

VLIV BIOGENNÍCH IONTŮ NA FORMOVÁNÍ ENZYM-INHIBITOROVÉHO KOMPLEXU U CHOLINESTERÁZ

THE IMPACT OF IONS ON CREATION OF THE CHOLINESTERASE'S ENZYME-INHIBITOR COMPLEX

Jiří Žeravík^a, Monika Hoskovcová^{a*}

^a Univerzita obrany, Brno, Ústav ochrany proti zbraním hromadného ničení, Víta Nejedlého, 682 01, Vyškov, Česká republika

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

Abstrakt

Příspěvek pojednává o působení různých typů nervově paralytických látek na acetylcholinesterázu v přítomnosti mono a bivalentních kationtů makrobiogenních prvků. Pro monitorování aktivity enzymu po inkubaci směsi NPL a určených iontů bylo využito Ellmanovy biochemické metody. Součástí experimentů bylo srovnání výsledků získaných pomocí dvou rozdílných semikvantitativních metod. Aktivita enzymu byla měřena pomocí biosenzoru Detehit a optimalizované metody pro multidetekční zařízení (Synergy H1M, BioTek).

Klíčová slova: *acetylcholinesteráza, biochemická metoda, Ellmanova metoda, nervově paralytické látky, alkalické kovy, kovy alkalických zemin*

Abstract

The effects of different types of nerve agents on acetylcholinesterase in the presence of mono- and bivalent cations of biogenic elements were described and discussed. Ellman's biochemical method was utilized for monitoring an enzyme activity after incubation of a mixture of nerve agent and selected ion. Two different semi-quantitative methods was used as a comparison for the obtained results. The enzyme activity was measured using a Detehit biosensor and an optimized method for a modular multimode reader (Synergy H1M, BioTek).

Key words: *acetylcholinesterase, biochemical method, Ellman's method, nerve agents, alkali metals, alkaline earth metals*

1. ÚVOD

Studiem vlivu iontů na aktivitu acetylcholinesterázy (AChE) se zabývá řada publikací [1-6], avšak pouze malá část je zaměřena na studium vlivu iontů kovů na aktivitu AChE ve spojitosti s působením ireversibilního inhibitoru [7]. Nachmansohn [1] jako první vyslovil názor, že v prostředí iontů alkalických kovů a kovů alkalických zemin je aktivita enzymu zvyšována. Popisuje zde vyšší účinnost u bivalentních iontů ve srovnání s monovalentními. Hughes a Bennet [2] naopak uvádí, že sodné ionty působí inhibičně, inaktivují AChE. Tyto jevy jsou připisovány iontové síle, konformačním změnám způsobeným obsazením periferních míst

enzymu kovovým iontem nebo přímo specifické vazbě na anionické místo aktivního centra enzymu, přičemž zastoupení jednotlivých příspěvků působících sil je různé, dané také valencí iontů. Další publikace se zaměřují na působení nejenom důležitých iontů makrobiogenních prvků (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} a Ca^{2+}) [5], ale také i na inhibiční působení těžkých kovů [5,6]. Pohanka [5] ve své studii prokázal inhibiční působení vápenatých iontů na rekombinantní lidskou AChE, zatímco ostatní makrobiogenní prvky nevykazovaly žádné inhibiční chování.

Použití iontů spolu s inhibitory AChE nebylo téměř nikde diskutováno. Byla pouze provedena studie vlivu iontů na AChE inhibovanou látkami VX a R-33 s použitím biosenzoru Detehit. Použití dvoumocných iontů kovů alkalických zemin nevedlo ke snížení účinku silných inhibitorů AChE i přes to, že je prezentován jejich aktivační účinek. Inhibiční účinek Mg^{2+} a Ca^{2+} iontů byl naopak zvýšen. Bylo konstatováno, že tyto ionty ovlivňují funkci enzymu nejen pro zvýšení jeho reaktivity vůči substrátu, ale zároveň i kompetitivnímu inhibitoru. [7]

Tato práce se zaměřila na souběžné působení vybraných nervově paralytických látek typů G a iontů kovů makrobiogenních prvků na aktivitu AChE. Pro monitorování aktivity enzymu po inkubaci směsi NPL a vybraných iontů bylo využito klasické Ellmanovy metody [8]. Experimenty byly prováděny s využitím dvou rozdílných semikvantitativních metod. Aktivita enzymu byla měřena pomocí biosenzoru Detehit a optimalizované metody pro multidetekční zařízení Synergy H1M.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie

Nervově paralytické látky: sarin (GB) [isopropyl-methylfosfonofluoridát], soman (GD) [(3,3-dimethylbut-2-yl)-methylfosfonofluoridát], cyklosarin (GF) [cyklohexyl-methylfosfonofluoridát]. Čistota látek byla ověřena metodou GC-MS. Látky byly syntetizovány ve VVÚ, s. p. Brno. Zásobní roztoky byly připravovány v roztoku hexanu. Pro přípravu vzorků pro DETEHIT byla použita výchozí koncentrace inhibitoru $1 \cdot 10^{-3}$ mg / ml ve vodných roztocích iontů kovů.

Ionty kovů: chlorid sodný (Lachema n. p., Brno), chlorid draselný (Lach-Ner s.r.o., Neratovice), chlorid vápenatý, bezvodý (PENTA s.r.o., Praha), hexahydrát chloridu hořečnatého (Lach-Ner s.r.o., Neratovice).

Ostatní chemikálie: 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB), acetylthiocholin jodid (ATCh) (Merck KGaA, Darmstadt, Německo), kyselina trihydrogenboritá, dodekahydrát tetraboritanu sodného (PENTA s.r.o., Praha), acetylcholinesteráza (AChE) [EC 3.1.1.7] (ORITEST spol. s r.o., Praha).

2.2 Přístroje a pomůcky

Spektrofotometrický přístroj UltraScan XE od firmy HunterLab, Reston, Virginia, USA. Vyhodnocení dat bylo realizováno pomocí tabulkového procesoru Excel.

Multidetekční reader Synergy H1M s duálním reagenčním injektorem a příslušenstvím od firmy Biotek, Winoosky, Vermont, USA.

Poloautomatické pipety od firmy BRAND GMBH + CO. KG, Wertheim, Německo. Třepačka IKA MS 3 basic, Model MS 3 B S000, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo. Ultrazvuková

lázeň Sonorex, Typ DT 103H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Německo. Stolní pH metr HI2221 od firmy Hanna Instruments Czech s.r.o., Praha.

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 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzooovou kyselinou (CAS 69-78-3) od stejného dodavatele.

Mikrotitrační desky, Greiner 96 jamek, 1 x 8 strip od firmy Merck KGaK, Darmstadt, Německo.

2.3 Pracovní postup

Pro zjištění aktivity AChE po expozici NPL byl použit klasický postup využívající Ellmanovu kolorimetrickou metodu. Míra aktivity enzymu je odvozena od koncentrace reakčních produktů hydrolýzy. Vliv inhibitoru a mono a bivalentních iontů na enzym byl zjišťován pomocí dvou odlišných prostředků. Jeden ze způsobů je založen na Detektoru NPL Detehitu s imobilizovanou AChE s následnou detekcí vzniklých produktů na spektrofotometru UltraScan XE, druhý na UV-VIS detekci na multidetekčním readeru Synergy H1M. Detekce produktů esterázové reakce na biosenzoru Detehit byla prováděna měřením remise povrchu textilie ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra.

Stanovení aktivity enzymu imobilizovaném na biosenzoru Detehit

Pro stanovení aktivity enzymu byl přířez detekční tkaniny biosenzoru s imobilizovanou AChE o velikosti 2 cm² ponořen do destilované vody na dobu dvou minut. Poté byl na tuto tkaninu, na dobu jedné minuty, přitisknut indikační papír obsahující substrát a chromogenní činidlo. Na spektrofotometru UltraScan XE byla detekována změna zabarvení povrchu tkaniny v čase při vlnové délce 430 nm. Toto měření bylo opakováno sedmkrát.

Rychlost průběhu reakce slepého pokusu byla považována jako 100% aktivita AChE a byla následně používána k vyhodnocení vlivu iontů kovů. Měření bylo opakováno sedmkrát.

Stanovení vlivu iontů na aktivitu imobilizovaného enzymu na biosenzoru Detehit

Měření bylo realizováno s vodnými roztoky chloridů makrobiogenních iontů kovů Na⁺, K⁺, Mg²⁺ a Ca²⁺. Využity byly čtyři koncentrace pro každý iont, a to 1, 5, 10 a 20 mmol/l. Vybrané koncentrace představují jejich přibližné fyziologické hodnoty. Nejvyšší koncentrace mírně převyšuje fyziologické hodnoty pro K⁺, Mg²⁺ a Ca²⁺ ionty.

Pro stanovení aktivity enzymu v přítomnosti iontů byl aplikován stejný postup jako pro stanovení aktivity enzymu na biosenzoru Detehit, ale detekční tkanina byla ponořena do vodného roztoku příslušného iontu o dané koncentraci na 10 minut. Každé měření bylo opakováno sedmkrát. Koncentrace NPL, při které byl zjišťován vliv iontů, byla stanovena na hodnotu detekčního limitu pro daný inhibitor.

Určení LOD pro enzym-inhibitorový komplex s a bez přídavku iontů na biosenzoru Detehit

Pro stanovení limitu detekce (LOD) enzym - inhibitorového komplexu AChE-NPL látek typu „G“ byla detekční tkanina ponořena do vodného roztoku inhibitoru na dobu dvou minut. Následně byla tkanina propláchnuta destilovanou vodou, čímž byl eliminován přebytek inhibitoru. Na dobu 1 minuty byl na tkaninu přitisknut indikační papír. Koncentrace inhibitoru byly voleny v rozsahu několika řádů. Vyhodnocení reakce vzniklého thiocholinu s Ellmanovým činidlem, které se v případě stále ještě aktivního enzymu projeví vznikem žlutého zabarvení, v opačném

případě zůstává textilie bílá, bylo prováděno vizuálně pod přirozeným denním světlem. Výsledky byly pozorovány ve 30. sekundě a v 1. minutě od odstranění indikačního papíru. Celý proces byl opakován minimálně sedmkrát pro každý inhibitor. Měření při takto zjištěné koncentraci bylo následně prováděno na spektrofotometru UltraScan XE při vlnové délce 430 nm. Při této hodnotě jsou rozdíly v naměřených absolutních jednotkách odpovídajících emisí povrchu největší. Měření bylo zahájeno ve 20. sekundě po sejmutí indikačního papíru a bylo opakováno sedmkrát. Lineární průběh reakce byl zaznamenán v rozmezí 20 - 50 sekund.

Stejným způsobem, který je popsán výše, byl zjišťován také LOD v případě přítomnosti vybraných iontů a hodnocen jejich vliv na enzym - inhibitorový komplex. Byly použity koncentrace iontů 1, 5, 10 a 20 mmol / l. Doba působení iontu byla 10 minut.

Stanovení aktivity enzymu pomocí Synergy H1M

Funkčnost AChE byla ověřována před každou sadou experimentálních měření pomocí stanovení aktivity enzymu. Do mikrotitrační destičky byl dávkován enzym ze zásobního roztoku 1 mg / ml, v ředící řadě 25x, 50x, 100x a 200x. Následně byla pomocí injektoru do mikrotitrační destičky nadávkována reagenční směs obsahující DTNB a ATCh v borátovém pufru pH 8,5, přičemž po protřepání vzorku proběhlo měření aktivity enzymu v jednotlivých jamkách. Základem bylo měření změny absorbance v časovém intervalu 2 minut. Získaná data byla poté extrapolována pomocí lineární regrese, přičemž hodnota směrnice přímky odpovídala rychlosti enzymatické reakce ($\Delta A_{420} / \text{min}$). Pro následná měření bylo vždy vybráno takové ředění enzymu, kdy vypočtená hodnota rychlosti enzymové reakce spadala do intervalu 150 – 300 $\Delta A_{420} / \text{min}$.

Měření aktivity enzymu po inkubaci s inhibitorem a vybraným iontem

Měření aktivity enzymu bylo prováděno na dělených mikrotitračních destičkách, přičemž byl na mikrotitrační destičku nejprve nanesen inhibitor rozpuštěný v hexanu v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-9}$, $1 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$ mg / ml. Následně byl pomocí duálního reagenčního injektoru do jamek mikrotitrační destičky nadávkován roztok obsahující odpovídající množství AChE a vybranou koncentraci příslušného iontu kovu (0, 1, 5, 10, 20 mmol / l). Poté proběhla 10 minutová inkubace, po které následovalo nadávkování odpovídajícího množství směsi reagentů DTNB a ATCh rozpuštěných v borátovém pufru pH 8,5. Aktivita enzymu byla měřena při vlnové délce 420 nm v časovém intervalu 2 minut. Výsledky byly zpracovány ovládacím softwarem Genesis 5.0 (BioTek, USA). Pro srovnávací měření posloužil vzorek obsahující hexan, roztok enzymu s odpovídající koncentrací vybraného iontu. Obsah hexanu ve vzorcích byl 10% obj. Všechna měření byla prováděna v tetraplikátech.

Vyhodnocení naměřených dat

Vzniklá kalibrační závislost rychlosti reakce vztažená k \log_{10} koncentrace inhibitoru byla extrapolována pomocí nelineární regrese podle rovnice $Y = [(A1 - A2) / (1 + (X / IC50)^p)] + A2$, kde hodnoty A1 a A2 odpovídají horní a dolní asymptotě, hodnota IC50 představuje koncentraci inhibitoru, při které dochází k 50% poklesu aktivity enzymu. Hodnota p představuje směrnici přímky v inflexním bodě (odpovídá hodnotě IC50). Pro další vyhodnocení naměřených dat byla výše zmíněná rovnice použita k výpočtu hodnoty IC20, která v rámci tohoto typu měření je často spojována s definicí limitu detekce. V tomto případě byly hodnoty IC20 použity ke srovnání měření prováděných Detehitem (stanovení LOD).

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Interakce NPL s cholinesterázami lze zařadit mezi skupinové reakce. Bližší selekce těchto látek je spojována s využitím reaktivátorů, popřípadě námi studovaných iontu alkalických kovů a kovů alkalických zemin, přičemž podstatou těchto postupů je přidavek těchto látek až po inkubaci cholinesteráz s příslušným inhibitorem. [9] Tímto způsobem lze rozlišit látky typu G a V. [10] Dalším, zde prezentovaným, způsobem je možnost využít souběžného působení vybrané látky a inhibitoru na aktivitu enzymu. Ke studiu této vzájemné interakce byly zvoleny dva přístupy. Nejprve bylo využito biosenzoru s imobilizovanou AChE (Detehit), následně dané reakce byly studovány v homogenním prostředí.

Studium tvorby komplexu inhibitor-cholinesteráza v přítomnosti vybraných iontů pomocí biosenzoru Detehit

Jako srovnávací hodnota pro danou sérii měření byla zvolena hodnota LOD. Hodnota LOD byla zjišťována u AChE exponované jednotlivým inhibitorům a dané koncentraci iontu. Současně byla také sledována míra aktivity daného enzymu při takto stanovené koncentraci Inhibitoru (LOD) v porovnání s maximální odezvou biosenzoru.

V rámci jednotlivých měření byly stanoveny LOD pro inhibici AChE látkami GB, GD a GF pro desetiminutovou expozici. Nejvyšší inhibici vykazala látka GF s hodnotou LOD $9 \cdot 10^{-7}$ mg / ml. Rozdíl v inhibici nebyl, vzhledem k látce GD ($2 \cdot 10^{-6}$ mg / ml), příliš významný, ale rozdílný o dva řády ve srovnání s GB ($1 \cdot 10^{-5}$ mg / ml). Díky látce GF klesla při dané koncentraci aktivita enzymu na 75 %, u GD na 80 % a u GB na 86 %. Při takto stanovených koncentracích byl studován vliv mono a bivalentních iontů.

Srovnáním LOD pro látku GB ve vodě a v přítomnosti iontů můžeme pozorovat významnější odlišnost u Ca^{2+} iontů, které se v daném rozsahu použitých koncentrací liší o jeden a půl řádu. Vykazují nejvyšší inhibiční účinek, což bylo potvrzeno také výsledným snížením aktivity AChE. Pro K^{+} byl tento posun zaznamenán pouze pro koncentraci 1 mmol / l. Působení ostatních iontů významněji neposunulo LOD pro AChE inhibovanou látkou GB. Výsledky jsou shrnuty v *Tabulce 1* a na *Obrázku 1*.

Inhibiční účinek na aktivitu AChE vykazaly ionty K^{+} a Ca^{2+} , přičemž u iontů Ca^{2+} bylo zaznamenáno značné snížení aktivity enzymu vůči slepému vzorku. Všechny ionty v koncentracích 1, 5 a 10 mmol / l potencují inhibiční účinek látky GB. Pouze u Mg^{2+} v koncentraci 20 mmol / l, kdy se neprojevil vliv inhibitoru, aktivita enzymu dosahovala původní hodnoty s ohledem na chybu měření.

Tabulka 1: Vliv iontů na imobilizovanou AChE za současné inhibice látkou GB.

c(M ⁺) [mmol / l]	Na ⁺		K ⁺	
	LOD·10 ⁻⁶ [mg / ml]	Aktivita [%]	LOD·10 ⁻⁶ [mg / ml]	Aktivita [%]
1	10,0	26 ± 5	7,0	58 ± 13
5	10,0	31 ± 3	10,0	49 ± 7
10	20,0	62 ± 10	10,0	36 ± 8
20	30,0	84 ± 6	10,0	39 ± 6
c(M ⁺) [mmol / l]	Mg ²⁺		Ca ²⁺	
	LOD·10 ⁻⁶ [mg / ml]	Aktivita [%]	LOD·10 ⁻⁶ [mg / ml]	Aktivita [%]
1	20,0	28 ± 6	6,0	69 ± 6
5	20,0	42 ± 5	6,0	62 ± 5
10	20,0	62 ± 10	6,0	38 ± 7
20	20,0	98 ± 5	6,0	3 ± 5

LOD pro Detehit inhibovaný látkou GD se při současném působení biogenních iontů mírně liší oproti enzymu vystavenému pouze vodnému roztoku látky GD, která byla stanovena na $2 \cdot 10^{-6}$ mg / ml. K větší odchylce došlo pouze u koncentrace 20 mmol / l Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů, kde došlo ke snížení LOD o jeden řád. Byl zaznamenán synergický efekt při inhibici AChE.

Vliv iontů kovů na komplex AChE–GD vykazoval u všech iontů v nejnižší koncentraci aktivační účinek, který přesahoval původní aktivitu enzymu. Ionty Na^+ se zvyšující se iontovou silou prokázaly snížení inhibičního účinku látky GD a zvýšení aktivity až na téměř 120 % u koncentrace 20 mmol / l. Naopak u iontů K^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} se u této koncentrace projevil synergický účinek iontu a inhibitoru. Nejvyšší snížení aktivity AChE bylo zaznamenáno pro bivalentní ionty, tedy pravý opak toho, co bylo zjištěno pro Mg^{2+} . Výsledky jsou zaznamenány v *Tabulce 2* a na *Obrázku 2*.

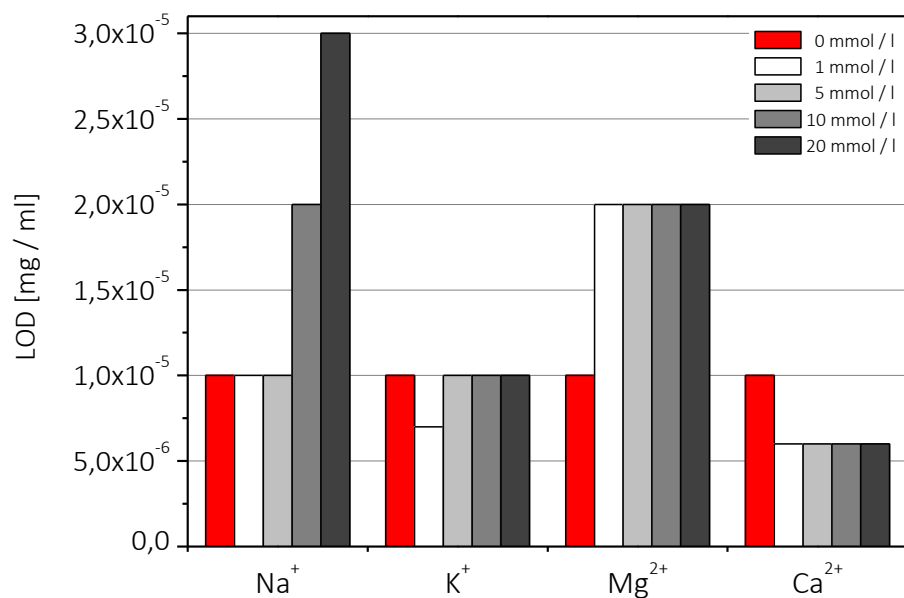
Tabulka 2: Vliv iontů na imobilizovanou AChE za současné inhibice látkou GD.

c(Me^+) [mmol / l]	Na^+		K^+	
	LOD· 10^{-6} [mg / ml]	Aktivita [%]	LOD· 10^{-6} [mg/ml]	Aktivita [%]
1	4,0	107 ± 9	4,0	114 ± 13
5	5,0	109 ± 7	5,0	89 ± 10
10	5,0	113 ± 7	3,0	70 ± 11
20	5,0	119 ± 11	3,0	49 ± 3
c(Me^+) [mmol / l]	Mg^{2+}		Ca^{2+}	
	LOD· 10^{-6} [mg / ml]	Aktivita [%]	LOD· 10^{-6} [mg/ml]	Aktivita [%]
1	2,0	103 ± 15	3,0	108 ± 9
5	3,0	79 ± 11	3,0	93 ± 9
10	6,0	55 ± 7	3,0	86 ± 9
20	3,0	35 ± 7	1,0	33 ± 6

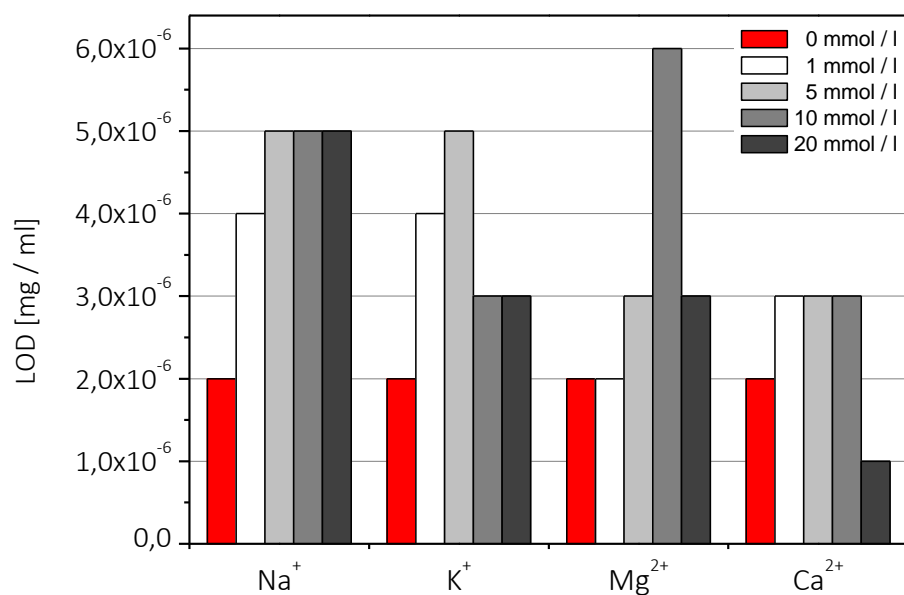
Změna LOD imobilizované AChE, vlivem vybraných iontů, se po inhibici látkou GF příliš neměnila, jak dokazuje *Tabulka 3* a *Obrázek 3*. Zjištěné hodnoty se pohybovaly v rámci jednoho řádu. Vliv biogenních iontů na aktivitu AChE inhibovanou látkou GF byl srovnatelný s látkou GB. Stejně jako u látky GB bylo u Mg^{2+} iontů prokázáno značné snížení inhibičního účinku látky GF a zvýšení aktivity enzymu. Tento nárůst byl ale markantnější, zvyšoval se se zvyšující se iontovou silou a při nejvyšší použité koncentraci iontu přesáhl hodnotu 160%. Ionty K^+ prokázaly ve spojení s látkou GF mírný synergický účinek. V přítomnosti iontů Ca^{2+} byl zaznamenán účinek provázený se zvýšením aktivity enzymu pouze u nejnižší použité koncentrace.

Tabulka 3: Vliv iontů na imobilizovanou AChE za současné inhibice látkou GF.

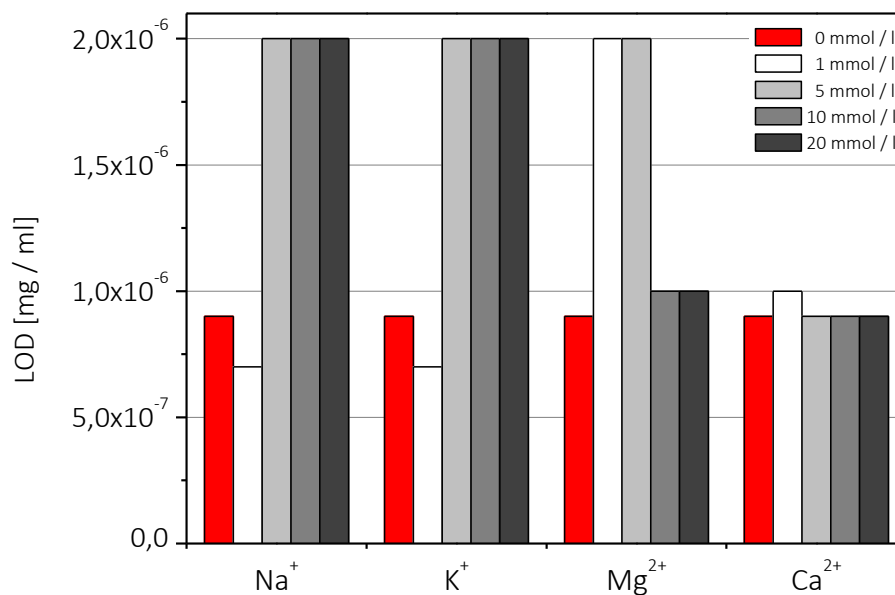
c(Me^+) [mmol/l]	Na^+		K^+	
	LOD· 10^{-6} [mg/ml]	Aktivita [%]	LOD· 10^{-6} [mg/ml]	Aktivita [%]
1	0,7	35 ± 6	0,7	94 ± 6
5	2,0	40 ± 5	2,0	95 ± 5
10	2,0	95 ± 10	2,0	80 ± 3
20	2,0	95 ± 6	2,0	68 ± 5
c(Me^+) [mmol/l]	Mg^{2+}		Ca^{2+}	
	LOD· 10^{-6} [mg/ml]	Aktivita [%]	LOD· 10^{-6} [mg/ml]	Aktivita [%]
1	2,0	117 ± 10	1,0	91 ± 12
5	2,0	137 ± 5	0,9	73 ± 3
10	1,0	162 ± 9	0,9	64 ± 8
20	1,0	154 ± 5	0,9	75 ± 7



Obrázek 1: Srovnání LOD pro enzym inhibovaný látkou GB a současném působení iontů.



Obrázek 2: Srovnání LOD pro enzym inhibovaný látkou GD a současném působení iontů.



Obrázek 3: Srovnání LOD pro enzym inhibovaný látkou GF a současném působení iontů.

Studium tvorby komplexu inhibitor-cholinesteráza v přítomnosti vybraných iontů v homogenním systému

Využití multidetekčního zařízení pro studium interakcí inhibitoru s enzymem v roztoku nám umožňuje provedení několika násobně většího množství měření vzorků ve stejném časovém úseku v porovnání s jedním měřením provedeným použitým biosenzorem. Tato skutečnost se odráží i ve způsobu vyhodnocení získaných dat. Konstruované kalibrační křivky mají větší výpovědní hodnotu o chování inhibitoru v přítomnosti vybraných iontů. Hlavním hodnotícím parametrem je hodnota IC₅₀, jejíž změna v rámci různých koncentrací iontů nám vypovídá o celkovém tendenčním chování daného systému. Ze získaných extrapolovaných dat lze také vypočítat hodnotu IC₂₀, která koresponduje s LOD výše zmiňovaného biosenzoru Detehit (viz Tabulka 4, 5 a 6).

Hodnoty IC₅₀ pro jednotlivé inhibitory, se kterými byla získaná data srovnávána, závisela na aktuální přípravě standardu a jeho následném zpracování. Z tohoto důvodu nebyla brána jako výchozí hodnota IC₅₀ průměrná hodnota těchto měření, ale vždy hodnota, která aktuálně souvisela s danou sérií měření. V případě látky GB se hodnoty IC₅₀ pohybovaly v rozsahu 1,8 - 2,2 · 10⁻⁶ mg / ml (Tabulka 4). Pro látku GD byly naměřeny hodnoty IC₅₀ v rozsahu 1,0 - 5,5 · 10⁻⁵ mg / ml (Tabulka 5). Hodnoty IC₅₀ pro látku GF byly v rozsahu 2,2 – 8,3 · 10⁻⁷ mg / ml (Tabulka 6).

Působení jednotlivých iontů na tvorbu AChE-GB komplexu je zachyceno v Tabulce 4 a na Obrázku 4. Z výsledků je patrné, že v případě působení monovalentních iontů na enzym-inhibitorový komplex, narůstající koncentrace vedla u Na⁺ iontů k synergickému působení, což se projevilo poklesem hodnoty IC₅₀ v nejvyšší koncentraci daného iontu o 30%. Zatímco K⁺ ionty prokázali jistou míru antagonistického chování vůči tvorbě AChE-GB komplexu, zde hodnota IC₅₀ vzrostla o 37% oproti srovnávací hodnotě. V případě působení bivalentních iontů je zde patrný synergický efekt, který se projevuje již při koncentraci 1 mmol/l.

Nejvýraznější pokles je patrný u Mg^{2+} iontů, kde při nejvyšší koncentraci hodnota IC50 poklesla o 85%. U Ca^{2+} iontů byl zaznamenán pokles hodnoty IC50 o 70% při nejvyšší koncentraci.

Tabulka 4: Vliv vybraných iontů na tvorbu AChE-GB komplexu v homogenním systému.

c(Me ⁺) [mmol / l]	Na ⁺			K ⁺		
	IC50·10 ⁻⁶ [mg / ml]	*IC50 / IC50 ₀ ·100 [%]	**IC20·10 ⁻⁶ [mg / ml]	IC50·10 ⁻⁶ [mg / ml]	*IC50 / IC50 ₀ ·100 [%]	**IC20·10 ⁻⁶ [mg / ml]
0	1,81 ± 0,08	100 ± 5	0,57	1,45 ± 0,05	100 ± 3	0,45
1	1,86 ± 0,07	103 ± 4	0,58	1,60 ± 0,04	111 ± 3	0,52
5	1,82 ± 0,09	101 ± 5	0,57	1,70 ± 0,10	117 ± 7	0,52
10	1,57 ± 0,08	87 ± 4	0,49	1,65 ± 0,15	114 ± 10	0,54
20	1,28 ± 0,01	71 ± 1	0,31	1,98 ± 0,12	137 ± 8	0,60
c(Me ⁺) [mmol / l]	Mg ²⁺			Ca ²⁺		
	IC50·10 ⁻⁶ [mg / ml]	*IC50 / IC50 ₀ ·100 [%]	**IC20·10 ⁻⁶ [mg / ml]	IC50·10 ⁻⁶ [mg / ml]	*IC50 / IC50 ₀ ·100 [%]	**IC20·10 ⁻⁶ [mg / ml]
0	2,22 ± 0,22	100 ± 10	0,73	1,78 ± 0,16	100 ± 9	0,64
1	0,73 ± 0,09	33 ± 4	0,24	0,79 ± 0,05	45 ± 3	0,29
5	0,45 ± 0,03	20 ± 1	0,12	0,57 ± 0,04	32 ± 2	0,16
10	0,38 ± 0,01	17 ± 1	0,11	0,60 ± 0,02	33 ± 1	0,17
20	0,34 ± 0,01	15 ± 1	0,09	0,55 ± 0,03	31 ± 2	0,15

*Poměrové vyjádření hodnoty IC50 jednotlivých měření vztahené k hodnotě IC50 stanovené pro inhibitor bez přítomnosti iontů (0 mmol / l).

**Hodnoty IC20 pro jednotlivé koncentrace byly vypočteny z parametru získaných extrapolací experimentálně naměřených dat z příslušné kalibrační závislosti.

Z výsledků prezentovaných v *Tabulce 5* a na *Obrázku 5* je patrné, že tvorba komplexu AChE-GD v přítomnosti vybraných iontů je spojena se synergickým efektem. V případě monovalentních iontů se jedná o pokles o 51% u Na⁺ a 53% u K⁺ iontů. Obdobný pokles, o 60%, byl zaznamenán také v případě nejvyšší koncentrace Mg²⁺ iontů. Ca²⁺ ionty v celkovém zhodnocení zaznamenaly u nejvyšší koncentrace pokles hodnoty IC50 o 50%, ale zajímavý je průběh zaznamenaného chování. Maximální synergický efekt je zde pozorován při koncentraci 5 mmol / l. Při této koncentraci hodnota IC50 poklesla o 81%. Při vyšších koncentracích již dochází k opětovnému snížení rozdílu v hodnotách IC50.

Obdobných výsledků bylo také dosaženo v případě studia vlivu vybraných iontů na tvorbu AChE-GF komplexu (viz *Tabulka 6* a *Obrázek 6*). Přítomnost monovalentních iontů snížila hodnotu IC50 při nevyšší koncentraci o 54% u Na⁺ a o 62% u K⁺. Mg²⁺ ionty napomohly v rámci synergického působení k poklesu hodnoty IC50 o 80%. U Ca²⁺ iontů byl pozorováno obdobné chování, jako v případě měření s GD. Při maximální koncentraci hodnota IC50 poklesla o 38%, ale opětovně při koncentraci 5 mmol / l byl zaznamenán pokles hodnoty IC50 o 60%.

Tabulka 5: Vliv vybraných iontů na tvorbu AChE-GD komplexu v homogenním systému.

c(Me ⁺) [mmol / l]	Na ⁺			K ⁺		
	IC50·10 ⁻⁶ [mg / ml]	*IC50 / IC50 ₀ ·100 [%]	**IC20·10 ⁻⁶ [mg / ml]	IC50·10 ⁻⁶ [mg / ml]	*IC50 / IC50 ₀ ·100 [%]	**IC20·10 ⁻⁶ [mg / ml]
0	14,3 ± 1,3	100 ± 9	4,1	13,1 ± 0,4	100 ± 3	3,9
1	12,3 ± 0,5	86 ± 4	3,7	12,3 ± 0,9	94 ± 7	3,3
5	9,7 ± 0,4	68 ± 3	2,7	10,0 ± 0,1	76 ± 3	2,8
10	8,6 ± 0,5	60 ± 4	2,3	8,7 ± 0,3	66 ± 2	2,4
20	7,0 ± 0,4	49 ± 3	1,9	6,2 ± 0,2	47 ± 1	1,8
c(Me ⁺) [mmol / l]	Mg ²⁺			Ca ²⁺		
	IC50·10 ⁻⁶ [mg / ml]	*IC50 / IC50 ₀ ·100 [%]	**IC20·10 ⁻⁶ [mg / ml]	IC50·10 ⁻⁶ [mg / ml]	*IC50 / IC50 ₀ ·100 [%]	**IC20·10 ⁻⁶ [mg / ml]
0	9,5 ± 0,4	100 ± 4	2,4	54,9 ± 3,0	100 ± 9	15,8
1	4,3 ± 0,2	46 ± 2	1,3	18,6 ± 7,2	34 ± 13	5,8
5	4,2 ± 0,2	44 ± 2	1,2	10,7 ± 1,1	19 ± 2	3,2
10	3,8 ± 0,1	40 ± 1	1,0	13,2 ± 0,6	24 ± 1	4,0
20	2,0 ± 0,5	21 ± 5	0,3	27,1 ± 0,2	49 ± 3	14,8

*Poměrové vyjádření hodnoty IC50 jednotlivých měření vztažené k hodnotě IC50 stanovené pro inhibitor bez přítomnosti iontů (0 mmol/l).

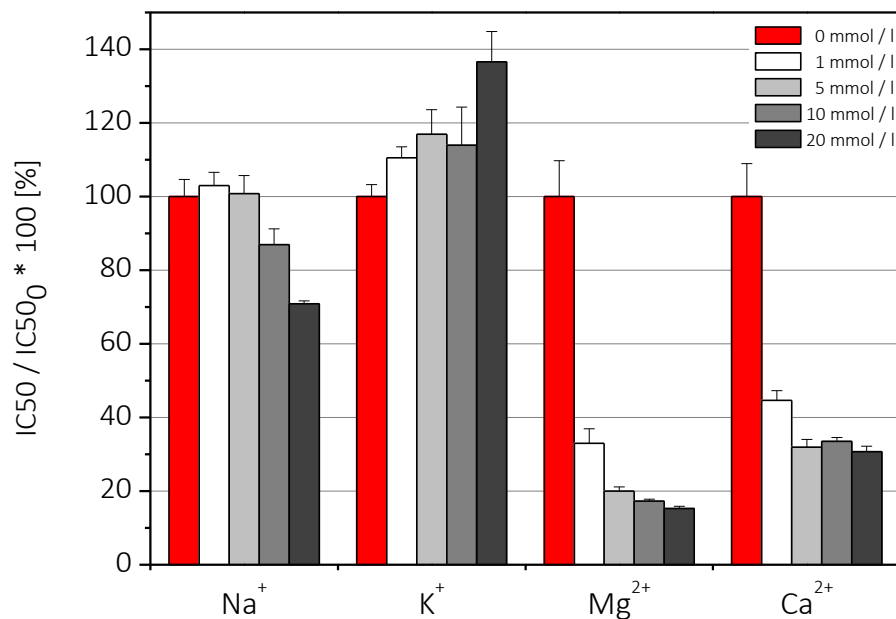
**Hodnoty IC20 pro jednotlivé koncentrace byly vypočteny z parametru získaných extrapolací experimentálně naměřených dat z příslušné kalibračních závislosti.

Tabulka 6: Vliv vybraných iontů na tvorbu AChE-GF komplexu v homogenním systému.

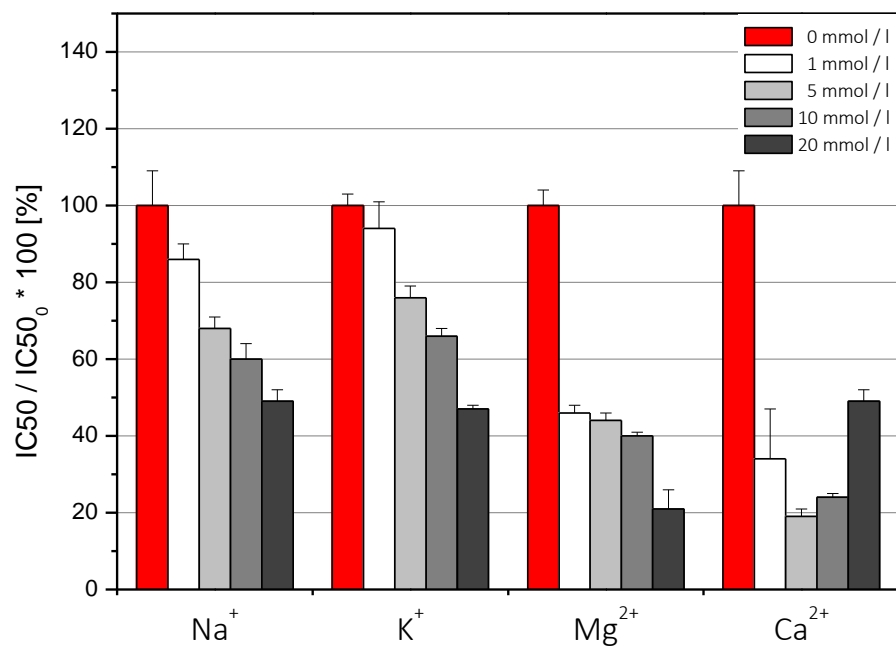
c(Me ⁺) [mmol / l]	Na ⁺			K ⁺		
	IC50·10 ⁻⁶ [mg / ml]	*IC50/IC50 ₀ ·100 [%]	**IC20·10 ⁻⁶ [mg / ml]	IC50·10 ⁻⁶ [mg / ml]	*IC50/IC50 ₀ ·100 [%]	**IC20·10 ⁻⁶ [mg / ml]
0	0,51 ± 0,03	100 ± 6	0,15	0,65 ± 0,07	100 ± 10	0,25
1	0,43 ± 0,01	84 ± 3	0,13	0,50 ± 0,03	76 ± 4	0,16
5	0,36 ± 0,01	72 ± 1	0,11	0,41 ± 0,03	63 ± 5	0,12
10	0,23 ± 0,01	46 ± 2	0,07	0,36 ± 0,02	56 ± 2	0,11
20	0,23 ± 0,01	46 ± 2	0,07	0,25 ± 0,01	38 ± 1	0,08
c(Me ⁺) [mmol/l]	Mg ²⁺			Ca ²⁺		
	IC50·10 ⁻⁶ [mg / ml]	*IC50/IC50 ₀ ·100 [%]	**IC20·10 ⁻⁶ [mg / ml]	IC50·10 ⁻⁶ [mg / ml]	*IC50/IC50 ₀ ·100 [%]	**IC20·10 ⁻⁶ [mg / ml]
0	0,83 ± 0,05	100 ± 6	0,35	0,22 ± 0,01	100 ± 5	0,07
1	0,36 ± 0,02	44 ± 3	0,10	0,20 ± 0,04	89 ± 2	0,06
5	0,178 ± 0,003	21,4 ± 0,4	0,06	0,090 ± 0,005	40 ± 2	0,03
10	0,198 ± 0,006	23,8 ± 0,7	0,06	0,116 ± 0,006	52 ± 3	0,04
20	0,17 ± 0,01	20 ± 1	0,05	0,138 ± 0,006	62 ± 3	0,05

*Poměrové vyjádření hodnoty IC50 jednotlivých měření vztažené k hodnotě IC50 stanovené pro inhibitor bez přítomnosti iontů (0 mmol / l).

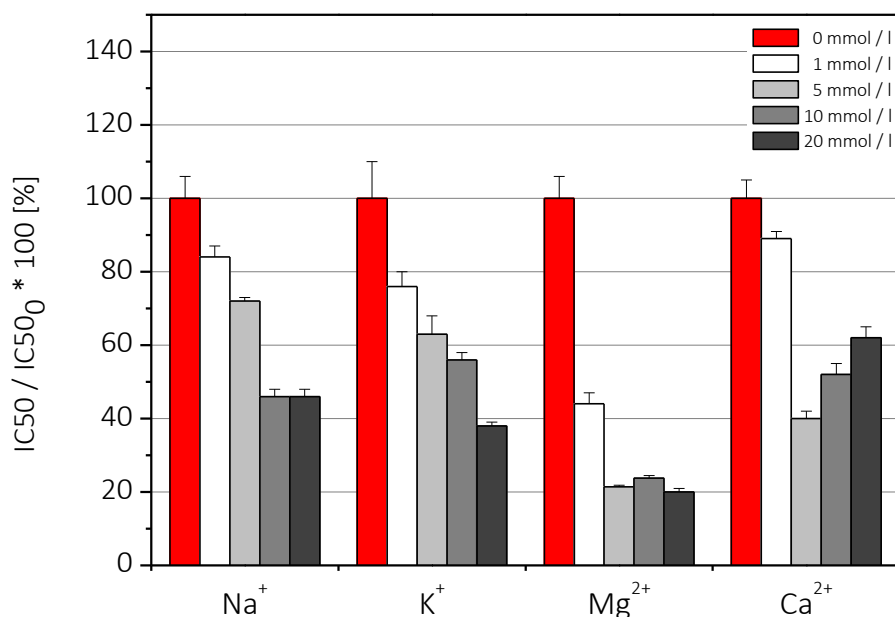
**Hodnoty IC20 pro jednotlivé koncentrace byly vypočteny z parametru získaných extrapolací experimentálně naměřených dat z příslušné kalibračních závislosti.



Obrázek 4: Srovnání relativních hodnot IC50 získaných pro enzym inhibovaný látkou GB za současného působení iontů.



Obrázek 5: Srovnání relativních hodnot IC50 získaných pro enzym inhibovaný látkou GD za současného působení iontů.



Obrázek 6: Srovnání relativních hodnot IC_{50} získaných pro enzym inhibovaný látkou GF za současného působení iontů.

Z pohledu působení jednotlivých iontů na látky typu G při formování enzym-inhibitorového komplexu vyplývá, že Na^+ a Mg^{2+} ionty ve všech případech vykazaly synergický efekt, který se projevil poklesem hodnoty IC_{50} . V případě K^+ iontů byl pozorován antagonistický efekt na tvorbu AChE-GB komplexu, u zbývajících inhibitorů se již projevilo synergické působení iontu. Velmi zajímavé chování bylo pozorováno u Ca^{2+} iontů. Při nízkých koncentracích se projevil dominantně synergický efekt na enzym-inhibitorový komplex, ale v kombinaci s GD a GF při zvýšení koncentrace iontu byl pozorován nárůst hodnoty IC_{50} , což poukazuje na zmírnění synergického efektu iontu na AChE-GD popř. AChE-GF komplex.

4. ZÁVĚR

Srovnávané systémy vykazovaly odlišné chování jednotlivých NPL při interakci s AChE v přítomnosti různých koncentrací vybraných iontů. Z pohledu trendů nelze u biosenzoru Detehit hovořit o jednoznačném synergickém nebo antagonistickém působení daných iontů při tvorbě komplexu AChE-inhibitor. Zatímco v rámci měření v homogenním systému byl zde patrný synergický efekt především u bivalentních iontů Mg^{2+} a Ca^{2+} , zatímco monovalentní Na^+ a K^+ ionty vykazují synergické chování při tvorbě AChE-GD a AChE-GF komplexů. Antagonistické působení bylo zaznamenáno pouze při formování AChE-GB komplexu v přítomnosti K^+ iontu. Podobné antagonistické chování u biosenzoru bylo zaznamenáno při tvorbě AChE-GD komplexu v přítomnosti Mg^{2+} iontů, což je zcela v rozporu s daty získanými v homogenním systému. Při srovnání hodnot LOD biosenzoru a hodnot IC_{20} vypočtených pro homogenní systém

a uvedených v *Tabulkách 4 6*, lze vyvodit obdobné závěry. Imobilizovaná AChE nevykazuje tendenční chování, zatímco hodnoty IC20 poukazují na vyšší citlivost vůči NPL v přítomnosti GD a GF, pouze u GB v kombinaci s K⁺ ionty se jedná o zcela protichůdné chování.

Důvod rozdílných výsledků lze spatřovat částečně ve formě enzymu, který se k dané reakci využívá. Imobilizovaný enzym biosenzoru je do jisté míry omezen v možnosti tvorby konformačních změn díky pevným vazbám a ukotvení na matici. Samozřejmě na změny v chování enzymu mají také vliv látky vyskytující se v blízkém okolí enzymu, které mohou např. regulovat pH prostředí, tudíž i aktivitu enzymu, popř. změnu konformace. V případě homogenního systému nejsou změny konformace enzymu limitovány rigidními vazbami, přičemž enzym je dokonale přístupný jak inhibitoru, tak i iontu vybraného prvku.

Získané výsledky napovídají o jistých možnostech vylepšení citlivosti detekčních systémů, přičemž jak bylo zjištěno, negativní roli hraje pravděpodobně ukotvení enzymu na matici.

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] NACHMANSOHN D. Action of ions on choline esterase. *Nature*. 1940, **145**(3674), 513-514. ISSN 0028-0836.
- [2] HUGHES R. J. a BENNET J. Effects of metal ions on the activity of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). *Biochemical Society Transactions*. 1985, **13**(1), 219-220. ISSN 0300-5127.
- [3] HOFER P., FRINGELI U. P. a HOPFF W. H. Activation of acetylcholinesterase by monovalent (sodium and potassium) and divalent (calcium and magnesium) cations. *Biochemistry*. 1984, **23**(12), 2730-2734. ISSN 0006-2960.
- [4] TOMLINSON G., MUTUS B. a MCLENNAN I. Activation and inactivation of acetylcholinesterase by metal ions. *Canadian Journal of Biochemistry*. 1981, **59**(9), 728-735. ISSN 0008-4018.
- [5] POHANKA M. Copper, aluminum, iron and calcium inhibit human acetylcholinesterase in vitro. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014, **37**(1), 455-459. ISSN 13826689.
- [6] LOPES D. F. C., de ASSIS C. R. D., de SANT'ANNA M. C. S., da SILVA J. F., de SOUZA BEZERRA R. a FRÉDOU F. L. Brain acetylcholinesterase of three perciformes: From the characterization to the in vitro effect of metal ions and pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019, **173**, 494-503. ISSN 01476513.
- [7] HOSKOVCOVÁ M. Vliv iontů kovů na acetylcholinesterázu inhibovanou látkami série „V“. *HAZMAT PROTECT 2018*. Česká republika: SÚJCHBO, v.v.i, Kamenná, Česká republika, 2018, roč. 3, s. 79-86. ISBN 978-80-270-4852-6.
- [8] ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES V. a FEATHERSTONE R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961, **7**(2), 88-95. ISSN 00062952.
- [9] ČAPOUN T.: Laboratorní kontrola ve stacionárních laboratořích. In: PITSCHMANN, Vladimír. *Chemické zbraně a ochrana proti nim*. Praha: Manus, 2011, s. 64-87. ISBN 978-80-86571-09-6.
- [10] HOSKOVCOVÁ M., HALÁMEK E., KOBLIHA Z. a KASALOVÁ I. Proposal for selective differentiating of nerve agent G and V type with utilisation of modified Ellman's method. *Environmental Chemistry Letters*. 2009, **7**(3), 277-281. ISSN 1610-3653.