

## VLIV IONTŮ KOVŮ NA ACETYLCHOLINESTERÁZU INHIBOVANOU LÁTKAMI SÉRIE „V“

## THE IMPACT OF METAL IONS ON THE ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITED BY THE NERVE AGENTS „V“ TYPE

Monika Hoskovicová<sup>a\*</sup><sup>a</sup> Univerzita obrany, Brno, Ústav ochrany proti zbraním hromadného ničení, Víta Nejedlého, 682 01, Vyškov, Česká republika<sup>b</sup> Instrukce spoluautora, adresa

\*Korespondující autor. e-mail: monika.hoskovicova@unob.cz, tel.: +420 973 452 316

## Abstrakt

Biochemická reakce určená k detekci přítomnosti nervově paralytických organofosforových látek je založená na inhibici cholinových esteráz. Je reakcí skupinovou. Z chromogenních modifikací je nejčastěji využívanou právě Ellmanova reakce, pomocí níž je detekován vznik příslušného thiolu, který se projeví barevnou změnou. V práci byl studován vliv biogenních iontů jako možná cesta k odlišení zástupců nervově paralytických látek typu „V“. Jejich použití je však omezeno užitím ve stadiu před dealkylací enzym-inhibitorového komplexu.

**Klíčová slova:** acetylcholinesteráza, biochemická metoda, Ellmanovo činidlo, nervově paralytické látky, kovy alkalických zemin

## Abstract

Biochemical method is appointed for detection of organophosphorus nerve agents presence. It is based on choline esterases inhibition. It is group reaction. From chromogenic modifications is usually used Ellman's reaction, which is constituted for detection of developed thiol, which is presented by color change. Influence of metal ions were studied in this work as possible way how to differentiate members of nerve agents "V" type. Their use is limited by application before dealkylation of enzyme-inhibitor complex.

**Key words:** acetylcholinesterase, biochemical method, Ellman's reagent, nerve agents, alkaline earth metal ions

## 1. ÚVOD

V padesátých letech byl na několika místech studován nový typ nervově paralytických látek, které později dostaly kódové označení „V“. Do výzbroje armády USA a Velké Británie byla zavedena látka S-[(2-diisopropylamino)ethyl]-O-ethyl-methylfosfonothioát, s kódovým označením VX. Její struktura byla oficiálně publikována až v roce 1973. [1,2]

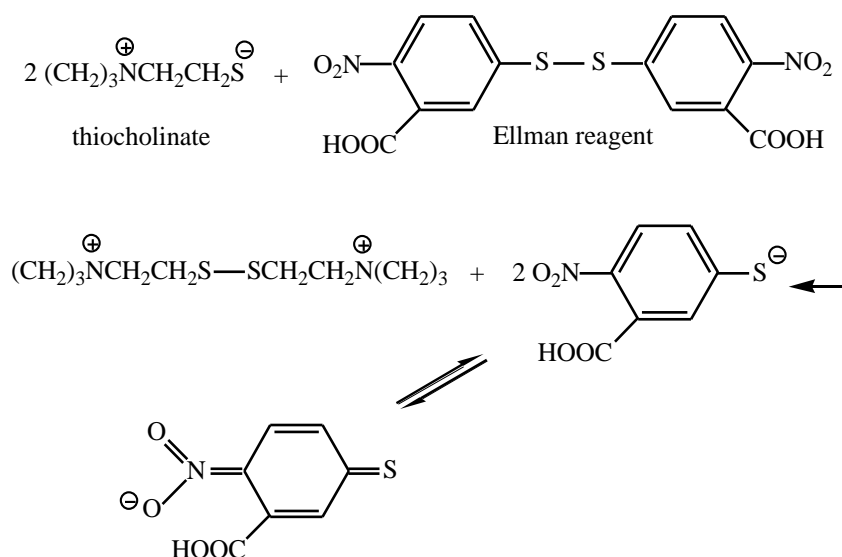
Sovětský svaz také vyvinul chemickou sloučeninu ze série „V“, nazývanou „sovětská látka V“. Tato látka se uvádí jako V<sub>x</sub> nebo Vx. Její ruské kódové označení je R-33 a jedná se fakticky o izomer.

Spolu s látkou A-232 se stala jednou z látek projektu „Novičok“ v programu binární chemické munice, se kterým začal Sovětský svaz v osmdesátých letech. Látka R-33 byla, až do roku 1991, označována jako totožná s americkou látkou VX. Skutečný chemický název sloučeniny je *S*-[(2-diethylamino)ethyl]-*O*-isobutyl-methylfosfonothioát. [3]

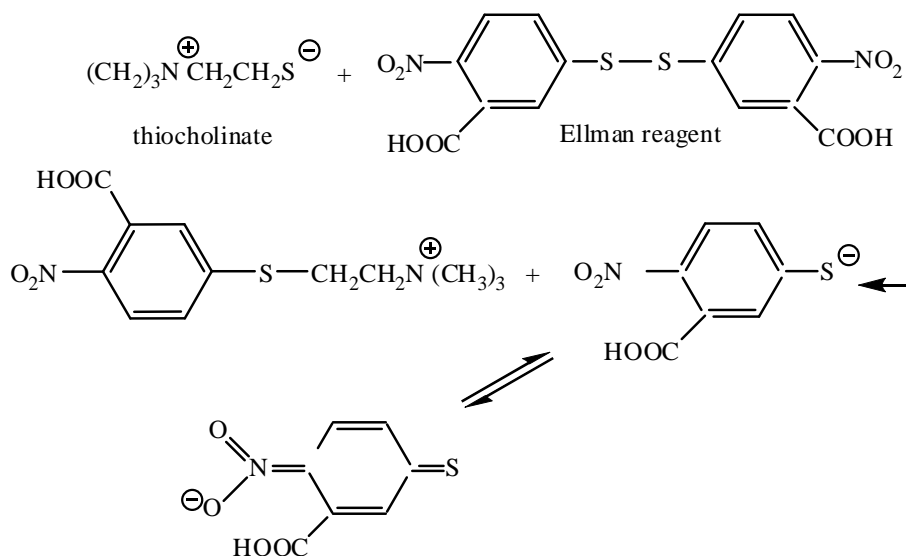
VX a R-33 mají extrémně vysokou toxicitu, která je vyšší než u sloučenin série „G“. Jsou vhodné k dlouhodobé kontaminaci terénu. Jsou to látky lipofilní a snadno prochází pokožkou. Obtížné je také léčení intoxikací. V organismu působí jako ireverzibilní inhibitory acetylcholinesterázy (AChE), enzymu, který se významně podílí na cholinergním přenosu nervového vzruchu v nervovém systému. Jeho inhibicí nedochází k eliminaci neurotransmiteru, acetylcholinu, a dochází tak k jeho akumulaci v synaptické mezeře a nadměrnému dráždění receptorů, které vyvolává fyziologické projevy. [4]

Biochemické metody detekce a analýzy využívají jako svůj základ právě znalost mechanismu působení v organismu. Pro stanovení aktivity acetylcholinesterázy je i z historického hlediska velmi často využívána tzv. Ellmanova metoda. Ellmanovo činidlo (kyselina 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová)) je specifické pro stanovení thiolů. [5] Proto byl při její modifikaci na stanovení produktů katalyticky řízené hydrolýzy upraven i původní substrát acetylcholin (butyrylcholin) tak, aby ve své struktuře obsahoval vázanou síru, tedy na acetylthiocholin nebo butyrylthiocholin. [6] Principem metody je tudíž hydrolýza acetyl- (butyryl-) thiocholinu za uvolnění příslušné kyseliny a thiocholinu. Vzniklý thiocholin lze detekovat pomocí Ellmanova činidla. V literatuře lze nalézt dva možné reakční mechanismy, které jsou znázorněny na obrázcích 1. a 2. [7,8] Štěpení substrátu je indikováno vznikem redukované formy tohoto činidla, které je žluté. Tím je umožněna spektrofotometrická detekce při 412 nm.

Obrázek 1: Navržený průběh Ellmanovy reakce 1.



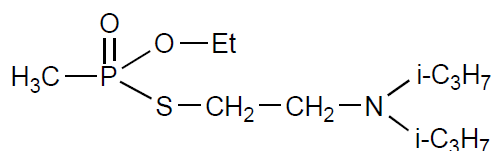
Obrázek 2: Navržený průběh Ellmanovy reakce 2.



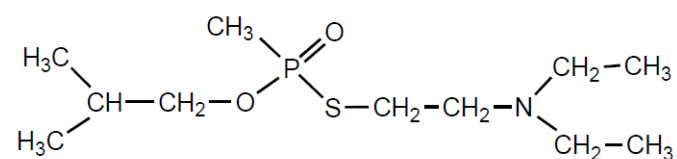
Cholinesterázová metoda je velmi citlivá a z toho důvodu často využívaná v řadě aplikací. Jednou z nich je i Biosenzor pro detekci a rozlišení inhibitorů cholinesteráz Detehit. Jedná se o plastový strip skládající se ze zóny s bavlněnou textilií s imobilizovanou a stabilizovanou acetylcholinesterázou a detekčního papíru se substrátem acetylthiocholin jodidem a chromogenním Ellmanovým činidlem. AChE je imobilizována jako stabilní enzymová chiméra s polysacharidem celulózu. Enzym zůstává v tuhé fázi a jeho použití je tedy polyvalentní. Výhodou je možnost odstranění přebytku činidel, která působí na enzym prostým vymytím textilie vodou. [9]

Tento prostředek byl použit pro studium vlivu iontů na acetylcholinesterázu inhibovanou nervově paralytickými látkami série V, tedy látkou VX a jejím ruským analogem R-33. Strukturální vzorce těchto látek je uveden na obrázcích 3. a 4.

Obrázek 3: Chemická struktura látky VX.



Obrázek 3: Chemická struktura látky R-33.



Bylo prokázáno, že ionty ovlivňují enzymatickou aktivitu acetylcholinesterázy. Ta je zvýšena alkalickými kovy, jako jsou  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  a ionty kovů alkalických zemin  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ . Aktivace pomocí kovů alkalických zemin je významnější. [10] V práci [11] jsou však  $\text{Na}^+$  ionty uváděny jako inaktivátory enzymu.

Ovlivnění aktivity acetylcholinesterázy je vysvětlováno třemi způsoby:

1. Vlivem iontové síly podle teorie Brønsted-Bjerrum a Debye-Hückela.
2. Konformačními změnami, které jsou výsledkem obsazení periferních míst ionty kovů.
3. Specifickou vazbou kovového iontu na anionické místo aktivního centra enzymu.

Monovalentní ionty ( $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$ ) působí díky zvýšení iontové síly. Teorie Brønsted-Bjerrum a Debye-Hückela popisuje reakci mezi dvěma nabitými částicemi. Podle ní je rychlostní konstanta reakce mezi dvěma nabitými částicemi závislá na iontové síle. Aktivita AChE je závislá na nejpomalejším kroku při hydrolýze substrátu (acetylcholinu). Tímto limitním krokem je deacetylace. V tomto případě je deacetylace AChE reakcí mezi negativním hydroxylovým iontem a pozitivně polarizovanou karboxylovou skupinou, která je obklopená šesti negativně nabitými karboxylovými skupinami, které hydroxylový iont ovlivňují (ačkoli ne tolik jako celkový náboj aktivního místa). Aktivitu acetylcholinesterázy zvyšují monovalentní ionty v souladu s teorií tím, že snižují rozsah elektrického pole karboxylátových skupin, které snižují elektrostatickou repulzi mezi těmito skupinami a hydroxylovou skupinou. Platnost této teorie je však omezená a u vysokých iontových sil selhává.

U dvojmocných iontů je mechanismus pravděpodobně jiný. U vápenatých a hořečnatých iontů bylo zjištěno, že neutralizují negativní náboje aktivního místa tvorbou komplexu s karboxylovými skupinami. To vede k lepšímu přístupu negativně nabitých hydroxylových iontů k místu deacetylace. U nízkých iontových sil může být jejich vliv vysvětlen elektrostatickým efektem. [12]

Publikace [13] uvádí, že je aktivace acetylcholinesterázy způsobená právě obsazením periferních míst enzymu kovovými ionty  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Na}^+$ . Platí to pro roztoky s nízkou iontovou silou. Inaktivace AChE byla pozorována pro ionty  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Pb}^{2+}$  bez závislosti na iontové síle roztoku.

$\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ionty jsou většinou považovány za aktivátory enzymu. [10,11]

Vzhledem k řadě publikací, které se zabývají vlivem iontů na AChE, bylo provedeno několik experimentů za účelem ověřit jejich vliv na enzym inhibovaný nervově paralytickou látkou.

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Chemikálie

V experimentu byly použity nervově paralytické látky *S*-[(2-diisopropylamino)ethyl]-*O*-ethylmethylfosfonothioát (VX) a *S*-[(2-diethylamino)ethyl]-*O*-isobutylmethylfosfonothioát (R-33). Čistota látky VX byla 87,51 % a látky R-33 86,77 %. Deklarovaná čistota byla ověřena GC-MS.

Látky byly skladovány ve skleněných ampulích o objemu 2 ml. Obě látky byly syntetizovány ve Vojenském výzkumném ústavu, a.s., Brno.

Chlorid vápenatý, bezvodý, granulovaný (CAS 10043-52-4) byl získán od firmy Lachner. Čistota 96 %. Chlorid hořečnatý (CAS 7786-30-3) od firmy Sigma. Jeho čistota byla 98 %.

Textilie s imobilizovanou AChE [EC 3.1.1.7] byla dodána společností ORITEST spol. s r.o., Praha. Jako nosič pro AChE je použita tkanina z čisté přírodní bavlny. Indikační papír s acetylthiocholin jodidem a kyselinou 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou) (CAS 69-78-3) byl zakoupen od stejného dodavatele. Textilie i indikační papír byly skladovány v chladu při  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 Popis metody

Ke stanovení vlivu iontů na AChE inhibovanou NPL série „V“ byla použita Ellmanova kolorimetrická metoda. Průběh reakce je indikován vznikem žlutého zbarvení, jako důsledek vzniku redukované formy Ellmanova činidla. Intenzita zbarvení je přímo úměrná aktivitě enzymu.

Využita byla modifikovaná aplikace metody na bavlněnou textilii – Detektor nervově paralytických látek Detehit. Polotovar detekční textilie s imobilizovaným enzymem byl aktivován ve vodných roztocích iontů po dobu 10 nebo 30 minut. Byly použity 1 M a nasycené roztoky iontů. Textilie byla po stanovené expozici iontům vyňata z roztoku a opláchnuta destilovanou vodou. Následně byla vložena do vodného roztoku nervově paralytické látky o koncentraci  $2,098 \cdot 10^{-6}\text{ mol/l}$  po dobu 2 minut. Po uplynutí této doby byla textilie opět vytažena z roztoku a opláchnuta destilovanou vodou. Poté byl na textilii na dobu 1 minuty přitisknut indikační papír s obsahem substrátu a chromogenního činidla. Po uplynutí této doby byla reakční textilie vložena do nosiče přístroje.

Intenzita zbarvení bavlněné textilie byla proměřována na spektrometru Ultra Scan XE, firmy Hunter Lab, Reston VA, USA,. Měření bylo prováděno při 430 nm. Měření bylo započato ve 20 sekundě a ukončeno ve 2 minutě po odstranění indikačního papíru. Tato doba překračuje dobu nutnou k průběhu biochemické reakce, což se projevilo stálým probarvením textilie.

Experimenty byly prováděny za běžných laboratorních podmínek.

### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Byly provedeny experimenty ke zjištění účinku iontů alkalických zemin na AChE inhibovanou látkami VX nebo R-33. Využity byly  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  ionty. Bylo zjištěno, že účinkem těchto dvoumocných iontů dochází k prohloubení inhibice vybranými nervově paralytickými látkami. Výsledky pro AChE inhibovanou látkou VX jsou prezentovány v Tabulce 1 a pro AChE inhibovanou látkou R-33 v Tabulce 2. Pokud by byl vliv iontu na aktivaci enzymu způsoben vazbou na alosterická místa poblíž aktivního centra enzymu, dochází pravděpodobně k takovým konformačním změnám, které vedou k usnadnění přístupu nervově paralytické látky do prostoru aktivního centra.

V případě vazby iontů na anionická centra a následné neutralizaci negativních nábojů aktivního místa, čímž by se usnadnil přístup hydroxylových iontů s následnou deacetylací, jak je to prezentováno např. v publikaci [12], je nepravděpodobné. K deacetylaci nedochází. Nebyl použit nativní substrát, ale inhibitor, který aktivní centrum fosfonyluje. Pokud by docházelo k vazbě na anionická místa, znamenalo by to změny, které podporují vazbu inhibitoru v aktivním centru.

Elektrostatický efekt, který je popisován právě u roztoků s nízkou iontovou silou, lze vzhledem k podmínkám experimentu vyloučit. Výsledky vlivu iontů uvedené v publikacích uvedených v předchozím textu tohoto příspěvku pracují většinou s roztoky s nízkou iontovou silou.

Další vliv inhibitoru, a tedy další snížené aktivity enzymu, je po předchozí stanovené 2 minutové expozici možné vyloučit. Přebytek je z textilie vymyt destilovanou vodou. Navíc bylo monitorování vzniku barevných produktů enzymaticky řízené reakce prováděno téměř ihned po vlastní inhibici.

Z tabulek je patrný výraznější inhibiční účinek pozorovaný ve variantě s vápenatými ionty. Ten je prohlubován s dobou působení. Stejný účinek byl pozorován i pro hořečnaté ionty a to v případech obou nervově paralytických látek. To koresponduje s výsledky naměřenými na pracovišti, kdy bylo zjištěno, že vápenaté ionty mají pro tento enzymatický model mírně deaktivující účinek, zatímco vliv hořečnatých iontů byl pozitivní, tedy došlo k aktivaci AChE. Tento vliv je pravděpodobně ovlivněn i použitými koncentracemi, které vysoce překračují ty fyziologické.

Při porovnání případu, kdy je brán v úvahu vliv inhibitoru, bylo zjištěno, že inhibice způsobená ruskou látkou R-33 je výraznější. Aktivita enzymu byla ve všech případech snížena o více než 100 %.

*Tabulka 1: Vliv působení iontů kovů alkalických zemin na AChE inhibovanou látkou VX.*

Doba působení	10 min					
	1 M	Rovnice přímky	Korelační koeficient R <sup>2</sup>	Nasycený roztok	Rovnice přímky	Korelační koeficient R <sup>2</sup>
Ca <sup>2+</sup>	- 87,46	$y = -0,019x + 100,08$	0,9432	-79,82	$y = -0,0468x + 100,27$	0,9477
Mg <sup>2+</sup>	-26,96	$y = -0,0548x + 100,95$	0,9976	- 80,04	$y = -0,046x + 100,02$	0,9784
Doba působení	30 min					
Ca <sup>2+</sup>	-115,10	$y = -0,036x + 100,39$	0,9569	- 120,39	$y = -0,0221x + 100,17$	0,9214
Mg <sup>2+</sup>	- 107,95	$y = -0,0548x + 100,95$	0,9976	- 107,49	$y = -0,056x + 100,6$	0,9813

Tabulka 2: Vliv působení iontů kovů alkalických zemin na AChE inhibovanou látkou R33.

Doba působení	10 min					
	1 M	Rovnice přímky	Korelační koeficient R <sup>2</sup>	Nasycený roztok	Rovnice přímky	Korelační koeficient R <sup>2</sup>
Ca <sup>2+</sup>	- 108,39	$y = -0,042x + 100,86$	0,9671	- 111,248	$y = -0,0431x + 100,72$	0,9652
Mg <sup>2+</sup>	- 104,22	$y = -0,0335x + 100,75$	0,9777	- 108,27	$y = -0,0373x + 100,6$	0,9643
Doba působení	30 min					
Ca <sup>2+</sup>	-148,0	$y = -0,076x + 100,39$	0,9469	- 148,39	$y = -0,0751x + 100,17$	0,9424
Mg <sup>2+</sup>	- 129,97	$y = -0,0548x + 100,75$	0,9876	- 136,26	$y = -0,0674x + 100,6$	0,9753

#### 4. ZÁVĚR

Použití dvoumocných iontů alkalických zemin nevedlo ke snížení účinku silných inhibitorů AChE, v tomto případě nervově paralytických látek série V, americké látky VX S-[(2-diisopropylamino)ethyl]-O-ethyl-methylfosfonothioátu a jejího isomeru R-33, tedy S-[(2-diethylamino)ethyl]-O-isobutyl-methylfosfonothioátu. Bylo možné očekávat, že aktivita enzymu bude po expozici nervově paralytickou látkou snížena. Otázkou byl vliv hořčnatých a vápenatých iontů. Jak ovlivní celou biochemickou reakci, když je prezentován jejich aktivační účinek. Naopak, inhibiční účinek byl prohlouben. Je zřejmé, že tyto ionty ovlivňují funkci enzymu nejen pro zvýšení jeho reaktivity vůči substrátu, ale zároveň i kompetitivnímu inhibitoru. Vyšší inhibiční účinnost byla pozorována u AChE exponované látkou R-33. To by mohlo být praktické pro rozlišení mezi jednotlivými inhibitory na základě biochemické reakce.

#### Poděkování

Výzkum byl prováděn v rámci DZRO Ústavu OPZHN Výzkum metod a technologií ochrany před účinky zbraní hromadného ničení a průmyslových nebezpečných látek.

#### Použitá literatura

[1] LEY R. V.; SAINSBURY G. L.: O-ethylS-[2-diisopropylamino)ethyl]methyl-phosphonothioates. *Patent GB*, 1,346.409., 1974.

[2] WADE N.: Going public with VX formula – a recipe for trouble?. In *Science*, vol. 187, no. 414, 1975.

[3] BECKAJA I. P.; NOVIKOV, C. C.: Chimičeskoje oružie rosii. In *Věstn. Ros. Akad. Nauk.*, no. 2, pp. 99–104, 1995.

[4] SOMANI S. M.: *Chemical warfare Agents*, UK: Academic Press, 1992. ISBN 0-12-654620-7

[5] ELLMAN G. L.: Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Bioph.*, vol. 82, no. 1, pp. 70-77, 1959.

© National Institute for NBC Protection, Kamenná, Czech Republic

<http://hazmat-protect.sujchbo.cz>

ISBN 978-80-270-4852-6

- [6] ELLMAN G. L.; COURTNEY K. D.; ANDRES V. jr.; FEATHERSTONE R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. In *Biochem. Pharm.*, vol. 7, pp. 88 – 95, 1961.
- [7] HALÁMEK E.; KOBLIHA Z.; PITSCHMANN V.: *Organophosphorus warfare agents*. CZ, Brno: University of Defence, NBC Defence Institute. In *Analysis of Chemical Warfare agents*, pp. 57-63, 2007.
- [8] ŽDÁROVÁ KARASOVÁ J.; KUČA K.; JUN D.; BAJGAR J.: Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholin-esteras při in vivo hodnocení účinku reaktivátorů. *Chem. Listy*, vol. 104, pp 46-50, 2010.
- [9] TUŠAROVÁ I.; HALÁMEK, E.: Biosenzor pro detekci a rozlišení inhibitorů cholinesteráz, způsob přípravy zóny biosenzoru s imobilizovanou cholinesterázou, způsob detekce cholinesteráz a způsob rozlišení inhibitorů esteráz. *Patent CZ 288576*, 2001.
- [10] NACHMANSOHN D.: Action of Ions on Choline Esterase. Londýn: *Nature*, vol. 145, no. 3674, pp. 513 – 514, 1940.
- [11] HUGHES R. J.; BENNET J.: Effects of metal ions on the activity of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). In *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 13, pp. 219 – 220, 1985.
- [12] HOFER P.; FRINGELI U. P.; HOPFF W. H.: Activation of Acetylcholinesterase by Monovalent (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) and Divalent (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) Cations. In *Biochem.*, vol. 23, pp. 2730-2734, 1984.
- [13] TOMLINSON G.; MUTUS B.; MCLENNAN I.: Activation and inactivation of acetylcholinesterase by metal ions. In *Can. J. Biochem.*, vol. 59, pp. 728-735, 1981.