

## **OBSAH:**

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
2	ÚVOD.....	8
3	CÍL PRÁCE.....	10
4	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
4.1	Struktura nervově paralytických látek (NPL).....	11
4.2	Fyzikálně-chemické vlastnosti a toxicita vybraných NPL.....	12
4.3	Brány vstupu NPL do organismu.....	13
4.4	Mechanismus účinku NPL.....	13
4.5	Distribuce, biotransformace a eliminace NPL.....	15
4.6	Příznaky otrav NPL.....	16
4.7	Diagnóza otrav NPL.....	17
4.8	Jednotlivé metody pro stanovení intoxikace.....	18
4.9	Terapie otrav NPL.....	19
4.9.1	Obecné zásady terapie otrav NPL.....	20
4.9.2	Anticholinergika.....	20
4.9.3	Reaktivátory.....	20
4.9.4	Doplňková terapie otrav NPL.....	21
4.10	Odmořování otravných látek (OL).....	22
4.10.1	Principy odmořování.....	22
4.10.2	Individuální protichemický balíček vzor 80 (IPB-80).....	23
4.11	První pomoc při zasažení NPL.....	24
5	MATERIÁL A METODIKA.....	25
5.1	Zvířata.....	25
5.2	Chemikálie.....	26
5.3	Stanovení aktivity cholinesteráz.....	26

5.4	Odmořovací rukavice.....	27
5.5	Experimentální postupy na zvířatech.....	28
5.6	Statistické zpracování výsledků.....	30
6	VÝSLEDKY .....	31
7	DISKUSE.....	40
8	ZÁVĚR .....	46
9	SOUHRN.....	47
10	SUMMARY.....	48
11	POUŽITÁ LITERATURA .....	49

# UNIVERZITA KARLOVA



## FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

DIPLOMOVÁ PRÁCE

### STANOVENÍ AKTIVITY ACETYLCHOLINESTERÁZY V MOZKU POTKANA PO INTOXIKACI LÁTKOU VX A NÁSLEDNÉM ODMOŘENÍ

DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN  
THE RAT BRAIN AFTER VX INTOXICATION AND FOLLOWING  
DECONTAMINATION

Hradec Králové 2007

Zpracovala: **Pavla Šubrtová**

Školitelé: **Doc. Mudr. Josef Herink, DrSc.**

**Mgr. Lucie Bartošová, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelů Doc. MUDr. Josefem Herinkem, DrSc. a Mgr. Lucie Bartošové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum:

Podpis:

Tato diplomová práce vznikla v laboratořích fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové ve spolupráci s Mgr. Lucií Bartošovou, Ph.D.

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. Mudr. Josefu Herinkovi, DrSc. za odborné vedení, jakož i za cenné připomínky a podněty, které mi poskytl při zpracovávání mé diplomové práce.

Stejně tak chci poděkovat i mé externí školitelce Mgr. Lucii Bartošové, Ph.D. za odborné konzultace, zájem a čas, který mi věnovala během vzniku této práce.

Vřelé díky patří i celému kolektivu fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové za příjemné pracovní prostředí a také všem mým blízkým za velkou podporu.

## **1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

AČR

Armáda České republiky

ACh	acetylcholin
AChE, EC 3.1.1.7	acetylcholinesteráza
BOL	bojová otravná látka
BTChJ	butyrylthiocholin jodid
BuChE, EC 3.1.1.8	butyrylcholinesteráza
CaE, EC 3.1.1.1	karboxylesteráza
CNS	centrální nervová soustava
DFP	diisopropylfluorofosfát
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina
GABA	$\gamma$ -amino-máselná kyselina
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HCl	kyselina chlorovodíková
ChE	cholinesterázy
i.m.	intramuskulární podání
IPB – 80	individuální protichemický balíček vzor 80

i.v.	intravenózní aplikace
LC <sub>t50</sub>	letální koncentrace chemické sloučeniny, jejíž expozice způsobuje úmrtí u 50% nechráněných
LD <sub>50</sub>	dávka toxické látky, která způsobuje u 50% testované populace úmrtí
NATO	severoatlantická aliance
NPL	nervově paralytická látka
OL	otravné látky
OM	ochranné masky
TRIS	tris-(hydroxymethyl)aminomethan

## 2 ÚVOD

Na syntéze nervově paralytických látek (NPL) se podíleli chemici v období mezi dvěma světovými válkami. V této době bylo připraveno velké množství organických

sloučenin fosforu, toxických nejen pro hmyz, ale i pro teplokrevné živočichy, včetně člověka. V německých laboratořích vznikla nová skupina tzv. nervových plynů - sarin, soman a tabun. V poválečném období byla tato skupina doplněna o VX-látku, vyvinutou ve Spojených státech. Všechny tyto NPL se brzy staly nejvýznamnější skupinou bojových otravných látek (BOL) a to díky velice výhodným fyzikálně-chemickým vlastnostem pro bojové použití, vysokou toxicitou a rychlému nástupu toxického účinku.

Na univerzitě v Cambridge byla v roce 1941 připravena další látka, diisopropylfluorofosfát (DFP) a bylo to právě studium jeho biologických efektů, které vedlo k základnímu objasnění účinku NPL, publikovanému ovšem až o šest let později. Tehdy bylo poprvé zjištěno, že mechanismus toxického působení organofosfátů spočívá v ireverzibilní inhibici enzymu acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7). AChE hraje klíčovou roli při přenosu nervového vzruchu v cholinergním nervovém systému. AChE se vyskytuje u savců v kosterním svalstvu, nervové tkáni a také v erythrocytech, úloha erythrocytární AChE nebyla dosud zcela objasněna. Z důvodu relativně malého množství AChE v těle a vysoké afinity organofosfátů k AChE je jejich toxický účinek obrovský a velice rychle smrtící (Patočka, 1998)

Riziko vojenského zneužití organofosfátů a později i obavy z narůstajícího počtu teroristických útoků představují hlavní důvody studia jejich vlastností. Poprvé v historii byl zneužit k útokům proti nevojenským cílům v roce 1994 sarin. K vlastnímu útoku došlo v japonském městě Matsumoto a o sedm měsíců později, v březnu 1995, se útok opakoval v tokijském metru (Maekawa, 1995). Za oběma útoky stála teroristická skupina Aum Shinrikyo. Tyto incidenty si vyžádaly celkem 19 obětí a několik tisíc zasažených (Nozaki, 1995).

Prvotním cílem výzkumu NPL je nalézání efektivnějších způsobů ochrany před těmito látkami. Další vlna – tentokrát ryze medicínského - zájmu o inhibitory AChE nastala v souvislosti se zjištěním významné úlohy cholinergního nervového systému v procesech učení a paměti. Cholinergní hypofunkce, která je způsobená nedostatkem acetylcholinu (ACh) v mozku, obecně vede ke snížení kognitivních funkcí a představuje tak hlavní patologický podklad demence. Jednou z možností jak uměle docílit vyšší hladiny ACh v mozku, je právě inhibice AChE v mozku. Je jasné, že ireverzibilně působící nervově paralytické organofosfáty nemohou být k tomuto účelu použity a proto je nutné hledat jejich méně toxické deriváty, využitelné např. při dosud nepříliš úspěšné léčbě senilní demence Alzheimerova typu (Patočka, 1998).

### **3 CÍL PRÁCE**

Cílem této práce bylo porovnat odmořovací účinnost individuálního protichemického balíčku, vzor 80, který je v AČR určen k prvotnímu odmoření nekryté

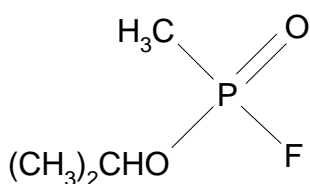
pokožky a přiléhajících částí výstroje zasažených otravnou látkou (OL), a odmořovací rukavice, která představuje nový způsob odmořovací techniky. Jako modelová OL pro zamoření byla vybrána VX látka. Experiment byl prováděn na potkanech, jejichž kůže byla zamořena kapalnou VX látkou a byl sledován úhyn zvířat do 24 h. V rámci experimentu byly také stanoveny aktivita acetylcholinesterázy ve třech částech mozku potkana (frontální kůra, bazální ganglia a pontomedulární oblast), která měla sloužit jako další marker pro porovnání efektivity obou použitých způsobů odmoření.

## **4 TEORETICKÁ ČÁST**

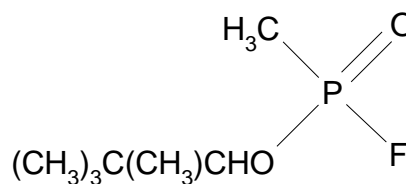
### **4.1 *Struktura nervově paralytických látek (NPL)***

Z chemického hlediska se jedná o estery fosforových nebo fosforečných kyselin. (Obr.č.1). Dle struktury je můžeme dělit do tří skupin: alkyl-alkylfosfonofluoridáty (např. sarin, cyklosarin, soman), alkyl-dialkylfosforamidokyanidáty (např. tabun) a alkyl-S-(2(dialkyl)alkylfosfonothionáty (např. VX) (Wiener, 2004).

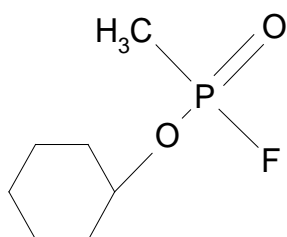
Obr.č.1. Struktury NPL:



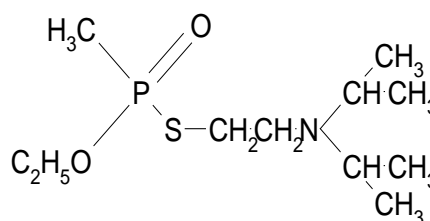
**SARIN**



**SOMAN**



**CYKLOSARIN**



**VX**

## 4.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti a toxicita vybraných NPL

V chemicky čistém stavu je sarin bezbarvá, pohyblivá kapalina bez výraznějšího zápachu. Sarin je velmi těkavý, dobře rozpustný ve vodě i většině organických rozpouštědlech. Hydrolyza vodou je pomalá, zatímco alkalická hydrolyza probíhá velmi rychle, proto se alkalické roztoky používají k jeho odmořování. 50% letální efekt vůči živé síle (LC<sub>50</sub>) má dávka 0,08 mg.min.l<sup>-1</sup>. Soman se na rozdíl od sarinu špatně rozpouští ve vodě. Stejně jako u sarinu se k odmořování používá alkálií a k urychlení hydrolyzy se dá použít i alkohol. 50% letální efekt vůči živé síle (LC<sub>50</sub>) má dávka 0,03 mg.min.l<sup>-1</sup>. Látka VX je podobně jako soman špatně rozpustná ve vodě a naopak dobře v organických rozpouštědlech, na rozdíl od obou předchozích látek je velmi málo těkavá. Zmíněná odolnost vůči hydrolyze a nízká těkavost umožňuje VX látce zamořovat dlouhou dobu ovzduší, v zimě až 16 týdnů, vyšší teploty zevního prostředí dobu zamoření zkracují. LC<sub>50</sub> VX je 0,036 mg.min.l<sup>-1</sup>. Vyšší toxicita VX

látky ve srovnání se sarinem a somanem je podmíněna jednak vysokou stálostí, nízkou těkavostí, dobrou rozpustností v tucích a jednak tím, že není odbourávána detoxikačním systémem organismu. Tento detoxikační systém se zčásti uplatňuje u sarinu a somanu (Kassa, 1992).

### **4.3 Brány vstupu NPL do organismu**

NPL mohou do organismu pronikat všemi branami vstupu, tzn. sliznicí dýchacích cest, zažívacím traktem, spojivkami i neporušenou kůží. Toxická dávka většiny NPL při perkutánních otravách je vyšší než při otravách parenterálních nebo inhalačních, což je dáno nejen mechanickými ztrátami a odpařováním noxy ze zamořeného povrchu, ale také schopností kůže a tkání, přes které NPL prostupuje, tyto látky vázat a enzymaticky je inaktivovat. Ke značnému urychlení resorpce látky dochází při výskytu třeba již malé ranky.

Perkutánní intoxikace je nebezpečná zejména u NPL typu V, které se ze zamořené pokožky beze zbytku vstřebávají. Velmi dobře se také NPL vstřebávají přes bohatě prokrvené spojivky. Příznaky, které se objevují jako první při tomto způsobu zamoření, jsou mióza, poruchy akomodace, bolesti hlavy a letargie, zatímco při ostatních branách vstupu jsou to spíše příznaky postižení dýchacích cest.

Alimentární otravy NPL mají za následek nejen poruchy trávicího traktu (nauzea, zvracení, průjem, kolika), ale v závislosti na dávce vedou až k těžkým otravám se všemi systémovými příznaky. Velmi rychlý průběh mají zejména otravy NPL inhalační cestou (Augerson, 2000; Hayes, 2001).

### **4.4 Mechanismus účinku NPL**

Hlavní mechanismus účinku NPL je založen na ireversibilní inhibici enzymu AChE (Obr. č. 2). Fyziologickou funkcí AChE na cholinergních synapsích je štěpení ACh na cholin a kyselinu octovou. ACh působí jako přenašeč nervových vzruchů na postgangliových vláknech (inervace žláz, srdce, hladkého svalstva), gangliových buňkách a dření nadledvin autonomního nervového systému, nervosvalových ploténkách a synapsích centrálního nervového systému (CNS).

Mechanismus inhibice AChE působením NPL lze popsat jako acylaci (fosforylaci nebo fosfonylaci) esteratického centra AChE (tzv. katalytická triáda serinu, histidinu a glutamové kyseliny), tvořeného hydroxylovou skupinou serinu. Navázáním NPL na AChE vzniká inhibovaný komplex, jehož aktivita může být znovu obnovena působením oximových sloučenin (tzv. reaktivátorů) a tím dojde i k obnovení fyziologické funkce AChE (Marrs, 1993).

Z inhibovaného enzymu postupně dochází k samovolnému odštěpení jednoho alkyly z alkylfosforylové skupiny, vázané na esteratické centrum AChE v podobě alkoholu. Tento tzv. proces dealkylace probíhá u různých NPL odlišnou rychlostí (poločas dealkylace např. u somanu – 5 min, VX – zanedbatelná rychlost). Při procesu dealkylace inhibované AChE se enzym stává nereaktivovatelným a jeho fyziologická funkce již nemůže být obnovena (Bajgar, 2004).

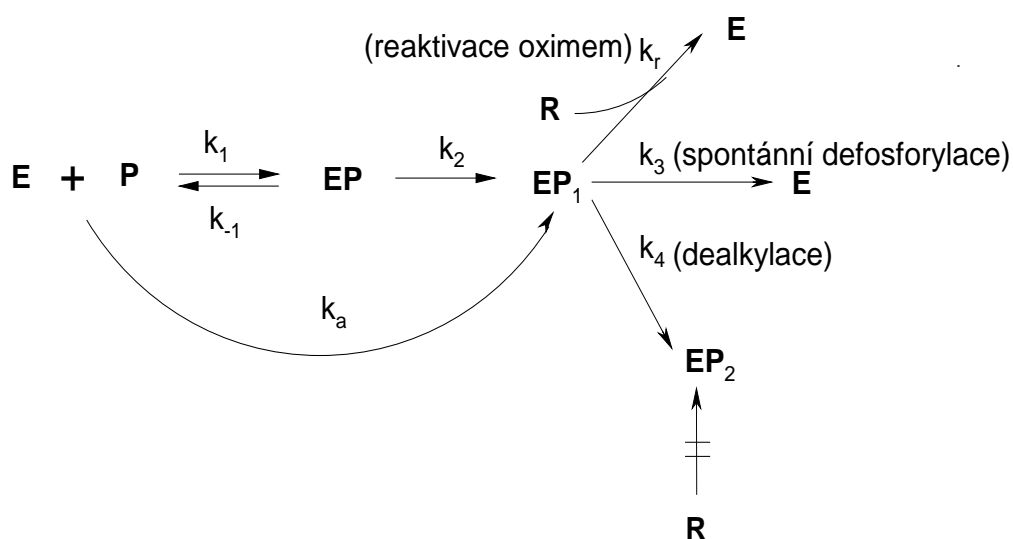
Původní aktivita AChE v organismu se obnoví až po syntéze enzymu de novo. Plná regenerace mozkové AChE trvá přibližně 50 dní. U erytrocytů, které nejsou schopny syntetizovat nové bílkoviny, se aktivita obnoví až po 100 dnech, tedy v době kdy dojde k náhradě erytrocytů s inhibovanou AChE za erytrocyty nově vytvořené (Lüllman, 2002).

Cholinesterázy (ChE) v krvi jsou prvním cílovým místem působení NPL. V krevním řečišti se kromě AChE vyskytuje také butyrylcholinesteráza (BuChE, EC 3.1.1.8) a karboxylesteráza (CaE, EC 3.1.1.1), které do určité míry působí jako scavangery při otravách NPL. Váží na sebe NPL a tím tak snižují množství noxy, která by jinak inhibovala AChE v životně důležitých orgánech. Značné mezidruhové rozdíly v toxicitě NPL odrážejí mezidruhově rozdílná množství a distribuci esteráz schopných na sebe vázat NPL (Kaliste, 1996). Rozdíly v aktivitě těchto enzymů v rámci lidské populace mohou být příčinou různé citlivosti osob při otravách NPL (Lander, 1991).

Obr.č.2. Schéma reakce NPL (P) s enzymem (E):

Enzym reaguje s inhibitorem za vzniku reakčního intermediátu (EP). Tato reakce je reversibilní a charakterizují jí rychlostní konstanty 1.řádu ( $k_1$ ,  $k_{-1}$ ). Reakční intermediát je přeměňován na stabilní fosforylovaný enzym  $EP_1$  a rychlost reakce je dána rychlostní konstantou  $k_2$ . Rychlost tvorby komplexu  $EP_1$  přímo z enzymu a inhibitoru popisuje bimolekulární rychlostní konstanta  $k_a$ . Rychlost spontánní

defosforylace, charakterizované rychlostní konstantou  $k_3$  je velmi pomalá a nemusí také vůbec proběhnout. Působením reaktivátorů může z komplexu  $EP_1$  vzniknout zpět samotný enzym E. Komplex  $EP_1$  je tedy reaktivovatelný. Rychlostní konstanta reaktivace ( $k_r$ ) je velmi důležitá pro léčbu. Vznik komplexu  $EP_2$  z fosforylovaného enzymu  $EP_1$ , charakterizovaný rychlostní konstantou  $k_4$ , se nazývá dealkylace (tzv. aging) a touto reakcí se enzym stává nereaktivovatelný.



#### 4.5 Distribuce, biotransformace a eliminace NPL

Při studiu distribuce sarinu u zvířat po i.v. aplikaci, byl inhibitor za 1 min detekován v mozku, plicích, srdci, bránici, ledvinách, játrech a plazmě, přičemž nejvyšší koncentrace byla zjištěna v plazmě, ledvinách a játrech. Distribuce NPL v mozku, do kterého se dostává 1-3% z celkového množství NPL v organismu, závisí jednak na typu NPL (lipofilnější soman má vyšší afinitu k mozkové AChE než sarin), na prokrvení jednotlivých částí mozku a také na vlastní aktivitě mozku v době expozice.

U somanu i sarinu bylo zjištěno, že k jejich akumulaci dochází především v hypothalamu (2-5 x vyšší koncentrace než v ostatních částech mozku) (Little, 1988).

Obecně NPL série G inhibují mozkovou AChE velmi rychle (50% inhibice během několika minut), zatímco u látek série V dochází k určitému zpoždění. Např. k inhibici mozkové AChE látkou VX dochází až po 20 min, protože proniká hůře než sarin nebo soman (Bajgar, 2004).

Výrazná je inhibice AChE při otravách VX látkou v kůře mozku a mozečku, retikulární formaci mozkového kmene a ve většině jader hypothalamu a mesencephalu. Naopak mírná a pomalejší je inhibice v subkortikálních strukturách předního mozku, především bazálních gangliích. Soman inhibuje AChE v mozku rovnoměrně opět s výjimkou bazálních ganglií. Sarin nejvýrazněji inhibuje AChE v mozkové kůře, pontu a prodloužené míše, nejméně postiženou oblastí jsou bazální ganglia, kde k výraznější inhibici dochází teprve ve finálních fázích otravy. Inhibice AChE v mozku působením NPL je tedy velmi selektivním procesem (Hrdina, 1983).

NPL jsou z krevního řečiště eliminovány rychle, protože dochází k jejich hydrolýze. Např. isopropylmethylfosfonát – hlavní metabolit sarinu, je ve velkém množství vylučován močí s poločasem eliminace 3,7 h, ale část zůstává přítomna v tkáních. Cyklosarin se metabolizuje analogicky s poločasem eliminace 9,9 h. Metabolismus somanu je složitější a probíhá ve dvou fázích s eliminačními poločasy 3,6 a 18 h. U somanu jako jediné NPL bylo zjištěno, že se vytváří jeho depa v tkáních (převážně ve svalech a v plicích), kde nedochází k jeho inaktivaci, ale odkud se později zpětně uvolňuje opět jako toxická NPL (Shih, 1994).

## **4.6 Příznaky otrav NPL**

V důsledku inhibice AChE se v těsné blízkosti cholinergních receptorů nahromadí endogenní ACh. Cholinergní receptory se např. nacházejí v efektorových parasympatických synapsích duhovky, bronchiálního kmene, močového měchýře, cév, trávicího traktu, sekrečních žláz v dýchacím traktu a také zakončeních sympatických nervů potních žláz. Klinickým projevem akumulace ACh v těchto oblastech jsou příznaky **muskarinového** typu, zatímco nahromaděním ACh na zakončeních motorických nervů příčně pruhovaného svalstva a ve vegetativních gangliích vznikají příznaky **nikotinového** typu. Akumulace ACh v jednotlivých strukturách a synapsích mozku a spinální míchy podmiňuje **centrální** příznaky otravy.

Periferní muskarinové příznaky otravy NPL se projevují zvýšenou sekrecí

exokrinních žláz – zvýšená sekrece z nosu, bronchů, zvýšené pocení, slzení a slinění. Zvýšená hladina ACh v hladkém svalstvu způsobuje miózu, poruchy akomodace, abdominální křeče, průjem, častější močení a také bradykardii.

Mezi periferní nikotinové příznaky patří - bledost, tachykardie, hypertenze (autonomní ganglia) a svalová slabost, fascikulace a křeče až paralýza (kosterní svaly včetně bránice a mezižeberních svalů).

Muskarinové a nikotinové centrální příznaky - nejsou příliš specifické a jsou popisovány jako závratě, úzkost, neklid, bolest hlavy, třes, zmatenost, ztráta koncentrace, křeče a útlum dýchání (Bajgar, 2004a).

NPL ovlivňují řadu dalších orgánů a systémů. Příznaky vyvolané touto cestou působení NPL se nazývají necholinergní (také nespecifické). Kromě cholinesteráz tedy mohou být ovlivněny další enzymy a neurotransmitery (např. serotonin, dopamin, GABA), může docházet k imunopatologickým změnám, anafylaktickým reakcím a změnám v chování. Dokumentovány jsou změny v permeabilitě membrán a hematoencefalické bariéry a metabolické změny jako poruchy energetického metabolismu mozku a také poruchy oxidativního metabolismu (Bajgar, 1992; Kassa, 1998).

## **4.7 Diagnostika otrav NPL**

Pro stanovení diagnózy otravy NPL je důležité rozpoznání cholinergních příznaků jako jsou mióza, poruchy dýchání, fascikulace, zvýšené slzení, slinění a sekrece z nosu. Je možné stanovit diagnózu i pomocí laboratorních testů ChE v krvi.

Stanovení ChE v krvi je zatím nejjednodušším a nejrychlejším diagnostickým prostředkem. Aktivita ChE (AChE i BuChE) závisí na mnoha faktorech jako jsou pohlaví, věk, výživa, hormonální vlivy, ionizující záření atd. Rozdíly v aktivitě BuChE jsou v rámci lidské populace významnější než rozdíly v aktivitě AChE, což je geneticky podmíněno (Lockridge, 2000).

Měření aktivity ChE je objektivní ukazatel umožňující stanovení jednak závažnosti intoxikace a jednak potvrzení, zda k intoxikaci vůbec došlo. Je však důležité

znát celý klinický obraz intoxikace, tzn. nejen biochemické vyšetření, ale také klinické symptomy pro přesnější stanovení a další prognózu otravy. Dosud není zcela uspokojivě vyřešeno, zda je lepším markerem pro otravy NPL aktivita plazmové BuChE nebo erytrocytární AChE. V několika studiích bylo prokázáno, že aktivita BuChE odráží klinický průběh intoxikace NPL a že se její aktivita při intermediárním syndromu otravy NPL dále nemění. Dále byla zjištěna přímá korelace mezi stupněm inhibice BuChE a závažností intoxikace organofosforovými pesticidy. Aktivita BuChE však může být snížena nejen při intoxikacích NPL ale i v důsledku jiných postižení, např. dědičně snížené aktivity BuChE, poškození jater, akutní infekce, chronické podvýživy, metastáz (převážně v játrech), infarktu myokardu, otravy rtuť nebo obstrukční žloutenky (Cokugras, 2003). Při stanovení aktivity AChE zase může dojít k tomu, že při akutní fázi otravy sice nízká aktivita AChE svědčí o intoxikaci NPL, neposkytuje však signifikantní údaj o její závažnosti. Naopak pokud by došlo jen k lehké intoxikaci NPL, kdy by pokles aktivity AChE nebyl větší než 20%, není stanovení aktivity AChE spolehlivým markerem pro potvrzení expozice NPL.

Problémem při stanovování ChE jako markeru intoxikace NPL zůstává rozdílná původní aktivita ChE před intoxikací, která se může v rámci populace značně lišit (Wiener, 2004). Nabízí se zde tedy možnost *in vitro* reaktivace inhibovaných ChE různými oximy (trimedoxim, obidoxim). Tato metoda ovšem není vhodná u NPL, které se vyznačují rychlým stárnutím inhibovaného enzymu (např. soman) (Bajgar, 1992).

#### **4.8 Jednotlivé metody pro stanovení intoxikace**

Pro stanovení aktivity ChE se v současné době většinou používá spektrofotometrická metoda podle Ellmana (Ellman a spol., 1961). Při stanovení celkové aktivity ChE v krvi odpovídá u člověka 10% celkové aktivity BuChE a 90% aktivitě AChE. Tento poměr je výrazně jiný u potkanů, kde aktivita BuChE tvoří 29% a aktivita AChE 71%. V poslední době se také rozvíjí stanovení míry inhibice jednotlivých molekulárních forem AChE a BuChE. Bylo totiž prokázáno, že jednotlivé molekulární formy ChE nejsou inhibovány ve stejném rozsahu, nízkomolekulární formy se ukázaly být rezistentnější než vysokomolekulární (Bajgar, 1997).

Plazma může sloužit jako biologický materiál pro další možný marker intoxikace NPL, a to koncentraci NPL v plazmě po fluoridy indukované reaktivaci.

Fluorid draselný přidaný do vzorku plazmy v nadbytku kovalentně váže NPL vyvázáním z ChE a vzniklý organofosfát tak může být kvantifikován metodou plynové chromatografie (GC). Výhodou této metody je možnost retrospektivní detekce expozice NPL, kterou není možno provádět měřením aktivity ChE z důvodu de novo syntézy enzymů. Plazma navíc obsahuje BuChE v poměrně vysoké koncentraci (70-80 nM), narozdíl od koncentrace AChE v krvi (3 nM), takže představuje vhodný a pro analýzu látky bohatý biologický materiál, není však jasné, zda by mohla být použita při intoxikacích všech NPL, zejména v případě rychlého vzniku nereaktivovatelného enzymu (soman). Problematickou se při použití této metody jeví také spontánní reaktivace, in vivo sekvestrace a nedostačující identifikace NPL, která způsobila intoxikaci (Pohluijs, 1997).

Další metoda využívá jako biologický materiál BuChE, která je izolována z plazmy afinitní chromatografií, štěpena pepsinem a poté analyzována kapalinovou chromatografií. Stanovení je pak založeno na kvantifikaci fosfonylovaných (příp. fosforylovaných) nonapeptidů hmotnostní spektrometrií (MS) (Fidder, 2002).

Přímo v krvi je také možno stanovit NPL a její metabolity. Toto stanovení je však limitováno velmi krátkou přítomností původní NPL v krevním oběhu, protože k její metabolizaci a distribuci do jiných tkání dochází velmi rychle. Metabolity cirkulují v krvi delší dobu a jsou většinou vylučovány močí. K tomuto stanovení se většinou používá GC-MS (Driskell, 2002).

Při intoxikacích NPL se monitoruje mnoho dalších biochemických markerů, většina z nich je ovšem pro otravu NPL nespecifických. Při biochemickém monitorování obětí sarinových útoků byla v jednom případě naměřena u 15% osob zvýšená hladina kreatin kinázy, u 8% osob leukocytóza, 5% hypokalémie a 3% hypolipidemie, zatímco v druhém případě při monitorování obětí útoku stejnou NPL již bylo stanoveno jen zvýšené množství kreatin kinázy u 15% osob bez dalších signifikantně změněných markerů (Yokoyama, 1996).

## **4.9 Terapie otrav NPL**

### **4.9.1 Obecné zásady terapie otrav NPL**

Na základě známého mechanismu účinku NPL jsou k terapii otrav využívány dva základní terapeutické principy. Hlavními antidoty jsou anticholinergika, která blokují účinek nahromaděného ACh na cholinergních synapsích (též nazývaná symptomatická nebo funkční antidota) a reaktivátory cholinesterázy (oximy), schopné reaktivovat inhibovanou AChE (jsou označovány jako kauzální antidota). Jejich účinky jsou synergistické. Benzodiazepiny je možné použít k tlumení křečí (antikonzulziva).

Vzhledem k vysoké toxicitě NPL je pro další osud intoxikovaného organismu rozhodující včasná první pomoc. Ta zahrnuje přerušování kontaktu s jedem (evakuace, ochranná maska), pokud možno podání antidot a dekontaminaci. Nutné je také udržení základních životních funkcí (masáž srdce a umělé dýchání) pokud je potřeba (Bajgar, 2004).

### **4.9.2 Anticholinergika**

Nejpoužívanějším anticholinergikem v léčbě otrav NPL je atropin, který velmi dobře působí proti muskarinové složce otravy, méně ovlivňuje centrální účinek NPL a prakticky nepůsobí na nikotinové příznaky. Mezi anticholinergika používaná v léčbě otrav NPL patří též benaktyzin (nověji pak obdobně působící biperiden), který má ve srovnání s atropinem podstatně silnější centrální účinek a příznivě ovlivňuje i psychiku otrávených. Naopak málo působí na muskarinové příznaky otravy (Kassa, 1992).

### **4.9.3 Reaktivátory**

Kauzální antidota jsou sloučeniny s nejméně jednou oximovou skupinou ve své struktuře, které jsou schopny reaktivovat inhibovanou AChE a tak obnovit její fyziologickou funkci. Jednotlivé oximy se liší nejen počtem a polohou oximových skupin, ale také počtem pyridiniových jader (1 nebo 2) a délkou a charakterem spojovacího řetězce.

V současné době jsou v experimentální léčbě nejvíce používané oximy pralidoxim, obidoxim, trimedoxim, methoxim a HI-6. Žádný z uvedených reaktivátorů není dostatečně efektivní při otravě jakoukoli NPL, tzn. dosud neexistuje žádný širokospektrální reaktivátor (Dawson, 1994).

Efektivita příslušného oximu závisí na reaktivovatelnosti inhibované AChE použitým oximem. Poměrně uspokojivě jsou z terapeutického hlediska vyřešeny otravy sarinem, cyklosarinem a látkou VX (Kassa, 2002a). Otravy somanem jsou z důvodu velmi rychlé dealkylace, tzn. nereaktivovatelnosti inhibovaného enzymu, k terapii konvenčními oximy rezistentní. Nejvyššího terapeutického efektu bylo dosaženo s oximem HI-6 (Kassa, 1999). Specifická je také situace při otravách tabunem, v jehož struktuře přítomnost volného elektronového páru na amidickém dusíku eliminuje elektronovou deficienci potřebnou pro atak nukleofilu představovaného reaktivátorem. Nejefektivnějším reaktivátorem je při otravách tabunem trimedoxim (Cabal, 2004), který však v současné době nemá ve své antidotní výbavě žádná armáda na světě. Ačkoliv je oxim HI-6 při otravách tabunem neúčinný, obecně se považuje v současné době za nejefektivnější reaktivátor.

#### **4.9.4 Doplnková terapie otrav NPL**

Do antidotní terapie zahrnujeme také léčení akutní respirační insuficience a potlačení křečí. K potlačení křečí se používají preparáty hydantoinové řady, barbituráty s rychle nastupujícím a krátkodobým efektem a především benzodiazepiny (v AČR k dispozici autoinjektor s diazepamem). Při léčení respirační insuficience přichází do úvahy vedle křísících přístrojů, odsávání slin, oxygenoterapie také farmakologická podpora dýchání syntophylinem (Kassa, 1993).

## 4.10 Odmořování otravných látek (OL)

Proces odmořování lze hodnotit z několika hledisek:

- a) podle urgentnosti zásahu na prvotní a druhotné odmořování.
- b) podle rozsahu očisty daného objektu na částečné a úplné.
- c) a podle druhu očišťovaného objektu na odmořování osob, zvířat, materiálu, dopravní techniky, proviantu, vody a terénu.

### 4.10.1 Principy odmořování

Rozkladu, eventuálně odstranění otravné látky lze dosáhnout působením vhodných činidel a odmořovacích postupů. Principy, které se při tom uplatní jsou chemické, fyzikální, nebo mechanické.

- Chemické, způsobují chemickou změnu struktury molekuly otravné látky (OL) reakcí s odmořovacím činidlem.

- Fyzikální, způsobují odstranění OL ze zamořeného povrchu, např. odpařením účinkem horkých plynů, rozpuštěním OL ve vhodném rozpouštědle nebo sorbcí OL na vhodný sorbent.

- Mechanické, způsobují odstranění OL ze zamořených povrchů, např. otěrem zamořeného povrchu kartáči nebo sejmutím vrchní vrstvy z povrchu zamořeného předmětu. V praxi se však při odmořování používá nejčastěji kombinace těchto principů.

Základem většiny odmořovacích postupů je chemická reakce mezi OL a odmořovacím činidlem. O průběhu chemické reakce rozhoduje struktura OL a odmořovacího činidla a podmínky, za kterých reakce probíhá (teplota, vlhkost, katalýza).

Činidla, která reagují s OL dělíme na nukleofilní  $Z^-$  a elektrofilní  $E^+$ .

Nukleofilní reagují nejspíše tam, kde dojde ke zředění elektronového oblaku, elektrofilní zase tam, kde je hustota elektronů vyšší. Z látek, které se používají

v odmořovací praxi mohou jako nukleofilní činidla působit tyto sloučeniny:

- a) **Kyslíkaté zásady:** voda, hydroxidy, uhličitany, alkoholáty, fenoláty,
- b) **Dusíkaté zásady:** čpavek, alifatické a aromatické aminy, ethanalaminy,
- c) **Sírné zásady:** sulfidy, thioalkoholáty,

Jako elektrofilní se mohou uplatnit tyto sloučeniny:

- a) **Chlórovadla:** elementární chlór, organické a anorganické chlornany, chlórované amidy arylsulfonových kyselin,
- b) **Okysličovadla:** kyslík, peroxidy, manganistany, chlornany, chlorečnany.

Dalším faktorem ovlivňujícím reaktivitu molekul je jejich prostorové uspořádání. Teorie sférické zábrany vysvětluje, že má-li činidlo s OL reagovat, musí mít přístup k místu, na kterém má reakce proběhnout. Je-li takové místo stíněno jinou částí molekuly, reakce se zpomalí, nebo je vůbec nemožná.

Na rychlost reakce má zásadní vliv také teplota, pH, polarita rozpouštědla, viskozita prostředí apod..

V praxi se snažíme odmořovat v homogenní fázi, tzn. takovým odmořovadlem, ve kterém je konkrétní OL dobře rozpustná. Ze skupiny látek typu sarin, které se odmořují alkalickou hydrolyzou činí největší potíže soman pro svou malou rozpustnost ve vodě. Zvýšení jeho rozpustnosti a tím i zvýšení bezpečného odmoření se dosahuje přidávkem vhodného organického rozpouštědla (např. aceton, ethanol). U látek typu V se s výhodou používá roztok dichloraminu v dichlorethanu, který je s látkami V neomezeně mísitelný. Při odmořování látek typu V pomocí chlornanu vápenatého se zvýšení rozpustnosti OL v odmořovacím roztoku dá dosáhnout jejich rozpuštěním nejdříve v acetonu nebo ethanolu a smícháním odmořovala s tímto roztokem (Kassa, 1993; Cabal 2004).

#### 4.10.2 Individuální protichemický balíček vzor 80 (IPB-80)

Jako prostředek první zdravotnické pomoci, určený k prvotnímu odmoření nekryté pokožky a přiléhajících částí výstroje zasažených OL byl v armádě zaveden tzv. individuální protichemický balíček vzor 80 (IPB-80). Základ soupravy tvoří lahvička s adsorpčním přípravkem DESPRACH.

DESPRACH je univerzální práškový odmořovací prostředek na bázi zeolitů,

který účinně odmožuje všechny typy otravných látek, které byly v době vývoje zavedeny do výzbroje armád NATO. Odmoření tímto prostředkem je založeno na fyzikálním principu (využití adsorpčních schopností odmořovací hlínky), proto je možno uplatnit tento prostředek proti všem potenciálním otravným látkám bez ohledu na jejich chemickou povahu.

Dalšími výhodami DESPRACHu jsou nízká hmotnost, stálost, nezávislost účinku na teplotě, jednoduché použití, nízké pořizovací náklady a dobrá výrobní dostupnost. Dobrá použitelnost IPB vzor 80 pro odmořování i za ztížených podmínek (nasazená ochranná maska, rukavice) byla potvrzena při vojenských zkouškách.

Při odmořování se obsah lahvičky vysype na odmořované místo, OL se nechá vsáknout do prášku a poté se smete z odmořovaného povrchu. Sorbční účinek DESPRACHu se zvyšuje roztíráním přiloženými tampóny (Cabal, 2004).

#### **4.11 První pomoc při zasažení NPL**

a) První zdravotnická pomoc:

První zdravotnickou pomoc, pokud se jedná o vojáka, si poskytuje voják sám, nebo i za pomoci svých kolegů. Prvním nezbytným krokem je včasné a správné nasazení ochranné masky (OM), která bezpečně chrání spojivky, dýchací cesty a kůži obličeje. Bezprostředně po nasazení OM si zasažený jedinec podá pomocí autoinjektoru antidotum proti NPL. V případě zamoření části oděvu si musí zasažený neprodleně zasažená místa odmořit pomocí IPB vz.80.

b) První lékařská pomoc:

Je orientována na udržení základních životních funkcí.

c) Odborná lékařská pomoc:

Musí být poskytnuta do 6-10 hodin po zasažení. Zahrnuje komplexní terapii otrav NPL s hlavním zaměřením na zvládnutí akutní respirační insuficience a zvládnutí jejích následků.

d) Specializovaná lékařská pomoc:

Má být zajišťovaná do 10-12 hodin. Obsahem tohoto stupně pomoci je komplexní terapie otrav NPL včetně jejich klinicko-laboratorního sledování až do úplného vyléčení (Kassa, 1993; Patočka a spol., 2004).

## **5 MATERIÁL A METODIKA**

### **5.1 Zvířata**

Pokusy byly prováděny na samicích potkana kmene Wistar (BioTest s.r.o. Konárovice, Česká republika), jejichž hmotnost se pohybovala mezi 180 –250 g. Zvířata byla před pokusem nejméně 1 týden aklimatizována ve viváriu Katedry toxikologie, které je klimatizované se světelným režimem od 7:00 do 19:00. Pokusná zvířata byla krmena standardní peletovou dietou a vodou *ad libitum*.

Zvířata byla rozdělena do skupin po 6 jedincích. Hmotnostní rozpětí jednotlivých zvířat ve skupinách nepřekročilo  $\pm 15$  g. Experimenty byly schváleny

Etickou komisí Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové v souladu s vyhláškou 207/2004 Sb. o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

Personál manipulující se zvířaty byl předem proškolen a získal osvědčení o způsobilosti pracovat s laboratorními zvířaty podle §17 odst. 1 zákona 207/2004.

## **5.2 Chemikálie**

Látka VX (O-ethyl-S-2-diisopropylaminoethyl methylfosfonothioát, Vojenský technický ústav, Zemianské Kostolany, Slovensko). Látka byla na pokožku pokusných zvířat nanášena v neředěném stavu mikropipetou Microman-Gilson 1 – 10 µl vždy v čerstvém stavu.

Pro spektrofotometrické stanovení dle Ellmana, použitého pro stanovení aktivity AChE v odebraném biologickém materiálu byly použity následující chemikálie: 1,1,1-tris-(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (Fluka, Švýcarsko), kyselina chlorovodíková (HCl), butyrylthiocholin jodid (BTChJ), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina (DTNB) (Sigma-Aldrich, Německo).

## **5.3 Stanovení aktivity cholinesteráz**

Aktivita acetylcholinesterázy v mozku byla měřena spektrofotometricky Ellmanovou metodou (Ellman, 1961) za pomoci DTNB modifikovaným postupem podle Bajgara (Bajgar, 1972). Usmrceným potkanům byl odebrán mozek a po jeho zmrazení byla vypreparována frontální kůra, pontomedulární oblast a bazální ganglia (Obr.č.5 a 6). Odebrané části mozku byly poté zhomogenizovány v destilované vodě v poměru 1:10 a homogenát byl použit k měření aktivity AChE.

Základní roztoky pro stanovení byly připravovány následovně:

- TRIS pufr pH 7,6

2,42 g TRIS bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody, bylo dotitrováno 1 M HCl na pH 7,6 a doplněno destilovanou vodou na 100 ml.

➤ BTCHJ

0,3962 g BTChJ bylo rozpuštěno v destilované vodě na objem 100 ml.

➤ DTNB

0,016 g DTNB bylo rozpuštěno v 1 ml ethanolu, bylo přidáno 45 ml TRIS pufru a doplněno destilovanou vodou na 100 ml.

➤ BuChE

K lyofilizované BuChE v původním obalu byly nadávkovány 3 ml TRIS a lahvička byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Z připraveného roztoku bylo odebráno 0,2 ml a bylo přidáno 85 ml vody. Aktivita enzymu byla seřízena dalším přídatkem zásobního roztoku.

Postup stanovení:

Do skleněné kyvety ( $l = 0,999$  cm) bylo přidáno 0,4 ml roztoku DTNB v 0,2 M TRIS-HCl pufru (pH 7,6; výsledná koncentrace DTNB v kyvetě  $5 \times 10^{-3}$  M), 50  $\mu$ l homogenátu mozku a 1,35 ml výše uvedeného TRIS pufru. Reakce byla zahájena přidáním 0,2 ml substrátu (výsledná koncentrace v kyvetě  $10^{-3}$  M) a absorbance byla měřena při 412 nm za laboratorní teploty po dobu 5,5 min. Pokud byla aktivita vzorku příliš vysoká nebo příliš nízká, byl vzorek zředěn respektive byl přidán větší objem vzorku. Absorbance se měřila proti slepému vzorku, ve kterém byl TRIS pufr. Po dobu 5,5 min byla každých 30 s zaznamenávána hodnota absorbance. Směrnice této časové závislosti pak byla zaznamenávána jako aktivita příslušného vzorku.

## **5.4 Odmořovací rukavice**

Odmořovací rukavice (Obr.č.3) byly vyvinuty jako alternativa k IPB-80. Jsou plněny adsorbentem DESPRACHEm a princip při odmořování je podobný jako u IPB-80, kdy se roztírá prášek, obsažený v rukavici, po odmořovaném místě.

Obr.č.3. Odmořovací rukavice:



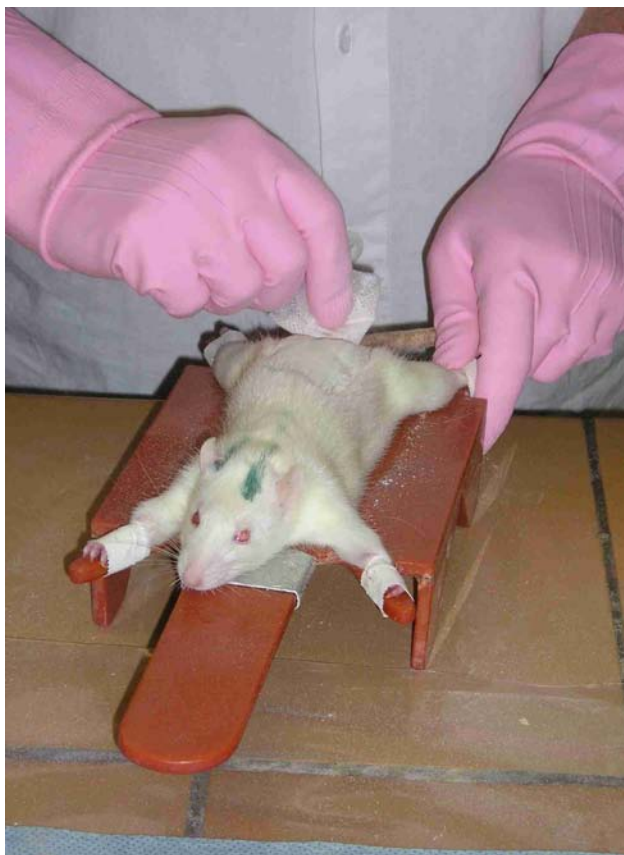
### **5.5 Experimentální postupy na zvířatech**

Potkani byli upoutáni na zkušební stolky, na hřbetní části byla elektrickým stříhacím strojkem ostříhaná plocha zhruba 5 x 5 cm (Obr.č.4). Pokusnou skupinu tvořilo vždy 6 potkanů.

Účinnost DESPRACHu byla stanovena zjištěním percutánní toxicity ( $LD_{50}$ ) VX na potkanech bez a s odmořením, způsobem, jehož podstatou je nanášení noxy pomocí mikropipet na ostříhanou hřbetní stranu zvířete.

Odmořuje se za 2 min po aplikaci VX 0,3 g DESPRACHu roztíráním tamponem po dobu 30 s nebo testovanou odmořovací rukavicí (Obr.č.3) (rukavice se rozstříhá na čtverce cca 7,5 x 7,5 cm- obě vrstvy – mezi ně se nasype 0,3 g DESPRACHu – sešije se sešíváčkou -do pinzety se uchopí obě vrstvy a roztírá se jako u buničitého tamponu).

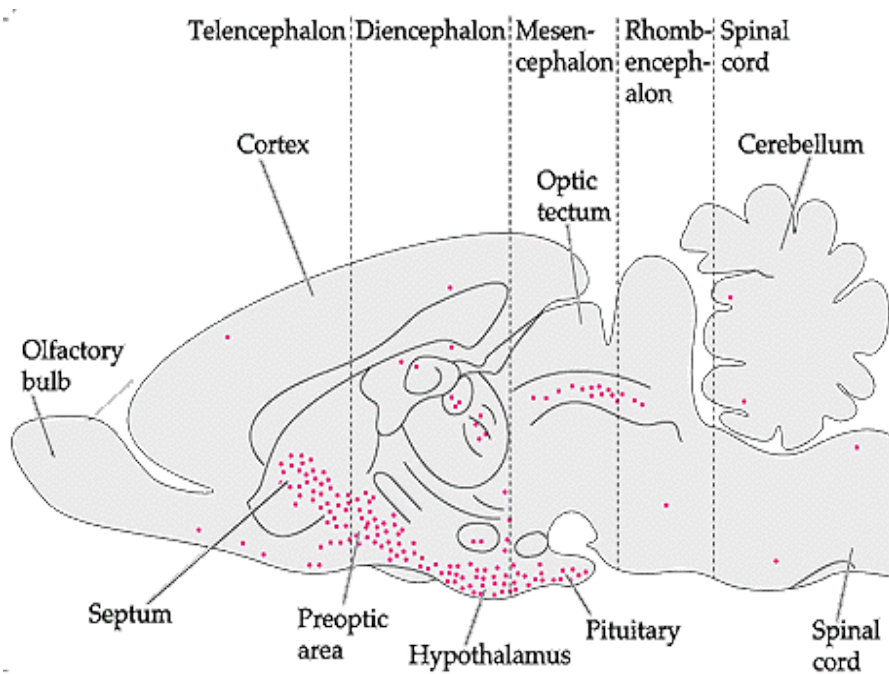
Obr.č.4. Způsob odmořování VX látky na oholené hřbetní části potkana:



Obr.č.5. Mozek potkana:



Obr.č.6. Schéma podélného průřezu potkaního mozku:



## 5.6 Statist

*ické zpracování výsledků*

Statistická významnost rozdílu mezi hodnotami LD<sub>50</sub> i průměrnými aktivitami cholinesteráz mezi jednotlivými skupinami zvířat byla počítána párovým a nepárovým Studentovým t-testem na různých hladinách významnosti (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Konečná grafická prezentace výsledků vznikla za pomoci programu Microsoft Excel.

## **6 VÝSLEDKY**

Perkutánní toxicita VX látky bez i s odmořením byla u potkanů zjišťována po nanesení OL na oholený hřbet zvířete a případném odmoření, sledováním jejich úhynu do 24 hodin. Akutní toxicita VX látky u potkanů byla po odmoření IPB téměř 69krát nižší než bez odmořovacího zásahu (Tab.č.1)

Tabulka č.1. Toxicitní údaje látky VX při perkutánní aplikaci potkanům (po 24 h):

LD <sub>50</sub> bez odmoření	0,105 mg/kg
LD <sub>50</sub> po odmoření DESPRACHEM	7,2 mg/kg

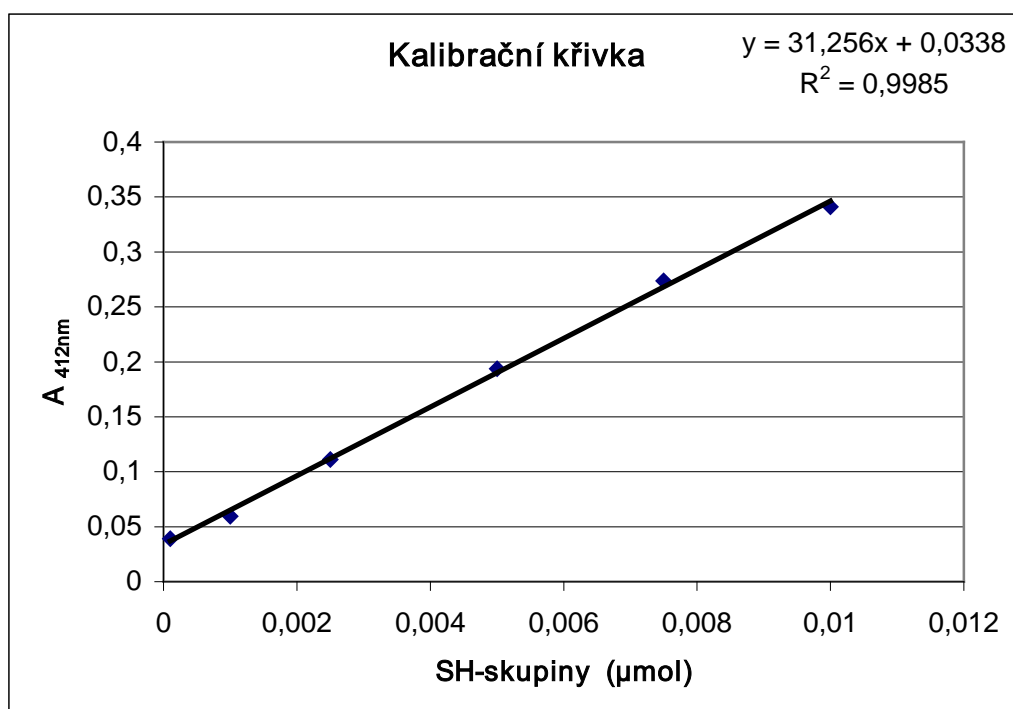
Následující tabulka (Tab.č.2) konkretizuje úhyn potkanů při zvolených dávkách VX látky. V našem experimentu byly použity 2 dávky látky VX – 2 mg/kg (~ 28% LD<sub>50</sub> VX po odmoření DESPRACHEM) a 4 mg/kg (~ 56% LD<sub>50</sub> VX po odmoření DESPRACHEM). Tyto dávky byly zvoleny tak, aby výrazně vyšší, případně nižší úhyn zvířat při použití odmořovací rukavice ve srovnání s IPB, jednoznačně prokázal nižší, resp. vyšší odmořovací účinnost nově testované rukavice

Tabulka č.2. Úhyn potkanů po expozici VX látkou a odmoření IPB nebo rukavicí:

Dávka VX	Úhyn (do 24H )
2mg/kg IPB	1/6
2mg/kg R	3/6
4mg/kg IPB	3/6
4mg/kg R	3/6

Pro určení absolutních hodnot aktivit AChE byla použita kalibrační metoda s cysteinem (Obr.č. 7). Postup fotometrického měření byl stejný jako u stanovení AChE jen místo homogenátu tkáně byl do kyvety napipetován roztok cysteinu o různé koncentraci a měřen při vlnové délce 412 nm proti slepému vzorku. Ten byl zpracován stejně, jen místo roztoku cysteinu byla přidána destilovaná voda.

Obr.č.7. Kalibrace na cystein:



Z kalibrační křivky je možné odečíst množství SH - skupin v mikromolech. Se zvyšující se koncentrací cysteinu se množství SH - skupin lineárně zvyšuje.

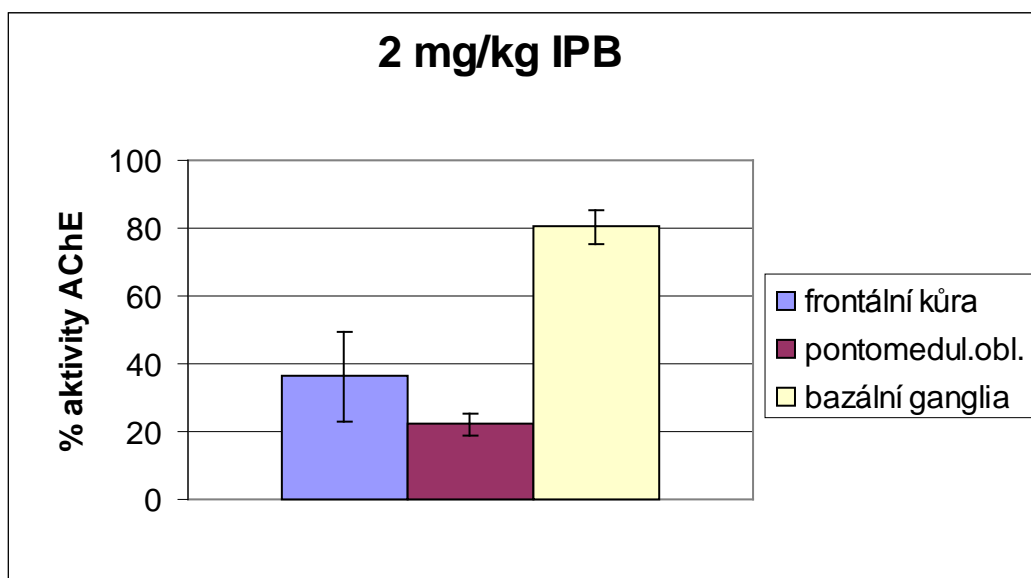
Tabulka č.3 uvádí hodnoty aktivit AChE v jednotlivých částech mozku potkanů z kontrolní skupiny, která byla podrobena stejnému experimentálnímu postupu jako ostatní skupiny potkanů, mimo nanesení VX-látky, která byla nahrazena hexanem, který se běžně používá jako rozpouštědlo při nanášení velmi nízkých koncentrací VX látky na kůži zvířat. Aktivita AChE je uváděna v μcat/g vlhké tkáně (μmol hydrolyzovaného substrátu/60 min· kg).

Tabulka č.3. Aktivita AChE v jednotlivých částech mozku u kontrolní skupiny potkanů:

Oblast mozku potkana	Aktivita AChE (μcat/g)
----------------------	------------------------

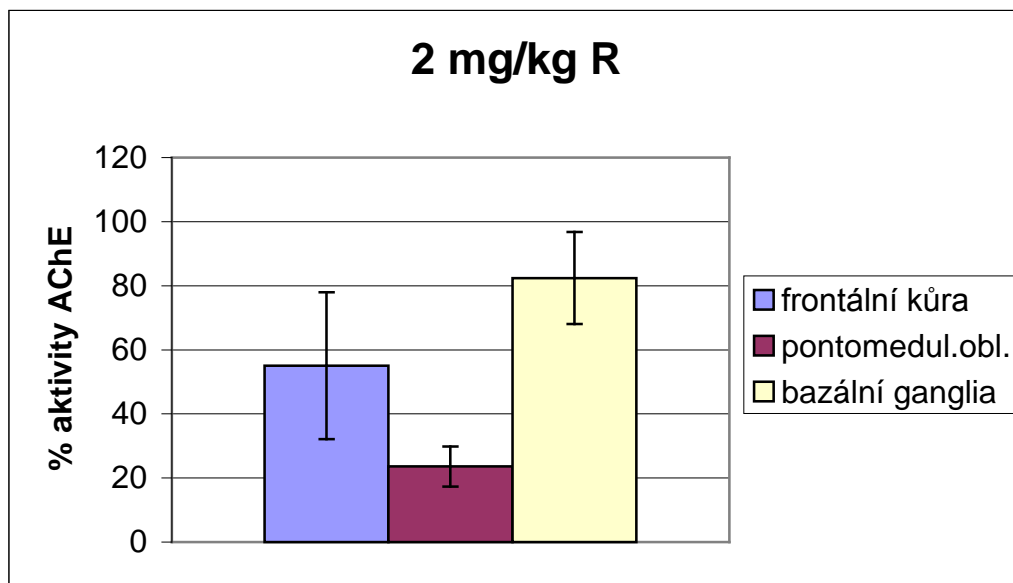
Frontální kůra	282,1 ± 19,7
Pontomedulární oblast	407,8 ± 17,4
Bazální ganglia	1254,3 ± 24,7

Obr.č.8. Srovnání aktivity AChE v různých částech mozku (frontální kůře, pontomedulární oblasti a bazálních gangliích) při použití 2 mg/kg VX látky a odmoření pomocí IPB.



Nevyšší aktivita AChE při použití 2mg/kg VX látky, kde byl jako odmořovací činidlo použit IPB, byla naměřena v bazálních gangliích, poté ve frontální kůře a nejmenší aktivita byla naměřena v pontomedulární oblasti (Obr.č.8).

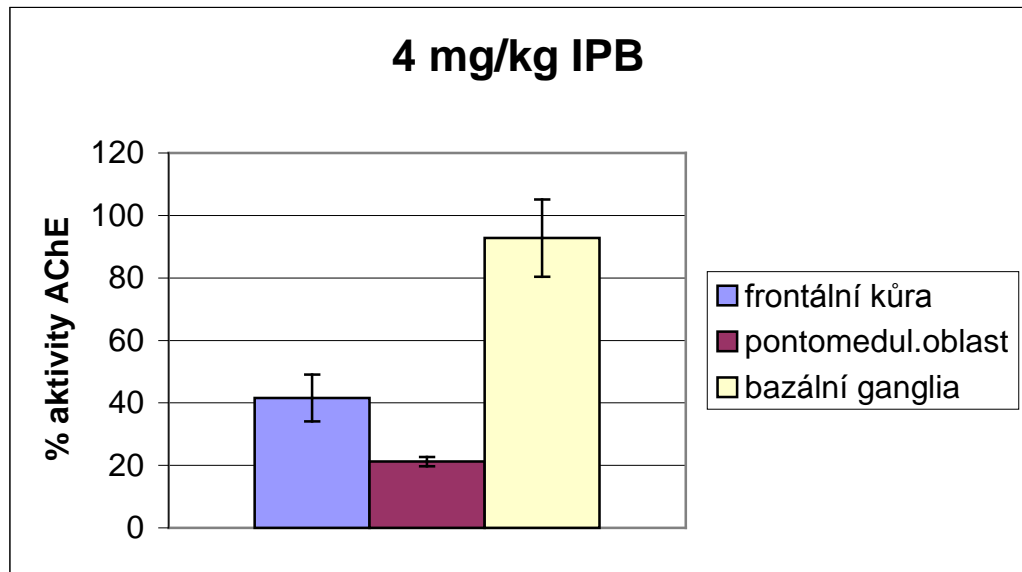
Obr.č.9. Srovnání aktivity AChE v různých částech mozku (frontální kůře, pontomedulární oblasti a bazálních gangliích) při použití 2 mg/kg VX látky a odmoření pomocí rukavice.



Při použití stejné koncentrace VX látky (2 mg/kg), a s použitím odmořovací činidla byla aktivita AChE v jednotlivých částech mozku obdobně vysoká jako při použití IPB (Obr.č.9). Také zůstala zachována nejvyšší inhibice AChE v pontomedulární oblasti a nejnižší v bazálních gangliích.

Obr.č.10. Srovnání aktivity AChE v různých částech mozku (frontální kůře, pontomedulární oblasti a bazálních gangliích) při použití 4 mg/kg VX látky a odmoření

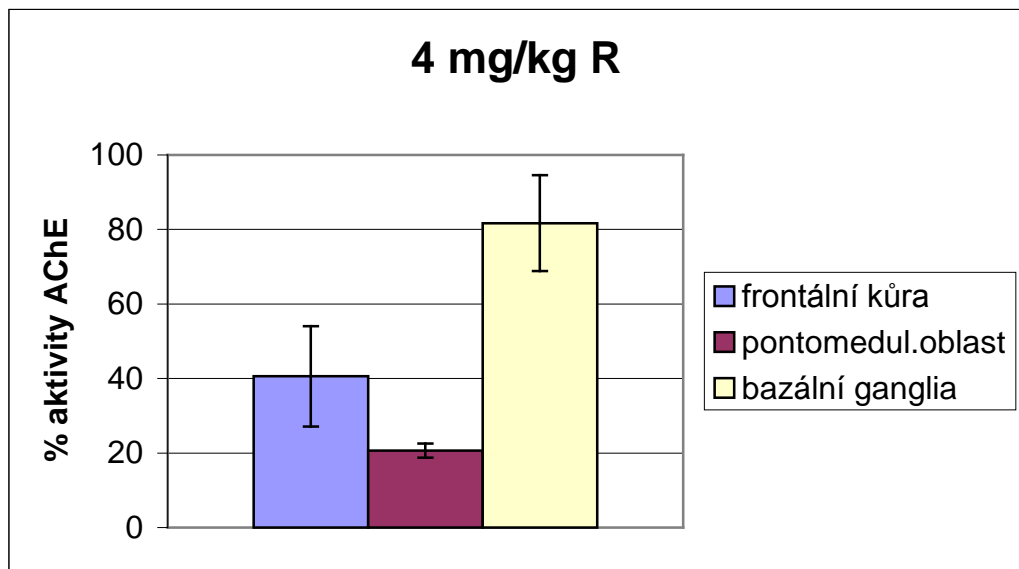
pomocí IPB.



Při použití 4 mg/kg VX látky a odmoření IPB byla nejvyšší aktivita AChE naměřena opět v bazálních gangliích, poté ve frontální kůře a nejmenší aktivita v pontomedulární oblasti (Obr.č.10).

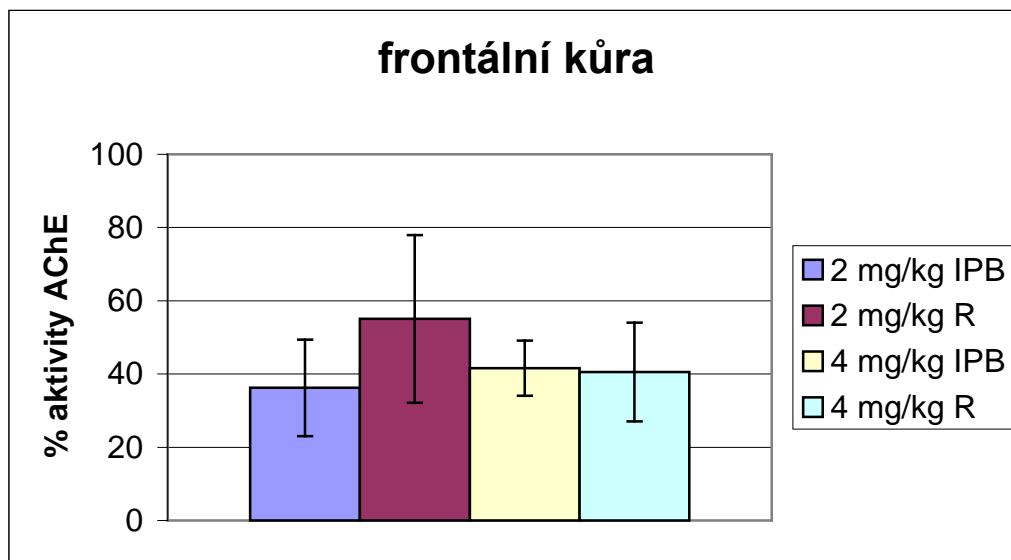
Obr.č.11. Srovnání aktivity AChE v různých částech mozku (frontální kůře, pontomedulární oblasti a bazálních gangliích) při použití 4 mg/kg VX látky a odmoření

pomocí rukavice.



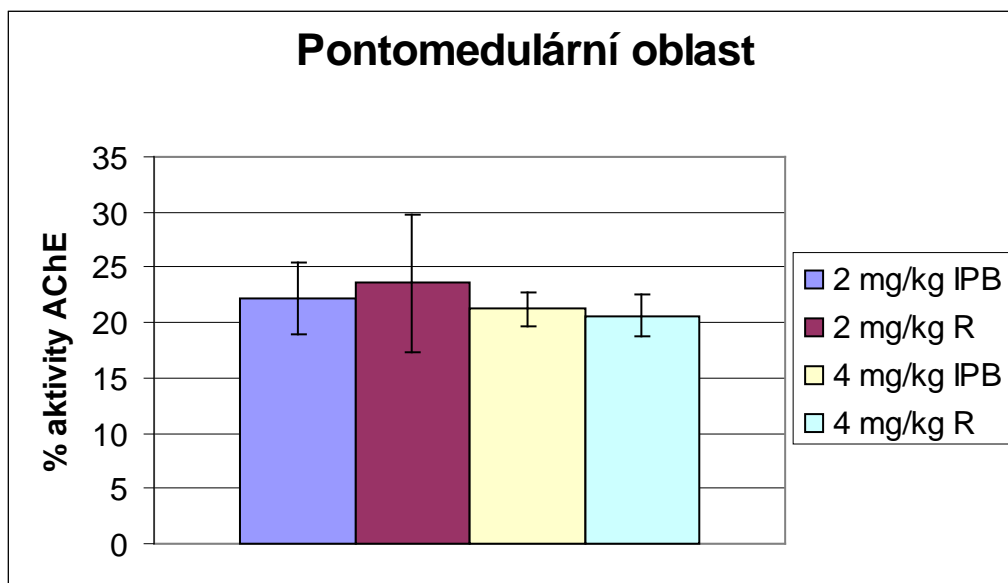
V případě použití 4mg/kg VX látky a použití rukavice jako odmořovacího prostředku byla nejvyšší inhibice AChE naměřena v pontomedulární oblasti, poté ve frontální kůře a nejnižší v bazálních gangliích (Obr.č.11).

Obr.č.12. Srovnání aktivity AChE ve frontální kůře u všech skupin potkanů.



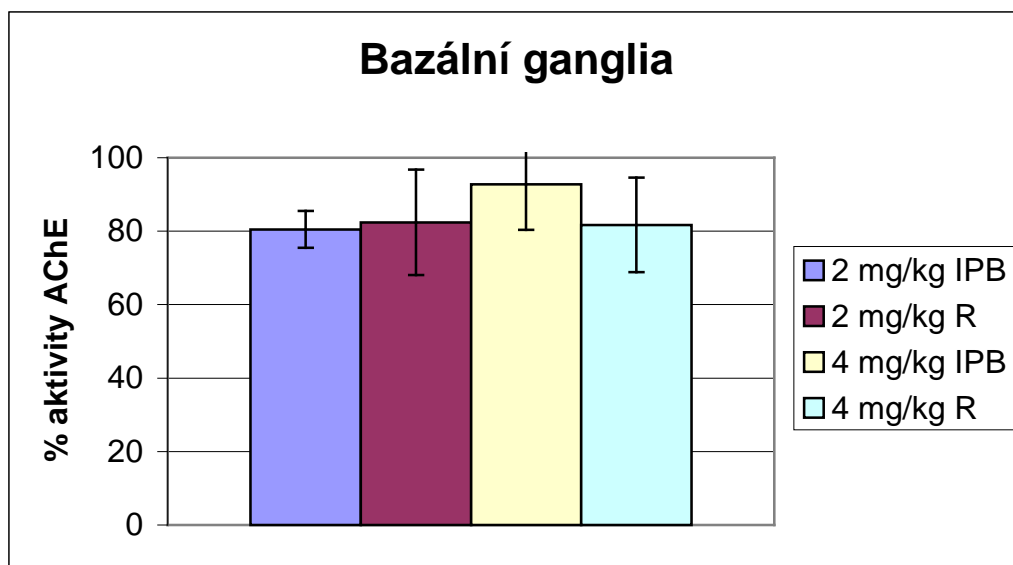
Nejvyšší aktivita AChE ve frontální kůře byla naměřena ve skupině, které byly aplikovány 2 mg/kg VX látky a jako odmořovacího prostředku bylo použito rukavice. Aktivita AChE v ostatních skupinách byla srovnatelná. Rozdílná hodnota aktivity AChE ve skupině 2 mg/kg R však nebyla signifikantní ani při srovnání s 2 mg/kg IPB ani v případě skupiny 4 mg/kg R (Obr.č.12).

Obr.č.13. Srovnání aktivity AChE v pontomedulární oblasti u všech skupin potkanů.



Při měření aktivity AChE v pontomedulární oblasti byla naměřena srovnatelná aktivita AChE u všech zkoumaných skupin. Statistické testy neprokázaly signifikantní rozdíl při vzájemném testování skupin (Obr.č.13).

Obr.č.14. Srovnání aktivity AChE v bazálních gangliích u všech skupin potkanů.



V bazálních gangliích byla nejvyšší aktivita AChE naměřena při použití 4mg/kg VX látky a použití IPB jako odmořovacího prostředku, u ostatních měřených skupin se aktivita AChE pohybovala u 80%. Ani v bazálních gangliích nebyly rozdíly v aktivitě AChE mezi jednotlivými skupinami statisticky významné (Obr.č.14).

## 7 DISKUSE

Pro každou závažnější intoxikaci NPL je po několika minutové latenci charakteristický dramatický průběh, provázený vážným narušením základních životních funkcí, končící bez adekvátní terapie smrtí během 20-30 minut. Vzhledem k vysoké toxicitě a rychlosti účinku NPL tak nabývají na významu ochranná a preventivní opatření s cílem zabránit průniku noxy do organismu. Součástí těchto opatření je také farmakologická profylaxe založená na zvýšení odolnosti organismu vůči této skupině bojových chemických látek. Výzkum se stále zaměřuje i na zvýšení účinnosti následné antidotní terapie (Patočka, 2004a). Pokud dojde k zamoření, je třeba co nejrychleji dekontaminovat zasažené oblasti těla, což zabrání dalšímu prostupu noxy do organismu. Dekontaminace je jedním z nejdůležitějších bodů v první pomoci při zasažení NPL. Rychlost a způsob jakým je dekontaminace provedena, může rozhodovat o přežití zasaženého jedince a je tedy důležité získávat nové poznatky o možnostech dekontaminace, stejně jako o profylaxi, nebo antidotní terapii.

V rámci této diplomové práce jsme porovnávali dva různé způsoby odmoření NPL ve snaze zjistit, který ze dvou způsobů odmoření poskytne lepší výsledky a případně doporučit AČR zavedení účinnější metody, která by byla prakticky použitelná v případě zamoření BOL.

AČR v současné době používá k prvotnímu odmoření nekryté pokožky a přiléhajících částí výstroje zasažených OL IPB - 80 (individuální protichemický balíček). Základ tvoří lahvička s adsorpčním přípravkem DESPRACH. Ten se při odmořování vysype na odmořované místo, OL se nechá vsáknout do prášku a poté se smete z odmořovaného povrchu. Sorbční účinek DESPRACHU se zvyšuje roztíráním přiloženými tampóny (Kassa, 1992).

Tento odmořovací postup byl v diplomové práci považován za standard, s kterým byla porovnávána odmořovací rukavice. Tato rukavice obsahuje pod vnějším pórovitým povrchem DESPRACH. Ten se při roztírání po zasažené pokožce postupně uvolňuje a absorbuje NPL. U obou metod je používána stejná odmořovací látka - DESPRACH.

Výzkum se v poslední době zaměřil také na nové směsi sloučenin pro odmoření pokožky zasažené NPL. Jako schopné prostředky se ukázaly být kationaktivní a neionogenní tenzidy, schopné tvořit pěnu. Příslušné složení a reologické vlastnosti (stabilita, schopnost pění) testovaných směsí se hodnotí v in vitro studiích a jejich

schopnost odstranit kontaminující látky z povrchu a transformovat je v netoxické sloučeniny je vyhodnocována v in vivo studiích. Rychlá a dostatečně efektivní dekontaminace lidské kůže se zdá být skutečně přínosným opatřením v ochraně lidí, před smrtelnými toxickými účinky NPL. Objev těchto různých látek schopných odmořit kůži, jejichž aktivita je založena na vysoké absorpční aktivitě a schopnosti hydrolyzovat kontaminující látku je velkým přínosem pro dekontaminaci po zamoření NPL (Cabal, 2003). Výsledky Cabalovy (2003) studie potvrzují, že lze dosáhnout dobré odmořovací účinnosti jak s laboratorními produkty, tak i s tenzidy produkovanými v průmyslu, kdy tenzidy jsou smíchány s hydrolytickými sloučeninami ve správném poměru.

Z předcházejících výsledků se zdá, že tyto kationaktivní a neionogenní tenzidy jsou opravdu slibnou budoucností v ochraně před toxickými účinky NPL. Jejich velkou výhodou, ale současně i nevýhodou je, že pracují na základě chemické reakce. Touto chemickou reakcí sice dokáží konvertovat velmi toxickou látku na netoxický produkt, ale nevýhoda spočívá v tom, že obě zúčastněné látky spolu musí reagovat, a protože fyzikálně chemické vlastnosti BOL se liší, je tedy těžké najít odmořovadlo, které by bylo univerzální a reagovalo se všemi BOL. Další výhodou se zdá být skutečnost, že kromě dekontaminace vojáků po zamoření NPL, by mohly tyto směsi tvořící pěnu chránit před sekundární kontaminací zdravotnického personálu, zatímco by tento ošetřoval zasažené vojáky (Cabal, 2003). Nesnadným úkolem však je vytvořit dostatečně účinnou směs, která má současně i výborné reologické vlastnosti a dokáže na pokožce vytvořit dostatečně hustou pěnu, která nestéká a vydrží určitou dobu, potřebnou k odstranění kontaminující látky z povrchu a ke vzniku reakce. Zásadním problémem je tedy neuniverzálnost těchto směsí a proto je stále jako univerzální odmořovací látkou v AČR používán DESPRACH, který se díky svým adsorpčním schopnostem dá použít k odmoření jakékoliv, tedy i neznámé BOL. Teprve čas a další výzkumy ukáží, zda bude vyměněn za účinnější, ale zároveň stejně univerzální látku.

V naší studii jsme jako modelovou BOL použili silně toxickou VX látku. Je známo, že V - látky jsou obecně toxicitější než G - sloučeniny což je pravděpodobně způsobeno tím, že v organismu se V - látky nerozkládají. Účinek V - látek (zejména VX ) je v porovnání se sarinem nebo somanem delší (Vachek, 1996). VX látka inhibuje AChE přednostně v periferním nervovém systému (Bajgar, 1992). Nejvyšší inhibice AChE v mozku je pak popisována v pontomedulární oblasti (Bajgar, 1992). I v naší studii můžeme tuto skutečnost potvrdit, i my jsme nejvyšší inhibici AChE zaznamenali právě v pontomedulární oblasti.

Mozek je velmi dobře uspořádaný a komplexní orgán, obsahující v jednotlivých mozkových strukturách různé druhy neuromediátorů a příslušné enzymy. Bylo zjištěno, že mezi bazálními ganglii (konkrétně ve striatu) a mozečkem je minimálně čtrnáctinásobný rozdíl v aktivitě AChE (Gupta, 2004). Další studie (Bajgar, 2007) ukazuje, že rozdíl mezi aktivitou AChE v bazálních gangliích a ve frontální kůře je pětinašobný, což je v souladu s Guptovými výsledky. V naší studii byl rozdíl v aktivitě AChE mezi bazálními ganglii a frontální kůrou minimálně dvojnásobný (viz. grafy č.8-11).

Ve všech jmenovaných studiích, včetně naší, jsou výsledky inhibice AChE v jednotlivých částech mozku porovnatelné, i přesto, že byly použity odlišné NPL, různé dávky NPL, a také různý způsob jejich podání.

Ve studii Bajgara (2007) je uváděno, že i při použití nižších dávek, než jaké použil Gupta (1987, 2000, 2004) jsou výsledky jen mírně odlišné. VX způsobila prakticky totální inhibici AChE v kůře, pontomedulární oblasti, a hipokampu, ale inhibice ve striatu (bazálních gangliích) nebyla téměř zaznamenána. Mozkové části mající nižší AChE aktivitu, jako je mozková kůra, by mohly vykazovat vyšší procentuelní inhibici hlavně proto, že obsahují menší počet buněk s AChE aktivitou. Tato interpretace pravděpodobně platí pro vyšší dávky NPL (Bajgar, 1972) a může být platná pro většinu mozkových částí s výjimkou pontomedulární oblasti. Pontomedulární oblast, která má relativně vysokou AChE aktivitu, byla silně inhibovaná všemi zkoušenými NPL (Bajgar, 2007). Pontomedulární oblast je k inhibici NPL nejvíce citlivou částí mozku (Bajgar, 1972). V tomto kontextu je velmi důležité zaměřit se na pontomedulární oblast, kde je regulováno dýchání přes dechové regulační centrum. Útlum hlavních respiračních kontrolních center v pontomedulární oblasti je považován za primární příčinu vedoucí ke smrti (Goswamy, 1994; Sungur, 2001; Pope, 2006).

Existují i určité pohlavní rozdíly v AChE aktivitě, které se mohou projevit v toxikodynamických studiích, nicméně tyto rozdíly nejsou příliš významné. V experimentech se tedy pracuje s jedním druhem pohlaví, ale při srovnávání výsledků jednotlivých studií se většinou nerozlišuje jaké pohlaví potkana bylo vybráno pro daný výzkum. V naší studii byly použity samice albinotického potkana o váze 230 – 260 g.

V naší studii jsme VX látku podávali perkutánně in vivo na vymezenou hřbetní část kůře potkanů. Je to jeden z možných experimentálních modelů pro intoxikaci NPL. Domníváme se, že tento model nejlépe napodobuje situaci, která nastává v praxi při

plošné otravě BOL. Je třeba zmínit, že studií, ve kterých je NPL podávaná perkutánně není mnoho (např. Vijayaraghavan, 2004), většinou jsou tyto látky podávány in vivo subkutánně, nebo intravenózně.

Při perkutánním a injekčním podání se liší toxikodynamické i toxikokinetické parametry. Kůže hraje velmi důležitou roli v transformaci topicky aplikovaných materiálů a činidel a to přímou biochemickou přeměnou. Bylo také zjištěno, že kůže obsahuje mnoho enzymů podobně jako v játrech, které mohou konvertovat inaktivní molekuly jako např. polycyklické uhlovodíky na aktivní karcinogeny (Vijayaraghavan, 2004). Vijayaraghavan (2004) dále ve své práci popisuje různé metabolické cesty sarinu po dermální aplikaci, které vedou k různě toxickým metabolitům a vyvozuje z toho závěr, že ačkoliv je ve všeobecném povědomí, že chemikálie jsou mnohem více toxické pokud jsou aplikované injekčně, nebo přijímané potravou, tak jeho studie jako první dokazuje že chemikálie aplikované perkutánně mohou být mnohem více toxičtější.

První příznaky otravy po perkutánní aplikaci VX látky a odmoření DESPRACHEM se v našem experimentu objevily u potkanů průměrně do 23 minut po použití 4 mg/kg VX látky (odpovídá 56% LD<sub>50</sub>). Při použití 2 mg/kg VX látky (odpovídá 28% LD<sub>50</sub>) se první příznaky po odmoření DESPRACHEM objevily v průměru po 30 minutách. Nástup účinku VX látky je např. ve srovnání se sarinem pomalejší, Gupta (1991) ve své studii udává, že po subkutánním podání 1 μg/kg VX látky se první toxické příznaky u potkanů objevily do 20 – 50 minut po podání, zatímco po podání sarinu, nástup účinku zaznamenal do 5 – 15 minut. Bajgar (2007) použil pro i.m. aplikaci VX látky 0,5xLD<sub>50</sub> a první příznaky otravy opět pozoroval do 30ti minut. V našem případě by se dalo usuzovat, že v závislosti na dávce se objevují i první příznaky otravy, protože při použití dávky 28% LD<sub>50</sub> se první příznaky jasně objevily později než u dávky 56% LD<sub>50</sub>. Srovnání s Guptovými (1991), nebo Bajgarovými (2007) studiemi, přináší jednotný výsledek, že zhruba do 30 minut se objevují první příznaky, ovšem je třeba si uvědomit, že v každé studii bylo použito jiné množství VX a byla zvolena jiná forma podání.

Zajímavé je i srovnání zvoleného způsobu podání, tzn. i.m. podání dle Bajgara (2007) a perkutánní podání v naší studii. Bajgar (2007) podal potkanům i.m. 0,5xLD<sub>50</sub> a přitom ze skupiny deseti zvířat přežila všechna i bez odmořovacího zásahu. V naší studii jsme v jednom z našich experimentů použili 4mg/kg VX látky a v obou případech jak po odmoření rukavicí, tak po odmoření IPB uhynuly v obou skupinách, kde bylo po šesti potkanech, tři zvířata. Popsané rozdíly mezi perkutánní a intramuskulární aplikační

formou by mohly svědčit o vyšší toxicitě VX látky aplikované na kůži.

Záměrně byly také použity dávky VX látky 2mg/kg a 4 mg/kg, které odpovídají 28% a 56% LD<sub>50</sub> a to z toho důvodu, aby byl úhyn zvířat u jednotlivých dávek výraznější a bylo tak možné i podle vyššího či nižšího úhynu porovnat účinnost obou způsobů odmoření. U dávky 4mg/kg byl úhyn zvířat v obou testovaných skupinách stejný (3/6), což nasvědčuje o stejné odmořovací účinnosti rukavice a IPB. Při použití dávky 2 mg/kg VX látky se úhyn zvířat lišil. Při odmoření IPB byl zaznamenán pouze úhyn jednoho potkana (1/6), zatímco při odmoření rukavicí byly zaznamenány úhyny tři (3/6), což by mohlo nasvědčovat o nižší odmořovací účinnosti rukavice. Tento rozdílný úhyn zvířat může být způsoben biologickou variabilitou potkanů. Nasvědčuje tomu i fakt, že ve skupinách, kde byla použita dávka vyšší, tedy 4 mg/kg, byly úhyny u obou způsobů odmoření totožné.

V absorpci NPL přes pokožku a její distribuci v organismu je také velký mezidruhový rozdíl. Ve studii Chilcotta (Chilcott, 2005) sledují absorpci a distribuci VX látky u prasete domácího. Prase domácí, jak je všeobecně známo, je nejvhodnějším zvířecím modelem pro studii absorpce látek přes lidskou kůži. Výsledky této studie ukazují, že in vivo perkutánní absorpce VX látky přes prasečí uši je rychlá (odpovídá 660  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  za hodinu) a je také rozsáhlá (bylo absorbováno více než 98% aplikované dávky). Ve srovnání absorpce pokožkou VX látky přes lidskou (hrudní) epidermální membránu je přibližně 5,5krát menší (120  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  za hodinu, Chilcott, 2005).

My jsme použili jako modelová zvířata potkany. Absorpce přes pokožku byla sice vzdálenější lidskému modelu, ale protože naším hlavním cílem bylo porovnat účinnost dvou různých způsobů odmoření, na výsledek, že oba způsoby odmoření jsou stejně účinné, to z hlediska absorpce nemělo vliv, protože u obou způsobů odmoření jsme použili stejná zvířata a zachovali totožné postupy. Navíc použití potkanů je z hlediska manipulace pro laboratorní podmínky přijatelnější a v neposlední řadě i finančně méně náročné.

Všichni potkani, kteří přežili 24 hodin, byli usmrceni a byly jim odebrány mozky, ty jsme zmrazili a rozmrazovali až těsně před preparací jednotlivých částí. Frontální kůru jsme odebrali z přední části mozku těsně nad bulbus olfactorius, tak abychom ho nezasáhli a jen v tenké vrstvě, abychom se nedostali do hlubší vrstvy. Pak jsme asi v polovině mozku vyřízli asi třímilimetrový pás a z něj vypreparovali bazální ganglia, která byla barevně odlišena od ostatních mozkových struktur. Nakonec jsme ze spodní části mozku vypreparovali pontomedulární oblast. Vypreparované části jsme

poté homogenizovali a homogenát použili k měření AChE aktivity na spektrofotometru.

Při porovnání výsledků v naší studii jsme nezjistili žádné signifikantní rozdíly mezi oběma zkoumanými způsoby odmoření, tedy mezi v armádě používaným IPB a novější variantou, rukavicí. Odmořovací účinnost v obou testovaných případech byla shodná.

Používání rukavice místo IPB bychom mohli doporučit z hlediska lepší a bezpečnější manipulace, která je velmi snadná a při jejich reálném použití na větší ploše (člověk) je rychlost odmoření vyšší než při použití balíčku IPB 80, protože v procesu odmořování je využita celá plocha rukavice (dlaně), zatímco u IPB 80 se odmořuje jen malou plochou tamponu. Protože pokus probíhal na malých laboratorních zvířatech, nemohla být testována celá rukavice, a to kvůli špatné manipulaci s rukavicí na poměrně malé zamořené ploše. To by mohlo vysvětlovat, proč odmořovací účinnost u obou způsobů byla stejná, pokud by byl pokus proveden na zvířatech větších, jako je např. prase, mohla by být k odmoření použita celá rukavice a výsledek by mohl být efektivnější, právě díky větší ploše, která je zároveň odmořována.

Důležitým parametrem rukavice je jistě velikost pórů, která by měla být taková, aby se z nich uvolnilo dostatečné množství DESPRACHU potřebného k adsorpci NPL a také se předpokládá jeho vyšší obsah mezi vrstvami rukavice, než který je v IPB, to z toho důvodu, že DESPRACH z IPB nasypeme na kůži a roztíráme tampóny, ale při tření kůže rukavicí se DESPRACH z rukavice uvolňuje postupně a nějaká část může uvíznout mezi vrstvami textilie.

Z ekonomického hlediska, pokud porovnáme účinnost versus cena by náklady na rukavici byly o něco vyšší než jaké jsou na IPB, a to z důvodu vyššího obsahu DESPRACHU v rukavici, materiál a náklady na výrobu. Protože cena DESPRACHU je poměrně nízká a náklady spojené s výrobou takové rukavice také nebudou příliš vysoké, lze zavedení rukavic místo IPB do AČR doporučit i z finančního hlediska.

Pro další potvrzení výsledků by bylo užitečné zopakovat pokus tak, aby bylo možné použít celé plochy rukavice a použít tedy jiné experimentální zvíře, např. prase.

## 8 ZÁVĚR

V rámci této práce byla provedena srovnávací studie dvou zadaných způsobů odmoření kůže zasaženou BOL.

Srovnávanými metodami byly:

- individuální protichemický balíček ( IPB – 80 ), používaný v AČR
- rukavice, nová alternativa k IPB – 80

Podle našich výsledků nebyly prokázány žádné signifikantní rozdíly mezi oběma způsoby odmoření a můžeme je tedy považovat za stejně účinné.

Při porovnání inhibice acetylcholinesterázy (AChE) v jednotlivých částech mozku po expozici NPL naše výsledky odpovídaly výsledkům srovnatelných vědeckých studií.

Domníváme se, že na základě získaných výsledků by bylo vhodné experiment opakovat u větších pokusných zvířat, aby mohla být k odmoření kůže využita celá plocha rukavice.

Z ekonomického hlediska by bylo možné zavedení odmořovacích rukavic do AČR doporučit, protože by zřejmě nepředstavovalo výrazné navýšení nákladů ve srovnání s výrobou IPB-80.

## 9 SOUHRN

Cílem diplomové práce bylo srovnání dvou způsobů odmořovací techniky a to

standardní pomocí individuálního protichemického balíčku IPB-80 a nové s použitím speciální odmořovací rukavice.

Pokusy byly prováděny na samicích laboratorního potkana kmene Wistar. Na vyholenou hřbetní část pokusného zvířete byla nejprve nanesena VX látka a poté provedeno odmoření jedním z uvedených způsobů. Potkani byli po 24 hodinách usmrceni dekapitací a byly jim odebrány mozky.

Aktivita acetylcholinesterázy (AChE) byla měřena ve frontální kůře, bazálních gangliích a pontomedulární oblasti. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl a odmořovací účinnost obou použitých metod se ukázala shodná.

## **10 SUMMARY**

Determination of acetylcholinesterase activity in the rat brain after VX

## intoxication and following decontamination

The purpose of these was to compare two different kinds of decontamination methods. The first was a standard one using a personal decontamination set IPB-80, and the second, a new method using a special decontamination glove.

Experiments were conducted on laboratory female Wistar rats. Firstly VX compound was applied to shaved dorsal rat skin and subsequently one of the aforementioned decontamination methods was tested. All rats were killed by decapitation after 24 hours and their brains were removed. The activity of acetylcholinesterase (AChE) was measured in the frontal cortex, basal ganglia and pontomedullar area. There was no significant difference observed between the two methods, the decontamination efficacy of each method being identical.

## **11 POUŽITÁ LITERATURA**

AUGERSON, W.S. *A Review of the Scientific Literature as it Pertains to Gulf War Illnesses, Chemical and Biological Warfare Agents*. 1st ed.: Rand, 2000, vol.5, 265 s.

BAJGAR, J., et al. Changes of acetylcholinesterase activity in different rat brain areas following intoxication with nerve agents: Biochemical and histochemical study. *Chemico-Biological Interactions*, 2007, vol. 165, s.14-21.

BAJGAR, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv. Clin. Chem.* 2004a, vol. 38, s.151-216.

BAJGAR, J., et al. Complex prophylaxis against nerve agent intoxication. *8th International Symposium on Protection against Chemical and Biological Warfare Agents 2-6 June, 2004b Gothenburg, Švédsko*. s. 51.

BAJGAR, J. Differential inhibition of the brain acetylcholinesterase molecular forms following sarin, soman and VX intoxication in laboratory rats. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 1997, vol. 40, s. 89-94.

BAJGAR, J. Biological monitoring of exposure to nerve agents. *Br. J. Ind. Med.* 1992, vol. 49, s. 648-653.

BAJGAR, J. Determination of acetylcholinesterase activity in human blood-possible modification for field conditions (in Czech), *Voj. Zdrav. Listy*, 1972, vol. 41, s.78-80.

CABAL, J., et al. Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2004, vol. 95, s. 81-86.

CABAL, J., et al. A comparison of the decontamination efficacy of foam-making blends based on cationic and nonionic tensides against organophosphorus compounds determined in vitro and in vivo. *Human&Experimental Toxicology*, 2003, vol. 22, s. 507 – 514.

CHILCOTT, R.P., et al. In vivo skin absorption and distribution of the nerve agent VX (O-ethyl-S-[2(diisopropylamino)ethyl]methylphosphonothioate) in the domestic white pig. *Human&Experimental Toxicology*, 2005, vol. 24, s.347-352.

COKUGRAS, A.N. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk. J. Biochem.* 2003, vol. 28, s. 54-61.

DAWSON, R.M. Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning. *J. Appl. Toxicol.* 1994, vol. 14, s. 317-331.

DRISKELL, W.J., et al. Quantitation of organophosphorus nerve agent metabolites in human urine using isotope dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 2002, vol. 26, s. 6-10.

ELLMAN, G.L., et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, vol. 7, s. 88-95.

FIDDER, A. et al. Retrospective detection of exposure to organophosphorus anti-cholinesterases: mass spectrometric analysis of phosphorylated human butyrylcholinesterase. *Chem. Res. Toxicol.* 2002, vol. 15, s. 582-590.

GOSWANY, R., CHAUDHURI, A., MAHASHUR, A.A. Study of respiratory failure in organophosphate and carbamate poisoning, *Heart lung*, 1994, vol.23, s.466-472.

GUPTA, R.C. Brain regional heterogeneity and toxicological mechanisms of organophosphates and carbamates, *Toxicol. Mech. Meth.*, 2004, vol.14, s.103-143.

GUPTA, R.C., et al. Cholinergic and non-cholinergic brain biomarkers of insecticide exposure and effect, *Hum. Exp. Toxicol.*, 2000, vol. 19, s.297-308.

GUPTA, R.C., PATTERSON, G.T., DETTBARN, W.D. Comparison of cholinergic and neuromuscular toxicity following acute exposure to sarin and VX in rat. *Fundam Appl Toxicol.*, 1991, vol.16, s.449-458.

GUPTA, R.C., et al. Biochemical and histochemical alterations following acute soman intoxication in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1987, vol.87, s.393-402.

HAYES, A.W. *Principles and methods of toxicology*. 4th ed. Philadelphia: Taylor and Francis, 2001. 1888 s.

HRDINA, V. a kol. *Toxikologie bojových chemických látek a zdravotnicko-protichemická ochrana*. 1. vyd. Hradec Králové: Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav J.E.Purkyně, 1983. 238 s.

KALISTE-KORHONEN, E., et al. Interspecies differences in enzymes reacting with organophosphates and their inhibition by paraoxon in vitro. *Hum. Exp. Toxicol.* 1996, vol. 15, s. 972-978.

KASSA, J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2002a, vol. 40, s. 803-816.

KASSA, J., CABAL, J. A comparison of the efficacy of a new asymmetric bispyridinium oxime BI-6 with currently available oximes and H oximes against soman by in vitro and in vivo methods. *Toxicology*. 1999, vol. 132, s. 111-118.

KASSA, J. Non-specific effects of organophosphorus inhibitors of cholinesterases. *Voj. Zdrav. Listy*. 1998, vol. 67, s. 15-19.

KASSA, J., KRS, O., CABAL, J. Základy vojenské toxikologie a ochrany proti BChL, 1992, s.37 – 40.

LANDER, F., LINGS, S. Variation in plasma cholinesterase activity among greenhouse workers, fruitgrowers, and slaughtermen. *Br. J. Ind. Med.* 1991, vol. 48, s. 164-166.

LITTLE, P.J., et al. Distribution of [3H]diisopropylfluorophosphate, [3H]soman, [3H]sarin, and their metabolites in mouse brain. *Drug. Metab. Dispos.* 1988, vol. 16, s. 515-520.

LOCKRIDGE, O., MASSON, P. Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology*. 2000, vol. 21, s. 113-126.

LÜLLMAN, H., et al. *Farmakologie a toxikologie*. 1.vyd. Praha: Grada Publishing, 2002. 694 s.

MARRS, T.C. Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Ther.* 1993, vol. 58, s. 51-66.

NOZAKI, H., et al. Secondary exposure of medical staff to sarin vapor in the emergency room. *Intensive Care Med.* 1995, vol. 21, s.1032-1035.

PATOČKA, J., a kol. *Vojenská toxikologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004a. 180 s.

PATOČKA, J., et al. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase - important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2004b, vol. 47, s. 215-228.

POLHUIJS, M., et al. New method for retrospective detection of exposure to organophosphorus anticholinesterases: application to alleged sarin victims of Japanese terrorists. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997, vol. 146, s. 156-161.

POPE, C.N. Central nervous system effects and neurotoxicity, in: R.C. Gupta(Ed.), *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compound*, Elsevier-Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 2006, s.271-291.

SHIH, M. L., et al. Metabolite pharmacokinetics of soman, sarin and GF in rats and biological monitoring of exposure to toxic organophosphorus agents. *J. Appl. Toxicol.* 1994, vol. 14, s. 195-199.

SUNGUR, M., GUVEN M. Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning, *Crit. Care*, 2001, vol .5, s.211-215.

VACHEK, J., et al. Toxicities of O-alkyl S-(-2-dialkylaminoethyl) methyl phosphonothiolates (V-compounds). *Acta medica (Hradec Králové)*, 1996, vol.39, s.67-71.

VIJAYARAGHAVAN, R., et al., Differential toxicity of sulfur mustard administered through percutaneous, subcutaneous, and oral routes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, vol. 202, s.180-188.

WIENER, S. W., HOFFMAN, R.S. Nerve agents: a comprehensive review. *J. Intens. Care Med.* 2004, vol. 19, s. 22-37.

YOKOYAMA, K., YAMADA, A., MINURA, N. Clinical profiles with sarin poisoning after the Tokyo subway attack. *Am. J. Med.* 1996, vol. 100, s. 586.