



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Workshop v rámci semináře: Cholinesterasy a jejich využití v konstrukci biosenzorů

doc. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D.

pátek 18. října 2013, od 10.00 hod v přednáškové posluchárně Ústavu chemie a biochemie (budova D, učebna D06)

Akce je realizována v rámci klíčové aktivity 02 „Interdisciplinární vzdělávání pracovníků výzkumu a vývoje projektu

EXCELENCE DOKTORSKÉHO STUDIA NA AF MENDELU
PRO NAVAZUJÍCÍ EVROPSKOU VĚDECKO - VÝZKUMNOU KARIÉRU CZ. 1.07/2.3.00/20.0005

CHOLINESTERASY A JEJICH VYUŽITÍ V KONSTRUKCI BIOSENZORŮ

doc. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D.

Fakulta vojenského zdravotnictví

Univerzita obrany

Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové

miroslav.pohanka@gmail.com

Osnova

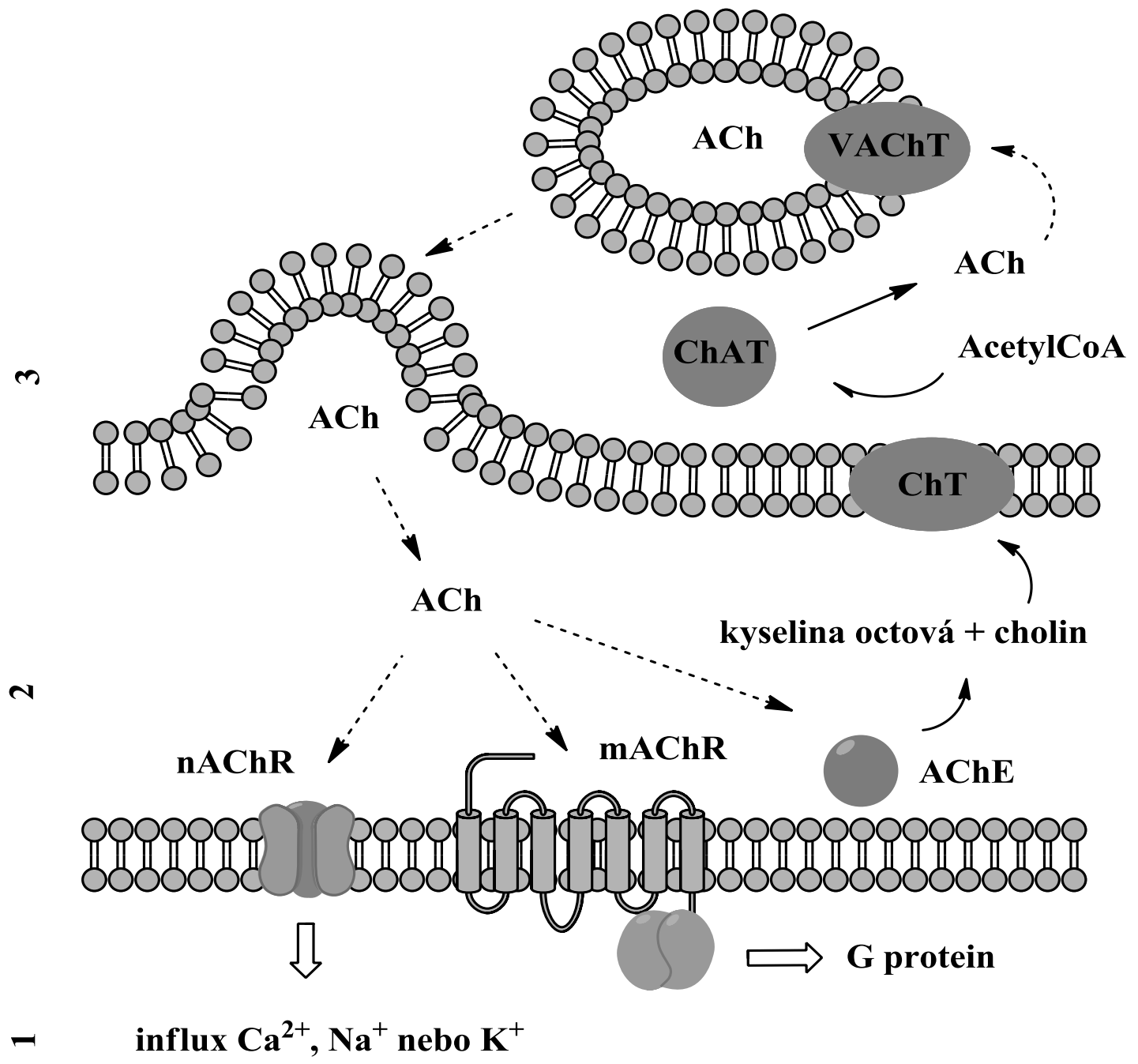
- **Cholinergní systém**
- **Cholinesterasy**
- **Inhibitory cholinesteras**
- **Využití v diagnostice**
- **ChE biosenzory**
- **Stanovení aktivity**
- **Příklady**
- **Závěr**

Cholinergní systém

- **Cholinergní systém je jedním ze základních excitačních nervových drah přítomných v parasymptiku, sympatiku a centrální nervové soustavě**
- **Pro tento systém je společné využití acetylcholinu (ACh) jako neurotransmiteru**
- **ACh je syntetizován v cytosolu neuronů v blízkosti neurosynapse**

Cholinergní systém

- **ACh je agonista nikotinových (iontové kanály; nAChR) a muskarinových (spojené s G proteiny; mAChR) acetylcholinových receptorů**
- **Signál je ukončen hydrolýzou ACh na cholin a kyselinu octovou působením cholinesteras (ChE) – jedním z enzymů acetylcholinesterasy (AChE), nebo butyrylcholinesterasy (BChE)**



Cholinesterasy

V organismu obratlovců jsou přítomny dvě cholinesterasy:

- **AChE (pravá ChE, EC 3.1.1.7)
ukončuje cholinergní neurotransmisi, aktivita v nervové soustavě a krvi**
- **BChE (plasmatická ChE, pseudo ChE, EC 3.1.1.8)
nemá hlavní fyziologický substrát, produkována v játrech, vysoká aktivita v plasmě, odbourává kokain, prokain, sukcinylcholin aj.**

Cholinesterasy

Cholinesterasy mohou být přítomny v organismu jako:

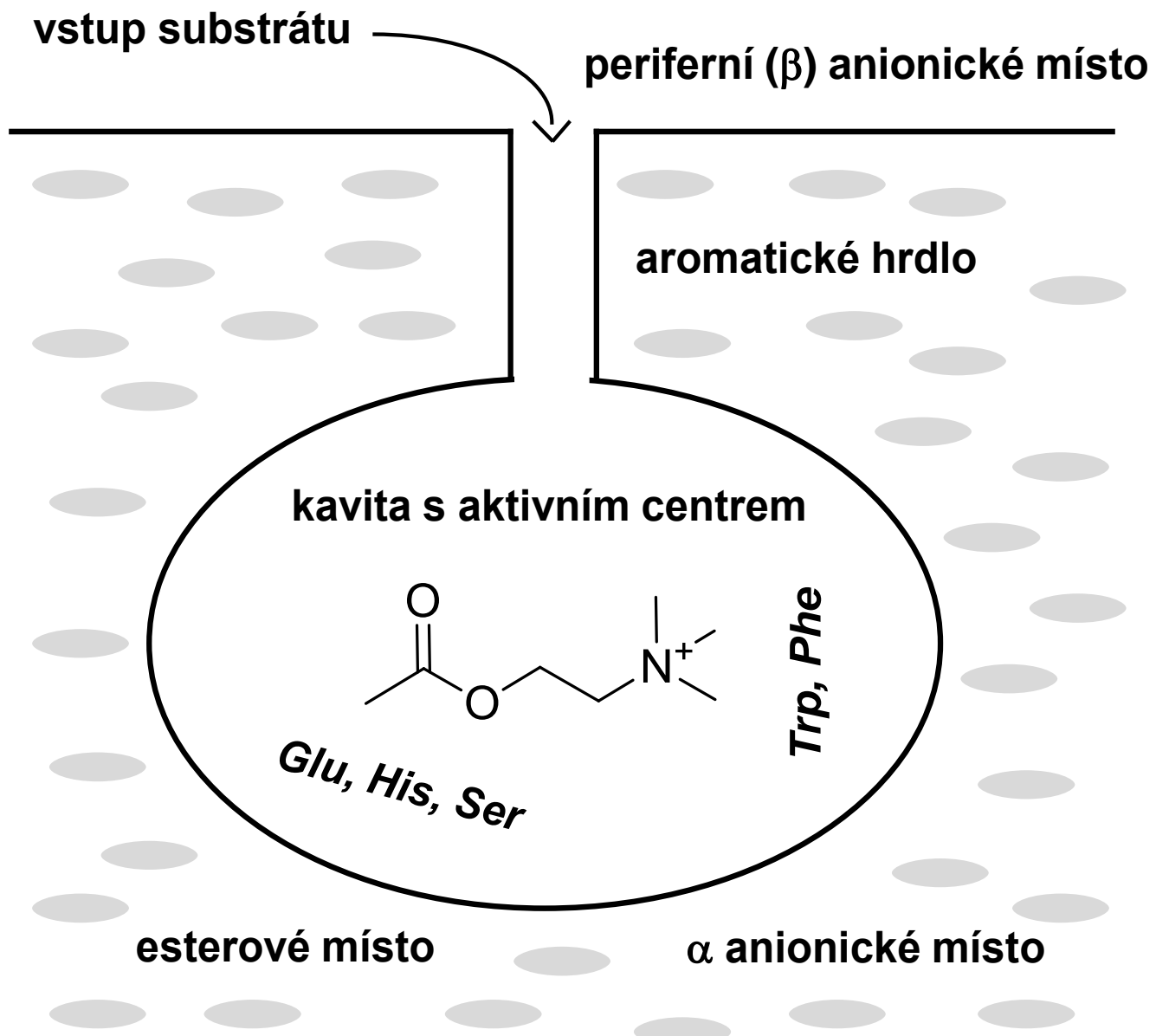
- **Monomer**
- **Dimer**
- **Tetramer**
- **Teramer vázaný na glykofosfatydylinositol kotvu**

Cholinesterasy

Struktura AChE obsahuje důležité části:

- **Periferní anionické místo**
- **Aromatické hrdlo**
- **Aktivní centrum obsahující alfa anionické a esterové (esteratické) místo**

BChE je strukturně blízká AChE, výraznější rozdíl je v aromatickém hrdle a periferním anionickém místě – je zde menší počet aromatických aminokyselin



Základní charakteristika	<i>AChE</i>	<i>BChE</i>
Podjednotka	69 kDa	85 kDa
Konverze acetyl-β-methyl-(thio)cholinu	Vysoká	Nízká
Inhibice nadbytkem substrátu	Ano	Ne
Inhibice tetraisopropyl pyrofosforamidem	Ne	Ano
Inhibice nervově paralytickými látkami	Ano	Ano
Inhibice huperzinem	Ano	Ne
Inhibice tetraisopropylpyrofosforamidem	Ne	Ano

Inhibitory cholinesteras

Cholinergní systém je cílem působení řady látek:

- **látek užívaných jako pesticidy**
- **otravných látek**
- **léčiv (především Alzheimerova choroba)**
- **přírodních toxinů**

Látky ovlivňující aktivitu ChE a především AChE mají výrazné zastoupení.

Inhibitory cholinesteras

Inhibitory cholinesteras mají rozdílnou toxicitu. Toxicita je výrazně ovlivněna:

- **Vstupem do organismu (např. VX snadno proniká kůží) a těkavostí**
- **Schopností pronikat hematoencefalitickou bariérou**
- **Faktem, zda se jedná o inhibitor in vitro, nebo inhibitor vzniká metabolismem prekurzoru**
- **Rychlostí rozkladu (spontánní dealkylace, interakce s karboxylasami aj.)**

<i>Inhibice</i>	<i>Vazba</i>	<i>Mechanismus</i>	<i>Látky / využití</i>
<i>Ireverzibilní</i>	Vazba do esterového místa aktivního centra	Fosforylace aktivního serinu	Organofosforové sloučeniny nervově paralytické látky, pesticidy, lék metrifonát
<i>Pseudo-ireverzibilní</i>	Vazba do esterového místa aktivního centra	Karbonylace aktivního serinu následovaná hydrolyzou	Karbamáty – pesticidy, léčiva (rivastigmin, fyzostigmin, neostigmin...)

<i>Inhibice</i>	<i>Vazba</i>	<i>Mechanizmus</i>	<i>Látky / využití</i>
<i>Reverzibilní - kompetitivní</i>	Vazba do aktivního centra – především alfa anionické místo	Interakce kation-π	Alkaloid galantamin (= syntetický nivalin) – léčivo Alzheimerovy choroby (AD)
<i>Reverzibilní - nekompetitivní</i>	Vazba do alfa nebo beta anionického místa	Hydrofobní interakce	Široká skupina látek – donepezil (piperidinový derivát), huperzin (alkaloid), takrin (tetrahydroakridinový derivát) – léčiva AD Aflatoxiny – plísňové toxiny

Symptomy otravy

- **Nikotinové příznaky**

Působení na autonomní ganglia a kosterní svalovinu – projevuje se svalová ochablost, fascikulace až paralýza svalů, hypertenze.

- **Muskarinové příznaky**

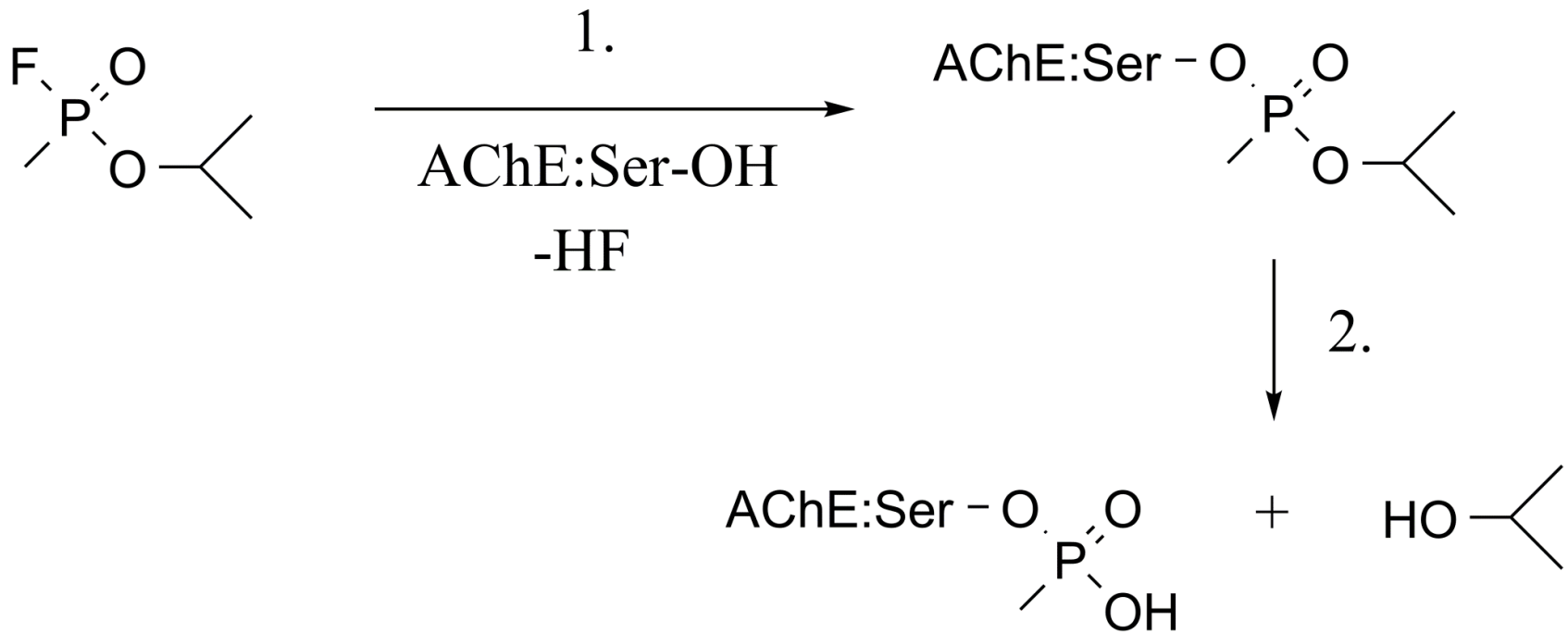
Působení na žlázy – bronchospasmus, pocení, slzení, salivace.

Působení na hladkou svalovinu – miosa, útrobní křeče, průjem, zpomalení srdeční činnosti (bradykardie).

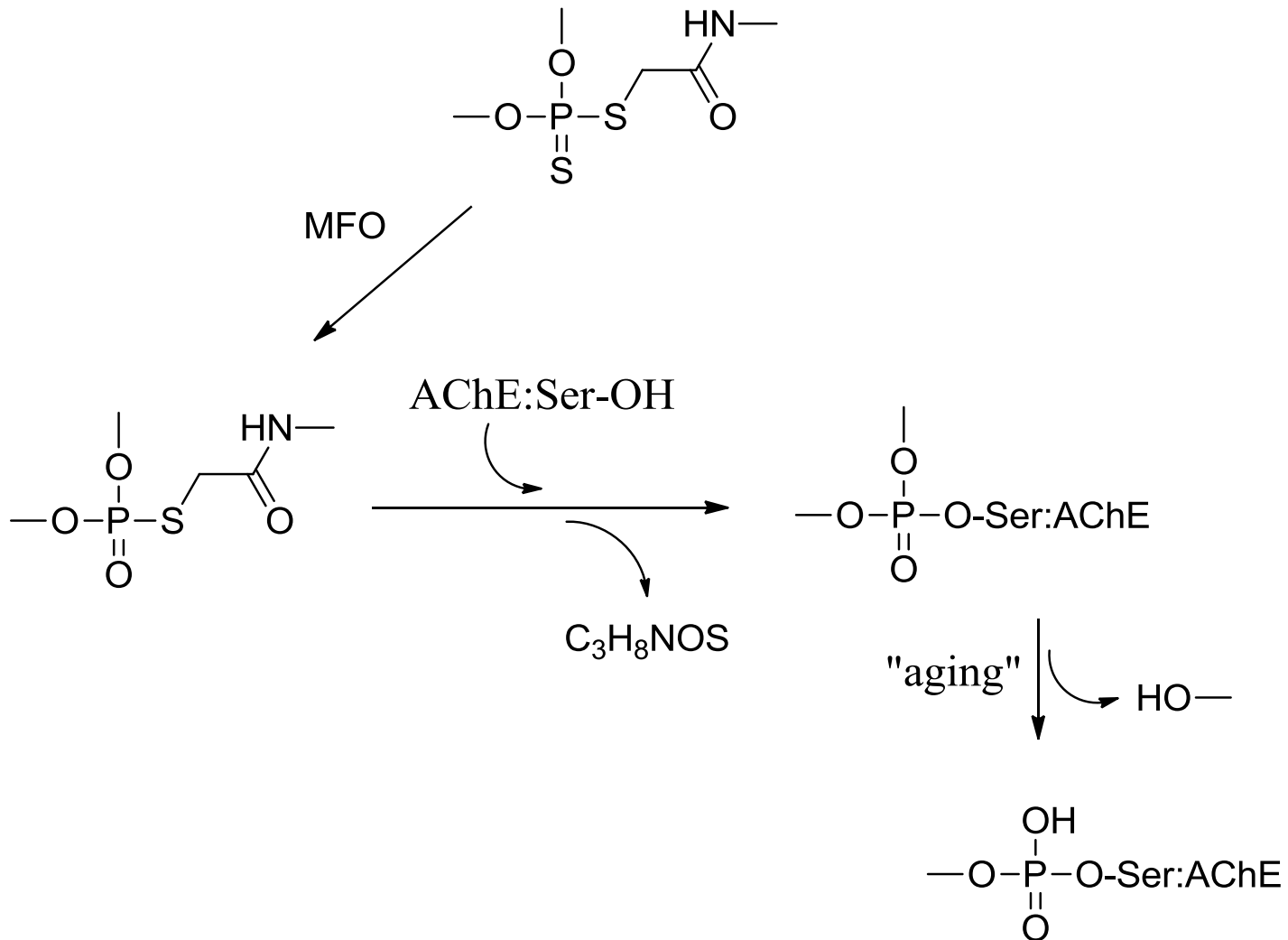
- **Centrální příznaky**

Působení na centrální nervový systém – závratě, stavy úzkosti, nervozita, bolesti hlavy, zmatenost, poruchy koncentrace, konvulze, potíže s dýcháním.

Mechanizmus toxicity sarinu

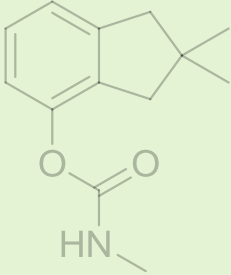
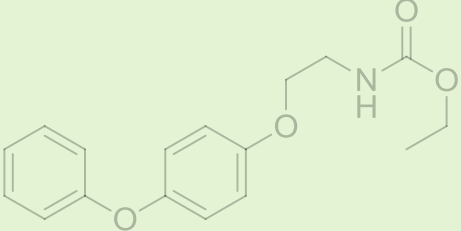
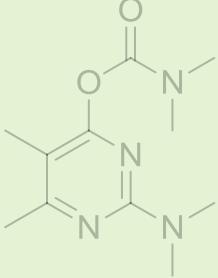


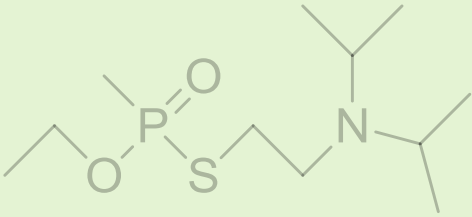
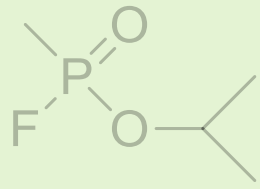
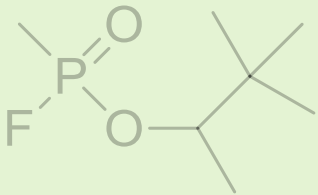
Aktivace dimethoatu a toxicita omethoatu

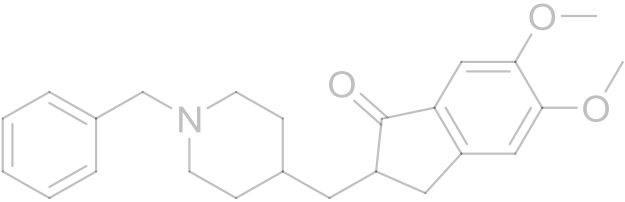
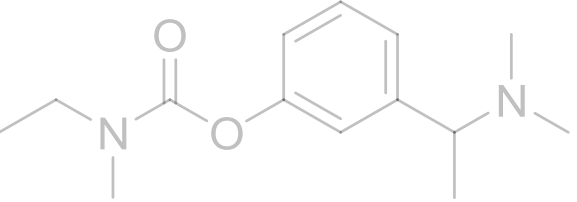
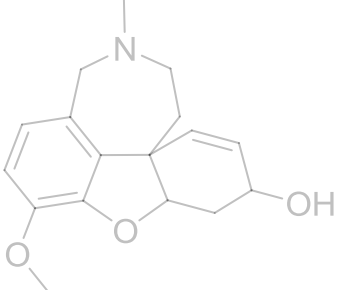


In vitro aktivace

- **Látky inhibující ChE až po metabolické aktivaci je třeba chemicky upravit mají-li být stanoveny pomocí ChE**
- **Doporučený postup – smíšení vzorku s 2 % (w/w) bromovou vodou ($\text{Br}_2/\text{H}_2\text{O}$) 1:1 po dobu 2 – 10 minut**
- **Nevýhodou je poškození ChE užitě v testu**

Inhibitor	LD_{50} (potkan)	Status	Struktura
Karbofuran	8 mg/kg (p.o.) 2 mg/kg (i.p.)	Zakázaný v zemích EU, Kanadě, povolený např. v USA (→kyjatka hrachová)	
Fenoxycarb	16 g/kg (p.o.)	V zemích EU povolený dle směrnice 91/414/EHS a vyhlášky Státní rostlinolékařské správy	
Pirimicarb	147 mg/kg (p.o.)		

Inhibitor	LD_{50} (potkan, i.m./p.o.)	Vlastnosti	Struktura
VX	15 mg/kg 80 μg/kg	Málo těkává, vytváří depa v tukové tkáni	 <p>The chemical structure of VX is a phosphorothioate ester. It features a central phosphorus atom double-bonded to an oxygen atom and single-bonded to a sulfur atom. The phosphorus atom is also bonded to a methyl group and an ethoxy group (-OCH2CH3). The sulfur atom is bonded to a cyclohexyl ring and a dimethylamino group (-N(CH3)2).</p>
Sarin (GB)	200 μg/kg 0,7 mg/kg	Těkavý	 <p>The chemical structure of Sarin is a phosphonofluoridate. It consists of a central phosphorus atom double-bonded to an oxygen atom and single-bonded to a fluorine atom and an isopropoxy group (-OCH(CH3)2). The phosphorus atom is also bonded to a methyl group.</p>
Soman (GD)	70 μg/kg 0,6 mg/kg	Těkavý, rychle dealkylující	 <p>The chemical structure of Soman is a phosphonofluoridate. It consists of a central phosphorus atom double-bonded to an oxygen atom and single-bonded to a fluorine atom and an isopropoxy group (-OCH(CH3)2). The phosphorus atom is also bonded to a methyl group and a tert-butyl group (-C(CH3)3).</p>

Lék	Struktura	Působení	Produkty
Donepezil	 <p>The chemical structure of Donepezil consists of a benzene ring attached to a piperidine ring, which is further connected to a pyrrolidine ring. The pyrrolidine ring is substituted with a 3,4-dimethoxyphenyl group.</p>	<p>Nekompetitivní inhibitor AChE</p>	<p>Aricept</p>
Rivastigmin	 <p>The chemical structure of Rivastigmin features a central benzene ring. It is substituted with a dimethylaminoethyl group, a dimethylcarbamoyloxy group, and a methyl group.</p>	<p>Pseudoireverzibilní inhibitor AChE a BChE</p>	<p>Exelon</p>
Galantamin	 <p>The chemical structure of Galantamin is a complex polycyclic system. It includes a central benzene ring fused to a five-membered ring containing an oxygen atom and a nitrogen atom. It also features a hydroxyl group and a methoxy group on the benzene ring.</p>	<p>Kompetitivní inhibice AChE</p>	<p>Nivalin, Razadyne, Reminyl ...</p>

Organická rozpouštědla

Pokles aktivity AChE oproti PBS (%)		
<i>rozpouštědlo</i>	<i>5 % (v/v)</i>	<i>10 % (v/v)</i>
DMSO	63	74
Metanol	27	43
Etanol	29	39
Propan-1,2-diol	13	23
Propan-2-ol	5	20
Atenonitril	34	54

Využití v diagnostice

- **BChE – test funkčnosti jater, hypocholinesterasemie nastává při akutních hepatitidách a jaterních cirhózách**
- **BChE u hypocholinesterasemie dobře koreluje s ostatními jaterními markery (albumin, AST, ALT)**
- **Hypercholinesterasemie může indikovat rakovinu jater**

Využití v diagnostice

- **AChE (autopsie, krev), BChE (plasma) – diagnostika otravy IREVERZIBILNÍM a PSEUDOIREVERZIBILNÍM inhibitorem**
- **Testování účinnosti kauzativní léčby oximovými reaktivátory – pouze stanovení aktivity krevní AChE**

Využití v diagnostice

- **BChE majoritní populace obsahuje Asp 70, existuje K varianta s Gly 70. Kavkazský region: homozygot Gly 70: (poměr 1/63)**
- **Obě varianty se téměř neliší schopností štěpit užívané substráty jako např. butyrylcholin, benzoylcholin, nitrofenylbutyrát**

Využití v diagnostice

- Jedinci s K variantou BChE neštěpí svalový relaxant sukcinylcholin a mivakurium
- Jedince s K variantou BChE lze rozlišit snadno pomocí dibkainového (DN) nebo fluoridového (FN) čísla – procenta inhibice enzymu
- A homozygot ($DN \geq 75$), K homozygot ($DN < 20$), heterozygot ($DN \sim 40 - 70$)

ChE biosenzory

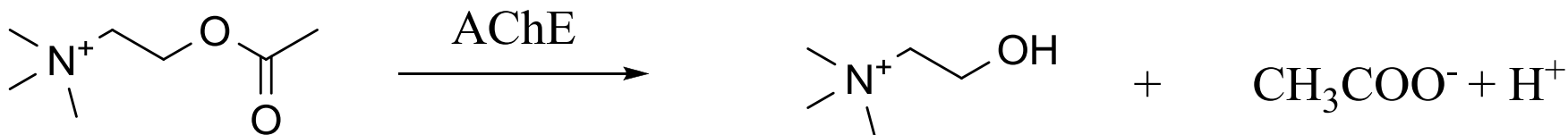
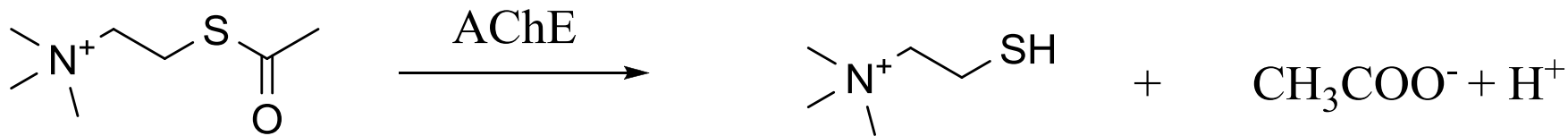
- **Biosenzor = zařízení těsně spojující biorekogniční element a fyzikálně chemický převodník.**
- **Biosenzory využívající cholinesterasy jsou analytická zařízení pro stanovení přítomnosti inhibitorů těchto enzymů.**
- **Inhibitory cholinesteras jsou neurotoxické látky.**
- **Díky inhibici cholinesteras in vitro lze dokázat přítomnost inhibitoru.**
- **Míra inhibice odpovídá afinitě inhibitoru vůči cholinesterase a zároveň jeho koncentraci.**

Stanovení aktivity

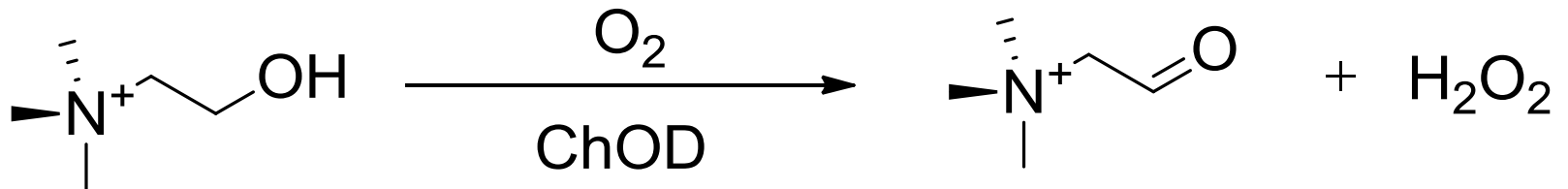
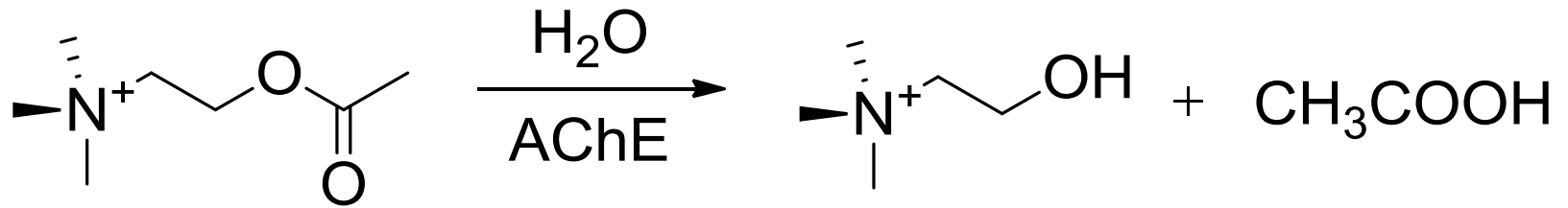
Metody sledování aktivity cholinesteras vhodné pro konstrukci biosenzorů a diagnostiku:

- **Sledování acidifikace média díky uvolňování kyseliny octové z acetylcholinu**
- **Oxidace cholinu na betain cholinoxidasou s následným stanovením peroxidu vodíku**
- **Ellmanova reakce**
- **Použití indoxylacetátu**
- **Použití 2,6-dichlorfenolindofenol acetátu**
- **Použití acetylthiocholinu jako substrátu s následnou elektrochemickou detekcí**

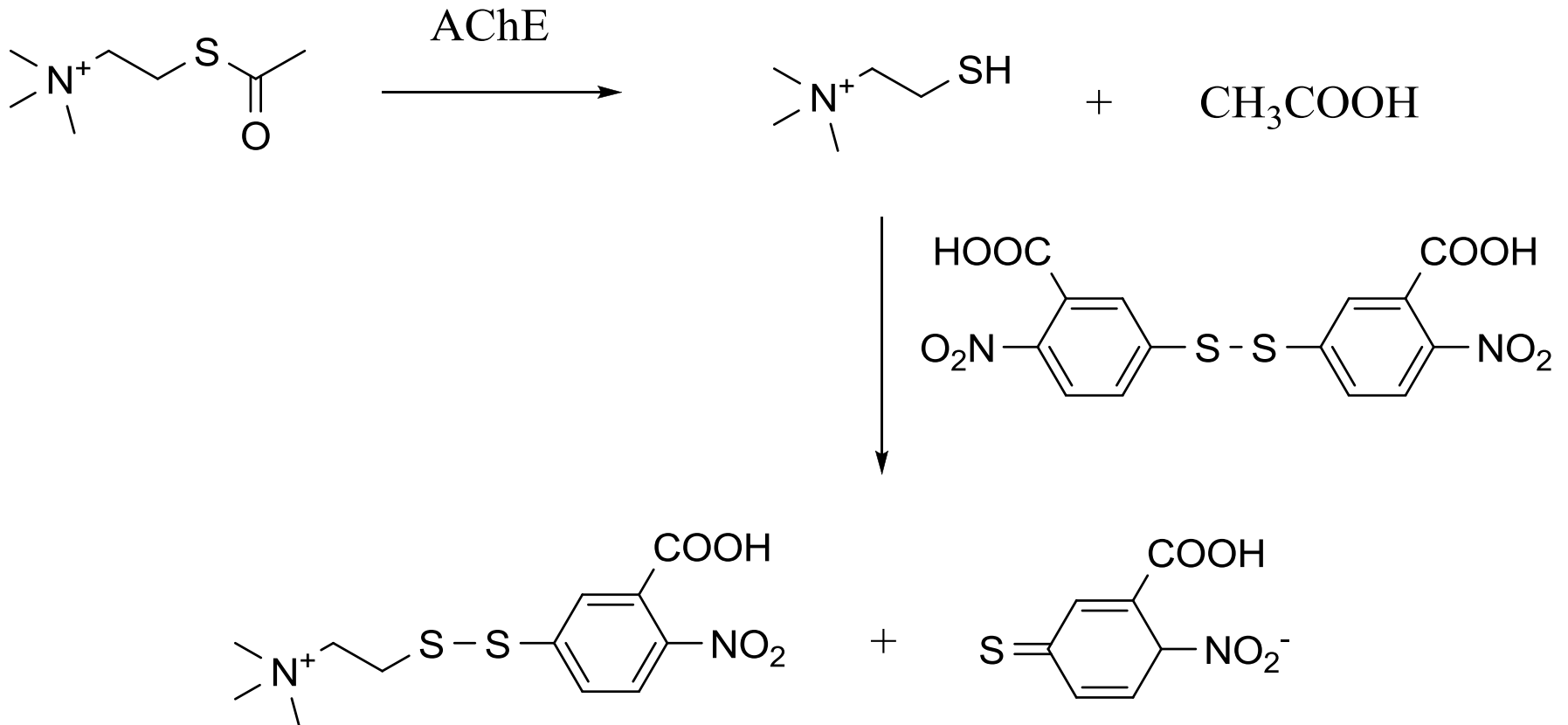
Jednoduchá hydrolýza



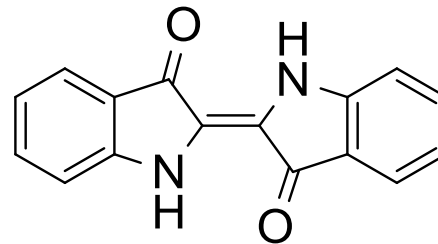
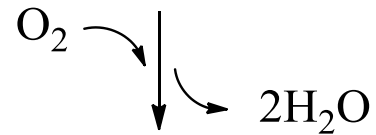
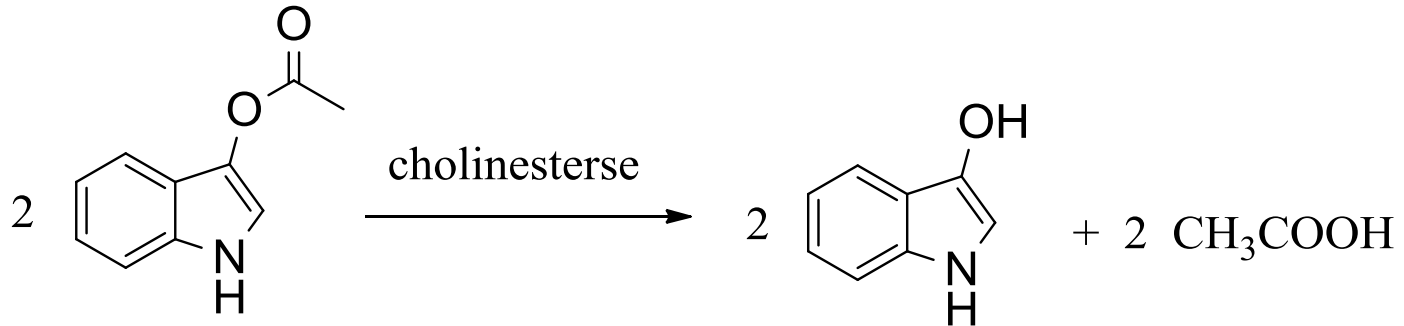
Aplikace cholinokidasy



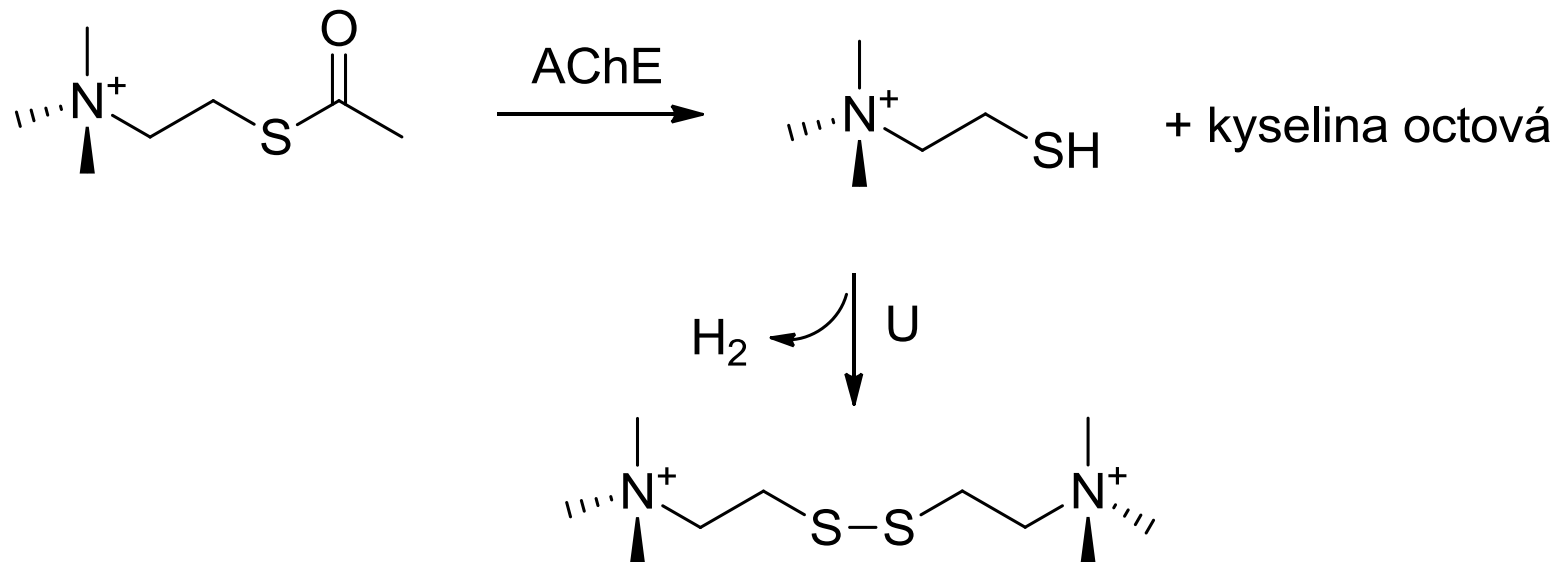
Ellmanova metoda



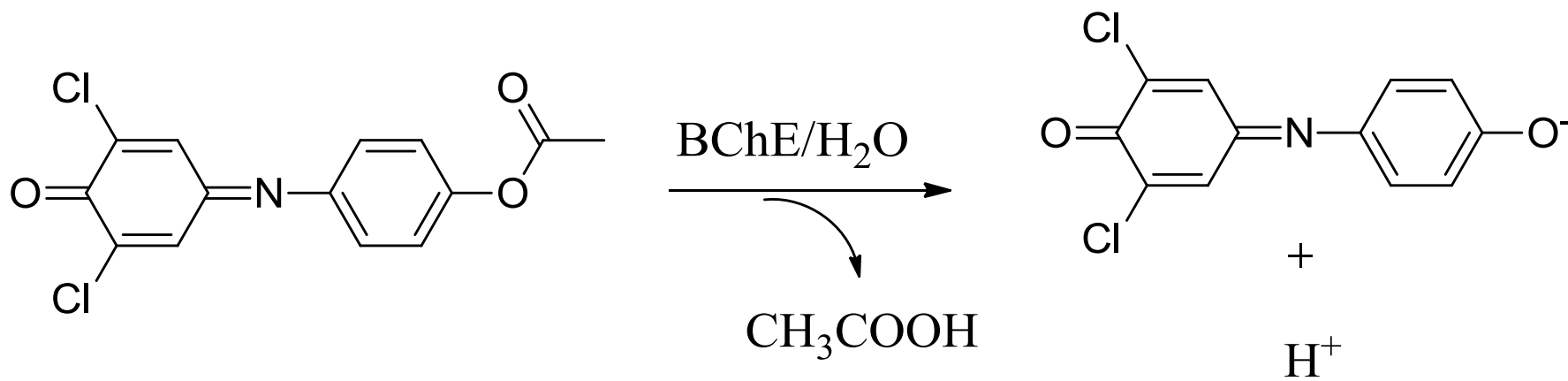
Indoxylacetát



Elektrochemie

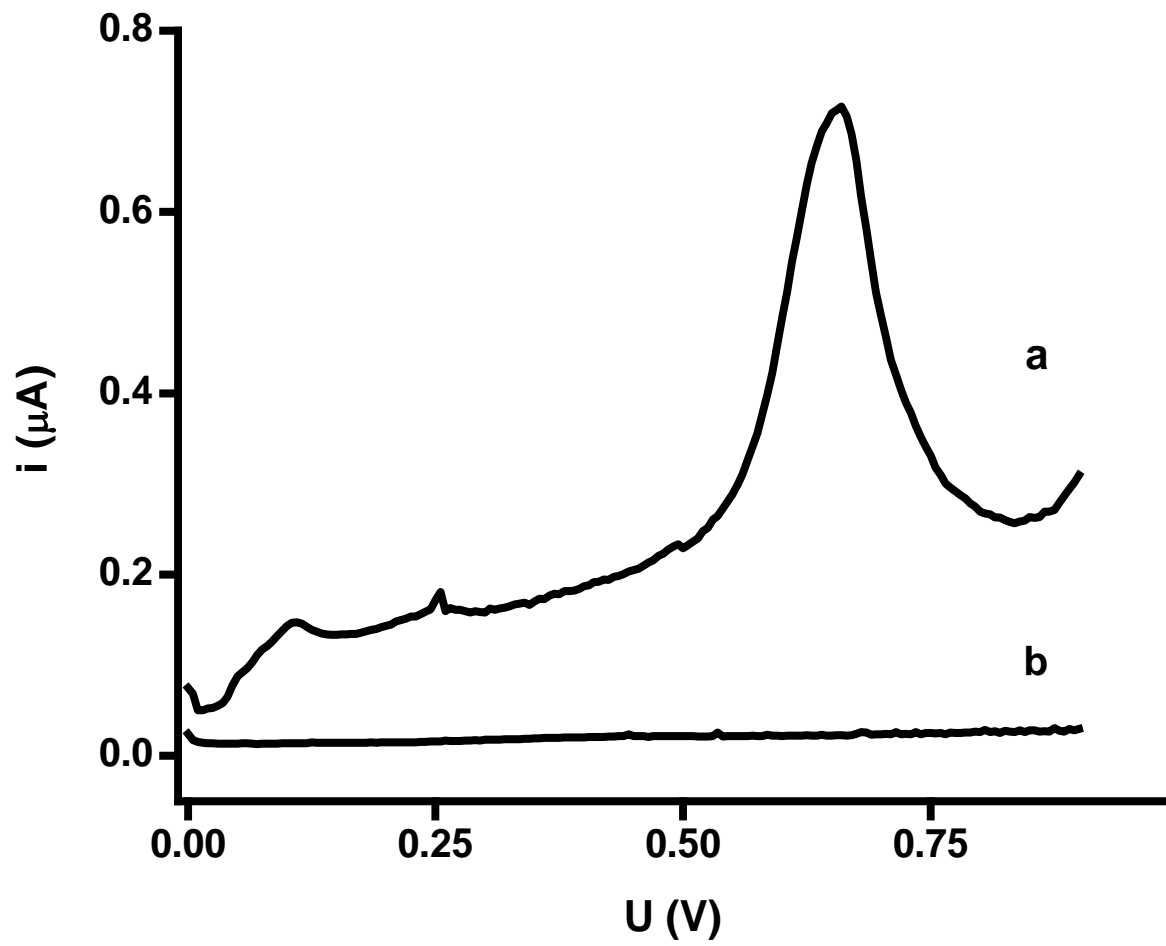


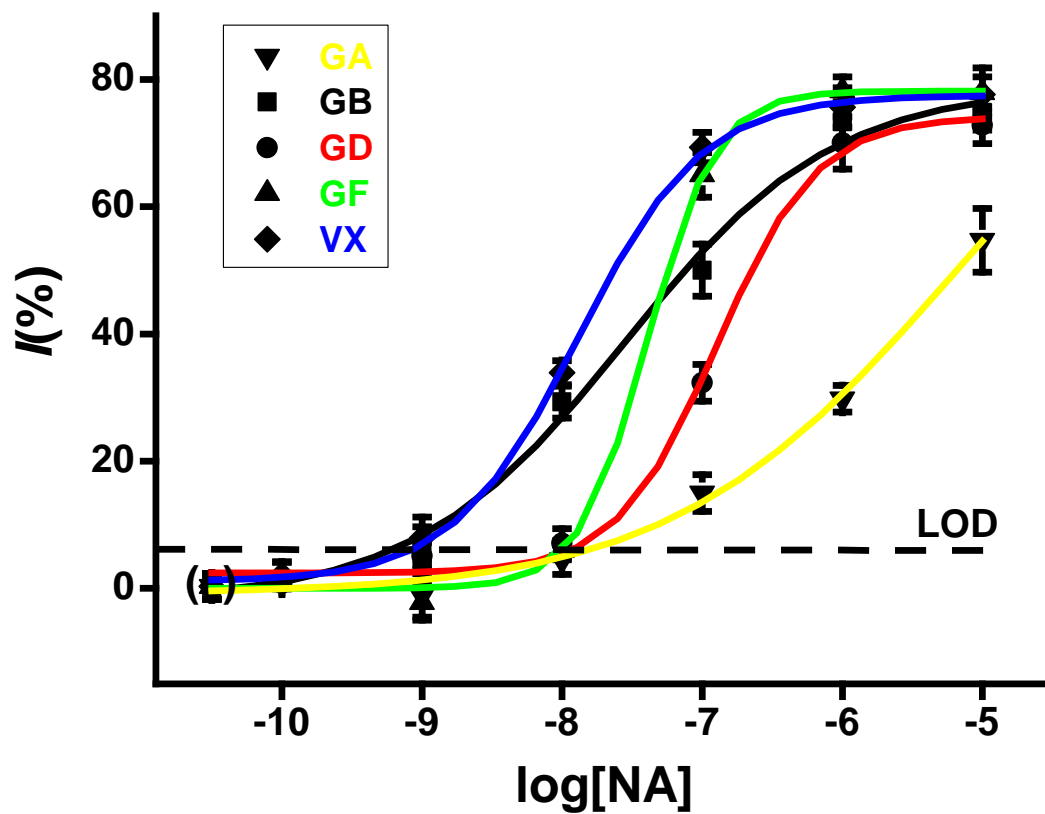
2,6-dichlorofenolindofenol acetát



Příklady

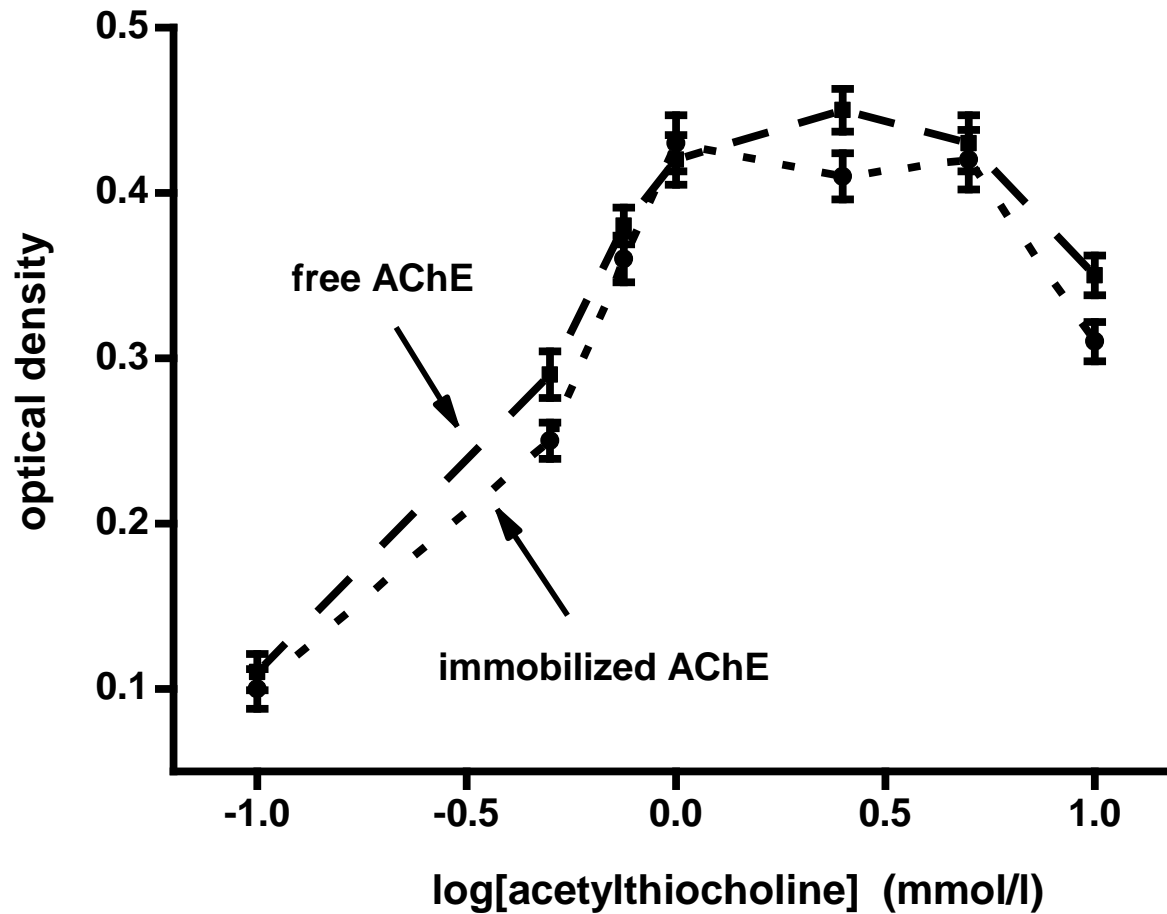
- **Elektrochemické biosenzory s AChE**
- **Spektrofotometrický detektor s AChE**
- **Spektrofotometrické stanovení BChE v diagnostice**



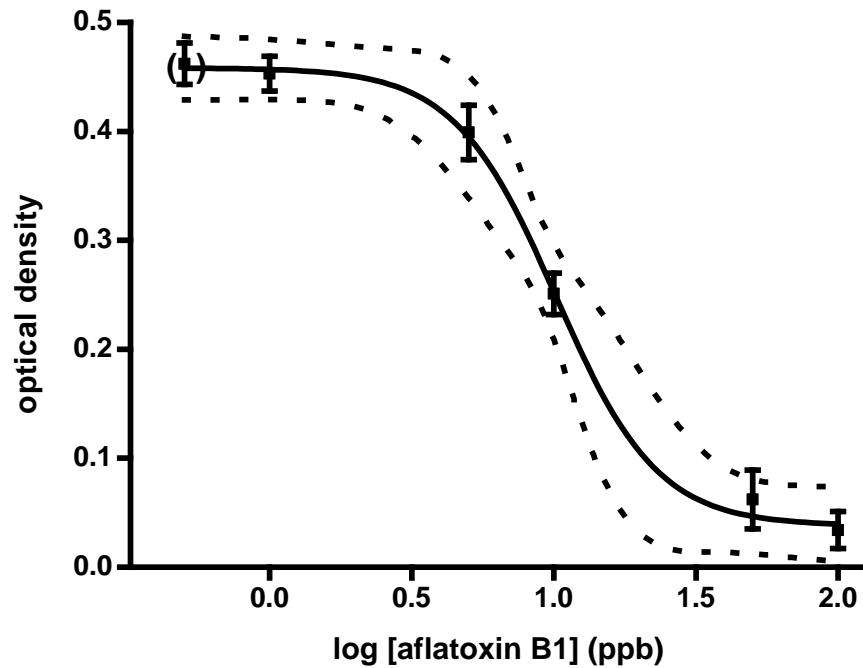


	<i>Tabun (GA)</i>	<i>Sarin (GB)</i>	<i>Soman (GD)</i>	<i>Cyclosarin (GF)</i>	<i>VX</i>
LOD (mol/l)	1.48×10^{-8}	5.88×10^{-10}	1.07×10^{-8}	9.12×10^{-9}	8.51×10^{-10}

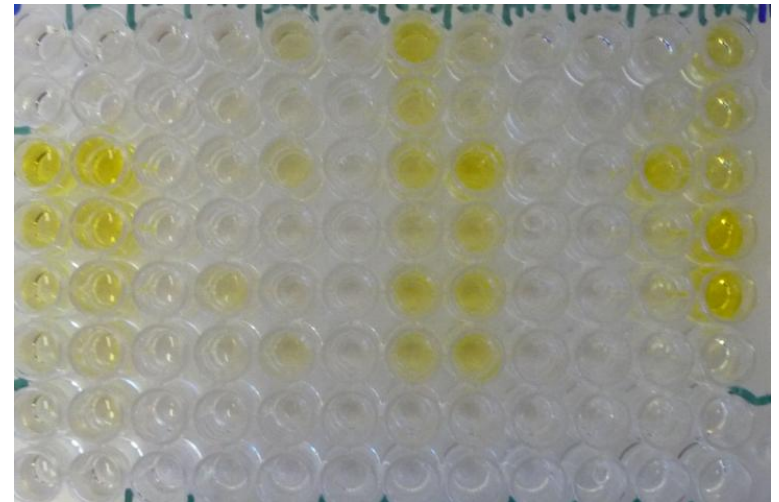
Příklad - spektrofotometrie



Příklad - spektrofotometrie



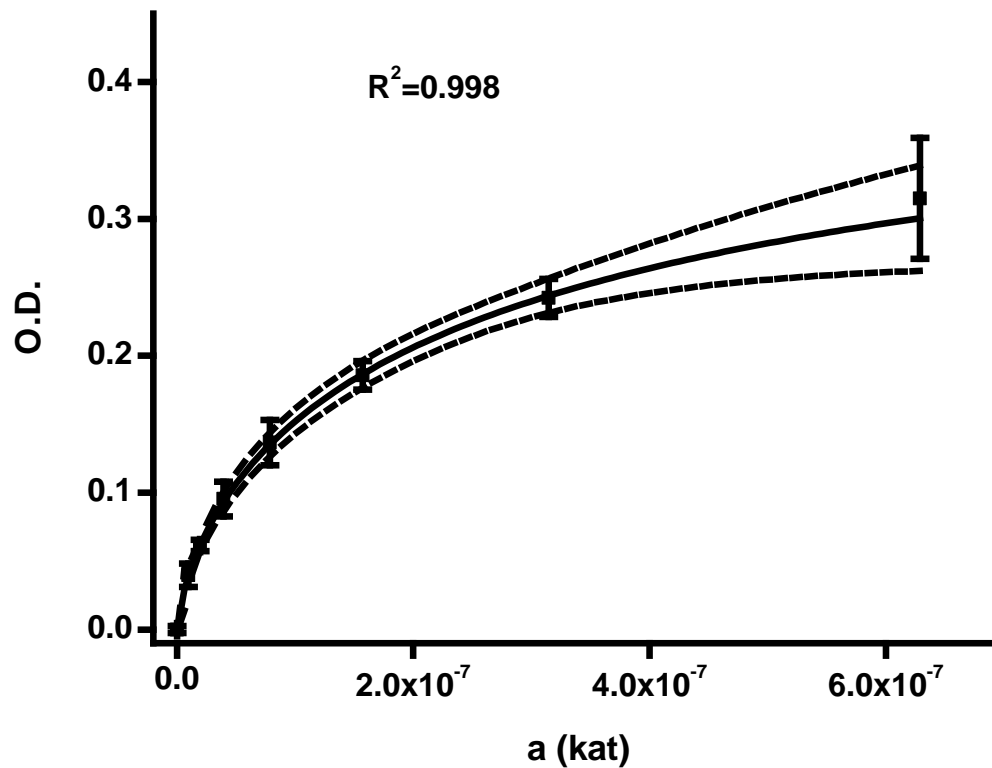
	<i>AFB1 (ppb)</i>	<i>Paraoxon</i>
LOD (ppb)	2,75	32,0



Pohanka Analytical Letters 2011; 44: 1254-1264

Pohanka et al. Turkish Journal of Chemistry 2010; 34: 91-98

Příklad - diagnostika



	<i>Ellman</i>	<i>Indoxylacetát</i>	<i>DPIPA</i>
LOD (nkat)	3,41	9,22	1,20

Literárně popsané limity detekce

<i>Imobilizační postup</i>	<i>Analyzovaná látka</i>	<i>Limit detekce</i>	<i>Reference</i>
Prostá sorpce na Pt elektrodu	DFP	35 nmol/l	Anal. Lett. 44, 1254 (2011)
Precipitace glutaraldehydem na Pt elektrodu		29 nmol/l	
Afinitní zachycení histidinovou kotvou na nikové nanočástice	paraoxon ethyl	1 pmol/l	Biosens. Bioelectron. 30, 43 (2011)
Vazba na zlaté nanočástice	Malathion chlorpyrifos	1 nmol/l	Int. J. Biol. Macromol. 49, 923 (2011)

Závěr

- **AChE je vhodným rekogničním elementem pro konstrukci elektrochemických biosenzorů.**
- **BChE je vhodným doplňkovým markerem v biochemii.**
- **Při konstrukci biosenzoru je třeba zvládnout kvantitativně navázat AChE na fyzikálně chemický převodník a zajistit dostatečnou stabilitu s ohledem na cenu enzymu (~ 10 – 1000 Kč).**

Děkuji za Vaši pozornost