



VYUŽITÍ KARBOXYLESTERÁZY PRO STANOVENÍ ORGANOFOSFOROVÝCH LÁTEK



Jiří Žeravík^{a*}, Monika Hoskocová^a

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

*Korespondující autor. e-mail: jiri.zeravik@unob.cz

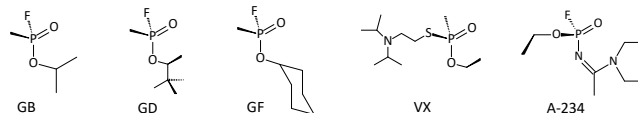
Abstrakt

Pro rychlé a orientační stanovení organofosforových látek se běžně využívá inhibiční cholinesterázové reakce. Výstupem tohoto stanovení je informace, zda v testovaném vzorku je obsaženo významné množství látek, které blokují cholinesterázovou reakci, ale již získaná informace neposkytuje další upřesnění, zda se jedná o organofosforové sloučeniny, karbamáty nebo jiné živočišné popřípadě rostlinné látky způsobujících inhibici enzymu. Pokud bychom chtěli informaci rozšířit o výše uvedenou specifikaci analyzované látky, je nutné do analytického systému vložit rekogniční element, který nám pomůže selektovat cílový analyt. V tomto případě jako selektivní prvek slouží jaterní karboxylesteráza ze *Sus Scrofa*. V rámci uvedené práce je studován mechanismus účinku organofosforových látek na výše uvedený enzym, s ohledem na následnou detekci přítomnosti OP látek pomocí acetylcholinesterázové reakce.

Klíčová slova: organofosforové látky, nervově paralytické látky, acetylcholinesteráza, karboxylesteráza, kolorimetrické stanovení aktivity, inhibice enzymu.

Úvod

Karboxylesterázy (CE) spolu s cholinesterázami (ChE) patří do rodiny α/β hydroláz. Tyto enzymy mají v aktivním centru katalytickou triádu His-Ser-Glu/Asp, která je zodpovědná za štěpení esterové vazby. Karboxylesterázy obdobně jako cholinesterázy jsou schopny v různé míře interagovat s organofosforovými látkami, karbamáty a jinými pesticidy. Řada autorů v rámci popisu funkce karboxylesteráz se zaměřuje na mechanismus působení těchto látek a na potenciál těchto enzymů jako biomarkerů otravy těmito látkami. Možnost karboxylesteráz jako možného rekogničního elementu pro jinou reakci nebyla studována.



Srovnání působení inhibitorů na karboxylesterázu a acetylcholinesterázu

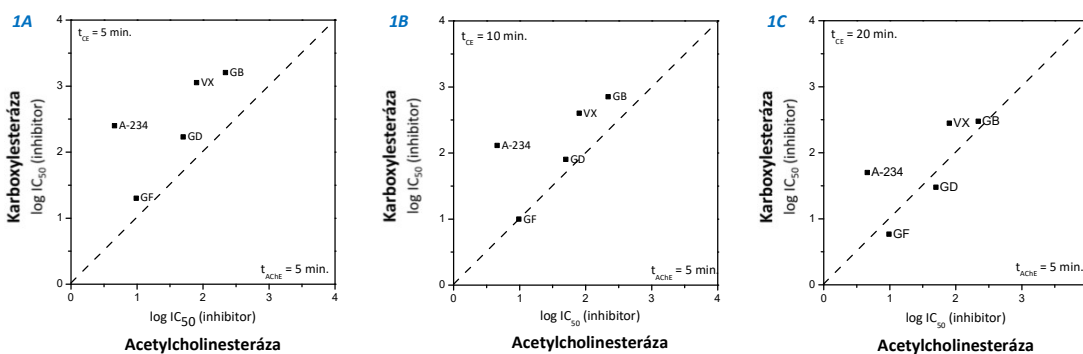
Vedle komerčně dostupné a již výše zmíněné karboxylesterázy, jako analytický element byla vybrána acetylcholinesteráza (AChE) z elektrického úhoře, která je dobře dostupná a může posloužit jako velmi stabilní a praxí ověřený srovnávací základ. Pro oba enzymy byla individuálně vyvinuta metoda detekce enzymové aktivity, jež byla následně využita pro inhibiční měření. K monitorování aktivity CE byl použit 4-nitrofenylbutyrát. Hydrolyzou tohoto esteru se uvolňoval 4-nitrofenyl, který v zásaditém prostředí přecházel na stabilní žlutou enolovou formu ($\lambda = 405 \text{ nm}$). Pro detekci aktivity AChE bylo využito modifikované Ellmanovy reakce. Následně byly tyto metody využity k monitorování působení vybraných inhibitorů. V tomto případě se jednalo o nervově paralytické látky (NPL) sarin (GB), soman (GD), cyklosin (GF), látku VX a látku A-234. Vedle okamžitého účinku inhibitorů byl také sledován vývoj inhibičního působení těchto látek v čase (inkubace inhibitoru s enzymem 5, 10 a 20 minut). Jako základní srovnávací parametr jednotlivých měření byla využita hodnota IC_{50} , která byla získána matematickou extrapolací ze sigmoidní kalibrační křivky. Hodnoty IC_{50} pro jednotlivé inhibitory v čase 5, 10 a 20 min jsou uvedeny v **Tabulce 1**.

Tabulka 1 Srovnání hodnot IC_{50} [nM] enzymů AChE a CE při inkubaci inhibitoru s enzymem po dobu 5, 10 a 20 minut.

Enzym	AChE <i>Electrophorus electricus</i>			CE <i>Sus scrofa</i>		
	5	10	20	5	10	20
GB	220 ± 40	100 ± 30	60 ± 8	1600 ± 198	710 ± 110	300 ± 40
GD	50 ± 4	30 ± 4	9 ± 1	170 ± 10	80 ± 8	30 ± 3
GF	9,7 ± 70	5,8 ± 0,1	1,8 ± 0,5	20 ± 2	10 ± 2	5,8 ± 0,4
VX	80 ± 20	50 ± 10	30 ± 70	1130 ± 320	400 ± 70	280 ± 40
A-234	4,6 ± 0,1	3,0 ± 0,5	1,8 ± 0,4	250 ± 2	130 ± 50	50 ± 6

Srovnání času inkubace inhibitoru s enzymem

Získané hodnoty IC_{50} pro jednotlivé enzymy poukazují na vyšší citlivost AChE vůči inhibitorům oproti CE (viz **Tabulka 1**). Rozdíl mezi hodnotami je přibližně v rozsahu jednoho řádu ve prospěch AChE v rámci srovnání stejných inkubačních časů. Využití CE jako rekogničního elementu má smysl pouze v případě, kdy citlivost daného enzymu bude srovnatelná nebo i vyšší v porovnání s AChE. V tomto ohledu připadá v úvahu kombinace různých inkubačních časů CE s 5 minutovou inkubací AChE. Vzájemně vynesení hodnot IC_{50} pro 5 min. inkubaci AChE a 5, 10 a 20 min. inkubace CE je vyjádřeno na **Obrázku 1A - 1C**. Jak je patrné z výsledků vhodnou kombinací inkubačních časů lze posunout body charakterizující jednotlivé inhibitory, kdy interakce inhibitoru s CE nemá vliv na následující inhibiční reakci inhibitoru s AChE, k diagonále (čárkovaná čára), popř. pod diagonálu, což představuje situaci, kdy daná kombinace enzymů při stávající kombinaci inkubačních časů bude poskytovat relevantní změnu signálu. Tato změna se projeví na poklesu míry inhibice AChE, která je monitorována. Při měření kalibrační závislosti dochází k posunu křivky směrem k vyšším hodnotám, hodnota IC_{50} pro daný systém se zvyšuje.

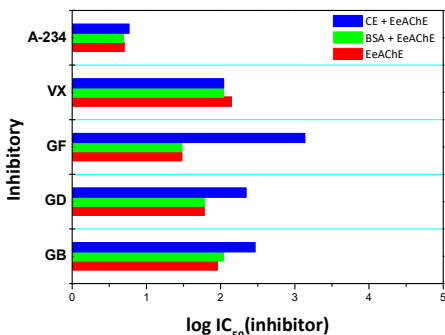


Obrázek 1A - 1C Srovnání inhibičních vlastností AChE a CE vyjádřených pomocí logaritmičeských hodnot IC_{50} pro jednotlivé inhibitory.

1A Srovnání hodnot IC_{50} pro 5 min. inkubaci inhibitoru jak s CE, tak i AChE.

1B Srovnání hodnot IC_{50} pro 10 min. inkubaci inhibitoru s CE a 5 min. inkubaci s AChE.

1C Srovnání hodnot IC_{50} pro 20 min. inkubaci inhibitoru s CE a 5 min. inkubaci s AChE.



Obrázek 2 Srovnání logaritmičeských hodnot IC_{50} získaných měřením kalibračních závislostí v systému obsahujícím pouze AChE (červená), BSA + AChE (zelená) a CE + AChE (modrá).

Identifikace inhibitoru systémem CE + AChE

Základní premisou identifikace pomocí systému kombinujícího inkubaci inhibitoru s CE a následnou inkubaci s AChE je dodat do systému dostatečné množství rekogničního prvku (CE), tak aby jeho kapacita překračovala kapacitu AChE. Pro tento experiment bylo rozhodnuto využít 10-ti násobné množství CE oproti AChE. Z předchozího vyhodnocení (viz **Obrázek 1A - 1C**) byla použita kombinace 20 min. inkubace inhibitoru s CE s následující 5 min inkubací s AChE. Vedle použití rekogničního systému CE + AChE je důležité také monitorovat účinek inhibitoru pouze na AChE. K tomuto účelu byla CE nahrazena stejným množstvím inertního proteinu (BSA). Získané výsledky jsou zahrnuty v **Obrázku 2**. Součástí je také zobrazení hodnot IC_{50} získaných standardizovanou metodou (5 min. inkubace inhibitoru s AChE). Z výsledků na **Obrázku 2** je patrné, že hodnoty IC_{50} pro kombinaci BSA + AChE jsou v souladu s hodnotami získanými standardizovanou metodou. Použití CE jako rozlišovacího prvku vedlo k separaci látek typu G, přičemž tento systém nejlépe rozpozná látku GF. Určení neznámého vzorku poté může vycházet ze zavedení poměru hodnot IC_{50} pro jednotlivé inhibitory $R(IC_{50}) = IC_{50}(\text{CE} + \text{AChE}) / IC_{50}(\text{BSA} + \text{AChE})$ viz **Tabulka 2**.

Tabulka 2 Přehled hodnot $R(IC_{50})$ vybraných NPL.

Inhibitor	$R(IC_{50})$
GB	2,64
GD	3,67
GF	45,33
VX	1,00
A-234	1,18

Závěr

Výše uvedený návrh detekce bojových látek rozšiřuje možnosti identifikace jednotlivých inhibitorů pomocí bioanalytické metody, přičemž využití jiných typů enzymů jako biorekogničního elementu mimikuje použití specifických sorbentů. Míra afinity inhibitoru závisí pouze na schopnosti vazby do aktivního místa. Celková odpověď systému závisí na kapacitě rekogničního prvku (v tomto případě CE) a dostatečně dlouhé inkubační době s inhibitorem. Zavedení poměru $R(IC_{50})$ pak umožňuje tuto metodu využít pro identifikaci látky v neznámém vzorku.

Poděkování

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