

**Histochemické změny po účinku
vysocetoxických inhibitorů cholinesteráz ve
vybraných částech centrální a periferní nervové soustavy**

Autoreferát dizertační práce

MUDr. Petr Hájek

Ústav anatomie

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Školitel: Doc. MUDr. Dáša Slížová, CSc.

Školitel specialista: Doc. MUDr. Jiří Bajgar, DrSc.

Doktorský studijní program: Anatomie, histologie a embryologie

Hradec Králové, 2008

Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Anatomie, histologie a embryologie na Ústavu anatomie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

Uchazeč: MUDr. Petr Hájek
Ústav anatomie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Školitelka: Doc. MUDr. Dáša Slížová, CSc.
Ústav anatomie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Školitel specialista:
Doc. MUDr. Jiří Bajgar, DrSc.
Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany

Předseda komise pro obhajoby dizertačních prací v doktorském studijním programu
Anatomie, histologie a embryologie:
prof. MUDr. Jaroslav Mokrý, Ph.D.
Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Oponenti: prof. MUDr. Václav Lichnovský, DrSc.
Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

prof. doc. MUDr. Jiří Kassa, CSc.
Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany
Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové

Stanovisko k dizertaci vypracovala vedoucí Ústavu anatomie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Doc. MUDr. Dáša Slížová, CSc.

S dizertací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38, Hradec Králové.

Obsah

Seznam použitých zkratk	4
1. Úvod	5
2. Literární přehled	5
2.1 Cholinergní systém v nervové soustavě	5
2.2 Inhibitory a reaktivátory AChE	6
2.3 Toxikologické a klinické aspekty otravy OF	7
2.4 Použitelnost antidot	9
2.5 Laboratorní metody průkazu aktivity AChE	9
3. Cíle práce	11
4. Materiál a metody	11
4.1 Základní metodika	11
4.2 Vliv tloušťky řezu, délky fixace a koncentrace substrátu na denzitu pixelu	12
4.3 Korelace s biochemickým stanovením	12
4.4 Inhibice acetylcholinesterázy G-látkami	13
4.5 Inhibice acetylcholinesterázy V-látkami	14
4.6 Protektivní účinek huperzinu A	14
4.7 Účinek antidot při otravě tabunem	14
4.8 Vyšetření jader respiračního centra	15
4.9 Reaktivace AChE v blízkosti cirkumventrikulárních orgánů	15
4.10 Histochemické preparáty bránice	15
5. Výsledky	16
5.1 Vliv tloušťky řezu, délky fixace a koncentrace substrátu na denzitu pixelu	16
5.2 Korelace s biochemickým pokusem	16
5.3 Inhibice acetylcholinesterázy G-látkami	16
5.4 Inhibice acetylcholinesterázy V-látkami	17
5.5 Protektivní účinek huperzinu A	17
5.6 Účinek antidot při otravě tabunem	17
5.7 Vyšetření jader respiračního centra	18
5.8 Reaktivace AChE v blízkosti cirkumventrikulárních orgánů	18
5.9 Histochemické změny na bránici	18

6. Diskuze	18
6.1 Metoda	18
6.2 Intoxikace zvířat	20
6.3 Výběr histochemické metody	20
6.4 Vliv tloušťky řezu, délky fixace a koncentrace substrátu na denzitu pixelu	20
6.5 Korelace výsledků	20
6.6 Nález při otravě G-látkami a V-látkami	21
6.7 Výsledky profylaktického užití huperzinu A	21
6.8 Výsledky použití antidot	22
6.9 Vyšetření jader respiračního centra	22
6.10 Reaktivace AChE v blízkosti cirkumventrikulárních orgánů	23
6.11 Možnosti dalšího pokračování práce	24
7. Závěry	24
8. Použitá literatura	25
9. Souhrn	28
10. Summary	29
11. Strukturovaný přehled publikační činnosti	30

Seznam použitých zkratk

ACh - acetylcholin

AChE - acetylcholinesteráza

AP - alkalická fosfatáza

BuChE – butyrylcholinesteráza (též pseudocholinesteráza, nespecifická cholinesteráza)

CCD – charge changing device (zařízení s vázanými náboji)

cVRG – caudal ventral respiratory group (kaudální ventrální respirační skupina)

FVZ UO – Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany

LD₅₀ – střední letální dávka

NPL - nervově paralytická látka

OF – organofosfát(y)

OVLT - organum vasculosum laminae terminalis

rVRG – rostral ventral respiratory group (rostrální ventrální respirační skupina)

VRG - ventral respiratory group (ventrální respirační skupina)

1. Úvod

Nervově paralytické látky (NPL) náleží do chemické skupiny orgánofosfátů; zároveň patří mezi nejsilnější známé jedy. Působí na metabolismus acetylcholinu inhibicí enzymu acetylcholinesterázy (AChE), čímž ovlivňují přenos nervových vzruchů. Mají řadu dalších méně významných účinků.

Ačkoliv organofosfáty jsou již od 30. let minulého století známy, vyráběny a používány k bojovým účelům, ochrana proti těmto látkám dosud není uspokojivě vyřešena. Jejich vojenské nebo teroristické použití je přitom stále aktuální, o čemž nás v posledních desetiletích přesvědčují události v Perském zálivu, či teroristické útoky na počátku 21. století. Středem zájmu toxikologů je proto v současné době vývoj co nejúčinnějšího antidota jak pro profylaktické použití, tak pro terapii otravy NPL. Zcela uspokojivého výsledku na tomto poli dosud nebylo dosaženo.

Abychom mohli přispět k poznatkům o mechanismu účinku nejtoxičtějších inhibitorů cholinesteráz, vyvinuli jsme metodu, která kvantifikuje histochemické nálezy. Touto metodou sledujeme a popisujeme jak obraz otravy NPL v jednotlivých částech nervové soustavy, tak účinek profylaktik a antidot proti NPL. Naše práce se tedy může uplatnit při vývoji nových antidot.

2. Literární přehled

2.1 Cholinergní systém v nervové soustavě

Acetylcholin (ACh) je vytvářen v nervových zakončeních reakcí cholinu a acetylkoenzymu A katalyzovanou cholinacetyltransferázou. ACh je činný jako neuromediátor na nervosvalových ploténkách, na synapsích ganglií a v CNS. V necholinergních synapsích může působit jako neuromodulátor (např. inhibicí Na⁺/K⁺ pumpy) (Fišar et Jiráček, 2001). V CNS je rozmístěn především v septum verum, v retikulární formaci a ve striatu (Perry, 1998).

Acetylcholinesteráza (AChE, EC 3.1.1.7.) je enzym, který rozkládá ACh působící na receptoru postsynaptické membrány. AChE je jedním z neaktivnějších enzymů, které jsou známy. AChE se vyskytuje zejména v erytrocytech, nervových a svalových buňkách (Lojda et al., 1979). Funkce AChE v erythrocytech není zcela známa (Bajgar, 2004). Aktivita AChE v mozkových jádrech a oblastech je různorodá a pohybuje se v rozmezí od 118 μmol/g/h v cerebellu do 1661 μmol/g/h ve striatu, což je zhruba patnáctinásobný rozdíl v rámci mozku.

Rozdílem AChE oproti BuChE (viz níže) je zejména lokalizace a funkce enzymu a z biochemického hlediska též vyšší afinita pro ACh než pro jiné estery cholinu. Mimoto je AChE inhibována nadbytkem substrátu, tedy vyššími koncentracemi acetylcholinu.

AChE je tvořena molekulou, v níž se vyskytují 2 alfa a 2 beta podjednotky. Tzv. aktivní povrch molekuly je místo, kde se k sobě přibližují na alfa řetězci alfa anionické místo a esteratické místo, na beta řetězci se na aktivním povrchu nacházejí tzv. alosterická místa (beta anionické a gama anionické místo) (Patočka et al., 1979; Bajgar, 1985). Inhibice AChE může probíhat na těchto různých místech molekuly několika možnými druhy vazeb. Nejzávažnější z biologického hlediska je vazba fosforylací na esteratickém místě. Enzym fosforylovaný OF se jen minimálně spontánně navrácí do funkčního stavu. Tuto reaktivaci je možno urychlit tzv. reaktivátory cholinesteráz. U některých OF ovšem fosforylovaná AChE podléhá dealkylaci (tzv. ageing, stárnutí), která neovlivňuje toxicitu OF, ale omezuje možnost použití reaktivátorů. Podstatou této dealkylace je zmenšení navázané molekuly o alkyl, jehož alkoxylová skupina se působením vody rozpadá na dva hydroxylové konce (Patočka et al., 1979).

Druhou cholinesterázou s mírně odlišnými vlastnostmi je butyrylcholinesteráza (BuChE, pseudocholinesteráza, nespecifická cholinesteráza a další méně používaná synonyma), EC 3.1.1.8. (Patočka et al., 2004; BRENDA, 2008). Vyskytuje se v plazmě a v játrech, též v kůži, buňkách pankreatu, svalových buňkách cévní stěny a trávicí trubice (Lojda et al., 1979). V nervové tkáni je přítomna v některých neuronech i glii. V mozku je obsažena v neuronech i v glii zhruba řádově méně než AChE. Přesný poměr obou enzymů se liší v závislosti na oblasti mozku, je to 1,5 – 60 x méně než AChE (Giacobini, 2003). Funkce BuChE v organismu není přesně známa. Existují hypotézy o roli BuChE jakožto tzv. vychytávače toxinů – scavengera (Schwarz et al., 1995) a řada dalších teorií.

2.2 Inhibitory a reaktivátory AChE

Skupina tzv. organofosfátů (OF) patří mezi organické sloučeniny fosforu. Jejich specifickým účinkem je zejména blokáda AChE a tím ovlivnění přenosu vzruchu. V průmyslu se OF využívají jako změkčovadla, hydraulické kapaliny, léčiva, pesticidy a insekticidy. Ty nejúčinnější se používají jako bojové chemické látky, pro jejich biologický účinek se pro ně používá označení nervově paralytické jedy či nervově paralytické látky (NPL) (Bajgar, 1985).

Dle vlastností NPL lze tyto látky rozdělit na tři skupiny:

a) G-látky (tabun, sarin, soman, a cyklosarin) jsou vysoce těkavé kapaliny, proto vstupují do

organismu zejména respirační cestou. Střední letální dávka (LD_{50}) při zamoření kůže je 0,7 – 7 mg/kg. Soman dealkyluje nejrychleji, s poločasem 6 minut (Coult et al., 1956), čímž velmi omezuje použití reaktivátorů.

b) V-látky (VX a její ruská obdoba značená RVX) vydrží v terénu díky nízké těkavosti velmi dlouho. Po průchodu do organismu účinkují velmi rychle hlavně na nervosvalové ploténky, proto příčinou smrti je akutní respirační insuficience. LD_{50} při i.v. aplikaci je 0,014 mg/kg (Bajgar, 1991).

c) IVA látka (látka se střední těkavostí) je pro svou střední těkavost nebezpečná všemi branami vstupu. LD_{50} 1,36 mg/kg (Prymula, 2002).

Jako blokátory AChE se chovají také karbamáty. Inhibují též acylací (karbamylací) esteratického místa AChE, na rozdíl od OF mají lepší spontánní reaktivaci, kterou však nelze urychlit terapeutickým podáním reaktivátorů (Patočka et al., 1979). Nejznámějšími představiteli jsou přírodní fyzostigmin (Eserin) a syntetický pyridostigmin.

Tzv. krátkodobé inhibitory cholinesterázy jsou například: tacrin, donepezil, rivastigmin, 7-methoxytacrin. Vážou se na γ -anionické místo AChE. Tyto látky, které mají terciální dusík a přestupují hematoencefalickou bariérou (HEB), se díky své podpoře cholinergního účinku a nízké toxicitě v posledních letech začaly používat pro léčbu Alzheimerovy choroby, jež je způsobena nedostatkem ACh v mozkové kůře (Perry, 1998). Mohou se také využít v profylaxi otravy NPL, kdy svým vlastním obsazením AChE krátkodobě ochrání její molekulu před navázáním NPL (Bajgar, 1991).

V protikladu k inhibitorům AChE, uvedeným v předchozích odstavcích, mají reaktivátory AChE zcela odlišnou roli v patofyziologii otrav. Jedná se o syntetické látky charakteru oximů, které jsou schopny reagovat s komplexem AChE-OF a obnovit aktivitu enzymu. Představitelé této skupiny látek se liší počtem pyridiniových kruhů a polohou oximové skupiny, nejčastěji se dělí podle počtu dusíkových iontů na monokvarterní a biskvarterní. Starší generaci zastupují pralidoxim, trimedoxim, methoxim, obidoxim (Bajgar, 2004), nověji se vyrábějí tzv. H-oximy (HI-6, HLö-7) (Kassa et Cabal, 1999). Snaha o zlepšení terapie otrav OF vede k vývoji dalších oximů, jak je např. BI-6 a další, které se však zatím neujaly v humánní medicíně.

2.3 Toxikologické a klinické aspekty otravy OF

Prvotní mechanismus toxického působení OF je inhibice AChE. Enzym je zablokován na esteratickém místě ireverzibilním mechanismem fosforylace. Následkem toho se na synapsích kumuluje nerozložený ACh a jeho zvýšená nabídka pro nikotinové a muskarinové

receptory je doprovázena centrálními i periferními parasymptomimetickými příznaky a svalovými křečemi (Bajgar, 2005). Za hlavní rozdíl působení G-látek a V-látek lze označit odlišný účinek na CNS a na PNS a svalovinu. V-látky procházejí HEB jen pomalu a patrně proto se uplatňují v periférii na nervosvalové ploténce výrazněji než v CNS (Shih et al., 2005). Při vzniku křečí se předpokládá účast dalších excitačních neurotransmiterů (Bajgar, 2005). Morfologické poškození nervové tkáně je zprostředkováno aktivací NMDA receptorů, které jsou přítomny na glutamatergických neuronech. Nadměrné vyplavení glutamátu vede k silnému nahromadění vápníku v neuronech a k neuronální smrti (Bajgar, 2006). Kromě účinku OF na nervový a svalový systém lze popsat další toxické účinky OF (stresogenní, imunitní atd.) (Kassa, 1998; Bajgar, 2004; Bajgar, 2005; Marrs et al., 1996).

Histopatologické změny při otravě OF se popisují v řadě orgánů. Jsou nespecifické, k podobnému poškození dochází při otravě jinými látkami. Histochemické změny vyplývají z výše popsaného mechanismu inhibice cholinesteráz v mozku a dalších tkáních a orgánech. Tato inhibice není rovnoměrná ve všech jádrech mozku, a není ani shodná pro všechny druhy OF a NPL. Tuto heterogenitu lze částečně vysvětlit přítomností izoenzymů a jejich různou citlivostí k jednotlivým NPL (Bajgar et Patočka, 1979). Z toxikologického pohledu je upřednostňován poznatek, že kritickou hodnotu představuje snížení aktivity AChE v pontomedulární retikulární formaci pod 5% (Bajgar, 1991; Bajgar, 2004).

Toxikokinetika OF je rozdílná dle typu organofosfátu. V cílové tkáni účinkuje 1-50% dávky, přičemž ztráty vznikají při resorpci, transportu a metabolizaci. Metabolizace probíhá především jako detoxikace v játrech, naproti tomu oxidace některých OF toxicitu ještě zvyšuje. Jako depo se může ukládat OF i jeho oxidovaný metabolit a způsobit druhou vlnu intoxikace, což je typické pro malathion (Bajgar, 1985). U somanu bylo prokázáno, že na toxickém efektu se podílí 1-3% podané dávky. Ztráty při průchodu organismem se přičítají zejména vazbě na plazmatickou BuChE a erythrocytární AChE a detoxikaci v játrech, plazmě a patrně i v plicích. Do mozku se soman dostává snadno díky své lipofilitě. U somanu jako u jediné NPL bylo prokázáno vytváření depa.

V terapii otravy OF jsou používány dva základní terapeutické principy. Anticholinergika antagonizují efekt kumulovaného ACh na synapsích a reaktivátory cholinesteráz reaktivují inhibovanou AChE. Používá se zejména atropin, případně benactylin, který má lepší centrální účinek (Kassa et al., 1996; Kassa et Samnaliev, 2004). Reaktivátory AChE pocházejí ze skupiny oximů, užívají se monokvarterní i biskvarterní oximy. Představitelé této skupiny jsou jmenovány v předchozím textu. Další možné terapeutické postupy zahrnují antikonvulzivní terapii, použití tzv. vychytávačů OF, výplach žaludku,

resuscitaci, apod. (Bajgar, 1985; Bajgar, 2006).

K profylaktické ochraně molekuly AChE v organismu se používá podání reverzibilních inhibitorů cholinesteráz nebo karbamátů, případně vychytávačů OF a také profylaktické dávky reaktivátorů AChE. V praxi je nejvíce používán pyridostigmin. Jeho vedlejší účinky lze nejlépe omezit kombinací s anticholinergiky, užívaná je zejména kombinace pyridostigminu s benactyzinem a trihexyfenidylem (preparát PANPAL) (Bajgar, 1985; Bajgar, 2006). Z reaktivátorů je pro tento účel nejlepší HI-6 s prodlouženou dobou působení (Doležal et al., 1988; Bajgar, 2004). Výhodou použití vychytávačů OF je absence vedlejších účinků, proto podání BuChE je jedním z nejvýhodnějších profylaktických postupů (Bajgar, 2004; Doctor, 2003).

2.4 Použitelnost antidot

Z experimentů in vitro i in vivo vyplývá, že látka HI-6 je z ověřených reaktivátorů nejúčinnější při léčebné dávce i při profylaktickém užití, přičemž při profylaxi je prakticky jediná účinná pro expozici supraletálních dávek sarinu, somanu a IVA (Kassa et al., 1997). V případě intoxikace tabunem jsou však H-oximy jsou málo účinné vlivem tvaru své molekuly. Nejsilnějším reaktivátorem zde zůstává obidoxim či méně užívaný trimedoxim (Kuča et al., 2005; Kassa, 2004). Žádný z klinicky i experimentálně užívaných oximů tedy není dostatečně efektivní při otravě jakoukoliv NPL, tzn. že dosud neexistuje žádný širokospektrý reaktivátor použitelný v bezpečné dávce (Dawson, 1994; Bajgar, 2004).

Účinná koncentrace oximů v mozku by měla být 10^{-4} až 10^{-5} M, aby zabezpečila dostatečnou reaktivaci inhibované AChE, zejména v pontomedulární oblasti. Oximy však díky své struktuře kvarterních pyridiniových solí velmi špatně penetrují přes intaktní HEB. To znamená, že pro dosažení potřebné koncentrace v mozku by byla potřeba extrémně vysoké plazmatické koncentrace. Je prokázán vstup oximů do CNS za určitých podmínek, pravděpodobným mechanismem je poškození HEB organofosfáty při otravě (Petrali et al., 1991). Tato problematika se stále zkoumá (Eyer, 2003).

Cílem toxikologů v současnosti je tedy vyvinout 1) reaktivátor AChE, který by měl co nejlepší účinek proti somanu, jehož komplex s AChE rychle dealkyluje, 2) reaktivátor AChE, který by byl univerzální vůči všem známým NPL.

2.5 Laboratorní metody průkazu aktivity AChE

Při histochemickém průkazu AChE jsou nejpoužívanější metody s acetylthiocholinjodidem - dvouetapová metoda Koelle-Friedenwald nebo přímá metoda

Karnovsky–Roots. Thiocholin uvolněný činností enzymu redukuje ferrikyanid na ferrokyanid, ten s Cu^{2+} ionty vytvoří nerozpustný hnědý ferrokyanid měďnatý (Karnovsky et Roots, 1964; Lojda et al., 1979).

K detekci AChE aktivity se převážně používají biochemické metody, které nepodávají informaci o přesnější lokalizaci enzymu v tkáni, ale které jsou vhodné pro kvantifikaci. V případě AChE je nejrozšířenější metoda dle Ellmana, jež je hodnocena spektrofotometricky (Ellman et al., 1961).

Protože biochemické metody prokazují aktivitu enzymu po homogenizaci tkáně a neumožňují přesně určit jeho lokalizaci, hledají se v posledních letech metody, které by dokázaly přesně kvantifikovat aktivitu enzymu na mikroskopickém preparátu. Rozvoj digitálního záznamu obrazu umožnil i rozvoj těchto metod. Při porovnávání aktivity vzorku s kontrolním vzorkem je samozřejmě potřeba dodržet stejné podmínky, které mají vliv na intenzitu zbarvení: standardní tloušťku řezů, dobu a druh fixace, koncentraci substrátů, inkubační dobu a teplotu. Při dodržení uvedených podmínek lze dosáhnout výborné korelace mezi histochemickými a biochemickými výsledky (Hammond et al., 1996).

Úskalí kvantitativní histochemie spočívají v několika limitujících faktorech metody, které ji znevýhodňují proti biochemickým metodám:

- 1) část molekul enzymu, která není ve tkáni pevně fixována, je při přípravě preparátu vymyta a nemůže se proto uplatnit při měření aktivity enzymu;
- 2) příprava preparátu fixačními činidly může snížit aktivitu enzymu;
- 3) omezení přístupu substrátu biologickými membránami nebo i tloušťkou řezu. Též při vysoké aktivitě enzymu ve vzorku může vznikající sraženina bránit substrátu v přístupu k enzymu;
- 4) v histochemii jde především o lokalizaci enzymu, často na úkor optimálních podmínek pro enzymatickou reakci. To platí i o koncentraci substrátu, která na rozdíl od biochemických vyšetření nerespektuje vždy kinetiku 0. řádu, to znamená, že ne vždy je zcela využita štěpná schopnost enzymu. Oproti tomu při biochemickém vyšetření je respektována kinetika 0. řádu, to znamená, že aktivita enzymu, která je vyjádřena příbytkem produktu za časovou jednotku, je úměrná koncentraci aktivního enzymu (Lojda, 1970).

Metody, jež kvantifikují histochemický preparát, pracují s digitálním obrazem, který je složen z bodů (pixelů). Každému pixelu přísluší určitá hodnota jasu. Při snímání obrazu intenzita světla dopadajícího na senzor digitálního snímače je nepřímě úměrně převáděna na napětí, tato hodnota je potom přiřazena každému pixelu rovnoměrně pomocí 256-tistupňové škály. Standardně se užívá stupnice jasu o 256 stupních (toto číslo je dáno informací o

velikosti 8 bitů) u černobílých obrazů. Pojmem černobílý obraz je myšlen obraz odstupňovaný šedí, nikoliv takový, který je tvořen jen černou a bílou složkou (Hozman et al., 2006).

Ke kvantifikaci histochemických metod je možno použít složité i relativně jednoduché systémy s podobnými výsledky (Ruiz-Torner et al., 2001; Ma et al., 2001; Hammond et al., 1996). Citovaní autoři se shodují, že histochemie AChE v mozku je dostatečně vhodná pro seriózní kvantitativní vyšetření včetně posouzení toxického efektu.

3. Cíle práce

1) Vypracovat vlastní metodiku kvantitativního stanovení acetylcholinesterázy v CNS a prokázat správnost získaných výsledků korelací s biochemickým vyšetřením prováděným na Fakultě vojenského zdravotnictví UO.

2) Popsat a kvantitativně vyhodnotit změny v aktivitě AChE po působení základních představitelů nervově paralytických látek na vybraná mozková jádra při akutní otravě.

3) Využít metodu k ověření profylaktického účinku huperzinu A proti NPL.

4) Kvantitativní histochemií prokázat účinek standardně používaných i aktuálně vyvíjených antidot na reaktivaci acetylcholinesterázy atakované tabunem s podrobným popisem obrazu inhibovaných mozkových oblastí.

5) Vyšetřit aktivitu AChE v těch jádrech retikulární formace, která jsou dle současné literatury považována za součást komplexu dýchacích center v oblongatě.

6) Na základě reaktivity AChE v různých částech mozku se pokusit vyvodit závěr o průchodu reaktivátorů hematoencefalickou bariérou.

7) Prostudovat účinek všech zmíněných látek na nervosvalovou ploténku bránice.

4. Materiál a metody

4.1 Základní metodika

Nervově paralytické látky dodal Vojenský technický ústav v Brně. Použité látky ze skupiny oximů byly syntetizovány na katedře toxikologie FVZ. Inhibice AChE v mozku a na nervosvalové ploténce bránice byla studována histochemicky na zvířecím modelu laboratorního potkana (Wistar, hmotnost 200-220 g). Zvířata byla otrávena vždy LD₅₀ agens i.m., v případě pokusů s antidoty a profylaktikem dávkou 1,2 x LD₅₀, kontrolní skupině byl

aplikován fyziologický roztok. Přeživší jedinci byli po 30 minutách usmrceni. Po dekapitaci byly vyjmuty mozky, příčně překrojeny na 2–4 části a rychle zamraženy a bez fixace krájeny na kryostatu na frontální řezy o tloušťce 20 μm . Po fixaci 1 min v parách formolu a 5 min v Bakerově roztoku byly řezy kultivovány k detekci AChE a alkalické fosfatázy (AP).

Histochemické vyšetření spočívalo v simultánní histochemické detekci AChE dle Karnovskyho a Rootse v úpravě Lojdy (Lojda, 1970) s detekcí AP. Pro orientaci v mozkové tkáni jsme ke každému řezu určenému na histochemické vyšetření provedli vždy sousední řez pro základní histologické barvení hematoxylinem a eosinem.

Výsledky byly hodnoceny a dokumentovány v mikroskopu Olympus BX51 s CCD kamerou napojenou na počítač s 20-ti palcovým LCD monitorem a se software QuickPhoto Micro 2.2. Pro identifikaci a ohraničení mozkových struktur jsme užívali všeobecně užívané atlasy potkaního mozku od G. Paxinose (Paxinos et Watson, 1987). Kvantifikace nálezu byla provedena jednoduchou digitální analýzou obrazu – převedením barevného obrazu do 256 stupňů šedi, manuálním ohraničením zvolené oblasti a měřením průměrné density pixelu v ohraničených oblastech. Digitální analýza obrazu byla prováděna pomocí grafického software 3D-Doctor společnosti Able Corporation. Statistické rozdíly v aktivitě AChE byly evaluovány t-testem.

4.2 Vliv tloušťky řezu, délky fixace a koncentrace substrátu na denzitu pixelu

Po usmrcení jednoho zdravého laboratorního potkana jsme vyjmuli mozek a rychle jej nechali zamrazit. Pro hodnocení jsme použili řezy z přední poloviny mozku, kde jsme vyšetřovali kortex a striatum. Obě struktury byly podrobeny histochemickému vyšetření, při kterém jsme vždy měnili jednu z podmínek přípravy preparátu. Nejprve jsme vyrobili sérii řezů o tloušťce 10 μm , 14 μm , 16 μm a 20 μm . K fixaci jsme použili Bakerův roztok, jak je uvedeno v základní metodice. Provedli jsme hodnocení na řezech po fixaci trvající 5 minut, 10 minut, 20 minut a 30 minut. Pro posouzení vlivu koncentrace substrátu jsme preparáty nechali inkubovat v médiu s plnou navázkou substrátu dle Lojdy anebo v médiích, která obsahovala 80%, 65% či 50% předepsaného množství substrátu. U každé varianty jsme na 3 řezech hodnotili průměrnou denzitu pixelu v ohraničených oblastech.

4.3 Korelace s biochemickým stanovením

Laboratorní zvířata byla otrávena dávkou LD₅₀ sarinu, somanu a VX-látky i.m. Kontrolní skupině byl aplikován pouze fyziologický roztok. Ve všech skupinách byli vždy 4

jedinci. Všechna pokusná zvířata byla po 30 minutách usmrcena a podrobena proceduře, která je popsána výše v části 4.1 Základní metodika.

Biochemické vyšetření metodou dle Ellmana v úpravě podle Bajgara (Ellman et al., 1961; Bajgar, 1972) prováděla laboratoř na Katedře toxikologie FVZ UO. Hodnoty aktivity jsou vyjádřeny jako μmol hydrolyzovaného substrátu/60min/kg vlhké tkáně a jako % kontrolních hodnot. K částem mozku, odebíraným k biochemickému vyšetření, jsme přiřadili histochemické preparáty v těchto oblastech či jádrech v uvedených úrovních mozku:

- amygdala – nucleus centralis amygdalae, nc. lateralis, nc. basolateralis, nc. basomedialis, nc. medialis a nc. posterolateralis corticalis, na řezu 2,8 mm dorzálně od bregmatu;
- frontální kortex – oblasti F1, F2, F3 v úrovni 2,2 mm rostrálně od bregmatu;
- dorzální septum – dorzální a intermediální část laterálního septálního jádra, v úrovni bregmatu;
- hypothalamus – jednostranně oblast zahrnující ventromediální a dorsomediální hypothalamická jádra, nucleus perifornicalis, nc. arcuatus, nc. periventricularis, nc. supraopticus, tuber cinereum, area hypothalamica dorsalis et lateralis, na řezu 2,8 mm dorzálně od bregmatu;
- hippocampus – oblasti CA1, CA2, CA3 a gyrus dentatus zastižený v úrovni 3,5 mm dorzálně od bregmatu;
- mediální thalamus – párově nuclei mediodorsales, intermediodorsales, paraventriculares, paracentrales, centrales mediales et centrolaterales, 2,8 mm dorzálně od bregmatu;
- pontomedulární oblast – nc. gigantocellularis retikulární formace na řezu 13 mm dorzálně od bregmatu;
- striatum – komplex nc. caudatus – putamen, v úrovni bregmatu.

Vzdálenosti od bregmatu a terminologie jader jsou citovány z atlasu potkaního mozku autorů Paxinose a Watsona (Paxinos et Watson, 1987).

Každá vyšetřovaná oblast mozku byla hodnocena na třech sousedních řezech z jednoho zvířete. Celkem jsme tedy z každé definované oblasti získali dvanáct výsledků.

4.4 Inhibice acetylcholinesterázy G-látkami

Laboratorní potkani byli otráveni LD_{50} tabunu, somanu nebo sarinu i.m., kontrolní skupině byl aplikován fyziologický roztok. V každé skupině byli zahrnuti 3 jedinci. Další postup byl shodný s postupem uvedeným v základní metodice.

4.5 Inhibice acetylcholinesterázy V-látkami

Laboratorní potkani byli otráveni LD₅₀ VX, respektive RVX i.m., kontrolní skupině byl aplikován fyziologický roztok. V každé skupině byli zahrnuti 3 jedinci. Další postup byl shodný s postupem uvedeným v základní metodice.

4.6 Protektivní účinek huperzinu A

Laboratorní potkani byli rozděleni do následujících skupin:

- 1) Soman: potkanům bylo aplikováno 0,1 ml/kg fyziologického roztoku i.p. a po 30 minutách 1,2 x LD₅₀ somanu i.m. Přežila-li zvířata 30 minut po aplikaci somanu, byla usmrcena a podrobena histochemickému vyšetření.
- 2) RVX: potkanům bylo aplikováno 0,1 ml/kg fyziologického roztoku i.p. a po 30 minutách 1,2 x LD₅₀ RVX-látkou i.m. Přeživší zvířata byla usmrcena 30 minut po podání RVX.
- 3) Huperzin A: zvířatům byl aplikován i.p. huperzin A v dávce 500 µg/kg a 30 minut poté i.m. fyziologický roztok. Usmrcení bylo provedeno 30 minut po aplikaci fyziologického roztoku.
- 4) Huperzin + soman: byl podán huperzin A 500 µg/kg i.p. a po 30 minutách 1,2 x LD₅₀ somanu i.m. Po dalších 30 minutách byla zvířata utracena.
- 5) Huperzin A a RVX: aplikován byl huperzin A 500 µg/kg i.p. a po 30 minutách 1,2 x LD₅₀ RVX i.m. Po dalších 30 minutách byla zvířata utracena.
- 6) Kontrola: kontrolní skupině bylo aplikováno 0,1 ml/kg fyziologického roztoku i.p. a po 30 minutách stejná dávka i.m. Zvířata byla utracena 30 minut po poslední aplikaci.

V každé skupině byla 3 zvířata určená pro histochemické vyšetření a hodnocení dle popisu v části 4.1 Základní metodika.

4.7 Účinek antidot při otravě tabunem

Laboratorní potkani byli rozděleni do následujících skupin:

- 1) Tabun: potkani byli intoxikováni 1,2 x LD₅₀ tabunu i.m. a po 1 minutě byl aplikován fyziologický roztok.
- 2) Tabun + HI-6: potkani byli intoxikováni 1,2 x LD₅₀ tabunu i.m. a po 1 minutě byl aplikován roztok s 21 mg/kg atropinu a 39 mg/kg HI-6 Cl i.m.
- 3) Tabun + obidoxim: potkani byli intoxikováni 1,2 x LD₅₀ tabunu i.m. a po 1 minutě byl aplikován roztok s 21 mg/kg atropinu a 7,5 mg/kg obidoximu i.m.
- 4) Tabun + K048: potkani byli intoxikováni 1,2 x LD₅₀ tabunu i.m. a po 1 minutě byl aplikován roztok s 21 mg/kg atropinu a 46 mg/kg K048 i.m.
- 5) Kontrola: kontrolní skupině byl aplikován pouze fyziologický roztok.

V každé skupině byli 3 jedinci. Všechna zvířata ve všech pokusných skupinách přežila 30 min, po té byla usmrcena a byl jim odebrán mozek a bránice k histochemickému vyšetření.

4.8 Vyšetření jader respiračního centra

Abychom zjistili aktivitu AChE v respiračních centrech oblongaty při použití různých kombinací látek, měřili jsme denzitu pixelu v místech, která literatura popisuje jako tzv. ventrální respirační skupinu (ventral respiratory group, VRG) (Chitravanshi et Sapru, 1999). K tomuto účelu jsme použili archivované snímky z předchozích experimentů s profylaktikem a s antidoty. Oblast byla měřena ventrálně od nc. ambiguus v těchto úrovních řezů:

- kaudální VRG (cVRG) 13,80 mm dorzálně od bregmatu;
- rostrální VRG (rVRG) 13,30 mm dorzálně od bregmatu;
- pre-Bötzingerův komplex 12,80 mm dorzálně od bregmatu;
- Bötzingerův komplex 12,30 mm dorzálně od bregmatu.

4.9 Reaktivace AChE v blízkosti cirkumventrikulárních orgánů

Abychom zjistili, zda v tzv. cirkumventrikulárních orgánech nedochází k prostupu oximů z likvoru či krevního řečiště do mozkové tkáně, sledovali jsme reaktivaci AChE v okolí těchto orgánů. Měřili jsme denzitu pixelu na archivovaných snímcích z preparátů z pokusu s antidoty. Použili jsme preparáty z kontrolní skupiny, skupiny otrávené tabunem, skupiny s kombinací tabun + látka HI-6 a ze skupiny s kombinací tabun + obidoxim. Hodnotili jsme řezy v těchto úrovních:

- organum vasculosum laminae terminalis (OVLТ), 0,30 mm dorzálně od bregmatu;
- eminentia mediana, 3 mm dorzálně od bregmatu;
- organum subfornicale, 4,80 mm dorzálně od bregmatu.

Ve všech případech jsme měřili denzitu pixelu v bezprostředním okolí orgánu (0,1 mm), dále mezikruží ve vzdálenosti 0,1 – 0,2 mm, 0,2 – 0,3 mm, 0,3 – 0,4 mm a 0,4 – 0,5 mm. V takto definovaných zónách jsme sledovali, zda dochází k vzestupu gradientu denzity pixelu směrem k cirkumventrikulárnímu orgánu.

4.10 Histochemické preparáty bránice

Pro demonstraci účinku látek na periferní nervový systém jsme z každého zvířete, které bylo vyšetřované na aktivitu AChE v mozku, odebrali bránici. Bránice byla kultivována v celku k detekci AChE, postup inkubace byl stejný jako pro mozkové řezy.

5. Výsledky

5.1 Vliv tloušťky řezu, délky fixace a koncentrace substrátu na denzitu pixelu

Z měření vyplývá, že tloušťka histochemického preparátu zřetelně ovlivňuje snímanou denzitu pixelu (striatum: tloušťka 10 μm – denzita pixelu 132,3, tloušťka 20 μm – denzita pixelu 71,4). Koncentrace substrátu je rovněž faktor, který ovlivňuje tmavost preparátu a tím i denzitu pixelu v digitálním obrazu (striatum: 100 % substrátu – denzita pixelu 64,9, 50 % substrátu – denzita pixelu 88,5). Doba fixace je ze třech zkoumaných faktorů tím nejméně významným, v případě mozkové kůry nemůžeme výsledek označit za prokazatelné zvýšení optické denzity (kortex: fixace 5 min – denzita pixelu 152,0, fixace 5 min – denzita pixelu 156,5).

5.2 Korelace s biochemickým pokusem

Naměřené hodnoty denzity pixelu jsme ve všech skupinách odečetli od 256. Tento odečet převádí hodnoty tak, aby vyšší číslo znamenalo vyšší tmavost obrázků a tím přeneseně vyjadřovalo vyšší aktivitu enzymu. Linearita této stupnice je přitom zachována. Kontrolním hodnotám jsme po té přiřadili 100%, hodnoty získané z ostatních skupin jsme dali do poměru k výsledkům kontrolní skupiny. Výsledky biochemického měření v $\mu\text{mol}/60 \text{ min}/\text{kg}$ jsme též vyjádřili jako % z kontrolní skupiny. Procentuální výsledky získané oběma metodami byly porovnány a podrobeny korelaci. Rovnice byla vypočtena jako $y = 0,9746x - 1,959$; $R^2 = 0,8626$. Korelaci hodnotíme jako dobrou.

5.3 Inhibice acetylcholinesterázy G-látkami

Histochemický obraz byl podrobně popsán v dizertační práci. Nejsilnější aktivita AChE v mozku v kontrolní skupině je přítomna ve striatu, bazolaterálních jádrech amygdaly, thalamických jádrech nucleii reticularis, laterodorsales et anteroventrales, motorických jádrech hlavových nervů, nucleii pontis, dorzálních a laterodorzálních jádrech tegmenta a nc. accumbens. V ostatních experimentálních skupinách (soman, sarin, tabun) byly všechny měřené hodnoty signifikantně odlišné od kontrolní skupiny ($p < 0.05$). Soman a tabun způsobily silnější inhibici AChE v mozku než sarin. Stejná jádra, která měla silnou aktivitu AChE v kontrolní skupině, si zachovala střední aktivitu po otravě G-látkami, čímž dominovala v obrazu inhibované mozkové tkáně. G-látky obecně vytvářejí v mozkové tkáni ložiska inhibice aktivity AChE, která se střídají s ložisky zbytkové aktivity. Tím se poněkud

stírá ohraničení jader oproti distribuci AChE v kontrolní skupině, též linie vyšší aktivity v lamina pyramidalis hippocampi a stratum granulare mozečkové kůry se stává méně zřetelnou.

Aktivita alkalické fosfatázy ve vyšetřovaných vzorcích byla silná v endoteliích, v area postrema a v epifýze, velmi silná v plexus choroideus mozkových komor. Její aktivitu neovlivnila žádná z podaných látek.

5.4 Inhibice acetylcholinesterázy V-látkami

Histochemický obraz byl podrobně popsán v dizertační práci. Všechny měřené hodnoty v obou experimentálních skupinách (s výjimkou RVX v oblasti frontálního kortexu) byly signifikantně rozdílné od kontrolní skupiny ($p < 0.05$). Ve většině struktur CNS byla zjištěna vyšší inhibice při použití LD_{50} G-látek než V-látek. Otrava RVX látkou měla velmi podobný histochemický obraz jako otrava látkou VX, výsledek se lišil nižší celkovou inhibicí mozkové AChE. V případě otravy V-látkami nebyly pozorovány ložiskovité výpadky aktivity AChE v jádrech, na rozdíl od G-látek.

5.5 Protektivní účinek huperzinu A

Po podání samotného huperzinu A jsme našli histochemický obraz velmi podobný kontrolnímu vzorku. Došlo pouze k mírnému snížení aktivity AChE. K nejsilnější inhibici AChE došlo v oblasti frontálního kortexu (zbylá aktivita přibližně 70%). Nejvíce rezistentní strukturou vůči působení huperzinu se ukázal nc. ruber. Podání somanu vedlo k silné inhibici AChE ve všech vyšetřovaných strukturách s výjimkou nucleus ruber, kde byla inhibice jen přibližně 25%. V ostatních oblastech mozku byla po použití somanu prokázána aktivita AChE od 28 do 40%. Ve srovnání se skupinou intoxikovanou somanem bez předléčení, došlo při předléčení huperzinem A k statisticky významnému zvýšení aktivity ve všech vyšetřovaných oblastech, nejvíce v oblasti dorzálního septa, v ncl. gigantocellularis, v thalamu a hypothalamu. Profylaktický účinek huperzinu A u RVX byl slabší, v případě některých jader dokonce téměř nulový (nc. gigantocellularis retikulární formace, nc. ruber). Podrobný popis histochemického obrazu je ve vlastní dizertační práci.

5.6 Účinek antidot při otravě tabunem

Kombinace podání tabunu a antidot vedla v případě HI-6 a obidoximu ke zvýšení aktivity AChE oproti skupině s tabunem. K signifikantnímu zvýšení došlo ve všech kvantifikovaných oblastech kromě frontálního kortexu v případě HI-6 a mediálního thalamu

v případě obidoximu. Naproti tomu ve skupině s antidotním podáním K048 se intenzita zbarvení při detekci AChE příliš nelišila od obrazu otravy tabunem a v řadě oblastí nedošlo ke statisticky prokazatelnému zvýšení aktivity (hypothalamus, retikulární formace). V případě všech tří kombinací jsme našli nehomogenní rozložení aktivity s ložiskovými výpadky, podobně jako byly popsány při otravě G-látkami.

5.7 Vyšetření jader respiračního centra

Aktivita AChE ve vyšetřovaných oblastech mírně převýšila aktivitu v okolní retikulární formaci. Výsledky získané kvantifikací jednotlivých částí VRG svým poměrem ke kontrolní skupině odpovídají inhibici v retikulární formaci.

5.8 Reaktivace AChE v blízkosti cirkumventrikulárních orgánů

V žádné ze tří oblastí jsme nenalezli nárůst aktivity AChE, který by svědčil pro lokálně zvýšenou prostupnost oximů a zvýšenou reaktivaci AChE v okolí cirkumventrikulárních orgánů.

5.9 Histochemické změny na bránici

Na nervosvalových ploténkách bránice jsme našli v případě intoxikace somanem, tabunem, sarinem, VX látkou i RVX silný úbytek aktivity AChE. Mezi působením G-látek a V-látek není zřetelný rozdíl. Při kombinaci profylaktického podání huperzinu A a somanu má oblast terminální ploténky aktivitu srovnatelnou s kontrolní skupinou. Podobnou intenzitu aktivity lze sledovat též u kombinace tabunu a obidoximu. Po aplikaci samotného Huperzinu A zbyla na nervosvalové ploténce překvapivě slabá aktivita AChE. Výsledky získané naší metodou nelze přesněji kvantifikovat, můžeme se proto omezit pouze na toto slovní hodnocení.

6. Diskuze

6.1 Metoda

Histochemie je obvykle hodnocena pouze okem vyšetřujícího, semikvantitativně v několika stupních. Hodnocení obrazu pouhým okem je málo přesné (oko není schopno postihnout velkou škálu tmavosti) a subjektivní. Navíc hodnotící osoba i při nejlepší snaze podléhá optickým klamům (stejná struktura na tmavém pozadí vypadá světleji než na světlém pozadí). Z toho důvodu považujeme za oprávněnou snahu kvantifikovat histochemické nálezy

objektivní metodou pomocí počítačové digitální analýzy obrazu. Literatura potvrzuje, že acetylcholinesteráza je vhodným enzymem pro takovou analýzu. Otázka spolehlivosti a úskalí kvantifikace histochemických preparátů je diskutována v literárním přehledu.

Z důvodů korelace s biochemickým vyšetřením prováděným na Katedře toxikologie FVZ UO v Hradci Králové jsme metodu upravili ve třech následujících bodech:

1) Metoda se substrátem acetylthiocholinem detekuje především aktivitu acetylcholinesterázy, ale náležitého zpřesnění výsledků bychom dosáhli použitím selektivních inhibitorů BuChE. Tyto látky jsou dostupné, jejich použitím by však došlo k odlišnosti od protokolů používaných na katedře toxikologie. Pracovní skupina na hradecké toxikologii ve svých protokolech nepoužívá supraselektivní inhibitory BuChE k odstranění falešně pozitivní aktivity, neboť na základě dlouhodobých zkušeností považuje aktivitu BuChE v mozku za zanedbatelnou, kolem 5% celkové aktivity cholinesteráz (Bajgar, 2004). Výsledky histochemického vyšetření tedy prezentujeme s určitou nepřesností jako aktivitu AChE.

2) Ohraničení jader mozku použitých pro kvantifikaci nálezu vycházejí z potřeby porovnat výsledky naší metody s výsledky biochemického vyšetření. Výběr částí mozku pro biochemické vyšetření zahrnuje takové oblasti, které reprezentují hlavní cholinergní systémy (septum, thalamus, hippocampus), případně jsou navíc vyjímečně významné svou fyziologickou funkcí (kortex, retikulární formace). Zároveň musí být možno izolovat je z mozku pro biochemické vyšetření. Tyto části mozku jsou oddělovány makroskopicky, přičemž oddělená oblast většinou zahrnuje více dílčích jader. Proto bylo potřeba pro kvantifikaci histochemického vyšetření předem stanovit polohu mikroskopických řezů a definovat jádra, která mají být do kvantifikace zahrnuta. Po podrobném studiu stereoskopického atlasu krysího mozku G. Paxinose jsme provedli jejich výběr tak, aby hodnocená oblast byla dostatečně reprezentativní a co nejvíce se blížila obsahu biochemicky vyšetřovaného homogenátu. Na těchto oblastech a skupinách jader mozku jsme poté prováděli statistické porovnání obou metod.

3) Použití statistiky komplikovala skutečnost, že jsme byli závislí na dodání intoxikovaných zvířat z Katedry toxikologie FVZ UO. Látky, se kterými se pracovalo, patří mezi nejprudší jedy vůbec, o jejich možném zneužití již bylo psáno. Tento unikátní materiál byl proto k dispozici jen v omezeném množství. Museli jsme se spokojit s třemi jedinci v každé skupině, aktivitu enzymu v mozkových jádrech jsme však posuzovali na větším množství řezů.

6.2 Intoxikace zvířat

Aplikované dávky NPL vycházely z údajů o střední letální dávce. Pro posouzení účinku G-látek a V-látek byla použita dávka $1 \times LD_{50}$, při pokusech s antidoty a profylaktikem byla dávka NPL zvýšena na $1,2 \times LD_{50}$. Střední letální dávka se vypočítává při akutní otravě, hodnotí se letální účinek do 2 hodin. Aplikované dávky antidot a profylaktik vycházejí rovněž z údajů o LD_{50} těchto látek. Při dávkách 2-10% LD_{50} antidota je zaručen potřebný reaktivační účinek a zároveň je podání antidota ještě bezpečné.

6.3 Výběr histochemické metody

K histochemické detekci aktivity AChE v nervové tkáni se v současnosti využívají prakticky výhradně metody Koelle-Friedenwald nebo Karnovsky-Roots. Mezi výsledky získanými oběma uvedenými histochemickými metodami není rozdíl (Hammond et al., 1996). Simultánní detekce AP a AChE je postup vyvinutý již dříve na našem pracovišti. Důvodem, proč prokazovat aktivitu AP, bylo odlišit aktivitu AChE v kapilárních endoteliích od neuronální AChE. Ověřili jsme si však nejdříve, že aktivita AP významně neovlivňuje CCD kamerou nasnímanou tmavost pixelů, dle které posuzujeme aktivitu AChE.

Literatura doporučuje jako optimální tloušťku 10-14 mikrometrů (Hammond et al., 1996; Ma et al., 2001). Zvolili jsme sílu řezů 20 mikrometrů proto, že jsme tloušťku řezů přizpůsobili práci se silnými inhibitory AChE a snažili jsme se postihnout rozdíly v této inhibici.

6.4 Vliv tloušťky řezu, délky fixace a koncentrace substrátu na denzitu pixelu

Z našeho měření vyplynulo, že optická denzita závisí na tloušťce preparátu a koncentraci substrátu. U oblastí s vysokou aktivitou AChE dochází ke ztrátám působením fixačního činidla. Toto zjištění je ve shodě s literaturou, podobná závislost byla sledována v práci Maa (Ma et al., 2001). Ačkoliv tento zdroj zároveň uvádí, že po pět týdnů nebyly sledovány změny v intenzitě zbarvení při pokojové teplotě, naše osobní zkušenosti byly jiné - již během 2 týdnů jsme zaznamenali pokles intenzity zbarvení, a to i v případě uchování na tmavém místě. Proto jsme hodnocení všech vzorků prováděli do dvou dnů od zamontování preparátů.

6.5 Korelace výsledků

Korelaci výsledků získaných histochemickou a biochemickou metodou hodnotíme jako dobrou. Korelace kvantitativní histochemie AChE a biochemické metody byla prováděna

v práci Maa (Ma et al., 2001) a bylo zde též dosaženo dobrého výsledku. Korelace výsledků nám vycházela dobře s výjimkou bazálních ganglií (striata). Striatum je místo nejvyšší aktivity AChE v mozku. Předpokládáme, že tato vysoká aktivita AChE mohla zhoršit podmínky pro substrátovou kinetiku na našich preparátech. Mechanismus by mohl být takový, že v oblasti striata vznikla sraženina v příliš velkém množství, které bránilo přístupu substrátu. Patrně k tomu výrazně přispěla i silnější tloušťka řezu, než jakou doporučuje literatura. Pokud se acetylthiocholin nedostal v plné míře k enzymu ve tkáni, nemohla být plně využita aktivita enzymu a výsledky z histochemických preparátů potom neodpovídají biochemickému měření.

6.6 Nález při otravě G-látkami a V-látkami

Pokud naše výsledky generalizujeme, při použití LD₅₀ inhibují v CNS nejvíce G-látky (zhruba v pořadí soman a tabun, méně sarin), méně VX a ještě méně RVX. Toto pořadí neodpovídá toxicitě, protože jsme ve všech případech používali LD₅₀ daného NPL, která je u V látek několikrát nižší než u G látek. Jinými slovy, srovnáváme účinek 15 µg/kg gramů V-látek a desetinásobné množství tabunu. Může to znamenat, že V-látky selektivně inhibují AChE v nějakém jádru, které je zodpovědné za přežití či letální účinek. Tuto domněnku nemůžeme zcela vyvrátit, ale při podrobném rozboru našich histochemických preparátů jsme si nepovšimli žádného jádra, kde by V-látky měly výrazně silnější inhibiční efekt než G-látky. Pravděpodobnější příčina je, že V-látky mají ještě jiný toxický účinek mimo CNS. Za tento toxický účinek může zodpovídat inhibice AChE v PNS, konkrétně na nervosvalové ploténce dýchacích svalů, což je v souladu s literárními údaji. Nelze ovšem vyloučit, že V-látky mají nějaký další mechanismus, kterým se projevuje toxicita a letalita agens. Takový účinek může být přisouzen RVX, která je oproti ostatním zástupcům NPL prezentovaným v této práci nejméně prozkoumána. Tato hypotéza může být podpořena i našim nálezem na bránici. V případě otravy RVX jsme při histochemickém vyšetření bránice in toto našli stále patrnou aktivitu AChE.

6.7 Výsledky profylaktického užití huperzinu A

Naše metoda byla použita pro testování profylaktického účinku huperzinu A. Huperzin A pochází z Číny, je přírodního původu a pro svůj centrální procholinergní účinek se v několika posledních letech v různých zemích testuje nebo používá k léčbě Alzheimerovy choroby. Zároveň je horkým kandidátem na zavedení do praxe jako profylaktikum proti otravě OF. Na rozdíl od pyridostigminu, který je v profylaxi pravděpodobně nejvíce

používaným inhibítorem AChE, je huperzin A selektivní inhibítor AChE a proniká přes HEB do centrální nervové soustavy. Další výhodou huperzinu A je, že je málo toxický, chrání neurony před toxickým účinkem glutamátu (Patočka, 1999) a má vysokou biologickou dostupnost při podání per os (Wang et al., 2006). Huperzin byl testován in vitro i in vivo a prokázal schopnost protekce vůči somanu (Lallement et al., 2002; Gordon et al., 2005; Wang et al., 2006).

Naše výsledky potvrzují příznivý efekt profylaktického podání huperzinu A při expozici somanu. V případě RVX je však profylaktický účinek huperzinu A v mozku slabší nebo žádný. Slabší efekt profylaxe u V-látek může souviset se skutečností, že též inhibiční účinek V-látek v CNS je slabší. Výsledky experimentů tedy ukazují, že huperzin A je nejen důležitý lék s uplatněním pro léčbu Alzheimerovy choroby, ale i látka s potenciálním využitím pro profylaxi proti G-látkám.

6.8 Výsledky použití antidot

Naše výsledky ukazují, že podání stanovené dávky obidoximu 1 minutu po intoxikaci tabunem ve většině jader mozku zvyšuje aktivitu AChE a má tedy dobrý účinek na reaktivaci enzymu. Podání látky HI-6 mělo podobný efekt, i když kvantitativně slabší. Na rozdíl od jmenovaných antidot, reaktivační účinek při použití látky K048 byl sporný. Nález u látky K048 jsou v protikladu s literaturou, která popisuje dobrý reaktivační účinek látky K048 při experimentální otravě tabunem in vitro a in vivo (Kassa, 2005). V našem experimentu se histochemický obraz při použití látky K048 v řadě oblastí mozku nelišil od morfologického obrazu neléčené otravy tabunem. Pro petrifikaci by však bylo potřeba provést pokus na větším množství experimentálních zvířat. Porovnání s biochemickými výsledky bohužel není k dispozici. U látky K048 jsme zaznamenali zvýšení aktivity AChE pouze ve frontálním kortexu, je tedy možné, že reaktivace AChE v kortexu zodpovídá za příznivý účinek antidota.

6.9 Vyšetření jader respiračního centra

Mezi částmi mozku více senzitivními k inhibítorům AChE mohou být oblasti funkčně důležité pro toxický efekt. Za takovou oblast se považuje retikulární formace v pontomedulární oblasti kmene, kde jsme prokázali silný účinek inhibitorů, stejně jako významný pokles inhibice při předléčení huperzinem či léčbě tabunové otravy obidoximem. Pontomedulární retikulární formace hraje významnou roli v dýchání, neboť se zde nalézá komplex respiračních center, která generují impulzy pro dýchací svaly. Pokles aktivity AChE v této oblasti po intoxikaci OF je pokládán za příčinu poklesu ventilace a rozvoje akutní

respirační insuficience vedoucí až ke smrti (Bajgar, 1991; Bajgar, 2004).

V posledních letech byla poodhalena poloha a zapojení jader respiračního centra. Vyčleňuje se pontinní respirační skupina a ventrální respirační skupina (VRG) v oblongatě. Do VRG se počítá v kraniokaudálním pořadí Bötzingerův komplex, rVRG a cVRG. Mezi Bötzingerovým komplexem a rVRG se nachází tzv. pre-Bötzingerův komplex, kde sídlí buňky, jež mají funkci pacemakeru a generují vzruchy pro dýchací svaly (Smith et al., 1991; Sun et al., 1998).

Zajímalo nás, zda některý z inhibitorů nebo reaktivátorů AChE nevykazuje selektivní účinek na komplex respiračních center, který by mohl přispět k objasnění působení NPL či vlivu léčebných látek na rozvoj akutní respirační insuficience. Neprokázáli jsme však žádnou změnu, která by naznačovala, že některá z vyšetřovaných látek při svém efektu přednostně účinkuje na určitou strukturu v komplexu medulárních respiračních center.

6.10 Reaktivace AChE v blízkosti cirkumventrikulárních orgánů

Cirkumventrikulární orgány jsou malé oblasti mozku lokalizované při stěnách III. a IV. mozkové komory. Jejich výjimečnost spočívá v přítomnosti propustných fenestrovaných kapilár a v úpravě HEB. Tato úprava slouží buď k detekci různých hormonů a cytokinů nebo naopak k jejich sekreci (Davson et Segal, 1996). Přesná poloha těchto orgánů je popsána v literatuře (Johnson et Gross, 1993; Fry et al., 2007), jednotlivé orgány jsou rovněž zakresleny v Paxinosově atlasu krysího mozku (Paxinos et Watson, 1987). Předpokládali, že by v těchto orgánech mohlo dojít ke zvýšenému průniku oximů do mozkové tkáně z cévního řečiště, případně z likvoru. Ačkoliv průchod oximů je nesmírně důležitý pro obnovu aktivity AChE v intoxikovaném mozku, jeho přesný mechanismus není dosud znám, uvádí se pouze narušení HEB organofosfáty (Petralsi et al., 1991). O průniku oximů do likvoru nejsou v dostupné literatuře informace. Je možné, že oximy se dostávají snadněji do likvoru než skrze HEB do mozkové tkáně a že z likvoru potom vstupují do mozku přes cirkumventrikulární orgány či ependym.

V našem experimentu jsme vyšli z předpokladu, že pokud by reaktivátory pronikaly ve zvýšené míře do mozku v cirkumventrikulárních orgánech, měla by být v okolí těchto orgánů vyšší reaktivace AChE, a to s gradientem v závislosti na vzdálenosti od vyšetřovaného orgánu. V okolí těchto orgánů jsme však žádný zjevný nárůst aktivity AChE nepozorovali. V okolí eminentia mediana byla aktivita AChE zvýšená přítomností *nc. arcuatus*

hypothalamu, tento nále z však nepovažujeme průkaz pronikání oximu cestou eminentia medialis.

6.11 Možnosti dalšího pokračování práce

V našich experimentech jsme pracovali pouze se vzorky ze zvířat po otravě střední letální dávkou NPL nebo 1,2 x LD₅₀. LD₅₀ je modelová dávka pro akutní otravu. Histochemický obraz by se však pravděpodobně lišil se změnou dávky a mohl by mít jinou výpovědní hodnotu o účincích NPL. Pokus by tedy bylo možno rozšířit o změnu dávky jedů či navození chronické otravy. Nabízí se provést kvantifikaci histochemie se subkonvulzivní dávkou (do 0,5x LD₅₀) či naopak supraletální dávkou (2x LD₅₀). Také bychom mohli sledovat vývoj inhibice AChE v čase. Usmrcením zvířat po 5 minutách, 10 min apod. by bylo možné sledovat histochemickou metodou vývoj inhibice AChE v mozku při akutní otravě i při předlčení akutní otravy. Neméně přínosná by byla studie, při níž by byl sledován časový vývoj obnovy aktivity AChE v mozkových jádrech při subletální dávce NPL.

7. Závěry

1) Naše metoda kvantitativní histochemie prokázala dobrou korelaci se standardním biochemickým stanovením AChE v mozkové tkáni. Umožňuje však také posoudit histochemické změny in situ.

2) Střední letální dávky NPL snižují aktivitu AChE ve studovaných strukturách CNS, což odpovídá klinickému obrazu respirační insuficience. K velmi silné inhibici AChE dochází zejména při použití G látek. V-látky inhibují mozkovou AChE méně než G-látky, což platí zejména pro RVX látku. Při použití LD₅₀ inhibují v CNS nejvíce soman a tabun, méně sarin, VX a ještě méně RVX. Inhibice AChE v mozkových jádrech a oblastech není uniformní pro žádnou ze zkoumaných NPL. Byly pozorovány značné rozdíly mezi inhibicí AChE v mozkových jádrech po použití LD₅₀ VX, nebo RVX, ačkoliv obě látky mají podobnou chemickou strukturu a fyzikálně chemické vlastnosti.

3) Samotný huperzin A mírně snižuje aktivitu AChE, jeho profylaktické užití má za následek zmírnění inhibice AChE, ale zdá se být vhodným k použití hlavně pro G látky. Profylaktický účinek huperzinu A při intoxikaci RVX je slabší nebo žádný.

4) Prokázali jsme reaktivační účinek obidoximu při otravě tabunem a rovněž méně silný účinek látky HI-6. V případě látky K048 při otravě tabunem jsme prokázali jen slabý nebo žádný reaktivační účinek.

5) Neprokázali jsme, že by některá z vyšetřovaných látek při svém účinku přednostně inhibovala nebo reaktivovala AChE v některém z medulárních respiračních center.

6) V žádné ze sledovaných oblastí jsme nesledovali nárůst aktivity AChE, která by svědčila ve zvýšenou prostupnost oximů a zvýšenou reaktivaci AChE v okolí cirkumventrikulárních orgánů.

7) Vyšetření bránice ukázalo pokles aktivity AChE při otravě nervově paralytickými látkami oproti kontrolnímu vzorku. Výsledky dále potvrzují příznivé působení huperzinu A při expozici somanu a účinnost léčby obidoximem při otravě tabunem.

8. Použitá literatura

Bajgar J. Complex view on poisoning with nerve agents and organophosphates. *Acta Medica* 48 (2005), s. 3-21

Bajgar J. Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz: účinek, diagnóza a terapie. *Novinky v medicíně* 34. Avicenum, Praha (1985), s. 7-40

Bajgar J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. *Advances in Clinical Chemistry* 38 (2004), s. 151-216

Bajgar J. Patočka J. Mechanismus účinku a biologický efekt vysoce toxických organofosfátů a karbamátů. In: *Extrémně toxické nízkomolekulární syntetické jedy. Sborník ze symposia toxikologické chemie Československé společnosti chemické ČSAV, VLVDÚ, Hradec Králové* (1979), s. 61-84

Bajgar J. Používání chemických zbraní a jednání o jejich zákazu: od historie k současnosti. *Nucleus HK, Hradec Králové* (2006), 182 stran

Bajgar J. Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. *Vojenské Zdravotnické Listy* 41 (1972), s. 78-80

Bajgar J. The influence of inhibitors nad other factors on cholinesterases. *Sborník Vědeckých Prací LFUK-HK* 34 (1991), 77 stran

BRENDA - Comprehensive Enzyme Information System, URL <http://www.brenda-enzymes.info> (2008) [31.3.2008]

Coult D.B. , Marsh D.J., Read G. Dealkylation studies on inhibited acetylcholinesterase. *Biochemical Journal* 98 (1956), s. 869-873

- Davson H., Segal M.B. The blood-cerebrospinal fluid barrier. In: Physiology of the CSF and Blood-Brain Barriers. CRC Press, London (1996), s. 25-47
- Dawson R.M. Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning. Journal of Applied Toxicology 14 (1994), s. 317-331
- Doctor B.P. Butyrylcholinesterase: its use for prophylaxis of organophosphate exposure. In: Butyrylcholinesterase: its function and inhibition. Giacobini E., editor. Publisher Martin Dunitz, London (2003), s. 163-177
- Doležal P., Vachek J., Hrabálek A. In vitro transdermal permeation of a cholinesterase reactivator HI-6. In: Perspectives in percutaneous penetration. STS Publishing, Cardiff (1988), s. 84
- Ellman G.L., Courtney D.K., Andres V., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 7 (1961), s. 88-95
- Eyer P. The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. Toxicological Reviews 22 (2003), s. 165-190
- Fišar Z., Jiráček R. Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie. Grada, Praha (2001), 315 stran
- Fry M., Hoyda T.D., Ferguson A.V. Making sense of it: Roles of the sensory circumventricular organs in feeding and regulation of energy homeostasis. Experimental Biology and Medicine 232 (2007), s. 14-26
- Giacobini E. Butyrylcholinesterase: its role in brain function. In: Butyrylcholinesterase: its function and inhibition. Publisher Martin Dunitz, London (2003), s. 1-19
- Gordon R.K., Haigh J.R., Garcia G.E., Feaster S.R., Riel M.A., Lenz D.E., Aisen P.S., Doctor B.P. Oral administration of pyridostigmine bromide and Huperzine A protects human whole blood cholinesterases from ex vivo exposure to soman. Chemico-Biological Interactions 157 (2005), s. 239-246
- Hammond P.I., Jelacic T., Padilla S., Brimijoin S. Quantitative, video-based histochemistry to measure regional effects of anticholinesterase pesticides in rat brain. Analytical Biochemistry 241 (1996), s. 82-92
- Hozman, J., Bernas M., Klíma J., Dvořák P. Zpracování obrazové informace. [skriptum] ČVUT, Praha (2006)
- Chitravanshi V.C., Sapru H.N. Phrenic nerve responses to chemical stimulation of the subregions of ventral medullary respiratory neuronal group in the rat. Brain Research 821 (1999), s. 443-460
- Johnson A.K., Gross P.M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. FASEB 7 (1993), s. 678-686
- Karnovsky M. J., Roots L.A. "direct coloring" thiocholine method for cholinesterases. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 12 (1964), s. 219-221
- Kassa J., Franková K., Hoder ., Patočka J. A comparison of the efficacy of cholinolytics atropine and biperiden (Akineton) in combination with HI-6 on cholinergic and stressogenic effects of soman in rats. Homeostasis 37 (1996), s. 135-136

- Kassa J., Cabal J., Bajgar J., Szinicz L. The choice: HI-6, pralidoxime, or obidoxime against nerve agents? *ASA Newsletter* 97-4 (1997), s. 16-18
- Kassa J. Non-specific effects of organophosphorus inhibitors of cholinesterases. *Vojenské Zdravotnické Listy* 67 (1998), s. 15-19
- Kassa J. The influence of the time of antidotal treatment administration on its effectiveness against tabun-induced poisoning in mice. *Acta Medica* 47 (2004), s. 111-114
- Kassa J. The influence of the time of antidotal treatment administration of the potency of newly developed oximes to counteract acute toxic effects of tabun in mice. *Acta Medica* 48 (2005), s. 87-90
- Kassa J., Cabal J. A comparison of the efficacy of a new asymmetric bispyridinium oxime BI-6 with currently available oximes and H oximes against soman by in vitro and in vivo methods. *Toxicology* 132 (1999), s. 111-118
- Kassa J., Samnaliev I. Assessment of the therapeutic and anticonvulsive efficacy of a drug combination consisting of trihexyphenidyle and HI-6 in soman poisoned rats. *Acta Medica* 47 (2004), s. 171-175
- Kuča K., Cabal J., Kassa J., Jun D., Hrabínová M. A comparison of the potency of the oxime HLö-7 and currently used oximes (HI-6, pralidoxime, obidoxime) to reactivate nerve agent-inhibited rat brain acetylcholinesterase by in vitro methods. *Acta Medica* 48 (2005), s. 81-86
- Lallement G., Demoncheaux J.P., Foquin A., Baubichon D., Galonnier M., Clarencon D., Dorandeu F. Subchronic administration of pyridostigmine or huperzine to primates: compared efficacy against soman toxicity. *Drug and Chemical Toxicology* 25 (2002), s. 309-320
- Lojda Z. *Základy histochemického průkazu enzymů (příprava roztoků a pufrů)*. ÚDVZP, Brno (1970), 110 stran
- Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T. H. *Enzyme Histochemistry - A Laboratory Manual*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979), 339 stran
- Ma T., Cai Z., Wellman S.E., Ho I.K. A quantitative histochemistry technique for measuring regional distribution of acetylcholinesterase in the brain using digital scanning densitometry. *Analytical Biochemistry* 296 (2001), s. 18-28
- Marrs T.C., Maynard R.L., Sidell F.R. *Chemical Warfare Agents. Toxicology and Treatment*. John Wiley & Sons Ltd., New York (1996), 243 stran
- Patočka J., Kuča K., Jun D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta Medica* 47 (2004), s. 215–230
- Patočka J. Může stará čínská droga pomoci pacientům s Alzheimerovou chorobou? *Psychiatrie* 3 (1999), s. 23-24
- Patočka J., Fusek J., Bajgar J. Interakce organofosfátů a karbamátů s cholinesterázami in vitro. In: *Extrémně toxické nízkomolekulární syntetické jedy. Sborník ze sympozia toxikologické chemie Československé společnosti chemické ČSAV, VLVDÚ, Hradec Králové* (1979), s. 41-59

Paxinos G., Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press (1987)

Perry E. Cholinergic mechanisms and cognitive decline. *European Journal of Anaesthesiology*, 15 (1998), s. 768-773

Petrali J.P., Maxwell D.M., Lenz D.E., Mills K.R. Effect of an anticholinesterase compound on the ultrastructure and function of the rat blood-brain barrier: a review and experiment. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 23 (1991), s. 331-8

Prymula R. *Biologický a chemický terorismus – informace pro každého*. Grada, Praha (2002), 152 stran

Ruiz-Torner A., Olucha-Bordonau F., Valverde-Navarro A.A., Martínez-Soriano F. The chemical architecture of the rat's periaqueductal gray based on acetylcholin histochemistry: a quantitative and qualitative study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 21 (2001), s. 295-312

Shih T.-M., Kan R.K., McDonough J.H. In vivo cholinesterase inhibitory specificity of organophosphorus nerve agents. *Chemico-Biological Interactions* 157-158 (2005), s. 293-303

Schwarz M., Glick D., Loewenstein Y., Soreq H. Engineering of human cholinesterases explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons. *Pharmacology and Therapeutics* 67 (1995), s. 283–322

Smith J.C., Butera R.J., Koshiya N., Del Negro C., Wilson C.G., Johnson S.M. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254 (1991), s. 726–729

Sun Q.J., Goodchild A.K., Chalmers J.P., Pilowski P.M. The pre-Bötzinger complex and phase-spanning neurons in the adult rat. *Brain Research* 809 (1998), s. 204-21

Wang R., Yan H., Tang X. Progress in studies of Huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacologica Sinica* 27 (2006), s. 1-26

9. Souhrn

NPL patří mezi nejsilnější známé jedy. Vojenské nebo teroristické použití nervově paralytických látek je stále aktuální. Středem zájmu toxikologů je proto v současné době vývoj co nejúčinnějšího antidota jak pro profylaktické použití, tak pro terapii otravy NPL.

Hlavní toxický účinek NPL je inhibice enzymu acetylcholinesterázy (AChE), čímž tyto látky ovlivňují cholinergní nervový přenos. Kvantitativní histochemii AChE jsme proto zvolili za metodu, schopnou posoudit efekt silných organofosfátů morfologickým přístupem, s použitím digitální analýzy obrazu. Cílem této práce bylo popsat touto metodou jak obraz otravy NPL v jednotlivých částech nervové soustavy, tak účinek profylaktik a antidot proti NPL.

Laboratorní potkany jsme intoxikovali LD₅₀ nebo 1,2x LD₅₀ NPL (Tabun, Soman,

Sarin, VX or RVX). V druhé fázi jsme vyšetřovali skupiny s kombinací NPL a profylaktika či antidota, uvedené níže. Kryostatové řezy mozků byly histochemicky vyšetřeny simultánní detekcí AChE dle Karnovskyho a Rootse s detekcí alkalické fosfatázy.

Naše výsledky prokazují snížení aktivity AChE ve všech studovaných strukturách CNS při použití středních letálních dávek NPL, více u G-látek než u V-látek. Dále jsme prokázali reaktivační účinek obidoximu při otravě tabunem, méně silný reaktivační účinek látky HI-6, příznivý profylaktický účinek huperzinu A při expozici somanu.

V případě látky K048 při otravě tabunem jsme prokázali jen slabý nebo žádný reaktivační účinek. Neprokázali jsme profylaktický účinek huperzinu A při expozici RVX, ani zvýšenou propustnost oximů v okolí cirkumventrikulárních orgánů. Neprokázali jsme, že by některá z vyšetřovaných látek při svém účinku přednostně inhibovala nebo reaktivovala AChE v některém z medulárních respiračních center.

Inhibice AChE v mozkových jádrech a oblastech není uniformní pro žádnou ze zkoumaných NPL.

Metoda prokázala dobrou korelaci se standardně používaným biochemickým vyšetřením, navíc umožňuje posoudit histochemické změny *in situ*.

Tato dizertační práce byla podpořena Grantovou agenturou UK, projekt 82 /2005 C.

10. Summary

Nerve agents belong to the most important group of highly toxic substances. The threat of their use is still actual in local conflicts or in terrorist attacks. Looking for the optimal measures of medical protection (antidotal therapy and prophylaxis) against them remains in the center of interest of both military and civilian sector.

Basic mechanism of action of nerve agents is their interference with cholinergic neurotransmission through the irreversible inhibition of acetylcholinesterase (AChE). We chose quantitative evaluation of AChE histochemistry as a method to assess changes in nerve tissue after untreated or treated intoxication by nerve agents, using computer image analysis. Description of these changes were the aims of this doctoral thesis.

The laboratory rats were intoxicated by LD₅₀ or 1,2x LD₅₀ of agent (Tabun, Soman, Sarin, VX or RVX). Prophylactic, respectively antidotal doses of drugs stated below were used as well. The cryostat sections of brains were treated by simultaneous histochemical detection of AChE by Karnovsky and Roots and alkaline phosphatase.

The results prove a decrease of enzyme activity in all studied CNS areas treated by mean lethal doses of nerve agents, more in case of G-agents. We establish good effect of obidoxime to reactivate AChE inhibited by tabun, less strong effect of HI-6 after tabun intoxication and good prophylactic effect of Huperzine A in case of soman exposure.

We demonstrate disputable effect of K048 on reactivation of AChE inhibited by tabun. Nor prophylactic effect of Huperzine A for RVX intoxication, nor increased penetration of oximes in circumventricular organs, nor selective effect of nerve agents to any respiratory center of oblongata was found.

AChE inhibition in brain nuclei and areas is uniform for no studied nerve agents.

We documented that our method is in good agreement with standardly used biochemical assessment of AChE activity. Furthermore, our method is eligible to judge the histochemical changes *in situ*.

This work was supported by the Charles University Grant Agency, No 82/2005 C.

11. Strukturovaný přehled publikační činnosti

Původní publikace a statě ve sbornících:

1. **Hájek P.**, Kopřiva J. Double vena cava inferior – a case of variation based on persistence of continual left supracardinal vein. Plzeň. lék. Sborn., Suppl.78 (2003), s.15-17, ISBN 80-246-0651-8
2. **Hájek P.**, Slížová D., Krs O., Bajgar J. Comparison of changes in AChE activity in the brain of the laboratory rat after soman and tabun intoxication. Biomed. Papers 148 (2004), s. 209-211, ISSN 1213-8118
3. Bajgar J., **Hájek P.**, Slížová D., Krs O., Fusek J., Kuča K., Jun D., Bartošová L., Bláha V. Changes of acetylcholinesterase activity in different rat brain areas following intoxication with nerve agents: Biochemical and histochemical study. In: Chemicobiological Interactions, Elseviers, 165 (2007), s.14–21, ISSN 0009-2797 (IF 1,800)
4. Bajgar J., **Hájek P.**, Karasová J., Slížová D., Krs O., Kuča K., Jun D., Fusek J., Čapek L. Inhibition of Acetylcholinesterase in Different Structures of the Rat Brain Following Soman Intoxication Pretreated with Huperzine A In: International Journal of Molecular Sciences, 8 (2007), s.1165-1176, ISSN 1422-0067 (IF 0,679)
5. Čapek L., **Hájek P.** Databáze anatomických modelů pro samostudium. In: Mefanet 2007, sborník přednášek, Brno 21.-22.11.2007, publisher: MSD, CD verze, ISBN 978-80-7392-007-4
6. Čapek L., **Hájek P.** Databáze anatomických modelů pro samostudium. In: Mefanet report 01, Masarykova Univerzita, Brno (2008), s. 73-74, ISBN 978-80-210-4539-2

7. **Hájek P.**, Bajgar J., Slížová D., Krs O., Čapek L. Kvantifikace histochemie cholinesteráz při otravě inhibitory AChE. Sborník přednášek 2. morfologického postgraduálního kurzu, Faf UK, Hradec Králové (2007), s. 16–19, ISBN 978-80-254-1310-4

Abstrakta ve sbornících s mezinárodním standardním číslováním:

1. **Hájek P.** Temporal bone: Computer-aided teaching programme. In: Morphology 2003, Sborník abstrakt 41. sjezdu ČAS, Hradec Králové (2003) s. 15, ISBN 80-239-1412-X
2. **Hájek P.**, Slaninka I., Jirásek M. Topography of head and neck – pictorial documentation of dissected specimens. In: Morphology 2003, Sborník abstrakt 41. sjezdu ČAS, Hradec Králové (2003), s. 16, ISBN 80-239-1412-X
3. **Hájek P.**, Slížová D., Krs O., Bajgar J. Histochemical changes of nervous system induced by highly toxic inhibitors of cholinesterases (Preliminary study). In: New Approaches in Morphology, Sborník abstrakt 42. sjezdu SAS, Košice (2004), s. 28, ISBN 80-7097-554-7
4. **Hájek P.**, Procházková O., Pospíšilová B. Audiovisual documentation of dissection for new curriculum of dentistry studies. In: New Approaches in Morphology, Sborník abstrakt 42. sjezdu SAS, Košice (2004), s. 29, ISBN 80-7097-554-7
5. **Hájek P.**, Slížová D., Krs O., Bajgar J. Histochemický obraz otravy tabunem v mozku laboratorního potkana. In: Sborník abstrakt 1. morfologického postgraduálního kurzu, Hradec Králové (2005), s. 13, ISBN 80-239-4381-2
6. **Hájek P.** Temporal bone: Computer-aided teaching programme. In: Prague Medical Report 105 (2004) s.153, ISSN 1224-6994
7. **Hájek P.**, Slaninka I., Jirásek M. Topography of head and neck – pictorial documentation of dissected specimens. In: Prague Medical Report 105 (2004), s.154, ISSN 1224-6994
8. **Hájek P.**, Čapek L. Creation of virtual and material anatomic models by „rapid prototyping“ method. In: Morphology 2007, Sborník abstrakt 41. sjezdu SAS, Bratislava (2007), s.42-43, ISBN 978-80-89305-01-8

Přednášky a posterové prezentace:

1. **Hájek P.**, Kopřiva J. Dvojitá vena cava inferior – případ založený na perzistenci souvislé levé suprakardinální žíly. 40. sjezd ČAS, Plzeň 10.-12.9.2002
2. **Hájek P.** Os temporale: počítačová výuková pomůcka. 41. sjezd ČAS, Hradec Králové 15.-19.9.2003
3. **Hájek P.**, Slaninka I., Jirásek M. Topografie hlavy a krku: obrazová dokumentace vypitvaných preparátů. 41. sjezd ČAS, Hradec Králové 15.-19.9.2003
4. **Hájek P.**, Procházková O., Pospíšilová B. Audiovizuální zpracování pitev pro nové kurikulum stomatologického směru. 42. sjezd SAS, Košice 29.-30.6.2004

5. **Hájek P.**, Slížová D., Krs O., Bajgar J. Histochemické změny nervového systému vyvolané vysoce toxickými inhibitory cholinesteráz (předběžná studie). 42. sjezd SAS, Košice 29.-30.6.2004
6. **Hájek P.**, Slížová D., Krs O., Bajgar J. Porovnání změn acetylcholinesterázy v mozku laboratorního potkana po otravě somanem a tabunem. 5. Moravský morfologický den, Olomouc, 8.9.2004
7. **Hájek P.**, Slížová D., Krs O., Bajgar J. Histochemický obraz otravy tabunem v mozku laboratorního potkana. 1. morfologický postgraduální kurz, 15.2.2005
8. Čapek L., Blekta J., **Hájek P.** Hyperflexe krční páteře - počáteční studie. Setkání uživatelů MSC.Software, Brno 25.-26.5.2005
9. Slížová D., Krs O., **Hájek P.** Topografické prostory hlavy a krku z pohledu anatoma. Odborném seminář České společnosti otorhinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku ČLS JEP, Lázně Sedmihorky 16.9.2005
10. **Hájek P.**, Bajgar J., Slížová D., Krs O. Comparison of changes of AChE activity in brain of laboratory rat after sarin and VX intoxication. Morphology 2006 - 43-rd International Congress on Anatomy, Praha, 3.-6.9.2006
11. **Hájek P.**, Bajgar J., Slížová D., Krs O., Čapek L. Kvantifikace histochemie cholinesteráz při otravě inhibitory AChE. 2. morfologický postgraduální kurz, Hradec Králové 14.12.2006
12. **Hájek P.**, Slížová D., Krs O. Změny aktivity cholinesteráz po otravě nervově paralytickými látkami při profylaktickém podání huperzinu A. XI. vědecká konference LFUK–HK a FN HK, Hradec Králové, 23.1.2007
13. **Hájek P.**, Čapek L. Creation of virtual and material anatomic models by „rapid prototyping“ method. Morphology 2007 - 41-th International Congress of Slovak Anatomical Society, Bratislava 9.-12.9.2007
14. Čapek L., **Hájek P.** Databáze anatomických modelů pro samostudium. MEFANET 2007, Brno 21.-22.11.2007
15. **Hájek P.**, Bajgar J., Slížová D., Krs O. Hodnocení účinku profylaktik a antidot pro nervově paralytické jedy metodou kvantitativní histochemie. 3. morfologický postgraduální kurz, Hradec Králové, 13.12.2007
16. Bajgar J., **Hájek P.**, Fusek J., Jun D., Kassa J., Karasová J., Krs O., Kuča K., Musílek K., Slížová D. Cholinesterase reactivators: mapping of their effect in the rat brain (toxicological, biochemical and histochemical study). Chemical and biological medical treatment symposium VII, Spiez, Švýcarsko 13.-18.4.2008