

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra farmakologie a toxikologie

**Terapie experimentální otravy  
organofosforovými sloučeninami vybranými oximy**

**Rigorózní práce**

Vedoucí práce : Doc. MUDr. Josef Herink, DrCs.

Hradec Králové 2007

Mgr. Irena Svobodová

## OBSAH

1	ABSTRAKT .....	- 4 -
2	ABSTRACT .....	- 5 -
3	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	- 6 -
4	TEORETICKÁ ČÁST .....	- 7 -
4.1	ENZYMY .....	- 7 -
4.2	CHOLINESTERÁZY .....	- 7 -
4.2.1	BUTYRYLCHOLINESTERÁZA .....	- 8 -
4.2.2	ACETYLCHOLINESTERÁZA .....	- 8 -
4.2.3	KLINICKÝ VÝZNAM ENZYMŮ .....	- 10 -
4.3	INHIBITORY CHOLINESTERÁZ .....	- 11 -
4.3.1	REAKTIVNÍ INHIBITORY .....	- 11 -
4.3.1.1	Acylojící inhibitory .....	- 11 -
4.3.1.2	Karbamáty .....	- 12 -
4.3.1.3	Organofosfáty ( OF ) .....	- 14 -
4.3.2	NEREAKTIVNÍ INHIBITORY .....	- 24 -
4.3.2.1	Nekvartérní inhibitory .....	- 25 -
4.3.2.2	Kvartérní inhibitory .....	- 26 -
4.4	REAKTIVÁTORY CHOLINESTERÁZY .....	- 27 -
4.5	TESTOVANÉ OXIMY .....	- 31 -
4.5.1	RVX .....	- 31 -
4.5.2	Soman .....	- 32 -
4.5.3	Tabun .....	- 32 -
4.6	METODY STANOVENÍ AKTIVITY CHOLINESTERÁZ .....	- 33 -
4.7	CÍL PRÁCE .....	- 36 -
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	- 37 -
5.1	MATERIÁL .....	- 37 -
5.1.1	Biologický materiál .....	- 37 -
5.1.2	Použité chemikálie .....	- 37 -
5.2	METODIKA .....	- 38 -
5.2.1	Ellmanova metoda .....	- 38 -
5.2.2	Homogenizace .....	- 41 -
5.3	PODMÍNKY EXPERIMENTU PRO RVX .....	- 42 -
5.4	PODMÍNKY EXPERIMENTU PRO SOMAN .....	- 42 -
5.5	PODMÍNKY EXPERIMENTU PRO TABUN .....	- 42 -
5.6	IN VIVO EXPERIMENT .....	- 43 -
5.6.1	RVX .....	- 44 -
5.6.1.1	Experiment I. – sledování farmakokinetiky RVX .....	- 44 -
5.6.1.2	Experiment II. – srovnávání účinnosti terap.komb. pro léčbu otrav RVX .....	- 50 -
5.6.2	Soman .....	- 55 -
5.6.3	Tabun .....	- 60 -
5.7	RVX .....	- 65 -
5.7.1	Výsledky Experimentu I. .....	- 65 -
5.7.2	Výsledky Experimentu II. .....	- 65 -
5.8	SOMAN .....	- 66 -
5.9	TABUN .....	- 67 -
6	HODNOCENÍ DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ .....	- 69 -
7	POUŽITÁ LITERATURA .....	- 72 -

Chtěla bych velice poděkovat svému školiteli Doc. MUDr. Josefu Herinkovi, DrSc. za odborné vedení během zpracování práce, cenné připomínky a rady, které mi poskytoval.

Dále bych chtěla poděkovat pracovnímu kolektivu Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové, který mě provedl experimentální částí, naučil mě pracovat s biologickým materiálem a zajistil mi odborné a příjemné prostředí pro vykonání práce.

Na závěr bych chtěla poděkovat i svým nejbližším za jejich podporu.

## 1 ABSTRAKT

Předmětem práce bylo srovnání účinnosti vybraných oximů při antidotní terapii modelové intoxikace somanem, RVX a tabunem. Pokusy byly provedeny na samcích laboratorního potkana kmene Wistar a na myších kmene NMRI. Oximy byly podávány i.m. a to jak jednotlivě, tak v kombinaci s atropinem. Odběry mozků pro vyšetření aktivity AChE byly prováděny v několika časových intervalech. Testované oximy (pralidoxim, obidoxim, HI-6) prokázaly rozdílnou schopnost reaktivace inhibované AChE. Nejefektivnějším antidotním prostředkem intoxikace somanem i RVX byl oxim HI-6. U akutních intoxikací tabunem se jako nejúčinnější oxim ukázal obidoxim.

## **2 ABSTRACT**

The aim of present work was a comparison of effectiveness of oximes chosen in the experimental therapy of nerve agents intoxication (soman and russian VX). All experiments were performed in male Wistar rats and in mice NMRI. All oximes tested were administered intramuscularly either in a separate injection or in combination with atropine. The preparation of the brain parts for determination of acetylcholinesterase was performed in several time intervals after drugs tested administration. Antidotal potency of oxime HI-6 was superior in comparison with the rest of oximes tested by soman and russian VX. The oxim obidoxime is the most effective oxim in the acute intoxication.

### 3 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimer's disease, Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
APP	amyloid prekursor protein
ATR	atropin
BuChE	butyrylcholinesteráza
CNS	centrální nervový systém
CSF	cerebrospinal fluid, cerebrospinální tekutina
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyselina, Ellmanovo činidlo
GIT	gastrointestinální trakt
HCl	kyselina chlorovodíková
HEB	hematoencefalická bariéra
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ChE	cholinesteráza
i.m.	intramuskulární aplikace
i.v.	intravenózní aplikace
KTOX, FVZ UO, HK	Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové
M – receptor	muskarinový receptor
MMC	methoxim
NPL	nervově paralytické látky
OF	organofosfáty
OPID	organophosphate – induced delayed polyneuropathy
2-PAM	pralidoxim
p.o.	perorální aplikace
RVX	ruská VX látka
St.D.	standard deviation, standardní odchylka
T0 048	obidoxim
TMB – 4	trimedoxim

## 4 TEORETICKÁ ČÁST

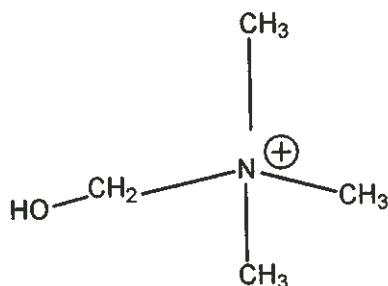
### 4.1 ENZYMY

Enzymy jsou specifické biologické katalyzátory, které řídí v živých organismech metabolické pochody a podílí se na regulaci a vzájemné koordinaci životně důležitých funkcí. Jsou to ve své podstatě proteiny, které jsou schopny snižovat aktivační energii některých chemických reakcí a tím je i urychlit. Děje se tak složitými mechanismy na komplikovaných površích enzymů, které vytváří vhodné prostředí pro zdáný průběh chemických reakcí, které jsou součástí metabolismu. Významným místem každého enzymu je tzv. katalytické centrum, místo, kde dochází k navázání chemické látky (substrátu) a její přeměně na látku jinou (produkt). Dnes je známo několik tisíc enzymů a každý organismus má své specifické enzymy, které se podílí na metabolických procesech.<sup>1</sup>

### 4.2 CHOLINESTERÁZY

Cholinesterázy (ChE) patří do skupiny serinových hydroláz štěpících esterovou vazbu cholinových esterů.

Cholin:



U teplokrevných organismů existují dva typy ChE. Podle toho, který ester cholinu štěpí, rozeznáváme pravou acetylcholinesterázu (AChE, EC 3.1.1.7) a pseudocholinesterázu (butyrylcholinesterázu; BuChE, 3.1.1.8).

Kromě AChE a BuChE existují v organismu ještě další esterázy, které byly charakterizovány jako samostatné typy. Patří mezi ně např. benzoylcholinesteráza, která má největší afinitu k benzoylcholinu, dále acylesterázy, štěpící acylestery, lipáza, která má vysokou afinitu k esterům mastných kyselin a fosfolipázy hydrolyzující fosfolipidy. Pro úplnost, je nutné uvést i pektinesterázu, štěpící pektinové estery s cholesterolesterázu, která se účastní rozkladu esterifikovaného cholesterolu.

#### 4.2.1 BUTYRYLCHOLINESTERÁZA

BuChE byla nalezena v tělních tekutinách, nachází se v játrech, v krevní plazmě, pankreatu, v endotelu kapilár v CNS apod. Není to zcela specifický enzym a má optimum účinku až při vysokých koncentracích substrátu. Kromě výskytu v organismu se liší od AChE i afinitou k příslušným substrátům či inhibitorům. Navíc je její molekula tvořena jen jedním polypeptidickým řetězcem, obsahujícím asi 25 % sacharidů. Existuje ve více než devíti isomerních formách.

Je syntetizována v mnoha tkáních, včetně jater, plic, srdce a mozku. V současnosti je známa její role v metabolismu lipoproteinů, úloze při udržování myelinu, buněčné adhezi a neurogenezi, z části jako scavenger toxických molekul. Má také důležitou roli při biotransformaci některých léčiv, např. lokálních anestetik prokainu, amethokainu, bupivakainu, dále suxamethonia anebo jiných sloučenin jako aspirin.

V lidském mozku se nachází v neuronech, gliích, destičkách a neurofibrilárních klucích u Alzheimerovy choroby (viz dále).

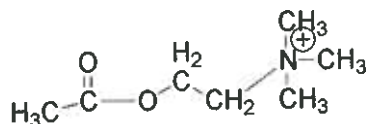
#### 4.2.2 ACETYLCHOLINESTERÁZA

AChE je fyziologicky důležitý enzym, bez něhož by nemohl fungovat cholinergní nervový systém. Je substrátově vysoce specifický a vždy vázaný na buněčné struktury. Je lokalizovaný v neuronech, zejména na synapsích, v erythrocytech, srdci, nervosvalové ploténce. Je to membránově-ohraničený glykoprotein existující v několika molekulárních formách. V nativním stavu je molekula složena ze dvou řetězců alfa a ze dvou řetězců beta a je tedy tetrametr. Jeho syntéza je úzce spjata s cyklem erythrocytů a již je možná i syntéza biotechnologickým postupem. Poměrné zastoupení AChE a BuChE v lidském organismu je 4 : 1.

Substrátem AChE je acetylcholin (ACh), neuromediátor cholinergního systému. ACh je syntetizován z exogenně dodávaného cholinu (potravou), který je acetylován pomocí acetylkoenzymu A. Tuto reakci katalyzuje enzym cholinacetyltransferáza. Po syntéze je ACh skladován v synaptických váčcích pro potřeby synaptického přenosu vzruchu.<sup>2</sup>



## Acetylcholin



Bezprostřední úloha AChE tkví v hydrolyze ACh na kyselinu octovou a cholin. Enzymatická hydrolyza ACh se uskutečňuje na aktivním centru AChE. Nejdůležitějším místem aktivního povrchu AChE je tzv. katalytické centrum, které je tvořeno hydroxylovou skupinou serinu (tzv. esteratické místo) a karboxylovou skupinou kyseliny glutamové (tzv.  $\alpha$ -anionické místo). Dále se na aktivním povrchu nachází ještě jedno anionické místo, označované jako  $\beta$ , které je rovněž tvořeno karboxylovou skupinou. Toto  $\beta$ -anionické místo bývá také nazýváno jako periferní anionické místo, resp. místo akcelerační, neboť navázáním některých modulátorů na toto místo, např. kalcia, je urychlena hydrolyza ACh. V blízkosti esteratického centra je ještě tzv. oblast hydrofobních interakcí, tvořená seskupením hydrofobních aminokyselin. Katalytické centrum se s největší pravděpodobností nachází na jednom ze dvou polypeptidických řetězců AChE, a to na řetězci alfa, zatímco  $\beta$ -anionické místo a hydrofobní oblast jsou na řetězci beta. Vazebná místa na  $\beta$ -řetězci lze považovat za místa allosterická, neboť jejich obsazení modulátory, ať už inhibitory či aktivátory, ovlivňuje aktivitu enzymu allosterickým mechanismem.<sup>3</sup> BuChE štěpí ACh oproti AChE poloviční rychlostí. Pokud je však AChE inhibována, pak ACh zůstává v místech nervového zakončení, nervový vzruch se z počátku přenáší, což má za následek počáteční stah svalstva.<sup>4</sup>

ACh po i.v. injekci či infúzi zvířeti či člověku způsobuje příznaky vyvolané stimulací postgangliových parasympatických receptorů (M-receptorů): snižování krevního tlaku negativně chronotropním účinkem a nepřímo vyvolanou vasodilatací (zprostředkovanou endotelem), dále negativně inotropní účinek na síně, bronchokonstrikci, zvýšení tonu střevní svaloviny, stimulaci svaloviny močového měchýře, zvýšenou sekreci žláz, stimulaci žaludeční sekrece kyselin a pepsinogenu. Nikotinové receptory ganglií a nervosvalové ploténky jsou k ACh relativně méně citlivé. Farmakologický účinek trvá velmi krátce, protože ACh se velmi rychle rozkládá. Pro velmi rychlou inaktivaci se tedy ACh k terapeutickému užití nehodí.

#### 4.2.3 KLINICKÝ VÝZNAM ENZYMŮ

Aktivita AChE i BuChE není jednotná a má své individuální výkyvy. Je možné říci, že kolísání aktivity AChE v erythrocytech nepodléhá v porovnání s plazmovou BuChE takové variabilitě jako plazmová BuChE. Při dlouhodobém sledování aktivity ChE bylo prokázáno, že aktivita erytrocytární AChE u mužů kolísá v rozmezí  $\pm 8\%$  a  $\pm 12\%$  u žen během jednoho roku. Pro BuChE byl tento rozdíl větší, za rok to bylo  $\pm 25\%$  u mužů a  $\pm 24\%$  u žen. Některá léčiva mohou erytrocytární aktivitu AChE zvyšovat, např. kontraceptiva.

Klinické stanovení aktivity ChE v krvi či v jiných orgánech má význam pro určení či upřesnění diagnózy různých patologických stavů.

Aktivita obou enzymů je ovlivněna pohlavím- u žen je aktivita plazmové BuChE i erytrocytární AChE nižší než u mužů, do dospělosti aktivita obou enzymů stoupá a po padesátém deceniu naopak klesá, takže po 60. roce života většinou nejsou rozdíly mezi aktivitou AChE či BuChE u mužů a u žen. Aktivitu obou enzymů ovlivňuje také výživa- u nízkoenergetické diety, u nedostatku proteinů, je aktivita obou enzymů snížena asi o jednu čtvrtinu. Navíc byly u erytrocytární AChE při nízkoenergetické dietě pozorovány i její změněné vlastnosti.

Aktivita AChE je dále ovlivňována hormonálními vlivy - např. hypothyreózou (pokles aktivity), adenalektomií (zvýšení), kastrací (snížení) apod. Také v časných fázích stresu bylo pozorováno zvýšení aktivity AChE.<sup>2</sup>

### 4.3 INHIBITORY CHOLINESTERÁZY

Inhibitory ChE zpomalují rozklad ACh, protože v závislosti na koncentraci blokují štěpení molekul mediátoru ACh. Na základě zvolených kritérií je můžeme dělit do několika skupin:

- reverzibilní / ireverzibilní
- reaktivní / nereaktivní
- dle chemické struktury

Reverzibilní inhibitory, převážně sloučeniny obsahující kvartérní dusík, vytváří energeticky slabší vazbu na AChE reverzibilního nebo allosterického charakteru. Při interakci se obecně uplatňují vazby elektrostatického či elektrokinetického charakteru. Ireverzibilní inhibitory, jako jsou estery kyseliny fosforečné typu organofosfátů, dokáží ireverzibilně fosforylovat esteratické centrum ChE. Některé z nich však jsou chemicky labilní, takže se v životním prostředí rychle rozpadají.

Inhibitory AChE :

– reaktivní :

- acylující inhibitory
- karbamáty
- organofosfáty a organofosfonáty

-nereaktivní :

- nekvartérní látky
- kvartérní látky

#### 4.3.1 REAKTIVNÍ INHIBITORY

##### 4.3.1.1 ACYLUJÍCÍ INHIBITORY

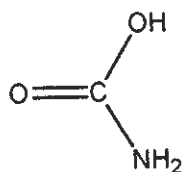
Acylující inhibitory interagují s AChE obdobně jako ACh. Blokáda enzymu je krátkodobá a plně reverzibilní. Tyto látky obsahují ve své struktuře skupinu kyseliny octové. Zbytek této kyseliny se naváže na serinový hydroxyl esteratického centra. Vznikne tak acetylovaná AChE, která je reaktivována hydrolytickým odštěpením kyseliny octové.

#### 4.3.1.2 KARBAMÁTY

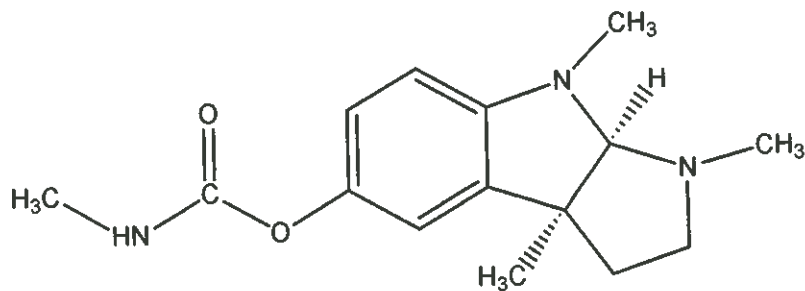
Karbamáty jsou obecně estery karbamové kyseliny. Nejdéle známý a široce používaný inhibitor AChE byl přírodní alkaloid fysostigmin, který je obsažen ve *Physostigma venenosum*, rostlině rostoucí v západní Africe. Další tisíce karbamátů byly pak syntetizovány, když byla objevena anticholinesterázová aktivita fysostigminu a objasněn význam N-metyl karbamové skupiny pro jeho biologickou aktivitu. Z chemického hlediska jsou až na výjimky N-metyl nebo N,N-dimetylkarbamáty. Některé z nich, převážně ze skupiny N-metylkarbamátů, jsou používány jako insekticidy – karbaryl, moban, isolan, atd. Jiné našly uplatnění v humánní a veterinární medicíně – miotin, pyridostigmin, syntostigmin.<sup>5</sup>

Pro jejich podobnost s molekulou ACh nepřekvapuje, že reagují s ChE. Primární kontakt nastává vždy mezi kationickým dusíkem inhibitoru a tzv. anionickým centrem enzymu. Vzniklý karbamoylderivát (komplex karbamoyl + AChE) podléhá rychle dekarbamoylaci (tj. reaktivaci) nukleofilním účinkem vody. Teprve po ztrátě navázané kyselé skupiny je esteráza opět schopna další reakce. Poločasy dekarbamoylace pro metyl- a dimetylkarbamylovanou AChE se pohybují kolem 40 min, což má za následek, že o karbamátech hovoříme jako o pseudoireverzibilních inhibitorech AChE. Dekarbamoylaci navíc nelze urychlit účinkem reaktivátorů, neboť tyto jsou účinné jen u fosforylovaného enzymu. Pokud karbamáty neobsahují v molekule kvartérní dusík, vstřebávají se rychle plicemi, GITem, méně kůží. Jsou poměrně stabilní ve vodných roztocích, ale v organismu mohou být rozkládány nespecifickými esterázami, stejně jako ChE. Proto je jejich účinek závislý hlavně na stabilitě komplexu karbamát-enzym a ani ne tak na biotransformaci nebo rychlosti vylučování. Inhibiční aktivita je podmíněna i strukturou látky a substitucí jednoho z atomu vodíku benzenového jádra alkylem či halogenem. Substituce má za následek zvýšení inhibiční mohutnosti karbamátu, přestože tato část molekuly inhibitoru představuje odstupující část karbamátu. Špatně procházejí HEB, proto jsou centrální symptomy intoxikace minimální. Specifickým antidotem je adekvátní dávka atropinu (ATR).<sup>6</sup>

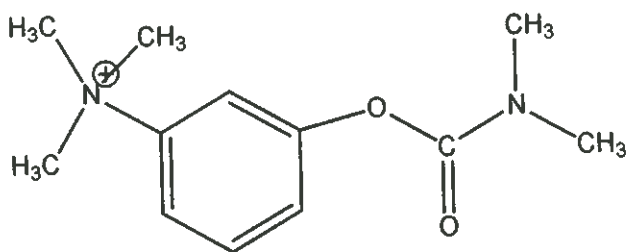
Všechny tyto látky obsahují v molekule skupinu karbamové kyseliny.



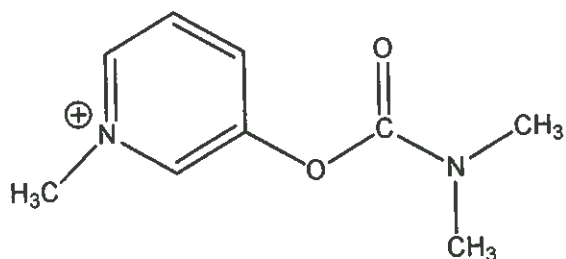
Fysostigmin se používá především v očním lékařství a pro snížení nitroočního tlaku



Neostigmin se používá při myasthenia gravis, postoperační atonii střev a močového měchýře, jako miotikum např. při glaukomu



Pyridostigmin našel použití jako profylaktikum otrav NPL

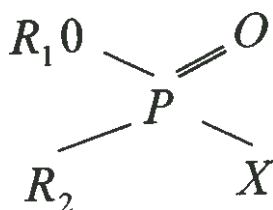
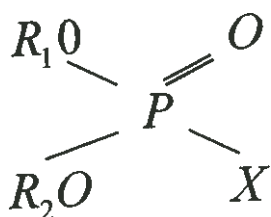


#### 4.3.1.3 ORGANOFOSFÁTY ( OF )

OF jsou synteticky připravované sloučeniny. Jediný přírodně se vyskytující OF je anatoxin-A (s), toxický produkt některých cyanobakterií. Všechny ostatní– syntetické OF– jsou pesticidy, nervově paralytické látky (NPL), změkčovadla plastických hmot nebo přísady do hydraulických kapalin.

První vysoce toxické OF byly připraveny v Německu a Velké Británii v období druhé světové války. Největší expanze syntézy a vývoje nových sloučenin byla v padesátých a šedesátých letech 20. století. OF, jako pesticidy, se v zemědělství a lesním hospodářství užívají již po dlouhou dobu.<sup>5</sup> Některé mají velmi silné insekticidní účinky a po použití se velmi rychle rozpadají. Nevýhodou OF jako insekticidních přípravků je jejich vysoká akutní toxicita pro teplokrevné organismy. Jako vysoce lipofilní látky se v případě, že neobsahují v molekule kvartérní dusík (např. echothifonát), velice rychle absorbují. Do organismu se dostávají všemi cestami včetně spojivek a neporušené kůže. Perkutánní absorpci mohou navíc usnadňovat různá rozpouštědla (chlorované uhlovodíky, xylene, toluen), která jsou součástí insekticidních přípravků, ve kterých se OF jako emulzní koncentráty dostávají do distribuční sítě.<sup>6</sup> Předností je jejich chemická labilita, takže zemědělské produkty jsou požitelné již za krátkou dobu po ošetření při nízkém riziku jejich případné kumulace organismu. Insekticidní účinek je vyvolán stejným molekulárním mechanismem jako toxicita pro teplokrevné živočichy. Nejvýznamnějšími reprezentanty organofosforových inhibitorů AChE z hlediska chemické stavby jsou dialkylfosfáty a dialkylfosfonáty, případně jejich thioanaloga.

Obecná struktura :



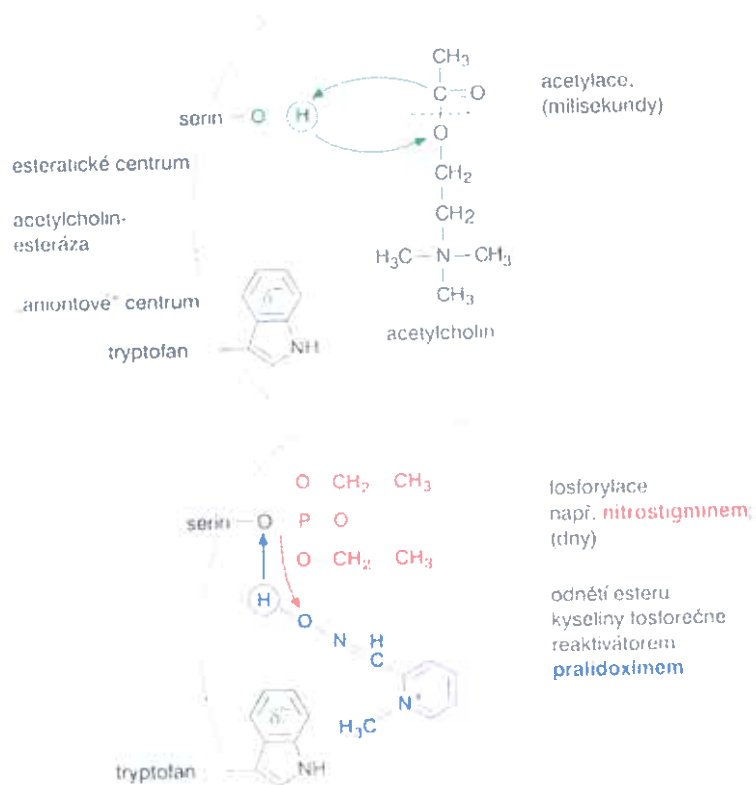
R1 a R2 jsou nejčastěji alifatické alkyly

X je tzv. odstupující skupina, která se při interakci OF s AChE odštěpí a zbývající acyl se naváže na esteratické místo enzymu. Funkci odstupující skupiny může plnit např. halogen, nejčastěji fluór, nitrilová skupina, substituovaný merkaptan atd.

OF, označované jako NPL, se vyznačují vysokou toxicitou a jsou nejvýznamnější a nejnebezpečnější skupinou bojových chemických látek. Vysoká toxicita je způsobena rychlým nástupem účinku a průnikem do organismu všemi branami vstupu. Dělí se na dvě velké skupiny, které jsou obecně označovány jako G-látky a V-látky. G-látky jsou bezbarvé, pohyblivé kapaliny podobné vodě, charakteristické vysokou těkavostí, takže nejpravděpodobnější branou vstupu jsou dýchací cesty. Mezi G-látky patří: tabun, soman, sarin a cyklosin. V-látky jsou toxičtější než G-látky. Největšího významu dosáhla VX látka, která je v chemicky čistém stavu bezbarvá, bez výraznějšího zápachu s velmi nízkou těkavostí, takže vydrží ve vodě a v terénu velmi dlouhou dobu (týdny až měsíce). Podobné vlastnosti má v Rusku zavedený analog látky VX označovaný jako VR.<sup>7</sup>

Mechanismus účinku OF je demonstrován na Obr. 1 , kde estery kyseliny fosforečné jsou inhibitory ChE: znemožňují štěpení ACh a organismus sám sebe intoxikuje.

ACh je štěpen AChE v okamžiku, kdy reaguje s dvěma aktivními centry esterázy. Účinek OF spočívá v kovalentní vazbě fosforu na hydroxylové skupině molekuly serinu v esteratickém centru AChE. Tato fosforylace centra odpovídá acetylaci, což je přirozená reakce při enzymatické hydrolýze ACh. Defosforylace na rozdíl od deacetylace probíhá tak pomalu, že simuluje ireverzibilní poškození enzymu. Aktivní centrum totiž už není k dispozici pro hydrolýzu ACh. ACh není „schopen“ vytěsnit zbytek kyseliny fosforečné od enzymu. OF jsou tedy ve vztahu k ACh nekompetitivními inhibitory .

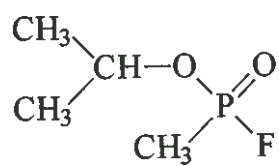


Zdroj: Lullmann, H., Mohr, K., Wehling, M., 2002. Farmakologie a toxikologie, Grada, <sup>1</sup>

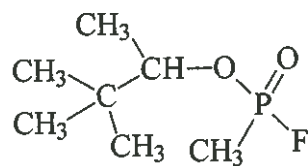


Vzorce vybraných NPL:

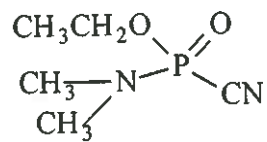
Sarin



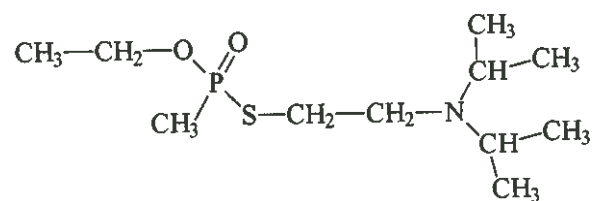
Soman



Tabun



VX látka



Vztahy mezi strukturou a účinkem ve skupině OF lze shrnout takto:

- estery fosfonové kyseliny bývají toxicitější než analogické estery fosforečné kyseliny
- sloučeniny s jednou vazbou P-N bývají toxicitější než sloučeniny s dvěma vazbami tohoto typu
- toxicita klesá v řadě F, I, CN
- oxosloučeniny jsou toxicitější než jejich thioanaloga

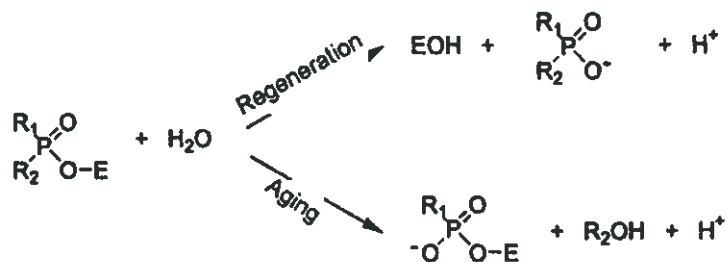
Interakci organofosforového inhibitoru s AChE lze vyjádřit zjednodušeným schématem:



Ve schématu představuje E enzym AChE, PX je OF a EPX je přechodný komplex, ze kterého vzniká fosforylovaný enzym a odstupující skupina. Síly vytvářející EPX komplex nemají charakter kovalentních vazeb. Inhibitor je na enzym nejprve poután nekovalentními vazbami a je orientován tak, aby mohlo v další fázi dojít k vytvoření chemické vazby mezi atomem kyslíku enzymu a atomem fosforu OF. Fosforylovaný enzym EP není ve všech případech zcela stálý. Jednak může být, i když jen velmi zvolna, defosforylován účinkem vody za obnovení enzymatické aktivity, což nazýváme spontánní hydrolýzou, a jednak může podléhat tzv. dealkylaci, kdy jedna z alkoxylových skupin je účinkem vody odštěpena ve formě alkoholu.<sup>3</sup> Spontánní hydrolýza za vytvoření volného enzymu probíhá kinetikou 1. řádu s ohledem na [EP], protože koncentrace vody je relativně velmi vysoká a závislá na enzymu, teplotě, pH, stupni ionizace a zejména na druhu fosforylované skupiny. Dealkylace, známá pod názvem stárnutí enzymu (aging), kdy permanentně inhibovaná AChE spontánně neregeneruje, ani nepodléhá reaktivaci, probíhá také kinetikou 1. řádu. Rychlost stárnutí je závislá na AChE a na fosforylované skupině. Poločas stárnutí např. u diethylfosforylované AChE je 41 hodin, ve srovnání s diisopropylfosforylovanou AChE, která má poločas stárnutí 4,6 hodiny. Některé skupiny stárnou s alarmující rychlostí, např. poločas stárnutí u NPL soman v hovězí erytrocytární AChE, je pouze 6 min při 25°C a pH 7,4. Výsledek stárnutí je tedy závislý především na substituci fosforu alkyly.<sup>5</sup> Jako bojové látky se vyvíjí sloučeniny, kde proces stárnutí probíhá velmi rychle, takže záhy po vytvoření komplexu EPX již není možné enzym reaktivovat.

Nejrychleji probíhá dealkylace u AChE inhibované somanem, kdy nejprve vzniká o-pinakolyl-methylfosfonylovaná AChE a po dealkylaci za odštěpení pinakolylalkoholu methylfosfonylovaný enzym. Poločas této reakce činí řádově několik minut. Poločas dealkylace u sarinem inhibované AChE se udává řádově kolem 10 hodin.<sup>2</sup>

Obr.2 popisuje proces stárnutí enzymu



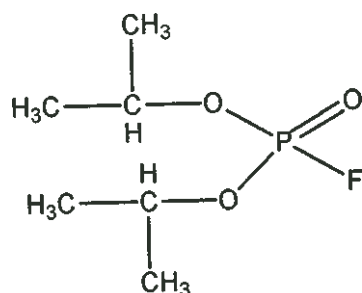
zdroj: Patočka J., Kuča K., Jun D., 2004, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase-important enzymes of human body<sup>5</sup>

Aktivita ChE se obnoví až po syntéze molekul enzymu de novo. Trvá přibližně 50 dní, než AChE v mozku plně regeneruje. Poněvadž bezjaderné erytrocyty nejsou schopny syntetizovat bílkoviny, zotaví se jejich enzymová aktivita až po nahrazení otrávených buněk novými erytrocyty- tj. až asi za 100 dní. Lidská erytrocytární AChE může být využívána k testování účinnosti nových oximů. Nebezpečné příznaky otravy vymizí již v okamžiku, kdy se obnoví přibližně 10% cholinesterázové aktivity v mozku, což je množství, které stačí pro záchranu života. Některé OF, používané jako insekticidy, disociují spontánně od esterického centra esterázy, takže ve srovnání s ireverzibilními inhibitory trvá otrava těmito látkami kratší dobu.

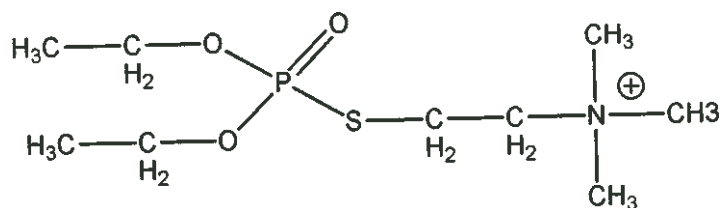
Příklady těchto látek:

- Fluostigmin (DFP) představitel s jednoduchým základním mechanismem účinku: po odštěpení fluoru se fosfor naváže na hydroxylovou skupinu molekuly serinu v aktivním centru ChE. To způsobí inhibici enzymu. Postižena je také BuChE a další enzymy, které v aktivním centru obsahují molekulu serinu. Příznaky otrav určuje výhradně blokáda AChE.
- Nitrostigmin (E 605, parathion) až v organismu in vivo je síra nahrazena kyslíkem (paraoxon) a tím teprve vznikne látka s vysokou afinitou k esteráze.
- Ekothiopat, zvláštnost - postranní řetězec obsahující dusík (cholin), který je přitahován k aniontovému centru ChE.

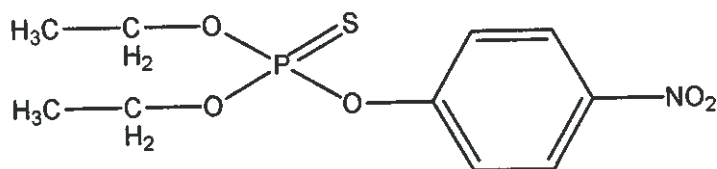
#### Fluostigmin



#### Ekothiopat



## Nitrostigmin (parathion)



### Projevy intoxikace OF

Podstatou klinického obrazu otravy OF je nahromadění ACh v místech jeho fyziologického účinku. Podle toho, na kterých receptorech nastává nahromadění ACh a tedy jejich nadměrná stimulace, rozdělují se klinické příznaky otravy na muskarinové, nikotinové a centrální. Nástup příznaků intoxikace a jejich intenzita závisí na dávce a cestě vstupu OF do organismu. Při inhalaci se příznaky objevují již po několika minutách, při p.o. požití za 15 min až 1 hodinu, po kožní absorpci za 2-3 hodiny. Smrt v případě těžkých akutních otrav nastává následkem bronchospasmu nebo paralýzy příčně pruhovaného svalstva (především bránice). Vědomí bývá obvykle dlouho zachované.

- Muskarinové účinky

GIT	salivace, ↑sekrece, ↑tonus a motilita střev (abdominální křeče, zvracení, diarea)
močový měchýř	inkontinence moči
oko	slzení, mióza
bronchy	↑bronchiální sekrece, bronchokonstrikce, pulmonální edém
kůže	pocení
kardiovaskulární systém	bradykardie, hypotenze

- Nikotinové účinky

Tyto příznaky jsou charakterizovány svalovými fibrilacemi, fascikulacemi a to nejprve jednotlivých svalů, a pak i celých svalových skupin, přecházejícími postupně v tonicko-klonické křeče a v terminálním stadiu v ochablost s přechodem v parézu až paralýzu svalstva. Následkem toho dochází ke značnému omezení ventilace (křeče a později paralýza dýchacích svalů), která je prohlubována bronchokonstrikcí a zvýšenou bronchiální sekrecí.

- Centrální příznaky

Jsou charakterizovány bolestmi hlavy, úzkostí, emoční labilitou, neklidem, nesnadnou koncentrací, závratěmi, ataxií a bezvědomím. Tyto příznaky jsou typické pro akutní stádium otravy a vyvíjejí se v závislosti na dávce a délce expozice během několika málo minut až hodin. Jejich intenzita je také závislá na době kontaktu, na dávce a na druhu použitého OF.<sup>2</sup>

Nutný postup při terapii otrav OF :

- blokáda periferních a centrálních ACh receptorů ATR. Potřebné dávky jsou velmi vysoké (30-100 mg v jednotlivé dávce, v extrémních případech až 400 mg v infuzi za 1 den), protože ATR prostupuje HEB poměrně pomalu.
- reaktivace AChE oximy
- přerušení centrálně vyvolaných křečí antiepileptiky (např. diazepamem)
- řízené dýchání
- potlačení acidózy podáváním pufovacího roztoku Tris a NaHCO<sub>3</sub>
- symptomatické léčení silné bronchiální sekrece

### Pozdní následky otrav OF

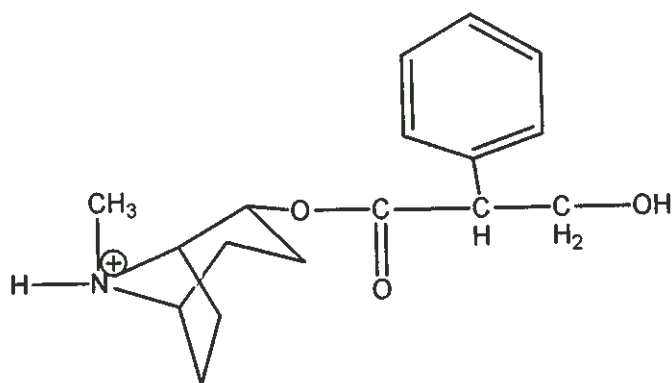
Po opakované expozici určitým OF obsahujícím fluor a při jednorázovém, nebo při opakovaném přívodu inhibitorů nespecifické ChE (triarylfosfátů- např. triortokresylfosfátu), se vyvíjí organofosfáty vyvolaná prolongovaná neuropatie (organophosphate-induced delayed polyneuropathy, OPID). V závislosti na závažnosti otrav se mohou vyvinout sensorické poruchy (mravenčení, bolesti), které se zpočátku objevují distálně v končetinách, později stoupají a zesilují. Současně se vyvíjí motorické poruchy (až ochrnutí). Tyto poruchy spočívají v edémech a fragmentaci axonů a konečně v demyelinizaci periferních a centrálních axonů. Klinický obraz lze označit jako polyneuropatie.

Specifická léčba není známa. Ústup příznaků trvá měsíce i roky. Mohou zůstat trvalé následky (spasticita). Chronická expozice OF může zaznamenat poškození funkce svalů, vyvolané četnými degenerativními změnami jednotlivých svalových vláken.

Jako funkční antidotum při otravách inhibitory ChE typu organofosfátů se užívá ATR. Je to alkaloid získávaný z četných lilkových rostlin, zejména z *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger* a *Datura stramonium*. Specifickými antidoty jsou reaktivátory ChE: jako obidoxim a další doplňující symptomatická léčba, zejména pak podávání antikonvulziv.<sup>8</sup>

Pro vyhodnocování nových oximů- jako antidot bojových NPL- se z etického důvodu užívají jen experimenty na zvířatech. Jakékoliv výsledky z experimentů na zvířatech a jejich klinická interpretace k lidem jsou ovšem komplikovány druhovou odlišností.<sup>9</sup>

Atropin



#### 4.3.2 NEREAKTIVNÍ INHIBITORY

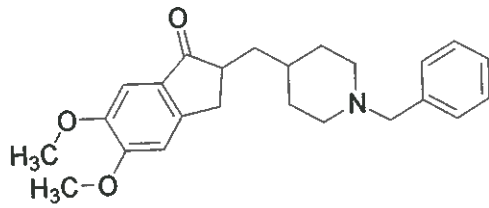
Jedná se o látky, které inhibují AChE na základě nevazebných interakcí, které nevedou k vytvoření kovalentní vazby mezi inhibitorem a serinovým hydroxylem v aktivním esteratickém centru enzymu. Inhibici mohou způsobit interakcí s  $\alpha$ -anionickým místem nebo s allosterickými místy na  $\beta$  řetězci.



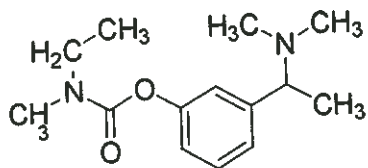
#### 4.3.2.1 NEKVARTÉRNÍ INHIBITORY

Nejdůležitější terapeutický přínos inhibitorů ChE představuje jejich využití při léčbě Alzheimerovy choroby (Alzheimer's disease, AD). Je to neurodegenerativní onemocnění charakterizované ztrátou paměti, které postihuje starou populaci. Samotná etiologie je neznámá. Přibližně 90 % případů je zpočátku klasifikováno jako ojedinělé pozdní výpadky paměti, které se objevují u každého druhého člověka staršího 85 let. Histopatologický obraz zahrnuje tři hlavní patologické znaky:  $\beta$ -amyloidní plaky, neurofibrilární zámotky a úbytek synapsí. Primární deficit v cholinergním systému je považován za jednu z hlavních příčin poškození paměti u AD.<sup>10</sup> V zájmu léčení AD byly provedeny jak krátkodobější, tak dlouhodobější studie, kde byla testována kognitiva donepezil, rivastigmin a galantamin. Všechny tři inhibitory AChE prokázaly nejen zlepšení kognitivních funkcí, ale také obecné zlepšení životních funkcí a celkového chování pacienta. Přibližně u 50 % pacientů s AD se po odpovídající léčbě stabilizují kognitivní funkce ve srovnání s placebem na dobu 12 měsíců. Novější studie ukazují, že u určitého procenta (přibližně u 20 %) pacientů, může být kognitivně stabilizující efekt prodloužen až k 24 měsícům. V in vitro a in vivo studiích lze např. demonstrovat spojení mezi cholinergní aktivací a APP (amyloid prekursor protein) metabolismem. Poškození centrálních cholinergních neuronů způsobuje rychlý nárůst APP v mozkové kůře a v CSF. Redukce v cholinergní neurotransmisi- typická právě pro AD- tak vede k nadměrné produkci amyloidního proteinu a přispívá k následné neuropatologické a kognitivní dysfunkci. Na druhé straně klinické poznatky připouštějí i jiný mechanismus účinku než pouze cholinergní. Mozek savců obsahuje dvě odlišné formy ChE: AChE a BuChE. V lidském těle se BuChE nalézá v neuronech a gliových buňkách, stejně jako v krevních destičkách, u AD pacientů pak ve zvýšené míře v depozitech amyloidu. Zatímco se AChE aktivita u AD pacientů snižuje, BuChE aktivita naopak vykazuje vzestup. Ke studiu funkce BuChE byl intrakortikálně perfundován potkaní mozek selektivním inhibitorem BuChE. Bylo pozorováno, že extracelulární ACh se zvýšil přibližně patnáctinásobně z 5 nM na 75 nM koncentrace s malým cholinergním vedlejším efektem. Základní poznatek z těchto a dalších klinických dat je ten, že existuje vztah mezi inhibovanou BuChE a kognitivní funkcí u AD pacientů.<sup>11</sup>

Chemické struktury inhibitorů používaných v terapii AD:



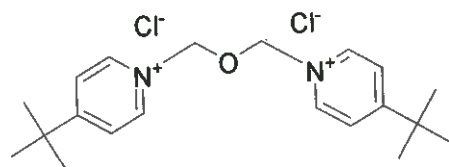
donepezil



rivastigmin

#### 4.3.2.2 KVARTÉRNÍ INHIBITORY

Jedná se o látky, které se jako falešné substráty mohou krátkodobě a plně reverzibilně navázat na aktivní centrum esteras, tím pak kompetitivně bránit navázání ACh na anionické místo a v konečném dopadu tak snížit esterasovou aktivitu. Působí především periferně (edrofonium se používá např. k diagnóze myastenia gravis).<sup>12</sup> Další využití je jako profylaktikum při otravě jinými závažnějšími inhibitory AChE a to zejména NPL a pesticidy. Nejznámější látkou je SAD-128. I když se jedná o kvartérní látku, existují klinické důkazy mnoho o jejím případném využití pro léčbu AD.<sup>13</sup>



SAD 128

#### 4.4 REAKTIVÁTORY CHOLINESTERÁZY

Reaktivátory cholinesterázy jsou nukleofilní činidla, která jsou schopna defosforylovat inhibovaný enzym a navrátit mu tak původní aktivitu. Reaktivací schopnost je vázána na existenci fosforylovaného enzymu v nedealkylované formě. Praktický význam mají jako antidota při otravách OF, neboť jsou schopny obnovit fyziologickou funkci fosforylovaného enzymu. Opakované podávání reaktivátorů AChE bývá zvláště u otrav NPL s rychlou dealkylací diskutabilní, na rozdíl od anticholinergik, jejichž opakované podávání až do příznaků atropinizace je velmi důležité.<sup>3</sup>

Myšlenka, že by určité sloučeniny mohly značně urychlit spontánní regeneraci fosforylované AChE, je spojena s Wilsonovým experimentem s hydroxylaminem a cholinem. Hydroxylamin totiž poukázal na nutnost nalézt sloučeniny se zlepšenými nukleofilními vlastnostmi, zatímco cholin podnítil myšlenku, že kvartérní dusík by mohl nukleofilní atak zesílit. Očekávaný terapeutický potenciál některých sloučenin tohoto typu tedy stimuloval hledání dalších látek, které vyvrcholilo objevem pralidoximu (2-PAM, 2-pyridiniumaldoxim-methyljodid). O tento objev se zasloužil Wilson, Ginsburg a kolektiv. V současné době jsou známy stovky sloučenin, které jsou nazývané reaktivátory fosforylované AChE.<sup>14</sup>

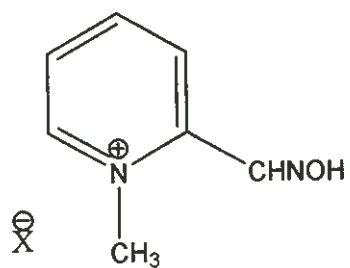
V současnosti užívané reaktivátory AChE patří z chemického hlediska mezi mono (pralidoxim) či biskvarterní (obidoxim, HI-6, methoxim) pyridinové sloučeniny s funkční aldoximovou skupinou. Tyto látky musí obsahovat ve své struktuře některé důležité znaky, bez nichž by jejich reaktivací schopnost byla nízká či nulová. Mezi nejdůležitější patří přítomnost a počet oximových skupin, přítomnost a počet kvartérních dusíků, délka a tvar spojovacího řetězce mezi jednotlivými pyridiniovými jádry.<sup>15</sup>

Reaktivátory se zpočátku vážou svým pozitivně nabitým dusíkem na anionické centrum esterázy. Tím se dostává aldoximový postranní řetězec do bezprostřední blízkosti fosforylovaného esterického centra. Následuje přesun fosfátu na molekulu reaktivátoru a uvolnění ChE.<sup>11</sup> Tento děj se nazývá reaktivace fosforylované AChE. Nárůst samotné AChE aktivity může být způsoben i syntézou enzymu de novo, tento děj je však velmi pomalý.

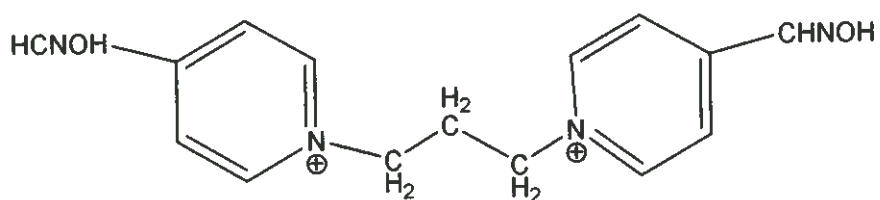
Neoficiálním standardem se stal 2-PAM, se kterým se porovnává naměřená účinnost jiných reaktivátorů. Nejvíce známé reaktivátory jsou aldoximy – derivátu pyridinu. Je mnoho bis-kvartérních dialdoximů (trimedoxim, obidoxim) a bis-kvartérní monoaldoximy (HI-6, HL6-7)

Konkrétní vzorce reaktivátorů:

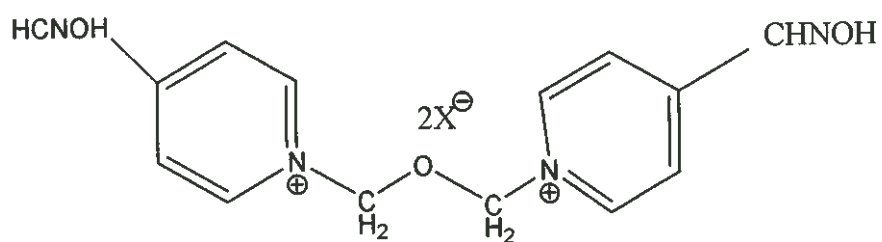
Pralidoxim



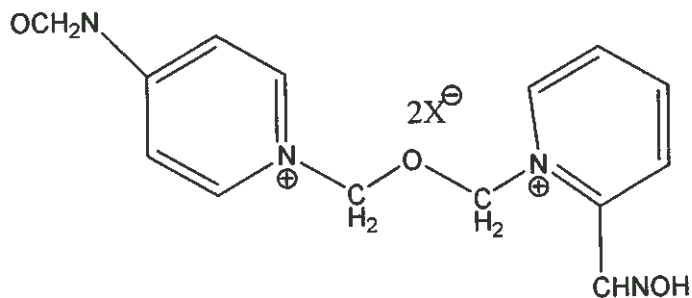
Trimedoxim



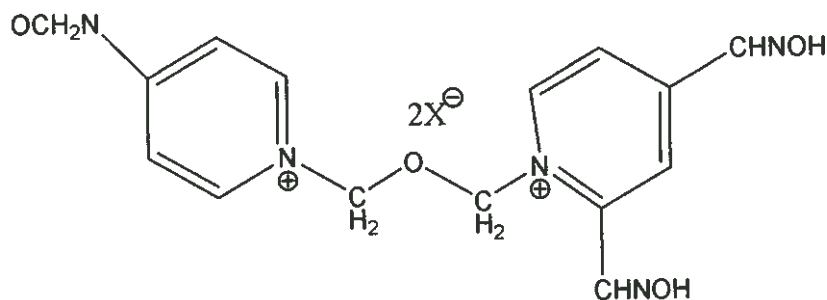
Obidoxim



HI-6



HL6-7



Obecně však platí, že reaktivační účinnost dialdoximů, jako je obidoxim, pralidoxim, je poměrně omezená, přičemž základní příčinou je rychlost stárnutí inhibovaného enzymu. Novější oxim HI-6 je zatím považován na základě experimentálních výsledků a klinických zkoušek za optimální lék volby v případě zasažení NPL.<sup>3</sup>

Kinetika reaktivace probíhá podle schématu :



Fosforylovaný enzym (EP) tvoří s reaktivátorem (R) přechodný komplex (EPR). Produkt této reakce je regenerovaný enzym (E) a fosforylovaný oxim (PR).

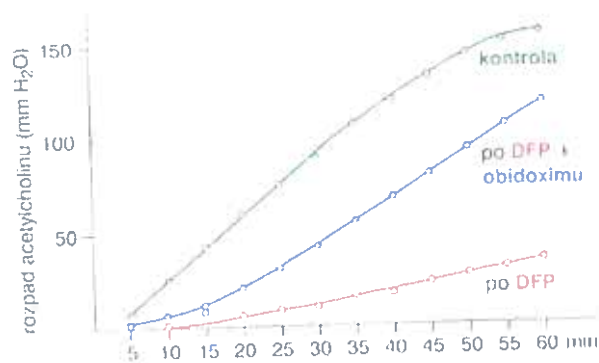
Samotné oximy mohou být silnými inhibitory ChE, ale jejich vazba je nestabilní a rozkládá se během několika minut až hodin.<sup>16</sup>

Obr. 3 znázorňuje reaktivaci AChE obidoximem po otravě DFP (fluostigmin). Pokus měl uspořádání podle Warburga – tzn. izovolumetrické měření rozpadu ACh

Kontrola : štěpení ACh „pravou“ AChE („morčecí erythrocyty“)

Křivka DFP : inhibice aktivity enzymu přísadou diisopropylfluorofosfátu 30 minut před začátkem pokusu

Křivka DFP + obidoxim : reaktivace esterázy otrávené DFP přísadou obidoximu v čase 5 minut.



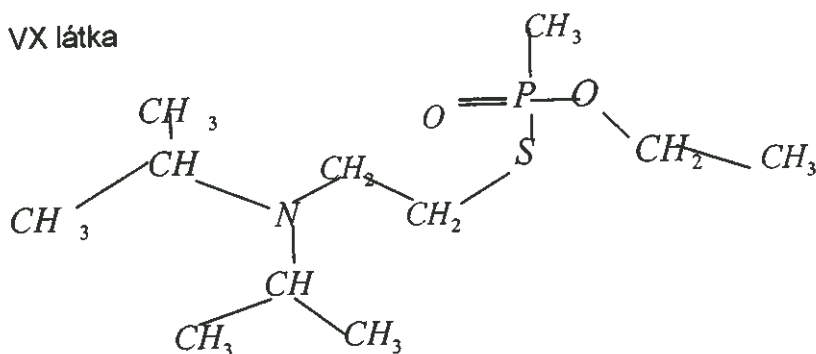
Zdroj: Lullmann, H., Mohr, K., Wehling, M., 2002. Farmakologie a toxikologie, Grada, <sup>13</sup>

## 4.5 TESTOVANÉ OXIMY

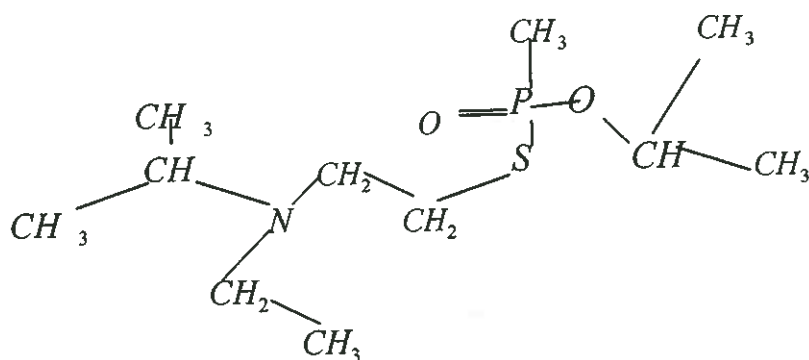
### 4.5.1 RVX

RVX (O-ethyl-S-(2-diisopropylaminoethyl)-methylthiofosfonát) je strukturálním analogem VX látky. Odlišuje se od VX látky dvěma alkylovými skupinami. Navíc je v životním prostředí stálejší než VX látka.

VX látka



Ruská VX



V současné době byla testována reaktivační schopnost nejužívanějších oximů (tzn. pralidoxim, obidoxim, HI-6) reaktivovat AChE inhibovanou RVX a eliminovat příznaky intoxikace touto látkou in vivo. Bylo zjištěno, že erytrocytární a mozkovou AChE inhibovanou RVX in vivo, reaktivuje nejúčinněji na periférii oxim HI-6, zatímco v centrálním kompartmentu byla účinnost ostatních reaktivátorů až na nepatrné rozdíly stejná. Oxim HI-6 je tedy považován za nejefektivnější k terapii akutních toxických účinků způsobených RVX a také v případě otravy způsobené sarinem, cyklosarinem či somanem. Pokusy byly provedeny na králících mozcích a krvi a dále na potkanech, kdy laboratorním zvířatům byl po otravě RVX i.m. podán ATR v dávce 21 mg/kg samotný či v kombinaci s jedním oximem.<sup>17</sup>

#### 4.5.2 SOMAN

Soman (o-pinakolylmetylfluorofosfonát) je fluoridovaný OF, známý též pod označením GD, patřící do G-skupiny chemických látek. Byl objeven v roce 1944 Richardem Kühnem v Německu a je to jeden z posledních válečných objevů (cyklosin GF byl objeven až po roce 1949). Označení GD dostal soman až po válce (GC bylo používáno v medicíně), kdy byly Sověty v německých archivech objeveny informace, týkající se tohoto OF. Je to těkavá, korozivní a bezbarvá kapalina mdlého zápachu, pokud je znečištěna, tak se zbarvuje od žluté do hnědé barvy a má silnější zápach.<sup>18</sup>

U myši intoxikovaných somanem v subletální dávce byla sledována po dobu minimálně 90 dní jejich hmotnost. První relativní ztráta hmotnosti (cca 20%) nastala již po 3 dnech intoxikace, histopatologicky pak bylo prokázáno především poškození hippokampu.<sup>19</sup>

#### 4.5.3 TABUN

Tabun (O-ethylidimethylamidokyanofosfát) patří mezi nejstarší NPL.<sup>20</sup> Je jeden ze skupiny syntetických látek, které byly objeveny v Německu v letech 1930 – 1940 (tabun v r. 1936). Původním záměrem použití těchto sloučenin, včetně tabunu, bylo hubení hmyzu – tedy pesticidní efekt. Tyto pesticidy byly ve svých účincích na nervový systém podobné somanu. Tabun patří do skupiny G- látek a nese označení GA. Je to čirá látka, bez chuti a zápachu. Ochoťně se mísí s vodou, v níž relativně rychle ztrácí svou sílu ve srovnání s parami nesenými vzduchem, které můžou mít účinek i několik dní. Léčba inhalační otravy spočívá ve třech injekcích antidota, např. ATR.<sup>21</sup> Atropin působí jako antagonist acetylcholinu na muskarinových cholinergních receptorech a reaktivátory AChE neboli oximy obnovují svým nukleofilním účinkem aktivitu inhibované AChE.<sup>20</sup> Přesto antidotní terapie akutních otrav touto noxou nebyla dosud uspokojivě vyřešena, proto akutní intoxikace tabunem představuje jednu z nejobtížněji léčitelných otrav. Jednou z jejich hlavních příčin je zřejmě velmi nesnadná reaktivace tabunem inhibované AChE z důvodu přítomnosti volného elektronového páru na amidickém dusíku, který zaplňuje elektronovou vakanci ve vazbě fosfor-enzym a tím stěžuje působení nukleofilních činidel včetně oximů.<sup>11</sup> Relativně nejméně vhodným oximem zaručující přežití letálních otrav tabunem je podobně jako v případě otravy somanem- obidoxim



#### 4.6 METODY STANOVENÍ AKTIVITY CHOLINESTERÁZ

Při stanovení aktivit ChE je možno využít mnoho principů. Obecně je nutno vycházet z toho, že do reakční směsi je dán enzym z různých zdrojů a vlastní reakce je zahájena přidáním substrátu. Po určité době, popř. kontinuálně, je sledován buď úbytek nerozloženého substrátu nebo přírůstek reakčních produktů, obojí buď přímo nebo nepřímo.

Byly popsány metody pro měření kinetiky enzymové hydrolýzy ACh a acetylthiocholinu v AChE in vivo, jako je metoda s využitím hydroxylaminu a HPLC metoda. Metoda používající hydroxylamin stanovuje závislost koncentrace substrátu vs. čas a HPLC metoda je schopná měřit současně závislost množství substrátu na času a zároveň oba primární produkty cholin nebo acetylthiocholin a kyseliny octovou.<sup>22</sup>

Pro testování enzymatické hydrolýzy ACh probíhající in vitro je užíván acetylthiocholin, protože mechanismus hydrolýzy acetylthiocholinu kvantitativně odpovídá mechanismu hydrolýzy ACh. Průběh reakce může být tedy kvantitativně měřen dvěma nezávislými metodami: spektrofotometricky – stanovení thiocholinu metodou podle Ellmana, a nebo elektrochemicky – stanovení kyseliny octové.

Všechny testované hydrolýzy odpovídají matematicky Michaelis-Mentenové rovnici s druhým ireverzibilním urychlením k úplnému vypořebenání substrátu. Rovnice popisuje chování mnoha enzymů při změně koncentrace substrátu. Byly provedeny korelace, tzn. diferenciální a integrální, kinetické rovnice popsané Michaelis – Mentenovým modelem. Optimální hodnoty Michaelisovy konstanty ( $K_M$ ), maximální rychlost ( $V_m$ ), kinetické konstanty jednotlivých reakčních kroků a absolutní koncentrace užívaných enzymů jsou vypočítány pro každý experiment.<sup>23</sup>

Aktivita ChE je vyjadřována v různých jednotkách. Je však vhodné, aby byla vyjadřována v  $\mu\text{mol}$  rozštěpeného substrátu na časovou jednotku a 1 g materiálu (tkáň, ml krve atd). V současné době je aktivita vyjadřována v kataltech na litr. Jedná se o pojem „koncentrace katalytické aktivity“, s jednotkou katal na litr ( $\text{kat/l}$ ), což odpovídá přeměně jednoho molu substrátu za sekundu na litr např. séra, plazmy.<sup>2</sup>

Pro přesnější diagnostiku je nejlepší měřit aktivitu obou enzymů (AChE i BuChE), což předpokládá u krve její centrifugaci a tím i časové ztráty. Je-li měřena aktivita ChE v celé krvi, výsledky nejsou zcela přesné, protože jde o společný účinek obou enzymů, jak AChE, tak BuChE (přibližně 80% : 20%). Přesto je však tento způsob výhodný, protože umožňuje zpracování materiálu bez předchozí centrifugace a protože krevní AChE je nejdůležitějším diagnostickým ukazatelem otravy.

Nejrozšířenější jsou modifikace těchto metod:

- potenciometrické – měřena změna potenciálu způsobená  $H^+$  ionty kyseliny, uvolňované při hydrolyze substrátu ve slabě pufovaném prostředí. Acetát snižuje pH. Tento pokles se eliminuje hydroxidem, dokud nedojde k ustálené hodnotě pH. Výsledkem měření je spotřeba hydroxidu.
- titrační – využití neutralizace při hydrolyze vznikající kyseliny louhem při zachování konstantního pH
- manometrické – měření objemu  $CO_2$  uvolněného z bikarbonátu kyselinou vznikající při hydrolyze substrátu
- radiometrické – využití značkových substrátů
- polarografické
- fluorimetrické
- kolorimetrické – určují změnu zbarvení indikátoru při změně pH nebo rozštěpený substrát, popř. štěpené produkty reakce v čase

Nejužívanější je metoda potenciometrická a kolorimetrická. U kolorimetrické metody je však nevýhodou zpracování biologického materiálu, který může způsobit, že homogenát není čirý a tím při měření způsobí zkreslení výsledků (např. měření aktivity u bránic).

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 OF tak může být kvantifikován metodou plynové chromatografie. Výhodou této metody je možnost retrospektivní detekce expozice NPL, kterou není možné provádět měřením aktivity ChE z důvodů de novo syntézy enzymů. Tato metoda byla úspěšně uplatněna u obětí teroristického útoku sarinem v Matsumotu a tokijském metru, není však jasné, zda by mohla být použita i při intoxikaci jinými 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.<sup>24</sup>

V nedávné době byla publikována další metoda využívající biologický materiál BuChE, která je izolována z plazmy afinitní chromatografií, štěpena pepsinem a poté analyzována kapalinovou chromatografií. Stanovení je pak založeno na kvantifikaci fosfonylovaných (popř. fosforylovaných) nonapeptidů hmotnostní spektrofotometrií.<sup>25</sup>

Z hlediska vzájemného srovnání testovaných reaktivátorů se při experimentech užívají dávky ekvimolární či dávky ekvitoxické. Ekvimolární dávky se používají pokud je látka málo toxická, není schopná se rozpustit a při experimentu tedy není možné stanovit její toxicitu. Problémem však je vlastní toxicita reaktivátoru. Řádově se jedná o dávky 50-100  $\mu\text{mol/l}$ . Konkrétně u oximů 1. generace jsou dávky kolem 200 mg/kg. HI-6 je již méně toxická a její dávka je 800 mg/kg. Podávání ekvitoxických dávek je v porovnání s dávkami ekvimolárními lepší. Užívá se 2 %  $\text{LD}_{50}$ , což je množství reaktivátoru, které by se podalo člověku z hlediska toxicity.

#### 4.7 CÍL PRÁCE

Cílem práce je:

- změření aktivity acetylcholinesterázy pomocí Ellmanovy metody po otravě somanem, tabunem a RVX,
- stanovení reaktivační schopnosti vybraných oximů (pralidoxim, obidoxim, trimedoxim a HI-6) a schopnosti eliminace toxického efektu uvedených OF,
- vzájemné srovnání síly zvolených oximů při reaktivaci inhibované acetylcholinesterázy,
- procentuální vyjádření reaktivace inhibované AChE v potkaní krvi, mozku a bránici,
- určení délky účinku testovaných antidot,
- případný antidotní efekt oximů je srovnán s ATR, případně TMB-4 jako standardem.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 MATERIÁL

#### 5.1.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

- potkaní mozky
- potkaní bránice
- potkaní krev

zdroj: potkani Wistar o váze 200 – 350 g pocházeli z Konárovic.

#### 5.1.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

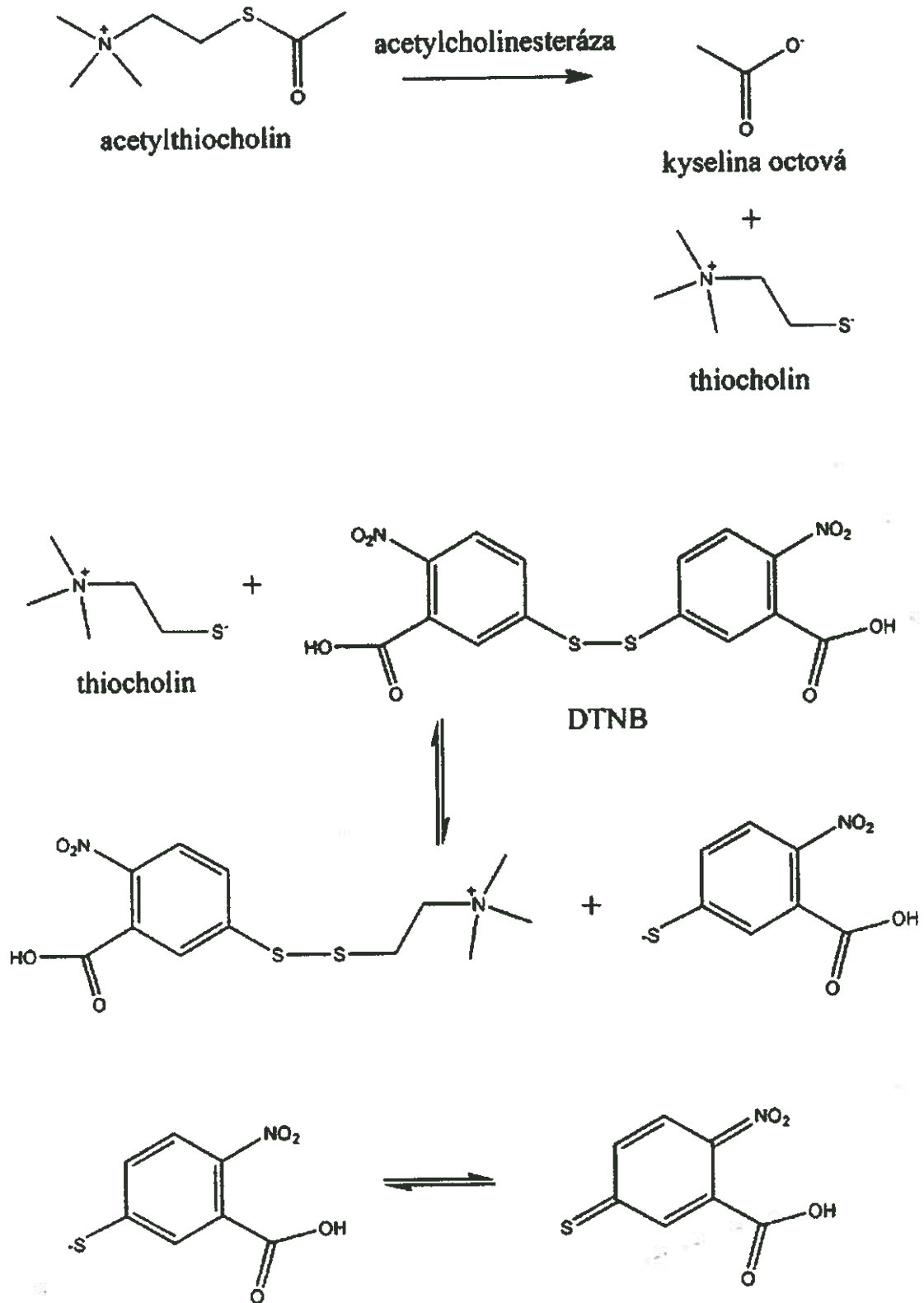
- |                          |                                   |
|--------------------------|-----------------------------------|
| ▪ Acetylthiocholin-jodid | Fluka, Sigma-Aldrich, Praha, ČR   |
| ▪ DTNB                   | Sigma-Aldrich, Praha, ČR          |
| ▪ RVX                    | Vojenský technický institut, Brno |
| ▪ Soman                  | KTOX, FVZ UO, HK, ČR              |
| ▪ Tabun                  | KTOX, FVZ UO, HK, ČR              |
| ▪ Atropin                | KTOX, FVZ UO, HK, ČR              |
| ▪ HI-6                   | KTOX, FVZ UO, HK, ČR              |
| ▪ Pralidoxim             | KTOX, FVZ UO, HK, ČR              |
| ▪ Obidoxim               | KTOX, FVZ UO, HK, ČR              |
| ▪ Lidská krev            | KTOX, FVZ UO, HK, ČR              |
| ▪ Destilovaná voda       | KTOX, FVZ UO, HK, ČR              |
| ▪ Cystein                | KTOX, FVZ UO, HK, ČR              |

## 5.2 METODIKA

### 5.2.1 ELLMANOVA METODA

Pro konkrétní experiment byla použita Ellmanova metoda. Je to jedna z nejcitlivějších a nejpoužívanějších metod pro stanovení aktivit AChE a BuChE využívající štěpení thiocholinových esterů s následnou detekcí SH- skupin. Jedná se o modifikaci kolorimetrické metody za použití 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB, Ellmanovo činidlo). ChE štěpí estery thiocholinu na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB a jeho zbytek 5-merkapt-2-nitrobenzoová kyselina, který je fotometrován. Výhodou této metody je specifika reakce, jednoduchost provedení a vysoká citlivost. Optimální podmínky při stanovení jsou pH 7,6, teplota 25 °C a iontová síla, která by měla odpovídat iontové síle fyziologického roztoku. Aktivita ChE se zvyšuje s rostoucí koncentrací substrátu a při určité hodnotě koncentrace, „maximum koncentrace“, nastává inhibice substrátu.

Obr. 4 znázorňuje štěpení acetylthiocholinu AChE na thiocholin a příslušnou kyselinu. A následnou reakci thiocholinu s Ellmanovým činidlem, kdy se stanovuje SH- skupina thiocholinu a 5-merkapto-2-nitrobenzoová kyselina je fotometrována.



Měření probíhalo při vlnové délce 412 nm. Pro kalibraci bylo místo hemolyzátu do kyvety pipetován roztok různých koncentrací cysteinu. Fotometrováno bylo proti slepému vzorku, který byl zpracován stejně, jen místo cysteinu byla přidána destilovaná voda. Přítomnost inhibitoru se projevila žlutým zbarvením. Čím byla koncentrace inhibitoru větší, tím menší byla intenzita žlutého zbarvení.

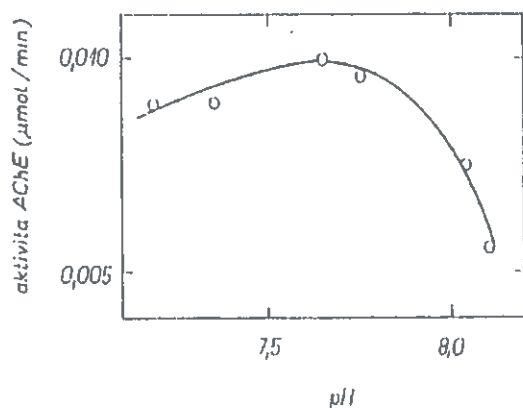
Bylo zjištěno, že aktivita ChE se zvyšuje s rostoucí koncentrací substrátu a při určité hodnotě koncentrace, „maximum koncentrace“, nastává inhibice substrátu. Proto byla vybrána pro měření aktivity AChE výsledná koncentrace  $1 \times 10^{-3}$  M. Aktivita AChE se zvyšuje také s nárůstem množství krve v reakční směsi. Závislost je do 3  $\mu$ l lineární, pak je intenzita zbarvení reakční směsi příliš vysoká, a měření není možné.

Modifikace byla v poměrném množství i složení použitých látek. Byl použit 0,2 M TRIS – HCl pufr: 24,2 g 1,1,1,-tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Lachema Brno) byl rozpuštěn v 1000,0 ml destilované vody. 50,0 ml tohoto roztoku bylo smícháno s 38,4 ml 0,2 M HCl, a doplněno destilovanou vodou na 200,0 ml a pH bylo upraveno na 7,6. Činidlo na SH-skupiny – DTNB - 0,1 g DTNB bylo rozpuštěno v 50,0 ml 0,2 M TRIS pufru. Jako substrát byl použit 0,029 g acetylthiocholin-jodid, který byl rozpuštěn v 10,0 ml destilované vody.

Samotný vzorek pro měření byl připraven následovně: mikropipetou bylo odebráno 5  $\mu$ l a hemolyzovaly se přidáním 0,4 ml destilované vody. Vznikl tak hemolyzát, který byl připravený pro stanovení vlastní aktivity.

Optimální podmínky pro stanovení byly: pH 7,6, teplota 25 °C a iontová síla. Hodnota pH, kdy je dosaženo optimum pro enzymatické štěpení acetylthiocholinu je v rozmezí 7,6-7,8. Se zvyšujícím se pH však roste i neenzymatická hydrolyza acetylthiocholinu (viz.obrázek níže). Proto hodnota pH 7,6 je optimální hodnotou, kdy je zanedbatelná hydrolyza substrátu.<sup>26</sup>

Obr. 5: závislost aktivity AChE na pH. Z obrázku je patrné, že hodnoty pH na 7,6 nejsou vhodné pro stanovení



zdroj: Bajgar, J., Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi, Vojenské zdravotnické listy, roční XLI. č.2 <sup>21</sup>



## 5.2.2 HOMOGENIZACE

### Homogenizace krve

Byly použity zmrazené vzorky. Homogenizovaly se ručním homogenizátorem Ultra – Turrax přibližně 1 minutu. Z homogenátu krve bylo pipetou odebráno 0,10 ml do zkumavky, do které bylo přidáno ještě 1,90 ml destilované vody. Takto připravený hemolyzát byl promíchán a inkubován 4 minuty. Hemolyzát tedy obsahoval i malé množství BuChE (přibližně 20 %).

### Homogenizace bránice

Byly použity zmrazené či nativní bránice, které se zvažily. Jejich váha se pohybovala kolem 500 mg. K bránici byla přidána destilovaná voda a to v množství, jež odpovídalo desetinásobku její váhy. Následovala homogenizace ručním homogenizátorem Ultra – Turrax přibližně dvě minuty ve větší zkumavce. Homogenní vzorky byly buď připraveny do zkumavek na měření, či byly zmrazeny při teplotě -30 °C. Při pipetování do zkumavek musela být upravena špička pipety - odstřížení 5 mm, aby bylo možné suspenzi dávkovat pipetou.

### Homogenizace mozku

Homogenizace mozku probíhala již popsaným postupem jako homogenizace bránice.

### **5.3 PODMÍNKY EXPERIMENTU PRO RVX**

Pokusná zvířata byli potkaní samci druhu Wistar. Potkani z nichž se získaly mozky, vážili 290 – 360 g a potkani, ze kterých se prováděl experiment s bránicemi a krví, vážili 300 – 350 g. Byli chováni v klimatizované místnosti se světlem od 7. – 19.hod. se standardní stravou.

### **5.4 PODMÍNKY EXPERIMENTU PRO SOMAN**

Pokusná zvířata byli potkaní samci druhu Wistar, jejichž váha se pohybovala mezi 250 – 320 g. Byli udržováni v klimatizované místnosti se světlem od 7. – 19.hod. se standardní stravou.

### **5.5 PODMÍNKY EXPERIMENTU PRO TABUN**

Pokusná zvířata byli samci bílých myší kmene NMR1 chovu Konárovic o hmotnosti 20 – 26 g nebo samci bílých potkanů kmene Wistar téhož chovu o hmotnosti 180-210 g.<sup>27</sup>

## 5.6 IN VIVO EXPERIMENT

Před začátkem hodnocení reaktivace a terapeutické účinnosti oximů byli potkani rozděleni do jednotlivých skupin o minimálním počtu pěti jedinců. Jednotlivým skupinám byl i.m. aplikován buď fyziologický roztok, jako roztok kontrolní, či samotný ATR nebo ATR v kombinaci s jedním studovaným oximem v ekvivalentní dávce. ATR byl podán v dávce 21 mg/kg. Bylo zvoleno vyšší dávkování, protože potkani jsou vůči ATR méně citliví než lidé, proto se dávkuje ve větším množství. V určitém časovém odstupu proběhla intoxikace tabunem, somanem nebo RVX. Za 30 min po intoxikaci byli potkani dekapitováni a odebrána krev, mozky a bránice. Následovala homogenizace a určení AChE aktivity spektrofotometricky (Ellman). Měření probíhalo na spektrofotometru HP 845 X při vlnové délce 436 nm. Standardně je užívána vlnová délka 412 nm, která je však v blízkosti absorpčního maxima hemoglobinu, z tohoto důvodu byla zvolena vlnová délka 436 nm.

### Kalibrace přístroje

Pro kalibraci metody byl použit roztok cysteinu CYS - 43. Místo homogenátu byla užitá destilovaná voda.

Slepý vzorek : 100  $\mu$ l destilované vody + 1,75 ml TRIS + DTNB + 200  $\mu$ l destilované vody.

Vzorky byly připraveny z roztoku cysteinu tak, aby výsledná koncentrace cysteinu byla 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0  $\mu$ mol.

0,1ml cysteinu – odebráno 205  $\mu$ l a 205  $\mu$ l destilované vody

0,05 ml cysteinu - odebráno 205  $\mu$ l a 205  $\mu$ l destilované vody

0,025ml cysteinu - odebráno 205  $\mu$ l a 205  $\mu$ l destilované vody

## 5.6.1 RVX

### 5.6.1.1 EXPERIMENT I. – SLEDOVÁNÍ FARMAKOKINETIKY RVX

Cílem experimentu bylo sledování farmakokinetiky RVX v určitém čase po otravě na základě stupně inhibice obsažených ChE. Experiment může také poskytnout informace, v jakém čase má ještě smysl podávat antidota.

Potkani byli rozděleni do 7 skupin, z nichž poslední skupina představovala skupinu kontrolní. Každá skupina byla zastoupena devíti zvířaty a ve skupině kontrolní bylo zvířat pět (poslední skupina v Tab.I.). Všechny skupiny byly intoxikovány RVX v dávce, jejíž dávkování bylo upraveno podle jednotlivých hmotností potkanů.

Obecně 1 LD<sub>50</sub> představuje dávku 14 µg/kg. Základní roztok RVX měl složení 1 mg RVX/1ml propylenglykolu.

Odběry mozkové tkáně byly v časových intervalech: 3, 6, 10, 20, 40 a 60 min. a stanovené aktivity ChE byly porovnány s aktivitou ChE kontrolní skupiny. Všechny odebrané vzorky byly před vlastním stanovením 10x zředěny.

Naměřené hodnoty byly zaznamenány do Tab.I. podle časové posloupnosti odběrů, byla zaznamenána naměřená aktivita v µkat/kg a u každé skupiny byla také spočítána průměrná aktivita. Hodnoty označené šedou barvou byly kvůli chybě ze skupiny vyřazeny.

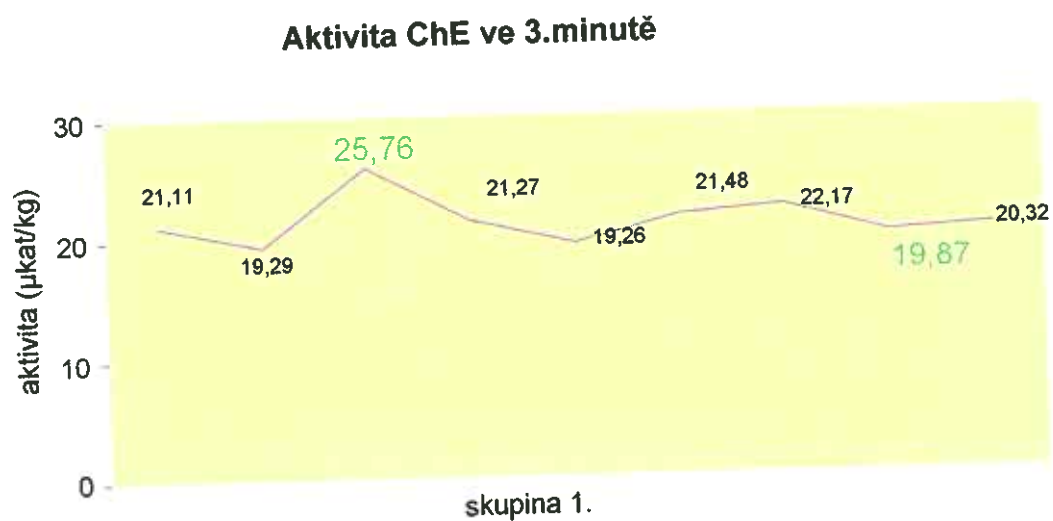
Tab.I.: naměřená aktivita ChE jednotlivých vzorků v dané časové posloupnosti, hodnoty označené červenou barvou jsou průměrné hodnoty aktivit celé skupiny

Skupina, Vzorek	AKTIVITA $\mu\text{kat/kg}$		AKTIVITA $\mu\text{kat/kg}$	Poznámka
1,1	21,11	Průměr Std. D.	21,17 1,99	Odběr za 3 min
1,2	19,29			
1,3	25,76			
1,4	21,27			
1,5	19,26			
1,6	21,48			
1,7	22,17			
1,8	19,87			
1,9	20,32			
2,1	26,10	Průměr Std. D.	20,05 4,52	Odběr za 6 min
2,2	14,15			
2,3	14,63			
2,4	23,48			
2,5	17,20			
2,6	23,80			
2,7	22,49			
2,8	18,52			
2,9	38,34			
3,1	8,93	Průměr Std. D.	10,07 1,94	Odběr za 10 min
3,2	10,04			
3,3	6,34			
3,4	8,16			
3,5	11,24			
3,6	11,67			
3,7	11,63			
3,8	12,24			
3,9	10,38			
4,1	4,02	Průměr Std. D.	7,03 2,77	Odběr za 20 min
4,2	5,17			
4,3	5,10			
4,4	8,11			
4,5	10,78			
4,6	8,92			
4,7	11,14			
4,8	5,79			
4,9	4,25			
5,1	14,77	Průměr Std. D.	19,28 3,86	Odběr za 40 min
5,2	16,56			
5,3	16,01			
5,4	35,89			
5,5	26,63			
5,6	21,98			
5,7	20,30			
5,8	20,27			
5,9	17,69			
6,1	9,71	Průměr Std. D.	9,774 1,551	Odběr za 60 min
6,2	9,53			
6,3	8,15			
6,4	8,86			
6,5	7,96			
6,6	10,48			
6,7	9,09			
6,8	11,51			
6,9	12,68			
7,1	21,02	Průměr Std. D.	26,84 7,471	Kontrola
7,2	20,85			
7,3	23,74			
7,4	38,35			
7,5	30,22			

Grafické zpracování výsledků :

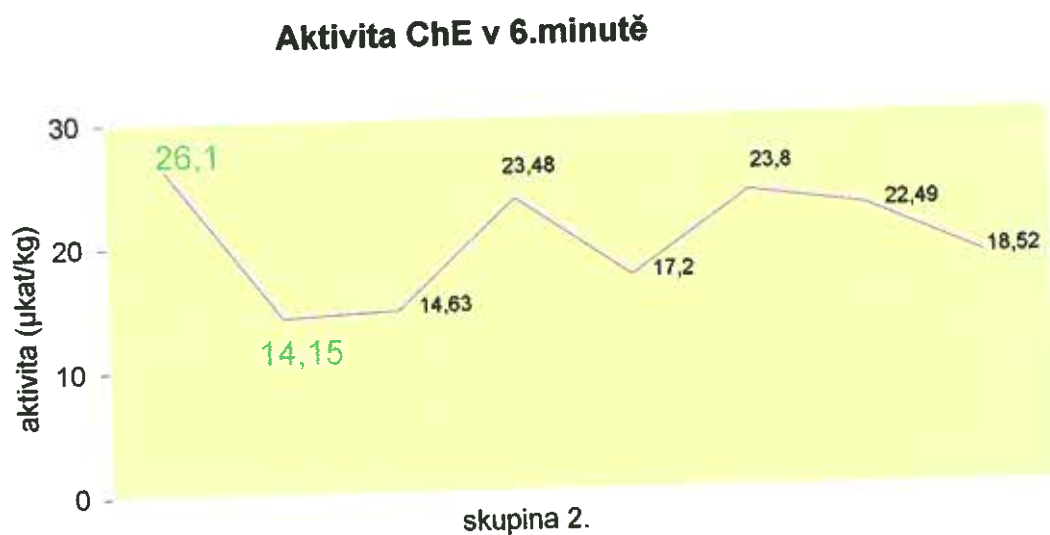
Graf č.1 - znázorňuje závislost aktivity ChE ve 3.minutě.

Hodnoty označené zelenou barvou jsou maximální a minimální hodnoty naměřené ve 3.minutě.



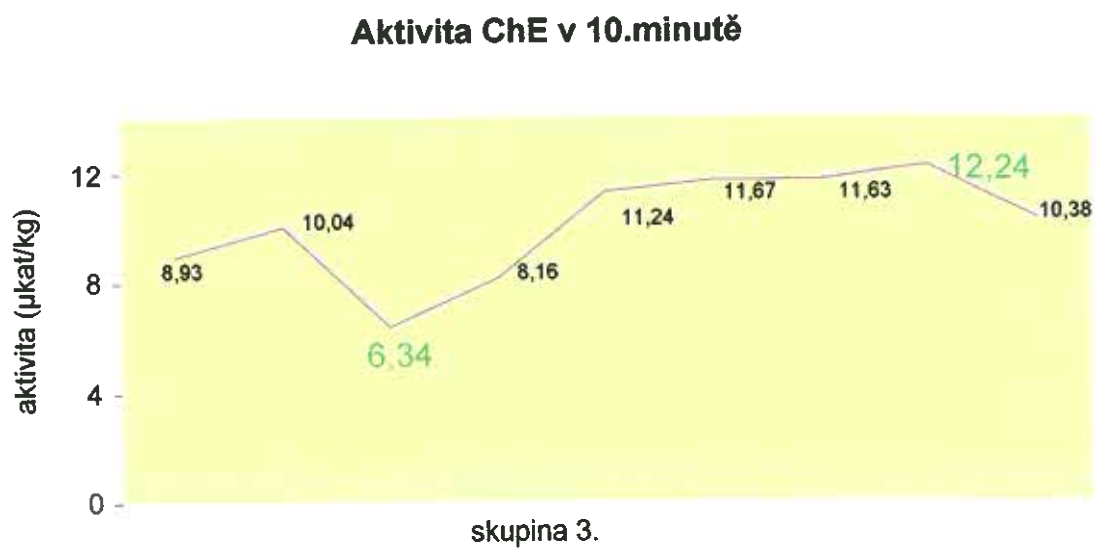
Graf č.2 - znázorňuje závislost aktivity ChE v 6.minutě.

Hodnoty označené zelenou barvou jsou maximální a minimální hodnoty naměřené v 6.minutě



Graf č.3 - znázorňuje aktivitu ChE v 10.minutě.

Hodnoty označené zelenou barvou jsou maximální a minimální hodnoty naměřené v 10 minutě



Graf č.4 - znázorňuje aktivitu ChE ve 20.minutě.

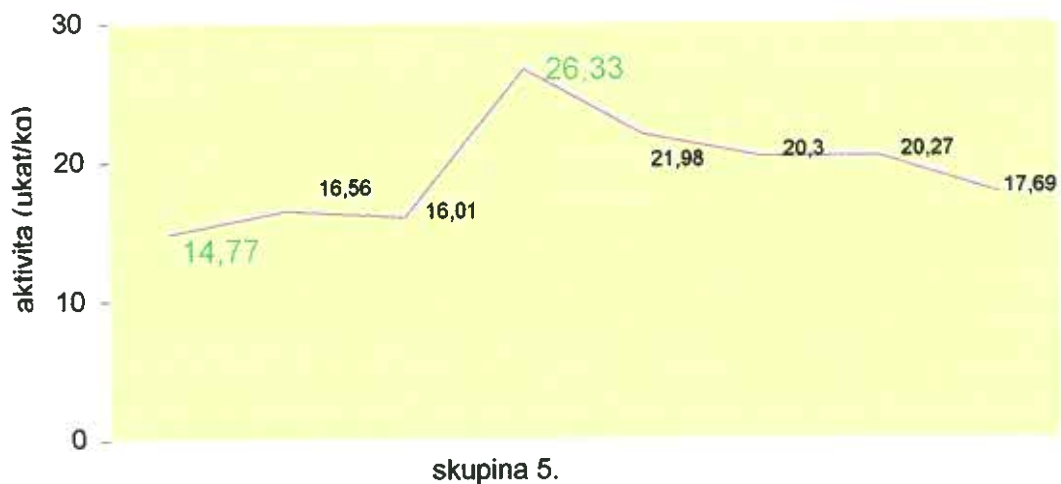
Hodnoty označené zelenou barvou jsou maximální a minimální hodnoty naměřené ve 20.minutě.



Graf č.5 - znázorňuje aktivitu ChE ve 40.minutě.

Hodnoty označené zelenou barvou jsou maximální a minimální hodnoty naměřené ve 40.minutě.

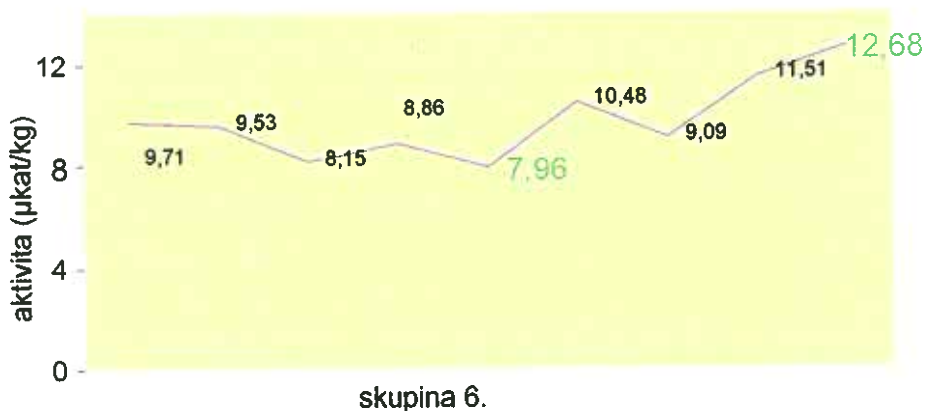
**Aktivita ChE ve 40.minutě**



Graf č.6 - znázorňuje aktivitu ChE v 60.minutě.

Hodnoty označené zelenou barvou jsou maximální a minimální hodnoty naměřené v 60.minutě.

**Aktivita ChE v 60.minutě**

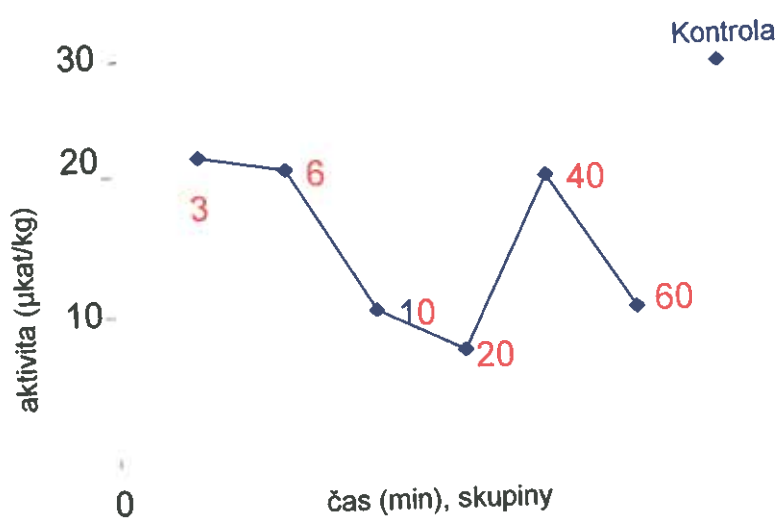




Tab. II.- souhrnná tabulka s průměrnými aktivitami ChE za jednotlivých časových intervalů

čas (min)	průměrná aktivita ( $\mu\text{kat/kg}$ )
3	21,200
6	20,050
10	10,070
20	7,031
40	19,280
60	9,774
Kontrola	26,840

Graf č.7 - vyjadřuje závislost průměrných hodnot aktivit ChE na časech



Při vyjádření aktivity ChE v procentech v Tab.III., považujeme hodnotu aktivity kontrolní skupiny za hodnotu 100%.

Číslo skupiny	Průměrná aktivita ( $\mu\text{kat/kg}$ )	%
1.	21,17	78,87
2.	20,05	74,70
3.	10,07	37,52
4.	7,03	26,20
5.	19,30	71,83
6.	9,77	36,42

### 5.6.1.2 EXPERIMENT II. – SROVNÁVÁNÍ ÚČINNOSTI TERAPEUTICKÝCH KOMBINACÍ PRO LÉČBU OTRAV RVX

Experiment poskytuje srovnávací informace o účinnosti několika terapeutických kombinací pro léčbu otrav RVX látkou po intoxikaci potkana dávkou ekvivalentní 1 LD<sub>50</sub>.

Potkani jsou rozděleni do 5 skupin po osmi zvířatech. Jedna z pěti skupin, je skupina kontrolní, které byl podán fyziologický roztok.

Jednotlivým skupinám potkanů byly i.m. aplikovány studované oximy v kombinaci s ATR či ATR samotný v ekvivalentní dávce, která odpovídá humánní dávce (2 % LD<sub>50</sub>).

Po jedné minutě byl každému potkanovi i.m. aplikován do pravé zadní končetiny 1 LD<sub>50</sub> RVX, jejíž dávkování bylo upraveno podle jednotlivých hmotností potkanů.

Obecně 1 LD<sub>50</sub> RVX = 10,0 µg/kg

Po 30 minutách byli potkani dekapitováni a odebrány mozky, bránice a krev.

Tab.IV.: uvádí aplikované látky jednotlivým skupinám po intoxikaci RVX.

Skupina	Aplikované látky
1.	fyziologický roztok
2.	ATR 21 mg/kg
3.	ATR 21 mg/kg + 2-PAM 5,2 mg/kg
4.	ATR 21 mg/kg + T0 048 3,8 mg/kg
5.	ATR 21 mg/kg + HI- 6 13,8 mg/kg

Tab. V.: znázorňuje naměřené hodnoty aktivity ChE v  $\mu\text{kat/l}$  v krvi po intoxikaci RVX.  
Všechny vzorky byly desetinásobně zředěny a kalibrovány.

aplikace fyziologického roztoku

vzorek	1	2	3	4	5	6	7	8
aktivita ( $\mu\text{kat/l}$ )	18,0	17,2	19,3	19,5	17,3	19,0	13,9	20,1

aplikace ATR 21 mg/kg

vzorek	9	10	11	12	13	14	15	16
aktivita ( $\mu\text{kat/l}$ )	13,0	12,3	10,3	11,6	13,1	12,4	13,7	12,0

aplikace ATR 21 mg/kg + 2-PAM 5,2 mg/kg

vzorek	17	18	19	20	21	22	23	24
aktivita ( $\mu\text{kat/l}$ )	15,0	16,9	15,5	16,5	17,2	16,4	9,5	16,4

aplikace ATR 21 mg/kg + T0 048 3,8 mg/kg

vzorek	25	26	27	28	29	30	31	32
aktivita ( $\mu\text{kat/l}$ )	17,0	18,8	14,3	16,0	17,8	16,2	16,8	16,7

aplikace ATR 21 mg/kg + HI- 6 13,8 mg/kg

vzorek	33	34	35	36	37	38	39	40
aktivita ( $\mu\text{kat/l}$ )	16,0	17,9	21,0	15,4	20,7	20,1	18,0	18,4

Tab.VI.: znázorňuje naměřené hodnoty aktivity ChE v  $\mu\text{kat}/\text{kg}$  u vzorků bránic po intoxikaci RVX. Všechny vzorky byly desetinásobně zředěny a kalibrovány.

aplikace fyziologického roztoku

vzorek	1	2	3	4	5	6	7	8
aktivita ( $\mu\text{kat}/\text{kg}$ )	65,0	45,5	45,7	45,2	42,5	58,5	60,3	47,6

aplikace ATR 21 mg/kg

vzorek	9	10	11	12	13	14	15	16
aktivita ( $\mu\text{kat}/\text{kg}$ )	49,3	50,1	56,7	45,0	48,9	50,5	51,3	49,0

aplikace ATR 21 mg/kg + 2-PAM 5,2 mg/kg

vzorek	17	18	19	20	21	22	23	24
aktivita ( $\mu\text{kat}/\text{kg}$ )	23,0	38,4	14,7	47,3	17,2	13,5	10,2	11,8

aplikace ATR 21 mg/kg + T0 048 3,8 mg/kg

vzorek	25	26	27	28	29	30	31	32
aktivita ( $\mu\text{kat}/\text{kg}$ )	9,6	10,8	13,9	7,7	7,5	19,2	14,5	17,6

aplikace ATR 21 mg/kg + HI- 6 13,8 mg/kg

vzorek	33	34	35	36	37	38	39	40
aktivita ( $\mu\text{kat}/\text{kg}$ )	18,7	61,5	244	61,9	60,6	67,9	86,0	49,8

Tab.VII.: znázorňuje naměřené hodnoty aktivity ChE v  $\mu\text{kat}/\text{kg}$  v mozcích potkanů po intoxikaci RVX. Všechny vzorky byly desetinásobně zředěny a kalibrovány.

aplikace fyziologického roztoku

vzorek	1	2	3	4	5	6	7	8
aktivita ( $\mu\text{kat}/\text{kg}$ )	80,7	72,3	72,5	65,6	67,6	59,4	58,1	62,6

aplikace ATR 21 mg/kg

vzorek	9	10	11	12	13	14	15	16
aktivita ( $\mu\text{kat}/\text{kg}$ )	71,6	55,1	55	54,7	61,6	62,2	71,1	61,4

aplikace ATR 21 mg/kg+ 2-PAM 5,2 mg/kg

vzorek	17	18	19	20	21	22	23	24
aktivita ( $\mu\text{kat}/\text{kg}$ )	51,9	69,2	69,3	69,1	69,1	72,3	65,2	68,9

aplikace ATR 21 mg/kg + T0 048 3,8 mg/kg

vzorek	25	26	27	28	29	30	31	32
aktivita ( $\mu\text{kat}/\text{kg}$ )	57,9	57,2	54,4	59	60,5	55	62,2	50,4

aplikace ATR 21 mg/kg + HI- 6 13,8 mg/kg

vzorek	33	34	35	36	37	38	39	40
aktivita ( $\mu\text{kat}/\text{kg}$ )	61,1	51,5	61	63,7	62,7	58,9	64,9	74,1

Průměrná aktivita v  $\mu\text{kat}/\text{kg}$  a  $\mu\text{kat}/\text{l}$  jednotlivých terapeuticky účinných látek ve vzorcích krve, bránic a mozcích je zaznamenána v následující Tab.VIII., kde hodnoty zvýrazněné červeně ukazují, že v mozku došlo k nejvyššímu stupni reaktivity, jak se předpokládalo.

	kontrola	ATR	ATR + 2PAM	ATR + T0 048	ATR + HI-6
krev	18,038	12,338	15,413	16,700	18,463
mozek	67,350	61,588	66,875	57,075	62,238
bránice	51,288	50,010	22,013	12,600	81,225

### 5.6.2 SOMAN

Experiment se somanem je totožný s experimentem II. s RVX, tedy poskytuje srovnávací informace o účinnosti několika terapeutických kombinací pro léčbu otrav somanem po intoxikaci potkana dávkou ekvivalentní 1 LD<sub>50</sub>.

Potkani byli rozděleni do 7 skupin po šesti potkanech, z nichž jedna skupina byla kontrolní.

Jednotlivým skupinám potkanů (skupina 1. – 6.) byl i.m. aplikován ATR v dávce 21 mg/kg a po pěti minutách byl aplikován do pravé zadní končetiny studovaný oxim v ekvivalentní dávce.

Kontrolní skupině K byl podán fyziologický roztok.

Fyziologický roztok i soman byly v dávce odpovídající 1 LD<sub>15</sub>.

Obecně: 1 LD<sub>15</sub> somanu = 120 µg/kg

V experimentu se somanem byly testovány i K-oximy ( K 074 a K 075), neboť se předpokládá, že mají vysokou reaktivační účinnost po intoxikaci. Obecně, jsou však K-oximy považovány za nejefektivnější reaktivátory po intoxikaci tabunem.

Tab. IX.:jednotlivým skupinám potkanů byla podána dávka různého oximu

skupina	Terapie	Intoxikace
1.	ATR 21 mg/kg	+ po 5 min 1 LD <sub>50</sub> somanu
2.	ATR 21 mg/kg + 18,9 mg/kg HI-6 chlorid	+ po 5 min 1 LD <sub>50</sub> somanu
3.	ATR 21 mg/kg + 24,8 mg/kg HI-6 mesylát	+ po 5 min 1 LD <sub>50</sub> somanu
4.	ATR 21 mg/kg + 18,0 mg/kg T0 048	+ po 5 min 1 LD <sub>50</sub> somanu
5.	ATR 21 mg/kg + 23 mg/kg K 074	+ po 5 min 1 LD <sub>50</sub> somanu
6.	ATR21 mg/kg + 22,9 mg/kg K 075	+ po 5 min 1 LD <sub>50</sub> somanu
K.	ATR 21 mg/kg	+ po 5 min. fyziol.roztok

Po 30 minutách byli potkani dekapitováni a odebrány vzorky mozků, bránic a krve.

Tab.X.: znázorňuje naměřené hodnoty aktivity ChE v  $\mu\text{kat/l}$  ve vzorcích potkaní krve po intoxikaci somanem.

skupina, vzorek	AKTIVITA $\mu\text{kat/l}$		AKTIVITA $\mu\text{kat/l}$
1,1	4,042	Průměr Std. D.	4,617 0,318
1,2	4,555		
1,3	4,920		
1,4	4,650		
1,5	4,890		
1,6	4,641		
2,1	5,517	Průměr Std. D.	5,318 0,685
2,2	5,950		
2,3	5,652		
2,4	4,927		
2,5	5,747		
2,6	4,112		
3,1	4,430	Průměr Std. D.	4,783 0,546
3,2	4,120		
3,3	4,881		
3,4	5,666		
3,5	4,738		
3,6	4,916		
4,1	4,467	Průměr Std. D.	4,433 0,281
4,2	4,719		
4,3	4,342		
4,4	4,847		
4,5	4,225		
4,6	4,095		
5,1	4,616	Průměr Std. D.	4,1 0,442
5,2	4,237		
5,3	4,248		
5,4	4,321		
5,5	3,786		
5,6	3,382		
6,1	4,630	Průměr Std. D.	4,403 0,341
6,2	4,486		
6,3	3,777		
6,4	4,260		
6,5	4,698		
6,6	4,561		
K,1	10,089	Průměr Std. D.	11,18 1,234
K,2	11,310		
K,3	11,261		
K,4	13,320		
K,5	11,244		
K,6	9,830		



Tab.XI.: znázorňuje naměřené hodnoty aktivity ChE v  $\mu\text{kat/kg}$  v mozcích potkanů po intoxikaci somanem. Naměřené hodnoty označené šedou barvou byly ze skupin vyřazeny.

skupina, vzorek	AKTIVITA $\mu\text{kat/kg}$		AKTIVITA $\mu\text{kat/kg}$
1,1	3,331	Průměr	4,827
1,2	4,271		1,449
1,3	3,828	Std.D	
1,4	6,044		
1,5	11,411		
1,6	6,663		
2,1	21,404	Průměr	12,690
2,2	25,695		10,130
2,3	17,732	Std.D	
2,4	5,078		
2,5	2,300		
2,6	3,940		
3,1	3,012	Průměr	3,324
3,2	2,467		0,959
3,3	3,129	Std.D.	
3,4	4,262		
3,5	4,712		
3,6	2,361		
4,1	2,876	Průměr	2,944
4,2	6,320		1,709
4,3	2,631	Std.D.	
4,4	1,687		
4,5	2,106		
4,6	2,041		
5,1	2,187	Průměr	2,662
5,2	11,454		0,943
5,3	2,464	Std.D.	
5,4	1,491		
5,5	3,259		
5,6	3,912		
6,1	2,266	Průměr	3,778
6,2	3,854		0,9671
6,3	13,636	Std.D	
6,4	4,910		
6,5	3,680		
6,6	4,177		
K,1	50,073	Průměr	44,190
K,2	36,192		4,965
K,3	47,203	Std. D.	
K,4	42,794		
K,5	47,052		
K,6	41,853		

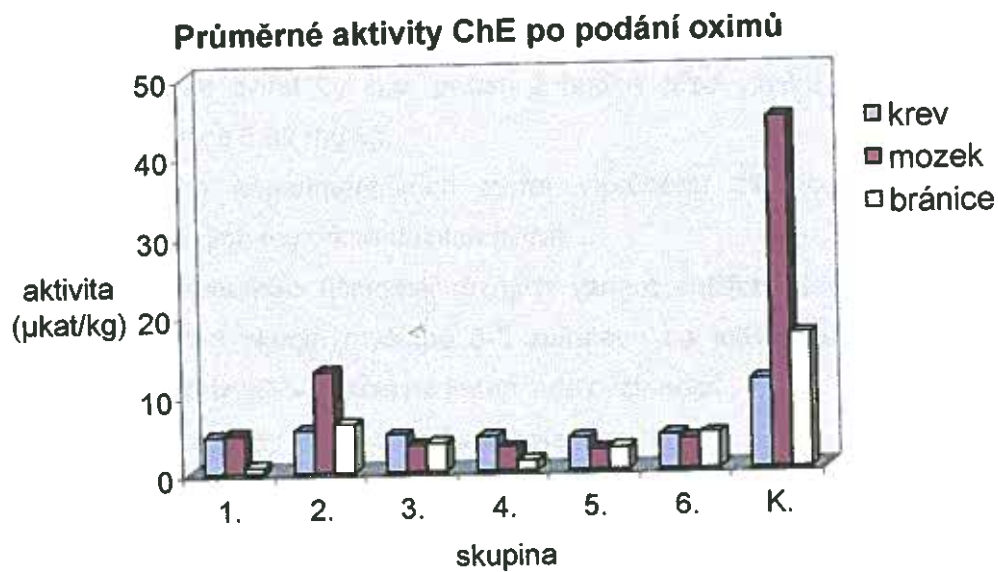
Tab.XII.: znázorňuje naměřené hodnoty aktivity ChE v  $\mu\text{kat}/\text{kg}$  ve vzorcích bránic po intoxikaci somanem. Naměřené hodnoty označené šedou barvou jsou ze skupin vyřazeny.

skupina, vzorek	AKTIVITA $\mu\text{kat}/\text{kg}$		AKTIVITA $\mu\text{kat}/\text{kg}$
1,1	0,166	Průměr Std. D.	0,7977 0,5131
1,2	0,682		
1,3	0,632		
1,4	1,567		
1,5	4,649		
1,6	0,942		
2,1	15,416	Průměr Std. D.	6,087 6,727
2,2	11,414		
2,3	8,949		
2,4	0,742		
2,5	0		
2,6	0		
3,1	6,061	Průměr Std. D.	3,55 3,024
3,2	2,891		
3,3	0		
3,4	6,122		
3,5	6,226		
3,6	0		
4,1	4,180	Průměr Std. D.	1,295 1,618
4,2	2,147		
4,3	0,852		
4,4	0,591		
4,5	0		
4,6	0		
5,1	5,687	Průměr Std. D.	2,849 2,278
5,2	4,683		
5,3	3,913		
5,4	0		
5,5	0,659		
5,6	2,155		
6,1	2,060	Průměr Std. D.	4,457 2,195
6,2	5,841		
6,3	6,743		
6,4	5,080		
6,5	5,633		
6,6	1,386		
K,1	18,192	Průměr Std.D.	16,94 1,224
K,2	15,707		
K,3	15,375		
K,4	16,586		
K,5	17,824		
K,6	17,961		

Průměrná aktivita jednotlivých skupin v odebraných vzorcích po intoxikaci somanem je zaznamenána v níže uvedené Tab.XIII., kde hodnoty zvýrazněné červenou barvou vyznačují nejvyšší stupeň reaktivace u vzorků krve,mozků a bránice

Skupina	$\mu\text{kat/l}$ <small>krv</small>	$\mu\text{kat/kg}$ <small>mozek</small>	$\mu\text{kat/kg}$ <small>bránice</small>
1.	4,62	4,83	0,80
2.	5,32	12,69	6,09
3.	4,78	3,32	3,55
4.	4,43	2,94	1,30
5.	4,10	2,66	2,85
6.	4,40	3,78	4,46
K.	11,18	44,19	16,94

Graf č. 8 - znázornění průměrné aktivity ChE po podání oximů



### 5.6.3 TABUN

Experiment srovnává účinnost všech klinicky zavedených oximů (2-PAM, HI-6, T0 048, TMB-4 a MMC), mimo ATR byly použity i tři centrálně působí anticholinergika (benzaktyzin, biperiden a skopolamin) a jako antikonvulzivní látka byl použit diazepam. Účinnost profylaktických a terapeutických antidot vůči tabunu byla hodnocena z hlediska jejich schopnosti zabránit neurotoxickým a letálním účinků tabunu po jeho podání experimentálnímu zvířeti. Účinnost byla testována in vitro s využitím homogenátu mozku potkana a poté in vivo na potkanech otrávených i.m. dávkou tabunu odpovídající 1 LD<sub>50</sub>, kdy se stanovila procenta reaktivace AChE v krvi, bránici a mozku 30 min po otravě a následné terapii. Anticholinergika i reaktivátory byly podány v ekvivalentní dávce odpovídající 2 % hodnoty jejich LD<sub>50</sub>.

2 % hodnoty LD <sub>50</sub>	HI-6	.....	13,8mg/kg pro myši
		.....	15,6 mg/kg pro potkany
	obidoxim	.....	3,8 mg/kg pro myši
		.....	3,2mg/kg pro potkany
	ATR	.....	8,4 mg/kg pro myši
		.....	25,2 mg/kg pro potkany

Diazepam byl podán v dávce 1mg/kg.

Některým skupinám zvířat byl p.o. podán 2 hodiny před vlastní intoxikací samotný pyridostigmin v dávce 5,82 mg/kg.

Úmrtnost léčených experimentálních zvířat v průběhu 24 hodin byla srovnána s úmrtností neléčených experimentálních zvířat.

Při stanovení terapeutické účinnosti různých variant antidotní terapie vůči NPL, se obvykle používá 5-6 skupin myši po 6-8 zvířatech na jeden typ NPL a jeden typ antidotní terapie, tedy 30-50 zvířat na jeden index účinnosti.

Normální hodnota aktivity AChE u potkana byla : krev ..... 19,5  $\mu$ kat/L  
bránice ..... 24,0  $\mu$ kat/kg  
mozek ..... 293,3  $\mu$ kat/kg

Tab. XIV : průměrné hodnoty aktivit AChE ( $\mu\text{kat/L}$  nebo  $\mu\text{kat/kg}$ ) po reaktivaci vybranými oximy.

Zaznamenané hodnoty jsou: průměr  $\pm$  směrodatná odchylka průměru

	krev	bránice	mozek
ATR	1,18 $\pm$ 0,38	5,71 $\pm$ 2,62	24,9 $\pm$ 4,9
ATR + 2-PAM	1,38 $\pm$ 0,32	11,48 $\pm$ 4,19	31,7 $\pm$ 10,8
ATR + T0 048	3,98 $\pm$ 0,63	15,73 $\pm$ 2,42	38,8 $\pm$ 7,2
ATR + MMC	1,55 $\pm$ 0,25	5,25 $\pm$ 1,42	28,8 $\pm$ 8,5
ATR + HI-6	1,50 $\pm$ 0,43	5,72 $\pm$ 2,10	24,9 $\pm$ 4,7
ATR + TMB-4	3,35 $\pm$ 0,81	15,41 $\pm$ 2,47	65,7 $\pm$ 11,2

Tab. XV.: stupeň reaktivace inhibované AChE tabunem v procentech

	krev	bránice	mozek
ATR	---	---	---
ATR + 2-PAM	1,8	18,6	1,9
ATR + T0 048	25,2	32,4	3,9
ATR + MMC	3,4	0	1,1
ATR + HI-6	2,9	0	0
ATR + TMB-4	19,5	31,4	11,5

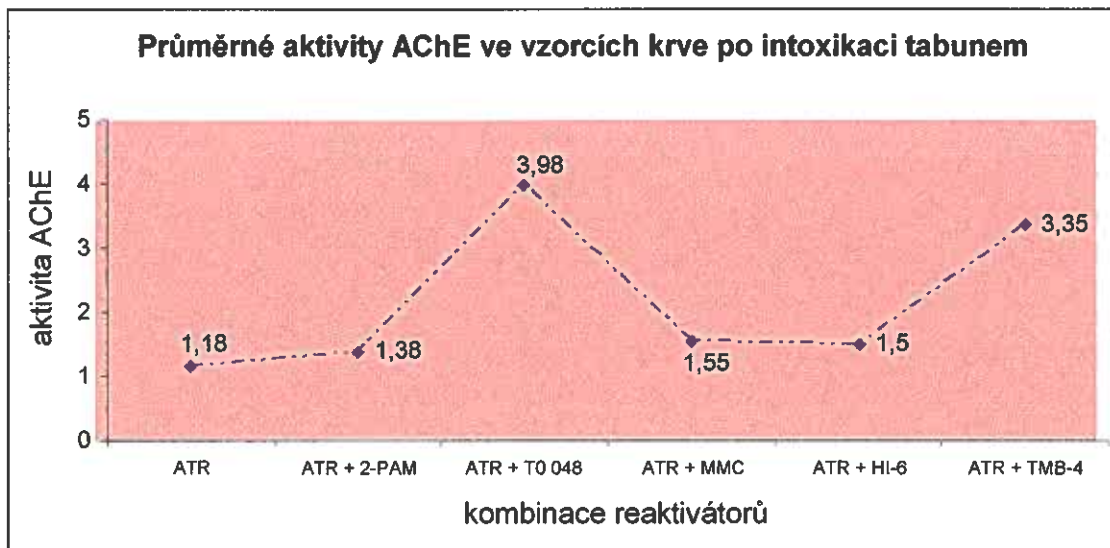
Tab. XVI.: ovlivnění hodnoty LD<sub>50</sub> tabunu reaktivátory AChE v kombinaci s ATR za přítomnosti nebo nepřítomnosti diazepam u myší

intoxikace	terapie	LD <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/kg}$ )
neléčená	-----	275,4
léčená	HI-6 + ATR	430,2
	HI-6 + ATR + diazepam	504,9
	T0 048 + ATR	454,9
	T0 048 + ATR + diazepam	645,5
	2-PAM + ATR	377,7
	2-PAM + ATR + diazepam	503,3

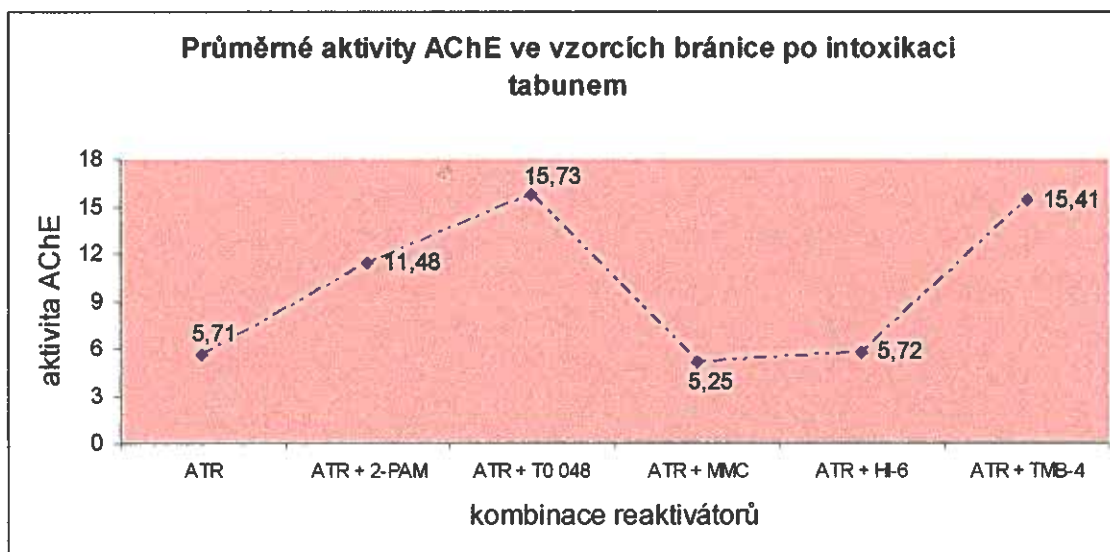
Tab. XVII.: ovlivnění hodnoty LD<sub>50</sub> tabunu T0 048 v kombinaci s ATR, benaktyzinem, biperidenem či skopolaminem za přítomnosti či nepřítomnosti diazepam u myši

intoxikace	terapie	LD <sub>50</sub> (µg/kg)
neléčená		275,4
léčená	T0 048 + ATR	454,9
	T0 048 + ATR + diazepam	645,5
	T0 048 + benaktyzin	773,2
	T0 048 + benaktyzin + diazepam	775,8
	T0 048 + biperiden	716,9
	T0 048 + biperiden + diazepam	715,5
	T0 048 + skopolamin	716,1
	T0 048 + skopolamin + diazepam	1074,0

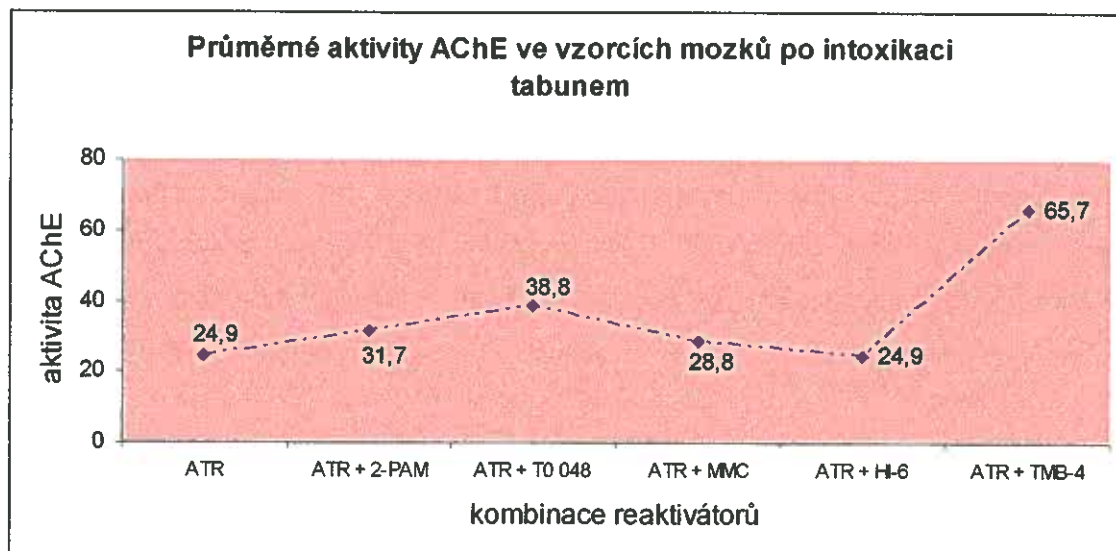
Graf č. 9 – znázornění průměrné aktivity AChE v krvi po intoxikaci tabunem



Graf č. 10- znázornění průměrné aktivity AChE v bránici po intoxikaci tabunem



Graf č. 11 – znázornění průměrné aktivity AChE v mozcích po intoxikaci tabunem





## 5.7 RVX

### 5.7.1 VÝSLEDKY EXPERIMENTU I.

Cílem pokusu bylo zjistit stupeň inhibice ChE po podání jednonásobku LD<sub>50</sub>. Z naměřených výsledků je patrné, že kontrolní roztok měl nejvyšší aktivitu ChE a s postupujícím časem se aktivita ChE postupně snižovala. V 10. minutě došlo k výraznému poklesu aktivity ChE. Ve 20. minutě odběru vzorku výrazný pokles aktivity pokračoval, ovšem ve 40. minutě následoval vzestup a v 60. minutě byla aktivita ChE v porovnání s 20. minutou vyšší.

### 5.7.2 VÝSLEDKY EXPERIMENTU II.

Cílem pokusu II. bylo srovnání účinnosti několika terapeutických kombinací pro léčbu intoxikace RVX látkou dávkou ekvivalentní jednonásobku LD<sub>50</sub>, která představovala 10,0 µg/kg.

Naměřené výsledky znázorňují, že terapeutická kombinace ATR + HI-6 ve vzorcích krve a bránic měla vyšší aktivitu ChE než vzorek kontrolní, ovšem kontrolní vzorek mozku měl aktivitu ChE vyšší než terapeutická kombinace ATR + HI-6.

Při vzájemném srovnání tkání a zvolených terapeutických kombinací, byla nejvyšší aktivita ChE naměřena v mozkové tkáni. Vzorek označený jako „kontrola“ měl aktivitu nejvyšší a terapeuticky nejúčinnější kombinací v mozkové tkáni byla kombinace ATR + 2-PAM. Ve vzorcích potkaní krve byla nejúčinnější terapeutická kombinace ATR + HI-6, stejně tak tomu bylo u vzorků bránic.

Jako nejméně účinná terapeutická kombinace se ukázala ATR + T0 048, ovšem samotný ATR vykazoval u krevních vzorků ještě menší terapeutickou účinnost než jeho kombinace s T0 048.

Při srovnání účinnosti námi testovaných oximů se ukázalo, že oxim HI-6 byl méně toxický v porovnání s pralidoximem a obidoximem (ATR + T0 048). Terapeutické dávky oximu HI-6 korespondující s 2% LD<sub>50</sub> byly signifikantně vyšší než dávky pralidoximu a obidoximu. Všechny studované oximy byly schopny signifikantně reaktivovat RVX inhibovanou BuChE v krvi, ale jenom oxim HI-6 obnovil tuto aktivitu kompletně. Obecně je tedy oxim HI-6 nejvýhodnější. Je to také oxim, který se ukázal být neúčinnějším reaktivátorem RVX inhibované AChE v periférní části, ale jeho schopnost reaktivovat AChE inhibovanou RVX látkou v mozku byla s ostatními oximy srovnatelná.

Na potkanech intoxikované RVX se v průběhu několika minut objevilo široké spektrum klinických příznaků otravy včetně muskarinových (slinění, slzení a žvýkací) a nikotinových (třes, tonicko-klonické křeče). V případě antidotální léčby se klinické příznaky objevily později a i jejich intenzita byla slabší ve srovnání s neléčenými otravami bez ohledu na typ oximu.

## 5.8 SOMAN

Cílem pokusu, kdy byl aplikován soman, byl obdobný jako Experiment II. s RVX, tedy určení terapeutické účinnosti jak jednotlivých oximů, tak jejich kombinace. Jako kontrolní vzorek byla použita kombinace fyziologického roztoku a funkčního antidota (ATR). Potkani byli intoxikováni dávkou ekvivalentní 1 LD<sub>50</sub>, která představovala 120,0 µg/kg.

Nejvyššího stupně reaktivace dosáhla u vzorků bránic terapeutická kombinace ATR + K 075. K-oximy (K 074 a K 075) jsou považovány za nejefektivnější reaktivátory při intoxikaci tabunem, ale jak je patrné, tak i po intoxikaci potkanů somanem mají reaktivační účinnost dosti vysokou. Terapeutická kombinace ATR + HI-6 se ukázala jako nejefektivnější reaktivátor inhibované AChE ve vzorcích potkaních mozků a tedy i nejvhodnější pro antidotní léčbu. Jejich aktivita v porovnání s kontrolním vzorkem vykazovala poloviční aktivitu. I z grafického znázornění je patrné, že nejvyšší stupeň reaktivace inhibované AChE nastal v mozkové tkáni. Na druhé straně, nejnižší stupeň reaktivace nastal u vyšetřovaných vzorků v krvi.

Nejnižší aktivita byla u skupin potkanů, který byl aplikován samotný ATR. Obdobně tomu bylo i u potkaních mozků a u krve, kdy dosahovala naměřená aktivita dokonce 4x menší hodnoty než u kontroly.

Na základě publikovaných dat se testovaný oxim HI-6 zdá být efektivní v profylaxi intoxikace somanem již v relativně nízkých dávkách. Naopak, klasické oximy jako jsou pralidoxim či obidoxim, se ukázaly být málo efektivní.<sup>28</sup>

## 5.9 TABUN

Cíl pokusu, kdy byl aplikován tabun, je obdobný jako u předešlých experimentů s již popsanými inhibitory AChE. Navíc v tomto experimentu bylo zjišťováno, zda je ovlivněna hodnota LD<sub>50</sub> tabunu reaktivátory AChE v kombinaci s ATR za přítomnosti nebo nepřítomnosti diazepamu u myší a dále, zda je ovlivněna hodnota LD<sub>50</sub> tabunu T0 048 v kombinaci s ATR, benaktyzinem, biperidenem či skopolaminem za přítomnosti či nepřítomnosti diazepamu u myší.

Při experimentu byly použity jak potkani kmene Wistar, tak myši kmene NMRI. Potkani kmene Wistar se obvykle používají pokud se stanovuje reaktivační účinnost reaktivátorů AChE in vivo (cestou stanovení procent reaktivace ve vybraných orgánech). Myši kmene NMRI se používají pokud se testuje terapeutická účinnost reaktivátorů AChE (cestou stanovení indexu účinnosti) vzhledem k větší spotřebě zvířat.

Některým skupinám zvířat byl před vlastní intoxikací podán pyridostigmin v dávce 5,82 mg/kg. U experimentálních zvířat s profylakticky podaným pyridostigminem, jehož podání vyvolalo karbamylaci AChE v dostatečném rozsahu, spontánní dekarbamylace enzymu regeneruje postačující množství enzymu k zachování základních životních funkcí. Profylaktická účinnost pyridostigminu (stejně jako u dalších karbamátů) je limitována podanou dávkou. S nárůstem podané dávky se zvyšuje i profylaktická účinnost, ovšem výrazněji se také projevují vedlejší účinky.<sup>29</sup>Problému vedlejších účinků pyridostigminu při vyšším dávkování lze předejít jeho kombinací s antagonisty-anticholinergiky. V této souvislosti bylo testováno mnoho látek s anticholinergním účinkem a jako nejvhodnější se zdála být kombinace pyridostigminu s benaktyzinem a trihexyfenidylem.<sup>30</sup>Současné podání těchto dvou anticholinergik spolu s pyridostigminem umožňuje ještě zvýšit jeho dávku a tím i profylaktický účinek. Dobrá profylaktická účinnost této kombinace byla in vivo na zvířatech prokázána nejen u tabunu, ale i u ostatních dosud známých NPL (sarin, soman, RVX, cyklosarin).<sup>31</sup>

Získané údaje zaznamenané v Experimentální části potvrzují všeobecně známou nízkou schopnost běžných oximů reaktivovat AChE inhibovanou tabunem.

Nejvyšší stupeň reaktivace u vzorků krve a bránic dosáhla kombinace ATR + T0 048. Vysoký stupeň reaktivace AChE v krvi dosáhla i kombinace ATR + TMB-4, ovšem nejvyšší stupeň reaktivace této kombinace byla stanoven ve vzorcích mozků.

Výsledky získané při hodnocení vlivu výběru anticholinergika a přidání diazepamů jako antikonvulziva na LD<sub>50</sub> tabunu jasně prokazují, že centrálně působící látky (benaktyzin, biperiden, skopolamin) významně zvyšují schopnost antidotní terapie eliminovat letální účinky tabunu ve srovnání s ATR. Přidali-li jsme k antidotní terapii diazepam (antikonvulzivní účinek), dosáhli jsme signifikantního zvýšení odolnosti experimentálních zvířat vůči letálním dávkám tabunu, avšak pouze v případě, že antidotní terapie zahrnovala jako anticholinergikum ATR. V tomto experimentu dosáhla nejvyšší schopnosti eliminovat letální účinky tabunu kombinace T0 048+ATR+diazepam. V případě použití centrálně působících anticholinergik se efekt diazepamů vůči eliminaci letálních účinků tabunu s výjimkou skopolaminu neprojevil.

## 6 HODNOCENÍ DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ

Obecně platí, že účinnost reaktivátorů AChE závisí na jejich reaktivitě a afinitě enzymu inhibovanému organofosfáty, ale také závisí na struktuře inhibovaného enzymu. Reaktivita všech studovaných oximů je většinou stejná, protože jejich základní struktury jsou velmi jednoduché.<sup>32</sup>

Výsledky provedených experimentů korespondují s výsledky demonstrovanými jinými autory, ze kterých je patrná odlišnost v terapeutické a reaktivační účinnosti jednotlivých studovaných oximů.<sup>30</sup>

Výsledky uvedených experimentů prokazují, že testovaný oxim HI-6 je schopný reaktivovat somanem inhibovanou AChE nejen v periferním systému (bránice), ale alespoň v určitém rozsahu i v centrálním nervovém systému (mozku). Ačkoliv oxim HI-6 tedy reaktivuje aktivitu AChE v mozku, není sice tato reaktivace dostačující k eliminaci všech symptomů nadměrné aktivace cholinergního systému, na druhé straně je však dostatečná pro záchranu potkanů intoxikovaných somanem. Nižší reaktivační schopnost v mozku je vysvětlená chemickou strukturou oximu, jedná se o bispyridiniovou látku, která má kladný náboj, a proto nízkou schopnost průniku hematoencefalickou bariérou. Je to také oxim, který se ukázal být nejúčinnějším k eliminaci akutních letálních účinků způsobených intoxikací potkanů RVX a k reaktivaci AChE v periferním systému intoxikovaných potkanů. Akutní toxicita RVX je převážně způsobena inhibicí periferní AChE, protože RVX, jako strukturální analog VX se dvěma kladnými náboji, velmi málo prochází přes HEB.<sup>33</sup>

Toxikodynamickým důsledkem efektu RVX je tedy přednostní akumulace ACh v periferních muskarinových a nikotinových receptorech. Oxim HI-6 a všeobecně H-oximy (HLÖ-7) prochází v určitém rozsahu HEB, i když má v molekule kladný náboj ve své molekule. Při intoxikaci somanem došlo k manifestaci zásahu těchto oximů na úrovni mozku<sup>34</sup> a to přes to, že soman snižuje v průběhu intoxikace vazbu HI-6 oximu v mozku v průběhu intoxikace.<sup>35</sup>

Po intoxikaci RVX byl reaktivační účinek všech studovaných oximů v centrálním nervovém systému přibližně stejný bez ohledu na typ oximu, zřejmě i proto, že inhibice AChE navozená RVX v mozku byla relativně nízká.<sup>23</sup>

Vysoká terapeutická účinnost oximu HI-6 se uplatňuje i v případech účinků založených na přímých antimuskarinových a ganglioplegických mechanismech, na obnovení nervosvalového přenosu, zpomalení tvorby stárnoucího komplexu inhibitor – enzym a inhibici uvolnění ACh.<sup>36</sup>

Oxim HI-6 je efektivní antidotum při intoxikaci somanem, i když jeho užití může být eliminováno několika faktory, např. nestabilitou ve vodném prostředí.<sup>26,37</sup> Reaktivace inhibované periferní AChE je pro terapeutickou účinnost oximů důležitější než reaktivace inhibované centrální AChE. Proto oxim HI-6 může být účinnější při eliminaci akutních letálních účinků způsobených intoxikací RVX, i když mezi námi studovanými oximy nebyl zjištěn rozdíl v jejich síle reaktivace inhibované AChE v mozku. Terapeutická kombinace ATR + K 075 vykazovala největší periferní reaktivační schopnost v periferním systému (bránice).

In vitro byla sledována reaktivační účinnost K-oximů u AChE inhibované tabunem. Vzájemným srovnáním jejich účinnosti se ukázalo, že oximy zavedené v Armádě České republiky (pralidoxim, obidoxim a HI-6) byly prakticky neúčinné.

V tomto směru prokázaly vyšší účinnost oxidy K 074 a K 075. Uvedené oximy reaktivovaly AChE inhibovanou tabunem v nižší koncentraci  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  M v porovnání s ostatními oximy, kdy byla nutná koncentrace  $10^{-3}$  a  $10^{-2}$  M. Proto jsou

K-oximy považovány za nejefektivnější reaktivátory AChE inhibované tabunem.<sup>38</sup>

V našich experimentech se K 074 a K 075 také projeví jako neúčinnější reaktivátory po intoxikaci somanem v periferním systému. Ovšem neúčinnějším a nejperspektivnějším oximem po intoxikaci tabunem se jeví již v minulosti používaný trimedoxim, který svou reaktivační účinností signifikantně předčí i nejužívanější používaný reaktivátor AChE- obidoxim a to hlavně v CNS. Dosažené výsledky tak podporují poznatky z pokusů in vitro, které prokázaly, že z testovaných oximů pouze trimedoxim je schopen v koncentraci  $10^{-2}$  M reaktivovat až 50% tabunem inhibované AChE. Oxim HI-6, tolik účinný vůči somanu a RVX, je naopak vůči tabunu velmi málo účinný. Ze současně používaných reaktivátorů AChE se jako nejvhodnější pro antidotní terapii akutní otravy tabunem jeví trimedoxim.

Dosažené výsledky naznačily, jak je důležitá komplexní antidotní terapie akutní otravy tabunem zahrnující vedle terapeutických antidot i farmakologickou profylaxi, neboť akutní otravu tabunem nelze s dostatečnou účinností léčit pouze klasickou kombinací anticholinergika s oximem.<sup>39</sup>

K zajištění ochrany CNS před účinky NPL se používají centrálně působící látky. Z této skupiny byly testovány benzodiazepiny (např. diazepam), které se běžně používají v následné terapii otrav NPL, kde výrazně zkracují čas nabytí vědomí. Jejich efektivita při profylaktickém podání však není příliš významná.<sup>40</sup>

Na závěr tedy lze říci, že oxim HI-6 je v současnosti považován za neúčinnější reaktivátor inhibované AChE různými NPL.<sup>41</sup> Je charakterizován vysokou afinitou k AChE inhibované RVX, VX, či somanem, ale nikoliv AChE inhibované tabunem. Dále

je charakterizován nejvyšším stupněm rychlosti reaktivace a v nízkých koncentracích byl schopen signifikantně reaktivovat AChE inhibované strukturálně odlišnými NPL.<sup>42</sup>

Výsledky ze studií provedených in vitro, stejně tak i výsledky ze studií in vivo ukazují, že oxim HI-6 je z hlediska účinnosti v porovnání s klasickými oximy (pralidoxim, obidoxim) účinnější a pro budoucí přínos v humánní medicíně má velký význam. Důvodem je vyšší pravděpodobnost k dosažení terapeutického účinku nejen v periferním, ale i v centrálním kompartmentu.

Žádný však z uvedených reaktivátorů není dostatečně efektivní při otravě jakoukoli NPL, tzn. dosud neexistuje žádný širokospektrální („univerzální“) reaktivátor.<sup>43</sup>

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

---

- <sup>1</sup> Patočka, J., 2005. Základy toxikologie, kap. IV-VI, Západočeská univerzita, České Budějovice
- <sup>2</sup> Bajgar, J., Navrátil, L., 1989. Prostaglandiny v klinické medicíně, Cholinesterázy a jejich klinický význam, Univerzita Karlova, Praha
- <sup>3</sup> Bajgar, J., Fusek, J., Patočka, J., 1979. Extrémně toxické nízkomolekulární syntetické jedy, VLDVDU HK
- <sup>4</sup> Prokeš, J., a kol., 2005 Základy toxikologie I., Karolinum, Praha
- <sup>5</sup> Patočka, J., Jun, D., Kuča, K., 2004. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase- important enzymes of human body, *Acta medica* 47(4):215-28
- <sup>6</sup> Vopršalová, M., Žáčková, P., 1996. Toxikologie pro farmaceuty, Univerzita Karlova, Praha
- <sup>7</sup> Patočka J. a kol.; 2004. Vojenská toxikologie, Grada Publishing, Praha, str. 30 – 44.
- <sup>8</sup> Lullmann, H., Mohr, K., Wehling, M., 2002. Farmakologie a toxikologie, Grada
- <sup>9</sup> Worek, F., Szinicz, L., Eyer, P., Thiermann, H., 2005. Evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning: development of kinetic-based dynamic, *Toxicol Appl Pharmacol.* 209(3): 193-202
- <sup>10</sup> Fine RE, 1999. The biochemistry of Alzheimer disease, *Alzheimer, Dis Assoc Disord.* 13 Suppl 1: S82-7
- <sup>11</sup> Giacobini, E., 2004. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease, *Pharmacol Res.* 50(4):433-40
- <sup>12</sup> Hartl, J., Palát, K., Doležal, M., Miletín, M., Opletalová, V., 2001. Farmaceutická chemie II/1, Univerzita Karlova, Praha
- <sup>13</sup> Alptuzun, V., Kapková, P., Baumann, K., Erciyas, E., Holzgrabe U., 2003. Synthesis and biological activity of pyridinium-type acetylcholinesterase inhibitors, *J Pharm. Pharmacol* 55(10): 1397-404
- <sup>14</sup> Wilson, IB., Ginsburg, S., 1995. Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by alkylphosphate, *Arch Biochem*, 54(2): 569-71
- <sup>15</sup> Kuča, K., Jun, D., Musílek, K. 2006. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini Rev. Med. Chem.*, 6 (3) : 269-277.
- <sup>16</sup> Hackley, Jr., Steiner, GM., Lamb, JC., 1991. Formation of potent inhibitors of AChE by reaction of pyridinaldoximes with isopropyl methylphosphonofluoridate, *Toxicol. Sci.* 17: 208-214
- <sup>17</sup> Kassa, J., Kuča, K., 2006. The reactivating and Therapeutical efficacy of currently available oximes to counteract Russian VX poisonings in rats and mice, *Int J Toxicol.* 25(5): 397-401
- <sup>18</sup> <http://en.wikipedia.org>



- 
- <sup>19</sup> Filliat, P., Coubard, S., Pierard, C., Liscia, P., and. col., 2006. Long-term behavioral consequences of soman poisoning in mice, *Neurotoxicology*. Nov.18.
- <sup>20</sup> Kassa, J., 2004. Vliv opakované antidotní terapie na toxicitu tabunu u myší, *Vojenské zdravotnické listy*. 73 (4)
- <sup>21</sup> <http://www.espionageinfo.com>
- <sup>22</sup> Štěpánková, S., Vránová, M., Zdražilová, P., Komers, K., Komersová, A., Cegan, A., 2005. Two new methods monitoring kinetice of hydrolysis of acetylcholin and acetylthiocholine, *Z Naturforsch.*, 60(11-12): 943-6
- <sup>23</sup> Komersova, A., Komers, K., Zdražilová, P., 2005. Kinetic of hydrolysis acetylthiocholine and acetylcholine by cholinesterases, *Chem Biol Interact*. Dec 15; 157-158: 387-8
- <sup>24</sup> Polhuijs, M., Langenberg, J.P., Benschop, H.P., 1997. New method for retrospective detection of exposure to organophosphorus anticholinesterases: application to alleged sarin victims of Japanese terrorists, *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1, 156-61
- <sup>25</sup> Fidder, A., et al., 2002. Retrospective detection of exposure to organophosphorus anti-cholinesterases: mass spectrometric of phosphylated human butyrylcholinesterase. *Chem. Rec. Toxicol.*, 15 (4): 582-590
- <sup>26</sup> Bajgar, J., Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi-možná modifikace pro polní použití, *Vojenské zdravotnické listy*. 41 (2)
- <sup>27</sup> Kassa, J., Kunešová, G., Vachek, J., Kuča, K., Cabal, J., 2004. Farmakologická profylaxe a antidotní terapie akutní otravy tabunem, *Vojenské zdravotnické listy*. 73 (3)
- <sup>28</sup> Kassa, J., Cabal, J., 1999. Comparison of the efficacy of a new asymmetric bispyridinium oxime BI-6 with currently available oximes and H oximes againts soman by in vitro and in vivo methods. *Toxicol*. 132:111-118
- <sup>29</sup> Golomb, B.A., 1999. A review of the scientific literature as it pertains to gulf war illnesses, volume 2: pyridostigmine bromide. 1. st ed: Rand, p.238
- <sup>30</sup> Bajgar, J., Fusek, J., Vachek, J., 1994. Treatment and prophylaxis againts nerve agent poisoning. *ASA Newsletter*. 94(4): 10-11
- <sup>31</sup> Kassa, J., Cabal J., 2002. A comparison of the efficacy of a new asymmetric byspyridinium oxime BI-6 with currently available oximes and H oximes againts soman by in vitro and in vivo methods. *Toxicology*. 132(2-3): 111-118  
Bajgar, J., et. al. 1996. Organophosphate poisoning: improvement of prophylaxis. Proceeding of the second CBMTS. p. 201-204
- <sup>32</sup> Shih, T.-M., 1993. Comparison of several oximes on reactivation of soman-inhibited blood, brain and tissue cholinesterase aktivity in rats. *Arch. Toxicol*. 67, 637
- <sup>33</sup> Mars, T.C.M., 1993. Organophosphorus compounds. *Pharmacol. Thr*. 58: 51-66  
Bajgar, J. 2004. Organophosphates/nerve agent poisonong : mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv Clin Chem* 38: 151-216