

VLIV IONTŮ BIVALENTNÍCH KOVŮ NA VAZBU OFOL-ACHE

Monika Hoskocová^{a*}, Jiří Žeravík^a, Dušan Trefilík^a

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

*Korespondující autor. e-mail: monika.hoskocova@unob.cz



Abstrakt

Interakce OFOL s AChE je v nativním prostředí výrazně ovlivňována přítomností iontů kovů makrobiogenních prvků. Tyto ionty mohou působit jako elektrofilní substituent interagující s fosforylovým kyslíkem, čímž prohlubují elektronový deficit na centrálním atomu fosforu NPL. V rámci pozorovaného chování při koncentracích vyšších, než je jejich fyziologická hladina, dochází k regeneraci aktivity enzymu. V nepřítomnosti NPL ve vyšších hladinách Mg^{2+} a Ca^{2+} dochází k prohloubení inhibičního účinku na AChE. Při vazbě NPL je u fyziologických koncentrací iontů synergický efekt. Ve vyšších koncentracích (20 mM) dochází náhle k antagonistickému efektu.

Klíčová slova: organofosforové sloučeniny, nervově paralytické látky, acetylcholinesteráza, bivalentní ionty, makrobiogenní prvky

Úvod

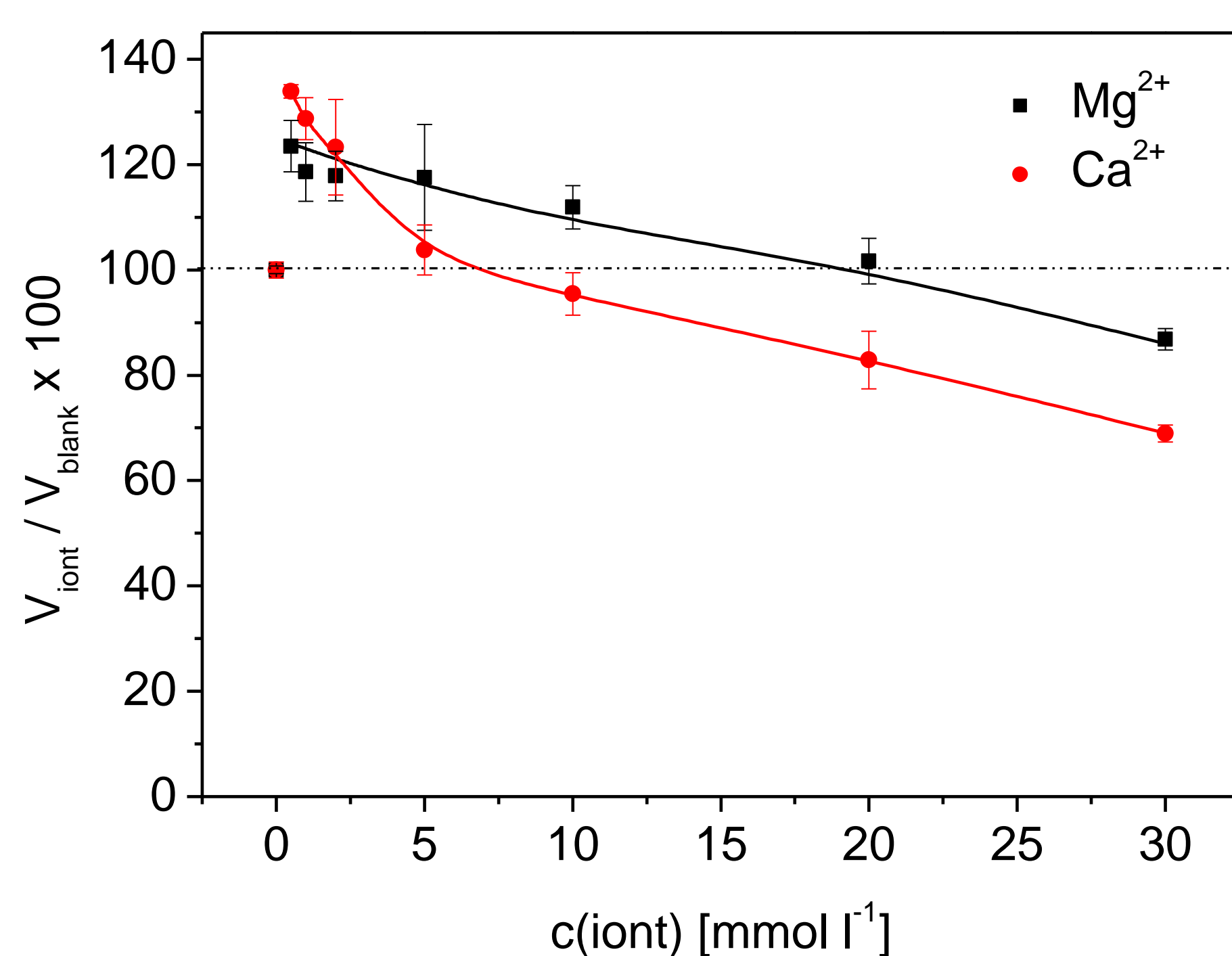
Acetylcholinesteráza (AChE) je enzym, který má významnou úlohu v ukončení impulzů nervového přenosu. Na cholinergních synapsích katalyzuje hydrolyzu neurotransmiteru acetylcholinu. Mnohé látky však jeho aktivitu potlačují, popř. zcela inhibují. Výzkum látek, které interferují s acetylcholinesterázou, je využíván v monitorování škodlivin v životním prostředí nebo potravinách. Jedná se o velmi citlivou bioanalytickou metodu, která umožňuje zjistit polutant i pod hygienickým limitem. Významné je užití pro detekci přítomnosti pesticidů nebo bojových chemických látek. Funkce tohoto enzymu je ovlivněna také přítomností iontů a mnohé z nich mají důležitou úlohu v jeho účinnosti. Mezi biologicky nejvýznamnější ionty v organismu patří Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} nebo Cl^- . Ve svých přesně daných směsích nebo individuálně kontrolují celý biologický systém.

Teoretický základ

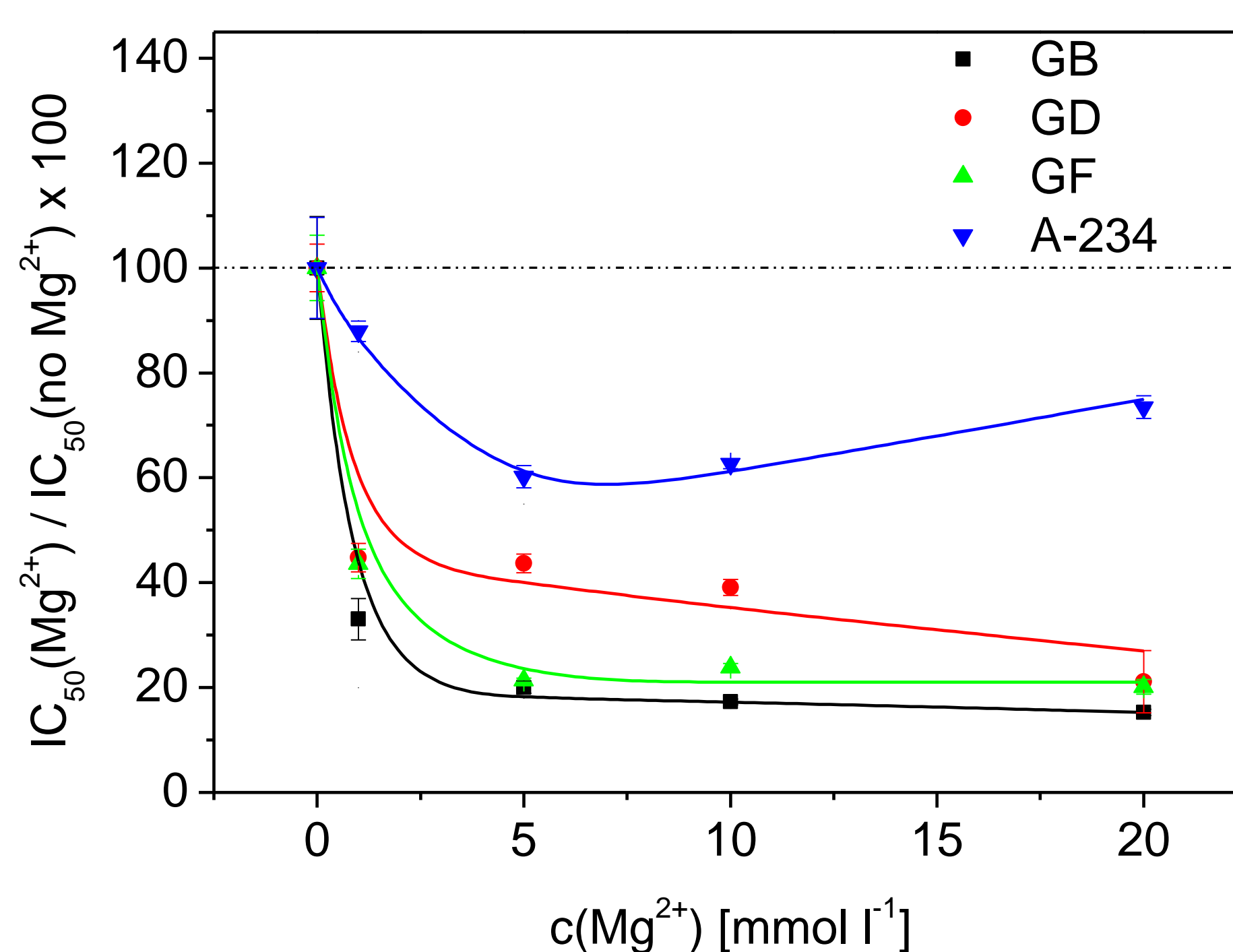
Bylo zjištěno, že ionty zvyšují nebo naopak inhibují aktivitu AChE. Tyto vlastnosti jsou připisovány iontové síle, konformačním změnám způsobeným obsazením periferních anionických míst enzymu nebo přímo specifické vazbě na anionické místo aktivního centra. Zastoupení jednotlivých příspěvků působících sil je různé, dané také valencí iontů. Předpokládá se, že kovové ionty mají významnou úlohu při katalyzování reakcí tím, že stabilizují aktivní konformace a reaktivní intermediáty nebo tranzitní stavy. Iniciují některé reakce transferem protonů. Ca^{2+} a Mg^{2+} jsou většinou uváděny jako aktivátory aktivity AChE. Ale v některých publikacích autoři prokázali inhibiční působení vápenatých iontů, např. na rekombinantní lidskou AChE, zatímco ostatní makrobiogenní prvky nevykazovaly žádné inhibiční chování.

Pracovní postup

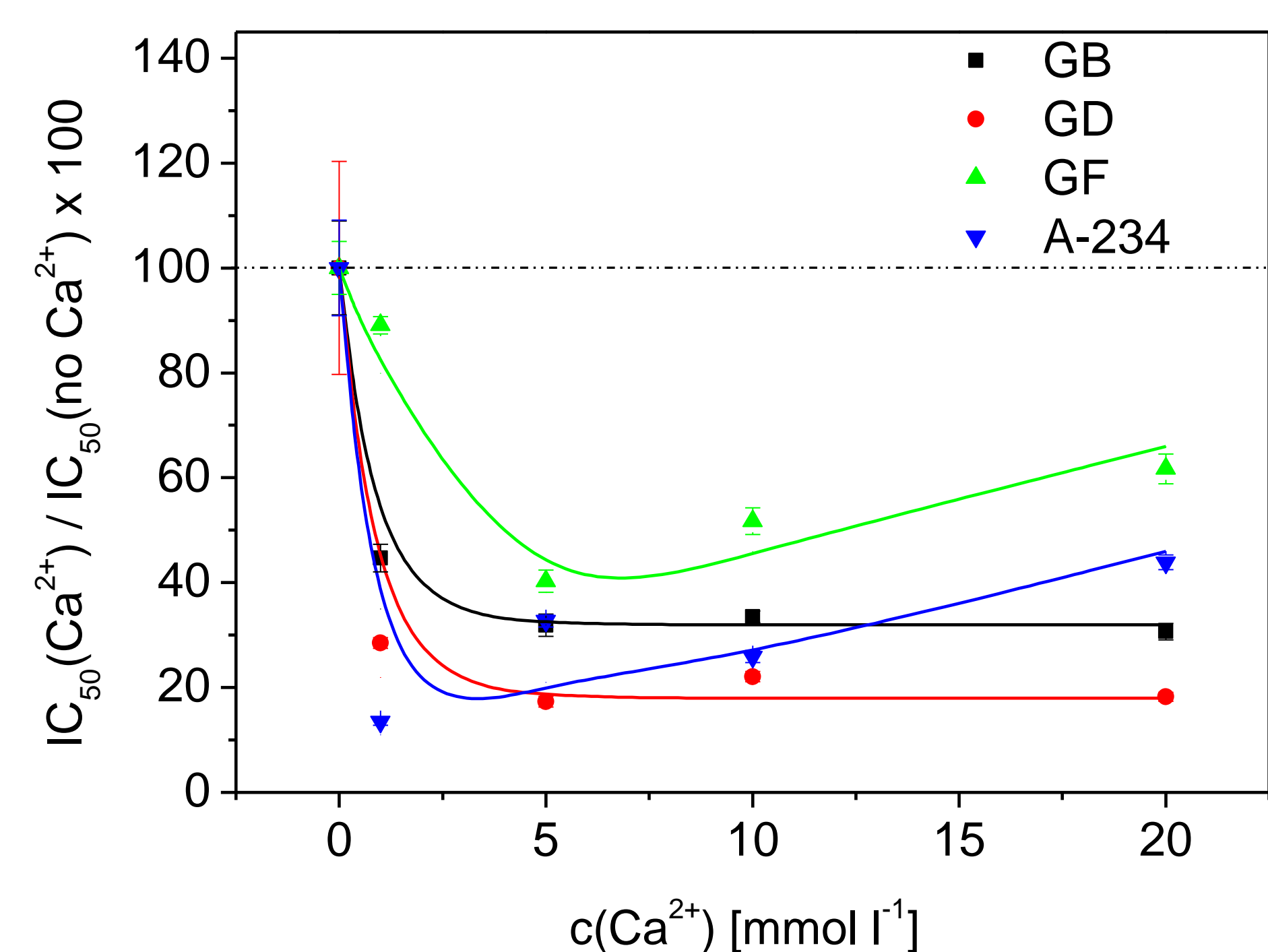
Měření aktivity enzymu bylo prováděno na dělených mikrotitračních destičkách, přičemž nejprve na mikrotitrační destičku byl nanesen inhibitor rozpuštěný v hexanu v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-9}$, $1 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$ mg ml⁻¹. Následně pomocí duálního reagenčního injektoru byl do jamek mikrotitrační destičky nadávkován roztok obsahující odpovídající množství AChE a vybranou koncentraci příslušného iontu kovu (0, 1, 5, 10, 20 mmol l⁻¹). 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.



Obrázek 1 Vliv koncentrací iontů Mg^{2+} a Ca^{2+} na aktivitu acetylcholinesterázy vztahované k aktivitě enzymu v nepřítomnosti iontů.



Obrázek 2 Vliv koncentrací iontů Mg^{2+} na aktivitu acetylcholinesterázy inhibované různými typy OFOL.



Obrázek 3 Vliv koncentrací iontů Ca^{2+} na aktivitu acetylcholinesterázy inhibované různými typy OFOL.

Výsledky

V rámci experimentů jsme zaznamenali při aplikaci iontů bez NPL, při koncentracích do 1 mol l⁻¹, zvýšení enzymové aktivity, při aplikaci vyšších koncentrací iontů nad fyziologické hodnoty, tyto ionty působí inhibičně a dochází k opětovnému snížení aktivity enzymu. Pokles aktivity enzymu je v případě Ca^{2+} iontů výraznější oproti Mg^{2+} iontům (viz Obrázek 1). Následně, při aplikaci směsi iontů s NPL, docházelo k synergickému efektu, kdy se míra inhibice enzymu zvýšila v porovnání k inhibici enzymu NPL bez iontů. Změna míry inhibice byla vyjádřena poměrem získaných hodnot IC_{50} pro jednotlivé koncentrace iontů ku hodnotě IC_{50} blanku (no Mg^{2+} nebo no Ca^{2+}). Výsledky jsou znázorněny na Obrázcích 2 a 3. V případě působení Mg^{2+} iontů v interakci s NPL dochází u látek typu G k synergickému efektu, tedy prohloubení inhibice. Zatímco u látky typu A docházelo při vyšších koncentracích Mg^{2+} iontu k zvýšení aktivity enzymu. U Ca^{2+} iontů látka typu A vykazovala podobné chování jako v předchozím případě. Mezi látkami typu G bylo, v porovnání s Mg^{2+} ionty, zaznamenáno odlišné chování u měření provedených s látkou GF (viz Obrázek 3).

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory DZRO Protect II (2022-2029), Ústavu OPZHN, Univerzity obrany.

Diskuse a závěry

Působení iontů bylo již studováno ve spojení s pesticidy, karbamáty nebo i NPL. Pro plasmovou a erytrocytální AChE bylo v publikaci Ajilore et al. (2018) prezentováno, že Mg^{2+} ionty zvyšují aktivitu enzymu a také snižují účinek pesticidu chlorpyrifosu. Studie Shetab-Boushehri et al. (2012) vyslovuje myšlenku, že se Mg^{2+} ionty účastní reaktivace aktivního místa. Studie byla provedena inhibicí enzymu pesticidem dichlorvos s následnou reaktivací pralidoximem v přítomnosti Mg^{2+} iontů a bez nich. Výsledkem je návrh použití oximů spolu s Mg^{2+} ionty jako prostředek pro zvýšení antidotní terapie. Vliv Mg^{2+} iontů byl studován také na plazmové esteráze exponované inhibitorům. U Mg^{2+} iontů bylo u kontrolního, neexponovaného vzorku zaznamenáno snížení aktivity esterázy, zatímco u vzorku inhibovaného organofosfáty a karbamáty, došlo k jejímu zvýšení. V přítomnosti inhibitorů dochází pravděpodobně k alosterickým změnám, které podporují další změny účinkem Mg^{2+} iontů. Ve vyšších koncentracích iontů dochází opět k poklesu aktivity enzymu. Z výsledků námi provedených experimentů vyplývá, že bivalentní ionty ve fyziologických koncentracích působí synergicky s inhibitorem, tudíž prohlubují inhibici. Ve vyšších koncentracích byl u některých inhibitorů zaznamenán opětovný vzrůst aktivity enzymu, což by nasvědčovalo antagonistickému působení iontů. Tento vliv byl zaznamenán u enzymu inhibovaného A-234 pro oba použité ionty a u inhibitoru GF ve spojení pouze s Ca^{2+} . U ostatních testovaných kombinací iontů a NPL byl pozorován synergický účinek.