

TESTOVÁNÍ REFERENČNÍ METODY ZALOŽENÉ NA INDOXYLACETÁTU JAKO SUBSTRÁTU ACETYLCHOLINESTERASY PRO URČENÍ ÚČINNOSTI REAKTIVACE

Miroslav POHANKA^{1,2}, Martina HRABINOVÁ², Jana ŽDÁROVÁ KARASOVÁ², Ondřej HOLAS³, Kamil KUČA^{1,2}, Jiří CABAL²

¹Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Centrum pokročilých studií, Hradec Králové

²Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, katedra toxikologie, Hradec Králové

³Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra farmaceutické chemie, Hradec Králové

Souhrn

Biochemické vyhodnocení aktivity acetylcholinesterasy je důležitým faktorem při výběru a hodnocení látek modulující její aktivitu, jako jsou oximové reaktivátory. Úskalím v současnosti používané Ellmanovy metody pro stanovení aktivity cholinesterasy je samovolná reakce mezi Ellmanovým činidlem a oximovým reaktivátorem. V této práci je použit a popsán alternativní chromogenní substrát indoxylacetát umožňující vyhodnotit účinnost reaktivity acetylcholinesterasy bez znatelné interference in vitro. Metoda byla úspěšně ověřena pro pět standardních oximových reaktivátorů (HI-6, methoxim, trimedoxim, obidoxim, 2-PAM) a tři organofosfátové inhibitory: paraoxon-methyl, sarin a tabun.

Klíčová slova: Organofosfátový insekticid; Nervově paralytická látka; Acetylcholinesterasa; Reaktivátor; Indoxylacetát.

Testing of a Referential Method Based on Indoxylacetate as a Acetylcholinesterase Substrate for Identification of Reactivation Efficacy

Summary

Biochemical evaluation of acetylcholinesterase activity is an important factor for selection and evaluation of drugs, such as oxime reactivators, which modulate acetylcholinesterase activity. A spontaneous reaction between an Ellman reagent and an oxime reactivator is the main disadvantage of currently available Ellman's method used for identification of cholinesterase activity. In this study, an alternative chromogen, substrate indoxylacetate is used. It is suitable for evaluation of acetylcholinesterase reactivation efficacy without oxime interference in vitro. The method was successfully examined for five standard oxime reactivators (HI-6, methoxime, trimedoxime, obidoxime, and 2-PAM) and three organophosphate inhibitors: paraoxon-methyl, sarin and tabun.

Key words: Organophosphate insecticide; Nerve agent; Acetylcholinesterase; Reactivator; Indoxylacetate.

Úvod

Mechanismus toxického působení některých toxických látek, jako jsou organofosfátové a karbamátové pesticidy, nervově paralytické látky a některé přírodní toxické látky, jako je např. skupina pyrethroidů, je založen na inhibici důležitého enzymu v lidském těle: acetylcholinesterase (AChE). Význam AChE spočívá v ukončování přenosu signálu cholinergní neurotransmisí v centrální a periferní nervové soustavě hydrolýzou neurotransmiteru acetylcholinu (5). Zároveň se cholinergní neurotransmise podílí na regulaci imunitního systému tzv. cholinergní protizánětlivou dráhou (9). Intoxikace organofosfátovými, resp. karbamátovými inhibitory, způsobuje nadměrné dráždění acetylcholinových receptorů (8). Intoxikace je pak typicky manifestována nikotinovými, muskarinovými nebo centrálními příznaky otravy (3). Současná snaha potlačit toxické

působení inhibitorů AChE je založena na farmakologickém navrácení aktivity AChE pomocí tzv. oximových reaktivátorů (1, 2).

Cílem těchto experimentů je vytvořit kontrolní metodu pro určení reaktivační účinnosti nových i stávajících oximových reaktivátorů. Tato snaha je motivována obtížemi při biochemickém vyhodnocování účinnosti reaktivity z důvodu interakce oximových reaktivátorů s používaným chromogenem Ellmanovým činidlem (7). Pro účely testování byla vybrána spektrofotometrická metoda založená na alternativním substrátu acetylcholinesterasy indoxylacetátu. Tato metoda byla vybrána pro testování standardních oximových reaktivátorů: obidoximu, trimedoximu, HI-6, methoximu a 2-PAM v koncentracích 10^{-4} – 10^{-6} mol/l. Pro jednotlivé reaktivátory a jejich finální koncentrace je brána jako výstupní hodnota reaktivační účinnost (procento reaktivity).

Metody

Chemikálie a vybavení

Acetylcholinesterasa z elektrického úhoře, indoxylacetát, paraoxon-methyl a standardní reaktivátory asoxim (HI-6), methoxim, trimedoxim, obidoxim a 2-PAM byly zakoupeny od pobočky Sigma-Aldrich (ČR). Sarin a tabun byly získány od tehdejšího Vojenského technického ústavu ochrany (ČSFR). Jako základní pufr byl použit standardní fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS). AChE byla roz-suspendována v PBS na finální aktivitu 1 U/μl (tj. 16,7 nkat/μl), měřeno Ellmanovou metodou. Vlastní měření bylo realizováno v standardním spektrofotometru se spojitým laděním vlnové délky za použití jednorázových PS kyvet s maximálním objemem 2 ml.

Uspořádání měření

Měření probíhá ve standardních kyvetách. Do standardní kyvety bylo postupně přidáno:

1. 25 μl roztoku AChE,
2. 0,85 ml PBS,
3. 25 μl roztoku paraoxonu, sarinu nebo tabunu, případně PBS; roztok je inkubován při laboratorní teplotě 30 (sarin, tabun), resp. 60 (paraoxon) minut;
4. 100 μl 25 mM in-doxylacetátu a 50 μl roztoku testovaného oximového reaktivátoru; absorbance je změřena při 670 nm.

Jako blank byl použit roztok obsahující vše, jak je výše uvedeno, se záměnou roztoku AChE za PBS. Vlnová délka odečtu maximální absorbance byla optimalizována v rámci vlastních experimentů, při této vlnové délce vznikající indigomodř vykazuje nejvyšší absorbanci. Další lokální absorpční maximum při 540 nm bylo používáno jako kontrolní. Použitá koncentrace paraoxonu, sarinu a tabunu byla vypočtena z kalibračních křivek jako taková, která poskytla 95% inhibici daného roztoku AChE. Pro zpracování experimentálních dat byl použit software Origin 8 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Výpočet reaktivace

Reaktivace byla vypočtena na základě měření absorbance poskytnuté intaktním enzymem, enzymem plně inhibovaným a enzymem inhibovaným a následně reaktivovaným:

$$R(\%) = \left(\frac{A_r - A_i}{A_0 - A_i} \right) \times 100$$

kde A_r je absorbance naměřená při 670 nm enzymem po reaktivaci oximovým reaktivátorem, A_i je absorbance reakční směsi s plně inhibovanou AChE a A_0 je absorbance poskytnutá enzymem ve vzorku s inhibitorem i reaktivátorem nahrazeným PBS.

Výsledky

Pro jednotlivé inhibitory, oximové reaktivátory a koncentrace oximových reaktivátorů byly naměřeny hodnoty procentní reaktivace. Vlastní experimentální data jsou uvedena tabulce 1. Hodnoty procent reaktivace se pohybovaly v rozmezí -4,1 až 60,6. Záporné hodnoty procent reaktivace nebyly statisticky signifikantní (ANOVA s Scheffe testem, $P > 0,05$) a nebylo možné rozhodnout, zda se jednalo o chybu měření, či uplatnění jiných mechanismů.

Tabulka 1

Určení účinnosti reaktivace (procento reaktivace R) pro jednotlivé oximové reaktivátory a jejich finální koncentrace (směrodatná odchylka pro $n = 4$)

	coxim (mol/l)	tabun	sarin	paraoxon
obidoxim	10^{-4}	$25,4 \pm 1,3$	$48,3 \pm 2,6$	$20,3 \pm 1,0$
	10^{-5}	$8,4 \pm 0,8$	$4,1 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$
	10^{-6}	$2,4 \pm 0,5$	$2,9 \pm 0,3$	$-0,4 \pm 0,5$
trimedoxim	10^{-4}	$34,9 \pm 1,7$	$55,3 \pm 2,9$	$30,5 \pm 2,1$
	10^{-5}	$8,1 \pm 0,7$	$3,6 \pm 0,8$	$17,6 \pm 1,1$
	10^{-6}	$4,1 \pm 0,4$	$0,1 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,9$
HI-6	10^{-4}	$12,8 \pm 0,6$	$6,5 \pm 0,4$	$8,6 \pm 0,6$
	10^{-5}	$4,7 \pm 0,2$	$-1,2 \pm 0,8$	$7,4 \pm 0,7$
	10^{-6}	$0,1 \pm 0,3$	$-4,1 \pm 1,3$	$7,0 \pm 0,4$
methoxim	10^{-4}	$48,1 \pm 2,9$	$33,5 \pm 1,7$	$30,9 \pm 2,4$
	10^{-5}	$25,1 \pm 1,4$	$10,6 \pm 0,6$	$13,7 \pm 0,9$
	10^{-6}	$4,3 \pm 0,5$	$2,9 \pm 0,3$	$10,3 \pm 1,1$
2-PAM	10^{-4}	$24,7 \pm 1,2$	$60,6 \pm 3,2$	$34,0 \pm 1,7$
	10^{-5}	$7,8 \pm 0,4$	$13,5 \pm 0,7$	$11,7 \pm 0,9$
	10^{-6}	$3,9 \pm 0,8$	$-1,2 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,8$

Diskuse

Pro jednotlivé standardní oximové reaktivátory a tři vybrané koncentrace byly změřeny hodnoty procenta reaktivace pro sarin, tabun a paraoxon.

Koncentrace oximového reaktivátoru 10^{-4} mol/l je zajímavá především z experimentálního hlediska pro odhad některých parametrů *in vitro*. Pro tera-

peutické využití není příliš vhodná z důvodu uplatnění nežádoucích vedlejších příznaků při *in vivo* podání. Koncentrace 10^{-5} mol/l je vhodnější pro použití *in vivo* a experimentální výpovědní hodnota pro tuto koncentraci je tedy vyšší. Při koncentraci reaktivátoru 10^{-5} mol/l se ukázal jako nejlepší pro návrat aktivity sarinem inhibované AChE 2-PAM pro tabun methoxim a pro paraoxon trimedoxim. Účinnost reaktivity pro koncentraci oximového reaktivátoru 10^{-6} mol/l byla velmi nízká pro všechny testované reaktivátory a při žádné z testovaných kombinací nepřesáhla 10 %.

V této studii byl jako substrát AChE použit indoxylacetát. Jeho použití není příliš běžné, na druhou stranu některé analytické práce již v minulosti poukázaly na jeho použitelnost při kolorimetrických studiích (4). Výhodou použití indoxylacetátu byla nulová interakce mezi vlastním indoxylacetátem a oximovými reaktivátory. Při použití standardní Ellmanovy metody pro vyhodnocení reaktivační účinnosti dochází k spontánní reakci mezi Ellmanovým činidlem (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoová kyselina)) a testovaným oximovým reaktivátorem. Tato tzv. oximolýza zvyšuje experimentálně změřenou hodnotu reaktivity (7). Pro potlačení dopadu oximolytického rozkladu Ellmanova činidla na stanovenou měřenou absorbanci je třeba provádět samostatná měření a vliv oximolýzy odečítat od naměřených experimentálních dat. Při použití indoxylacetátu nebylo žádné oximolytické působení zaznamenáno a roztok obsahující indoxylacetát a oximový reaktivátor, příp. organofosfátový inhibitor, vykazuje bez přidání AChE nezměněnou hodnotu absorbance po dobu několika hodin.

Pro úplnost je třeba zmínit fakt, že indoxylacetát zde byl využit pro *in vitro* studii zaměřenou na hodnocení aktivity jednoho čistého enzymu v přítomnosti potenciálních léčiv. Při *in vivo* testech lze očekávat interferenci jiných hydrolas. Například Popovic-Uroic a spol. (6) navrhli test založený na rozdílné schopnosti hydrolyzovat indoxylacetát jednotlivými bakteriálními rody *Campylobacter*, *Helicobacter* a *Wolinella*. Tato *in vivo* interference však nepředstavuje omezení metody pro *in vitro* prescreening potenciálních léčiv.

Závěr

Byla testována fotometrická metoda pro odhad reaktivační účinnosti oximových reaktivátorů založená na indoxylacetátu jako substrátu a zároveň chro-

mogenu. Tato metoda byla ověřena na pěti standardních oximových reaktivátorech pro tři koncentrace a tři organofosfátové inhibitory. Značnou předností této metody je, na rozdíl od standardní Ellmanovy metody, stabilita indoxylacetátu v přítomnosti oximového reaktivátoru. Tato metoda může sloužit jako referenční k nově vyvíjeným metodikám a automatickým, resp. poloautomatickým analyzátorům.

Autoři děkují MO ČR za projekt OVUOFVZ200801.

Literatura

1. BAJGAR, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv. Clin. Chem.*, 2004 vol. 38, no. 1, p. 151–216.
2. JOKANOVIC, M. – PROSTRAN, M. Pyridinium oximes as cholinesterase reactivators: structure-activity relationship and efficacy in the treatment of poisoning with organophosphorus compounds. *Curr. Med. Chem.*, 2009 vol. 16, no. 17, p. 2177–2188.
3. MARRS, TC. Organophosphate poisoning. *Pharmac. Ther.*, 1993, vol. 58, no. 1, p. 51–66.
4. NO, HY., et al. Cholinesterase-based dipstick assay for the detection of organophosphate and carbamate pesticides. *Anal. Chim. Acta*, 2007, vol. 594, no. 1, p. 37–43.
5. PATOČKA, J. – KUČA, K. – JUN, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta Medica*, 2004, vol. 47, no. 4, p. 215–228.
6. POPOVIC-UROIC, T., et al. Evaluation of the indoxyl acetate hydrolysis test for rapid differentiation of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* species. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, vol. 28, no. 10, p. 2335–2339.
7. SINKO, G., et al. Limitation of the Ellman method: cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Anal. Biochem.*, 2007, vol. 370, no. 2, p. 223–227.
8. THIERMANN, H., et al. Lessons to be learnt from organophosphorus pesticide poisoning for the treatment of nerve agent poisoning. *Toxicology*, 2007, vol. 233, no. 1, p. 145–154.
9. TRACEY, KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.*, 2007, vol. 117, no. 2, p. 289–296.

Korespondence: Kpt. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D.

Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: miroslav.pohanka@gmail.com;
pohanka@pmfhk.cz

Do redakce došlo 15. 12. 2009