

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### STANOVENÍ HLADINY ACETYLCHOLINU A CHOLINU V HIPPOKAMPU POTKANA KAPALINOVOU CHROMATOGRafiÍ S ELEKTROCHEMICKOU DETEKcí

MARCELA BIELAVSKÁ a JIŘÍ KASSA\*

*Katedra toxikologie, Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyňe, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové  
e-mail: kassa@pmfhk.cz, bielavska@pmfhk.cz*

Došlo 29.3.02, přepracováno 1.3.03, přijato 11.5.03.

**Klíčová slova:** kapalinová chromatografie, elektrochemická detekce, acetylcholin, cholin, soman, hippokampus, atropin, obidoxim, HI-6

### Úvod

Kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí je rychlou, selektivní a citlivou metodou pro stanovení hladin acetylcholinu (ACh) a cholinu (Ch) v tkáních a mikrodialyzátech<sup>1-6</sup>. Detekci ACh a Ch umožňuje použití postkolonového reaktoru, který obsahuje imobilizované enzymy cholinoxidasy a acetylcholinesterasy (AChE) (cit.<sup>6</sup>). Maximální účinnosti daných enzymů je dosaženo při teplotách v rozmezí 35 °C až 37 °C a pH v rozmezí 8,0 až 8,5.

V předložené práci byly cholin a acetylcholin nejprve rozděleny na analytické kolony s reverzní fází. Poté byl acetylcholin hydrolyzován imobilizovanou AChE na cholin a octovou kyselinu a cholin enzymaticky oxidován imobilizovanou cholinoxidasou na betain a peroxid vodíku (obr. 1) ve výše uvedeném reaktoru. Peroxid vodíku byl detegován amperometricky.

Tato metoda byla využita ke srovnání účinku dvou reaktivátorů AChE, obidoximu a oximu HI-6, v kombinaci s atropinem, vůči vysoce toxickému organofosfátu (OF) somanu (3,3-(dimethylbuten-2-yl)-methylfosfonofluoridát), jenž představuje největší nebezpečí pro člověka v případě použití chemických zbraní za válečné situace nebo při teroristických akcích. Ireverzibilní inhibice AChE s následnou akumulací

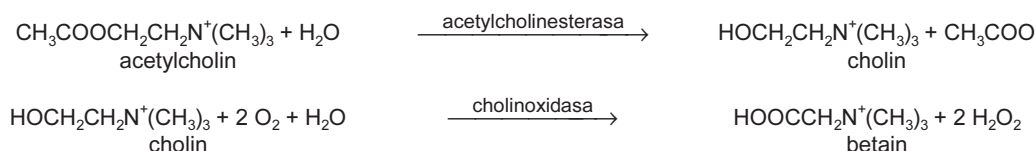
ACh na periferních i centrálních cholinergních synapsích vede k nadměrné stimulaci cholinergního nervového systému, jež je pokládána za hlavní mechanismus toxického účinku těchto nox<sup>7-8</sup>. Současná antidotní terapie otrav OF sloučeninami obvykle spočívá v kombinovaném podání anticholinergní látky (nejčastěji atropin) a oximu (obvykle pralidoxim, obidoxim nebo oxim HI-6). Anticholinergní látky blokují účinky nahromaděného ACh na muskarinových cholinergních receptorech, zatímco oximy, látky s nukleofilními vlastnostmi, obnovují aktivitu inhibované AChE defosforylací enzymu<sup>7,9</sup>. Reaktivní účinnost oximů je obvykle hodnocena měřením aktivity AChE po intoxikaci OF sloučeninou a následné antidotní terapii<sup>9</sup>. Nicméně stanovení hladiny ACh se ukazuje jako přesnější metoda vyhodnocení terapeutické účinnosti oximu, protože právě akumulace ACh na cholinergních synapsích způsobuje nadměrnou stimulaci cholinergního nervového systému, jež je odpovědná za akutní toxické účinky OF sloučenin. Proto je tato fáze otravy též nazývána „akutní cholinergní krize“.

Jedno z nejvýznamnějších poškození způsobené otravou somanem je degenerace mozkové tkáně v oblasti hippokampu, jenž tvoří morfologický substrát pro kognitivní funkce. Proto také narušení kognitivních funkcí jako je pozornost, učení a paměť patří mezi nejčastější centrální příznaky akutní otravy OF sloučeninami<sup>7</sup>. Metoda HPLC spojená s elektrochemickou detekcí byla proto využita ke stanovení hladin ACh v hippokampu somanem otrávených potkanů za účelem vyhodnocení terapeutické účinnosti vybraných oximů (obidoxim, oxim HI-6).

### Experimentální část

#### Přístroje a zařízení

Chromatografický systém byl sestaven z gradientového čerpadla SpectraSERIES model P200 (Spectra-Physics, Fremont, USA), vysokotlakého dávkovače s 10 µl smyčkou model 7125 (Rheodyne, Cotati, USA), analytické kolony ACH-3(RP-POLY/C18; 5 µm), 150 mm × 3 mm i.d. (ESA, Bedford, USA), za ní umístěného reaktoru se zakotvenou tuhou fází, naplněného imobilizovanými enzymy cholinoxidasou a acetylcholinesterasou (ESA, Bedford, USA) a multielektrodového detektoru s analytickou celou a platinovou pomocnou elektrodou Coulochem II, model 5040 (ESA, Bedford, USA).



Obr. 1. Schéma hydrolýzy acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou a enzymatické přeměny cholinu na betain a peroxid vodíku

\* Autor pro korepondenci

Homogenizace byla prováděna na homogenizátoru X 520 CAT (SRN).

Chromatogramy byly zpracovány Chromatografickou stanicí pro Windows (CSW), verze 1.7 (Data Apex, Praha, Česká republika).

Mobilní fáze obsahovala 100 mmol.l<sup>-1</sup> hydrogenfosforečnanu sodného, 2 mmol.l<sup>-1</sup> natrium-oktyl-sulfátu a 0,005 % antimikrobiálního činidla MB. Konečné pH bylo nastaveno na 8,0 koncentrovanou (850 g.l<sup>-1</sup>) kyselinou trihydrogenfosforečnou<sup>6</sup>. Fáze byla vakuově filtrována filtrem 0,45 μm HV (Millipore, Bedford, USA). Průtok mobilní fáze byl 0,35 ml.min<sup>-1</sup>, teplota 35 °C. Kolona byla kondicionována mobilní fází nejméně 10 hodin před použitím. Potenciál pracovní elektrody byl +500 mV.

### Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. nebo pro HPLC. Cholin-chlorid (Ch) a acetylcholin-chlorid (ACh) byly získány od firmy Fluka, antimikrobiální činidlo MB od ESA (Bedford, USA); kyselina fosforečná, kyselina chloristá, 3-(dimethylamino)propan-1-ol a ethyljodid od firmy Merck. Ethylhomocholin (interní standard, ISTD) byl připraven známým postupem<sup>1</sup>. Pro přípravu mobilní fáze a roztoků standardů byla použita voda čištěná reverzní osmózou (Aqua 50, Goro, Česká republika).

### Příprava standardů

Zásobní roztoky standardních látek Ch, ACh a ISTD (každý 0,3 mg.ml<sup>-1</sup>) byly připraveny v 0,1 mol.l<sup>-1</sup> kyselině chloristé a uchovávány při -70 °C 1 týden. Pracovní roztoky (15–3000 ng.ml<sup>-1</sup>) byly připravovány každý den ředěním zásobních roztoků 0,1 mol.l<sup>-1</sup> kyselinou chloristou.

### Příprava vzorků

Mozek potkana byl ihned po vyjmutí zmražen kapalným dusíkem a uchováván v mrazícím boxu při -70 °C do dalšího zpracování. Vypreparovaný hippokampus byl zvážěn a převeden do skleněné centrifugační zkumavky obsahující 1 ml 0,1 mol.l<sup>-1</sup> kyseliny chloristé s obsahem 2100 ng ISTD. Po homogenizaci a centrifugaci při 4 000 g po dobu 10 min byla reakční směs filtrována filtrem Millipore (0,45 μm). 10 μl supernatantu bylo následně dávkováno do HPLC systému.

Koncentrace ACh a Ch byly stanoveny metodou kalibrační křivky.

### Biologický experiment

Samci potkana kmene SPF o hmotnosti 160–200 g byli zakoupeni od VÚFB Konárovice, rozdělení do skupin po 6 zvířatech a intoxikováni i.m. subletální dávkou somanu (60 μg.kg<sup>-1</sup>, 75 % LD<sub>50</sub>), který byl získán od Vojenského technického ústavu v Zemianských Kostolanech (Slovensko). Za jednu minutu po otravě somanem byla potkanům podána i.m. kombinace jednoho ze zvolených oximů s atropinem v dávkách odpovídajících 2 % hodnoty LD<sub>50</sub> (cit.<sup>10</sup>).

Potkani byli usmrceni dekapitací 1 h nebo 24 hodin po podání somanu a jejich mozky byly po vyjmutí ihned zmraže-

ny v kapalném dusíku. Pokus na zvířeti byl povolen příslušnou Etickou komisí LF UK a VLA JEP v Hradci Králové.

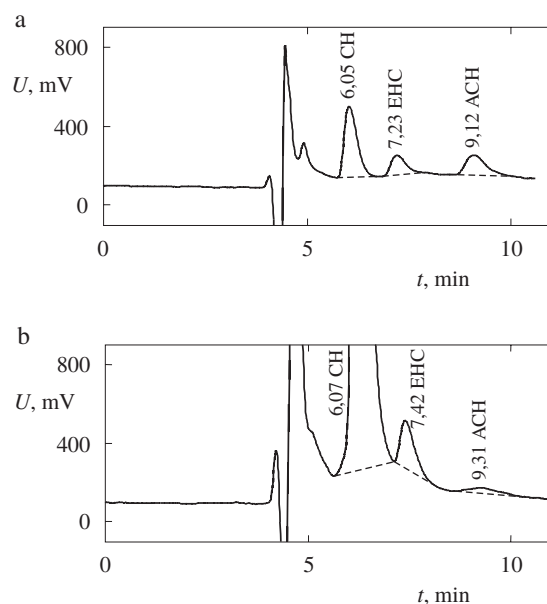
### Statistické zpracování výsledků

Získané experimentální údaje byly srovnávány s kontrolními údaji získanými od kontrolních potkanů, kterým byl místo somanu a antidot podáván fyziologický roztok ve stejném objemu. Statistická významnost byla počítána nepárovým Studentovým *t*-testem na hladině významnosti 95 % ( $P < 0,05$ ) (cit.<sup>11</sup>).

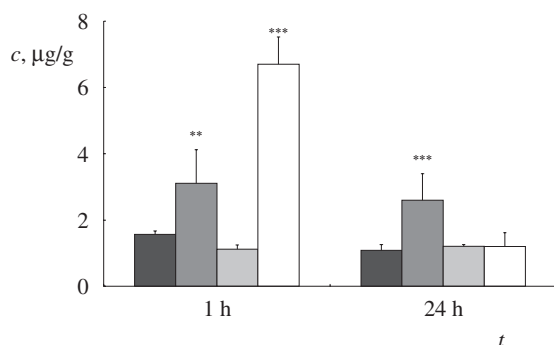
### Výsledky a diskuse

Typické chromatogramy roztoků standardů ACh, Ch a ISTD v kyselině chloristé a chromatogramy stejných substancí ve vybraných částech mozku potkana jsou uvedeny na obrázku 2. Lineární odezva každého standardu byla nalezena v koncentračním rozmezí 0,15–30 ng/10 μl ( $r > 0,998$ ,  $n = 6$ ). Detekční limit ( $S/N = 3$ ) byl 0,15 ng/10 μl. Analytická výtěžnost pro každou substanci byla vypočtena porovnáním jejich koncentrací nalezených v homogenátu vzorku hippokampu s přidáním známým množstvím detegovaných substancí s jejich koncentrací ve vzorcích obsahujících stejnou množství těchto substancí v kyselině chloristé v téže objemu. Relativní výtěžnost 2100 ng.ml<sup>-1</sup> ACh, Ch a ISTD z homogenátu hippokampu byla 89,8 ± 1,8 %, 93,4 ± 2,8 % a 91,6 ± 1,6 % (průměr ± směrodatná odchylka,  $n = 9$ ).

Srovnání kontrolních a experimentálních hladin ACh ve vybrané části mozku potkana po 1 a 24 hodinách po otravě somanem a následné antidotní terapii je znázorněno na obr. 3. Zatímco soman způsobil statisticky významné zvýšení hladiny ACh v hippokampu potkana za 1 hodinu i 24 hodin po otravě ( $P < 0,01$ ), akumulaci ACh způsobenou somanem oxim



Obr. 2. Chromatogram standardních vzorků o koncentraci 7 ng/10 μl (a) a extraktu tkáně hippokampu (b); ACh – acetylcholin, EHC – ethylhomocholin, CH – cholin.



Obr. 3. Změny koncentrace acetylcholinu (průměr ± směrodatná odchylka) v hippocampu potkana za 1 h a 24 h po i.m. podání somanu a antidotní terapie. První sloupec představuje kontrolní hodnoty, druhý sloupec neléčenou otravu somanem, třetí sloupec otravu somanem léčenou oximem HI-6 a atropinem a čtvrtý sloupec hodnoty koncentrace acetylcholinu po otravě somanem léčené obidoximem a atropinem. Statistická významnost: \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

HI-6 v obou sledovaných časových intervalech zcela eliminoval. Naproti tomu obidoxim eliminoval somanem navozenou akumulaci ACh teprve 24 h po otravě. V akutní fázi otravy (1 h po podání somanu) byla hladina ACh v hippocampu potkana v případě otravy somanem léčené atropinem a obidoximem ještě vyšší než v případě neléčené otravy ( $P < 0,001$ ), jak je patrné z obr. 3.

Naše výsledky potvrdily, že oxim HI-6 je schopen eliminovat somanem způsobenou akumulaci ACh nejen na periférii, ale také v mozku<sup>10,12</sup>. Zdá se tedy, že oxim HI-6 je schopen při systémovém podání v lidských dávkách proniknout do mozku přes hemato-encefalickou bariéru v koncentraci schopné vyvolat terapeutický účinek zabraňující statisticky významným způsobem centrálním toxickým účinkům somanu<sup>13</sup>. Na druhé straně v současnosti používaný obidoxim je v dávkách odpovídajících 2 % hodnoty LD<sub>50</sub> nejen prakticky neschopen eliminovat somanem indukovanou akumulaci ACh během akutní fáze otravy (do 1 h po expozici somanu)<sup>10,12</sup>, ale dokonce akumulaci ACh a tím i hyperstimulaci cholinergního nervového systému ještě více vyvolává ve srovnání s neléčenou otravou somanem. To odpovídá dříve publikovaným výsledkům dokumentujícím, že obidoxim, je-li použit jako antidotum proti otravě somanem, může paradoxně zvýšit intenzitu somanem vyvolaných akutních klinických cholinergních příznaků včetně klinických projevů neurotoxicity<sup>14</sup>. To znamená, že obidoxim rozhodně není vhodným oximem pro terapii akutních otrav somanem, neboť je terapeuticky neúčinný a navíc snižuje pozitivní terapeutický přínos atropinu, s kterým je obvykle podáván<sup>14</sup>. Měl by proto být nahrazen oximem HI-6, který se jeví jako relativně účinný oxim, zabraňující v případě akutní subletální otravy somanem akumulaci ACh a následným klinickým cholinergním příznakům<sup>10,15,16</sup>.

## Závěr

Kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí využívající elektrochemický detektor Coulochem II se ukáza-

la jako dostatečně citlivá metoda k detekci změn hladin ACh v mozku vyvolaných somanem, které nejpřesněji prokáží nejen samotnou expozici organismu inhibitorům AChE jako jsou organofosfáty včetně somanu, ale pomohou i odhadnout závažnost expozice, prognózu akutní otravy a efekt použité antidotní terapie.

Autoři děkují Ing. J. Bielavskému za syntézu ethylhomocholinu a paní I. Ježkové a J. Petrové za technickou spolupráci.

## LITERATURA

- Potter P. E., Meek J. L., Neff N. H.: *J. Neurochem.* 41, 188 (1983).
- Damsma G., Westerink B. H. C., Horn A. S.: *J. Neurochem.* 45, 1649 (1985).
- Ikarashi Y., Blank C., Suda Y., Kawakubo T., Maruyama Y.: *J. Chromatogr., A* 718, 267 (1995).
- Yasumatsu M., Yazawa T., Otokowa M., Kuwasawa K., Hasegawa H., Aihara Y.: *Comp. Biochem. Physiol., A: Physiol.* 121, 13 (1998).
- Tsai T.-H.: *J. Chromatogr., B* 747, 111 (2000).
- ESA Application note: Acetylcholine in Brain Microdialysates. ESA, Chelmsford 2000.
- Marrs T. C.: *Pharmacol. Ther.* 58, 51(1993).
- Taylor P.: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw Hill, New York 1996.
- Dawson R. M.: *J. Appl. Toxicol.* 14, 317 (1994).
- Kassa J., Cabal J.: *Toxicology* 132, 111 (1999).
- Eckschlager K.: *Chyby chemických rozborů*. SNTL, Praha 1971.
- Kassa J.: *Toxicology* 101, 167 (1995).
- Clement J. G.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 112, 104 (1992).
- Kassa J., Koupilová M.: *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67, 663 (2000).
- Shih T.-M.: *Arch. Toxicol.* 67, 637 (1993).
- van Helden H. P. M., Busker R. W., Melchers B. P. C., Buijnzeel P. L. B.: *Arch. Toxicol.* 70, 779 (1996).

**M. Bielavská and J. Kassa** (*Department of Toxicology, Purkyně Military Medical Academy, Hradec Králové, Czech Republic*): **Determination of Acetylcholine and Choline in the Rat Hippocampus by HPLC with Electrochemical Detection**

A rapid, selective and sensitive method for simultaneous determination of acetylcholine and choline in the rat hippocampus was developed. Hippocampus samples with an internal standard were deproteinized with perchloric acid. After homogenization, centrifugation and filtration, the supernatant was directly injected into an isocratic HPLC system with electrochemical detection and a post-column enzyme reactor. The response to the detected substances was linear in the range 0.15–30 ng/10 µl. Total recovery of the method was higher than 90 %. The method was used for the determination of acetylcholine in the hippocampus of rats poisoned with Soman and treated with a combination of atropine and an oxime (obidoxime or oxime HI-6).