

UŽITÍ ELLMANOVY METODY PRO STANOVENÍ AKTIVIT CHOLIN-ESTERAS PŘI *IN VIVO* HODNOCENÍ ÚČINKŮ REAKTIVÁTORŮ

JANA ŽDÁROVÁ KARASOVÁ^a, KAMIL KUČA^{a,b}, DANIEL JUN^{a,b} a JIŘÍ BAJGAR^a

^a Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové,

^b Centrum pokročilých studií, vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové
karasova@pmfhk.cz

Došlo 13.10.08, přepracováno 10.2.09, přijato 12.3.09.

Klíčová slova: acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, Ellmanovo činidlo, reaktivátory, tabun, cyklosarin, acetylthiocholin

Úvod

Inhibice enzymu acetylcholinesterasy (AChE; EC 3.1.1.7) a butyrylcholinesterasy (BChE; EC 3.1.1.8) je v současnosti považována za hlavní mechanismus toxického účinku organofosfátových inhibitorů. Inhibice těchto enzymů má za následek změny v mnoha důležitých tělesných funkcích^{1,2}. Znalost aktuálního stavu aktivity cholinesteras v organismu je klíčová pro včasnou diagnózu intoxikace organofosforovými inhibitory (OFI) a také pro sledování účinnosti podané terapie, hlavně pak reaktivátorů AChE². Nejčastěji je pro toto stanovení využívána erytrocytární AChE, jelikož je dobře dostupná a míra její inhibice velmi dobře koresponduje se závažností otravy³.

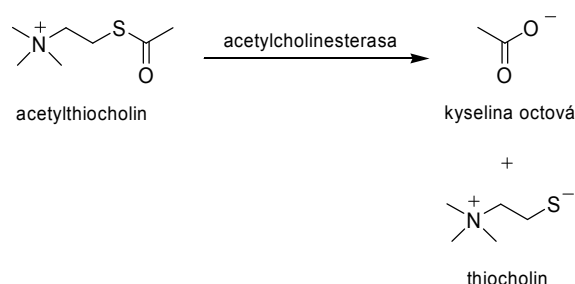
Existuje mnoho metodik, jež byly pro stanovení aktivity cholinesteras vyvinuty, mezi nejčastěji používané jsou řazeny metody elektrometrické⁴, titrační⁵, kolorimetrické⁶, měření změny pH s využitím indikátoru⁷, spektrofotometrické^{8,9}, fluorimetrické¹⁰, radiometrické¹¹, polarografické¹² a enzymové¹³. Výše uvedené metody však nemohou být zavedeny do rutinní praxe z mnoha důvodů, zvláště pak náročné úpravy vzorku, dlouhé doby měření nebo nedostatečné specifické enzymu k substrátu¹⁴.

Velmi citlivá a pro běžné využití vhodná metoda byla popsána Ellmanem¹⁵. Tato kolorimetrická metoda je dnes zavedena do praxe k hodnocení zdravotního stavu lidí, kteří běžně přichází do styku s organofosforovými inhibitory (pracovníci v průmyslu a zemědělství)^{16,17}.

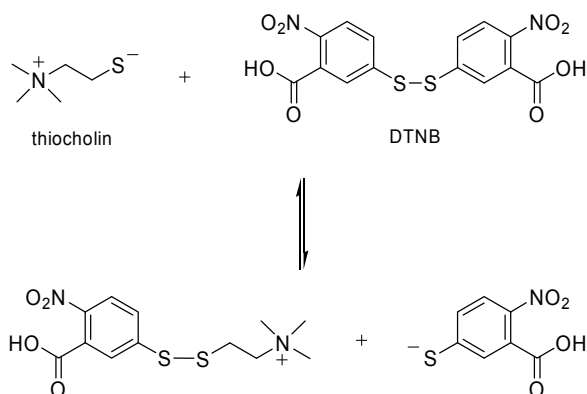
Princip této metody je založen na hydrolýze thiocholinu (acetylthiocholinu pro AChE, butyrylthiocholinu pro BChE). Po enzymové hydrolýze je uvolněna příslušná kyselina a thiocholin. Thiocholin obsahující ve své molekule skupinu SH je detegován pomocí 5,5'-dithiobis-2-

-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) tím, že po reakci s thiocholinem dochází k uvolnění 5-merkapt-2-nitrobenového aniontu (TNB⁻) (obr. 1, 2 a 3). Tento anion je pak detegován spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm. Tato metoda je v dobré korelaci s ostatními výše uvedenými postupy⁴⁻¹⁴.

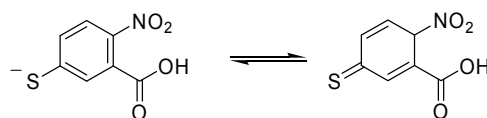
Ačkoliv je Ellmanova metoda rychlá, jednoduchá a levná, má také své nevýhody. Velmi zásadní při měření aktivity cholinesteras v krvi je interference s hemoglobinem. Absorpční maximum barevného indikátoru TNB⁻ (5-merkapt-2-nitrobenzoátového aniontu) je 412 nm. Při této vlnové délce však absorbuje záření také v krvi přítomný hemoglobin¹⁸. Pokud chceme vyloučit takto vzniklou chybu, je potřeba krevní vzorek hodně



Obr. 1. Štěpení acetylthiocholinu na kyselinu octovou a thiocholin



Obr. 2. Štěpení DTNB a vznik chromoforu



Obr. 3. Přechod chromoforu na formu, která je fotometrována

ředit. Dalším problémem je pak reakce Ellmanova činidla (DTNB) s pomalu reagujícími sulphydrylovými skupinami v roztoku, jež mohou ovlivnit výsledky měření¹⁹.

Tyto nedostatky vedly k mnoha modifikacím původní Ellmanovy metody. Ve snaze o snížení interference s hemoglobinem byly na některých světových pracovištích použity k měření odlišné vlnové délky²⁰, dvoupráskové spektrofotometry nebo jiné chromogenní disulfidy, např. 4,4'-dithiopyridin^{21,22}. Jinou možností, jak zlepšit stanovení AChE v krvi, je použití selektivních inhibitorů BChE, jako jsou quinidin ((2-ethenyl-4-azabicyclo(2,2,2)oct-5-yl)-(6-methoxyquinolin-4-yl)-methanol)²³ nebo fenothiazinové deriváty^{24,25}.

Další možností je sledování změny aktivity BChE, které se používá v běžné medicíně²⁶ a klinické toxikologii^{27,28,29}. Tyto diagnózy intoxikace OFI pomocí BChE je používána v praxi při automatickém stanovování aktivity cholinesteras v klinické chemii. Stále se však objevují dohady, zda změna aktivity BChE dokáže přesně indikovat také změnu aktivity synaptické AChE³⁰.

Cílem této práce je sledovat změny aktivit cholinesteras v krvi a plasmě. Určit změny aktivit těchto enzymů po intoxikaci dvou organofosforových inhibitorů (cyklosarin a tabun) a zároveň sledovat terapeutický efekt reaktivátorů. V této studii je hodnocena reaktivační účinnost dvou reaktivátorů – v terapii běžně užívaného obidoximu (1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)2-oxapropanidchlorid) a nově připraveného oximu K 203 ((E)-1-(4-karbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-en dibromid).

Experimentální část

Chemikálie

Organofosforové inhibitory tabun a cyklosarin o čistotě ~ 98 % byly získány z institutu VTUO Brno (Česká republika) a skladovány ve skleněných ampulích po 0,3 ml. Roztoky inhibitorů použitých ve studii byly připraveny těsně před použitím. Oximy obidoxim a K 203 byly připraveny na Katedře toxikologie, Fakulty vojenského zdravotnictví (Hradec Králové, Česká republika)³¹. Ostatní chemikálie čistoty p.a. byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika).

Zvířata

Samci potkanů kmene Wistar o váze 180–200 g (BioTest; Konarovice, Česká republika). Zvířata byla udržována v klimatizované místnosti (stálá teplota 22 ± 2 °C, vlhkost 50 ± 10 %, světelný cyklus 12 h světlo/tma), krmena byla standardní peletovou dietou a vodou *ad libitum*. Experiment byl pod dohledem Etické komise Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové.

Experiment *in vivo*

Atropin v terapeutické dávce (21 mg kg^{-1}) byl i.m. aplikován v kombinaci s reaktivátorem (obidoxim, K 203) 5 min před intoxikací. Otravné látky v dávkách odpovídajících 1 LD₅₀ byly aplikovány do svalu pravého zadního stehna zvířete. Kontrolní skupině byl podán atropin v terapeutické dávce a za 5 min byl i.m. aplikován fyziologický roztok.

Zvířata byla usmrcena dekapitací 30 min po intoxikaci otravnými látkami, jako anestézie byl použit CO₂. Po dekapitaci byla odebrána hrdelní krev do zkumavek se standardním množstvím heparinu. Aktivita AChE byla stanovena ihned po odběru krve. Krev byla nejprve hemolyzována v 0,02 M Tris-puftru (pH 7,6) v poměru 1:20 (krev/puftr) po dobu 5 min.

Stanovení enzymové aktivity AChE

Aktivita AChE byla stanovována v nesrážlivé krvi v den odběru vzorků. Krev byla nejprve hemolyzována přidáním 0,02 M Tris-puftru o pH 7,6 v poměru 1:20. Hemolýza je kompletní po uplynutí 4minutového intervalu od přidání puftru. Měření aktivity enzymu AChE uvolněného z povrchu a vnitřního obsahu erytrocytů pak probíhal následovně: do kyvety byl pipetován roztok DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina) v 0,1 M Tris-puftru o pH 7,6 (1,7 ml), pak byla přidána hemolyzovaná krev (0,1 ml) a reakce byla odstartována přidáním substrátu specifického pro AChE, ATCh (0,2 ml). Aktivita enzymu byla měřena při 37 °C.

Pro stanovení aktivity AChE byla využita standardní spektrofotometrická metoda dle Ellmana¹⁵, byla modifikována vlnová délka na 436 nm tak, aby nedocházelo k výrazným interferencím s hemoglobinem. Pro stanovení absorbance byl použit Spektrofotometr Helios Alpha (Elektron Corporation, Oxford, Velká Británie). Výsledky byly vyhodnoceny v jednotkách $\mu\text{kat ml}^{-1}$.

Stanovení enzymové aktivity BChE

Část nesrážlivé plné krve byla v den odběru odstředěna za stálé teploty 15 °C a při 3000 otáčkách/min po dobu 10 min. Plasma byla odebrána do mikrozkušavek a uchovávána při teplotě -80 °C (při této teplotě je zaručeno zachování stálé aktivity enzymů po dobu několika měsíců) až do dne, kdy byla ve vzorcích stanovována aktivita BChE. Před stanovováním BChE v plasmě je vhodné ustálit aktivitu enzymu přes noc při teplotě $+4$ °C (lednice) a 2 h při teplotě laboratorní.

Do kyvety byl pipetován roztok DTNB v 0,1 M Tris-puftru o pH 7,6 (1,7 ml), pak byla přidána plasma (0,1 ml) a reakce byla odstartována přidáním substrátu specifického pro BChE, BTCh (0,2 ml). Aktivita enzymu byla měřena při 37 °C.

Pro stanovení aktivity BChE byla využita taktéž standardní spektrofotometrická metoda dle Ellmana¹⁵

s modifikovanou vlnovou délkou. Výsledky byly vyhodnoceny v jednotkách $\mu\text{kat ml}^{-1}$.

Kalibrace

Před vlastní kalibrací je připravena cysteinová kalibrační řada. Základní roztok cysteinu je ředěn vždy v poměru 1 : 1 (koncentrovanější roztok cysteinu : destilovaná voda). Takto vznikne řada o čtyřech různých koncentracích, přičemž základní roztok je $0,2 \mu\text{M}$.

Pro kalibraci se do kyvety místo hemolyzátu krve nebo plasmy pipetuje stejný objem ($0,1 \text{ ml}$) roztoku cysteinu z připravené kalibrační řady. Přidá se roztok DTNB ($1,7 \text{ ml}$) v pufru a reakce se odstartuje přidáním $0,2 \text{ ml}$ příslušného substrátu (ATCh, BTCh). Absorbance vzorku se měří při 436 nm . Kalibrace se měří proti slepému vzorku, v něm je hemolyzátní nebo plasma (cystein) nahrazena destilovanou vodou.

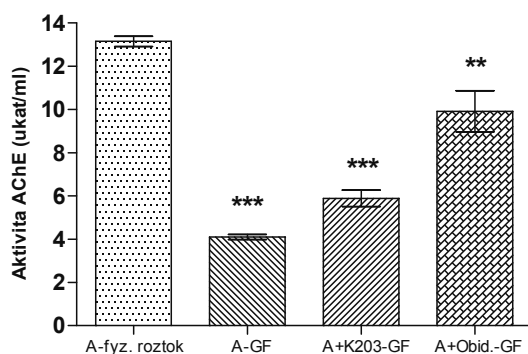
Statistické hodnocení

Počet zvířat ve skupině byl 6. Aktivity enzymu v krevním hemolyzátu byly vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka, pro zjištění statisticky významné změny mezi jednotlivými skupinami byl použit t-test.

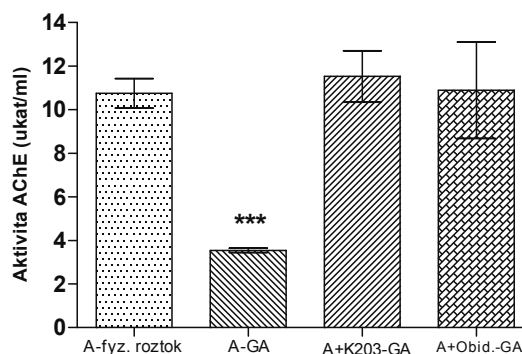
Výsledky a diskuse

Z výsledků vyplývá, že obě nervově paralytické látky způsobily výrazný pokles aktivit cholinesteras, po podání 1 LD_{50} cyklosarinu byl zaznamenán pokles aktivity AChE na 34 % a BChE na 23 % vzhledem k původní aktivitě (obr. 4 až 7). Po podání stejné dávky tabunu došlo také k výraznému snížení aktivit, a to na 38 % u AChE a 17 % u BChE (obr. 5 a 7).

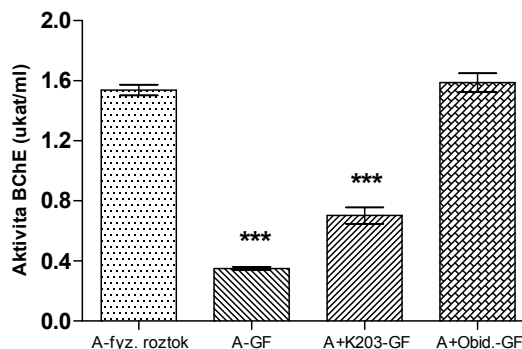
Při intoxikaci cyklosarinem došlo po podání reaktivá-



Obr. 4. Změna aktivit AChE v krvi po podání 1 LD_{50} cyklosarinu (GF), terapie byla podána 1 min před intoxikací, krev byla odebrána 30 min po intoxikaci; A – atropin, GF – cyklosarin, K203 – syntetizovaný oxim K203, Obid – obidoxim



Obr. 5. Změna aktivit AChE v krvi po podání 1 LD_{50} tabunu (GA), terapie byla podána 1 min před intoxikací, krev byla odebrána 30 min po intoxikaci; A – atropin, GF – cyklosarin, K203 – syntetizovaný oxim K203, Obid – obidoxim

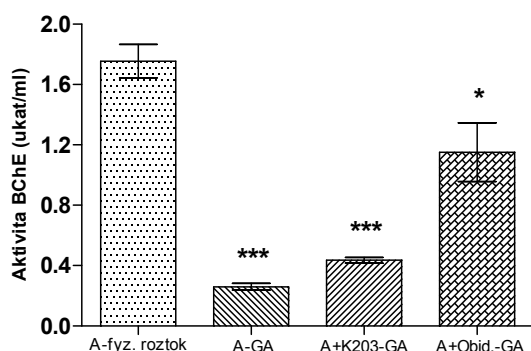


Obr. 6. Změna aktivit BChE v plasmě po podání 1 LD_{50} cyklosarinu (GF), terapie byla podána 1 min před intoxikací, krev byla odebrána 30 min po intoxikaci; A – atropin, GF – cyklosarin, K203 – syntetizovaný oxim K203, Obid – obidoxim

torů k zlepšení klinického stavu. Zvýšení aktivity AChE nebylo po podání jednotlivých oximů srovnatelné (obr. 4), lepší výsledek vykázal obidoxim, který reaktivoval enzym na hodnotu 74 % vzhledem k aktivitě AChE kontrolní skupiny. Při sledování změn v aktivitě BChE byl také zaznamenán podobný průběh reaktivity. Zde prokázal výrazně lepší reaktiváční účinnost také obidoxim, došlo k úplné reaktivaci BChE. Po podání nově syntetizovaného oximu K203 bylo zaznamenáno dvojnásobné navýšení aktivity oproti skupině, již nebyla podána terapie (obr. 6).

Reaktivace enzymu AChE byla lepší po intoxikaci tabunem. Zde došlo k nárůstu aktivity AChE po podání reaktivátoru K 203 i obidoximu až na původní hodnoty vzhledem ke skupině, jež nebyla intoxikována (obr. 5). Naproti tomu lepší reaktivace BChE v plasmě byla zaznamenána po podání obidoximu (obr. 7).

Jak již bylo uvedeno v úvodu, největší nevýhodou stanovení aktivit cholinesteras v krvi je interference



Obr. 7. Změna aktivit BChE v plasmě po podání 1 LD₅₀ tabunu, terapie byla podána 1 min před intoxikací, krev byla odebrána 30 min po intoxikaci; A – atropin, GF – cyklosarin, K203 – syntetizovaný oxim K203, Obid – obidoxim

s hemoglobinem, jehož absorpční maximum se shoduje se vznikajícím barevným indikátorem. Tuto interferenci jsme v experimentu omezili dvěma způsoby, a to: přípravou hemolyzátu plné krve, kde byla krev ředěna 1 : 20 a zároveň byla upravena vlnová délka stanovení na 436 nm. Při této vlnové délce je absorbance hemoglobinu snížena asi na 1/4 hodnoty absorbance při vlnové délce 412 nm (cit.¹⁴).

AChE se nachází nejen v matrix erytrocytů, ale je také zabudována do jejich buněčné membrány³². Pro stanovení přesné aktivity AChE a snížení interferenci s plasmatickou BChE je nutné promýt erytrocyty pufr. Pro výplach je vhodné použít pufr, jež není k erytrocytárním buňkám agresivní (při hemolýze by došlo k uvolnění AChE do vyplachovacího pufru) a má vyváženou osmolalitu, z tohoto důvodu není možné k výplachu zbytkové plasmy použít 0,1 M Tris pufr o pH 7,6, který se používá při samotném stanovení. Mnohem výhodnější je použití 0,1 M fosfátového pufru o fyziologickém pH (pH 7,6). Další možností, jak snížit interferenci s BChE, je využití selektivních inhibitorů BChE (ethopropazin), které mají minimální vliv na hodnotu aktivity stanovené AChE³³.

Pro lepší uvolnění AChE z erytrocytů je přidáváno minimální množství tenzidu Tritonu X-100, který zlepšuje hemolýzu krevních buněk. Pro hemolýzu používáme roztoky o velmi nízkých koncentracích Tritonu (0,01 %), protože vyšší koncentrace ovlivní výsledek měření¹⁴.

Udržení stabilního pH po dobu měření aktivit cholinesteras je velmi důležité, protože enzymová hydrolyza substrátů (ATCh, nebo BTCh) používaných při tomto stanovení je závislá na pH. Při pH 7,6–7,8 je dosaženo optima pro enzymové štěpení acetyl- a butyrylthiocholinu³⁴.

Další možnou komplikací při stanovení aktivit cholinesteras v tělních tkáních a krvi je reakce DTNB s běžně v tkáních přítomným glutathionem a dalšími látkami obsahujícími skupinu SH (cit.¹⁹). Tyto látky reagují s DTNB stejným mechanismem jako substrát změněný cholineste-

rasou a vykazují pak chybně pozitivní výsledek. Tato reakce je při měření tkání nevyhnutelná. Takto vzniklou chybou je možné vyloučit preinkubací měřených vzorků po dobu asi 5 min. V tomto intervalu dojde k reakci DTNB se všemi těmito látkami a ty pak již neovlivňují následný odečet aktivit cholinesteras.

Závěr

Sledování změn aktivit cholinesteras v biologických vzorcích prokázalo reaktivaci inhibovaných enzymů po podání reaktivátorů (obidoxim, K203). Reaktivace byla potvrzena u obou látek v plasmě i krvi. Reaktivace AChE inhibované tabunem v plné krvi byla lepší po podání nově vyvinutého reaktivátoru K 203, jež byl vyvinut jako možné terapeutikum právě pro případ intoxikace tímto inhibitorem. Obidoxim vykázal horší reaktiváční schopnost vůči této nervově paralytické látce.

Uvedená práce byla vypracována díky podpoře grantu Ministerstva obrany (Česká republika) FVZMO0000501.

LITERATURA

- Holmstedt B.: *Pharmacol. Rev.* 11, 567 (1959).
- Bajgar J.: *Adv. Clin. Chem.* 38, 151 (2004).
- Bajgar J., Fusek J., Kuca K., Bartosova L., Jun D.: *Mini Rev. Med. Chem.* 7, 461 (2007).
- Michel H. O.: *J. Lab. Clin. Med.* 34, 1564 (1949).
- Nenner M.: *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 8, 537 (1970).
- Hestrin S.: *J. Biol. Chem.* 180, 241 (1949).
- Winter G. D.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 87, 629 (1960).
- Voss G., Sachsse K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 16, 764 (1970).
- Worek F., Kirchner T., Backer M., Szinicz L.: *Arch. Toxicol.* 70, 497 (1996).
- Sasaki M.: *Rinsko Biori.* 12, 555 (1964).
- Israel M., Lesbats B.: *Neurochemistry: A Practical Approach*, str. 113. IRL Press, Washington 1987.
- Fiserova-Bergerova V.: *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* 28, 3311 (1969).
- Abernethy M. H., George P. M., Herron J. L., Evans R. T.: *Clin. Chem.* 32, 194 (1986).
- Worek F., Mast U., Kiderlen D., Diepold Ch.: *Clin. Chim. Acta* 288, 73 (1999).
- Ellman G. L., Courtney K. D., Anders V.: *Biochem. Pharmacol.* 7, 88 (1961).
- London L., Thompson M. L., Sacks S.: *Occup. Environ. Med.* 52, 57 (1995).
- Wilson B. W., Sanborn J. R., O'Malley M. A.: *Occup. Environ. Med.* 12, 347 (1997).
- Ellman G. L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 443 (1958).
- Ellman G. L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70 (1959).
- Kassa J., Karasova J., Musilek K., Kuca K.:

- Toxicology. 243, 311 (2008).
21. George P. M., Abernethy M. H.: Clin. Chem. 29, 365 (1983).
 22. Hackathorn D. R., Brinkman W. J., Hathaway T. R.: Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 44, 547 (1983).
 23. Magnotti R. A., Dowling K., Eberly J. P.: Clin. Chim. Acta 315, 315 (1988).
 24. Gordon J. J.: Nature 162, 146 (1948).
 25. Meuling W. J. A., Jongen M. J. M., Hemmen J. J.: Am. J. Ind. Med. 22, 231 (1992).
 26. Lopez-Carrillo L., Lopez-Cervantes M.: Arch. Edvir. Healt 48, 359 (1993).
 27. Bajgar J.: Brit. J. Ind. Med. 49, 648 (1992).
 28. Bajgar J.: Voj. Zdrav. Listy 67, 1 (1998).
 29. Bajgar J.: Klin. Biochem. Metab. 13, 40 (2005).
 30. Ballantyne B., Marrs T. C., v: *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*, (Ballantyne B., Marrs T. C., ed.), str. 3. Butterworth & Heinemann, Oxford 1992.
 31. Musílek K., Jun D., Cabal J., Kassa J., Guun-Moore F., Kuca K.: J. Med. Chem. 50, 5514 (2007).
 32. Paleus S.: Arch. Biochem. Biophys. 12, 153 (1947).
 33. Todrick A.: Br. J. Pharmacol. 9,76 (1954).
 34. Bajgar J.: Voj. Zdrav. Listy 41, 78 (1972).

J. Žďárová-Karasová, K. Kuča, D. Jun, and J. Bajgar (*Department of Toxicology, Faculty of Military Health Service, Defence University, Brno*): **Using the Ellman Method for *In Vivo* Testing of Cholinesterase Activity**

The changes in cholinesterase activity in tissues were evaluated and compared with the reactivation potential of reactivators. As reactivators, (*E*)-1-(4-carbamoylpyridinium-1-yl)-4-{4-[(hydroxyimino)methyl]pyridinium-1-yl}but-2-ene dibromide (K203) and common 1,3-bis{4-[(hydroxyimino)methyl]pyridinium-1-yl}-2-oxapropane dichloride (obidoxime) were used. The reactivation of both oximes was monitored in blood and blood plasma. The reactivation of tabun-inhibited acetylcholinesterase (AChE) was higher using the newly synthesized K203.

**Proděkan chemické sekce Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze
upozorňuje, že pro přijímací řízení ve školním roce 2010/11**

v navazujícím magisterském studiu

je možno studovat v následujících studijních programech/oborech

Studijní program: Chemie

Studijní obory:

Analytická chemie

Anorganická chemie

Fyzikální chemie

Biofyzikální chemie

Jaderná chemie

Makromolekulární chemie

Organická chemie

Chemie životního prostředí

Modelování chemických vlastností nano- a biostruktur

Učitelství chemie a biologie pro SŠ

Učitelství chemie a matematiky (UK MFF) pro SŠ

Učitelství chemie jednooborové

Studijní program: Biochemie

Studijní obor:

Biochemie

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor:

Klinická a toxikologická analýza

Příhlášky a podrobné informace lze získat na adrese: PřF UK, studijní oddělení, Albertov 6, 128 43 Praha 2,
tel: 221 951 155, 221 951 156. Příhlášky ke studiu se přijímají do 28. února 2010.

Další informace naleznete na webových stránkách PřF UK – www.natur.cuni.cz.