponieważ $0,53 < 3,20$ różnica $M_1 - M_2$ jest statystycznie nieznamienna; ponieważ $0,13 < 3,20$ różnica $M_3 - M_2$ jest statystycznie nieznamienna; ponieważ $0,62 < 3,20$ różnica $M_3 - M_1$ jest statystycznie nieznamienna.

Activity of erythrocyte cholinesterase after several minutes of exertion
Because $0,53 < 3,20$, the difference $M_2 - M_1$ is statistically insignificant; because $0,13 < 3,20$, the difference $M_3 - M_2$ is statistically insignificant; because $0,62 < 3,20$, the difference $M_3 - M_1$ is statistically insignificant.

III.

W trzeciej serii doświadczeń podawaliśmy szczurom atropinę (20 mg dootrzewnowo na szczura). Zwierzęta dzieliliśmy na dwie grupy: pierwszą, która nie wykonywała pracy i służyła jako kontrola, zwierzęta grupy drugiej zmuszaliśmy do jednogodzinnego pływania.

Krew pobieraliśmy u obu grup dwukrotnie: w 1 godzinę i w 2 godziny po podaniu atropiny, przy czym drugie pobranie krwi u grupy drugiej zbiegało się w czasie z zakończeniem wysiłku. W grupie kontrolnej między jedną a dwoma godzinami działania atropiny w aktywności cholinesterazy krwinek nie zaszły żadne statystycznie istotne zmiany, chociaż na ogólną liczbę 16 pomiarów w 5 pomiarach wystąpił nieznaczny wzrost, a w 11 nieznaczny spadek aktywności (ryc. 5 „kontrola”). U grupy zwierząt poddanych działaniu wysiłku w 21 doświadczeniach wystąpił wyraźny wzrost aktywności enzymu, w 2 zmniejszenie, w 1 doświadczeniu nie było zmian. Średnia aktywności enzymatycznej krwinek po pracy wyraźnie wzrasta, przy czym ten wzrost jest statystycznie znamieny (ryc. 5 „praca”).



Ryc. 5. Zachowanie się aktywności esteraz cholinowych erytrocytów u zwierząt zatrutych atropiną. Strona lewa — zwierzęta nie wykonujące pracy (kontrola). Strona prawa — zwierzęta wykonujące pracę (praca). Reszta oznaczeń jak na ryc. 2.

$$M_1 = 0,74 \quad M_2 = 0,66 \quad M_3 = 0,67 \quad M_4 = 0,96$$

$$(M_1 - M_2) : \sqrt{S^2 m_1 + S^2 m_2} = 0,68; \quad (M_3 - M_4) : \sqrt{S^2 m_3 + S^2 m_4} = 3,50$$

$$T_{30} = 3,27$$

$$T_{46} = 3,17$$

Ponieważ $0,68 < 3,27$ różnica $M_1 - M_2$ jest statystycznie nieznamienista; ponieważ $3,50 > 3,17$ różnica $M_3 - M_4$ jest statystycznie znamienista.

Activity of erythrocyte cholinesterase in animals poisoned with atropine. Left: animals in rest (kontrola); right: animals undergoing physical exertion (praca).

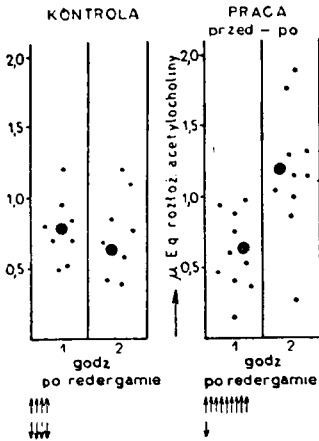
For other explanations see Fig. 2

Because $0,68 < 3,27$, the difference $M_1 - M_2$ is statistically insignificant; because $3,50 > 3,17$, the difference $M_3 - M_4$ is statistically significant

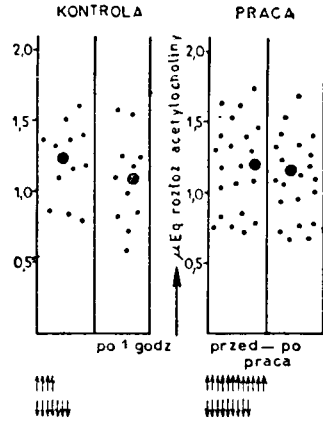
IV.

W czwartej serii doświadczeń podawaliśmy szczurom dwuhydroergotoksynę (Redergam-Richter) jako środek sympatykolityczny (0,1 mg dootrzewnowo na szczura).

Bieg doświadczeń i sposób kontroli były analogiczne jak w doświadczeniach z atropiną. W grupie kontrolnej między jedną a dwoma godzinami działania redergamu nie wystąpiły żadne statystycznie istotne różnice w aktywności cholinesterazy krwinek, chociaż w 4 doświadczeniach obserwowano się nieznaczny wzrost, a w dalszych 4 nieznaczny spadek aktywności (ryc. 6 „kontrola”). Pod wpływem pracy u zwierząt, którym podano redergam, wystąpił wybitny, statystycznie znamienisty wzrost aktywności enzymatycznej w krwinkach. Odnieśliśmy wrażenie, że pod wpływem redergamu praca fizyczna powoduje znaczniejsze narastanie aktywności cholinesterazy krwinek, gdyż znamienność statystyczną różnicy średnich uzyskaliśmy już w 10 doświadczeniach, przy czym w 9 doświadczeniach wystąpił bardzo wyraźny wzrost, a tylko w jednym nieznaczny spadek aktywności enzymatycznej (ryc. 6 „praca”).



Ryc. 6.



Ryc. 7.

Ryc. 6. Zachowanie się aktywności esteraz cholinowych erytrocytów u zwierząt zatrutych dwuhydroergotoksyną (Redergam). Strona lewa — zwierzęta nie wykonujące pracy (kontrola). Strona prawa — zwierzęta wykonujące pracę (praca).

Reszta oznaczeń jak ryc. 2.

$$M_1 = 0,67 \quad M_2 = 0,76 \quad M_3 = 0,63 \quad M_4 = 1,19$$

$$(M_1 - M_2) : \sqrt{S^2 m_1 + S^2 m_2} = 0,65; \quad (M_3 - M_4) : \sqrt{S^2 m_3 + S^2 m_4} = 3,47$$

$$T_{14} = 3,64 \quad T_{18} = 3,47$$

Ponieważ $0,65 < 3,64$ różnica $M_1 - M_2$ jest statystycznie nieznamienna; ponieważ $3,47 = 3,47$ różnica $M_3 - M_4$ jest statystycznie znamienna.

Activity of erythrocyte cholinesterase in animals poisoned with dihydroergotoxin (redergam). Left: animals in rest (kontrola); right: animals undergoing physical exertion (praca). Other explanations as in Fig. 2

Because $0,65 < 3,64$, the difference $M_1 - M_2$ is statistically insignificant; because $3,47 = 3,47$, the difference $M_3 - M_4$ is statistically significant

Ryc. 7. Zachowanie się aktywności esteraz cholinowych erytrocytów u zwierząt zatrutych atofanem. Strona lewa — aktywność enzymatyczna a działanie atofanu (kontrola). Strona prawa — praca a aktywność enzymatyczna erytrocytów u zwierząt zatrutych atofanem (praca). Reszta oznaczeń jak na ryc. 2.

$$M_1 = 1,22 \quad M_2 = 1,08 \quad M_3 = 1,19 \quad M_4 = 1,17$$

$$(M_1 - M_2) : \sqrt{S^2 m_1 + S^2 m_2} = 1,09; \quad (M_3 - M_4) : \sqrt{S^2 m_3 + S^2 m_4} = 0,21$$

$$T_{20} = 3,43 \quad T_{40} = 3,20$$

Ponieważ $1,09 < 3,43$ różnica $M_1 - M_2$ jest statystycznie nieznamienna; ponieważ $0,21 < 3,20$ różnica $M_3 - M_4$ jest statystycznie nieznamienna

Activity of erythrocyte cholinesterase in animals poisoned with atophan. Left: enzymatic activity and the action of atophan (kontrola); right: enzymatic activity of erythrocytes in animals poisoned with atophan undergoing physical exertion (praca). Other explanations as in Fig. 2.

Because $1,09 < 3,43$, the difference $M_1 - M_2$ is statistically insignificant; because $0,21 < 3,20$, the difference $M_3 - M_4$ is statistically insignificant.

V.

W piątej serii doświadczeń podawaliśmy szczurom (5 sztuk) podskórnie atofan (0,05 g soli sodowej atofanu na szczura) codziennie w ciągu 10 dni, w następnych 6 dniach co drugi dzień. Jak wiadomo, wątroba jest głównym narządem wytwarzającym cholinesterazę nieswoistą. Chodziło nam o wywołanie przejściowego uszkodzenia wątroby (Churchill i van Wagener, Reichle (3)) i stwierdzenie, czy wpływa ono na zachowanie się aktywności cholinesterazy krwinek w przebiegu wysiłku fizycznego.

U zwierząt, którym podawano atofan aktywność cholinesterazy krwinek pod wpływem tej substancji nie ulegała zmianie: wartości aktywności enzymatycznej oznaczane w 1 godzinę jak również w 2 godziny po podaniu atofanu oraz w różnych dniach 16-dniowego okresu podawania tej substancji nie wykazywały większych wahań i nie odbiegały od wartości uzyskanych na zwierzętach, którym atofanu nie podawano (ryc. 7 „kontrola”). Natomiast wysiłek fizyczny u tych samych zwierząt w przeciwieństwie do zdrowych nie powodował charakterystycznego wzrostu aktywności enzymatycznej. W 12 doświadczeniach wystąpił po wysiłku nieznaczny wzrost, w 9 nieznaczny spadek. Średnia wartość aktywności przed i po wysiłku jest prawie taka sama (ryc. 7 „praca”).

VI.

W szóstej serii doświadczeń badaliśmy zmiany aktywności esteraz krwinek czerwonych używając jako podłoża tributyriny. Seria ta miała wykazać, czy wzrost aktywności cholinesterazy krwinkowej po długotrwałym wysiłku zachodzi w wyniku zwiększania się aktywności cholinesterazy nieswoistej.

Wykonaliśmy 44 podwójne oznaczenia przed wysiłkiem i bezpośrednio po jednogodzinnym pływaniu. W 39 doświadczeniach wystąpił wzrost aktywności, w 3 spadek, a w 2 doświadczeniach aktywność pozostała bez zmian. Średnia aktywność po wysiłku jest większa niż przed wysiłkiem, a występująca różnica średnich jest statystycznie znamienna (ryc. 8).



Ryc. 8. Zachowanie się w czasie pracy aktywności nieswoistej cholinesterazy erytrocytów, mierzonej intensywnością rozkładu tributyriny. Oznaczenia jak na ryc. 2.

$$M_1 = 0,55 \quad M_2 = 0,65$$

$$(M_1 - M_2) : \sqrt{S^2 m_1 + S^2 m_2} = 3,36$$

$$T_{36} = 3,09$$

Ponieważ $3,36 > 3,09$ różnica $M_1 - M_2$ jest statystycznie znamienna.

The activity during exertion of unspecific cholinesterase in erythrocytes, measured by the intensity of decomposition of tributyrin. For explanations see Fig. 2.

Because $3.36 > 3.09$, the difference $M_1 - M_2$ is statistically significant.

VII.

W siódmej serii doświadczeń badaliśmy zachowanie się stężenia krwi (hemokoncentracji) przed i po jednogodzinnym wysiłku.

Jak wykazały oznaczenia, jednogodzinne pływanie nie powoduje u szczura zmian we wskaźniku hematokrytowym (tab. 1).

Tab. 1. Zmiana objętości krwinek podczas wysiłku fizycznego
Change in erythrocyte volume during physical exertion

| Data | Szczur Nr | Objętość krwinek w %% | |
|----------|--------------|-----------------------|----------|
| | | Przed pracą | Po pracy |
| 20.11.59 | 21 | 55 | 55 |
| „ | 22 | 60 | 60 |
| „ | 23 | 57 | 57,5 |
| 21.11.59 | 24 | 60 | 60 |
| „ | 25 | 60 | 60 |
| „ | 26 | 58 | 58 |

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Jak wynika z pierwszej serii pomiarów, w osoczu krwi szczurów nie występują wyraźne, jednokierunkowe zmiany aktywności esteraz cholinowych ani w pierwszych kilkunastu minutach wysiłku, ani też w przebiegu dłuższej pracy, trwającej od 45 minut do 1 godziny. Esterazy cholinowe krwinek w początkowych okresach wysiłku zachowują się podobnie jak esterazy osocza i nie wykazują statystycznie znamiennych zmian aktywności, natomiast w przedłużającym się wysiłku między 45 minutą a 1 godziną występuje wyraźne zwiększanie się ich aktywności, przy czym wzrost wartości średniej jest statystycznie istotny (druga seria doświadczeń). Celem przekonania się, w jakiej mierze układ wegetatywny bierze udział w powstawaniu tego zjawiska, zatruliśmy zwierzęta atropiną lub dwuhydroergotoksyną (redergamem), (trzecia i czwarta seria). Jak wynika z doświadczeń tych serii zarówno atropina blokująca obwodowo znaczną część zakończeń parasympatycznych, jak i dwuhydroergotoksyna mająca analogiczne działanie na zakończenia współczulne nie wpływają w widoczny sposób na wspomnianą zmianę aktywności esteraz krwinkowych. Jest więc mało prawdopodobne, aby wzrost aktywności esteraz erytrocytów w czasie wysiłku powstawał za pośrednictwem impulsów, idących z układu wegetatywnego. Rzecz charakterystyczna, że atofan w dawkach uszkadzających przejściowo czynność wątroby powoduje, iż zwiększenie aktywności esteraz krwinkowych pod wpływem wysiłku nie występuje (piąta seria

pomiarów). Fakt ten nasunął przypuszczenie, że wzrost wysiłkowy aktywności cholinesteraz krwinkowych powstaje wskutek wzmożonego wytwarzania, względnie tylko zwiększonego oddawania do krwiobiegu nieswoistej cholinesterazy, której nadmiar nie gromadzi się w osoczu lecz wychwytywany zostaje przez krwinki. W celu sprawdzenia słuszności tego przypuszczenia wykonaliśmy szóstą serię doświadczeń, w której oznaczaliśmy przed i po wysiłku aktywność wyłącznie nieswoistej cholinesterazy krwinek, rozkładającej tributyrinę. Jak wykazały oznaczenia, po wysiłku zachodzi wyraźny, statystycznie znamieny wzrost aktywności tego enzymu. Z siódmej serii doświadczeń wynika, że wskaźniki hematokrytowe krwi szczurów nie ulegają widocznym zmianom nawet po dłuższym wysiłku, co świadczy, że opisany wzrost cholinesteraz krwinkowych nie może być spowodowany zagęszczeniem krwi, a odniesiony być musi do istotnych zmian aktywności enzymatycznej.

W ostatecznym podsumowaniu wyników pracy dochodzimy do wniosku, że dłuższy wysiłek fizyczny powoduje u szczurów wzrost aktywności cholinesteraz erytrocytów i to głównie esterazy nieswoistej. Na wzrost ten nie wpływają hamująco jady blokujące obwodowo działanie układu wegetatywnego, nie występuje natomiast ten wzrost u zwierząt zatrutych atofanem, co wskazuje na to, że zwiększenie się aktywności cholinesterazy krwinek dochodzi do skutku dzięki wzmożonemu oddawaniu do krwi enzymu przez wątrobę. Enzym nie gromadzi się w osoczu, gdyż szybko zostaje adsorbowany przez erytrocyty.

WNIOSKI

1. Zarówno krótkotrwały jak i dłuższy wysiłek nie powoduje u szczurów statystycznie istotnych zmian aktywności cholinesterazy osocza.
2. Krótkotrwały wysiłek nie prowadzi do zmian aktywności cholinesterazy krwinek.
3. Długotrwały wysiłek powoduje u szczurów wyraźny, statystycznie znamieny wzrost aktywności cholinesterazy krwinek.
4. Zatrucie zwierząt atropiną lub dwuhydroergotoksyną (redergamem) nie znosi powysiłkowego wzrostu aktywności cholinesterazy krwinek. Po podaniu redergamu wzrost aktywności powysiłkowej zdaje się być nawet nieco większy.
5. Zatrucie lekkiego stopnia zwierząt atofanem nie wpływa na spoczynkowe wartości aktywności enzymatycznej krwinek, natomiast znosi powysiłkowy jej wzrost.
6. Aktywność nieswoistej cholinesterazy krwinek, mierzona intensywnością rozkładu tributyriny, po dłuższym wysiłku wzrasta.

7. Wskaźnik hematokrytowy krwi pod wpływem stosowanego w naszych doświadczeniach wysiłku nie ulegał zmianom.

8. Doszliśmy do wniosku, że dłuższy wysiłek powoduje u szczurów wzrost aktywności cholinesterazy krwinek i to głównie dzięki wzmożeniu aktywności cholinesterazy nieswoistej, rozkładającej tributyrinę. Z doświadczeń można wnioskować, że jest to esteraza pochodzenia wątrobowego, która nie gromadzi się w osoczu lecz szybko zostaje adsorbowana przez erytrocyty.

P I S M I E N N I C T W O

1. Croft P. G., Richter D.: Muscular activity and cholinesterase. (Exercise-effects.) *J. of Physiol.* **102**, 155—169, 1943.
2. Jasiński A.: Szybka metoda oznaczania aktywności esterazy cholinowej we krwi i tkankach. *Acta Physiol. Polon.* **10**, 647—650, 1959.
3. Łazarew N. W. (pod red.): Wywoływanie chorób u zwierząt dla badań doświadczalno-leczniczych. Warszawa 1957, PZWL.
4. Pilz W.: Untersuchungen über Fermente des menschlichen Blutes. I Mitteilung. Die photometrische Mikrobestimmung der Acetylcholinesterase in Serum und Erythrocyten — *Klin. Wochenschr.* **36**, 1017—1021, 1958.
5. Richterich R.: *Enzymopathologie*. Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer, 1958.
6. Romanowski W., Siedelnik J.: Wpływ wysiłku fizycznego na aktywność cholinesterazy surowicy krwi ludzkiej. *Acta Physiol. Polon.* **3**, 235—245, 1952.
7. Stoner H. B., Wilson A.: Effect of muscular exercise on serum cholinesterase level in normal adults and patients with myasthenia gravis. *J. of Physiol.* **102**, 1—4, 1943.

Р Е З Ю М Е

Исследования авторами проводились на крысах, которых заставляли к выполнению определенной работы в виде кратковременного плавания (до 16 минут), или более продолжительного (от 45 минут до 1 часа). Активность холинэстераз обозначалась потенциметрически в плазме крови и в кровяных тельцах до и после выполнения заданной работы. В качестве субстратов пользовались хлористоводородным ацетилхолином, а также трибутирином. Средние величины, получаемые из отдельных серий измерений, сравнивались с помощью статистических методов.

Авторы пришли к следующим заключениям:

1. Кратковременный, а равно и более продолжительный труд не вызывает у крыс в статистическом отношении существенных изменений в активности холинэстеразы в плазме крови.

2. Кратковременный труд не приводит к изменениям активности холинэстеразы в кровяных тельцах.

3. Продолжительный труд вызывает у крыс отчетливое, статистически существенное повышение активности холинэстеразы кровяных телец.

4. Интоксикация животных атропином или дигидроэрготоксином (редергамом) не устраняет повышения активности холинэстеразы кровяных телец, вызванного выполнением определенной работы. После подачи редерама повышение указанной выше активности кажется даже несколько больше.

5. Слабое отравление животных атофаном не оказывает влияния в покое на энзиматическую активность кровяных телец, но устраняет послетрудовое ее повышение.

6. Активность неспецифической холинэстеразы кровяных телец, определяемая интенсивностью разложения трибутирина, после более продолжительного выполнения заданной работы, возрастает.

7. Отношение объема форменных элементов крови к её плазме под влиянием задаваемой авторами подопытным животным работы не изменялась.

8. Более продолжительный труд вызывает у крыс повышение активности холинэстеразы кровяных телец, главным образом, благодаря усилению активности неспецифической холинэстеразы, разлагающей трибутирин. На основании произведенных опытов можно предположить, что это эстераза печеночного происхождения, которая но накапливается в плазме крови, но весьма быстро адсорбируется эритроцитами.

Рис. 1. Зависимость активности ацетилхолинэстеразы от концентрации субстрата. На оси x обозначено количество μ экв. ацетилхолина в 6 мл., на оси y обозначена активность в μ экв./45 мин.

Рис. 2. (Стрелки, направленные вверх обозначают повышение энзиматической активности для отдельных измерений, направленные вниз — снижение активности; стрелки горизонтальные — отсутствие изменений. Средняя величина обозначена жирной точкой).

Рис. 3. Состояние активности холинэстераз плазмы крови и эритроцитов после выполнения одночасовой работы. Обозначения как на рис. 2.

Рис. 4. (обозначения как на рис. 2.).

Рис. 5. Состояние активности холинэстераз эритроцитов у животных отравленных атропином. Слева — животные, невыполняющие работу (контрольные) Справа — животные, выполняющие работу (заданная работа). Остальные обозначения как на рис. 2.

Рис. 6. Состояние активности холинэстераз эритроцитов у животных, отравленных дигидроэрготоксином (редергам). Слева — животные, невыполняющие работы (контрольные). Справа — животные, выполняющие работу (заданная работа). Остальные обозначения как на рис. 2.

Рис. 7. Состояние активности холинэстераз эритроцитов у животных отравленных атофаном. Слева — энзиматическая активность, действие атофана (контроль). Справа —

выполняемая работа, а энзиматическая активность эритроцитов у животных отравленных атофаном (заданная работа). Остальные обозначения как на рис. 2. (Подробности в тексте).

Рис. 8. Состояние во время выполнения работы активности неспецифической холинэстеразы эритроцитов, определяемой интенсивностью разложения трибутирина. Обозначения как на рис. 2.

S U M M A R Y

The investigations were conducted on rats, which were forced to swim for a short time (up to 16 minutes) or for a longer time (from 45 minutes to 1 hour). The cholinesterase activity in plasma and in erythrocytes was determined potentiometrically before and after physical exertion. Acetylcholine chlorhydrate and tributyrin were used as substrates. The mean values obtained from the separate series of measurements were compared statistically.

The authors arrived at the following conclusions.

1. Neither a short nor a prolonged exertion produce in rats statistically significant changes in the cholinesterase activity of blood plasma.

2. A short exertion does not produce any change in the activity of cholinesterase in erythrocytes.

3. A prolonged exertion causes in rats a marked, statistically significant increase of the cholinesterase activity in erythrocytes.

4. Administration of atropine or dihydroergotoxin (redergam) does not inhibit this increase of the cholinesterase activity in erythrocytes; on the contrary, after the administration of redergam it seems to be even greater.

5. A slight poisoning with atophan has no influence on the initial value of the enzymatic erythrocyte activity, but inhibits its increase after exertion.

6. The activity of unspecific cholinesterase of erythrocytes measured by the intensity with which it decomposes tributyrin increases after a longer exertion.

7. The haematocrit index remained unchanged after the experimental physical effort.

8. A prolonged exertion produces in rats an increase of the activity of cholinesterase in erythrocytes, mainly owing to an increased activity of the unspecific cholinesterase which decomposes tributyrin. It may be concluded from the authors' experiments that this is an esterase of hepatic origin, which is not stored in blood plasma, but is quickly adsorbed by erythrocytes.