

CHARAKTERIZACE PREPARÁTU KOŇSKÉ BUTYRYLCHOLINESTERÁZY *IN VITRO* A JEHO HLADINY V KRVÍ U LABORATORNÍCH POTKANŮ

Lucie BARTOŠOVÁ, Jiří BAJGAR

Univerzita obrany, katedra toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové

Souhrn

U preparátu koňské butyrylcholinesterázy byla stanovena Michaelisova konstanta in vitro se substrátem butyrylthiocholin jodid pro dvě koncentrační rozmezí koncentrace substrátu potvrzující aktivaci enzymu substrátem (K_m 59,7 μ M a K_{ss} 1,02 mM) a pI_{50} pro sarin (7,06 nM). Po i. p. podání laboratorním potkanům byly stanoveny aktivity cholinesteráz v krvi, které přetrvávají až do 72 hodin po aplikaci.

Klíčová slova: Preparát; Koňská butyrylcholinesteráza; Charakterizace; Potkan.

Characterization of Preparation of Equine Serum Butyrylcholinesterase *in vitro* and Its Blood Levels in Rats

Summary

Michaelis constant in two concentration ranges of substrate (K_m 59.7 μ M and K_{ss} 1.02 mM) evidencing activation of the enzyme by substrate and pI_{50} (7.06 nM) value for preparation of equine butyrylcholinesterase were determined in vitro. Activities of cholinesterases in the blood of rats were determined following i. p. administration lasting 72 hours after the administration.

Key words: Preparation; Equine butyrylcholinesterase; Characterization; Rat.

Úvod

Hrozba použití chemických zbraní (CHZ) přes existenci Úmluvy o zákazu vývoje, výroby, hromadění zásob a použití chemických zbraní a o jejich zničení (dále Úmluva) nezmizela a je stále aktuální (9). Je tomu tak proto, že přes určité restriktce pro státy, které nejsou členy Úmluvy, není možno vyloučit eventualitu, že CHZ by tyto mohly vyrábět a skladovat, event. použít, a takové země tedy budou představovat potenciální vlastníky CHZ a nebezpečí pro členské státy Úmluvy. Z téhož důvodu pak vůbec nelze vyloučit zneužití těchto látek v lokálních konfliktech, teroristy apod. Zejména poslední možnost byla potvrzena v Japonsku – 27. června 1994 v městě Matsumoto a 20. března 1995 v Tokiu. V obou případech šlo o teroristické použití nervově paralytické látky (NPL) sarinu (3, 16).

Mezi nejdůležitější reprezentanty NPL se řadí zmíněný sarin, soman, VX-látka a další (3, 14). Pro efektivní léčbu i profylaxi intoxikací NPL (dříve bojové organofosfáty) je nutno znát nejen mechanismus účinku, ale i možnosti terapie a profylaxe, aby jejich účinky byly minimalizovány, a to zejména pro akutní intoxikace způsobené letálními dávkami NPL.

Z hlediska profylaxe je možné použít odmoření

před penetrací a při penetraci NPL do organismu (nejedná se o medicínskou záležitost, je uvedeno jen pro úplnost). Farmakologická profylaxe otrav NPL je založena na několika principech. Jedním je podávání reverzibilních inhibitorů cholinesteráz (především pyridostigmin), kdy reverzibilně inhibovaná (karbamylovaná) acetylcholinesteráza (AChE, EC 3.1.1.7), rezistentní vůči NPL, je spontánně dekarbamylována a dekarbamylovaný enzym slouží jako zdroj normální AChE (2, 3, 4, 14). Profylaktická účinnost je limitována dávkou reverzibilního inhibitoru – při vyšších dávkách je sice dosaženo vyšší profylaktické účinnosti, ovšem za cenu výraznějších vedlejších účinků. U přípravku zavedeného v AČR (PANPAL, s vyšší dávkou pyridostigminu) je tento problém částečně řešen přidáním dvou anticholinergik, která eliminují účinek vyšší dávky pyridostigminu, avšak účinnost zejména proti somanu a tabunu není optimální. Druhým přístupem je podávání běžně používaných antidot, jakási „léčba v předstihu“, vyžadující ale dostatečně vysokou a časově delší hladinu těchto léčiv v krvi (2, 3, 4). Tento problém byl v AČR řešen zavedením nového profylaktického antidota TRANSANT, obsahujícího reaktivátor HI-6 pro transdermální podání. Podávání jiných farmak jako profylaktik je ve stadiu

V celé krvi byla stanovena aktivita ChE, v erytrocytech pak aktivita AChE a v plazmě byla stanovena aktivita BuChE.

Stanovení aktivity cholinesteráz

Aktivita plazmové BuChE byla stanovena Ellmanovou metodou (10) se substrátem BuTCh. Aktivita cholinesteráz v krvi a AChE v erytrocytech byla stanovena stejnou metodou (10), avšak se substrátem acetylthiocholin jodid. Jako chromogen byla použita 5,5' bis-2-nitrobenzoová kyselina. Principem metody je spektrofotometrické stanovení SH-skupiny thiocholinu uvolněného enzymatickou hydrolyzou ze substrátu.

Statistické hodnocení

Proložení přímkou u stanovení enzymatických konstant in vitro bylo provedeno metodou nejmenších čtverců podle příslušných programů, jinak byly výsledky hodnoceny běžnými metodami (průměr, směrodatná odchylka).

Výsledky

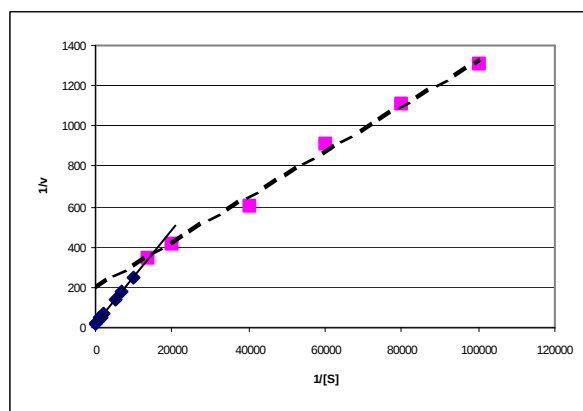
Charakteristika preparátu EqBuChE

Preparát dodané EqBuChE byl charakterizován jednak konstantami K_m , V_{max} a také hodnotou pI_{50} . Vzhledem k tomu, že ke stanovení aktivity plazmatické BuChE se jako substrát používá BTCh, byl tento substrát použit i při stanovení konstant K_m a V_{max} . Konstanta K_m vyjadřuje koncentraci substrátu, při níž je dosaženo poloviny maximální reakční rychlosti V_{max} , tj. rychlosti, kdy je enzym substrátem nasycen. Konstanty byly stanoveny při široké škále koncentrací substrátu (0,01–10 mM) – konstanta K_m popisuje štěpení BTCh při koncentraci 0,01–0,1 mM, konstanta K_{ss} při koncentraci BTCh 1–10 mM. Měření byla prováděna při hodnotě pH 7,6, které se blíží optimu pH pro BuChE (při tomto pH je zachována nejméně 90% aktivita plazmatické ChE a spontánní hydrolyza je zanedbatelná). Hodnota pI_{50} je záporný dekadický logaritmus koncentrace sarinu, jež vyvolala 50% inhibici EqBuChE. Na obr. 2 je grafické znázornění výsledků v oboustranně reciproké transformaci rovnice Michaelise a Mentenové podle Lineweavera–Burka.

$$v_0 = V_{max} [S] / K_m + [S] \quad \text{rovnice Michaelise a Mentenové}$$

$$1/v_0 = K_m / V_{max} \cdot 1/[S] + 1/V_{max} \quad \text{Lineweaver–Burkova transformace}$$

Z Lineweaverovy–Burkovy transformace byly stanoveny hodnoty kinetických konstant, které jsou uvedeny v tabulce 1.



Obr. 2: Lineweaverova–Burkova transformace rovnice Michaelise a Mentenové pro EqBuChE a substrát butyrylthiocholin jodid

Tabulka 1

Kinetické konstanty EqBuChE stanovené v TRIS pufru, pH 7,6 pro substrát butyrylthiocholin jodid při 20 °C

	K_m	K_{ss}	V_{max1}	V_{max2}	pI_{50}
	μM	mM	$\mu mol/min/ml$	$\mu mol/min/ml$	nM
EqBuChE	59,7	1,02	5,2	11,9	7,06

V_{max1} stanovena při koncentraci substrátu 0,01–0,1 mM

V_{max2} stanovena při koncentraci substrátu 1–10 mM

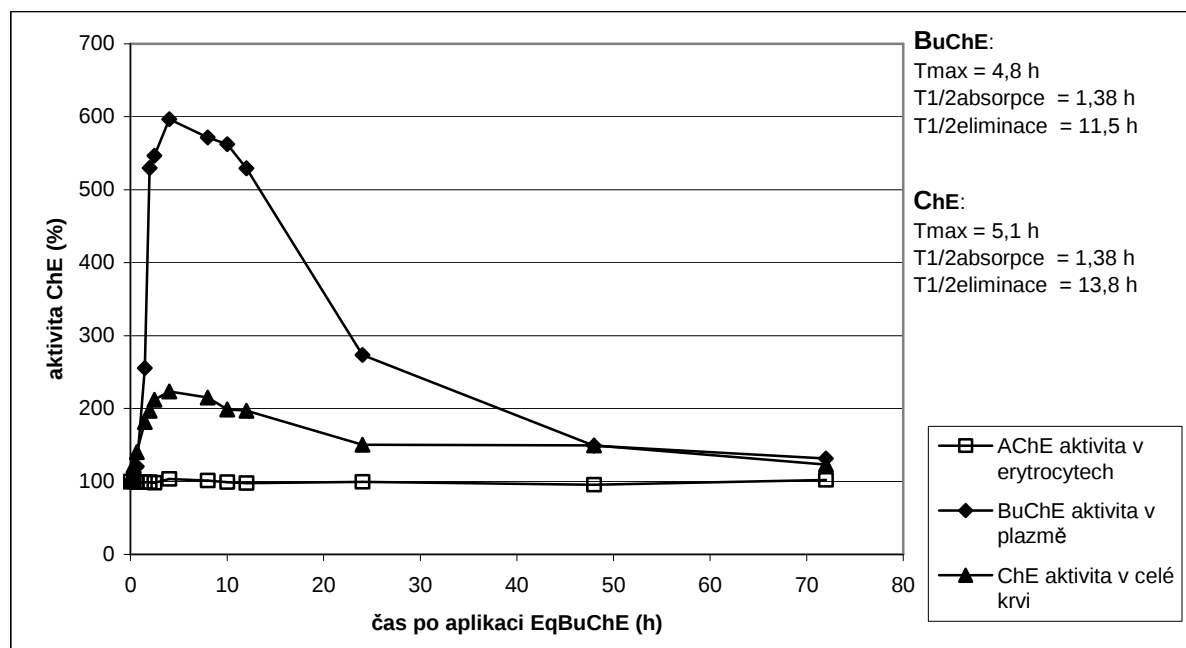
Kinetika EqBuChE po intraperitoneálním podání u potkana

Po i. p. podání EqBuChE v dávce 250 U/kg byla u potkanů měřena aktivita ChE v krvi v 8 časových intervalech až do 72 h. V odebrané krvi byla stanovena aktivita ChE v celé krvi, aktivita AChE v erytrocytech a aktivita BuChE v plazmě. Průběh aktivity ChE je dokumentován na obr. 3.

Za 72 h po i. p. podání u potkana byla aktivita BuChE v plazmě i aktivita ChE v plné krvi zvýšena nejméně o 23 % nad původní hodnotu stanovenou na začátku experimentu.

Diskuse

Dodaná EqBuChE byla charakterizována kinetickými konstantami se substrátem BTCh, který byl pak použit i pro stanovení aktivity BuChE v plazmě potkanů zahrnutých do experimentu. Je známo, že Lineweaverova–Burkova transformace pro hydro-



Obr. 3: Aktivita cholinesteráz v krvi potkana po i. p. aplikaci EqBuChE v dávce 250 U/kg

lýzu BTCh BuChE není lineární v koncentračním rozmezí 0,01–40 mM. Tato nelinearita je přisuzována substrátové aktivaci při koncentracích BTCh nad 0,4 mM (13, 18). Konstanta K_m popisuje hydrolyzu BTCh při nízké koncentraci substrátu (0,01–0,1 mM), konstanta K_{ss} při vysoké koncentraci substrátu (1 až 10 mM). Analogicky při stejných koncentracích byly stanoveny i konstanty V_{max1} a V_{max2} . Obě naměřené konstanty K_m (59,7 μM) a K_{ss} (1,02 mM) jsou v dobré shodě s již publikovanými údaji Xie et al. ($K_m = 60 \pm 8 \mu\text{M}$; $K_{ss} = 1,0 \pm 0,2 \text{ mM}$) (28). Pro kinetické konstanty rychlosti reakce V_{max1} a V_{max2} obecně platí, že pokud je poměr V_{max2} a V_{max1} vyšší než 1, jedná se o aktivaci enzymu substrátem, pokud je roven 1, je oboustranně reciproká transformace lineární, a pokud je nižší než 1 dochází k inhibici enzymu substrátem. Také tato charakteristika EqBuChE byla v našem experimentu v souladu s hodnotami uváděnými v literatuře (28) a potvrzuje aktivaci EqBuChE substrátem BTCh. Hodnota pI_{50} pro EqBuChE inhibovanou sarinem není v dostupné literatuře publikována. Srovnání s údaji uváděnými v literatuře pro BuChE izolovanou z jiného druhu je komplikované vzhledem k mezidruhovým rozdílům v citlivosti k jednotlivým NPL a také rozdílnou reaktivitou ChE s organofosfáty podle orgánu, ze kterého byla ChE izolována (17).

Aplikace ChE jako scavengerů při otravách NPL je možná pouze parenterální cestou. Nejčastěji se ex-

perimentálním zvířatům ChE aplikují i. m. (19, 20), i. v. (20, 21) nebo i. p. (22, 23). V těchto studiích bylo prokázáno, že způsob aplikace sice ovlivňuje čas dosažení maximální koncentrace enzymu v plazmě, střední doba pobytu látky v cirkulaci (mean residence time, MRT) však zůstává neovlivněna a konstantní hladina enzymu přetrvává po dobu 3 až 20 hodin. Tyto studie také potvrdily, že nezávisle na způsobu aplikace se do cirkulace dostává 50 až 90 % podané dávky enzymu. Důležitou úlohu pro MRT v cirkulaci má počet glykosylačních míst v molekule enzymu: např. tetramer fetální hovězí AChE má 6–7krát delší MRT v cirkulaci než monomerní forma. Výhodou nativní EqBuChE i nativní lidské (HuBuChE) cholinesterázy proti nativní AChE je právě vyšší počet glykosylačních míst v molekule (12). V dosud publikovaných studiích zabývajících se profylaktickou účinností BuChE při otravách NPL byl vždy zjišťován pouze nárůst aktivity BuChE v plazmě (1, 15, 19). V naší studii jsme však chtěli také zhodnotit, jaký vliv bude mít exogenně aplikovaná EqBuChE na aktivitu celkové ChE v celé krvi a také na aktivitu AChE v erytrocytech. Aktivita AChE v erytrocytech zůstala po i. p. aplikaci EqBuChE podle našeho očekávání po celou dobu sledování (72 h) nezměněna. V celé krvi došlo k nárůstu ChE až na 223 % původní hodnoty, v plazmě se zvýšila aktivita BuChE až na 596 % původní aktivity. Tento poměr nárůstu aktivit velmi dobře koresponduje

s podílem AChE a BuChE na aktivitě ChE v celé krvi, který je u potkana 7:3 (3). Čas dosažení maximální aktivity BuChE po i. p. aplikaci EqBuChE u potkana byl zatím v literatuře publikován pouze v jedné studii (11), kde byla samicím potkanům aplikována EqBuChE v dávce 5000 U/potkan a maximálního zvýšení aktivity bylo dosaženo za 4 hodiny. I v našem experimentu byl zjištěn $t_{\max}$ EqBuChE po i. p. podání v podobném čase – 4,8 h. Z dalších dostupných údajů lze zjistit $t_{\max}$ pro i. m. aplikaci HuBuChE potkanům – 9 h a myším – 13 h (19), a $t_{\max}$ pro i. p. aplikaci HuBuChE myším – 14 h, morčatům – 30 h a potkanům – 2–3 h (5, 22, 23).

V posledně zmiňované studii jsou srovnávány kinetické parametry HuBuChE po i. m. a i. p. podání a z tohoto porovnání vyplývá, že u myší je $t_{\max}$ po i. p. aplikaci téměř 2krát kratší, zatímco u morčat jsou $t_{\max}$ po i. p. i i. m. podání srovnatelné. Obdobné srovnání i. p. a i. m. aplikace exogenních ChE pro potkany bohužel není publikováno. Vzhledem k tomu, že pro dlouhotrvající protektivní účinek před možnou expozicí NPL by musely být ChE podávány opakovaně, byla sledována i jejich farmakokinetika po opakovaném podání (23). Výsledky této studie naznačují, že při aplikaci myší BuChE myším a BuChE makakům se po opakovaném podání nemění MRT enzymu v cirkulaci, ani nebyly detekovány žádné protilátkové reakce. Naopak po druhém podání HuBuChE myším se MRT enzymu v plazmě výrazně zkrátila (ze 48 na 26 hodin). Vzniklé protilátky totiž způsobí při opakovaném podání exogenní BuChE její velmi rychlou eliminaci z cirkulace, což omezuje použití heterologního enzymu pouze na jednu dávku. Navíc bylo prokázáno, že podání EqBuChE chrání před inhibicí i AChE mozkovou (26). Tyto výsledky tedy prokazují, že homologní BuChE je efektivním a bezpečným prostředkem k profylaxi otrav NPL.

Literatura

1. ALLON, N., et al. Prophylaxis against soman inhalation toxicity in guinea pigs by pretreatment alone with human serum butyrylcholinesterase. *Toxicol. Sci.*, 1998, vol. 43, p. 121–128.
2. BAJGAR, J. Prophylaxis against organophosphorus poisoning. *J. Med. Chem. Def.*, 2003, vol. 1, p. 1–15.
3. BAJGAR, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. *Adv. Clin. Chem.*, 2004, vol. 38, p. 151–216.
4. BAJGAR, J. – FUSEK, J. – SEVELOVA, L. – KASSA, J. Complex prophylaxis against nerve agent intoxication. Presented at the Eighth International Symposium on Protection against Chemical and Biological Warfare Agents. Sweden, Gotheburg, 2–6 June 2004, Abstracts, p. 51.
5. CLARK, MG., et al. Effects of physostigmine and human butyrylcholinesterase on acoustic startle reflex and prepulse inhibition in C57BL/6J mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2005, vol. 81, p. 497–505.
6. DOCTOR, BP., et al. Enzymes as pretreatment drugs for organophosphate toxicity. *Neurosci. Behav. Rev.*, 1991, vol. 15, p. 123–128.
7. DOCTOR, BP., et al. Preparation and characterization of bioscavengers for possible use against organophosphate toxicity. m-CB Medical Treatment Symposium, 26–30 May 1997, Hradec Kralové. Abstracts, p. 17–18.
8. DOCTOR, BP., et al. Scavenger protection against organophosphates by human serum butyrylcholinesterase. The 4th International CB Medical Treatment Symposium, 28 April–3 May 2002, Switzerland, Spiez. Abstract, no. 24.
9. Dokument OSN. Report of the Conference on Disarmament. General Assembly Official Records. Forty-seventh Session Supplement no. 27 (A/47/27). United Nations, New York, 1992, p. 105–289.
10. ELLMAN, GL., et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, vol. 7, p. 88–95.
11. GENOVESE, RF., DOCTOR, BP. Behavioral and pharmacological assessment of butyrylcholinesterase in rats. *Pharm. Biochem. Behav.*, 1995, vol. 51, p. 647–654.
12. GIACOBINI, E. Butyrylcholinesterase its function and inhibitors. 1st ed. London, Martin Dunitz, 2003. 181 p.
13. MASSON, P., et al. Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylthiocholine to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 1997, vol. 36, p. 2266–2277.
14. MARRS, TC., et al. Chemical warfare agents. Toxicology and treatment. Chicester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1996.
15. MATZKE, SM., et al. Behavioral and immunological effects of exogenous butyrylcholinesterase in rhesus monkeys. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1999, vol. 62, p. 523–530.
16. OHBU, S., et al. Sarin poisoning in Tokyo subway. *South Med. J.*, 1997, vol. 90, p. 587–593.
17. PATOČKA, J. – BAJGAR, J. Affinity of human brain acetylcholinesterase to some carbamates and organophosphates. *J. Neurochem.*, 1971, vol. 18, p. 2545–2546.
18. RADIC, Z., et al. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 1993, vol. 32, p. 12074–12084.
19. RAVEH, L., et al. Human butyrylcholinesterase as a general prophylactic antidote for nerve agent toxicity. In vitro and in vivo quantitative characterization. *Biochem. Pharmacol.*, 1993, vol. 45, p. 2465–2474.
20. RAVEH, L., et al. The stoichiometry of protection against soman and VX toxicity in monkeys pretreated with human butyrylcholinesterase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997, vol. 145, p. 43–53.
21. ROSENBERG, Y., et al. Pharmacokinetics and immunologic consequences of exposing macaques to purified homologous butyrylcholinesterase. *Life Sci.*, 2002, vol. 72, no. 2, p. 125–134.
22. SAEZ-VALERO, J., et al. Intraperitoneal administration of 340 kDa human plasma butyrylcholinesterase increases

- the level of the enzyme in the cerebrospinal fluid of rats. *Neurosci. Lett.*, 2005, vol. 383, p. 93–98.
23. SAXENA, A., et al. HuBChE: A bioscavenger for protection against organophosphate chemical warfare agents. *U. S. Army Med. Dep. J.*, 2004, vol. 7, p. 22–29.
24. SAXENA, A., et al. Mutant acetylcholinesterases as potential detoxification agents for organophosphate poisoning. *Biochem. Pharmacol.*, 1997, vol. 54, p. 269–274.
25. SAXENA, A., et al. Scavenger protection against organophosphate agents by human serum butyrylcholinesterase. The meeting of NATO TG 004 Task Group on Prophylaxis and Therapy of Chemical Agents; 4–7 November 2002, Norway, Oslo.
26. SEVELOVA, L. – BAJGAR, J. – FUSEK, J., et al. Inhalation intoxication with sarin in rats: effect of pretreatment with butyrylcholinesterase. In 22nd Xenobiochemical Symposium; 9–11 June 2003, Slovakia, Smolenice. Abstracts p. 174–175.
27. WOLFE, AD., et al. Acetylcholinesterase prophylaxis against organophosphate toxicity. *Fund. Appl. Toxicol.*, 1987, vol. 9, p. 266–270.
28. XIE, W., et al. An improved cocaine hydrolase: the A328Y mutant of human butyrylcholinesterase is 4-fold more efficient. *Mol. Pharmacol.*, 1999, vol. 55, p. 83–91.
- Poděkování
Autoři děkují za technickou spolupráci paní Janě Uhlířové a MO ČR za finanční podporu (projekt č. OPUOFVZ 200603).
- Korespondence: Mgr. Lucie Bartošová
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Katedra toxikologie
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: bartosova@pmfhk.cz
- Do redakce došlo 1. 2. 2007
-